



UNIVERSIDAD DE CHILE - FACULTAD DE CIENCIAS - ESCUELA DE PREGRADO

“EFECTO DE LOS LINFOCITOS T HELPER 17 EN EL MICROAMBIENTE TUMORAL”

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

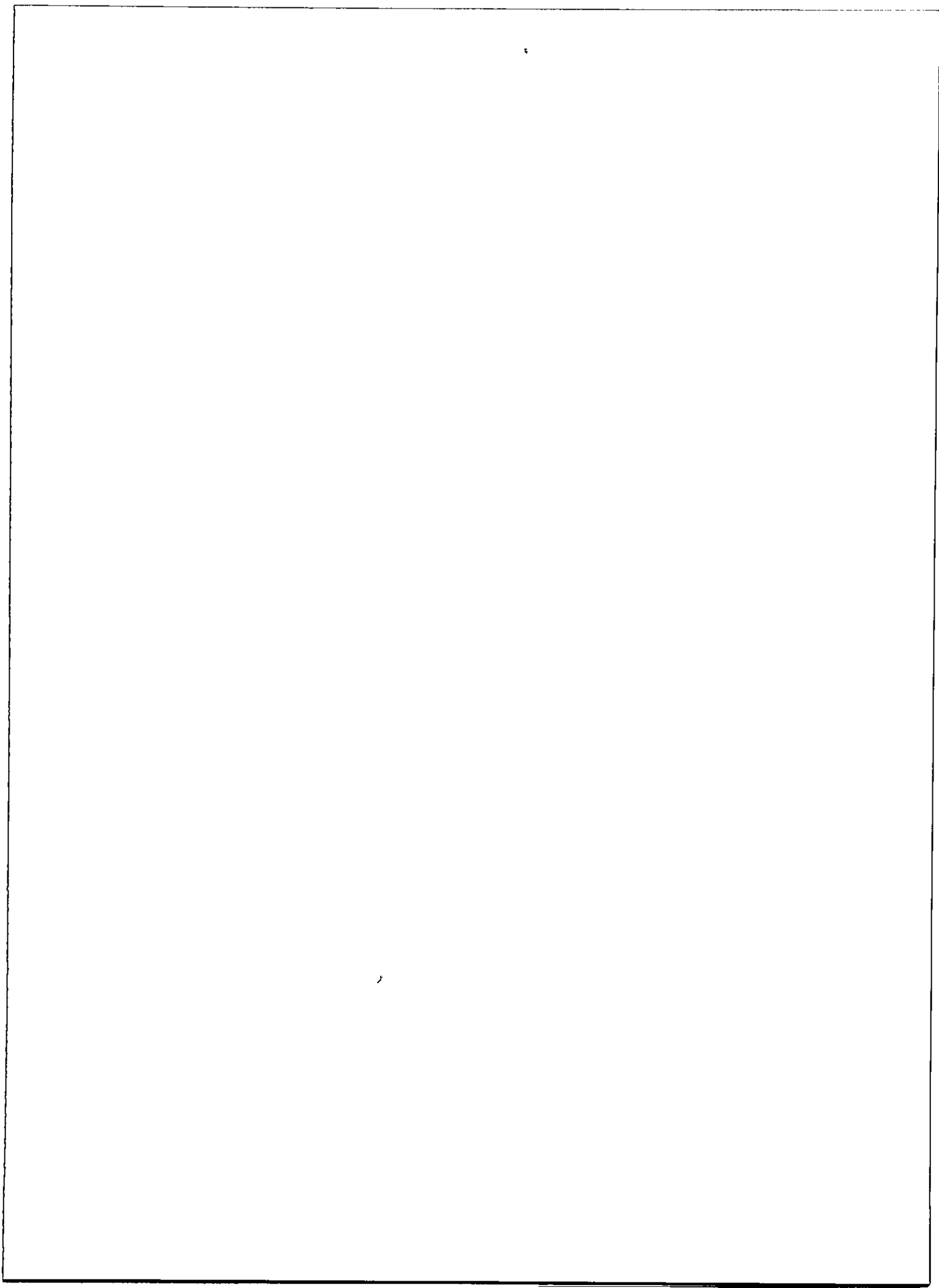
Juan José Tomás Sáez Pons

Directora del Seminario de Título:
Dra. María Rosa Bono

Co-Directores del seminario de Título:

Dra. Daniela Sauma
Dr. Mario Roseblatt

Marzo de 2014
Santiago - Chile





**“EFECTO DE LOS LINFOCITOS T HELPER 17 EN EL
MICROAMBIENTE TUMORAL”**

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

JUAN JOSÉ TOMÁS SÁEZ PONS

Dra. María Rosa Bono Merino
Directora Seminario de Título

Dra. Daniela Macarena Sauma Mahaluf
Co-Directora Seminario de Título

Dr. Mario Roseblatt Silber
Co-Director Seminario de Título

Comisión de Evaluación Seminario de Título

Dr. Miguel Allende Connelly
Presidente Comisión

Dra. María Inés Becker
Evaluadora

Santiago de Chile, Marzo de 2014

Juan José Tomás Sáez Pons

Dra. Daniela Macarena Sauma Mahaluf

Dr. Mario Roseblatt Silber

Miguel Allende

María Inés Becker

**“Comienza el día con una sonrisa, verás lo divertido
que es ir por ahí desentonando con todo el mundo”**
QUINO

BIOGRAFÍA



Dicen que la curiosidad mató al gato, la misma virtud que me ha llevado adelante en todos los pasos que he dado en la vida. Además ser insufriblemente molesto, de pequeño me preguntaba muchos “por qué” clásicos de la infancia, lo que me llevó directamente a disfrutar el aprender (ñoño desde pequeño). Hijo de madre bióloga me vi rápidamente envuelto en el mundo de la biología y de cómo es posible que exista algo tan complejo como lo es la vida. Al ir creciendo me iba encantando cada vez más con este universo tan complejo a nuestro alrededor hasta que decidí que mi futuro en la vida tenía que estar dentro de aquellas grandes mentes que trabajan día a día a resolver estos misterios. Caí casi por accidente en la carrera de Biotecnología en la Universidad de Chile, que me dio las herramientas y la oportunidad que necesitaba para seguir mis sueños, por los que le estaré eternamente agradecido. Gracias a Dios que no soy un gato porque puedo vivir de mi curiosidad.

AGRADECIMIENTOS

Solo he podido llevar adelante este proyecto con la ayuda de muchas personas a quienes les debo las gracias. Trataré de corresponder toda la ayuda que me han dado con algunas sencillas palabras que, espero, expresen lo que siento.

En primer lugar me gustaría agradecerle al grupo académico que me ayudo en la realización del seminario. A mi jefa, Daniela, quien me apoyo durante estos años, siempre dándome ánimos para poder seguir adelante, sin dejar que ningún mal resultado estropeará el espíritu del team. A María Rosa, por enseñarme que es la verdadera inmunología y haberme inspirado a seguir este camino que tanto he disfrutado. A Mario por tener una buena disposición para escuchar y aportar en cada paso que daba, siempre con ideas concisas que solucionaban problemas.

No puedo olvidar a Sarah, quien me acogió cuando llegué al laboratorio y por toda la paciencia que me tuvo al enseñarme pacientemente como empezar en este mundo. Muchísimas gracias a mis ompa loompas, Felipe y Dominique, quienes se incorporaron al team y me ayudaron con todos los experimentos que tenía que hacer, que sin su ayuda habría sido imposible.

Agradezco haber entrado a un laboratorio donde aparte de buena ciencia, existe un ambiente de cooperatividad que no se observa en todos lados. Un abrazo gigante al Leo, quien tuvo la mejor de las disposiciones cada vez que necesité su ayuda, ya sea con algún experimento, o simplemente para hablar de la vida. Mis compañeras de carrera con quien entre al laboratorio, Vale, Naty y Coté, con quienes fue un agrado compartir esta vida de pregrado. Nunca olvidaré a todas aquellas personas que me motivaron día a día en este proyecto: Cinthia, Gaby, Pauli, Paula, Yessia, Camila, Pame, Óscar y Zoila.

Cuando fue necesario distender de las presiones del laboratorio siempre tuve amigos que me ayudaron. Talo, Rolo, Mati, Ariel y Aliosha gracias por estar siempre disponibles para esos momentos de ocio tan necesarios para resistir.

Gracias a mi familia completa, con especial mención a mis padres, Manuel y Lola, que siempre me apoyaron y tuvieron la confianza en mi para dejarme viviendo solo en esta ciudad, sin que me sintiera abandonado. Agradezco cómo pudieron hacerme sentir siempre acompañado a kilómetros de distancia. También a mi hermano, Felipe, que, aunque nos tenemos ciertas diferencias, se que puedo contar con él. No quiero dejar de lado a mi familia política, Jorge, Blanca y Luciana, que me acompañaron durante estos años de tesis.

Por último, pero la más importante le agradezco al amor de mi vida, que siempre me acompaña, me escucha y me sobreestima. Siempre sacándome adelante, recordándome las cosas importantes de la vida. Te amo Claudia!!

ÍNDICE

ÍNDICE	vi
ÍNDICE DE FIGURAS	viii
LISTA DE ABREVIATURAS.....	ix
1. RESUMEN.....	2
2. ABSTRACT	2
3. INTRODUCCIÓN.....	3
3.1 El Sistema Inmune.....	3
3.2 Subtipos de Linfocitos <i>T Helper</i>	4
3.3 El Sistema Inmune y Cáncer.....	8
3.4 Sistema Inmune: ¿A favor o en contra del tumor?	9
3.5 Papel de las células Th17 en el desarrollo del cáncer	12
4. HIPÓTESIS	15
5. OBJETIVOS	15
5.1 Objetivo General.....	15
5.2 Objetivos Específicos	15
6. MATERIALES Y MÉTODOS.....	16
6.1 Ratones	16
6.2 Genotipificación de ratones RORc	16
6.3 Líneas y modelos tumorales.....	17
6.4 Procesamiento de órganos linfoides secundarios y tumor.....	18

6.5 Generación de células Th1 y Th17 <i>in vitro</i>	19
6.6 Transferencia adoptiva de células Th1 y Th17	20
6.7 Activación de linfocitos	21
6.8 Anticuerpos y citometría de flujo	21
6.9 Análisis de citoquinas en el microambiente tumoral	23
6.10 Análisis estadístico	23
7. Resultados	24
7.1 La deficiencia de linfocitos Th17 provoca una aceleración del crecimiento tumoral	24
7.2 Las células Th17 provocan una disminución de la IL-6 en el microambiente tumoral	25
7.3 Fenotipo de los linfocitos Th17 endógenos en el microambiente tumoral.....	27
7.4 Generación de linfocitos Th17 <i>in vitro</i>	30
7.5 Los linfocitos Th17 retrasan la progresión tumoral en ratones ROR ^{gfp/gfp}	32
7.6 Las células Th17 poseen un alto nivel de sobrevivencia y se diferencian hacia un fenotipo Th1 para ejercer su acción anti-tumoral.....	34
7.7 El microambiente tumoral modifica la expresión de CD39 en los linfocitos Th17 transferidos.....	37
8. Discusión	40
8.1 Crecimiento y microambiente tumoral en ratones deficientes en Th17	41
8.2 Fenotipo de linfocitos Th17 en tejidos asociados al tumor	43
8.3 Diferenciación a linfocitos Th17	44
8.4 Transferencia adoptiva de linfocitos Th17	45
9. Resumen de Resultados.....	48
10. Conclusión	49

11. Referencias	50
-----------------------	----

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Cinética de crecimiento tumoral en ratones C57BL/6 y ROR ^{gfp/gfp}	25
Figura 2. Análisis del patrón de citoquinas producidas por células provenientes del bazo, TdLN y tumor de ratones C57BL/6 y ROR ^{gfp/gfp}	27
Figura 3. Expansión y fenotipo de los linfocitos Th17 en el microambiente tumoral.....	29
Figura 4. Diferenciación de linfocitos T <i>helper in vitro</i>	31
Figura 5. Curva de crecimiento tumoral en ratones ROR ^{gfp/gfp} inyectados con células Th17 y Th1.	33
Figura 6. Fenotipo de las células Th17 y Th1 inyectadas en ratones C57BL/6 con tumores.	36
Figura 7. Fenotipo de las células Th17 y Th1 inyectadas en ratones ROR ^{gfp/gfp} con tumores.....	38
Figura 8. Expresión de CD39 y CD73 en células Th17 inyectadas en ratones con tumor.	39

LISTA DE ABREVIATURAS

ANOVA

CCR

Análisis de varianza.

CD

Receptor de quimioquina con motivo C-C.

DC

Clúster de diferenciación.

g

Célula Dendrítica.

GM-CSF

Aceleración de gravedad.

IFN

Factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos.

IL

Interferón.

LT

Interleuquina.

OVA

Linfocito T.

PBS

Ovoalbúmina

ROR γ t

Tampón de fosfato salino.

SFB

Receptor huérfano relacionado a RAR γ isoforma t.

TCR

Suero fetal bovino.

TGF- β

Receptor de linfocito T.

Th

Factor de crecimiento tumoral β .

TNF

T "*helper*".

WT

Factor de necrosis tumoral.

Wild Type, fenotipo silvestre.

1. RESUMEN

Los linfocitos T *helper* subtipo 17 (Th17) se han caracterizado a fondo en el desarrollo y progresión de enfermedades inflamatorias y autoinmunes, pero su papel en el cáncer es controversial. La producción de factores angiogénicos por las células Th17, sugiere su participación en la promoción del crecimiento tumoral, sin embargo, su actividad inflamatoria apoya la idea que puedan tener un papel en las respuestas anti-tumorales. Para discernir el papel real de esta población se utilizó un modelo de melanoma murino en el contexto de ratones deficientes de células Th17, se evaluó el crecimiento del tumor y el fenotipo de las células infiltrantes del tumor. Los ratones deficientes de Th17 presentan un aumento en la tasa de crecimiento tumoral en comparación con ratones silvestres, efecto que pueden ser revertido mediante la transferencia adoptiva de células Th17 generadas *in vitro* específicas contra el tumor. Las células Th17 son capaces de infiltrarse en el tumor y sus tejidos asociados, secretan IFN- γ y dentro del tumor y reducen la tasa de crecimiento tumoral. Además, estos linfocitos se mantienen en circulación en el sistema circulatorio de los ratones proporcionando una fuente continua de células efectoras anti-tumorales. Estos resultados revelan un papel inesperado de las células Th17 en respuestas anti-tumorales y abre nuevas posibilidades hacia el desarrollo de nuevas estrategias inmunoterapéuticas.

2. ABSTRACT

T helper subtype 17 (Th17) lymphocytes have been thoroughly characterized in the development and progression of inflammatory and autoimmune diseases, but their role in cancer is controversial. The production of angiogenic factors by Th17 cells suggest their involvement in promoting tumor growth however, their inflammatory activity supports the idea they may have a role in anti-tumoral responses as well. To discern the real role of this population we used a murine melanoma model in the context of Th17 deficient mice, evaluating tumor growth and tumor-infiltrating cells phenotype. Th17 deficient mice present an increase in the tumor growth rate compared to wild type mice, which can be reverted by adoptively transferring in vitro generated tumor-specific Th17 cells. Th17 cells are able to infiltrate the tumor and associated tissues, secrete IFN- γ within the tumor and reduce the tumor growth rate. Furthermore, these lymphocytes keep circulating the mice's circulatory system providing a continuous source of anti-tumoral effectors. These results reveal an unexpected role of Th17 cells in anti-tumor responses and open new possibilities towards the development of new immunotherapeutic strategies.

3. INTRODUCCIÓN

3.1 El Sistema Inmune

Desde tiempos remotos se conoce que el cuerpo humano tiene la capacidad de defenderse contra enfermedades mediante el reconocimiento de ciertos componentes provenientes de patógenos. Esta defensa contra las enfermedades es organizada y mediada por un conjunto de células denominado el sistema inmune. Hoy en día existe una visión más amplia de la función del sistema inmune, puesto que además del reconocimiento de componentes asociados a patógenos, involucra el reconocimiento de moléculas no propias y moléculas propias alteradas. De esta manera, el sistema inmune funciona como un arma ante enfermedades, como un control de calidad de las células propias y como un sensor que discrimina entre microorganismos patogénicos y no patogénicos (Abbas y col., 2010).

La respuesta inmune puede ser clasificada en innata y adaptable, de acuerdo al tiempo de reacción, especificidad y a la capacidad de generar memoria. La respuesta inmune innata corresponde a la primera barrera contra los patógenos, tanto física como biológica. Está compuesta por las barreras epiteliales, mucosas y una amplia gama de leucocitos, dentro de los cuales encontramos a los macrófagos y células dendríticas (DCs) (Dempsey y col., 2003). Estas células se encuentran en permanente alerta en busca de patógenos que son identificados por una serie de receptores codificados en la línea germinal denominados *Pattern Recognition Receptors* (PRR) diseñados para reconocer patrones moleculares asociados a patógenos (*Pathogen-Associated Molecular Patterns*, PAMPs). Al encontrar un patógeno, los macrófagos y DCs se activan, fagocitan al patógeno y secretan citoquinas pro-inflamatorias (como IL -1 β , IL-6, IL-12 y/o TNF-

α (Medzhitov y Janeway, 1997, Dempsey y col., 2003) estimulando y atrayendo a otras células del sistema inmune. La respuesta inmune innata marca el inicio de la defensa, es de reacción instantánea al reconocer al patógeno y efectiva. Aún así existen patógenos que escapan a la primera línea de defensa, para lo cual las DCs son capaces de activar la segunda barrera, más específica y efectiva que la primera, la respuesta inmune adaptable (Pancer y Cooper, 2006).

