

UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS



Título de Tesis

La inflamación local aguda de los neutrófilos inducida por la vacuna de lisado de células de melanoma TRIMELVax incrementa la migración de las células dendríticas al ganglio linfático drenante y se asocia al rechazo del tumor.

The acute local inflammation of neutrophils induced by the melanoma cell-lysate vaccine TRIMELVax increases dendritic cell migration to the draining lymph node and is associated with tumor rejection.

Amarilis Pérez Baños

Director de Tesis: Dr. Flavio Salazar Onfray

Santiago-CHILE

09-2023

UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS

INFORME DE APROBACIÓN DE TESIS DE DOCTORADO

Se informa a la Dirección de la Escuela de Postgrado de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas que la Tesis de Doctorado presentada por el candidato

Amarilis Pérez Baños

Ha sido aprobada por la Comisión de Evaluadora de Tesis como requisito para optar al grado de Doctorado en Bioquímica, en el examen público rendido el día

Director de Tesis:

Dr. Flavio Salazar Onfray _____

Co-director de Tesis:

Ma. Alejandra Gleisner _____

Comisión Evaluadora de Tesis:

Dra. María Inés Becker _____

Dr. Leandro Carreño _____

Dr. Álvaro Lladser _____

Dr. Juan Diego Maya _____

Esta tesis fue desarrollada en el Laboratorio de Inmunología Antitumoral (LIAT), perteneciente al Instituto de Ciencias Biomédicas de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile, y fue dirigida por el Dr. Flavio Salazar Onfray.

Para su realización, este trabajo contó con el apoyo y financiamiento de los siguientes proyectos:

- Beca de Doctorado Nacional (ANID), 2018-2022 No. 21180633
- Gastos operacionales No.242200124.
- Proyecto FONDECYT 1171213
- Instituto Milenio de Inmunología (IMII). ICN09_016/ICN 2021_045.

Derivado de los resultados obtenidos en esta tesis, así como de las metodologías desarrolladas, se han desarrollado los siguientes trabajos presentados en congresos o informados en artículos científicos de especialidad, los cuales se citan a continuación:

Publicaciones relacionadas con la Tesis:

Amarilis Pérez-Baños, Gleisner MA, Flores I, Pereda C, Navarrete M, Araya JP, Navarro G., Quezada C., Tittarelli A., and **Salazar-Onfray F.** (2023). Whole tumour cell-based vaccines: tuning the instruments to orchestrate an optimal antitumour immune response. **Br J Cancer**. DOI: 10.1038/s41416-023-02327-6; Available from: <https://www.nature.com/articles/s41416-023-02327-6>.

Amarilis Pérez-Baños, Gleisner M.A., Tittarelli A., Tempio F., Flores I., Pereda C., Lladser A., González F.E., Becker M.I., Achour A., López M.N., and Salazar-Onfray F. (2023). The acute local neutrophil inflammation determines the effective tumor rejection induced by a heat-shocked melanoma cell lysate vaccine. **(Manuscript in preparation)**

Otros artículos:

Richard García-Betancourt, Cristian Gutiérrez-Vera, Pablo A. Palacios, Daniela Schneider, Carolina Schäfer, Álvaro Santibáñez, Gary J. Flores, Sebastián González, Romina Falcón, **Amarilis Pérez-Baños**, Ana Riveros, Noemi Alejandra Saavedra-Avila, Jose Gascon, Steven A. Porcelli, Amy R. Howell, Leandro J. Carreño. Induction of regulatory iNKT cells by liposomes containing glycolipids using partially humanized mice for iNKT cells. **(Manuscript in preparation)**

Álvaro Santibáñez, Pablo A. Palacios, Cristian Gutiérrez-Vera, Richard García-Betancourt, Daniel Rivas, Carolina Schäfer, Francisco F. Otero, **Amarilis Pérez-Baños**, Ana Riveros, Marcelo J. Kogan, Steven A. Porcelli³, Amy R. Howell, Leandro J. Carreño. iNKT cell activation using α -Galactosylceramide analogue AH10-7 promotes a robust humoral response inducing a differential production of IgG2c. **(Manuscript in preparation)**

Presentaciones en congresos:

Amarilis Perez-Baños, Ma. Alejandra Gleisner, Juan Pablo Araya, Romina Falcón, Andrés Tittarelli⁴, Omar Barría, Cristian Pereda, Flavio Salazar-Onfray TRIMELVax induces increased proinflammatory immune cell recruitment and an early inflammatory cytokines pattern in treated mice. V Reunión Anual de la Asociación Chilena de Inmunología (ASOCHIN) (2022). Chile.

