

UCH-FC  
Biotecnología  
S454  
C.1

FACULTAD DE CIENCIAS  
UNIVERSIDAD DE CHILE



**“CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA Y FUNCIONAL DE  
LINFOCITOS T REGULADORES DE PACIENTES CON  
MELANOMA TRATADOS CON INMUNOTERAPIA CELULAR”**

**Seminario de Título**

**Entregada a la Universidad de Chile**

**En cumplimiento parcial de los requisitos para**

**Optar al Título de Ingeniero en Biotecnología Molecular.**



**Por**

**Gabriela Yael Segal Wasserman**

**Marzo, 2009**

**Santiago-Chile**

**Directora de Seminario de Titulo: Mercedes López N.**

**Co-Director: Flavio Salazar-Onfray.**



## INFORME DE APROBACIÓN SEMINARIO DE TÍTULO

Se informa a la Escuela de Pregrado de la Facultad de Ciencias, de la Universidad de Chile que el Seminario de Título, presentado por la Sra.:

**GABRIELA Yael SEGAL WASSERMAN**

### “CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA Y FUNCIONAL DE LINFOCITOS T REGULADORES DE PACIENTES CON MELANOMA TRATADOS CON INMUNOTERAPIA CELULAR”

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

*MD. Mercedes López Nitsche*  
**Director Seminario de Título**

*Dr. Flavio Salazar-Onfray*  
**Co-Director Seminario Título**

**Comisión de Evaluación**

*Dra. María Rosa Bono Merino*  
**Presidente Comisión**

*Dr. Mario Rosemblatt Silber*  
**Corrector**



Santiago de Chile, Marzo de 2009

## BIOGRAFÍA

Un soleado día de otoño de 1983, nací en Santiago de Chile un 5 de Abril. Mis padres, Ricardo y Viviana, me llamaron Gabriela Yael Segal Wasserman. Soy la mayor de mis hermanos, Rodrigo y Michelle. Cuando solo tenía 3 años ingresé al jardín Infantil del que a la postre sería mi único colegio, el Instituto Hebreo Dr. Chaim Weizmann . El año 2001, antes de cumplir mis 18 años, ingreso al programa de Bachillerato con Mención en Ciencias de la Universidad de Chile, además de los significativos conocimientos adquiridos, en esta etapa de mi vida desarrollé grandes amistades que hasta el día de hoy mantengo. El año 2003, ingreso a la carrera de Ingeniería en Biotecnología Molecular en la Facultad de Ciencias de la Universidad de Chile. La formación recibida en esta carrera fue de muy elevado nivel académico y me reafirmó mi vocación científica – biológica. En esta etapa he cultivado valiosísimas y entrañables amistades que jamás olvidaré, y con las cuales realizamos imperecederos viajes y paseos. El año 2006 ingresé al Laboratorio de Inmunología Antitumoral de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile, para realizar una unidad de investigación, lugar donde luego desarrollaría la presente tesis. Ahora que estoy alcanzando el fin de esta etapa académica me siento muy agradecida por todo el apoyo recibido en estos maravillosos años de estudio.





## AGRADECIMIENTOS

Después de todo el tiempo que ha transcurrido hasta llegar a este momento la lista de gente a la cual quiero agradecer es bastante amplia. En primer lugar a quienes me dieron la vida ; dos personas gracias a quien soy lo que soy, Viviana y Ricardo ellos han tenido la paciencia de enseñarme y de encausarme cuando ha sido necesario y no hubiese llegado hasta este momento de no ser por ellos. Muchas gracias también a mis hermanos Rodrigo y Michelle, quienes me alegran el diario vivir y me han ayudado siempre que se los he solicitado.

También a alguien muy especial una persona demasiado linda que ha sido un apoyo demasiado importante y me ha brindado todo su amor en todo momento y me ayudado a levantarme en cada tropiezo, tampoco lo habría logrado sin ti Gracias Ramón.

No puedo dejar de agradecer a mis profesores Mercedes y Flavio que me han hecho mejorar tanto científicamente como humanamente y me han motivado a en el campo de la investigación. Y a toda la gente que estuvo ayudándome en diferentes funciones que involucró esta tesis como; Cristian Pereda por su ayuda con las citometrías, Leonel Muñoz por la ayuda con los análisis estadísticos, a Claudio Perez gracias a quien logre ordenar mis experimentos, a Lorena Salazar quien fue un gran apoyo en todo el proceso de escritura, Marisol Briones quien siempre me ha brindado toda su ayuda para obtener reactivos, y a quienes ya esta altura del partido mas que compañeros y compañeras los considero mis amigos; Paulina Toledo, Estefanía Espinoza, Claudia Duran, Marcela Farías, Carlos Saffie, Diego Reyes, Raquel Aguilera, Alexandra Ginesta, Daniel Hevia, Fermín González, Andrés

Tittareli, Rodrigo González, Isidora Insunza, Tamara García, Andrea Villablanca, Paula Fluxa, Mónica Kurte y Marcos Ramírez

Tampoco puedo dejar de mencionar a mis compañeros de carrera quienes fueron parte importante de la enseñanza y con quienes pasamos también momentos inolvidables, gracias a quienes todo este proceso fue simplemente un agrado.



## **FINANCIAMIENTO**

Este trabajo fue financiado mediante el proyecto FONDECYT 1060935 y la oficina de Apoyo a la Investigación Clínica del Hospital Clínico de la Universidad de Chile OAIC.



# ÍNDICE DE CONTENIDOS

1. ÍNDICE DE FIGURAS.....	ix
2. LISTA DE ABREVIATURA.....	x
3. RESUMEN.....	xii
4. ABSTRACT.....	xiii
5. INTRODUCCIÓN.....	1
5.1 Cáncer de piel.....	1
5.2 Sistema inmune y Cáncer.....	2
5.3 Inmunoterapia en melanoma.....	4
5.4 Células dendríticas.....	5
5.5 Nuestra experiencia en inmunoterapia del cáncer.....	9
5.6 Linfocitos T reguladores y cáncer.....	10
6. HIPÓTESIS.....	14
7. OBJETIVOS.....	14
7.1 Objetivo General.....	14
7.2 Objetivos Específicos.....	14
8. MATERIALES Y MÉTODOS.....	15
8.1 Pacientes.....	15
8.2 Obtención de Células mononucleares de sangre periférica.....	15
8.3 Caracterización Fenotípica de linfocitos T reguladores.....	16
8.4 Caracterización Fenotípica de linfocitos T reguladores inducibles Th3 y Tr1.....	17
8.5 Aislamiento de poblaciones regulatorias.....	18
8.6 Inmunofluorescencia.....	19

8.7 Ensayo de Citotoxicidad .....	20
8.8 Análisis Estadísticos .....	20
9. RESULTADOS .....	22
9.1 Caracterización fenotípica y cuantificación de poblaciones de linfocitos T reguladores derivados de sangre de pacientes con melanoma en distintas etapas de la inmunoterapia. ....	22
9.1.1 Caracterización fenotípica de linfocitos T reguladores naturales .....	22
9.1.2 Caracterización fenotípica de linfocitos T reguladores tipo1 .....	23
9.1.3 Caracterización de linfocitos T helper tipo3. ....	25
9.2 Cuantificación estadística de las proporciones de linfocitos T reguladores encontradas en pacientes con melanoma avanzados tratados con inmunoterapia de CD4. ....	26
9.3 Evaluación de la capacidad inhibitoria de las poblaciones de células T reguladoras CD4+CD25high.....	34
Selección de poblaciones Treg obtenidas de pacientes con melanoma mediante microesferas magnéticas. ....	34
Treg provenientes de pacientes con melanoma son capaces de suprimir la citotoxicidad de clones de LT CD8+ específicos contra MART-1.....	36
10. DISCUSIÓN .....	39
11. CONCLUSIONES .....	42
12. BIBLIOGRAFÍA .....	43
13. ANEXO 1.....	51





# 1. ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Caracterización fenotípica de la población de Linfocitos Treg por citometría de flujo.....23

Figura 2: Caracterización fenotípica de la población de Linfocitos Tr1 por citometría de flujo .....24

Figura 3: Caracterización fenotípica de la población de Linfocitos Th3 por citometría de flujo .....26

Figura 4: Sobrevida y respuesta inmunológica (DTH) de pacientes ingresados al protocolo de inmunoterapia basado en CDs contra el melanoma maligno.....27

Figura 5: Variación de LT CD4<sup>+</sup>foxp3<sup>+</sup> en pacientes respondedores y no respondedores durante el tratamiento con CDs.....29

Figura 6: Variación de Linfocitos Tr1 en pacientes respondedores y no respondedores pre y post vacunación con CDs.....31

Figura 7: Variación de Linfocitos Th3 en pacientes respondedores y no respondedores pre y post vacunación con CDs .....33

Figura 8: Enriquecimiento de la población Treg a partir de células mononucleares de pacientes con melanoma avanzado.....35

Figura 9: Expresión de foxp3 en LT CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup> aisladas por microesferas magnéticas .....36

Figura 10: Treg provenientes de pacientes con melanoma son capaces de suprimir la citotoxicidad de clones específicos contra MART-I .....38

## 2. LISTA DE ABREVIATURAS

APC: Células presentadoras de antígenos (*Antigen Presenting Cells*)

CCR7: Receptor C-C de quimioquinas 7 (*C-C Chemokine Receptor 7*)

CD: Célula Dendrítica

CD40L: Ligando de CD40 (*CD40 Ligand*)

CPM: Cuentas por minuto CTL: Linfocitos T Citotóxicos (*Cytotoxic T Lymphocytes*)

DAMPs: Patrones moleculares asociadas al daño (*Damage Associated Patterns*)

DMSO: Dimetil sulfóxido

DTH: Respuesta de hipersensibilidad retardada tipo IV (*Delayed Type IV Hypersensitivity*)

DTIC : Dacarbazina

Flt3L: Ligando de Flt-3 (*Flt-3 Ligand*)

Foxp3: Forkhead Box P3

GM-CSF: Factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (*Granulocyte Monocyte Colony Stimulating Factor*)

IL: Interleuquina

KLH: Hemocianina del molusco "Keyhole limpet" (*Keyhole Limpet Hemocyanine*)

LPS: Lipopolisacárido

LT : Linfocitos T

MART-1: Antígeno de Melanoma reconocido por células T (*Melanoma Antigen Recognized by T-cells*).

MHC: Complejo Principal de Histocompatibilidad (*Major Histocompatibility Complex*)

mRNA: Acido Ribonucleico Mensajero (*Messenger Ribonucleic Acid*)

NK: Asesinas naturales (*Natural Killer*)

PBL: Linfocitos de sangre periférica (*Peripheral Blood Lymphocytes*)

PBMC : Células mononucleares de sangre periférica (*Peripheral Blood Mononuclear Cell*)

PBS : Fosfato buffer salino (*Phosphate Buffer Saline*)

RPM: Revoluciones Por Minuto.(Revolutions per minute)

TAA :Antígenos asociados a tumor (*Tumor Associated Antigens*)

TCR: Receptor linfocito T (*T Cell Receptor*)

TGF- $\beta$  :Factor de transformación y crecimiento beta (*Transforming Growth Factor Beta*)

Th: Linfocitos T *helper* (*T Helper lymphocytes*)

Th3: Linfocitos T *helper* 3

TIL: Linfocitos infiltrantes de tumor (*Tumor Infiltrating Lymphocytes*)

TNF: Factor de necrosis tumoral (*Tumor Necrosis Factor*)

Tr1: Linfocitos T reguladores tipo 1

Treg: Linfocitos T reguladores naturales

TSA: Antígenos tumor específicos (*Tumor Specific Antigens*)

### 3. RESUMEN

Recientemente hemos finalizado en Chile el primer ensayo clínico de fase II utilizando células dendríticas (CDs) cargadas con lisados de melanoma alogénicos, con el fin de activar el sistema inmune de pacientes con melanoma avanzado. De acuerdo al tipo de respuesta inmunológica detectada después del tratamiento, se han diferenciado dos grupos de pacientes, un grupo que genera memoria inmunológica contra antígenos tumorales luego de las inoculaciones, al que se ha denominado *respondedores*, cuya mediana de supervivencia es de 33 meses y otro grupo que no genera memoria inmunológica contra antígenos tumorales y que se ha denominado como *no respondedores*, cuya mediana de supervivencia es de 11 meses.

Las diferencias entre ambos grupos puede estar dada por la existencia de poblaciones de linfocitos T reguladores que inhiben el desarrollo de la respuesta inmune periférica y controlan respuestas autoinmunes y antitumorales. En este trabajo, evaluamos el rol de estas poblaciones en las respuestas clínicas e inmunológicas observadas en nuestro protocolo. Nuestros resultados demuestran que en aquellos pacientes que denominamos *no respondedores* (n=14) la proporción y el número de linfocitos T reguladores productores de TGF- $\beta$ , aumentan significativamente luego de cada inmunización, a diferencia del grupo *respondedor* (n=14), donde la proporción de estas células disminuye con las inmunizaciones. Adicionalmente, se observaron diferencias significativas entre la proporción de linfocitos T CD4<sup>+</sup>foxp3<sup>+</sup> (Treg) que aumenta en los pacientes *No Respondedores* y disminuye en los *Respondedores* y de la población de linfocitos T CD4<sup>+</sup>IL10<sup>+</sup> (Tr1), que presentan un aumento significativo a medida que la terapia avanza en pacientes *No Respondedores*.

Según estos antecedentes el comportamiento de los linfocitos T reguladores en la sangre de los pacientes podría constituir un importante factor de predicción del resultado de la terapia basada en CDs, lo que le otorga una alta implicancia para la

compresión y diseño de nuevas estrategias terapéuticas para el tratamiento del cáncer y de enfermedades autoinmunes.

#### 4. ABSTRACT

In Chile, we have recently finalized the first clinical phase II study using dendritic cells (DCs), loaded with allogeneic melanoma tumor lysates, with the purpose to activate the immune system in patients with advanced melanoma. According to the immunological type of response detected after receiving the treatment, two groups' of patients were identified. One group which generated an immunological memory response towards the tumor antigens, which was nominated *responders*, with an estimated median survival of 33 months, and the other group did not generate an immunological memory response towards the tumor antigens and was called *non-responders* which have an estimated median survival of 11 months.

The different immunological response between the two groups of patients could partly be due to the presence of regulatory T-lymphocytes, which inhibits the peripheral immune response and controls autoimmune diseases as well as anti-tumoral immune responses. In this study, we have evaluated the regulatory T-lymphocytes role in relation with the clinical and immunological responses observed in our melanoma patients. Our results demonstrate that after each immunization the proportion and the number of TGF- $\beta$  producing T regulatory lymphocytes were significantly increased in the group of patients nominated *non-responders* (n=14). In contrast, the group of patients nominated *responders* (n=14) was observed to show a decrease in this cellular population during the immunization. In addition, a significant difference in the proportion of CD4<sup>+</sup>foxp3<sup>+</sup> lymphocytes (Treg) was observed between the two groups of patients, in which this population was augmented in the *non responder* patients and reduced in the *responders*. Moreover in *non responder* patients' CD4<sup>+</sup> IL-10<sup>+</sup> lymphocytes (Tr1), there is an increase while the therapy proceeds.

According to these results the behavior in regulatory T-lymphocytes from our patients' blood could potentially be an important predictor for the outcome of the clinical response. Furthermore, our results could have important implications for a better understanding and design of therapeutic strategies for the treatment of cancer and autoimmune diseases.