La respuesta inmune adaptable está compuesta por linfocitos T (LT) y linfocitos B (LB), cada uno equipado con un receptor (BCR para los LB y TCR para los LT) que no se encuentra codificado en la línea germinal, sino que se genera a partir de la recombinación genética de segmentos de genes que se ensamblan al azar. Por esta razón, tanto el BCR como el TCR pueden reconocer un amplio espectro de motivos moleculares.

Durante la activación de la respuesta inmune adaptable, las DCs producen péptidos provenientes del patógeno y los presentan a LT, activando clones capaces de reconocer el péptido en el contexto de moléculas de histocompatibilidad. Existen dos subtipos de LT, los LT CD8, caracterizados por la expresión de la proteína CD8 asociada al TCR los cuales son capaces de inducir la muerte de células infectadas por un patógeno, y los LT CD4, caracterizados por presentar la proteína CD4 asociada al TCR, y que tienen como función la producción de citoquinas encargadas de la comunicación celular.

3.2 Subtipos de Linfocitos T *Helper*

Los linfocitos T *helper* o CD4⁺ son células esenciales para el desarrollo de la respuesta inmune ya que actúan coordinando a otros componentes celulares del sistema inmune. Una vez activados por las DCs, los LT CD4⁺ se diferencian en distintos linajes,

los cuales se clasifican en base a su función y el patrón de citoquinas que secretan. Hasta hoy se han descrito 4 linajes distintos de linfocitos T *helper* denominados *T helper 1* (Th1), *T helper 2* (Th2), *T helper 17* (Th17) y T reguladores (Tregs). La diferenciación de los linfocitos T CD4⁺ hacia los diferentes linajes depende principalmente de las citoquinas presentes durante su activación (Murphy y Reiner, 2002, Weaver y col., 2006).

Los linfocitos T CD4⁺ se diferencian en células Th1 en presencia de interleuquina-12 (IL-12). Esta citoquina promueve, mediante la activación de STAT1 y STAT4, la expresión del factor de transcripción T-bet (Lighvani y col., 2001, Afkarian y col., 2002, Usui y col., 2003), controlador maestro del linaje (Szabo y col., 2000) que, junto a STAT4, son responsables del fenotipo Th1 completamente funcional (Thieu y col., 2008). Las células Th1 están asociadas principalmente a la respuesta inmune celular y se caracteriza por su capacidad de producir IFN- γ . Esta citoquina tiene propiedades antivirales directas, induce la expresión de moléculas de histocompatibilidad clase I y II (MHC-I y MHC-II) en las células nucleadas (Steimle y col., 1994, Zhou, 2009), activa procesos bactericidas en macrófagos (Boehm y col., 1997), aumenta la actividad de células NK (Carnaud y col., 1999) y regula la actividad y memoria de los LB aumentando la producción de anticuerpos y promoviendo el cambio de isotipo (Finkelman y col., 1988, Boehm y col., 1997).

Los linfocitos Th2 se generan en presencia de IL-4 que induce la expresión de GATA3, el factor de transcripción maestro de este linaje (Zhu y col., 2006). Estos linfocitos se caracterizan por la producción de IL-4, IL-5 e IL-13 y se encuentran asociados a la respuesta inmune humoral, teniendo un papel crítico en el desarrollo de asma y de otras reacciones alérgicas (Zhu y col., 2006).

Los linfocitos T CD4⁺ pueden diferenciarse a Tregs en presencia de TGF- β a

través de la activación del factor de transcripción Foxp3 (Fontenot y col., 2003). Estas células se caracterizan por regular negativamente la respuesta inmune, eliminando o evitando la activación de las células efectoras. Dentro de los mecanismos de supresión se encuentran: la secreción de citoquinas inhibitorias, la disrupción metabólica y la inhibición de la maduración de DCs entre otros (Vignali y col., 2008). Al activarse, los Tregs pueden secretar citoquinas inhibitorias como IL-10, TGF- β e IL-35 que son capaces de ejercer una función regulatoria sobre otras células (Joetham y col., 2007). Por otra parte, la expresión de ciertas enzimas por parte de los Tregs, tanto en la superficie celular como excretadas, permite a estas células eliminar ciertas moléculas del microambiente a su alrededor causando una disrupción metabólica en las células adyacentes. Un ejemplo de este proceso es la expresión de la ectonucleosidasa trifosfato difosfohidrolasa 1 (ENTPD1), también llamada Clúster de Diferenciación 39 (CD39), que cataliza la hidrólisis de ATP extracelular a ADP o AMP, eliminando el ATP utilizable por otras células en el medio. Esta acción es complementada por la expresión de una 5'-nucleotidasa denominada CD73, capaz de catalizar la hidrólisis de AMP a adenosina, la cual a través de la unión a sus receptores en las células adyacentes, aumenta los niveles de AMP cíclico intracelular, inhibiendo procesos de activación y proliferación (Huang y col., 1997). Estos variados mecanismos con los que cuentan los Tregs, permiten a estas células regular negativamente la respuesta inmune, convirtiendo a los Tregs en uno de los pilares de la inhibición de la respuesta inmune.

Por otra parte, los linfocitos Th17 son una población descrita recientemente como un linaje independiente a los linfocitos Th1 y Th2. Estas células se caracterizan por producir citoquinas proinflamatorias como IL-17A (IL-17), IL-17F, IL-21 e IL-22 y por estar regulados por un único factor de transcripción maestro llamado *RAR-related orphan receptor gamma t* (ROR γ t) (Ivanov y col., 2006) (Harrington y col., 2005). Se describen

como un linaje independiente de los ya descritos, puesto que no producen IFN- γ ni IL-4, ni están regulados por los factores de transcripción T-bet ni GATA-3 (Harrington y col., 2005). En el modelo murino se ha descrito que la diferenciación *in vitro* de los linfocitos Th17 depende directamente de las citoquinas TGF- β e IL-6, sin embargo existen discrepancias en cuanto al papel de TGF- β en este proceso (Zhou y col., 2007, Schumann y col., 2012). La función de los Th17 está relacionada a procesos de inflamación, donde la producción de IL-17 induce la secreción de numerosas citoquinas proinflamatorias (IL-1b, IL-6, TNF y GM-CSF), quimioquinas (CXCL1, CXCL5, IL-8, CCL2 y CCL7), péptidos antimicrobianos y metaloproteasas (MMP1, MMP3 y MMP13) por parte de fibroblastos, células epiteliales y células endoteliales (Iwakura y col., 2011). Desde su descubrimiento, los linfocitos Th17 han sido relacionados con la respuesta contra varias infecciones bacterianas, tanto gram negativas como positivas, y en especial en la defensa contra hongos (Infante-Duarte y col., 2000, Chung y col., 2003, Huang y col., 2004). Sin embargo, hoy se postula que estas células también poseen un papel determinante en el desarrollo de enfermedades autoinmunes. De esta forma, las células Th17 han sido relacionados con el pronóstico de ciertas enfermedades como la artritis reumatoide (Murphy y col., 2003, Nakae y col., 2003) y la esclerosis múltiple (Nakae y col., 2003, Langrish y col., 2005, Hofstetter y col., 2005).

Actualmente, varios trabajos plantean la distinción de dos tipos de células Th17 dependiendo de su patogenicidad; los linfocitos Th17 patogénicos o inflamatorios y los linfocitos Th17 regulatorios. El grupo de Lovett-Racke determinó que no todos los tipos de linfocitos Th17 generados *in vitro* pueden generar EAE, sino que requería de ciertos factores que aseguraran su patogenicidad (Yang y col., 2009). Estas células no patogénicas (Th17 regulatorios) no solo fallan al generar EAE, sino que además pueden secretar IL-10 otorgándoles funciones regulatorias (McGeachy y col., 2007). Más aún,

investigaciones recientes han demostrado que los linfocitos Th17 regulatorios pueden ser encontrados en el intestino delgado, donde controlan procesos de inflamación (Esplugues y col., 2011) y en el microambiente tumoral donde aún se desconoce el papel que cumplirían (Chalmin y col., 2012).

3.3 El Sistema Inmune y Cáncer

Hasta finales de la década de los 50 no existían argumentos formales que permitieran relacionar el cáncer con el sistema inmune. El paradigma no permitía el concepto que el sistema inmune pudiera identificar y destruir células propias, incluso aunque estas tuvieran un fenotipo alterado, ya que no se conocían antígenos propios de los tumores que no se encontraran en células no alteradas. Este concepto fue puesto a prueba en 1957, cuando Macfarlane Burnet y Lewis Thomas desarrollaron lo que se transformaría en la teoría de la "vigilancia inmune del cáncer" (*Cancer Immunosurveillance*) (Burnet, 1964, Burnet, 1970). Esta teoría propone que constantemente se están desarrollando múltiples focos tumorales en un organismo multicelular a partir de células somáticas transformadas o alteradas, las cuales adquieren ciertos antígenos que las distinguirían como células alteradas, siendo capaces de ser detectadas y eliminadas por el sistema inmune antes que el foco tumoral llegue a ser detectado clínicamente (Burnet, 1970). En un principio, la hipótesis no era muy aceptada, principalmente por la falta del conocimiento de antígenos tumorales, pero en los años 60, utilizando trasplantes singénicos de tumores en ratones se probó que se podía inmunizar un organismo contra un tumor. De esta forma se demostró que los tumores contenían antígenos propios de las células alteradas capaces de ser reconocidos por el sistema inmune, respaldando la teoría de la "vigilancia inmune" (Old y Boyse, 1964, Klein, 1966).

En el año 2001, un estudio reveló que los tumores generados en ratones inmunodeficientes tenían una mayor inmunogenicidad que los tumores generados en ratones inmunocompetentes (Shankaran y col., 2001). Las células tumorales en el ratón inmunocompetente están constantemente sometidas a una presión al ser atacadas por el sistema inmune, eliminando aquellas capaces de generar una respuesta inmune e ignorando a aquellas que poseen algún mecanismo de evasión, por esta razón, el sistema inmune estaría favoreciendo la generación de células tumorales menos inmunogénicas. Este descubrimiento dio origen a la teoría de la "inmunoedición del cáncer" (Cáncer Immunoediting) (Dunn y col., 2004), que explica como el sistema inmune constantemente busca y destruye células tumorales, a su vez seleccionando aquellas células con más posibilidades de evadir el ataque, hasta que finalmente una célula tiene el potencial de escapar completamente a la eliminación, generando un tumor.

Así, el estudio del sistema inmune y sus diversos componentes ha sido un eje fundamental en la batalla contra el cáncer. Terapias biológicas que mejoran el pronóstico de pacientes y complementan las terapias actuales, como la utilización de anticuerpos contra las moléculas inmunoregulatorias (Peggs y col., 2006, Brahmer y col., 2012, Topalian y col., 2012), fomentan que el conocimiento y utilización de la inmunología en terapias celulares para esta enfermedad.

3.4 Sistema Inmune: ¿A favor o en contra del tumor?

Una característica principal de las células tumorales es su proliferación descontrolada, lo que genera un importante estrés mitótico en las células, cambiando su patrón de expresión proteico. Péptidos provenientes de proteínas mutadas o péptidos que

se encuentran en una proporción anormal en la superficie celular permiten al sistema inmune la identificación de estas células para su eliminación. Por otro lado, las células tumorales que han sobrevivido al proceso de inmunoección poseen mecanismos de evasión a la respuesta inmune organizando un microambiente inmunosupresor. De esta forma, dentro de las células del sistema inmune que se encuentran en el microambiente tumoral, existen células que presentan una función antitumoral, y otras células inmunosupresoras que poseen actividad protumoral.

Entre las células con actividad antitumoral se encuentran aquellas con capacidad citotóxica, como son las células NK y los linfocitos T CD8. Las células NK reconocen la expresión moléculas de histocompatibilidad de clase I (MHC-I) y marcadores de estrés en las células del cuerpo (Waldhauer y Steinle, 2008). Las células tumorales, al estar sometidas a un estrés genético, sobreexpresan moléculas ligando de un receptor especial llamado NKG2D, expresado en células NK y en LT (Backstrom y col., 2004, Waldhauer y Steinle, 2008). Este receptor es capaz de activar las células NK gatillando la destrucción del tumor. Por otro lado, los linfocitos T CD8 reconocen, mediante el TCR, péptidos presentados en MHC-I, detectando la alteración en las células tumorales. Ambos tipos celulares son capaces de causar la lisis de células tumorales mediante vías similares basadas en la expresión de moléculas solubles citotóxicas contenidas en gránulos. Al reconocer sus ligandos, las células se activan y liberan gránulos citotóxicos que poseen moléculas con función directa de lisis celular como son perforinas y granzimas. Estas últimas activan la vía de señalización de las caspasas causando la muerte de la célula blanco (Trapani y Smyth, 2002).

Adicionalmente a las células citotóxicas, existe otra fracción de la respuesta efectora que se encarga de activar tanto la respuesta inmune innata, como la adquirida,

de tal forma de organizar una respuesta eficiente antitumoral. Los linfocitos Th1 detectan los péptidos alterados presentados en MHC-II, se activan y secretan moléculas proinflamatorias, en especial IFN- γ . Esta citoquina, como se explicó con anterioridad, induce la degranulación en las células citotóxicas promoviendo su actividad antitumoral, provoca la activación de macrófagos, induce la expresión de MHC de clase I y II en las células tumorales de manera de mejorar su detección y favorece la diferenciación de otros linfocitos T *helper* hacia células Th1.

Por otra parte, entre las células que disminuyen la respuesta inmune antitumoral se encuentran los Tregs y las células supresoras de origen mieloide (MDSC). Los Tregs son el pilar fundamental de la regulación de la respuesta inmune y los tumores han logrado utilizarlos en su favor. Los tumores secretan quimioquinas como CCL22, cuyo receptor CCR4 se expresa en los Tregs mediando el reclutamiento de estas células al microambiente tumoral (Woo y col., 2001, Curiel y col., 2004, Ishida y col., 2006, Wang y Wang, 2007). Una vez en los alrededores del tumor, estas células mitigan todas las respuestas antitumorales mediante sus diversos mecanismos de acción anteriormente descritos. Los Tregs expresan tanto CD39 como CD73 mediante los cuales genera adenosina extracelular. Esta molécula afecta de gran manera a los linfocitos T efectores, inhibiendo su activación y proliferación (Majumdar y Aggarwal, 2003, Zhang y col., 2004), su capacidad citotóxica y la producción de citoquinas (Ohta y col., 2009), e incluso generando anergia (Zarek y col., 2008).

Las MDSC están compuestas de una población heterogénea de células inmaduras de origen mieloide que poseen la capacidad de suprimir la respuesta inmune. Fueron descritas por primera vez en la década de los 90 en modelos animales de cáncer (Young y col., 1987). Esta población existe naturalmente en la médula ósea correspondiendo a un

20 a 30% de las células, y a un 4 a 5% de los esplenocitos de un ratón sano, pero en condiciones patológicas esta población se expande, llegando a ser un 10% de los esplenocitos y una gran parte de las células infiltradas en un tumor (Nuñez y col., 2012). La capacidad regulatoria de estas células se basa en varios mecanismos, entre ellos la expresión de arginasa-1 y de óxido nítrico sintasa inducible (iNOS). Estas enzimas catabolizan la degradación de la L-arginina extracelular, alterando el ciclo celular de linfocitos T e inhibiendo la maduración de DCs (Rodríguez y col., 2002).

3.5 Papel de las células Th17 en el desarrollo del cáncer

Los linfocitos Th17 han sido relacionados con inflamación y enfermedades autoinmunes, pero su rol activo en el cáncer aun es un tema controversial. Los fenómenos de inflamación se han asociado al cáncer tanto para su formación, mantención, invasión y metástasis, fomentando su malignidad; mientras que por otra parte, la inflamación también es la base de la respuesta inmune al ser utilizada para reclutar más leucocitos y ayudar en la eliminación de las células tumorales (Coussens y Werb, 2002, Rakoff-Nahoum, 2006, Grivennikov y col., 2010). Aún cuando en varios tipos de cáncer como melanoma (Kryczek y col., 2009), hepatocarcinomas (Zhang y col., 2009), cáncer de ovario (Miyahara y col., 2008), de próstata (Sfanos y col., 2008), de páncreas, renal (Kryczek y col., 2009) y en cáncer microcítico de pulmón (Koyama y col., 2008, Su y col., 2010) se ha descrito un aumento en el número de linfocitos Th17, el rol que cumplen estas células en la patología aún no es claro.

Variadas evidencias apuntan a un papel pro-tumoral de las células Th17 y de las citoquinas que producen. Mediante la inducción de inflamación, estos linfocitos pueden



promover la transformación celular, el crecimiento tumoral y metástasis (Mantovani y col., 2008). Además de IL-17, estas células son capaces de secretar IL-8, GM-CSF, TNF- α , IFN- γ (Pelletier y col., 2010). En conjunto, estas citoquinas reclutan y activan neutrófilos en el lugar de inflamación, en este caso al tumor, donde se encuentran relacionados con un diagnóstico negativo, al inducir un microambiente tolerogénico e inducir la proliferación de las células tumorales (Fridlender y col., 2009, Houghton y col., 2010).