Zoé K. Engels, **Amarilis Perez-Baños**, Ma. Alejandra Gleisner, Juan Pablo Aray, Omar Barría, Cristian Pereda, Flavio Salazar-Onfray. The Melanoma Vaccines TRIMELVax and G Limit Myeloid-Derived Suppressor Cell Expansion and Tumor-Growth in Mice. V Reunión Anual de la Asociación Chilena de Inmunología (ASOCHIN) (2022). Chile.

Camila Fuentes, Consuelo Merino-González, Mariela Navarrete, **Amarilis Pérez-Baños**, Fabian Tempio, Dominique Fernandez, Felipe Flores, Flavio Salazar-Onfray, Fabiola Osorio, Mercedes López. Inmunoterapia basada en lisados tumorales TRIMELvax promueve la mantención de linfocitos T CD8⁺stem-like y disminuye la exhaustividad. Jornada de presentación de posters - 25° Aniversario ICBM (2023).

Amarilis Perez-Baños, Ma. Alejandra Gleisner, Juan Pablo Araya, Omar Barría, Romina Falcón, Flavio Salazar-Onfray. A heat-shocked melanoma cell lysate vaccine TRIMELVax promotes an innate immune response in vivo. IV Reunión Anual de la Asociación Chilena de Inmunología (ASOCHIN) (2021). Chile.

ÍNDICE

1. ÍNDICE DE FIGURAS.....	8
2. ÍNDICE DE TABLAS	9
3. ÍNDICE DE ABREVIATURAS	10
4. RESUMEN	15
5. SUMMARY	16
6. INTRODUCCIÓN	17
6.1. Melanoma maligno incidencias y Tratamiento	17
6.2. Sistema inmunológico.....	18
6.3. La piel como órgano inmune	19
6.4. Neutrófilos y dinámica inmunológica en la piel.	24
6.5. Respuesta inmune antitumoral.	25
6.6. Neutrófilos: intercomunicación con DCs y respuesta inmune antitumoral.....	26
6.7. Inmunoterapias contra cáncer y TAPCells®.....	28
6.8. TRIMELVax una vacuna terapéutica contra melanoma maligno.	30
7. HIPÓTESIS.....	33
8. OBJETIVOS.	33
8.1. Objetivo general:.....	33
8.2. Objetivos específicos:	33
9. MATERIALES Y MÉTODOS	34
9.1. Animales.	34
9.2. Líneas celulares y reactivos.	34
9.3. Preparación de los lisados de líneas tumorales.	34
9.4. Preparación de las vacunas en estudio	34
9.5. Reclutamiento de poblaciones celulares en modelo de almohadilla plantar trasera.	35
9.6. Ensayo de migración con CFSE.....	35
9.7. Depleción de neutrófilos.	35
9.8. Ensayo de crecimiento tumoral.....	36
9.9. Recolección y procesamiento de muestras:.....	36
9.10. Citometría de Flujo.	37
9.11. Expresión de citoquinas y quimioquinas en la almohadilla plantar trasera.	37
9.12. Análisis estadístico.....	38
10. RESULTADOS.....	39

10.1. TRIMELVax induce la expresión de un perfil proinflamatorio de genes de citoquinas y quimioquinas en el sitio de inmunización.....	39
10.2. TRIMELVax induce el reclutamiento secuencial de poblaciones celulares específicas de la inmunidad innata al sitio de administración.....	42
10.3. La depleción transitoria de los neutrófilos disminuye el reclutamiento de DCs al linfonodo poplíteo (pLN) en ratones tratados.....	46
10.4. La depleción transitoria de neutrófilos durante la vacunación disminuye la capacidad de TRIMELVax para controlar el crecimiento del volumen tumoral.....	51
11. DISCUSIÓN.....	53
12. CONCLUSIONES.....	62
13. FIGURAS SUPLEMENTARIAS.....	63
14. BIBLIOGRAFÍA.....	67

1. ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: TRIMELVax induce una potente sobreexpresión de un patrón específico de quimioquinas y citoquinas proinflamatorias.

Figura 2: TRIMELVax induce un rápido y marcado reclutamiento de neutrófilos y monocitos; además de un incremento en los macrófagos M1 y una disminución de los macrófagos M2.

Figura 3: TRIMELVax induce el reclutamiento sostenido de cDC1, así como un aumento de poblaciones de cDC2, moDCs y LCs en el sitio de vacunación.

Figura 4: La depleción de los neutrófilos disminuye el reclutamiento temprano de las dendríticas totales, así como de las subpoblaciones de cDC1, cDc2 y moDCs al pLN.

Figura 5: TRIMELVax induce un aumento en el número total de células dendríticas CFSE+ y CFSE- en el pLN, y este efecto se reduce cuando los neutrófilos son eliminados de forma transiente.

Figura 7: La ausencia de neutrófilos en el momento de la vacunación disminuye la capacidad de TRIMELVax para controlar el crecimiento tumoral.