## 5. INTRODUCCIÓN

### 5.1 Cáncer de piel

El cáncer es un grupo heterogéneo de enfermedades, que se desarrollan cuando las células de un tejido pierden los mecanismos que controlan su ciclo celular, promoviendo su proliferación e inhibiendo su muerte. En los países desarrollados el cáncer es la primera causa de muerte en la población adulta. Mientras que en Chile, los tumores malignos constituyen la segunda causa de muerte en la población mayor de 15 años, precedida sólo por las enfermedades cardiovasculares (Medina y Kaempffer, 2001).

Entre los cánceres de piel, el melanoma es sin duda el de más rápida expansión y de más alta mortalidad (Lawson, 2004). Su incidencia ha aumentado progresivamente en las últimas décadas en Europa, Estados Unidos, y especialmente en Australia. En Chile, entre los años 1992 al 2002 se constataron 2.425 muertes por melanoma maligno y su incidencia aumentó de 1,1 casos en el año 1990 a 1,9 casos por 100.000 habitantes en el año 2005 (Ministerio de Salud, Chile).

Aunque más del 95% de los pacientes con melanoma sobreviven cuando son diagnosticados en etapas tempranas, es decir, cuando el tumor está confinado a la epidermis y es tratable mediante cirugía. Una vez que éste se disemina, es altamente resistente a los tratamientos convencionales como cirugía, radioterapia y quimioterapia. Cuando el melanoma está en etapa IV, ya diseminado a órganos distantes, la sobrevida a 5 años es menor al 15%, con una mediana de sobrevida de 9 a 11 meses (Balch y col., 2001).

Actualmente, los investigadores en las áreas básicas, pre-clínica y clínica están abocados en comprender los mecanismos celulares y moleculares de esta enfermedad, su relación con el sistema inmune y los tratamientos más efectivos y seguros para poder combatir la enfermedad.

## **5.2 Sistema inmune y Cáncer**

El sistema inmune se compone de un variado número de células y moléculas que confieren al organismo protección frente a una gran variedad de entidades como bacterias, virus, hongos y de diversas agresiones internas como el desarrollo de neoplasias.

Históricamente, los estrechos vínculos entre inmunidad y cáncer se conocen desde hace más de un siglo, cuando el científico William Coley obtuvo respuestas antitumorales esporádicas, inyectando en pacientes extractos de bacterias (Pain, 2002). La interrelación del sistema inmune y las neoplasias fue elaborada en la teoría de la inmunovigilancia anti-tumoral, acuñada por Burnet en 1970 (Burnet, 1970), que establece que una de las principales funciones del sistema inmune es reconocer y destruir células neoplásicas. Actualmente, el concepto original se ha ido adaptando a observaciones que demuestran que aunque tumores letales son capaces de desarrollarse en individuos inmunocompetentes, es también un hecho que individuos inmunodeficientes tienen una mayor tendencia a desarrollar algunos tipos de tumores, como linfomas o sarcomas, lo que otorga un papel al sistema inmune en el control de estas neoplasias (Dal Maso y col.; 2005, Álvarez y col., 2004).

En 1943, se demostró que la inmunización con tumores podía prevenir el crecimiento de tumores singénicos en ratones (Gross, 1943), posteriormente se demostró

que linfocitos T (LT) humanos tienen la capacidad de lisar específicamente tumores autólogos en ensayos *in vitro* (Topalian y col., 1989) y que la estimulación de linfocitos T con células tumorales autólogas induce su proliferación y la secreción de citoquinas (Barth y col., 1991).

Los linfocitos T poseen receptores altamente específicos que son capaces de reconocer antígenos tumor-específicos (TSA) o tumor-asociados (TAA), en el contexto del Complejo Principal de Histocompatibilidad (MHC) y destruir células cancerosas (Boon y col., 1994; Van den Eynde y col., 1995; Coulie y col., 1994; Kawakami y col. 1994, 1994 y 1995; Brichard y col., 1993). Los linfocitos T citotóxicos CD8<sup>+</sup> (CTL) tienen la capacidad de reconocer tumores a través de fragmentos peptídicos de 8-10 aminoácidos derivados de proteínas citoplasmáticas o nucleares que están asociados al MHC clase I (Townsend y col., 1985; Falk y col., 1991). Los linfocitos T citotóxicos específicos contra antígenos tumorales pueden ser aislados desde los ganglios linfáticos, linfocitos infiltrantes de tumor (TIL) o desde sangre periférica de pacientes con melanoma (Coulie y col., 1994; Kawakami y col., 1994 y 1994). El aislamiento de linfocitos T antitumorales ha permitido la identificación y posterior caracterización de antígenos tumorales en varios tipos de tumores (Kawakami y col., 1995; Brichard y col., 1993).

La utilización del sistema inmune para el tratamiento del cáncer se denomina inmunoterapia. Este tratamiento se basa en la activación de diversos componentes inmunológicos para controlar el crecimiento tumoral. Actualmente, aún se persigue la oportunidad de desarrollar un procedimiento eficaz y de bajo costo para el tratamiento de

un amplio espectro de cánceres, manipulando el sistema inmune para inducir respuestas antitumorales potentes y perennes.

### **5.3 Inmunoterapia en melanoma**

En los últimos 15 años se han desarrollado terapias basadas en la utilización de células y moléculas del sistema inmune, las que administradas a pacientes inducen la activación de respuestas antitumorales. Distintas moléculas como Interleuquina 2 (IL-2) e Interferón alfa (IFN- $\alpha$ ) han sido utilizadas solas o en combinación con dacarbazina (DTIC), el único quimioterapéutico aprobado para melanoma, mostrando utilidad para reducir metástasis, pero sin aumentar la supervivencia de los pacientes (Agarwalla y col., 2002; Bajetta y col., 1994; Falkson y col., 1998; Keilholz y col., 1998; Dudley y col., 2005). Terapias celulares como transferencia adoptiva de linfocitos T CD8<sup>+</sup> específicos contra antígenos tumorales con o sin inmunosupresión sistémica, también han sido utilizados en distintos ensayos clínicos mostrando reducciones tumorales importantes, pero con un alto costo y un elevado porcentaje de reacciones adversas para los pacientes (Rosenberg y col., 2008; Mackensen y col., 2006; Powell y col., 2006). Nuevos blancos terapéuticos se han identificado sobre células de melanoma y sobre componentes del sistema inmune, lo que ha permitido desarrollar una amplia gama de anticuerpos monoclonales dirigidos contra CTLA-4 o contra Her2/neu, con el objetivo de eliminar el tumor y modular la respuesta inmune antitumoral. La utilidad de estas moléculas está siendo investigada actualmente a través de diversos estudios clínicos en curso (Vogel y col., 2002; Ribas y col., 2005; Amin y col., 2008)

Una de las herramientas inmunológicas más promisorias como terapia contra el cáncer, es la utilización de células dendríticas (CDs) autólogas cargadas con antígenos tumorales (TAA). Las células dendríticas, adecuadamente activadas, son capaces de estimular en forma natural, la respuesta inmune antitumoral generando además memoria inmunológica durante el desarrollo de esta respuesta (Porgador y Gilboa, 1995; Paglia y col., 1996; Hart, 1997).

#### **5.4 Células dendríticas:**

##### **¿Por qué pueden generar respuestas contra el tumor en pacientes con melanoma?**

La capacidad de activar *in vivo* CTL específicos contra células tumorales, requiere de la presentación antigénica previa en un contexto celular especial dado por células presentadoras de antígenos profesionales (APC), particularmente las CDs (Bell y col., 1999). Estas células se encuentran localizadas en epitelios y mucosas, como CDs residentes. En estos tejidos, reciben señales de peligro endógenas, conocidas como DAMPS (*Danger-Associated Molecular Pattern Molecules*), inducidas por la muerte y el stress de células tumorales (Matzinger, 2007; Bianchi, 2007; Sauter y col., 2000; Randolph y col., 2002). Las CDs adquieren antígenos tumorales, maduran y migran hacia los órganos linfoides secundarios, donde entregan señales a los linfocitos T para que éstos se activen, proliferen y se trasladen a los tejidos periféricos para eliminar células tumorales. Cuando las CDs son estimuladas con las señales adecuadas en la periferia son capaces de expresar moléculas co-estimuladoras, secretar citoquinas y traspasar otras señales que son cruciales para garantizar la efectividad de la respuesta antitumoral mediada por LT (Bianchi, 2007; Sauter y col., 2000; Randolph y col., 2002; Cella y col., 1999; Mendoza-Naranjo y col.,

enviado a publicación 2009; Krug y col., 2001; Ito y col., 2002). Estas capacidades, hacen de las CDs las mejores candidatas para ser usadas en protocolos de vacunación en cáncer (Dalod y col., 2002; Ardavin y col., 2004). Células dendríticas cargadas adecuadamente con antígenos asociados a tumor han inducido respuestas inmunes protectoras y eficaces en la eliminación de tumores en modelos animales y humanos (Shuler y col., 2003; Svane y col., 2003; Song y col., 1997; Carrasco y col., 2008).

Los ensayos clínicos basados en vacunaciones con CDs, han sido posibles por el desarrollo de métodos que permiten obtener un alto número de CDs *ex vivo*. En efecto, cantidades relativamente altas de CDs inmaduras, pueden obtenerse a partir de monocitos CD14<sup>+</sup> aislados de sangre o a través de leucoaféresis por gradientes de centrifugación y adherencia (Sallusto y Lanzavecchia, 1994; Banchereau y Steiman, 1998; López y col., 2004). Estas células son estimuladas a diferenciarse con factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF) e Interleuquina-4 (IL-4) por 5-7 días (Sallusto y Lanzavecchia, 1994). Las CDs inmaduras pueden ser maduras con diferentes estímulos, entre otros, factor de necrosis tumoral  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), ligando de Flt-3 (Flt3L), lipopolisacárido (LPS) o ligando de CD40 (CD40L) (Banchereau y Steiman, 1998; Steiman, 2003; O'Rourke col., 2003).

La entrega óptima del antígeno tumoral constituye uno de los factores más importantes para el éxito de la inmunoterapia basada en CDs. En distintos ensayos han sido utilizados como proveedores de antígenos para las CDs, lisados autólogos de células tumorales, péptidos derivados de TAA o TSA, células tumorales completas y mRNA tumoral (Trefzer y col., 2005; Nagayama y col., 2003; Palucka y col., 2006; Vilella y col.,

2004). Además, se han utilizado lisados alogénicos de células de melanoma, los que constituyen una valiosa alternativa (Trefzer y col., 2005; Nestle y col., 1998; Rosenberg y col., 1998).

El primer estudio clínico de vacunación con CDs en humanos, fue reportado en *Nature Medicine* en 1998 (Rosenberg y col., 1998), y a partir de esa fecha se han desarrollado distintos protocolos que utilizan estas células como inductoras de respuestas antitumorales en distintas neoplasias como carcinoma de próstata, melanoma y linfoma (Ardavin y col., 2004; Shuler y col., 2003; Svane y col., 2003)

Hasta ahora, varios de estos estudios han mostrado datos promisorios respecto a aumentos en la inducción de inmunidad anti-tumoral, pero ninguno de estos resultados se han acompañado por mejoras clínicas duraderas en enfermedades metastásicas (Nestle y col., 1998; Rosenberg y col., 1998; Schaendorf y col., 2006; O'Rourke y col., 2003; Ridgway, 2003). Esta carencia de eficacia clínica observada en ensayos clínicos basados en vacunas ha causado decepción en la comunidad médica y científica (Sallusto y Lanzavecchia, 1994; Rosenberg y col., 2004). Los ensayos clínicos que usaron péptidos sintéticos como antígenos, no lograron producir respuestas clínicas objetivas o mejoras en la sobrevida probablemente debido a la inducción de tolerancia mediada por péptidos de alta afinidad, por el escape de clones del tumor que han perdido la expresión del antígeno, o ausencia de las señales de peligro asociadas a los antígenos (Nestle y col., 1998; Schaendorf y col., 2006; Ridgway, 2003). Por otra parte, CDs pulsadas o cargadas con tumor autólogo se han utilizado para inducir respuestas inmunológicas más fuertes y más extensas contra los tumores (Hersey y col., 2004; Morton y col., 1992; Ridolfi y col.,

2006). Sin embargo, estas aproximaciones limitan su aplicación a una proporción reducida de pacientes que tienen tumores en sitios accesibles para su remoción, dejando la terapia fuera del alcance de pacientes con metástasis inoperables, micrometástasis y pacientes de alto riesgo de recurrencia.

Por otro lado, la existencia de otras señales conocidas como DAMPs inducidas por la muerte y el stress producido sobre las células tumorales (Matzinger, 2007; Bianchi, 2007; Sauter y col., 2000), serían esenciales para el direccionamiento adecuado de las respuestas inmunes efectoras por las CDs. En nuestro laboratorio, se ha determinado que el estrés inducido en el procesamiento de lisados tumorales, no sólo hace de estos lisados una rica fuente de antígenos tumorales, sino que también los hace grandes proveedores de agentes de activación, los cuales son entregados a la célula dendrítica con el fin de inducir una fuerte respuesta inmune. Nuestros estudios han determinado que el lisado tumoral de líneas de melanoma (TRIMEL®) que utilizamos en nuestros protocolos, es capaz de expresar y secretar moléculas DAMPs como las proteínas de shock térmico p70 y p69 (*Heat Shock Proteins*; HSP70, HSP69), Calreticulina y *High Mobility Group Box 1*, (HGBM1), las que son sintetizadas en respuesta al stress celular generado por el procesamiento del lisado TRIMEL® (Manuscrito en preparación). Así, el éxito de la vacunación con CDs podría depender del esquema de tratamiento utilizado, de la vía de inoculación, de la dosis de CDs inyectadas y de las señales de activación con las que las CDs son maduras.

Por esa razón, diseñamos un protocolo que incluyó TRIMEL®, que no sólo proporciona una fuente estandarizada y extensamente aplicable de antígenos específicos de

tumor, sino que además resulta un factor fundamental en la inducción de la maduración *in vitro* de las CD.

### 5.5 Nuestra experiencia en inmunoterapia del cáncer

Recientemente hemos finalizado en Chile, el primer ensayo clínico de fase II utilizando CD cargadas con lisados de melanoma alogénicos con el fin de activar el sistema inmune de pacientes con melanoma avanzado (López y col., 2009; Escobar y col., 2005). En este estudio que involucra a 50 pacientes, hemos observado ausencia de reacciones adversas y un aumento de la mediana de sobrevida de los pacientes en comparación con los datos históricos (Balch y col., 2001).

De acuerdo al tipo de respuesta inmunológica detectada después del tratamiento, hemos podido diferenciar dos grupos de pacientes, un grupo que genera memoria inmunológica contra antígenos tumorales luego de las inoculaciones, medido mediante ensayos de hipersensibilidad retardada tipo IV (DTH), al que hemos denominado *respondedores* y otro grupo que no genera memoria inmunológica contra antígenos tumorales y que denominamos *no respondedores*. El 60,98% de los pacientes tratados son *respondedores* (n=25) mientras que el 39,02% son *no respondedores* (n=16). Clínicamente, ambos grupos difieren en que aquellos *respondedores* mostraron una sobrevida tres veces superior al grupo *no respondedor*. El grupo de *respondedores* mostró una mediana de sobrevida de 33 meses, comparado con el grupo de *no respondedores* que mostró una mediana de sobrevida de 11 meses (López y col., 2009). Por lo tanto, existe un perfil de respuesta clínica e inmunológica diferencial en los pacientes tratados con inmunoterapia basada en células dendríticas. El estudio de los factores que influyen en estas

respuestas permitirá diseñar estrategias personalizadas y más eficaces para combatir el melanoma.