Como ya se ha mencionado, el papel biológico de las células Th17 está fuertemente relacionado con la generación de inflamación. Estudios realizados en ratones inmunodeficientes revelan que la aplicación de IL-17 exógena induce la expresión de VEGF y prostaglandinas (E1 y E2) en células del estroma y fibroblastos, lo que promueve la vascularización del tumor (Tartour y col., 1999, Numasaki y col., 2003, Numasaki y col., 2005). Además, la IL-17 induce la producción de IL-6 *in situ*, aumentando la expresión del factor de transcripción STAT-3 en las células tumorales promoviendo su proliferación y sobrevivencia (Wang y col., 2009). Más aún, ratones incapaces de reaccionar ante IL-17, knock out para el receptor de IL-17 (IL-17R), presentan una disminución en el número de MDSC capaces de infiltrar el tumor lo que provoca una reducción en el crecimiento tumoral (He y col., 2010).

Por otro lado, han surgido numerosos trabajos que postulan un efecto antitumoral de las células Th17. Estudios realizados en modelos murinos indican que las células Th17 tienen una relación directamente proporcional con la infiltración y actividad de células efectoras (linfocitos T citotóxicos, células productoras de IFN- γ y células NK) e indirectamente proporcional con linfocitos Tregs (Curiel y col., 2004, Martin-Orozco y col., 2009, Kryczek y col., 2009), (Nuñez y col., 2012). Incluso, un estudio del grupo de Restifo demuestra que en un ratón receptor linfopénico, las células Th17 son capaces de

erradicar melanomas establecidos de una forma dependiente de IFN- γ (Muranski y col., 2008).

Este conjunto de datos contradictorios no permite dilucidar el verdadero papel que cumplen los linfocitos Th17 en el cáncer. Sin embargo cabe destacar que la mayoría de las evidencias que avalan la capacidad protumoral de estas células se enfocan en la acción de IL-17. Recientemente se ha ampliado el arsenal de citoquinas que producen las células Th17, por lo cual reducir el efecto de las células Th17 a la producción de IL-17 resulta un modelo demasiado simplista. Más aún y agregando complejidad al papel de estas células en el cáncer, nuevos estudios indican que los linfocitos Th17 pueden adoptar un fenotipo regulatorio, fomentando así el desarrollo tumoral.

En este trabajo se analizó el papel de los linfocitos Th17 en la respuesta inmune anti-tumoral. Para esto, estudiamos el crecimiento tumoral en ratones que carecen de células Th17, el efecto de la transferencia adoptiva de células Th17 en el crecimiento tumoral y finalmente verificamos el efecto del tumor sobre los Th17 endógenos. Nuestros resultados indican que los linfocitos Th17 tienen una acción anti-tumoral, la cual podría ser mediada por la producción de IFN- γ por parte de estas células.

4. HIPÓTESIS

Los linfocitos Th17 poseen función anti-tumoral.

5. OBJETIVOS

5.1 Objetivo General

- Estudiar la función de los linfocitos Th17 en el microambiente tumoral.

5.2 Objetivos Específicos

- Estudiar el crecimiento tumoral en ratones deficientes de linfocitos Th17.
- Estudiar el fenotipo de los linfocitos Th17 en el microambiente tumoral.
- Generar linfocitos Th17 *in vitro* y demostrar su efecto antitumoral.
- Describir la estabilidad y actividad de los linfocitos Th17 en el tiempo.

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 Ratones

Ratones C57BL/6 (WT), OT-II, B6.129P2(Cg)-*Rorc*^{tm2Litt/J} (RORc) y ratones B6.SJL-*Ptprc*^a *Pep3*^b/BoyJ (CD45.1), fueron comprados a *The Jackson Laboratories*. Los ratones homocigotos RORc (o ROR γ ^{t^{gfp/gfp}}) poseen un *knock-in* de GFP en el gen ROR- γ , específico para la isoforma ROR- γ _t, por lo cual son incapaces de expresar el factor de transcripción ROR γ _t, y son deficientes en linfocitos Th17. Los ratones heterocigotos (ROR γ ^{t^{gfp}}), son utilizados como reporteros, ya que los Th17, al expresar ROR γ _t, coexpresan GFP (Eberl y col., 2004). Los ratones OT-II presentan una inserción genética en el cromosoma Y que les permite expresar en linfocitos T CD4⁺ un TCR transgénico (cadenas V α 2 y V β 5) con especificidad contra un péptido de ovoalbúmina (OVA₃₂₃₋₃₃₉), presentado en contexto de MHC-II I-A^b. Ratones OT-II que expresan ambas isoformas de CD45 (CD45.1 y CD45.2) se generaron mediante la cruce de ratones OT-II (CD45.2) con ratones B6.SJL-*Ptprc*^a *Pep3*^b/BoyJ (CD45.1). Todos los ratones fueron mantenidos en el bioterio de la Fundación Ciencia y Vida en condiciones libres de patógenos. Para los experimentos se utilizaron ratones entre 6 y 12 semanas de edad.

6.2 Genotipificación de ratones RORc

Para identificar el genotipo de las crías de los ratones transgénicos RORc que portan la mutación de forma heterocigota u homocigota se les realiza un ensayo de PCR. Para obtener ADN de cada ratón se utilizó el método *HOTSHOT*. Para esto, un trozo de 1-2 mm de cola del ratón se sumerge en solución de lisis alcalina (NaOH 2,5 mM+ EDTA

0,2mM, pH 12) y se incubó por 2 horas. Finalmente, esta solución se neutraliza con una solución de Tris-HCl (40 mM), obteniendo ADN genómico del ratón listo para ser utilizado en una reacción de PCR.

El genotipo se verifica con una reacción de PCR tradicional utilizando Platinum PCR Supermix (Invitrogen) y el resultado se analiza mediante una electroforesis en un gel de agarosa 2,5%. El amplicón del gen no alterado tiene un peso molecular de 174 pb, mientras que el amplicón de la versión transgénica tiene un peso molecular de 241 pb.

6.3 Líneas y modelos tumorales

La línea tumoral de melanoma murino B16.F10 se obtuvo de ATCC. Las células B16 que expresan la ovoalbúmina, B16-OVA fueron donadas por el Dr. Randolph Noelle (King's College, Londres). La línea murina de cáncer de vejiga MB-49 fue donada por la Dra. María Inés Becker (Biosonda). La línea murina de hepatocarcinoma Hepa 1-6 fue donada por el Dr. Luis Burzio (Fundación Ciencia y Vida). Para la obtención de tumores intradérmicos, $0,3 \times 10^6$ (B16.F10, B16-OVA) o 2×10^6 (MB-49, Hepa 1-6) células se inyectaron por vía intradérmica (i.d.) al costado derecho de ratones de 6 semanas de edad. La evolución del tamaño de los tumores se evaluó cada dos días mediante dos mediciones perpendiculares del tumor realizadas con un pie de metro. Los tumores se desarrollan en el ratón hasta un tamaño máximo de 250 mm^2 antes de ser sacrificados.

6.4 Procesamiento de órganos linfoides secundarios y tumor

Para la obtención de esplenocitos, el bazo del ratón se disectó y se recibió en una placa de Petri con 10 mL de RPMI + 10% SFB y se perfundió para obtener una suspensión celular. Esta se centrifugó a 600 x g durante 7 minutos y se resuspendió en 2 mL buffer de lisis de glóbulos rojos (RBC Lisis Buffer, eBioscience) durante 5 minutos. Las células se lavaron con RPMI + 10% SFB y se resuspendieron en 10 mL del mismo medio.

Para la obtención de células desde los ganglios linfáticos, éstos se disectaron y se disgregaron con una tijera. Finalmente, la suspensión celular se filtró por una malla metálica de 90 μm , llevando a un volumen de 7 mL con RPMI + 10% SFB.

Tumores entre 50 y 150 mm^2 se disectaron y disgregaron mecánicamente con una tijera en HBSS + 5% SFB. Luego, la suspensión celular y restos de tejido se traspasaron a un tubo falcon de 15 mL y se realizó una digestión enzimática con 2 mg/mL de Colagenasa D (Roche) y 2 mg/mL de DNasa I (Roche). Luego se incubaron a 37°C con agitación suave durante 30 minutos. Al terminar la digestión, el tejido se filtró a través de una malla de 70 μm (cell strainer, BD), luego se centrifugó a 500 x g durante 5 minutos y se resuspendieron en 2 mL de buffer de lisis de glóbulos rojos por 5 minutos. Tras el tratamiento, las células se lavaron y luego resuspendieron en 3 mL de Percoll 40%. Con una pipeta Pasteur, se agregó el mismo volumen de Percoll 70% bajo la suspensión celular, y se centrifugó a 750 x g durante 20 minutos, a temperatura ambiente. Luego, se recuperó el anillo que se produce entre las dos fases que contiene las células mononucleares y se traspasó a otro tubo donde se lavan con HBSS + 5% SFB de manera de eliminar el Percoll existente. Finalmente, las células se resuspendieron en 3 mL de medio.

6.5 Generación de células Th1 y Th17 *in vitro*

Para obtener células Th1 y Th17 específicas contra OVA, se aislaron linfocitos T vírgenes a partir de ratones OT-II y se activaron, en diferentes condiciones polarizantes, con células dendríticas obtenidas a partir de ratones C57BL/6.

Los linfocitos T vírgenes se aislaron a partir del bazo de un ratón OT-II. Para esto, luego de la lisis de glóbulos rojos, los esplenocitos se incubaron con perlas magnéticas acopladas a anticuerpos α -CD4 (Miltenyi Biotec)(75 μ L de perlas por cada 100 millones de esplenocitos) en Verseno + 5% SFB, durante 20 minutos a 4°C con agitación rotatoria suave. Luego se realizó la selección positiva de los linfocitos T CD4 mediante separación inmunomagnética (Columnas LS, Miltenyi Biotec). La fracción positiva contiene los LT CD4+. La pureza de la preparación se verificó cada vez mediante citometría de flujo, obteniéndose siempre al menos un 85% de células CD4+.

Para obtener células dendríticas, se disectó el bazo de un ratón C57BL/6, y se recibió en 10 mL de RPMI + 10% SFB. Se disgregó con una tijera, se realizó la digestión enzimática con 2 mg/mL de Colagenasa D (Roche) y 2 mg/mL de DNAsa I (Roche) y se incubó a 37°C con agitación rotatoria leve durante 45 minutos. Al finalizar la incubación, la muestra se filtró en un *cell strainer* de 70 μ m, se centrifugó a 600 x g durante 7 minutos y se resuspendió en 2 mL buffer de lisis de glóbulos rojos durante 5 minutos. Tras la lisis de glóbulos rojos, las células se lavaron y resuspendieron en 10 mL de RPMI + 10% SFB. Para aislar las DCs, los esplenocitos se incubaron con perlas magnéticas acopladas a anticuerpo α -CD11c (Miltenyi Biotec)(30 μ L de perlas por cada 100 millones de esplenocitos) en Verseno + 5% SFB, durante 20 minutos a 4°C con agitación rotatoria suave. Luego de la incubación, se lavaron y resuspendieron en 1 mL de Verseno + 5%

SFB. La suspensión celular se traspasó a una columna (Columna LS, Miltenyi Biotec) sometida a un campo magnético, de manera que células marcadas con las perlas quedan atrapadas en la columna, luego se lava la columna, se saca del magneto y se eluyen las células. Las células se centrifugaron y se resuspendieron en medio de cultivo, IMDM (Iscove's Modified Dulbecco's Media) suplementado con 10% de SFB, 0,25µg/mL de Fungizona y 0,05 µM de β-mercaptoetanol.

Una vez obtenidas las DCs y los linfocitos T vírgenes, las células se cocultivaron a una proporción 1:5 (20.000 DCs y 100.000 linfocitos T vírgenes) por pozo, en placas de 96 pocillos, en presencia del anticuerpo α-CD3 (eBioscience) a una concentración final de 1 µg/mL para activar a los linfocitos T vírgenes. Para polarizar hacia un fenotipo Th17, el medio se suplementó con 5 ng/ml de TGF-β (eBioscience), 20 ng/ml de IL-6 (R&D System), 10 ng/ml de IL-1β (R&D System) y 5µg/mL de un anticuerpo α-IFN-γ (BioLegend). En el caso de la polarización hacia linfocitos Th1 el medio se suplementó con 10 ng/mL de IL-12 (R&D Systems) y 10 ng/mL de IL-2 (eBioscience). El cocultivo se incubó durante 4 días a 37°C y 5% CO₂, luego de lo cual se verificó el fenotipo de los linfocitos resultantes mediante citometría de flujo.

6.6 Transferencia adoptiva de células Th1 y Th17

Al día 10 posterior a la inyección i.d. de células tumorales, 1 x 10⁶ células Th17 o Th1 generadas *in vitro* se inyectaron en el ratón por vía intravenosa (i.v.). Cuando fue necesario marcar las células a inyectar, se lavaron las células con PBS y se resuspendieron en 5µM de CellTrace™ Violet (Invitrogen) en medio PBS a 37°C y agitación suave durante 10 minutos, luego se lavaron con PBS y se inyectaron al ratón.

En el caso de un experimento de crecimiento tumoral, se realizó un seguimiento al crecimiento al medir los tumores en el tiempo hasta el día 21, día en el cuál los ratones son sacrificados para análisis.

6.7 Activación de linfocitos

Para analizar la expresión de citoquinas por parte de linfocitos se realizó una activación *in vitro* independiente de TCR. Los linfocitos aislados fueron incubados en RPMI 10% SFB, en presencia de PMA 0,25 μ M (Sigma), ionomicina 1 μ g/mL (Sigma) y 1 μ L de Brefeldina A (GolgiPlug, BD Biosciences), durante 4 horas a 37°C y 5% CO₂. Luego de la incubación, se centrifugaron a 600 x g durante 7 minutos y se resuspendieron en PBS + 2% SFB.

6.8 Anticuerpos y citometría de flujo

Para analizar las células obtenidas de los ratones y las células generadas *in vitro* se usó citometría de flujo multiparamétrica.

Los anticuerpos contra CD3-FITC (clon 17A2), CD4-APC-eFluor780 (clon GK1.5), CD39-PE (clon 24DMS1), CD73-PE-Cy7 (clon TY/11.8), CD11c-APC (clon N418), V α 2-PE (clon B20.1), CD16/32 (clon 93), CD25-PE (clon PC61.5), CD45.2-PE-Cy7 (clon 104) y IFN- γ -Alexa 647 (clon XMG1.2) se compraron a eBioscience; el anticuerpo contra CD19-APC-Cy7 (clon 1D3) se compró a BD Pharmigen; y los anticuerpos que reconocen CD4-APC (clon GK1.5), I-Ab-FITC (clon 25-09-17), B220-PE-Cy7 (clon Ra3-6B2), V β 5-APC

(clon MR9-4), CD45.1-APC (clon A20) y IL-17-PE (clon TC11-18H10.1) se compraron a BioLegend.

Para la detección de moléculas de superficie mediante citometría de flujo, las células se incubaron con un anticuerpo contra CD16/CD32 (Fc Block) en medio PBS + 2% SFB durante 20 minutos a 4°C y oscuridad para bloquear receptores Fc. Luego, se lavaron las células con PBS + 2% SFB y centrifugaron a 600 x g por 7 minutos. Posteriormente, las células se incubaron con los respectivos anticuerpos fluorescentes en PBS + 2% SFB durante 30 minutos a 4°C y oscuridad. De manera de descartar células muertas, las células se lavaron nuevamente y se incubaron con un reactivo para determinar viabilidad (LiveDead Cell Viability Dye, Life Technologies) diluido en PBS (1µL de LiveDead por mL de PBS) a 4°C por 30 minutos. Finalmente, se lavaron con PBS + 2% SFB, se centrifugaron a 600 x g durante 7 minutos y se resuspendieron en 300 µL de PBS + 2% SFB para ser analizadas.

Para marcaje intracelular, luego del marcaje extracelular descrito anteriormente, las células se fijaron y permeabilizaron con 200 µL de BD Cytofix/Cytoperm (BD Biosciences) durante 20 minutos a 4°C y oscuridad. Al cabo de la incubación, las células se lavaron con 700 µL de Permwash (BD Biosciences) y se centrifugaron a 700 x g durante 8 minutos. Luego, las células se incubaron con los respectivos anticuerpos diluidos en 100 µL de Permwash durante 30 minutos a 4°C y oscuridad. Finalmente, se lavaron con 700 µL de Permwash, se centrifugaron a 700 x g por 8 minutos y se resuspendieron en 300 µL de PBS + 2% SFB. Las células se analizaron mediante citometría de flujo en un citómetro FACSCanto II (BD Biosciences), y los datos fueron procesados con el programa FlowJo (Tree Star, Inc.)

6.9 Análisis de citoquinas en el microambiente tumoral

Se aislaron células mononucleares de distintos órganos y se activaron con PMA 0,25 μ M (Sigma) y ionomicina 1 μ g/mL (Sigma) durante 4 horas a 37°C y 5% CO₂. Luego de la incubación se centrifugaron las células a 600 x g durante 7 minutos y se recolectó el sobrenadante. Los sobrenadantes se analizaron con el kit de citoquinas CBA Mouse Th1/Th2/Th17, que en conjunto detectan IL-10, IL-17, TNF- α , IL-4, IL-6, IFN- γ e IL-2.