Figura Suplementaria 1. Estrategias de análisis utilizadas en el documento.

Figura Suplementaria 2: Control de depleción de neutrófilos en sangre.

Figura Suplementaria 3. Evaluación de la frecuencia de neutrófilos en sangre de ratones en modelo de evaluación de crecimiento tumoral.

2. ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Resumen de genes sobreexpresados para quimioquinas y citoquinas en los grupos tratados con TRIMELVAX y GVAX a las 6 horas y 24 horas.

3. ÍNDICE DE ABREVIATURAS

Adipoq: Adiponectina.

ADN: Ácido Desoxirribonucleico.

Ags: Antígenos.

ANOVA: Análisis de Varianza.

APC: Célula Presentadora de Antígeno.

ARN: Ácido Ribonucleico.

ATP: Adenosín Trifosfato.

BAG3: Proteína Bcl-2 asociada a GTPasa 3.

CCH: Hemocianina de *Concholepas concholepas*.

CCL: Quimiocina C-C.

CCR: Receptor de Quimioquina C-C.

CD: Cluster de Diferenciación.

cDC1: Células Dendríticas Convencionales de Tipo 1.

cDC2: Células Dendríticas Convencionales de Tipo 2.

cDC2A: Células Dendríticas Convencionales de Tipo 2 Antiinflamatoria.

cDC2B: Células Dendríticas Convencionales de Tipo 2 Proinflamatoria.

cDNA: Ácido Desoxirribonucleico Complementario.

CFSE: Carboxyfluorescein Succinimidyl Ester.

CRT: Calreticulina.

CRYAA: Crystallin Alfa A.

CRYAB: Crystallin Alfa B.

Csf1: Factor Estimulante de Colonias de Macrófagos 1.

Ct: Umbral de ciclo.

CTL: Linfocitos TCD8⁺ Citóxicos.

CTLA-4: Proteína Citotóxica Linfocito T antígeno 4.

CXCL: Quimioquina C-X-C.

CXCR: Receptor para quimioquina C-X-C.

DAMP: Patrones Moleculares Asociados a Daño.

DCs: Células Dendríticas.

DDCs: Células Dendríticas Dermal.

DMEM: Medio Mínimo Esencial de Eagle Modificado con Dulbecco.

DNAJB1: Proteína 1 tipo B de unión a ADN.

DNAJB13: Proteína 13 tipo B de unión a ADN.

DNAJB7: Proteína 7 tipo B de unión a ADN.

DNAJB8: Proteína 8 tipo B de unión a ADN.

DNAJC5B: Proteína 5 tipo C de unión a ADN B.

DNAJC5G: Proteína 5 tipo C de unión a ADN G.

DTIC: Dacarbazina.

EDTA: Ácido Etilendiaminotetraacético.

ELS: Estructuras Linfoides Ectópicas.

EMA: Agencia Europea de Medicamentos.

FACS: Citometría de Flujo Multiparamétrica.

FBS: Suero Fetal Bovino.

FDA: Administración de Alimentos y Medicamentos.

GM-CSF: Factor estimulante de granulocitos y macrófagos.

Gy: Unidad derivada del Sistema Internacional de Unidades que mide la dosis absorbida de radiaciones ionizantes por una determinada materia.

HMGB1: Proteína de Unión a ADN de Caja Alta Movilidad.

HSPA1A: Proteína de Choque Térmico de la Familia A (Hsp70) Miembro 1A.

HSPA1B: Proteína de Choque Térmico de la Familia A (Hsp70) Miembro 1B.

HSPA1L: Proteína de Choque Térmico de la Familia A (Hsp70) Miembro 1L.

HSPA6: Proteína de Choque Térmico de la Familia A (Hsp70) Miembro 6.

HSPB1: Proteína de Choque Térmico B1.

HSPB3: Proteína de Choque Térmico B3.

HSPH1: Proteína de Choque Térmico H1.

ICAM-1: Molécula de Adhesión Intercelular 1.

ICB: Inhibidores puntos de control inmunitario.

ICD: Muerte Celular Inmunogénica.

IFN- γ : Interferón gamma.

IL: Interleuquina.

ILCs: Células Linfoides Innatas.

LB: Linfocitos B.

LC: Células de Langerhans.

LIAT: laboratorio de Inmunología Antitumoral.

Lif: Factor Inhibidor de Leucemia.

LNs: Linfonodos Drenantes.

LT: Linfocitos T.

M1: Macrófagos Tipo 1.

M2: Macrófagos Tipo 2.

MAAs: Antígenos Asociados a Melanoma.

Mac-1: Molécula de Adhesión Macrófago-1.

M-CSF: Factor Estimulante de Colonias de Macrófagos.

MHC I: Complejo Mayor de Histocompatibilidad de Tipo I.

MHC II: Complejo Mayor de Histocompatibilidad de Tipo II.