## 5.6 Linfocitos T reguladores y cáncer

Los linfocitos T reguladores son poblaciones heterogéneas en fenotipo y función y pueden ser divididas en linfocitos T reguladores centrales (Treg) y Linfocitos T reguladores periféricos (López y col., 2006). Los Treg son LT CD4<sup>+</sup>, que sobreexpresan constitutivamente en su superficie, la cadena alfa del receptor de IL-2 (CD25), y característicamente expresan un factor de transcripción, llamado Foxp3 (López y col., 2006; Sakaguchi, 2005). Foxp3 es un factor transcripcional, el cual se une al DNA y es capaz de actuar como represor transcripcional probablemente antagonizando la función del factor nuclear de célula T (NFAT) e inhibiendo la producción de varias citoquinas proinflamatorias (Shubert y col., 2001). Mientras que su mutación en humanos y ratones causa un devastador síndrome inmunoproliferativo asociado a autoinmunidad (Bennet y col., 2001), la transducción retroviral de este mismo gen a LT CD4<sup>+</sup> CD25<sup>-</sup>, transfiere un fenotipo regulador a estas células (Fontenot y col., 2003; Hori y col., 2003). Estos datos sugieren, que foxp3 actuaría como un factor que podría definir un linaje particular de células T con propiedades supresoras definidas.

Los Treg constituyen un 5-15% de la población total de LTCD4<sup>+</sup> en sangre periférica en humanos (Walker, 2004; Becher-Allan y col., 2005), y expresan otros marcadores que son útiles para su caracterización y enriquecimiento como CD5<sup>high</sup>, GITR<sup>high</sup>, y CD62L (Becher-Allan y col., 2005; Sakaguchi, 2005). Estas células son capaces de inhibir la proliferación y las funciones efectoras de otros LT por variados

mecanismos que incluyen, el contacto célula a célula a través de interacción de receptores como CTLA-4, TGF- $\beta$  de membrana o el traspaso de moléculas como AMP cíclico a través de canales intercelulares y posiblemente la secreción de citoquinas inmunoregulatorias como IL-10 y TGF- $\beta$  (Sakaguchi y col, 1995; Nakamura y col., 2001; Pandiyan y col., 2007; Boop y col., 2007).

Por otro lado, los linfocitos T reguladores periféricos tienen la capacidad de generar respuestas regulatorias en la periferia, principalmente, a través de la secreción de citoquinas. Los Linfocitos T regulatorios tipo 1 (Tr1) son células capaces de secretar altas cantidades de IL-10 cuando son estimulados *in vitro* con dexametasona (Un Glucocorticoide sintético) y vitamina D3 (Roncarolo y col., 2001). Estudios realizados por Salazar y col. demostraron que líneas celulares de melanoma pre-tratadas con IL-10 recombinante (rIL-10) se tornan menos sensibles a CTL tumor específicas, correlacionándose este hecho directamente con una reducción de la expresión de MHC clase I en las células tratadas con IL-10 (Matsuda y col., 1994; Salazar-Onfray y col., 1995 y 1997). Estudios más recientes han demostrado que el silenciamiento de IL-10 con RNA de interferencia (iRNA), en células dendríticas humanas, además potencia las respuestas citotóxicas de LT autólogos anti MART-1 (Chhabra y col., 2008). Estudios realizados en nuestro laboratorio demuestran que el pre-tratamiento de CDs con IT9302, nonapéptido que representa la porción funcional de IL-10, es capaz de inducir un fenotipo tolerogénico en las CDs y que éstas son capaces de inducir la expresión de foxp3 en LT alogénicos (Manuscrito en preparación).

Otra población de linfocitos T reguladores lo constituyen los linfocitos Th3 los que producen grandes cantidades de TGF- $\beta$ , otra citoquina con propiedades inmunoregulatorias (Zheng y col., 2002; O'neill y col., 2004). La evidencia acumulada indica que TGF- $\beta$  ejerce su acción sobre las células Natural Killer (NK), LT, monocitos/macrófagos y en CD4, afectando el inicio de la respuesta inmune, tanto primaria como secundaria, suprimiendo también la fase efectora de esta respuesta. La forma activa de TGF- $\beta$  se une a receptores en la superficie de LT CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup> y células NK, alterando su fenotipo, proliferación y secreción de citoquinas (O'neill y col., 2004; Blobe y col., 2000; Teicher, 2007). Por otro lado, TGF- $\beta$  está relacionado con la función y/o inducción de Treg. Si bien las células Treg son generadas a partir del desarrollo de linfocitos en el timo de manera natural, existe cada vez más evidencia de la presencia de un subtipo de Treg que puede ser inducido en la periferia. *In vitro* TGF- $\beta$  es capaz de inducir la expresión de foxp3, a partir de poblaciones de LT CD4<sup>+</sup> (Chen y col., 2003). Adicionalmente, se ha propuesto que TGF- $\beta$  es un factor que impide la efectividad de las inmunoterapias basadas en CD4 (Kobie y col., 2003; Kao y col., 2003), inhibiendo la presentación antigénica y la migración de estas células hacia los linfonodos (Kobie y col., 2003), generando la incapacidad de montar una respuesta inmune antitumoral eficaz, mediada por linfocitos T tumor-específicos (Kao y col., 2003). Ensayos utilizando anticuerpos anti-TGF- $\beta$  muestran un aumento en la respuesta y la eficacia de este tipo de terapias en modelos murinos y humanos (Nam y col., 2008; Biswas y col., 2007).

Estas células y otras poblaciones como linfocitos T reguladores CD8<sup>+</sup> o linfocitos T reguladores  $\gamma\delta$  (O'neill y col., 2004), probablemente son inducidas *in vivo* durante el desarrollo del proceso inflamatorio y provienen de células T cuyo fenotipo regulador es influenciado por el ambiente de citoquinas en el que se desarrollan. Por lo tanto, es

probable, que en circunstancias fisiológicas operen dos mecanismos generales de supresión periférica, por un lado la existencia de células T que cumplen un rol supresor determinado desde su maduración tímica y por otro, células T que adquieren este fenotipo producto del balance dinámico entre células que expresen niveles diferenciales de citoquinas y moléculas de superficie.

Desde que los linfocitos T reguladores fueron caracterizados existe abundante evidencia que apoya la influencia de estas subpoblaciones en las respuestas antitumorales. Los Treg han sido identificados en sangre, linfonodos, ascitis y tejido tumoral, en distintos tipos de cáncer (Wolf y col., 2003; Woo y col., 2001; Ichihara y col., 2003; Curie y col., 2004). También se ha demostrado que su aumento en líquido ascítico, o en el tejido tumoral, está relacionado a una menor sobrevida y a una etapa más avanzada de la enfermedad neoplásica (Curie y col., 2004; Gao y col., 2007; Salama y col., 2008). Hace un tiempo, Rosenberg y col., demostraron que pacientes con melanoma metastásico refractario, tratados con quimioterapia a altas dosis y transferencia adoptiva de LT CD8<sup>+</sup> antitumorales presentaban regresiones objetivas en el 50% de los casos (Rosenberg y col., 2007). Estas respuestas estarían indicando que la quimioterapia previa, puede eliminar o reducir significativamente, las poblaciones de linfocitos T reguladores, lo que generaría un ambiente más favorable y menos hostil a los LT transfundidos, con lo cual se logra aumentar la eficacia de los tratamientos (Rosenberg y col., 2007; Dudley y col., 2005).

Basados en los datos expuestos planteamos la siguiente hipótesis de trabajo:

## 6. HIPÓTESIS

*“La efectividad clínica de las inmunizaciones con antígenos asociados a tumor está asociada a la presencia de poblaciones de Linfocitos T reguladores en la sangre de pacientes con melanoma”*

## 7. OBJETIVOS

### 7.1 Objetivo General

Caracterizar *ex vivo*, fenotípica y funcionalmente, los linfocitos T reguladores de pacientes tratados con inmunoterapia de células dendríticas y lisados tumorales con el fin de comprender su rol en esta terapia.

### 7.2 Objetivos Específicos

1. Evaluar y caracterizar fenotípicamente, mediante citometría de flujo, la presencia de poblaciones T reguladoras; Treg, Tr1 y Th3 en sangre periférica de pacientes con melanoma, previo, durante y posterior al tratamiento con inmunoterapia de células dendríticas y lisados tumorales.

2. Estudiar la correlación entre el porcentaje de linfocitos T reguladores en sangre de pacientes tratados y las respuestas inmunológicas *in vivo* el tiempo de supervivencia y la estabilidad de la enfermedad

3. Evaluar la capacidad inhibidora de las poblaciones Treg CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup> sobre LT efectoras, mediante:

- Enriquecimiento de poblaciones Treg obtenidas de pacientes con melanoma mediante microesferas magnética.

-Medición de la capacidad de supresión *in vitro* mediante ensayos de inhibición de citotoxicidad específica.

## **8. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **8.1 Pacientes**

Se analizaron 28 pacientes con melanoma en etapa IV, incluidos en el Protocolo clínico de inmunoterapia con células dendríticas (López y col. 2004, 2006 y 2009 ), diagnosticado y tipificado según los parámetros clínicos establecidos por la AJCC (Balch y col. 2001) Los criterios de inclusión de los pacientes en el protocolo de inmunoterapia incluyeron: Melanoma histológicamente verificado, clasificaciones de autovalencia (ECOG) con un valor de 2 o menos (Balch y col. 2001), valores normales en recuento de glóbulos blancos y plaquetas y seronegatividad para HIV y Hepatitis B . Todos los pacientes habían firmado el consentimiento informado correspondiente.

### **8.2 Obtención de Células mononucleares de sangre periférica**

Se extrajeron 20 mL de sangre periférica por punción venosa, que fue recolectada en tubos con heparina (BD vacutainer) para evitar su coagulación. Las muestras fueron obtenidas al inicio del protocolo (tiempo 0) y previo a cada inmunización con células dendríticas, según el protocolo anexo. Las células mononucleares de sangre periférica, fueron separadas por medio de gradiente de densidad utilizando Ficoll- Hypaque ( $\delta= 1.077 \text{ g/mL}$ ) (Axis-Shield, Oslo, Noruega): Brevemente, 10mL de sangre fue diluida en la razón 1:1 con solución de

PBS (137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 4.3 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1.47 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) 1x frío. Luego sobre la suspensión celular, se agregó suavemente 10 mL de Ficoll y se centrifugó por 20 minutos a 1200 rpm. El anillo de células mononucleares fue separado cuidadosamente entre la interfase Ficoll-plasma y las células mononucleares recuperadas fueron lavadas dos veces con PBS frío y se les agregó tampón de lisis de glóbulos rojos, ACK, durante 5 minutos. Luego, fueron lavadas con solución de PBS 1x y contadas mediante azul de tripán asegurando que el porcentaje de viabilidad fuese superior al 95%, de ser así las células se criopreservaban con medio de congelación compuesto de Dimetilsulfóxido (DMSO) 10% y Suero Fetal Bovino (SFB) 90%, para luego ser almacenadas en criotubos de 1,5 mL, en nitrógeno líquido a -195°C.

### **8.3 Caracterización Fenotípica de linfocitos T reguladores**

Las células mononucleares fueron descongeladas y resuspendidas en RPMI con 10% de SFB, se verificó su viabilidad por medio de tinción con azul de tripan y se trabajo con una concentración de  $1 \times 10^6$  células/mL.

Para la determinación de linfocitos T reguladores naturales CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup> Foxp3<sup>+</sup> (Treg), las células fueron lavadas dos veces con PBS con 3% de SFB y marcadas con el anticuerpo anti CD4-PeCy5.5humano (clon RPA-T4, eBioscience, 50 ng/1x10<sup>6</sup> células), y anticuerpo anti CD25-FITC humano (clon 2A3, Pharmigen, 100 ng/1x10<sup>6</sup> células), y fueron incubadas por 30 minutos, en hielo y oscuridad. Luego las células fueron fijadas y permeabilizadas con el tampón de fijación/permeabilización (e-Bioscience, CA, USA) por 30 minutos a 4°C y bloqueadas con 2% de suero normal de ratón (eBioscience, CA, USA), durante 15 minutos a 4°C. Estas células fueron incubadas con el anticuerpo anti Foxp3-PE

humano (Clon PCH101, eBioscience, 37,5 ug/1x10<sup>6</sup> células) o con control de isotipo IgG2a de rata acoplado a este mismo fluoróforo (eBioscience, 37,5 ug/1x10<sup>6</sup> células) por 30 minutos. Posteriormente las células fueron lavadas con PBS 1x con 3% SFB y fijadas con paraformaldehído (PFA) al 1%.

#### **8.4 Caracterización Fenotípica de linfocitos T reguladores inducibles Th3 y Tr1**

Para la medición de citoquinas intracelulares, se partió desde 1x10<sup>6</sup> células /mL de células mononucleares de sangre periférica, las cuales fueron incubadas durante 16 horas en placas de 24 pocillos en medio RPMI 1640 al 10% de SFB, en presencia de 100 ng/mL de LPS (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) para estimular la secreción de IL-10 y TGF- $\beta$ . La secreción de citoquinas fue inhibida adicionando Brefeldina A 10 $\mu$ g/mL (eBioscience, USA) las últimas cuatro horas en cultivo.

Posteriormente fueron cosechadas mediante pipeteo suave, fijadas con PFA al 2% y permeabilizadas con tampón de permeabilización (PBS 1x al 3% SFB Tritón X-100 al 0,05%) (Fisher Scientific, Hanover Park, IL), por 30 minutos a temperatura ambiente. Luego las células fueron teñidas con los siguientes anticuerpos específicos: IgG1 rata anti IL-10-PE humana (clon JES3-9D7, eBioscience, 37,5  $\mu$ g/1x10<sup>6</sup> células), o anticuerpo anti-LAP TGF- $\beta$  (clon 27232, R & D Systems 1,5 $\mu$ g/1x10<sup>6</sup> células) sin conjugar, ambos anticuerpos fueron diluidos en tampón de permeabilización, e incubados 30 minutos a 4°C. Posteriormente las células fueron lavadas con tampón de permeabilización. En el caso de las células teñidas para TGF-  $\beta$ , éstas fueron incubadas posteriormente con el anticuerpo secundario F (ab)<sub>2</sub> cabra anti IgG-FITC de ratón (policlonal, R&D Systems, 0,075 $\mu$ g/1x10<sup>6</sup> células) por 30 minutos a 4°C. Las células fueron lavadas tres veces con tampón y fijadas

con PFA 1% por 10 minutos a temperatura ambiente, y nuevamente lavadas tres veces. Luego tanto las células teñidas para TGF- $\beta$  como para IL-10, fueron teñidas con el anticuerpo IgG1 de ratón anti CD4-PECy5.5 humano (clon RPA-T4, eBioscience, 50 ng/1x10<sup>6</sup> células) e incubadas por 20 minutos a 4°C, luego lavadas dos veces con PBS 1x al 3% de SFB y fijadas en PFA 1%, finalmente, todas las células fueron analizadas por Citometría de flujo, en el citómetro FACscan (Becton Dickinson). El análisis posterior de los datos se hizo utilizando el programa WinMDI 2.9.