6.10 Análisis estadístico

Para el análisis estadístico de las curvas de crecimiento tumoral entre distintas líneas tumorales y distintos tratamientos se utilizó un análisis de ANOVA de 2 vías con corrección de Bonferroni. Para el caso del análisis de secreción de citoquinas se analizó con mediante una prueba t de Student no pareada de 2 colas. Ambos análisis se realizaron en el programa GraphPad Prism 5.0c (GraphPad Software, San Diego, CA, EUA). Para ambos casos se considera la significancia con un valor de $p < 0,05$. (* $< 0,05$, ** $< 0,01$, *** $< 0,001$)

7. Resultados

7.1 La deficiencia de linfocitos Th17 provoca una aceleración del crecimiento tumoral

Para entender el papel que cumplen los linfocitos Th17 en la respuesta antitumoral, ratones que carecen de células Th17 ($ROR^{gfp/gfp}$) y ratones silvestres (C57BL/6) se inyectaron intradermicamente con diferentes líneas tumorales provenientes de melanoma (B16.F10), cáncer de vejiga (MB-49) y hepatocarcinoma (Hepa 1-6) y el crecimiento tumoral se monitoreó cada dos días. Como se observa en la figura 1, el crecimiento tumoral de todas las líneas celulares evaluadas se acelera en los ratones $ROR^{gfp/gfp}$ lo que sugiere que la ausencia de las células Th17 provoca una mayor tasa de crecimiento tumoral.

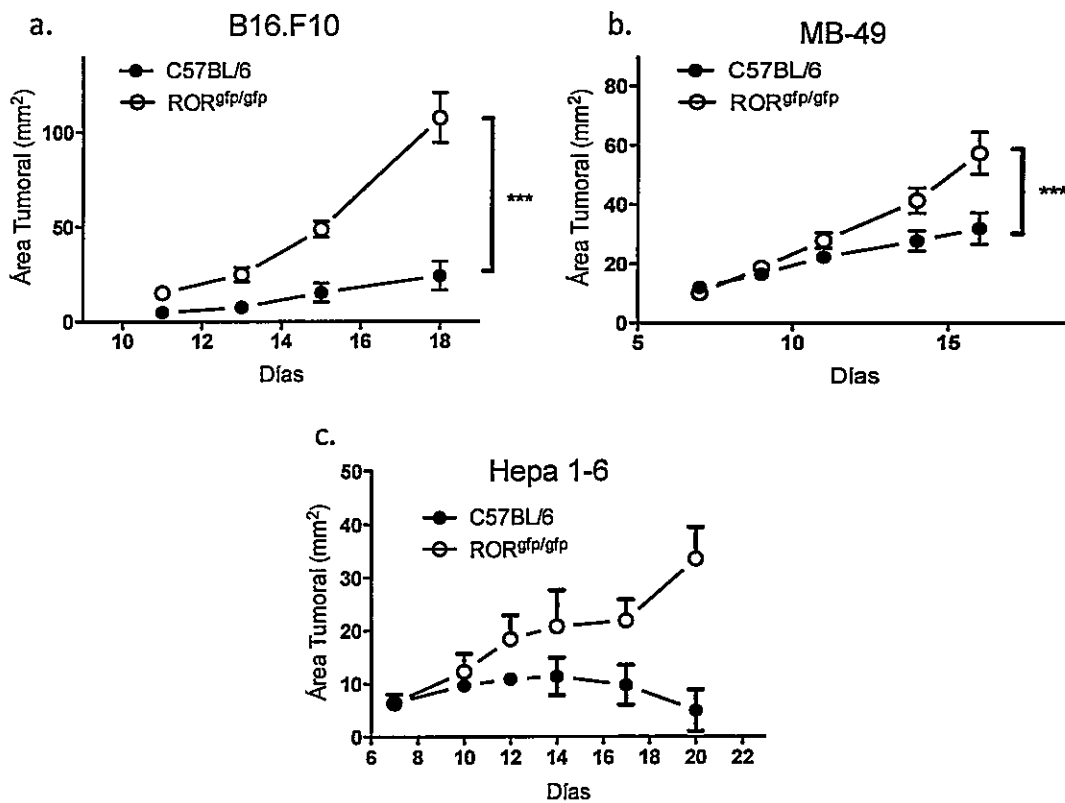


Figura 1. Cinética de crecimiento tumoral en ratones C57BL/6 y ROR^{gfp/gfp}. Ratones C57BL/6 y ratones deficientes de células Th17 (ROR^{gfp/gfp}) se inyectaron intradermicamente con (a). $0,3 \times 10^6$ células B16.F10, (b). 2×10^6 células MB-49 o (c). 2×10^6 células Hepa 1-6. Posteriormente se registró el crecimiento tumoral cada 2 días hasta ser sacrificados.

7.2 Las células Th17 provocan una disminución de la IL-6 en el microambiente tumoral

Para estudiar si un cambio en el patrón de citoquinas producidas en ausencia de células Th17 podría explicar las diferencias en el crecimiento tumoral entre ratones C57BL/6 y ROR^{gfp/gfp}, células del bazo, órgano linfóide drenante del tumor (TdLN) y del tumor se aislaron de ambos ratones y luego se activaron con PMA y ionomicina de tal manera de analizar las citoquinas producidas.

Tal como se esperaba, las células provenientes de ratones $ROR^{gfp/gfp}$ producen bajas concentraciones de IL-17 en el bazo, y no se encuentran niveles detectables de esta citoquina en el tumor (figura 2a). Los niveles de otras citoquinas como IFN- γ , TNF, IL-2 e IL-4 las cuales están asociadas a otros linajes *T helper* como Th1 y Th2 tampoco varían de forma significativa entre ratones silvestres y aquellos que carecen de células Th17 (figura 2b). En el caso de la IL-10, una citoquina relacionada con la inmunosupresión, se observa un aumento en la producción por parte de las células de bazo en ratones $ROR^{gfp/gfp}$, mientras que no ocurren cambios significativos en el microambiente tumoral (figura 2c). Finalmente, se observa un aumento significativo en las concentraciones de IL-6 en los sobrenadantes de activación de linfocitos capaces de infiltrar el tumor en ratones deficientes en células Th17 en comparación con ratones silvestres (figura 2d). Estos datos en conjunto indican que los ratones $ROR^{gfp/gfp}$ presentan alteraciones en el patrón de citoquinas que se producen en el microambiente tumoral.

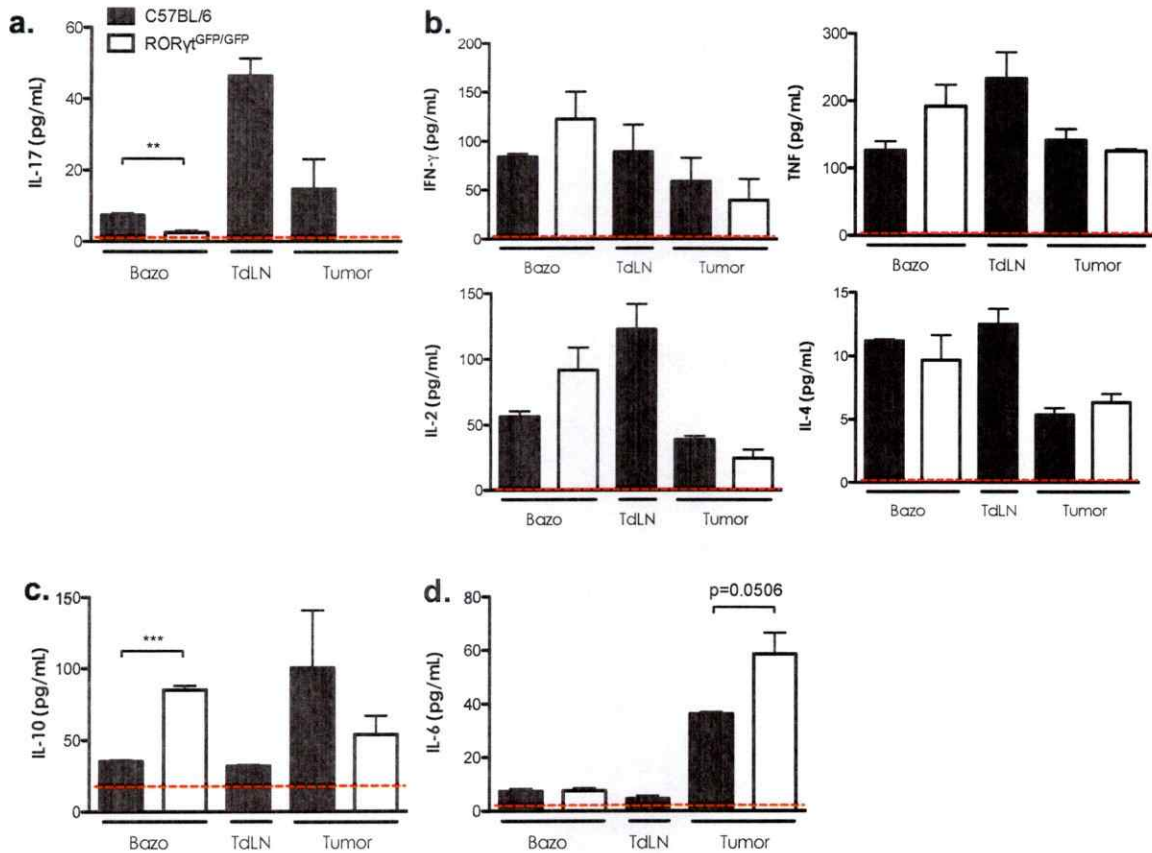


Figura 2. Análisis del patrón de citoquinas producidas por células provenientes del bazo, TdLN y tumor de ratones C57BL/6 y ROR^{gfp/gfp}. Ratones C57BL/6 y ROR^{gfp/gfp} se inyectaron con $0,3 \times 10^6$ células B16.F10 y al cabo de 10 días, se aislaron células de bazo, TdLN y tumor. Las células (1×10^6 células/mL) se activaron con PMA y Ionomicina por 4 horas. Luego de la incubación se recolectaron los sobrenadantes y se realizó un ensayo de CBA para detectar la concentración de IL-17 (a), IFN- γ , TNF, IL-2, IL-4 (b), IL-10 (c) e IL-6 (d). La línea roja punteada señala el límite de detección del kit.

7.3 Fenotipo de los linfocitos Th17 endógenos en el microambiente tumoral

El porcentaje de linfocitos Th17 en un humano o en un ratón saludables son extremadamente bajos, pero cuando se manifiestan ciertas enfermedades, como la esclerosis múltiple (o EAE en modelos murinos), esta población se expande y cumple un rol fundamental en la enfermedad (Matusevicius y col., 1999, Lock y col., 2002, Langrish y col., 2005). Para verificar si durante el desarrollo del cáncer también ocurre una expansión de células Th17, ratones ROR^{+/gfp} heterocigotos sanos y con tumores se analizaron en

busca de células GFP⁺ (que representan a la población de células Th17). Como se observa en la figura 3a, la población de linfocitos Th17 se expande en todos los órganos linfoides analizados en ratones con tumor en comparación con ratones sanos.

Nuevos estudios han revelado que las células Th17 pueden adoptar 2 fenotipos opuestos, un fenotipo inflamatorio o un fenotipo regulador (Lee y col., 2012). Por lo tanto, estas células Th17 en expansión podrían estar organizando una respuesta anti- o pro-tumoral. Por esta razón, se estudió el potencial regulador de las células Th17 provenientes de ratones con tumor mediante el análisis de la expresión en superficie de las ecto-nucleotidasas CD39 y CD73. Tanto en ratones sanos como en aquellos con tumor se observa que las células Th17 expresan la enzima CD73 encargada de la producción de adenosina, pero un mayor porcentaje de linfocitos provenientes de ratones con tumor expresan la enzima CD39 que provee el sustrato para la actividad de CD73 (figura 3b), indicando que el tumor favorece la expansión de células Th17 que presentan un fenotipo regulador.

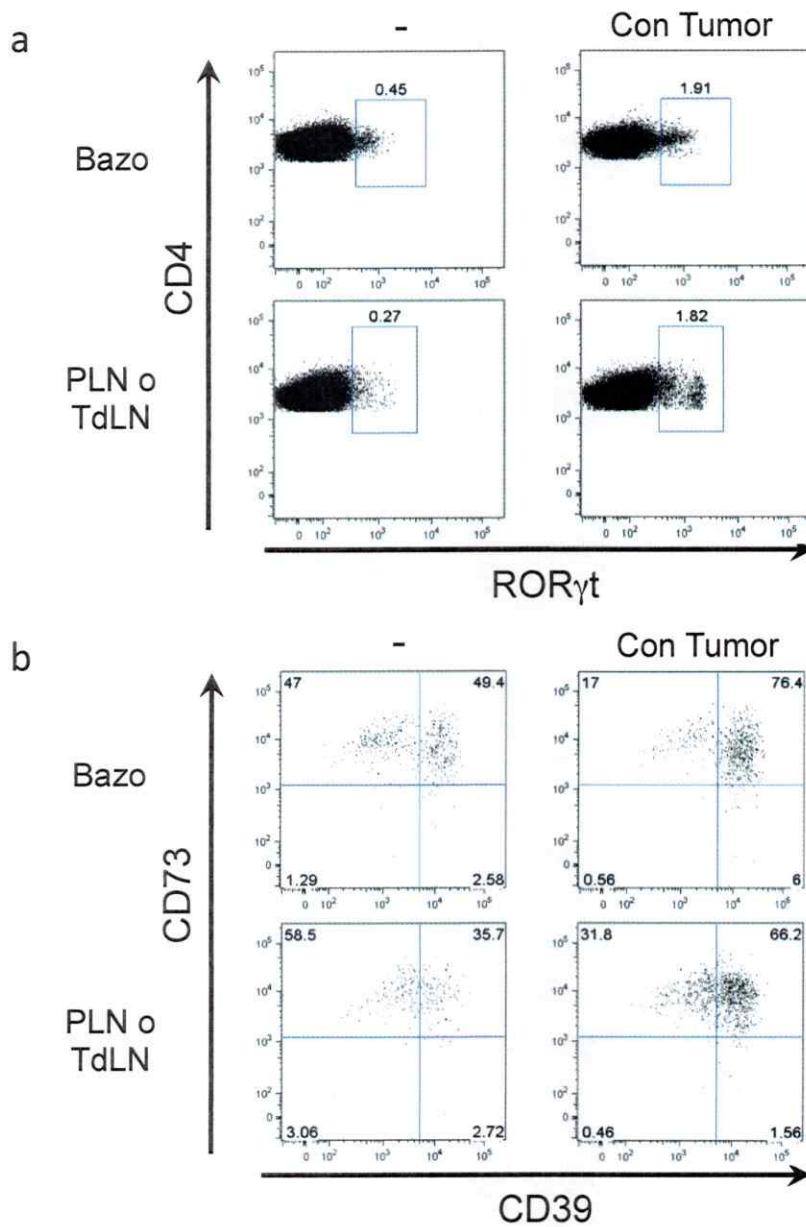


Figura 3. **Expansión y fenotipo de los linfocitos Th17 en el microambiente tumoral.** Células del bazo, PLN y TdLN provenientes de ratones heterocigotos $ROR\gamma_t^{+/gfp}$ con y sin tumor fueron aisladas y luego analizadas por citometría de flujo. **(a)** Se presentan sólo aquellas células $CD3^+CD4^+$ y el porcentaje de células Th17 se determinó en base a la expresión de GFP. **(b)** Las células $CD3^+CD4^+ROR\gamma_t^+$ (GFP^+) se analizaron para estudiar la expresión de CD39 y CD73, enzimas responsables de la producción de adenosina extracelular..

7.4 Generación de linfocitos Th17 *in vitro*

Para estudiar el papel de los linfocitos Th17 en la respuesta inmune anti-tumoral es necesario generar estas células *in vitro*. Las células Th17 se caracterizan principalmente por ser linfocitos T CD4⁺ capaces de producir y secretar IL-17, mientras que no producen IFN- γ (Harrington y col., 2005), por lo que se utilizó este criterio para evaluar diferentes protocolos de generación de células Th17.

En la literatura, la forma más común de generar células Th17 se realiza mediante un cocultivo de linfocitos T CD4 vírgenes y células dendríticas, en presencia de un medio polarizante hacia un fenotipo Th17, el cual consiste en la adición de las citoquinas TGF- β , IL-6 e IL-1 β (Guo y col., 2009). Otros grupos han demostrado la generación de células Th17 sin utilizar TGF- β , una citoquina también relacionada con la generación de linfocitos T reguladores (Nistala y Wedderburn, 2009, Das y col., 2009, Ghoreschi y col., 2010, Schumann y col., 2012). Mediante una aproximación empírica se estudiaron varias combinaciones de citoquinas en la generación de células Th17 y se determinó que el mejor protocolo para obtener linfocitos T CD4⁺ capaces de producir IL-17 es mediante la adición de TGF- β , IL-6 e IL-1 β , obteniendo más del doble de células Th17 en comparación a la utilización de un medio que carece de TGF- β (figura 4a). Por esta razón, en los experimentos que se muestran a continuación se utilizó este último protocolo para la generación de células Th17.