### **8.5 Aislamiento de poblaciones regulatorias**

Las células CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> se aislaron desde las células mononucleares de los pacientes, con el kit de depleción negativa para la molécula CD4 y de selección positiva para la molécula CD25 (Miltenyi, Alemania). Brevemente, 10<sup>7</sup> células mononucleares de sangre periférica, fueron lavadas con tampón de separación (PBS 1x 0,5% BSA y 2mM EDTA) y resuspendidas en 90 $\mu$ L de esta solución. Se incubaron luego con 10 $\mu$ L de anticuerpos biotinilizados (anti CD8, CD14, CD16, CD19, CD36, CD56, CD123, TCR $\gamma\delta$  y CD235a), por 10 minutos a 4°C. Posteriormente se agregó el anticuerpo anti-biotina acoplado a microesferas magnéticas y se incubó por 15 minutos a 4°C. Luego se lavaron las células con 2mL de Tampón de separación (PBS 1x 0,5% BSA y 2mM EDTA) y se centrifugaron a 1350 rpm por 10 minutos a 4°C. Luego, las células fueron resuspendidas en 500 $\mu$ L de este mismo tampón y aplicadas en una columna LD previamente dispuesta en el soporte magnético MidiMACs (Miltenyi, Alemania). Las células eluidas fueron recolectadas y contadas, para posteriormente ser sometidas a un segundo paso de separación. Los LT CD4<sup>+</sup> recolectados en el paso anterior, fueron resuspendidas en 90  $\mu$ L

de tampón de separación, se les adicionó 10µL de anticuerpo anti CD25 acoplado a microesferas magnéticas, e incubadas por 15 minutos a 4°C. Posteriormente fueron lavadas y finalmente se les hizo pasar por la columna MS situada en el soporte MiniMACs. Los linfocitos T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> fueron recolectados tras repetidas eluciones de la columna con el tampón, mientras que los LT CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup>, que se encontraban retenidas en la columna fueron liberadas por presión mediante un émbolo con 2mL de tampón. Los LT CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> fueron recuperadas y reservadas para posteriores experimentos. Posteriormente se verificó la pureza de la población por medio de citometría de flujo.

### **8.6 Inmunofluorescencia**

Para las tinciones de inmunofluorescencia se partió de 200.000 células CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> purificadas, según lo descrito en el punto anterior, estas fueron sembradas en portaobjetos de vidrio de 12 mm (Fisher, Pittsburgh, Pa) recubiertos con polilisina (Sigma-Aldrich, St Louis, MO). Las células fueron fijadas con metanol frío al 70% por 10 min, lavadas dos veces con PBS 1x e incubadas con PBS 1x -BSA 5% por una hora a temperatura ambiente. Posteriormente fueron incubadas durante toda la noche en una cámara húmeda a 4°C con los anticuerpos anti-CD4-PE Cy5.5 (clon RPA-T4, eBioscience, 50 ng/1x10<sup>6</sup> células), antiCD25-FITC (clon 2A3, Pharmigen, 100 ng/1x10<sup>6</sup> células) y anti-Foxp3-PE (Clon PCH101, eBioscience, 37,5 µg/1x10<sup>6</sup> células), los cuales fueron diluidos en PBS-BSA 1% e incubados en cámara húmeda a 4°C durante toda la noche. Las células fueron lavadas cuatro veces por 10 min en PBS-Triton-X100 0.05%. Posteriormente se agregó medio de montaje (Molecular Probes, Eugene, Ore) a los covers, para ser colocados en porta objetos y fueron analizados mediante microscopía confocal en el equipo Carl Zeiss MicroImaging (objetivo x63, LSM 510)

## 8.7 Ensayo de Citotoxicidad

Para los ensayos de citotoxicidad se utilizó la línea celular de melanoma FMS como célula blanco, ya que presenta antígenos específicos de melanoma, como MART1, el cual es reconocido específicamente por el clon de linfocito T CD8<sup>+</sup> anti-MART1 específico generado en nuestro laboratorio. (Mendoza-Naranjo y col., 2007)

Las células blanco FMS fueron cargadas con 5 a 10  $\mu$ Ci de <sup>51</sup>Cromo radioactivo (Cloruro de Cromo 10mCi, Perkin Elmer, USA), por una hora, a 37°C, y luego lavadas tres veces con 5mL de PBS 1X. Posteriormente, estas células fueron sembradas en conjunto con clones de LTCD8<sup>+</sup> específicos contra MART-1 (Efectores) en proporciones de 1:5 1:10 y 1:25 Efector/Blanco. Luego de 4 horas se obtuvieron 25  $\mu$ L de los sobrenadantes y se agregaron en placas Opti plate 96wells (Perkin Elmer, USA) con 225  $\mu$ L de líquido de centelleo (Microscint 20, Perkin Elmer, USA). Al cabo de 15 minutos de agitación en oscuridad se midió en el contador de centelleo Top Count NXT la liberación de <sup>51</sup>Cromo radioactivo (Perkin Elmer, USA) expresada como cuentas por minuto (cpm). Para expresar los resultados se utilizó la siguiente fórmula:

$$\text{Porcentaje de lisis} = \frac{(\text{cpm muestra} - \text{cpm liberación espontánea})}{(\text{cpm Máximo} - \text{cpm espontáneo})}$$

## 8.8 Análisis Estadísticos

Los análisis utilizados para la evaluación de la caracterización fenotípica del conjunto de pacientes, se realizó en dos etapas: en una primera instancia se realizó el análisis de la Normalidad de las muestras, para esto se utilizaron las pruebas de Skewness/Kurtosis, Shapiro-Wilk y Shapiro-Francia. En caso que la prueba de Normalidad fuera positiva se

aplicó, el t de student pareado. En el caso de las muestras no normales se aplicó el test del signo de Wilcoxon pareado. Ambas pruebas estadísticas permiten la comparación de una misma muestra a través del tiempo analizando cada paciente en forma individual, siendo agrupados finalmente en el valor estadístico arrojado por la prueba, expresado como valor de p.

Para los ensayos de Proliferación se utilizó Anova de una vía no paramétrico, para la determinación de la significancia entre las diferentes condiciones.

En todos los casos se fijó el nivel de significancia del p inferior a 0,05. Estos análisis fueron realizados con el Software STATA 7.

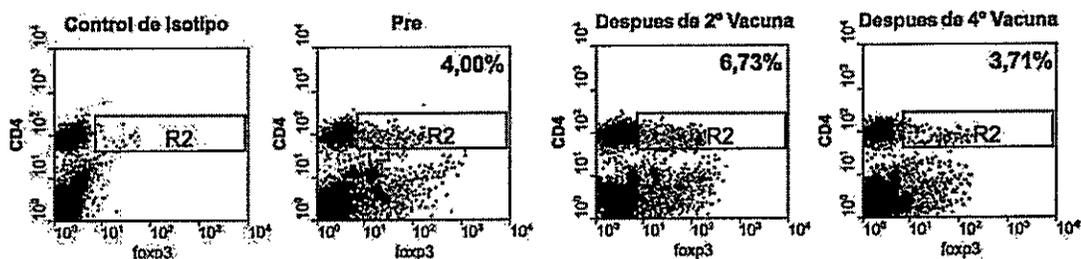
## **9. RESULTADOS**

### **9.1 Caracterización fenotípica y cuantificación de poblaciones de linfocitos T reguladores derivados de sangre de pacientes con melanoma en distintas etapas de la inmunoterapia.**

Con el objeto de caracterizar fenotípicamente los linfocitos T reguladores de sangre periférica de pacientes con melanoma avanzado sometidos a inmunoterapia con células dendríticas, se analizaron, mediante citometría de flujo células mononucleares criopreservadas, obtenidas después de cada inmunización. Sólo fueron analizadas aquellas muestras que al momento de la descongelación tenían una viabilidad mayor al 95% medido por Azul Tripán. Todos los datos fueron comparados con el recuento de leucocitos y linfocitos de los hemogramas de los pacientes seleccionados para estos análisis.

#### **9.1.1 Caracterización fenotípica de linfocitos T reguladores naturales**

Con el fin de realizar un análisis comparativo de las poblaciones de linfocitos T reguladores encontrados en distintas etapas del tratamiento se procedió a estandarizar el análisis de marcadores relevantes mediante citometría de flujo. En la Figura 1, panel izquierdo se observa la región R2, que corresponde a linfocitos T  $CD4^{+}/ foxp3^{+}$ . De acuerdo a los controles realizados mediante tinción simple con anti-CD4 y control de isotipo IgG2a, se puede observar que la población positiva es menos del 0,1%, lo que corresponde al basal de la metodología. En los siguientes paneles (pre, después de 2 vacunas, y después de 4 vacunas) se observan las variaciones que se producen en la sangre de un mismo paciente durante el tratamiento en la proporción de Treg observada. (Paciente MT40).



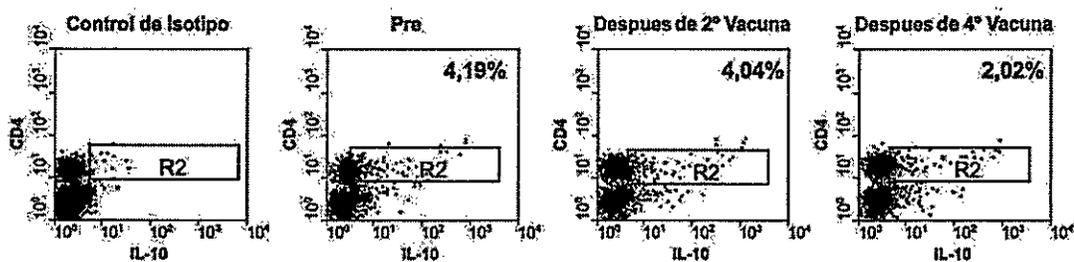
*Figura 1 Caracterización fenotípica de la población de Linfocitos Treg por citometría de flujo. Proporción de Treg de paciente MT40 antes de la inmunización y posterior a la segunda y cuarta vacuna. En el extremo superior derecho se observa el porcentaje de células encontradas en la región dos.*

En este ejemplo vemos variaciones que oscilan entre 4,00% de Treg al inicio de la terapia, con valores que llegan al 6,73% después de la segunda inmunización y disminuyen hasta 3,71% posterior a la cuarta inmunización. Es interesante notar, que existen poblaciones celulares que no expresan la molécula CD4 y que sin embargo expresan foxp3. Este subtipo de células podría corresponder a LT CD8<sup>+</sup> foxp3<sup>+</sup> que han sido descritos anteriormente en la literatura, a los cuales también se les ha asignado un rol regulador (Bisikirska y col., 2005)

### 9.1.2 Caracterización fenotípica de linfocitos T reguladores tipo 1

Dentro de las poblaciones de linfocitos T reguladores que se inducen en la periferia decidimos analizar los linfocitos Tr1 y linfocitos Th3, ya que éstos han sido relacionadas a inhibición de la respuesta inmune frente a tumores y a autoinmunidad. Los linfocitos Tr1 secretan como ya se mencionó IL-10, una citoquina inmunosupresora clásica. En la Figura 2, observamos la región R2, que corresponde a la población de LT CD4<sup>+</sup> secretores de IL-

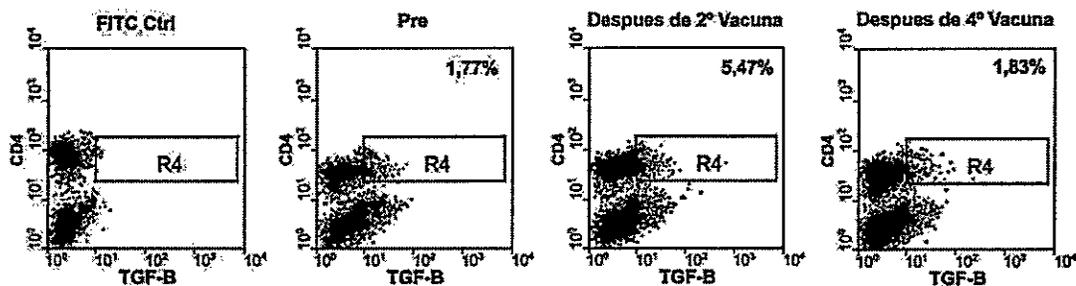
10. En el panel de la izquierda correspondiente al control de isotipo se observa que los eventos basales de la técnica no superan el 0,2% de la población estudiada. En los paneles siguientes podemos observar el comportamiento de la población de linfocitos Tr1 a medida que avanza la inmunización en un paciente (MT33). En este ejemplo, antes de la terapia el paciente presentaba un 4,19% de linfocitos Tr1 en sangre periférica y sólo después de la cuarta inmunización vemos una disminución de este porcentaje a 2,02%.



*Figura 2 Caracterización fenotípica de la población de Linfocitos Tr1 por citometría de flujo. Proporción de linfocitos Tr1 de paciente MT33 antes de la inmunización y posterior a la segunda y cuarta vacuna. En el extremo superior derecho se observa el porcentaje de células encontradas en la región dos.*

### 9.1.3 Caracterización de linfocitos T helper tipo3.

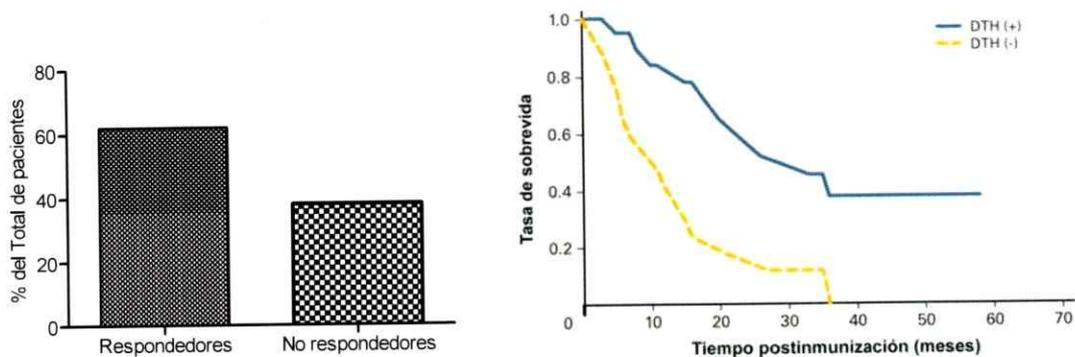
Los linfocitos Th3 se caracterizan por secretar cantidades significativas de TGF- $\beta$  y se han asociado al control de fenómenos autoinmunes y al escape tumoral. Con el objeto de identificar esta respuesta en los pacientes y evaluar las posibles diferencias entre los pacientes inmunizados y sus respuestas clínicas e inmunológicas, se analizaron las poblaciones de LT CD4<sup>+</sup> que expresan TGF- $\beta$ . En la Figura 3 observamos la caracterización fenotípica de linfocitos Th3 en sangre periférica de un paciente incluido en nuestro protocolo (MT15). En la Figura 3, observamos la región R4, que corresponde a la población de LT CD4<sup>+</sup> secretores de TGF- $\beta$ . En el panel de la izquierda correspondiente al control de isotipo, se observa que los eventos basales de la técnica no superan el 0,2% de la población estudiada. En los paneles siguientes, observamos el comportamiento de la población de linfocitos Th3, del paciente MT33, donde se observa que previo a las inmunizaciones existía una proporción de 1,77% que aumenta hasta un máximo de 5,47% luego de la segunda inmunización y luego vuelve a bajar hasta un 1,83%. Con los parámetros aquí descritos se hizo el análisis de 28 pacientes incluidos en el protocolo clínico lo que luego nos permitió estudiar variaciones estadísticas en dos grupos distintos de pacientes.