A modo de control, se generaron linfocitos Th1 mediante la diferenciación de linfocitos CD4⁺ en presencia de IL-12 e IL-2. Estas células tienen una función anti-tumoral extensamente estudiada (Knutson y Disis, 2005), por lo que su utilización provee de una

forma de comparar el efecto de las células Th17 sobre el tumor. Bajo las condiciones señaladas se logró generar sobre un 80% de linfocitos T CD4⁺ productores de IFN- γ (figura 4b). Cabe destacar que la producción de IFN- γ en los cultivos de generación de células Th17 es menor al 5%. Asimismo, el porcentaje de células productoras de IL-17 en los cultivos de generación de células Th1 no superó el 5% (figura 4b).

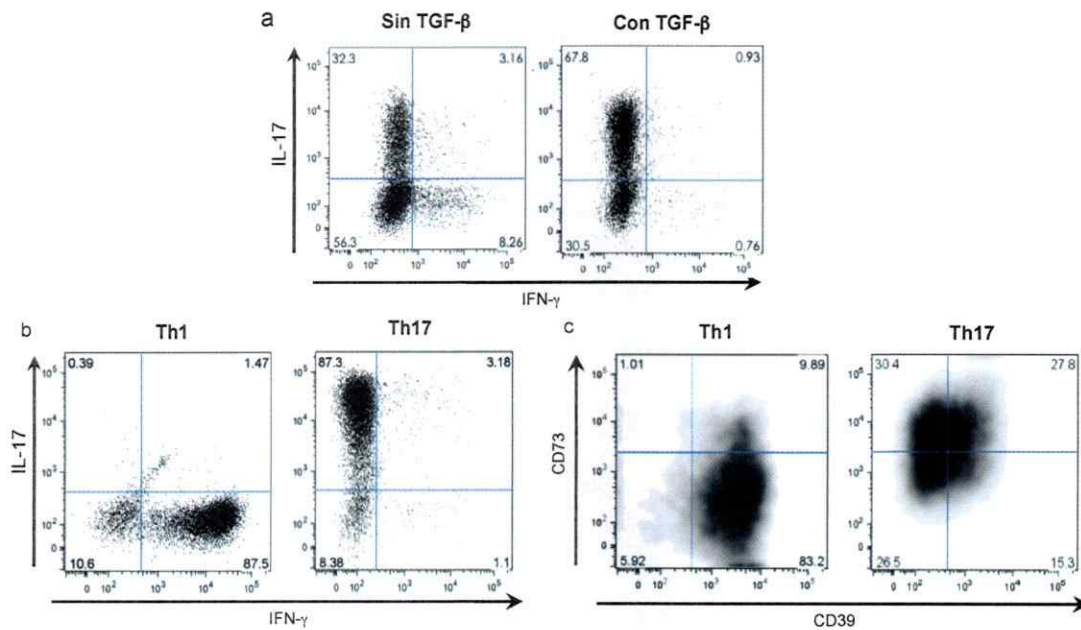


Figura 4. **Diferenciación de linfocitos T helper *in vitro*.** (a). Efecto de la adición de TGF- β en la generación de células Th17. Células T CD4⁺ aisladas del bazo de un ratón OT-II se cocultivaron con DCs aisladas del bazo de un ratón C57BL/6 y se activaron con 1 μ g/mL de α -CD3 en presencia de IL-6 (20 ng/ml), IL-1 β (10 ng/mL) y α -IFN- γ (5 μ g/mL). Los cultivos se realizaron en presencia o ausencia de TGF- β (5 ng/mL). (b). Diferenciación de células Th1 y Th17. Células T CD4⁺ aisladas del bazo de un ratón OT-II se cocultivaron con DCs aisladas del bazo de un ratón C57BL/6 y se activaron con 1 μ g/mL de α -CD3 en presencia de IL-12 (10 ng/mL) e IL-2 (10 ng/mL) para generar células Th1. Las células Th17 se diferenciaron en presencia de TGF- β (5 ng/mL), IL-6 (20 ng/ml), IL-1 β (10 ng/mL) y α -IFN- γ (5 μ g/mL). (c). Células Th1 y Th17, generadas en las mismas condiciones mencionadas en b, se analizaron en base a la expresión de CD39 y CD73. Las figuras a y b muestran el porcentaje de células productoras de IFN- γ e IL-17 luego de la activación de los cocultivos por 4 horas con PMA más Iononmicina en presencia de BFA. Todos los análisis se hicieron sobre la población CD4⁺.

Al tomar en consideración los estudios que identifican dos distintas poblaciones dentro de las células Th17 (Esplugues y col., 2011), se decidió verificar el potencial inmunosupresor de las células Th1 y Th17 generadas *in vitro*, mediante la expresión de

las ectonucleotidasas CD39 y CD73. Aunque CD39 es expresado en las células Th1, estas células no expresan la enzima CD73, encargada de la fase limitante en la producción de adenosina. Por el contrario, el análisis de la expresión de estas enzimas por parte de los linfocitos Th17 generados *in vitro* demostró que gran parte de las células expresan CD73, sin embargo existe un remanente importante de células que no expresan ni CD39 ni CD73 (figura 4c). Estos resultados permiten sugerir que el protocolo utilizado para obtener linfocitos Th17 genera células Th17 con una expresión heterogénea de CD39 y CD73 lo que podría dar cuenta de la obtención de una mezcla de células con potencial capacidad regulatoria e inflamatoria.

7.5 Los linfocitos Th17 retrasan la progresión tumoral en ratones ROR^{gfp/gfp}.

Como ya se ha demostrado, los ratones deficientes en el factor de transcripción ROR γ t y que por lo tanto carecen de células Th17, presentan un acelerado crecimiento tumoral en comparación a ratones C57BL/6, lo que ya entrega un indicio que las células Th17 tienen un papel anti-tumoral. Para corroborar la función anti-tumoral de los linfocitos Th17 se diseñó un experimento de transferencia adoptiva de células Th17 generadas *in vitro* a ratones con tumores pequeños y se evaluó el crecimiento tumoral. Para esto, ratones C57BL/6 y deficientes en células Th17 (ROR^{gfp/gfp}) se inyectaron intradérmicamente con una línea tumoral B16.F10 modificada (B16.OVA), capaz de expresar y presentar péptidos de la proteína ovoalbúmina (OVA). Luego, se generaron células Th17 y Th1 a partir de linfocitos T CD4⁺ de un ratón transgénico (OT-II) cuyos linfocitos T CD4⁺ tienen un TCR transgénico específico contra OVA. Finalmente, las células Th17 y Th1 se inyectaron en ratones con tumores B16.OVA visibles y se registró el crecimiento tumoral.

Los resultados obtenidos indican que tanto células Th17 como Th1 son capaces de limitar la tasa de crecimiento del tumor en los ratones $ROR^{gfp/gfp}$ en comparación a la inyección de PBS. Más aún, ratones $ROR^{gfp/gfp}$ inyectados con células Th17 presentan un crecimiento tumoral semejante a la tasa de crecimiento tumoral de ratones C57BL/6 (figura 5). Estos resultados indican que la transferencia adoptiva de células Th17 en ratones $ROR^{gfp/gfp}$ permite retrasar el crecimiento tumoral y permiten corroborar que, al igual que las células Th1, las células Th17 poseen una función anti-tumoral.

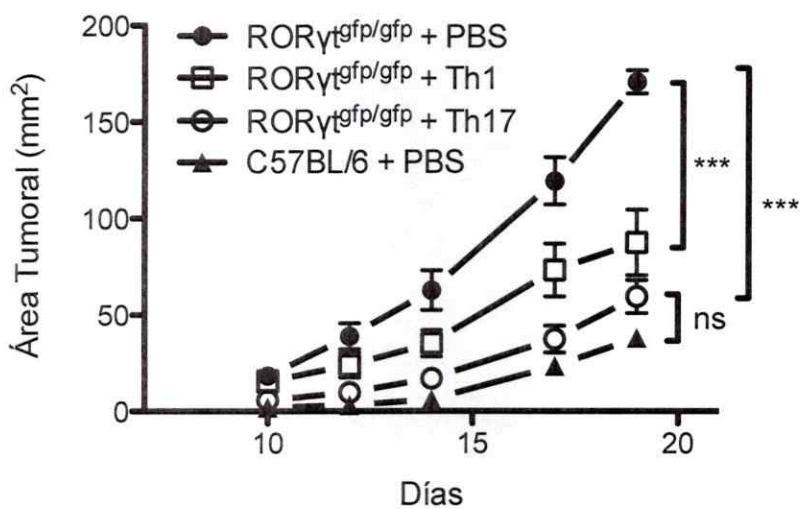


Figura 5. Curva de crecimiento tumoral en ratones $ROR^{gfp/gfp}$ inyectados con células Th17 y Th1. Ratones $ROR^{gfp/gfp}$ se inyectaron con la línea tumoral B16.OVA de forma intradérmica. Luego de 10 días, los ratones se dividieron en tres grupos que fueron inyectados con 1×10^6 células Th17, 1×10^6 células Th1 o PBS y se midió tamaño tumoral hasta el día 21. Se muestra además la curva de crecimiento tumoral en ratones C57BL/6.

7.6 Las células Th17 poseen un alto nivel de sobrevida y se diferencian hacia un fenotipo Th1 para ejercer su acción anti-tumoral.

Varios trabajos han analizado las características y la estabilidad de las células Th17. Se ha descrito que las células Th17 son capaces de convertirse a otros tipos celulares, como linfocitos T reguladores (Afzali y col., 2010) o a linfocitos Th1 (Lexberg y col., 2010). Por otro lado, otros trabajos han postulado que las células Th17 poseen características de células troncales, lo cual les permite tener una mayor sobrevida que otros tipos celulares y un mayor nivel de plasticidad (Muranski y col., 2011, Gattinoni y col., 2012). Por esta razón, estudiamos los mecanismos a través de los cuales las células Th17 estarían retrasando el progreso tumoral. Para resolver esta interrogante, ratones B6.SJL-*Ptprc*^a *Pep3*^b/BoyJ (ratones C57BL/6 cuyos leucocitos expresan la isoforma CD45.1) se inyectaron con la línea celular B16.OVA y 10 días después o cuando el tumor fuese visible, se les realizó la transferencia adoptiva de células Th1 o Th17 generadas a partir de ratones OT-II que expresan la isoforma CD45.2.

Al vigésimo día posterior a la inyección del tumor, las células Th17 se pueden observar claramente tanto en el bazo como en el TdLN, mientras que las células Th1 se encuentran en una menor proporción en estos órganos (figura 6a). Por otro lado, tanto las células Th1 como las Th17 son capaces de infiltrar el tumor en similares proporciones (figura 6a).

Al analizar la producción de citoquinas por parte de las células Th17 y Th1 inyectadas, se observa que un gran porcentaje de las células Th17 que se encuentran en el bazo y TdLN produce IL-17 pero no produce IFN- γ . Por otro lado, las células Th1 presentes en el bazo y TdLN siguen produciendo únicamente IFN- γ (figura 6b). Caso

completamente distinto ocurre con las células que infiltran el tumor, mientras que los Th1 mantienen su fenotipo, sin producir IL-17, las células Th17 inyectadas sufren una conversión hacia la producción de IFN- γ puesto que ocurre un aumento en el porcentaje de células IL-17⁺IFN- γ ⁺ y células IL-17⁻IFN- γ ⁺ (figura 6b). Estos datos indican que las células Th17 inyectadas poseen la capacidad de convertirse en células productoras de IFN- γ en el microambiente tumoral.

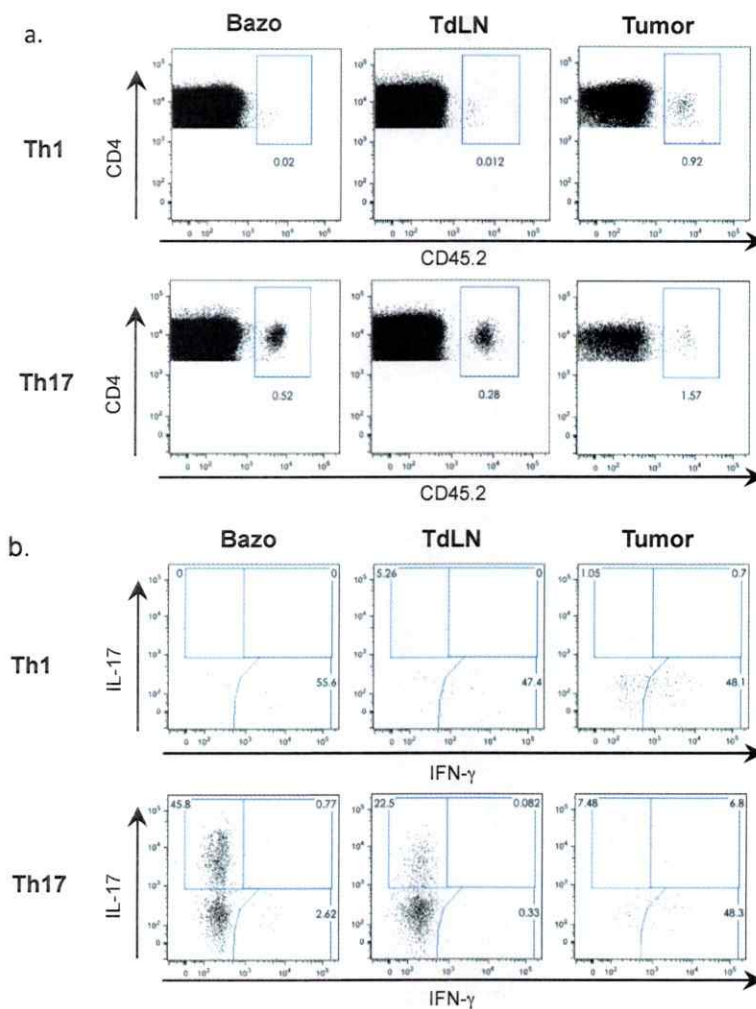


Figura 6. Fenotipo de las células Th17 y Th1 inyectadas en ratones C57BL/6 con tumores. (a). Células Th1 o Th17 (CD45.2⁺) se inyectaron en ratones C57BL/6 (CD45.1⁺) con tumor y al décimo día luego de la inyección se analizaron distintos órganos en busca de las células CD4⁺CD45.2⁺. **(b).** Células obtenidas desde el bazo, TdLN y tumor de ratones inyectados con células Th1 o Th17 se activaron con PMA y ionomicina en presencia de Brefeldina A durante 4 horas para posteriormente analizar la producción de citoquinas en las células CD4⁺CD45.2⁺.

Luego, estudiamos si este fenómeno de conversión de las células Th17 hacia células productoras de IFN- γ también ocurre en el modelo de ratón que carece de células Th17 (ROR^{gfp/gfp}). Los leucocitos de ratones ROR^{gfp/gfp} expresan la isoforma CD45.2, por lo que en estos ratones se inyectaron células Th1 y Th17 de un ratón OT-II que expresa ambas isoformas de CD45 (CD45.1⁺CD45.2⁺). En este modelo, (donde con anterioridad se demostró el efecto anti-tumoral al inyectar células Th17), observamos el mismo

fenómeno que se reportó en los ratones C57BL/6. Es así como luego de 20 días desde la transferencia adoptiva, las células Th17 se encuentran en el bazo de los ratones analizados, mientras que las células Th1 inyectadas no se encontraron, o se encontraron en un muy bajo porcentaje en el bazo. Sin embargo, tanto las células Th1 como Th17 se encontraron en similares proporciones en el tumor (figura 7a). Más aún, como se observó anteriormente, las células Th17 inyectadas producen IFN- γ y por lo tanto se convierten hacia un fenotipo Th1 al llegar al tumor, mientras que las células Th1 no logran producir IL-17 en ningún tejido analizado (figura 7b).

7.7 El microambiente tumoral modifica la expresión de CD39 en los linfocitos Th17 transferidos

Debido a que el porcentaje de células Th17 que expresa CD39 aumenta en el TdLN y bazo de ratones con tumores en comparación con ratones sanos (Figura 2b), estudiamos si la expresión de las ectonucleotidasas CD39 y CD73 también aumenta en células Th17 transferidas a ratones con tumores. Si bien las células Th17 generadas *in vitro* poseen una expresión intermedia para CD73 y baja para CD39 (figura 4c), 5 días después de la inyección en un ratón con tumor se observa un aumento en la expresión de CD39 en el TdLN a medida que estas células proliferan,(figura 8). Por otro lado, la expresión de CD73 se mantiene a medida que proliferan las células tanto en el bazo como el en TdLN.

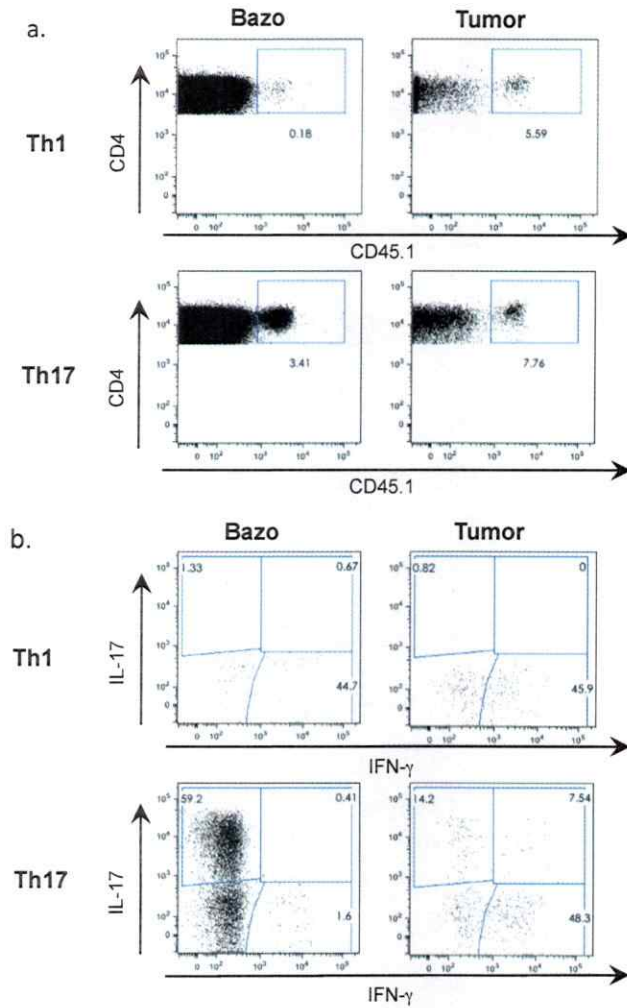


Figura 7. Fenotipo de las células Th17 y Th1 inyectadas en ratones $ROR^{gfp/gfp}$ con tumores. (a). Células Th1 o Th17 ($CD45.1^+/CD45.2^+$) se inyectaron en ratones $ROR^{gfp/gfp}$ ($CD45.2^+$) con tumor y al décimo día luego de la inyección se analizaron distintos órganos en busca de las células $CD4^+CD45.1^+$. (b). Células obtenidas desde el bazo, TdLN y tumor de ratones inyectados con células Th1 o Th17 se activaron con PMA y ionomicina en presencia de Brefeldina A durante 4 horas para posteriormente analizar la producción de citoquinas en las células $CD4^+CD45.1^+$.

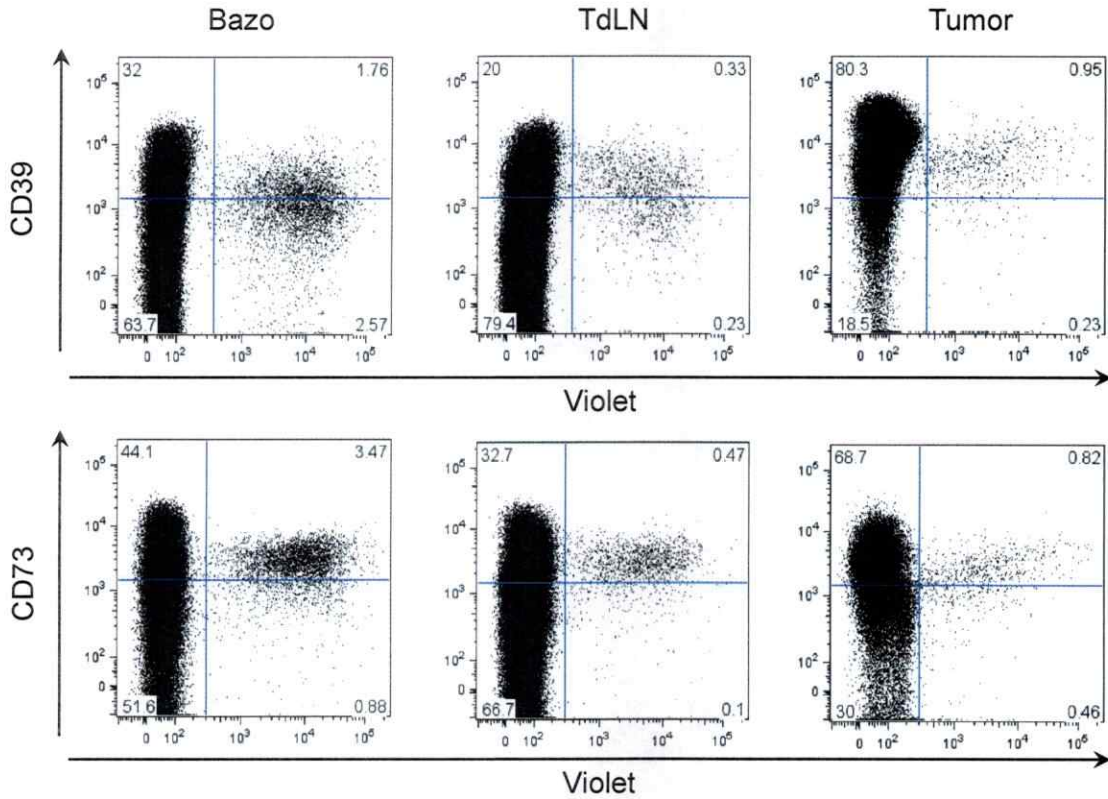


Figura 8. Expresión de CD39 y CD73 en células Th17 inyectadas en ratones con tumor. Linfocitos Th17 generados *in vitro* a partir de ratones OT-II, se marcaron con CellTrace™ Violet y se inyectaron en ratones C57BL/6 con tumores B16.OVA. 5 días después de la inyección de las células Th17, se aislaron células de distintos órganos y se marcaron con anticuerpos para ser analizadas por citometría de flujo. Los gráficos se muestran en una ventana de células CD4⁺.

8. Discusión

El sistema inmune cumple una función compleja en el microambiente tumoral, ya que puede montar respuestas efectoras tan opuestas como la anti-tumoral y la regulatoria (Ostrand-Rosenberg, 2008). El delicado balance que ocurre entre las diferentes respuestas es lo que desencadenará el crecimiento o reducción del tumor. Dentro de las células que componen la respuesta regulatoria se encuentran, principalmente, los linfocitos T reguladores y las células supresoras de origen mieloide (MDSC), capaces de apagar y anular la respuesta efectora mediante distintos mecanismos, como la secreción de citoquinas inmunosupresoras (como IL-10, IL-35 y TGF- β (Vignali y col., 2008)), disrupciones metabólicas (como el aumento de adenosina extracelular (Stagg y Smyth, 2010) y arginasa I), expresión de moléculas coinhibitorias (como CTLA-4 y LAG-3 (Vignali y col., 2008)) y provocar la citólisis de las células efectoras (mediante granzimas o perforina (Vignali y col., 2008), o la producción de óxido nítrico y especies reactivas de oxígeno (Gabrilovich y Nagaraj, 2009)). Por otro lado, la respuesta anti-tumoral se compone de células citotóxicas (como células NK, NKT y linfocitos T CD8⁺) y otras células que apoyan este tipo de respuesta como las células dendríticas y los linfocitos Th1. Dentro de este balance, el papel de las células Th17 es controversial.

Diversos estudios han intentado revelar cual es el verdadero rol de estas células en relación a la progresión tumoral, utilizando diferentes aproximaciones y modelos. Por una parte, se ha descrito que las células Th17 poseen una función importante en la inducción de procesos inflamatorios los cuales serían mediados principalmente por la secreción de citoquinas como IL-17, TNF- α , GM-CSF, IL-21 e IL-22. Estas citoquinas son capaces de inducir angiogénesis (Numasaki y col., 2003), promover el reclutamiento de las células MDSC (Charles y col., 2009, He y col., 2010) y activar vías transcripcionales

de supervivencia y proliferación en las células tumorales (Wang y col., 2009). Estos argumentos dan sustento a una posible función pro-tumoral de las células Th17. Por el contrario, estudios en ratones sub-lealmente irradiados y en metástasis en pulmón han demostrado que los linfocitos Th17 son capaces tanto de erradicar melanomas establecidos (Muranski y col., 2008), como promover la activación de linfocitos citotóxicos contra el tumor (Martin-Orozco y col., 2009), respectivamente. Es importante destacar que aquellos argumentos a favor de la actividad protumoral se basan fuertemente en la secreción de IL-17, que no comprende ni abarca toda la acción de estas células, mientras que aquellos estudios que apoyan una actividad anti-tumoral utilizan técnicas de transferencia adoptiva, que comprenden el efecto de la célula completa.

Estudios anteriores realizados en nuestro laboratorio han determinado que ratones ROR^{gfp/gfp} deficientes de células Th17 presentan un crecimiento tumoral acelerado y una menor infiltración de linfocitos T CD4 productores de IFN- γ al tumor en comparación a ratones silvestres (Nuñez y col., 2012). Esto sugiere que las células Th17 serían capaces, directa o indirectamente, de estar involucradas en el reclutamiento o infiltración de linfocitos T CD4⁺ al tumor. En este trabajo se continuó evaluando la actividad anti-tumoral de células Th17 generadas *in vitro* específicas contra el tumor.

8.1 Crecimiento y microambiente tumoral en ratones deficientes en Th17

Nuestros resultados corroboran que el aumento de la tasa de crecimiento tumoral en los ratones deficientes de Th17 ocurre al utilizar diferentes líneas tumorales que varían en su origen e inmunogenicidad, como demostramos con la línea de melanoma (B16), hepatocarcinoma (Hep 1-6) y de cáncer de próstata (MB-49) (figura 1). Las células de

melanoma son una línea tumoral poco inmunogénica en comparación a las otras líneas celulares, y es por eso que los tamaños alcanzados en estas últimas son menores. Es así como en un extremo se encuentra la línea de hepatocarcinoma que tiende a entrar en remisión en los ratones C57BL/6, mientras que en los ratones deficientes de Th17 continúa en crecimiento. Estos resultados sugieren fuertemente que los linfocitos Th17 tienen una función antitumoral independiente del tipo de tumor al que se enfrenten.

El perfil de citoquinas producidas por los linfocitos capaces de infiltrar el tumor, demuestra que no existen diferencias tanto para la secreción de IFN- γ , IL-2, TNF, IL-4 ni IL-10, lo que implica que la diferencia observada en las curvas de crecimiento tumoral entre el ratón ROR^{gfp/gfp} y el silvestre no se debe a diferencias en la producción de estas citoquinas por parte de los linfocitos infiltrantes. No obstante, existe un notable aumento en la concentración de IL-6 en tumores de ratones ROR^{gfp/gfp}. La IL-6 es una citoquina pro-inflamatoria fuertemente relacionada a la activación del factor de transcripción STAT3 asociado a la sobrevida y proliferación de las células tumorales (Yu y col., 2007). La señalización de IL-6 depende del receptor de IL-6 (IL-6R), cuya expresión se restringe a leucocitos y hepatocitos. Sin embargo, existe una forma soluble de este receptor (sIL-6R) capaz de interactuar con gp130, una proteína de expresión constitutiva (Rincon, 2012). De esta manera, mediante la expresión de sIL-6R se puede generar una respuesta a IL-6 en cualquier tipo celular. Las células Th17 estarían directa o indirectamente disminuyendo la producción de IL-6 en el tumor, reduciendo así la activación de STAT3 y por lo tanto la proliferación y sobrevida por parte de las células tumorales. Este efecto podría estar mediado por la expresión de sIL-6R que, al secuestrar la IL-6 producida, reduce su sobrevida en el medio y aumenta su señalización.

8.2 Fenotipo de linfocitos Th17 en tejidos asociados al tumor

Si bien la población endógena de linfocitos Th17 es bastante reducida en un ratón silvestre, sin sobrepasar un 0,5% de los linfocitos en los órganos linfoides, esta población se triplica cuando los animales presentan tumores. Este hecho revela una relación estrecha entre el tumor y las células Th17. Recientemente se han publicado trabajos que mencionan una población de linfocitos Th17 que presentan capacidades regulatorias mediante la expresión de CD39 y CD73, enzimas asociadas a una capacidad inmunosupresora, y la producción de IL-10 (McGeachy y col., 2007, Esplugues y col., 2011, Chalmin y col., 2012). Por esta razón comprobamos la expresión de CD39 y CD73 en los linfocitos Th17 endógenos presentes en el tumor y otros órganos linfoides. En un ratón C57BL/6 sano, las células Th17 se reparten equitativamente entre dos poblaciones divididas en base a la expresión de CD39. Sin embargo, en los ratones con tumor, se expande aquella población con alta expresión de CD39 tanto en el órgano linfoide drenante del tumor como en el tumor, la cual tendría un mayor potencial inmunoregulatorio. De esta forma el tumor podría estar provocando la expansión de las células Th17 con potencial inmunosupresor en los órganos encargados de montar la respuesta inmune, mermando la respuesta inmune. Por otro lado, este efecto podría ser independiente de la actividad tumoral. Al ser centros neurálgicos de la respuesta anti-tumoral, en los órganos linfoides ocurre una gran proliferación de células efectoras, que de no controlarse puede provocar más daño del que intenta mitigar. En casos de inflamación excesiva por Th17, uno de los métodos naturales de control ocurre mediante la diferenciación a Th17 regulatorios capaces de modular la inflamación (Esplugues y col., 2011).

8.3 Diferenciación a linfocitos Th17

Desde el descubrimiento de las células Th17 un objetivo importante fue generar este tipo celular *in vitro*. Los primeros estudios vincularon el uso de IL-23 y TGF- β para su diferenciación a partir de linfocitos T vírgenes (Wynn, 2005, Harrington y col., 2006), aunque posteriormente la necesidad de IL-23 fue cuestionada y prontamente reemplazada por IL-6 (Bettelli y col., 2006). Aunque muchas evidencias apoyan el papel de TGF- β en la diferenciación hacia células Th17 al demostrar que por sí misma, esta citoquina es capaz de diferenciar linfocitos T a células Th17 (Ichiyama y col., 2008), el uso de TGF- β ha sido cuestionado por otros grupos, restringiendo su papel a la prevención de la diferenciación hacia otros tipo celulares (Das y col., 2009). Más aún, otros grupos han reportado que esta citoquina es dispensable y que sería capaz de inhibir la generación de células Th17 (Ghoreschi y col., 2010, Schumann y col., 2012). Estudios recientes del grupo de Li han permitido entender un poco mejor el papel del TGF- β en la diferenciación hacia células Th17. Ellos demostraron que los linfocitos Th1, Th2 y Th17 son capaces de producir su propio TGF- β , siendo los Th17 los más eficientes en este proceso (Gutcher y col., 2011). Tomando estos argumentos en cuenta, podemos decir que el TGF- β exógeno y la IL-6 son necesarias para el compromiso de los linfocitos T vírgenes hacia el linaje Th17, sin embargo este linaje es capaz de mantener su propia producción de TGF- β ayudando incluso a otras células en su proceso de diferenciación, explicando porqué se pueden generar células Th17 sin la adición de TGF- β exógena. Si bien nuestros resultados corroboran que la mejor manera de obtener linfocitos Th17 a partir de linfocitos T vírgenes es mediante la adición de TGF- β al medio de polarización, un factor importante a considerar es que el uso de TGF- β no sólo aumenta la diferenciación a Th17, sino que además induce la expresión de CD39 y CD73, favoreciendo un fenotipo

regulatorio en estas células (Lee y col., 2012). Por esta razón, durante la diferenciación de linfocitos Th17 decidimos utilizar además IL-1 β , que se conoce como un regulador de patogenicidad en los Th17, disminuyendo su producción de IL-10 y aumentando la producción de IL-17 (Zielinski y col., 2012). La adición de esta citoquina resultó en un alto porcentaje de células Th17 con una expresión intermedia en cuanto a la expresión de ambas ectonucleotidasas.

8.4 Transferencia adoptiva de linfocitos Th17

Un factor importante en este trabajo es el fenotipo de las células Th17 en cuanto a su capacidad inmunomoduladora. En este trabajo demostramos que la población endógena sobreexpresa CD39 al ser enfrentada al cáncer, a diferencia del caso normal donde se encuentra repartida entre el fenotipo inflamatorio, baja expresión de CD39, y el regulatorio (alta expresión de CD39). De esta forma, para nuestros estudios de transferencia adoptiva realizamos los experimentos con células Th17 que expresan un nivel bajo de las ectonucleotidasas. Sin embargo, una vez transferidas a un ratón con tumor, las células Th17 no mantienen el mismo fenotipo *in vivo*. Los linfocitos Th17 en el bazo mantienen la expresión de CD39 y CD73 al proliferar, mientras que el microambiente del TdLN fomenta la expresión de CD39, induciendo el fenotipo inmunoregulador. Este fenómeno podría explicarse mediante el estado de indiferenciación de estas células, ya que células troncales, como las células mesenquimáticas, presentan una expresión constante de CD39 (Saldanha-Araujo y col., 2011). Mientras que el microambiente tumoral un efecto completamente opuesto, bajando la expresión de ambas ectonucleotidasas a medida que ocurren las rondas de proliferación, lo que puede estar

describiendo el proceso de diferenciación hacia Th1 tanto como la pérdida de la función regulatoria y el incremento de la función antitumoral.