**Figura 3** Caracterización fenotípica de la población de Linfocitos Th3 por citometría de flujo. Proporción de linfocitos Th3 de paciente MT15 antes de la inmunización y posterior a la segunda y cuarta vacuna. En el extremo superior derecho se observa el porcentaje de células encontradas en la región dos.

## 9.2 Cuantificación estadística de las proporciones de linfocitos T reguladores encontradas en pacientes con melanoma avanzados tratados con inmunoterapia de CD4s.

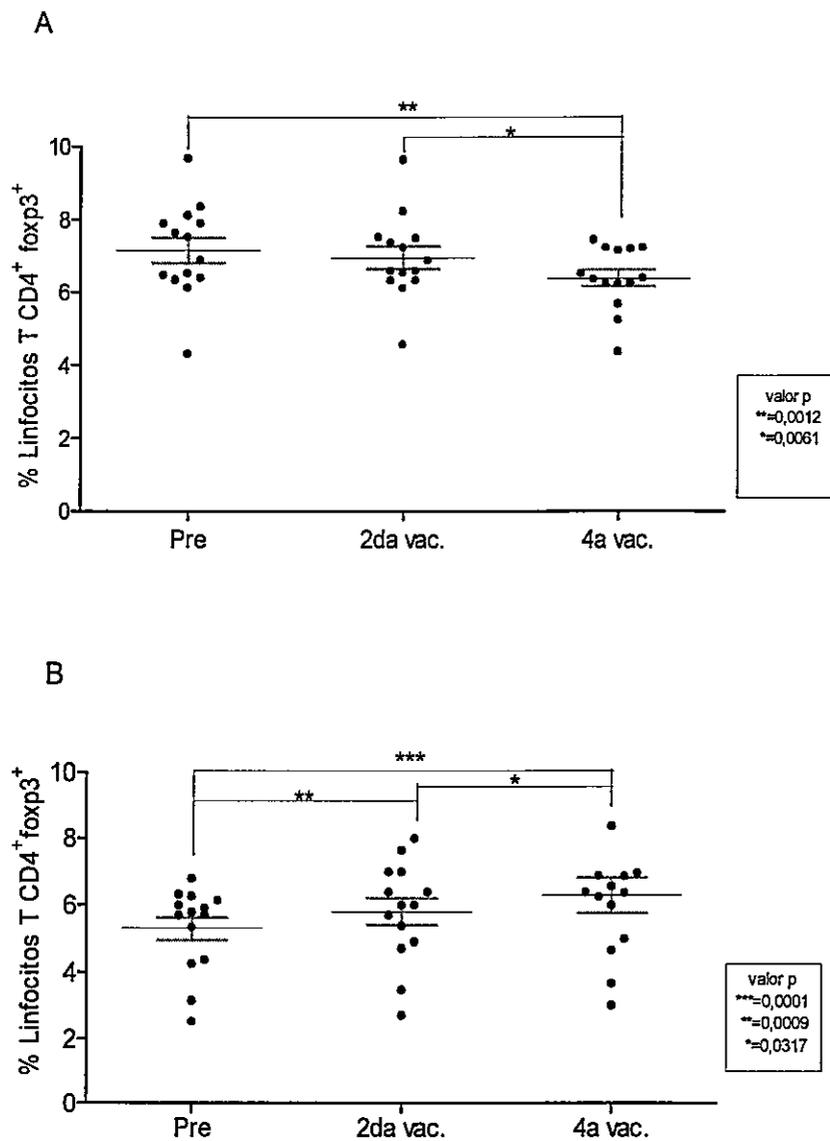
Como se describe en la Figura 4, hemos diferenciado dos grupos de pacientes de acuerdo al tipo de respuesta inmunológica detectada después del tratamiento, medido mediante ensayos de hipersensibilidad retardada tipo IV (DTH), un grupo de *respondedores*, que genera memoria inmunológica contra antígenos tumorales luego de las inoculaciones, y otro grupo de *no respondedores* que no genera reacción DTH contra antígenos tumorales. El 60,98% de los pacientes tratados son *respondedores* (n=25) cuya mediana de sobrevida fue de 33 meses, mientras que el 39,02% son *no respondedores* (n=16) y su sobrevida fue de 11 meses.



**Figura 4. Sobrevida y respuesta inmunológica (DTH) de pacientes ingresados al protocolo de inmunoterapia basado en CDs contra el melanoma maligno.** A) Porcentaje de pacientes con melanoma etapa IV ingresados al protocolo separados por respuesta de DTH (n=38). B) Curvas de sobrevida de pacientes con melanoma maligno etapa IV sometidos a inmunoterapia basada en CDs, agrupados según su respuesta DTH; DTH positivo n=21 y DTH negativo n=17

Para evaluar si las diferencias inmunológicas y de sobrevida observadas en nuestros pacientes pudiesen deberse al efecto de distintas poblaciones de linfocitos T reguladores presentes en la sangre de los pacientes, estudiamos las variaciones en la proporción de las poblaciones de linfocitos Treg, Tr1 y Th3, en células mononucleares de 28 pacientes, *respondedores* n=14 y *no respondedores* n=14. Estos datos fueron analizados con pruebas estadísticas pareadas, que analizan a cada paciente por separado en los diferentes tiempos de vacunación y los agrupan en un valor estadístico. En esta tesis fueron utilizados el test de student pareado, o el test del signo Wilcoxon pareado dependiendo de la normalidad de la muestra. Ambas pruebas estadísticas permiten la comparación de una misma muestra a través del tiempo, analizando cada paciente por separado y agrupándolo en un valor estadístico final.

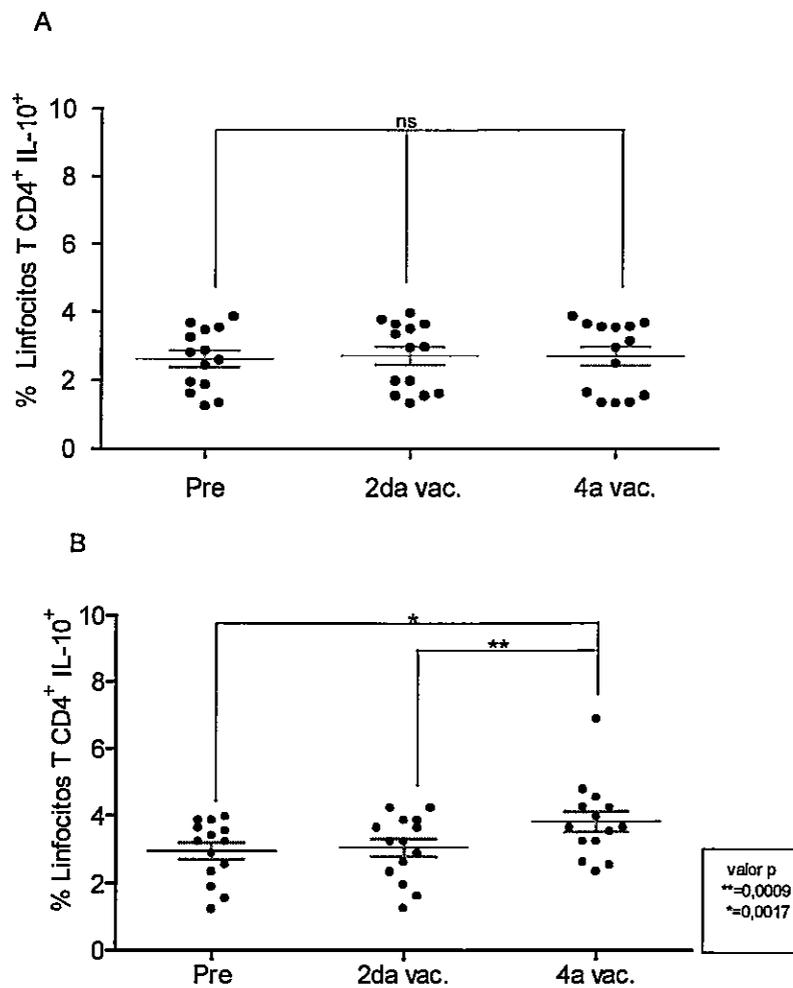
En la Figura 5A se observa que los pacientes *respondedores* muestran una disminución significativa de los Treg en la última dosis de vacunación comparados con el estado basal observado en la pre vacunación ( $p=0,0012$ ), de igual forma existe una disminución significativa de los Treg entre cuarta dosis versus la segunda dosis ( $p=0,0061$ ). Importantemente, en la figura 5B se observa un aumento significativo y sostenido en la población de los linfocitos Treg en los pacientes *no respondedores* entre la pre vacunación y la cuarta vacuna ( $p= 0,0001$ ), y entre la cuarta vacuna con respecto a la segunda vacuna ( $p=0,0317$ ).



**Figura 5. Variación de  $LT\ CD4^+ foxp3^+$  en pacientes respondedores y no respondedores durante el tratamiento con CDs.** Se determinó el porcentaje de Treg según los análisis mostrados en la figura N°1, se analizaron 14 pacientes respondedores (A) y 14 pacientes no respondedores (B) a la terapia con CDs pre y posterior a la 2<sup>da</sup> y 4<sup>a</sup> vacunación. Se realizó un análisis estadístico t de student pareado para los pacientes respondedores y para los no respondedores también con la excepción de la comparación pre vs. cuarta vacuna, para lo que se utilizó el test del signo de Wilcoxon. Los asteriscos y su significancia se indican en el recuadro derecho. Barra de error indica el error medio estándar SEM.

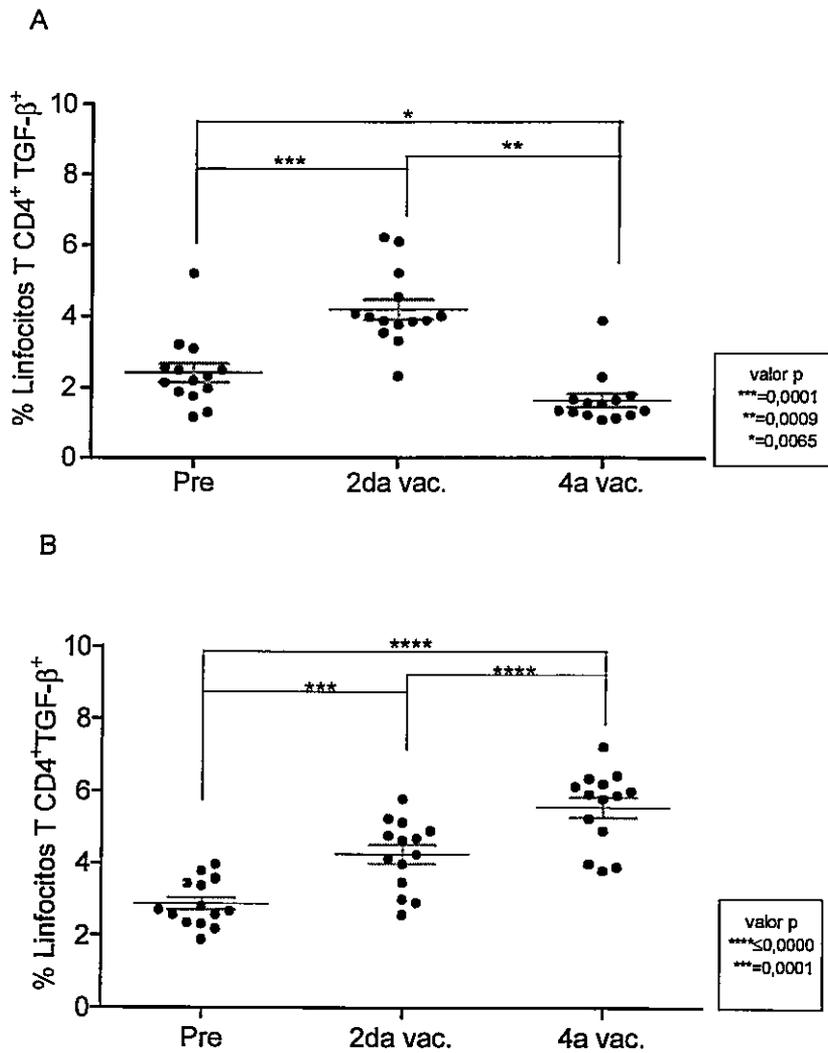
Posteriormente evaluamos las poblaciones Tr1 con la misma metodología descrita anteriormente. En la Figura 6 observamos que los *pacientes respondedores* no muestran cambios significativos en la proporción de células Tr1, que se mantiene constante durante todo el tratamiento.

Mientras que al estudiar los *pacientes no respondedores*, se observa un aumento en la población Tr1, tanto al comparar la pre vacunación con segunda dosis, como la segunda dosis con la cuarta dosis, asociado estos cambios a valores de alta significancia ( $p=0,0009$  y  $p=0,0017$ , respectivamente).



**Figura 6** Variación de Linfocitos Tr1 en pacientes respondedores y no respondedores pre y post vacunación con CDs. Se determinó el porcentaje de linfocitos Tr1 según los análisis mostrados en la figura N°2, se analizaron 14 pacientes respondedores (A) y 14 pacientes no respondedores (B) a la terapia con CDs pre y posterior a la 2<sup>da</sup> y 4<sup>a</sup> vacunación. En el caso de los respondedores se realizó la prueba estadística el test del signo de Wilcoxon con excepción de la comparación entre prevacunación y la segunda dosis para lo que se utilizó el t de student pareado, en el caso de los no respondedores se utilizó el t de student pareado para todas las comparaciones. Y se fijó el nivel de significancia en el valor de  $p < 0,05$ . Los asteriscos y su significancia se indican en el recuadro derecho. Barra de error indica SEM. Para cada uno de los gráficos  $n=14$ .

Finalmente, evaluamos el comportamiento de linfocitos Th3 en pacientes *respondedores* y *no respondedores*. Como podemos observar en la Figura 7, los pacientes *respondedores* presentan un aumento en la proporción de linfocitos Th3, a partir de la segunda inmunización, pero descienden a un nivel menor que el inicial, posterior a la cuarta vacuna. Por otro lado, los pacientes *no respondedores* mostraron un aumento linfocitos Th3 a partir la segunda dosis, aumento que se mantiene luego de la cuarta vacuna, presentando en todos los casos una alta significancia estadística ( $p \leq 0,0001$ ). En base a lo observado, es posible inferir que la disminución de esta subpoblación de linfocitos T está asociada a una mejor respuesta inmunológica de los pacientes, medida por DTH y a una mejor respuesta clínica, medida por aumento de la mediana de sobrevida tanto libre de progresión como sobrevida total.