Se ha descrito que los linfocitos Th17, a diferencia de otros linajes de linfocitos T *helper* poseen características de pluripotencialidad y troncalidad. Es así como se ha reportado que estas células no llegan hasta un grado de diferenciación terminal sino que se mantienen como una población con características de células troncales y de células de memoria, a diferencia de los linfocitos Th1 que ya han alcanzado su diferenciación terminal (Muranski y col., 2011). Incluso, se ha observado que los Th17 son capaces de producir IFN- γ , avanzando un paso hacia su diferenciación hacia Th1 (Nistala y col., 2010, Damsker y col., 2010). La pluripotencialidad y troncalidad de las células Th17 es corroborado en este trabajo. Los experimentos de transferencia adoptiva de células Th1 y Th17 en ratones silvestres y ROR^{gfp/gfp} demuestran que las células Th1, mantienen su producción de IFN- γ , sin llegar a producir IL-17 en ninguno de los órganos analizados. Sin embargo, los linfocitos Th17 mantienen su fenotipo en los órganos linfoides, pero en el tumor producen IFN- γ y disminuyen considerablemente la producción de IL-17. De esta manera, el fenotipo efector antitumoral de las células Th17 podría ser dependiente de la producción de IFN- γ , lo cual ha sido sugerido en otros trabajos (Muranski y col., 2008). Más aún, los linfocitos Th17 se mantienen como una población constante, con bajos niveles de diferenciación lo que aumenta su sobrevivencia, y les permite circular en los órganos linfoides del ratón y constantemente migrar al tumor. Ya en el tumor, las células utilizan su capacidad de troncalidad para dar origen a linfocitos Th1, con una clara y demostrada función antitumoral. De esta forma logran un flujo constante de células Th1 contra el tumor. Adicionalmente, los linfocitos Th17 expresan una mayor cantidad de ligandos de E-selectina que los linfocitos Th1, por lo que logran una mayor interacción con

el epitelio activado por citoquinas (Alcaide y col., 2012), lo que les otorga mejores cualidades de migración hacia sitios de inflamación, como el microambiente tumoral.

El conjunto de los datos obtenidos en este trabajo permite comprender las razones por las cuales los linfocitos Th17 poseen mejores capacidades antitumorales que los linfocitos Th1. Nuestros datos apoyan la idea que las células Th17 son una población celular que se mantiene en circulación, proliferando y permanentemente migrando hacia el tumor donde serían capaces de diferenciarse hacia células Th1 para ejercer su acción anti-tumoral.



9. Resumen de Resultados

- Los ratones ROR^{gfp/gfp}, que carecen de linfocitos Th17, presentan un crecimiento tumoral aumentado en relación a un ratón silvestre, efecto independiente del origen e inmunogenicidad de la línea tumoral utilizada.
- Los ratones ROR^{gfp/gfp} presentan un aumento en la producción de IL-6 en el tumor. Esta citoquina se encuentra asociada a la activación de STAT3 en las células tumorales, estimulando procesos de supervivencia y proliferación de estas células.
- El microambiente tumoral provoca cambios en la población endógena de linfocitos Th17, expandiendo aquella población con un mayor potencial inmunosupresor (población con una alta expresión de la ectonucleotidasa CD39).
- Mediante una combinación de las citoquinas IL-1 β , IL-6 y TGF- β generamos células Th17 *in vitro* con un fenotipo similar al encontrado en ratones sanos, de expresión intermedia para las ectonucleotidasas CD39 y CD73.
- La transferencia adoptiva de diferentes poblaciones de LT *helper* generadas *in vitro* a ratones ROR^{gfp/gfp} demostró que los linfocitos Th17 son más eficientes que las células Th1 en cuanto a sus propiedades anti-tumorales y distribución a los órganos linfoides secundarios y tumor. Esto puede estar relacionado con una mayor "troncalidad" que se le atribuye a las células Th17 por sobre otras poblaciones de LT *helper*.
- En los órganos linfoides el microambiente existente induce la sobreexpresión de CD39 y el aumento en la producción de IFN- γ en las células Th17 inyectadas.

10. Conclusión

En este seminario de título demostramos experimentalmente la capacidad antitumoral que poseen linfocitos Th17 específicos contra el tumor. Al poseer características de troncalidad y de células de memoria, estas células poseen una sobrevivencia mayor a otros tipos celulares, constituyendo un arsenal permanente y constante de linfocitos Th1 diferenciados *in situ*, que poseen una gran actividad antitumoral.

11. Referencias

Afkarian, M., Sedy, J.R., Yang, J., Jacobson, N.G., Cereb, N., Yang, S.Y., Murphy, T.L. and Murphy, K.M. 2002. T-bet is a STAT1-induced regulator of IL-12R expression in naive CD4+ T cells. *Nat Immunol.* **3**. 549-57.

Afzali, B., Mitchell, P., Lechler, R.I., John, S. and Lombardi, G. 2010. Translational mini-review series on Th17 cells: induction of interleukin-17 production by regulatory T cells. *Clin Exp Immunol.* **159**. 120-30.

Alcaide, P., Maganto-Garcia, E., Newton, G., Travers, R., Croce, K.J., Bu, D.X., Luscinskas, F.W. and Lichtman, A.H. 2012. Difference in Th1 and Th17 lymphocyte adhesion to endothelium. *J Immunol.* **188**. 1421-30.

Backstrom, E., Kristensson, K. and Ljunggren, H.G. 2004. Activation of natural killer cells: underlying molecular mechanisms revealed. *Scand J Immunol.* **60**. 14-22.

Bettelli, E., Carrier, Y., Gao, W., Korn, T., Strom, T.B., Oukka, M., Weiner, H.L. and Kuchroo, V.K. 2006. Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells. *Nature.* **441**. 235-8.

Boehm, U., Klamp, T., Groot, M. and Howard, J.C. 1997. Cellular responses to interferon-gamma. *Annu Rev Immunol.* **15**. 749-95.

Brahmer, J.R., Tykodi, S.S., Chow, L.Q., Hwu, W.J., Topalian, S.L., Hwu, P., Drake, C.G., Camacho, L.H., Kauh, J., Odunsi, K., Pitot, H.C., Hamid, O., Bhatia, S., Martins, R., Eaton, K., Chen, S., Salay, T.M., Alaparthi, S., Grosso, J.F., Korman, A.J., Parker, S.M., Agrawal, S., Goldberg, S.M., Pardoll, D.M., Gupta, A. and Wigginton, J.M. 2012. Safety and activity of anti-PD-L1 antibody in patients with advanced cancer. *N Engl J Med.* **366**. 2455-65.

Burnet, F.M. 1970. The concept of immunological surveillance. *Prog Exp Tumor Res.* **13**. 1-27.

Burnet, M. 1964. Immunological Factors in the Process of Carcinogenesis. *Br Med Bull.* **20**. 154-8.

Carnaud, C., Lee, D., Donnars, O., Park, S.H., Beavis, A., Koezuka, Y. and Bendelac, A. 1999. Cutting edge: Cross-talk between cells of the innate immune system: NKT cells rapidly activate NK cells. *J Immunol.* **163**. 4647-50.

Chalmin, F., Mignot, G., Bruchard, M., Chevriaux, A., Vegran, F., Hichami, A., Ladoire, S., Derangere, V., Vincent, J., Masson, D., Robson, S.C., Eberl, G., Pallandre, J.R., Borg, C., Ryffel, B., Apetoh, L., Rebe, C. and Ghiringhelli, F. 2012. Stat3 and Gfi-1 transcription factors control Th17 cell immunosuppressive activity via the regulation of ectonucleotidase expression. *Immunity*. **36**. 362-73.

Charles, K.A., Kulbe, H., Soper, R., Escorcio-Correia, M., Lawrence, T., Schultheis, A., Chakravarty, P., Thompson, R.G., Kollias, G., Smyth, J.F., Balkwill, F.R. and Hagemann, T. 2009. The tumor-promoting actions of TNF-alpha involve TNFR1 and IL-17 in ovarian cancer in mice and humans. *J Clin Invest*. **119**. 3011-23.

Chung, D.R., Kasper, D.L., Panzo, R.J., Chitnis, T., Grusby, M.J., Sayegh, M.H. and Tzianabos, A.O. 2003. CD4+ T cells mediate abscess formation in intra-abdominal sepsis by an IL-17-dependent mechanism. *J Immunol*. **170**. 1958-63.

Coussens, L.M. and Werb, Z. 2002. Inflammation and cancer. *Nature*. **420**. 860-7.

Curiel, T.J., Coukos, G., Zou, L., Alvarez, X., Cheng, P., Mottram, P., Evdemon-Hogan, M., Conejo-Garcia, J.R., Zhang, L., Burow, M., Zhu, Y., Wei, S., Kryczek, I., Daniel, B., Gordon, A., Myers, L., Lackner, A., Disis, M.L., Knutson, K.L., Chen, L. and Zou, W. 2004. Specific recruitment of regulatory T cells in ovarian carcinoma fosters immune privilege and predicts reduced survival. *Nat Med*. **10**. 942-9.

Damsker, J.M., Hansen, A.M. and Caspi, R.R. 2010. Th1 and Th17 cells: adversaries and collaborators. *Ann N Y Acad Sci*. **1183**. 211-21.

Das, J., Ren, G., Zhang, L., Roberts, A.I., Zhao, X., Bothwell, A.L., Van Kaer, L., Shi, Y. and Das, G. 2009. Transforming growth factor beta is dispensable for the molecular orchestration of Th17 cell differentiation. *J Exp Med*. **206**. 2407-16.

Dempsey, P.W., Vaidya, S.A. and Cheng, G. 2003. The art of war: Innate and adaptive immune responses. *Cell Mol Life Sci*. **60**. 2604-21.

Dunn, G.P., Old, L.J. and Schreiber, R.D. 2004. The three Es of cancer immunoediting. *Annu Rev Immunol*. **22**. 329-60.

Eberl, G., Marmon, S., Sunshine, M.J., Rennert, P.D., Choi, Y. and Littman, D.R. 2004. An essential function for the nuclear receptor RORgamma(t) in the generation of fetal lymphoid tissue inducer cells. *Nat Immunol*. **5**. 64-73.

Esplugues, E., Huber, S., Gagliani, N., Hauser, A.E., Town, T., Wan, Y.Y., O'connor, W., Jr., Rongvaux, A., Van Rooijen, N., Haberman, A.M., Iwakura, Y., Kuchroo, V.K., Kolls, J.K., Bluestone, J.A., Herold, K.C. and Flavell, R.A. 2011. Control of TH17 cells occurs in the small intestine. *Nature*. **475**. 514-8.

Finkelman, F.D., Katona, I.M., Mosmann, T.R. and Coffman, R.L. 1988. IFN-gamma regulates the isotypes of Ig secreted during in vivo humoral immune responses. *J Immunol*. **140**. 1022-7.

Fontenot, J.D., Gavin, M.A. and Rudensky, A.Y. 2003. Foxp3 programs the development and function of CD4+CD25+ regulatory T cells. *Nat Immunol*. **4**. 330-6.

Fridlender, Z.G., Sun, J., Kim, S., Kapoor, V., Cheng, G., Ling, L., Worthen, G.S. and Albelda, S.M. 2009. Polarization of tumor-associated neutrophil phenotype by TGF-beta: "N1" versus "N2" TAN. *Cancer Cell*. **16**. 183-94.

Gabrilovich, D.I. and Nagaraj, S. 2009. Myeloid-derived suppressor cells as regulators of the immune system. *Nat Rev Immunol*. **9**. 162-74.

Gattinoni, L., Klebanoff, C.A. and Restifo, N.P. 2012. Paths to stemness: building the ultimate antitumour T cell. *Nat Rev Cancer*. **12**. 671-84.

Ghoreschi, K., Laurence, A., Yang, X.P., Tato, C.M., McGeachy, M.J., Konkel, J.E., Ramos, H.L., Wei, L., Davidson, T.S., Bouladoux, N., Grainger, J.R., Chen, Q., Kanno, Y., Watford, W.T., Sun, H.W., Eberl, G., Shevach, E.M., Belkaid, Y., Cua, D.J., Chen, W. and O'shea, J.J. 2010. Generation of pathogenic T(H)17 cells in the absence of TGF-beta signalling. *Nature*. **467**. 967-71.

Grivnenkov, S.I., Greten, F.R. and Karin, M. 2010. Immunity, inflammation, and cancer. *Cell*. **140**. 883-99.

Guo, L., Wei, G., Zhu, J., Liao, W., Leonard, W.J., Zhao, K. and Paul, W. 2009. IL-1 family members and STAT activators induce cytokine production by Th2, Th17, and Th1 cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **106**. 13463-8.

Gutcher, I., Donkor, M.K., Ma, Q., Rudensky, A.Y., Flavell, R.A. and Li, M.O. 2011. Autocrine transforming growth factor-beta1 promotes in vivo Th17 cell differentiation. *Immunity*. **34**. 396-408.

Harrington, L.E., Hatton, R.D., Mangan, P.R., Turner, H., Murphy, T.L., Murphy, K.M. and Weaver, C.T. 2005. Interleukin 17-producing CD4+ effector T cells develop via a lineage distinct from the T helper type 1 and 2 lineages. *Nat Immunol.* **6**. 1123-32.

Harrington, L.E., Mangan, P.R. and Weaver, C.T. 2006. Expanding the effector CD4 T-cell repertoire: the Th17 lineage. *Curr Opin Immunol.* **18**. 349-56.

He, D., Li, H., Yusuf, N., Elmets, C.A., Li, J., Mountz, J.D. and Xu, H. 2010. IL-17 promotes tumor development through the induction of tumor promoting microenvironments at tumor sites and myeloid-derived suppressor cells. *J Immunol.* **184**. 2281-8.

Hofstetter, H.H., Ibrahim, S.M., Koczan, D., Kruse, N., Weishaupt, A., Toyka, K.V. and Gold, R. 2005. Therapeutic efficacy of IL-17 neutralization in murine experimental autoimmune encephalomyelitis. *Cell Immunol.* **237**. 123-30.

Houghton, A.M., Rzymkiewicz, D.M., Ji, H., Gregory, A.D., Egea, E.E., Metz, H.E., Stolz, D.B., Land, S.R., Marconcini, L.A., Kliment, C.R., Jenkins, K.M., Beaulieu, K.A., Mouded, M., Frank, S.J., Wong, K.K. and Shapiro, S.D. 2010. Neutrophil elastase-mediated degradation of IRS-1 accelerates lung tumor growth. *Nat Med.* **16**. 219-23.

Huang, S., Apasov, S., Koshiba, M. and Sitkovsky, M. 1997. Role of A2a extracellular adenosine receptor-mediated signaling in adenosine-mediated inhibition of T-cell activation and expansion. *Blood.* **90**. 1600-10.

Huang, W., Na, L., Fidel, P.L. and Schwarzenberger, P. 2004. Requirement of interleukin-17A for systemic anti-*Candida albicans* host defense in mice. *J Infect Dis.* **190**. 624-31.

Ichiyama, K., Yoshida, H., Wakabayashi, Y., Chinen, T., Saeki, K., Nakaya, M., Takaesu, G., Hori, S., Yoshimura, A. and Kobayashi, T. 2008. Foxp3 inhibits RORgammat-mediated IL-17A mRNA transcription through direct interaction with RORgammat. *J Biol Chem.* **283**. 17003-8.

Infante-Duarte, C., Horton, H.F., Byrne, M.C. and Kamradt, T. 2000. Microbial lipopeptides induce the production of IL-17 in Th cells. *J Immunol.* **165**. 6107-15.

Ishida, T., Ishii, T., Inagaki, A., Yano, H., Komatsu, H., Iida, S., Inagaki, H. and Ueda, R. 2006. Specific recruitment of CC chemokine receptor 4-positive regulatory T cells in Hodgkin lymphoma fosters immune privilege. *Cancer Res.* **66**. 5716-22.

Ivanov, I., McKenzie, B.S., Zhou, L., Tadokoro, C.E., Lepelletier, A., Lafaille, J.J., Cua, D.J. and Littman, D.R. 2006. The orphan nuclear receptor ROR γ directs the differentiation program of proinflammatory IL-17⁺ T helper cells. *Cell*. **126**. 1121-33.

Iwakura, Y., Ishigame, H., Saijo, S. and Nakae, S. 2011. Functional specialization of interleukin-17 family members. *Immunity*. **34**. 149-62.

Joetham, A., Takeda, K., Taube, C., Miyahara, N., Matsubara, S., Koya, T., Rhee, Y.H., Dakhama, A. and Gelfand, E.W. 2007. Naturally occurring lung CD4⁺CD25⁺ T cell regulation of airway allergic responses depends on IL-10 induction of TGF- β . *J Immunol*. **178**. 1433-42.

Klein, G. 1966. Tumor antigens. *Annu Rev Microbiol*. **20**. 223-52.

Knutson, K.L. and Disis, M.L. 2005. Tumor antigen-specific T helper cells in cancer immunity and immunotherapy. *Cancer Immunol Immunother*. **54**. 721-8.

Koyama, K., Kagamu, H., Miura, S., Hiura, T., Miyabayashi, T., Itoh, R., Kuriyama, H., Tanaka, H., Tanaka, J., Yoshizawa, H., Nakata, K. and Gejyo, F. 2008. Reciprocal CD4⁺ T-cell balance of effector CD62L^{low} CD4⁺ and CD62L^{high} CD25⁺ CD4⁺ regulatory T cells in small cell lung cancer reflects disease stage. *Clin Cancer Res*. **14**. 6770-9.

Kryczek, I., Banerjee, M., Cheng, P., Vatan, L., Szeliga, W., Wei, S., Huang, E., Finlayson, E., Simeone, D., Welling, T.H., Chang, A., Coukos, G., Liu, R. and Zou, W. 2009. Phenotype, distribution, generation, and functional and clinical relevance of Th17 cells in the human tumor environments. *Blood*. **114**. 1141-9.

Langrish, C.L., Chen, Y., Blumenschein, W.M., Mattson, J., Basham, B., Sedgwick, J.D., McClanahan, T., Kastelein, R.A. and Cua, D.J. 2005. IL-23 drives a pathogenic T cell population that induces autoimmune inflammation. *J Exp Med*. **201**. 233-40.

Lee, Y., Awasthi, A., Yosef, N., Quintana, F.J., Xiao, S., Peters, A., Wu, C., Kleinewietfeld, M., Kunder, S., Hafler, D.A., Sobel, R.A., Regev, A. and Kuchroo, V.K. 2012. Induction and molecular signature of pathogenic TH17 cells. *Nat Immunol*. **13**. 991-9.

Lexberg, M.H., Taubner, A., Albrecht, I., Lepenies, I., Richter, A., Kamradt, T., Radbruch, A. and Chang, H.D. 2010. IFN- γ and IL-12 synergize to convert in vivo generated Th17 into Th1/Th17 cells. *Eur J Immunol*. **40**. 3017-27.

Lighvani, A.A., Frucht, D.M., Jankovic, D., Yamane, H., Aliberti, J., Hissong, B.D., Nguyen, B.V., Gadina, M., Sher, A., Paul, W.E. and O'shea, J.J. 2001. T-bet is rapidly induced by interferon-gamma in lymphoid and myeloid cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **98**. 15137-42.

Lock, C., Hermans, G., Pedotti, R., Brendolan, A., Schadt, E., Garren, H., Langer-Gould, A., Strober, S., Cannella, B., Allard, J., Klonowski, P., Austin, A., Lad, N., Kaminski, N., Galli, S.J., Oksenberg, J.R., Raine, C.S., Heller, R. and Steinman, L. 2002. Gene-microarray analysis of multiple sclerosis lesions yields new targets validated in autoimmune encephalomyelitis. *Nat Med*. **8**. 500-8.

Majumdar, S. and Aggarwal, B.B. 2003. Adenosine suppresses activation of nuclear factor-kappaB selectively induced by tumor necrosis factor in different cell types. *Oncogene*. **22**. 1206-18.

Mantovani, A., Allavena, P., Sica, A. and Balkwill, F. 2008. Cancer-related inflammation. *Nature*. **454**. 436-44.

Martin-Orozco, N., Muranski, P., Chung, Y., Yang, X.O., Yamazaki, T., Lu, S., Hwu, P., Restifo, N.P., Overwijk, W.W. and Dong, C. 2009. T helper 17 cells promote cytotoxic T cell activation in tumor immunity. *Immunity*. **31**. 787-98.

Matusevicius, D., Kivisakk, P., He, B., Kostulas, N., Ozenci, V., Fredrikson, S. and Link, H. 1999. Interleukin-17 mRNA expression in blood and CSF mononuclear cells is augmented in multiple sclerosis. *Mult Scler*. **5**. 101-4.

Mcgeachy, M.J., Bak-Jensen, K.S., Chen, Y., Tato, C.M., Blumenschein, W., Mcclanahan, T. and Cua, D.J. 2007. TGF-beta and IL-6 drive the production of IL-17 and IL-10 by T cells and restrain T(H)-17 cell-mediated pathology. *Nat Immunol*. **8**. 1390-7.

Medzhitov, R. and Janeway, C.A., Jr. 1997. Innate immunity: the virtues of a nonclonal system of recognition. *Cell*. **91**. 295-8.

Miyahara, Y., Odunsi, K., Chen, W., Peng, G., Matsuzaki, J. and Wang, R.F. 2008. Generation and regulation of human CD4+ IL-17-producing T cells in ovarian cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **105**. 15505-10.

Muranski, P., Boni, A., Antony, P.A., Cassard, L., Irvine, K.R., Kaiser, A., Paulos, C.M., Palmer, D.C., Touloukian, C.E., Ptak, K., Gattinoni, L., Wrzesinski, C., Hinrichs, C.S., Kerstann, K.W., Feigenbaum, L., Chan, C.C. and Restifo, N.P. 2008. Tumor-specific Th17-polarized cells eradicate large established melanoma. *Blood*. **112**. 362-73.

Muranski, P., Borman, Z.A., Kerkar, S.P., Klebanoff, C.A., Ji, Y., Sanchez-Perez, L., Sukumar, M., Reger, R.N., Yu, Z., Kern, S.J., Roychoudhuri, R., Ferreyra, G.A., Shen, W., Durum, S.K., Feigenbaum, L., Palmer, D.C., Antony, P.A., Chan, C.C., Laurence, A., Danner, R.L., Gattinoni, L. and Restifo, N.P. 2011. Th17 cells are long lived and retain a stem cell-like molecular signature. *Immunity*. **35**. 972-85.

Murphy, C.A., Langrish, C.L., Chen, Y., Blumenschein, W., Mcclanahan, T., Kastelein, R.A., Sedgwick, J.D. and Cua, D.J. 2003. Divergent pro- and antiinflammatory roles for IL-23 and IL-12 in joint autoimmune inflammation. *J Exp Med*. **198**. 1951-7.

Murphy, K.M. and Reiner, S.L. 2002. The lineage decisions of helper T cells. *Nat Rev Immunol*. **2**. 933-44.

Nakae, S., Nambu, A., Sudo, K. and Iwakura, Y. 2003. Suppression of immune induction of collagen-induced arthritis in IL-17-deficient mice. *J Immunol*. **171**. 6173-7.

Nistala, K., Adams, S., Cambrook, H., Ursu, S., Olivito, B., De Jager, W., Evans, J.G., Cimaz, R., Bajaj-Elliott, M. and Wedderburn, L.R. 2010. Th17 plasticity in human autoimmune arthritis is driven by the inflammatory environment. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **107**. 14751-6.

Nistala, K. and Wedderburn, L.R. 2009. Th17 and regulatory T cells: rebalancing pro- and anti-inflammatory forces in autoimmune arthritis. *Rheumatology (Oxford)*. **48**. 602-6.

Numasaki, M., Fukushi, J., Ono, M., Narula, S.K., Zavodny, P.J., Kudo, T., Robbins, P.D., Tahara, H. and Lotze, M.T. 2003. Interleukin-17 promotes angiogenesis and tumor growth. *Blood*. **101**. 2620-7.

Numasaki, M., Watanabe, M., Suzuki, T., Takahashi, H., Nakamura, A., Mcallister, F., Hishinuma, T., Goto, J., Lotze, M.T., Kolls, J.K. and Sasaki, H. 2005. IL-17 enhances the net angiogenic activity and in vivo growth of human non-small cell lung cancer in SCID mice through promoting CXCR-2-dependent angiogenesis. *J Immunol*. **175**. 6177-89.

Nuñez, S., Saez, J.J., Fernandez, D., Flores-Santibanez, F., Alvarez, K., Tejon, G., Ruiz, P., Maldonado, P., Hidalgo, Y., Manriquez, V., Bono, M.R., Roseblatt, M. and Sauma, D. 2012. Th17 cells contribute to anti-tumor immunity and promote the recruitment of th1 cells to the tumor. *Immunology*.

Ohta, A., Ohta, A., Madasu, M., Kini, R., Subramanian, M., Goel, N. and Sitkovsky, M. 2009. A2A adenosine receptor may allow expansion of T cells lacking effector functions in extracellular adenosine-rich microenvironments. *J Immunol*. **183**. 5487-93.

Old, L.J. and Boyse, E.A. 1964. Immunology of Experimental Tumors. *Annu Rev Med.* **15.** 167-86.

Ostrand-Rosenberg, S. 2008. Immune surveillance: a balance between protumor and antitumor immunity. *Curr Opin Genet Dev.* **18.** 11-8.

Pancer, Z. and Cooper, M.D. 2006. The evolution of adaptive immunity. *Annu Rev Immunol.* **24.** 497-518.

Peggs, K.S., Quezada, S.A., Korman, A.J. and Allison, J.P. 2006. Principles and use of anti-CTLA4 antibody in human cancer immunotherapy. *Curr Opin Immunol.* **18.** 206-13.

Pelletier, M., Maggi, L., Micheletti, A., Lazzeri, E., Tamassia, N., Costantini, C., Cosmi, L., Lunardi, C., Annunziato, F., Romagnani, S. and Cassatella, M.A. 2010. Evidence for a cross-talk between human neutrophils and Th17 cells. *Blood.* **115.** 335-43.

Rakoff-Nahoum, S. 2006. Why cancer and inflammation? *Yale J Biol Med.* **79.** 123-30.

Rincon, M. 2012. Interleukin-6: from an inflammatory marker to a target for inflammatory diseases. *Trends Immunol.* **33.** 571-7.

Rodriguez, P.C., Zea, A.H., Culotta, K.S., Zabaleta, J., Ochoa, J.B. and Ochoa, A.C. 2002. Regulation of T cell receptor CD3zeta chain expression by L-arginine. *J Biol Chem.* **277.** 21123-9.

Saldanha-Araujo, F., Ferreira, F.I., Palma, P.V., Araujo, A.G., Queiroz, R.H., Covas, D.T., Zago, M.A. and Panepucci, R.A. 2011. Mesenchymal stromal cells up-regulate CD39 and increase adenosine production to suppress activated T-lymphocytes. *Stem Cell Res.* **7.** 66-74.

Schumann, J., Muller, U. and Blessing, M. 2012. TGF-beta signaling in T cells is not essential for Th17 cell development in the mouse. *J Biol Regul Homeost Agents.* **26.** 357-66.

Sfanos, K.S., Bruno, T.C., Maris, C.H., Xu, L., Thoburn, C.J., Demarzo, A.M., Meeker, A.K., Isaacs, W.B. and Drake, C.G. 2008. Phenotypic analysis of prostate-infiltrating lymphocytes reveals TH17 and Treg skewing. *Clin Cancer Res.* **14.** 3254-61.

Shankaran, V., Ikeda, H., Bruce, A.T., White, J.M., Swanson, P.E., Old, L.J. and Schreiber, R.D. 2001. IFN γ and lymphocytes prevent primary tumour development and shape tumour immunogenicity. *Nature*. **410**. 1107-11.

Stagg, J. and Smyth, M.J. 2010. Extracellular adenosine triphosphate and adenosine in cancer. *Oncogene*. **29**. 5346-58.

Steimle, V., Siegrist, C.A., Mottet, A., Lisowska-Groszpiere, B. and Mach, B. 1994. Regulation of MHC class II expression by interferon-gamma mediated by the transactivator gene CIITA. *Science*. **265**. 106-9.

Su, X., Ye, J., Hsueh, E.C., Zhang, Y., Hoft, D.F. and Peng, G. 2010. Tumor microenvironments direct the recruitment and expansion of human Th17 cells. *J Immunol*. **184**. 1630-41.

Szabo, S.J., Kim, S.T., Costa, G.L., Zhang, X., Fathman, C.G. and Glimcher, L.H. 2000. A novel transcription factor, T-bet, directs Th1 lineage commitment. *Cell*. **100**. 655-69.

Tartour, E., Fossiez, F., Joyeux, I., Galinha, A., Gey, A., Claret, E., Sastre-Garau, X., Couturier, J., Mosseri, V., Vives, V., Banchereau, J., Fridman, W.H., Wijdenes, J., Lebecque, S. and Sautes-Fridman, C. 1999. Interleukin 17, a T-cell-derived cytokine, promotes tumorigenicity of human cervical tumors in nude mice. *Cancer Res*. **59**. 3698-704.

Thieu, V.T., Yu, Q., Chang, H.C., Yeh, N., Nguyen, E.T., Sehra, S. and Kaplan, M.H. 2008. Signal transducer and activator of transcription 4 is required for the transcription factor T-bet to promote T helper 1 cell-fate determination. *Immunity*. **29**. 679-90.

Topalian, S.L., Hodi, F.S., Brahmer, J.R., Gettinger, S.N., Smith, D.C., McDermott, D.F., Powderly, J.D., Carvajal, R.D., Sosman, J.A., Atkins, M.B., Leming, P.D., Spigel, D.R., Antonia, S.J., Horn, L., Drake, C.G., Pardoll, D.M., Chen, L., Sharfman, W.H., Anders, R.A., Taube, J.M., McMiller, T.L., Xu, H., Korman, A.J., Jure-Kunkel, M., Agrawal, S., McDonald, D., Kollia, G.D., Gupta, A., Wigginton, J.M. and Sznol, M. 2012. Safety, activity, and immune correlates of anti-PD-1 antibody in cancer. *N Engl J Med*. **366**. 2443-54.

Trapani, J.A. and Smyth, M.J. 2002. Functional significance of the perforin/granzyme cell death pathway. *Nat Rev Immunol*. **2**. 735-47.

Usui, T., Nishikomori, R., Kitani, A. and Strober, W. 2003. GATA-3 suppresses Th1 development by downregulation of Stat4 and not through effects on IL-12R β 2 chain or T-bet. *Immunity*. **18**. 415-28.

Vignali, D.A., Collison, L.W. and Workman, C.J. 2008. How regulatory T cells work. *Nat Rev Immunol.* **8.** 523-32.

Waldhauer, I. and Steinle, A. 2008. NK cells and cancer immunosurveillance. *Oncogene.* **27.** 5932-43.

Wang, H.Y. and Wang, R.F. 2007. Regulatory T cells and cancer. *Curr Opin Immunol.* **19.** 217-23.

Wang, L., Yi, T., Kortylewski, M., Pardoll, D.M., Zeng, D. and Yu, H. 2009. IL-17 can promote tumor growth through an IL-6-Stat3 signaling pathway. *J Exp Med.* **206.** 1457-64.

Weaver, C.T., Harrington, L.E., Mangan, P.R., Gavrieli, M. and Murphy, K.M. 2006. Th17: an effector CD4 T cell lineage with regulatory T cell ties. *Immunity.* **24.** 677-88.

Woo, E.Y., Chu, C.S., Goletz, T.J., Schlienger, K., Yeh, H., Coukos, G., Rubin, S.C., Kaiser, L.R. and June, C.H. 2001. Regulatory CD4(+)CD25(+) T cells in tumors from patients with early-stage non-small cell lung cancer and late-stage ovarian cancer. *Cancer Res.* **61.** 4766-72.

Wynn, T.A. 2005. T(H)-17: a giant step from T(H)1 and T(H)2. *Nat Immunol.* **6.** 1069-70.

Yang, Y., Weiner, J., Liu, Y., Smith, A.J., Huss, D.J., Winger, R., Peng, H., Cravens, P.D., Racke, M.K. and Lovett-Racke, A.E. 2009. T-bet is essential for encephalitogenicity of both Th1 and Th17 cells. *J Exp Med.* **206.** 1549-64.

Young, M.R., Newby, M. and Wepsic, H.T. 1987. Hematopoiesis and suppressor bone marrow cells in mice bearing large metastatic Lewis lung carcinoma tumors. *Cancer Res.* **47.** 100-5.

Yu, H., Kortylewski, M. and Pardoll, D. 2007. Crosstalk between cancer and immune cells: role of STAT3 in the tumour microenvironment. *Nat Rev Immunol.* **7.** 41-51.

Zarek, P.E., Huang, C.T., Lutz, E.R., Kowalski, J., Horton, M.R., Linden, J., Drake, C.G. and Powell, J.D. 2008. A2A receptor signaling promotes peripheral tolerance by inducing T-cell anergy and the generation of adaptive regulatory T cells. *Blood.* **111.** 251-9.

Zhang, H., Conrad, D.M., Butler, J.J., Zhao, C., Blay, J. and Hoskin, D.W. 2004. Adenosine acts through A2 receptors to inhibit IL-2-induced tyrosine phosphorylation of

STAT5 in T lymphocytes: role of cyclic adenosine 3',5'-monophosphate and phosphatases. *J Immunol.* **173.** 932-44.

Zhang, J.P., Yan, J., Xu, J., Pang, X.H., Chen, M.S., Li, L., Wu, C., Li, S.P. and Zheng, L. 2009. Increased intratumoral IL-17-producing cells correlate with poor survival in hepatocellular carcinoma patients. *J Hepatol.* **50.** 980-9.

Zhou, F. 2009. Molecular mechanisms of IFN-gamma to up-regulate MHC class I antigen processing and presentation. *Int Rev Immunol.* **28.** 239-60.

Zhou, L., Ivanov, I., Spolski, R., Min, R., Shenderov, K., Egawa, T., Levy, D.E., Leonard, W.J. and Littman, D.R. 2007. IL-6 programs T(H)-17 cell differentiation by promoting sequential engagement of the IL-21 and IL-23 pathways. *Nat Immunol.* **8.** 967-74.

Zhu, J., Yamane, H., Cote-Sierra, J., Guo, L. and Paul, W.E. 2006. GATA-3 promotes Th2 responses through three different mechanisms: induction of Th2 cytokine production, selective growth of Th2 cells and inhibition of Th1 cell-specific factors. *Cell Res.* **16.** 3-10.

Zielinski, C.E., Mele, F., Aschenbrenner, D., Jarrossay, D., Ronchi, F., Gattorno, M., Monticelli, S., Lanzavecchia, A. and Sallusto, F. 2012. Pathogen-induced human TH17 cells produce IFN-gamma or IL-10 and are regulated by IL-1beta. *Nature.* **484.** 514-8.