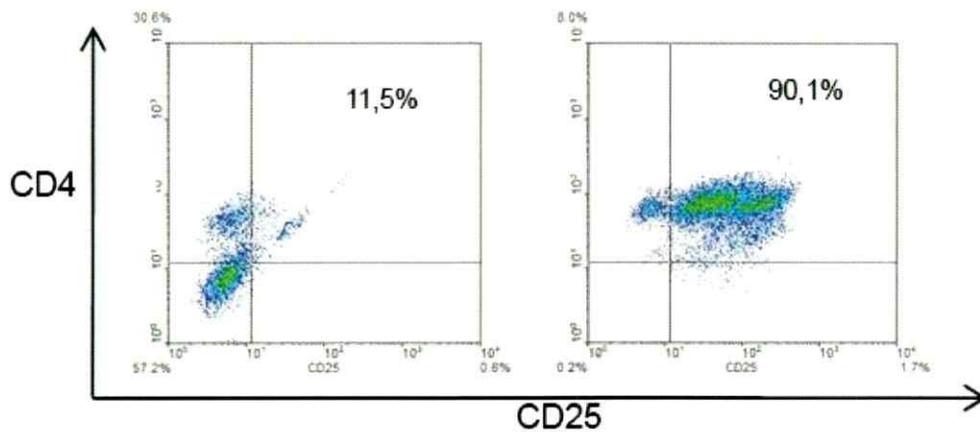
*Figura 7 Variación de Linfocitos Th3 en pacientes respondedores y no respondedores pre y post vacunación con CDs. Se determinó el porcentaje de linfocitos Th3 según los análisis mostrados en la figura N°3, se analizaron 14 pacientes respondedores (A) y 14 pacientes no respondedores (B) a la terapia con CDs pre y posterior a la 2<sup>a</sup> y 4<sup>a</sup> vacunación. Se realizó la prueba estadística t de student pareada en el caso de los no respondedores y el Test del signo de Wilcoxon en el caso de los respondedores. Se fijó el nivel de significancia en el valor de  $p \leq 0,05$ . Los asteriscos y su significancia se indican en el recuadro derecho. Barra de error indica SEM. Para cada uno de los gráficos  $n=14$*

### **9.3 Evaluación de la capacidad inhibitoria de las poblaciones de células T reguladoras $CD4^+CD25^{high}$**

Las células Treg se caracterizan por su capacidad para suprimir varias de las funciones efectoras de otros linfocitos. En base a esto, medimos la función supresora de los Treg obtenidos a partir de sangre de pacientes con melanoma, con el fin de evaluar si esta población mantenía su actividad en pacientes con melanoma avanzado. Con este fin se enriqueció la población de Treg a partir de sangre de pacientes con melanoma avanzado y se evaluó la capacidad de inhibir la citotoxicidad de linfocitos específicos anti-melanoma.

#### **Selección de poblaciones Treg obtenidas de pacientes con melanoma mediante microesferas magnéticas.**

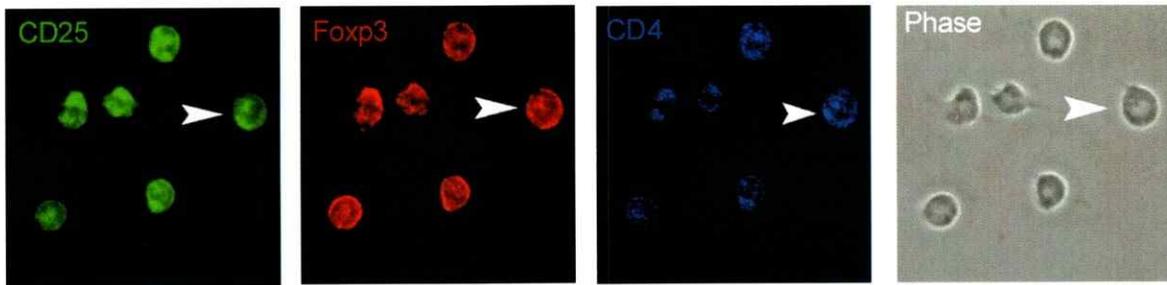
Las células Treg, se caracterizan por una serie de marcadores, entre ellos los marcadores de superficie CD4 y CD25. El marcador CD25 se expresa constitutivamente y a altos niveles, lo que permite diferenciar esta población regulatoria de los  $LTCD4^+CD25^+$  que están recientemente activados, cuyos niveles de expresión son menores (Baecher-Allan y col., 2005). Células mononucleares de pacientes con melanoma avanzado fueron recolectadas y separadas mediante microesferas magnéticas como se describió en Materiales y Métodos. Este método selecciona sólo las poblaciones de  $LT CD4^+CD25^{high}$ . Para evaluar la pureza de la separación se analizaron las poblaciones resultantes mediante citometría de flujo. En la Figura 8 se observa la diferencia entre la proporción de  $LT CD4^+CD25^+$  presentes en las células mononucleares obtenidas de pacientes con melanoma (Figura 8 panel izquierdo) y la proporción de las células  $LT CD4^+CD25^+$  aislados mediante inmunoselección (Figura 8 panel izquierdo).



**Figura 8** Enriquecimiento de la población Treg a partir de células mononucleares de pacientes con **melanoma avanzado**. Panel izquierdo: Porcentaje de LT  $CD4^+ CD25^{high}$  en células mononucleares de pacientes con melanoma avanzado. Panel derecho: Porcentaje de LT  $CD4^+ CD25^{high}$  en células mononucleares de pacientes con melanoma avanzado posterior al enriquecimiento mediante esferas magnéticas. Esta figura es representativa de 5 experimentos independientes.

A partir de la inmunoselección pudimos obtener una población de Treg altamente enriquecida con un porcentaje de pureza de un 90,1%, que pueden ser utilizadas en los ensayos *in vitro* para evaluar las propiedades funcionales de estas células.

Con el fin de comprobar la expresión de foxp3, en la población aislada, se utilizó la técnica de inmunofluorescencia. En la Figura N°9 es posible observar la triple tinción de células previamente purificadas mediante microesferas magnéticas. La flecha blanca indica una célula representativa positiva para los tres marcadores  $CD4^+ CD25^+ foxp3^+$ . Las células que no expresan foxp3 corresponden a un porcentaje marginal en los campos analizados, corroborando la alta pureza de las poblaciones obtenidas mediante la separación magnética.

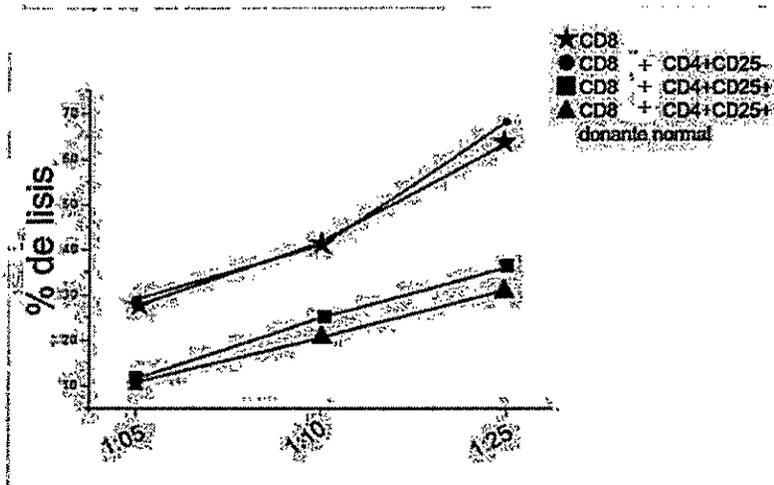


**Figura 9.** Expresión de *foxp3* en LT  $CD4^+CD25^{high}$  aisladas por microesferas magnéticas. Las células fueron aisladas, fijadas y teñidas con anticuerpos acoplados a fluorocromos, CD25 (verde), *Foxp3* (rojo) y CD4 (azul), en el cuarto cuadrante la fase de la misma zona detectada según lo descrito en *Materiales y Métodos*. Flechas blancas indican células  $CD4^+ CD25^+ foxp3$ . Microscopio Carl Zeiss MicroImaging (objetivo x63, LSM 510).

**Treg provenientes de pacientes con melanoma son capaces de suprimir la citotoxicidad de clones de LT  $CD8^+$  específicos contra MART-1.**

Se ha descrito que Treg son capaces de inhibir respuestas citotóxicas mediadas por LT  $CD8^+$  (Shevach y col., 2001). Para evaluar si las Treg enriquecidas a partir de células mononucleares de pacientes con melanoma avanzado eran capaces de suprimir estas respuestas, colocamos clones de LT  $CD8^+$  específicos contra MART-1 sobre líneas celulares de melanoma en presencia o ausencia de Treg, en un ensayo de liberación de  $^{51}Cromo$  como se describió de *Materiales y Métodos*. En la Figura 10 podemos observar que el clon anti MART-1, es capaz de lisar una línea celular de melanoma, llamada FMS, alcanzando hasta un máximo del 65% de lisis celular (razón E:T de 1:25), cuando agregamos Treg enriquecidas a partir de sangre de pacientes con melanoma avanzado,

estas fueron capaces de inhibir la citotoxicidad de los LT CD8<sup>+</sup> específicos, observándose un porcentaje de lisis no superior al 40% (razón E:T de 1:25) lo que constituye un 39% de inhibición, similar a lo observado en Treg provenientes de sujetos controles. Como control agregamos células no reguladoras (CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>) recuperadas de la separación magnética, pudiendo observar porcentaje de lisis de un 60%, similares a los porcentajes observados cuando el clon anti MART-1 fue utilizado solo. Este resultado demuestra que los Treg derivados de pacientes con melanoma son tan eficientes como los Treg de donantes normales en su capacidad de inhibir a CTL específicos contra antígenos de melanoma.



**Figura 10** Treg provenientes de pacientes con melanoma son capaces de suprimir la citotoxicidad de clones citotóxicos específicos contra MART-1. Se realizó un ensayo de liberación de cromo 51 enfrentando FMS (BLANCO) con LT CD8<sup>+</sup> específicos contra MART-1 en el contexto de HLA-A2 (EFECTOR), en proporciones de 1:5, 1:10 y 1:25 efector/blanco. En algunos casos se adicionó LT CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup> que fueron obtenidas a partir de PBMC de pacientes con melanoma avanzado o donantes normales, mediante inmunoselección con microesferas magnéticas. Los LT CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup> fueron adicionados en relación 1:1 con las células efectoras. LT CD8<sup>+</sup> específicos enfrentados con la línea celular derivada de melanoma FMS (★). LTCD8<sup>+</sup> específicos enfrentados a FMS y adicionando LT CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> de donantes normales en relación 1:1 (●). LTCD8<sup>+</sup> específicos enfrentados a FMS y adicionando LT CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> de pacientes con melanoma avanzado en relación 1:1 (■) LTCD8<sup>+</sup> específicos enfrentados a FMS y adicionando LT CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> de donantes normales en relación 1:1(▲) n=2.

## 10. DISCUSIÓN

En el presente trabajo demostramos por primera vez el impacto de la inmunización con células dendríticas sobre las poblaciones de linfocitos T reguladores y correlacionamos esta respuesta con la evolución clínica e inmunológica de los pacientes. Es así como, los linfocitos T reguladores naturales y T *helper* 3, aumentan significativamente en sangre periférica, luego de cada inmunización en los pacientes *no respondedores*. En cambio en pacientes *respondedores*, observamos que estas poblaciones disminuyen al final de la terapia a niveles inferiores que lo observado antes del tratamiento (Figura 5 y 6). Los cambios más dramáticos se observan en los linfocitos Th3, cuya proporción aumenta en ambos tipos de pacientes posterior a la segunda inmunización, sin embargo, la proporción de estas células disminuye notablemente posterior a la cuarta dosis en los pacientes *respondedores* mientras que en los *no respondedores* se incrementa (Figura 6). Este comportamiento es similar al observado en algunas enfermedades autoinmunes, donde este patrón de respuesta jugaría un importante rol inductor de la enfermedad (Kim y col., 2008). Adicionalmente, observamos que las poblaciones Treg disminuyen en la sangre de pacientes *respondedores* aunque no tan drásticamente como lo que ocurre con las poblaciones de linfocitos Th3. Además nuestros resultados muestran que los linfocitos Treg de pacientes con melanoma avanzado, mantienen sus funciones supresoras como los Treg de sujetos normales, sugiriendo que estas poblaciones funcionan normalmente durante el desarrollo de una neoplasia, aún en estadios avanzados de la enfermedad (figura 8 y 9).

La marcada reducción de la proporción de linfocitos Th3 y la disminución de los linfocitos Treg, en los pacientes que presentan respuestas de hipersensibilidad positivas,

implica que el estado inmunológico basal del paciente o variaciones en la respuesta inmune antitumoral inducidas por las inmunizaciones, pueden jugar un rol importante en el desarrollo de respuestas más inmunogénicas o tolerogénicas hacia los tumores. En la literatura se ha descrito que el aumento de las poblaciones Treg en diversos tipos de cáncer se correlaciona a progresión de la enfermedad (Curiel y cols., 2004) y que su eliminación podría favorecer las respuestas antitumorales (Dudley y col., 2005). Además recientemente, se ha descrito aumento de TGF $\beta$  en la sangre de pacientes con melanoma comparado con donantes sanos, y que estos niveles podrían ser aumentados por la inmunización con antígenos asociados a melanoma, en conjunto con GM-CSF (Filipazzi y col., 2007). Asimismo, la elevada concentración de TGF- $\beta$  en los tumores se ha correlacionado con la inhibición específica de CTL y de la citotoxicidad de células Natural Killer (Lee y col., 2004). Células tumorales, otros linfocitos T reguladores y un subgrupo de células mieloides CD14<sup>+</sup> pueden ser responsables de la producción de esta citoquina y probablemente de la inducción de linfocitos Th3 en el tumor (Filipazzi y col., 2007).

Actualmente, la evidencia sugiere que los linfocitos T CD4<sup>+</sup> juegan un rol central en el inicio y mantención de las respuestas contra tumor. La presencia de linfocitos T reguladores y de linfocitos Th17 puede definir mejor el rol que juegan los linfocitos T CD4<sup>+</sup> en el cáncer y otras enfermedades autoinmunes. Los linfocitos Th17 son una subpoblación de LTCD4<sup>+</sup>, que se caracteriza por la expresión del factor de transcripción ROR $\gamma$ t y la secreción de IL-17 (Park y col., 2005). Se ha descrito que linfocitos Th17 pueden encontrarse en el infiltrado linfocitario de tumores ováricos y se cree que su presencia favorecería las respuestas antitumorales (Miyahara y col., 2008). Aumentos en

los niveles de TGF- $\beta$  pueden ser responsables de evitar la generación y expansión de linfocitos Th17 de memoria en humanos (Miyahara y col., 2008). Interesantemente, altos niveles de TGF- $\beta$  están relacionados además, a la inducción de foxp3 en LT CD4<sup>+</sup> y a la adquisición de propiedades reguladoras por estas células (Shevach y col., 2008). Consistente con esta observación, reportes recientes indican que TGF- $\beta$  inhibe ROR $\gamma$ t y favorece la expresión de foxp3 (Zhou y col., 2008). Sin embargo, niveles incrementados de TGF- $\beta$  en el suero de pacientes con cáncer no es una constante y la secreción de la forma activa de esta citoquina por parte de los tumores tampoco (Miyahara y cols., 2008). Basados en estos hallazgos y en nuestros resultados creemos que es necesario analizar el rol que podrían tener otras fuentes de TGF- $\beta$  como los linfocitos Th3 y distintas poblaciones de células presentadoras de antígenos, en la inhibición de las poblaciones Th17 en el microambiente tumoral.

En resumen, nuestros datos sugieren que la presencia de poblaciones de linfocitos T reguladores en la sangre de pacientes sometidos a inmunoterapia basada en CDs, podría limitar la respuesta inmune anti melanoma y ser un factor de predicción fácil y relevante en el resultado clínico de esta terapia. Aunque, son necesarios posteriores estudios para determinar que otras variables están relacionadas a las mejores respuestas clínicas e inmunológicas encontradas en nuestros pacientes, nuestras observaciones pueden ofrecer nuevas herramientas para el desarrollo de estrategias terapéuticas y pronósticas para pacientes con cáncer.

## 11. CONCLUSIONES

- Es posible caracterizar y cuantificar linfocitos T reguladores desde células mononucleares de sangre periférica criopreservada obtenidas de pacientes con melanoma avanzado.
- Los pacientes *respondedores* presentan un menor porcentaje de linfocitos Th3 y Treg que los pacientes *no respondedores* al final de las inmunizaciones.
- La población Tr1 en los pacientes *respondedores* no mostró diferencias significativas durante el periodo de vacunación. Los pacientes *no respondedores* mostraron un aumento en la población Tr1 sólo después de la cuarta inmunización.
- Los linfocitos Treg de pacientes con melanoma avanzado mantienen su capacidad de suprimir la citotoxicidad mediada por CTL específico contra antígenos de melanoma.
- En conjunto estos datos nos indican que los pacientes *respondedores* tienen niveles inferiores de linfocitos Treg y Th3 en sangre periférica al final de las inmunizaciones y que estos hallazgos, se correlacionan con respuestas DTH positivas y aumento de la sobrevida total y libre de enfermedad en los pacientes

## 12. BIBLIOGRAFÍA

- Agarwala SS, Glaspy J, O'Day SJ, Mitchell M, Gutheil J, Whitman E, Gonzalez R, Hersh E, Feun L, Belt R, Meyskens F, Hellstrand K, Wood D, Kirkwood JM, Gehlsen KR, Naredi P. (2002). Results from a randomized phase III study comparing combined treatment with histamine dihydrochloride plus interleukin-2 versus interleukin-2 alone in patients with metastatic melanoma. *J Clin Oncol.* **20**: 125-133.
- Alvarez A, Sanroman B, Carro E, Vazquez-Martul E. (2004). Neoplasia in solid organ transplant recipients: single-center experience. *Transplant Proc.* **36**(3):784-786.
- Amin A, Benavides LC, Holmes JP, Gates JD, Carmichael MG, Hueman MT, Mittendorf EA, Storrer CE, Jama YH, Craig D, Stojadinovic A, Ponniah S, Peoples GE. (2008). Assessment of immunologic response and recurrence patterns among patients with clinical recurrence after vaccination with a preventive HER2/neu peptide vaccine: from US Military Cancer Institute Clinical Trials Group Study I-01 and I-02. *Cancer Immunol Immunother.* **57**(12):1817-25.
- Ardavin, C., Amigorena, S., Reis e Sousa, C. (2004). Dendritic Cells: Immunobiology and Cancer Immunotherapy. *Immunity.* **20**: 17-23.
- Baecher-Allan C, Wolf E, Hafler DA. (2005). Functional analysis of highly defined, FACS-isolated populations of human regulatory CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> T cells. *Clin Immunol.* **115**(1):10-8.
- Bajetta E, Di Leo A, Zampino MG, Sertoli MR, Comella G, Barduagni M, Giannotti B, Queirolo P, Tribbia G, Bernengo MG., et al. (1994). Multicenter randomized trial of dacarbazine alone or in combination with two different doses and schedules of interferon alfa-2a in the treatment of advanced melanoma. *J Clin Oncol.* **12**: 806-811.
- Balch CM, Buzaid AC, Soong SJ, Atkins MB, Cascinelli N, Coit DG, Fleming ID, Gershenwald JE, Houghton A Jr, Kirkwood JM, McMasters KM, Mihm MF, Morton DL, Reintgen DS, Ross MI, Sober A, Thompson JA, Thompson JF. (2001). Final version of the American Joint Committee on Cancer staging system for cutaneous melanoma. *J Clin Oncol.* **19**:3635-3648.
- Banchereau, J., Steiman, R.M. (1998). Dendritic cells and the control of immunity. *Nature.* **392**:245-52.
- Barth RJ, Jr., Mule JJ, Spiess PJ, Rosenberg SA. (1991). Interferon gamma and tumor necrosis factor have a role in tumor regressions mediated by murine CD8<sup>+</sup> tumor-infiltrating lymphocytes. *J Exp Med.* **173**:647-58.
- Bell, D., Young, JW., Banchereau.(1999), J. Dendritic cells. *Adv. Immunol;* **72**: 255 – 324. Review.
- Bennett, C.L. et al. (2001). The immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, Xlinked syndrome (IPEX) is caused by mutations of FOXP3. *Nat. Genet.* **27**: 20–21.
- Bianchi, M.E. (2007). PAMPs and alarmins: all we need to know about danger. *J. Leukoc Biol;* **81**:1–5
- Bisikirska B, Colgan J, Luban J, Bluestone JA, Herold KC. (2005). TCR stimulation with modified anti-CD3 mAb expands CD8<sup>+</sup> T cell population and induces CD8<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Tregs. *J Clin Invest.* **115**(10):2904-13.
- Biswas S, Guix M, Rinehart C, Dugger TC, Chytil A, Moses HL, Freeman ML, Arteaga CL. (2007). Inhibition of TGF-beta with neutralizing antibodies prevents radiation-induced acceleration of metastatic cancer progression. *J Clin Invest.* **117**(5):1305-13.

- Blobe GC, Schiemann WP, Lodish HF (2000). Role of transforming growth factor beta in human disease. *N Engl J Med.* **342**: 1350-1358
- Boon, T., Cerottini, J.C., Van den Eynde, B., van der Bruggen, P., Van Pel, A. (1994). Tumor antigens recognized by T lymphocytes. *Annu Rev Immunol.* **12**:337-65.
- Bopp T, Becker C, Klein M, Klein-Hessling S, Palmethofer A, Serfling E, Heib V, Becker M, Kubach J, Schmitt S, Stoll S, Schild H, Staeger MS, Stassen M, Jonuleit H, Schmitt E. (2007). Cyclic adenosine monophosphate is a key component of regulatory T cell-mediated suppression. *J Exp Med.* **11**;204(6):1303-10.
- Brichard, V., Van Pel, A., Wolfel, T., Wolfel, C., De Plaen, E., Lethè, B., Coulie, P., Boon, T. (1993). The tyrosinase gene coded for an antigen recognized by autologous cytolytic T lymphocytes on HLA-A2<sup>+</sup> melanoma. *J. Exp. Med.* **178**:489-95.
- Burnet, F.M. (1970). The concept of immunological surveillance. *Prog Exp Tumor Res.* **13**: 1-27.
- Carrasco J, Van Pel A, Neyns B, Lethè B, Brasseur F, Renkvist N, van der Bruggen P, van Baren N, Paulus R, Thielemans K, Boon T, Godelaine D, Porgador, A., Gilboa, E. 2008. Vaccination of a melanoma patient with mature dendritic cells pulsed with MAGE-3 peptides triggers the activity of nonvaccine anti-tumor cells. *J Immunol.* **180**(5):3585-93.
- Cella, M., Jarrosay, D., Facchetti, F., Alebardi, O., Nakajima, H., Lanzavecchia, A., Colonna, M. (1999). Plasmacytoid monocytes migrate to inflamed lymph nodes and produce large amounts of type I interferons. *Nat. Med.* **5**: 919-23.
- Chhabra A, Chakraborty NG, Mukherji B. (2008). Silencing of endogenous IL-10 in human dendritic cells leads to the generation of an improved CTL response against human melanoma associated antigenic epitope, MART-1 27-35. *Clin Immunol.* **126**(3):251-9
- Chen W, Jin W, Hardegen N, Lei KJ, Li L, Marinos N, McGrady G, Wahl SM. (2003). Conversion of peripheral CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> naive T cells to CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory T cells by TGF-beta induction of transcription factor Foxp3. *J Exp Med.* **198**:1875-86.
- Coulie, P.G., Brichard, V., Van Pel, A., Wolfel, T., Schneider, J., Traversari, C., Mattei, S., De Plaen, E., Lurquin, C., Szikora, J.P., Renault, J., Boon, T. (1994). A new gene coding for a differentiation antigen recognized by autologous cytolytic T lymphocytes on HLA-A2 melanomas. *J. Exp. Med.* **180**:35-42.
- Curjel TJ, Coukos G, Zou L, Alvarez X, Cheng P, Mottram P, Evdemon-Hogan M, Conejo-Garcia JR, Zhang L, Burow M, Zhu Y, Wei S, Kryczek I, Daniel B, Gordon A, Myers L, Lackner A, Disis ML, Knutson KL, Chen L, Zou W. (2004). Specific recruitment of regulatory T cells in ovarian carcinoma fosters immune privilege and predicts reduced survival. *Nat Med.* **10**(9):942-9.
- Dal Maso L, Tirelli U, Polesel J, Franceschi S. 2005. Trends in cancer incidence rates among HIV-infected patients. *Clin Infect Dis.* **41**(1):124-126
- Dalod, M., Salazar-Mather, T.P., Malmgaard, L., Lewis, C., Asselin-Paturel, C., Brière, F., Trinchieri, F., Bironet, C.A. (2002). Interferon  $\gamma$  and interleukin 12 responses to viral infections: pathways regulating dendritic cell cytokine expression *in vivo*. *J. Exp. Med.* **195**: 517-28.
- Dudley ME, Wunderlich JR, Yang JC, Sherry RM, Topalian SL, Restifo NP, Royal RE, Kammula U, White DE, Mavroukakis SA, Rogers LJ, Gracia GJ, Jones SA, Mangiameli DP, Pelletier MM, Gea-Banacloche J, Robinson MR, Berman DM, Filie AC, Abati A, Rosenberg SA. (2005). Adoptive cell transfer therapy following non-myeloablative but lymphodepleting

- chemotherapy for the treatment of patients with refractory metastatic melanoma. *J Clin Oncol.*;23(10):2346-57.
- Escobar A., López M., et al. (2005) Dendritic cell immunizations alone or combined with low doses of interleukin-2 induce specific immune responses in melanoma patients.. *Clin Exp Immunol.* 142 (3); 555-568
- Falk K. Rotzschke O. Deres K. Metzger J. Jung G. Rammensee HG. (1991). Identification of naturally processed viral nonapeptides allows their quantification in infected cells and suggests an allele-specific T cell epitope forecast. *J. Exp. Med.* 174:425.
- Falkson CI, Ibrahim J, Kirkwood JM, Coates AS, Atkins MB, Blum RH. (1998). Phase III trial of dacarbazine versus dacarbazine with interferon alpha-2b versus dacarbazine with tamoxifen versus dacarbazine with interferon alpha-2b and tamoxifen in patients with metastatic malignant melanoma: an Eastern Cooperative Oncology Group study. *J Clin Oncol.* 16: 1743-1751.
- Filipazzi P, Valenti R, Huber V, Pilla L, Canese P, Iero M, Castelli C, Mariani L, Parmiani G, Rivoltini L. (2007). Identification of a new subset of myeloid suppressor cells in peripheral blood of melanoma patients with modulation by a granulocyte-macrophage colony-stimulation factor-based antitumor vaccine. *J Clin Oncol.* 25(18):2546-53.
- Fontenot, J.D., Gavin, M.A. & Rudensky, A.Y. (2003). Foxp3 programs the development and function of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory T cells. *Nat. Immunol.* 4, 330–336.
- Gao Q, Qiu SJ, Fan J, Zhou J, Wang XY, Xiao YS, Xu Y, Li YW, Tang ZY. (2007). Intratumoral balance of regulatory and cytotoxic T cells is associated with prognosis of hepatocellular carcinoma after resection. *J Clin Oncol.*25(18):2586-93
- Gross L. (1943). Intradermal immunization of C3H mice against a sarcoma that originated in an animal of the same line. *Cancer Res.* 3:326
- Hart, D.N. (1997). Dendritic cells: Unique leukocyte populations which control the primary immune response. *Blood*; 90: 3245-87.
- Hersey P, Menzies SW, Halliday GM, et al. Phase I/II study of treatment with dendritic cell vaccines in patients with disseminated melanoma. (2004). *Immunol Immunother* 53:125-134,
- Hori, S., Nomura, T. & Sakaguchi, S. (2003). Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. *Science* 299, 1057–1061.
- Ichihara F, Kono K, Takahashi A, Kawaida H, Sugai H, Fujii H. (2003). Increased populations of regulatory T cells in peripheral blood and tumor-infiltrating lymphocytes in patients with gastric and esophageal cancers. *Clin Cancer Res.*9(12):4404-8.
- Ito, T., Amakawa, R., Kaisho, T., Hemmi, H., Tajima, K., Uehira, K., Ozaki, Y., Tomizawa, H, Akira, S., Fukuhara, S. (2002). Interferon- $\alpha$  and interleukin-12 are induced differentially by Toll-like receptor 7 ligands in human blood dendritic cells subsets. *J. Exp. Med.* 195:517-28.
- Kao JY, Gong Y, Chen CM, Zheng QD, Chen JJ. (2003). Tumor-derived TGF- $\beta$  reduces the efficacy of dendritic cell/tumor fusion vaccine. *J Immunol.* 170:3806-11.
- Kawakami, Y., Eliyahu, S., Sakaguchi, K., Robbins, P., Rivoltini, F. L., Yannelli, J., Appella, E., Rosenberg, S. A. (1994). Identification of the immunodominant peptides of the Mart-1 human melanoma antigen recognized by the majority of HLA-A2 restricted tumor infiltrating lymphocytes. *J. Exp. Med.* 180:347-52.

- Kawakami, Y., Eliyahu, S., Delgado, C.H., Robbins, P.F., Rivoltini, L., Topalian, S. L., Miki, T., Rosenberg, S. A. (1994). Cloning of the gene coding for a shared human melanoma antigen recognized by autologous T cells infiltrating into tumor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **91**:3515-19.
- Kawakami, Y., Eliyahu, S., Jennings, C., Sakaguchi, K., Kang, X., Southwood, S., Robbins, P., Sette, A., Appella, E., Rosenberg, S. A. 1995. Recognition of multiple epitopes in the human melanoma antigen gp100 by tumor infiltrating T lymphocytes associated with *in vivo* tumor regression. *J. Immunol.* **154**:3961-68.
- Keilholz U, Punt CJ, Gore M, Kruit W, Patel P, Lienard D, Thomas J, Proebstle TM, Schmittel A, Schadendorf D, Velu T, Negrier S, Kleeberg U, Lehman F, Suciú S, Eggermont AM. (2005). Dacarbazine, cisplatin, and interferon-alfa-2b with or without interleukin-2 in metastatic melanoma: a randomized phase III trial (18951) of the European Organisation for Research and Treatment of Cancer Melanoma Group. *J Clin Oncol.* **23**:6747-6755.
- Kobie JJ, Wu RS, Kurt RA, Lou S, Adelman MK, Whitesell LJ. (2003). Transforming growth factor beta inhibits the antigen presenting functions and antitumor activity of dendritic cell vaccines. *Cancer Res.* **63**:1860-4.
- Krug, A., Towarowski, A., Britsh, S., Rothenfusser, S., Hornung, V., Bals, R., Giese, T., Engelman, E.G., Hartmann, G. (2001). Toll-like receptor expression reveals CpG DNA as unique microbial stimulus for plasmacytoid dendritic cells which synergizes with CD40 ligand to induce high amounts of IL-12. *Eur. J. Immunol.*; **31**:3026-37.
- Lawson DH. (2004). Update on the systemic treatment of malignant melanoma. *Semin Oncol.* **4**:33-7.
- Lee JC, Lee KM, Kim DW, Heo DS. (2004). Elevated TGF-beta1 secretion and down-modulation of NKG2D underlies impaired NK cytotoxicity in cancer patients. *J Immunol.* **172**(12):7335-40.
- López M, Escobar A, Alfaro J, Fodor M, Larrondo M, Ferrada C and Salazar-Onfray F. (2004). Advances in cellular immunotherapy for malignant melanoma. *Rev Med Chi* **132** (9):1115-26
- López MN, Aguilera R, Pérez C, et al (2006): The role of regulatory T lymphocytes in the induced immune response mediated by biological vaccines. *Immunobiology* **211**:127-136
- López MN, Pereda C, Segal G, Muñoz L, Aguilera R, González FE, Escobar A, Ginesta A, Reyes D, González R, Mendoza-Naranjo A, Larrondo M, Compán A, Ferrada C, Salazar-Onfray F. (2009) Prolonged Survival of Dendritic Cells-Vaccinated Melanoma Patients Correlates with Tumor-Specific Delayed Type IV Hypersensitivity Response and Reduction of Tumor Growth Factor  $\beta$ -expressing T Cells. *Journal Clin. Oncol.* 2009 Publicación en línea.
- Mackensen A, Meidenbauer N, Vogl S, Laumer M, Berger J, Andreesen R. (2006). Phase I study of adoptive T-cell therapy using antigen-specific CD8<sup>+</sup> T cells for the treatment of patients with metastatic melanoma. *J Clin Oncol.* **24**: 5060-5069.
- Matsuda M., Salazar F., Petersson M., Masucci G., Hansson J., Pisa P., Zhang Q., Masucci M., y Kiessling R. (1994). Interleukin-10 pre-treatment protects target cells from tumor- and allo-specific cytotoxic T-cells and down-regulates HLA class I expression. *J. Exp. Med.* **180**:2371.
- Matzinger P: (2007). Friendly and dangerous signals: is the tissue in control? *Nat Immunol*; **8**:11-13
- Medina E, Kaempffer AM. (2001). Cancer mortality in Chile: epidemiological considerations. *Rev Med Chil.*; **129**(10):1195-202.

- Mendoza-Naranjo A, Pereda C, Ramirez M, López MN, Sáez JP, Webb KF, Becker DL, Kalergis AM, Bueno SM, Sáez JC, Salazar-Onfray F. Gap junctions assemble at the immunological synapse is required for t cell activation by dendritic cells. Enviado a publicación.
- Mendoza-Naranjo A, Saéz PJ, Johansson CC, Ramirez M, Mandakovic D, Pereda C, López MN, Kiessling R, Sáez JC, Salazar-Onfray F. (2007). Functional gap junctions facilitate melanoma antigen transfer and cross-presentation between human dendritic cells. *J Immunol.* **178**(11):6949-57.
- Morton DL, Foshag LJ, Hoon DS, et al: (1992). *Ann Surg* **216**:463-482,.
- Nagayama H, Sato K, Morishita M, et al. (2003). Results of a phase I clinical study using autologous tumour lysate-pulsed monocyte-derived mature dendritic cell vaccinations for stage IV malignant melanoma patients combined with low dose interleukin-2. *Melanoma Res.* **13**:521-530
- Nakamura, K., Kitani, A. & Strober, W. (2001). Cell contact-dependent immunosuppression by CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory T cells is mediated by cell surface-bound transforming growth factor  $\beta$ . *J. Exp. Med.* **194**: 629–644
- Nam JS, Terabe M, Mamura M, Kang MJ, Chae H, Stuelten C, Kohn E, Tang B, Sabzevari H, Anver MR, Lawrence S, Danielpour D, Lonning S, Berzofsky JA, Wakefield LM. (2008). An anti-transforming growth factor beta antibody suppresses metastasis via cooperative effects on multiple cell compartments. *Cancer Res.* **68**(10):3835-43.
- Nestle FO, Alijagic S, Gilliet M, et al. (1998) Vaccination of melanoma patients with peptide- or tumor lysate-pulsed dendritic cells.; *Nat Med* **4**:328-332.
- O'Neill EJ, Sundstedt A, Mazza G, Nicolson KS, Ponsford M, Saurer L, Streeter H, Anderton S, Wraith CD. (2004). Natural and induced regulatory T cells. *Ann N Y Acad Sci.* **1029**:180-92.
- O'Rourke MG, Johnson M, Lanagan C, et al. (2003) Durable complete clinical responses in a phase I/II trial using an autologous melanoma cell/dendritic cell vaccine. *Cancer Immunol Immunother* **52**:387-395
- O'Rourke MG, Johnson MK, Lanagan CM, et al: (2007). *Melanoma Res.* **17**:316-322,.
- Paglia P, Chiodoni, C., Rodolfo, M. (1996): Murine dendritic cells loaded *in vitro* with soluble protein prime cytotoxic T lymphocytes against tumor antigen *in vivo*. *J Exp Med*; **183**:317-322
- Pain, Stephanie. (2002). Dr Coley's Famous Fever. *New Scientist*. "Spontaneous regression: a hidden treasure buried in time by Hopton Cann".. *Medical Hypotheses.* **58**: 115.
- Palucka AK, Ueno H, Connolly J, et al (2006) Dendritic cells loaded with killed allogeneic melanoma cells can induce objective clinical responses and MART-1 specific CD8<sup>+</sup> T-cell immunity.. *J Immunother.* **29**:545-57
- Pandiyar P, Zheng L, Ishihara S, Reed J, Lenardo MJ. (2007). CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> regulatory T cells induce cytokine deprivation-mediated apoptosis of effector CD4<sup>+</sup> T cells. *Nat Immunol.* **8**(12):1353-62.
- Porgador A, Gilboa E.(1995). Bone marrow-generated dendritic cells pulsed with a class I restricted peptide are potent inducers of cytotoxic T lymphocytes. *J Exp Med*; **182**:255-260
- Powell DJ Jr, Dudley ME, Hogan KA, Wunderlich JR, Rosenberg SA. (2006). Adoptive transfer of vaccine-induced peripheral blood mononuclear cells to patients with metastatic melanoma following lymphodepletion. *J Immunol.* **177**: 6527-6539.

- Programa Nacional de Cáncer. Ministerio de Salud. Chile. Página web <http://deis.minsal.cl/indexmc.asp>
- Randolph, G.J., Sanchez-Schmitz G., Liebman, R.M., Schakel, K. (2002). The CD16<sup>(+)</sup> (FcγRIII<sup>(+)</sup>) subset of human monocytes preferentially becomes migratory dendritic cells in a model tissue setting. *J. Exp. Med.*; **196**: 517-27.
- Ribas A, Camacho LH, Lopez-Berestein G, Pavlov D, Bulanagui CA, Millham R, Comin-Anduix B, Reuben JM, Seja E, Parker CA, Sharma A, Glaspy JA, Gomez-Navarro J (2005). Antitumor activity in melanoma and anti-self responses in a phase I trial with the anti-cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 monoclonal antibody CP-675, 206. *J Clin Oncol*; **23**: 8968–8977.
- Ridgway D. (2003) The first 1000 dendritic cell vaccinees. *Cancer Invest* **21**:873–886.
- Ridolfi R, Petrini M, Fiammenghi L, Stefanelli M, et al: (2006). Improved overall survival in dendritic cell vaccination-induced immunoreactive subgroup of advanced melanoma patients *J Transl Med* **4**:36.
- Roncarolo MG, Bacchetta R, Bordignon C, Narula S, Levings MK. (2001). Type 1 T regulatory cells. *Immunol Rev.***182**:68-79.
- Rosenberg SA, Restifo NP, Yang JC, Morgan RA, Dudley ME. (2008). Adoptive cell transfer: a clinical path to effective cancer immunotherapy. *Nat Rev Cancer.* **8**(4):299-308.
- Rosenberg SA, Yang JC, Restifo NP. (2004). Cancer immunotherapy: moving beyond current vaccines. *Nat Med* **10**: 909-915.
- Rosenberg SA, Yang JC, Schwartzentruber DJ et al. (1998). Immunologic and therapeutic evaluation of a synthetic peptide vaccine for the treatment of patients with metastatic melanoma *Nat Med* **4**:321–327.
- Sakaguchi S, Sakaguchi N, Asano M, Itoh M, Toda M. (1995). Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. *J Immunol.***155**(3):1151-64.
- Sakaguchi, N. (2005) Naturally arising Foxp3-expressing CD25<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> regulatory T cells in immunologic tolerance to self and non-self. *Nat. Immunol.* **6**: 345–352
- Salama P, Phillips M, Grieu F, Morris M, Zeps N, Joseph D, Platell C, Iacopetta B.(2008).Tumor-Infiltrating FOXP3<sup>+</sup> T Regulatory Cells Show Strong Prognostic Significance in Colorectal Cancer. *J Clin Oncol.* Publicado en línea.
- Salazar-Onfray F., Charo J., Petersson M., Frelund S., Noffz G., Qin Z., Blankenstein T., Ljunggren H-G., and Kiessling R. (1997). Down-regulation of the expression and function of TAP in murine tumor cell lines expressing Interleukin-10. *J.Immunol.* : 3195-202.
- Salazar-Onfray F., Petersson M., Franksson L., Matsuda M., Blankenstein T., Kärre K., y Kiessling R. (1995). IL-10 converts mouse lymphoma cells to a CTL-resistant, NK sensitive phenotype with low but peptide-inducible MHC class I expression. *J. Immunol* **154**:6291– 8.
- Sallusto, F., Lanzavecchia, A. (1994).Efficient presentation of soluble antigen by cultured human dendritic cells is maintained by granulocyte/macrophage colony-stimulating factor plus interleukin 4 and downregulated by tumor necrosis factor α. *J. Exp. Med.* **179**: 1109 – 18.

- Sauter B, Albert ML, Francisco L. 2000: Consequences of cell death: exposure to necrotic tumor cells, but not primary tissue cells or apoptotic cells, induces the maturation of immunostimulatory dendritic cells. *J Exp Med*; **191**:423-434.
- Schadendorf D, Ugurel S, Schuler-Thurner B, et al: (2006). *Annals of Oncology* **17**:563–570,
- Schubert, L.A., Jeffery, E., Zhang, Y., Ramsdell, F. & Ziegler, S.F. (2001). Scurfin (FOXP3) acts as a repressor of transcription and regulates T cell activation. *J. Biol. Chem.* **276**: 37672–37679.
- Shevach E.M., McHugh R.S., Piccirillo C.A., Thornton A.M. (2001). Control of T-cell activation by CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> suppressor T cells, *Immunol. Rev.* **182**:58– 67.
- Shevach EM, Davidson TS, Huter EN, Dipaolo RA, Andersson J.( 2008)Role of tgf-Beta in the induction of foxp3 expression and T regulatory cell function.*J Clin Immunol.***28**(6):640-6.
- Shuler,G., Shuler-Thurner, B., Steinman, R.M. (2003). The use of dendritic cells in cancer immunotherapy. *Curr Opin Immunol*; **15**:138-147.
- Song, W., Kong, H.L., Carpenter, H., Torii, H., Granstein, R., Rafii, S., Moore, M., Ronald, G. (1997). Crystal Dendritic Cells Genetically Modified with an Adenovirus Vector Encoding the cDNA for a Model Antigen Induce Protective and Therapeutic Antitumor Immunity. *J. Exp. Med.*; **186**: 1247-56.
- Steiman, R.M. (2003) Some interfaces of dendritic cell biology. *APMIS.* **111**: 675-97.
- Svane, I.G., Soot, M.T., Buus, S., Johnsen, HE. (2003). Clinical application of dendritic cells in cancer vaccination therapy. *APMIS*; **111**: 818-34.
- Teicher BA. (2007). Transforming growth factor-beta and the immune response to malignant disease. *Clin Cancer Res.* **13**(21):6247-51.
- Topalian SL, Solomon D, Rosenberg SA. (1989). Tumor-specific cytotoxicity by lymphocytes infiltrating human melanomas. *J Immunol*; **142**:3714-25.
- Townsend AR, Gotch FM, Davey J. (1985). Cytotoxic T cells recognize fragments of the influenza nucleoprotein. *Cell.* **42**:457-461
- Trefzer U, Herberth G, Wohlan K, et al (2005) Tumour-dendritic hybrid cell vaccination for the treatment of patients with malignant melanoma: immunological effects and clinical results. *Vaccine.* **23**:2367-2373
- Van den Eynde, B., Peeters, O., De Backer, O., Gaugler, B., Lucas, S., Boon, T. (1995). A new family of genes coding for an antigen recognized by autologous cytolytic T lymphocytes on a human melanoma. *J. Exp. Med.*, **182**:689-98.
- Vilella R, Benítez D, Milà J, et al: (2004). Pilot study of treatment of biochemotherapy-refractory stage IV melanoma patients with autologous dendritic cells pulsed with a heterologous melanoma cell line lysate. *Cancer Immunol Immunother.* **53**:651-658.
- Vogel CL, Cobleigh MA, Tripathy D, Gutheil JC, Harris LN, Fehrenbacher L, Slamon DJ, Murphy M, Novotny WF, Burchmore M, Shak S, Stewart SJ, Press M. (2002). Efficacy and safety of trastuzumab as a single agent in first-line treatment of HER2-overexpressing metastatic breast cancer. *J Clin Oncol.*; **20**(3):719-26.
- Walker LS. (2004). CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> Treg: divide and rule? *Immunology.***111**(2):129-37

- Wolf AM, Wolf D, Steurer M, Gastl G, Gunsilius E, Grubeck-Loebenstein B. (2003). Increase of regulatory T cells in the peripheral blood of cancer patients. *Clin Cancer Res.* **9**(2):606-12.
- Woo EY, Chu CS, Goletz TJ, Schlienger K, Yeh H, Coukos G, Rubin SC, Kaiser LR, June CH.(2001). Regulatory CD4<sup>(+)</sup>CD25<sup>(+)</sup> T cells in tumors from patients with early-stage non-small cell lung cancer and late-stage ovarian cancer. *Cancer Res.* **61**(12):4766-72.
- Zheng SG, Gray JD, Ohtsuka K, Yamagiwa S, Horwitz DA. (2002). Generation ex vivo of TGF-beta-producing regulatory T cells from CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> precursors. *J Immunol.* **169**(8):4183-9.

## 13. ANEXO 1

### PUBLICACIONES DERIVADAS DEL SIGUIENTE SEMINARIO DE TÍTULO

Prolonged Survival of Dendritic Cells-Vaccinated Melanoma Patients Correlates with Tumor-Specific Delayed Type IV Hypersensitivity Response and Reduction of Tumor Growth Factor  $\beta$ -expressing T Cells. Mercedes N. López, Cristian Pereda, Gabriela Segal, Raquel Aguilera, Fermín González, Alejandro Escobar, Alexandra Ginesta, Leonel Muñoz, Rodrigo González, Milton Larrondo, Carlos Ferrada, and Flavio Salazar-Onfray. J Clin. Oncol. 2009 Jan 12. (Epub ahead of print).