MM: Melanoma Maligno.

mo: Monocitos.

moDCs: Células Dendríticas Derivadas de Monocitos.

mRNA: Ácido Ribonucleico Mensajero.

N1: Neutrófilos Proinflamatorios.

N2: Neutrófilos Antiinflamatorios.

NETs: Trampas Extracelulares de Neutrófilos.

NK: células Asesinas Naturales.

PAMPs: Patrones Moleculares Asociados a Patógenos.

PBS: Solución Salina Tamponada con Fosfato.

PD-1: Proteína de Muerte Programada 1.

pDCs: Células Dendríticas Plasmocitoides.

PD-L1: Ligando 1 de Muerte Programada.

PD-L2: Ligando 2 de Muerte Programada.

pLN: Linfonodo Drenante Poplíteo.

PRR: Receptores de Reconocimiento de Patógenos.

PS: Penicilina/ Streptomina.

RM: Residentes de Memoria.

ROS: Especies Reactivas de Oxígeno.

RPMI: Medio de Cultivo Roswell Park Memorial Institute.

RT-qPCR: Reacción en Cadena de la Polimerasa en Tiempo Real Cuantitativa.

SEM: Desviación Estándar de la Media.

SERPINH1: Proteína Inhibidora de Serina Proteasa H1.

SIA: Sistema Inmune Adaptativo.

DC-SIGN: Receptor No Integrina Específico de Células Dendríticas para la Molécula de Adhesión Intercelular-3.

SII: Sistema Inmune Innato.

SMART-DCs: Células Presentadoras de Antígenos Derivadas de Mieloides Autodiferenciadas Reactivas contra Tumores.

SPL: Péptidos Sintéticos Largos.

TAA: Antígenos Asociados a Tumores.

TAM: Macrófagos Asociados a Tumores.

TAPCells: Células Presentadoras de Antígenos Tumorales.

Tfh: Linfocitos T Foliculares.

TGF- β : Factor de Crecimiento Transformante Beta.

Th: Linfocito T Ayudador.

TLO: Órganos Linfoides Terciarios.

TME: Microambiente Tumoral.

TNF- α : Factor de Necrosis Tumoral Alfa.

Treg: Linfocitos T Reguladores.

TSA: Antígenos Tumor Específicos.

VACM-1: Molécula de Adhesión Vascular-1.

4. RESUMEN

TRIMELVax es una nueva tecnología inmunoterapéutica contra el melanoma maligno que consiste en lisados celulares de melanoma humanas condicionadas por choque térmico (TRIMEL) combinado la hemocianina del *Concholepas concholepas* como adyuvante. Esta vacuna demostró ser eficaz en protocolos profilácticos y terapéuticos *in vivo*, reduciendo significativamente el crecimiento del volumen tumoral y aumentando la supervivencia de los ratones vacunados y desafiados con el melanoma murino B16F10. Aunque la proyección clínica de esta vacuna genera grandes expectativas, se desconocen muchos de los factores inmunológicos implicados en el efecto antitumoral. En este trabajo nos enfocamos en estudiar cómo TRIMELVax induce la inflamación del microambiente tisular en el sitio de administración, el reclutamiento de células de la inmunidad innata y células dendríticas (DCs) y el papel que esta inflamación local ejerce sobre la activación y migración masiva de las DCs al linfonodo drenante poplíteo (pLN). Para esto, ratones C57BL/6 fueron inyectados con TRIMELVax, PBS o la vacuna GVax en la almohadilla plantar trasera y luego sacrificados en diferentes tiempos, obteniéndose muestras de la almohadilla plantar trasera para identificar las poblaciones de células de la inmunidad innata y la presencia de genes para citoquinas y quimioquinas. Además, se estudiaron las poblaciones de DCs que migran desde el sitio de inyección al linfonodo drenante y el efecto que tiene la depleción de los neutrófilos sobre la activación y migración de las DCs. Se observó que las primeras seis horas postinyección son fundamentales en la respuesta inmune generada por TRIMELVax. TRIMELVax induce la sobreexpresión de un patrón específico de genes para citoquinas y quimioquinas con perfil proinflamatorio a diferencia de GVax y el control de PBS. Además, observamos una respuesta inmune innata más aguda en el sitio de administración que se caracteriza por un rápido y potente reclutamiento de neutrófilos, un aumento de los macrófagos tipo 1 (M1), monocitos (mo), cDC1, células de Langerhans (LCs) y mo-DCs, así como una disminución de los macrófagos de tipo 2 (M2). Adicionalmente, se observó que la inflamación temprana inducida por TRIMELVax produce una mayor migración de cDC1 al pLN comparado con GVax o los controles. Interesantemente encontramos que los neutrófilos juegan un rol fundamental en el mecanismo de acción de la vacuna, dado que su depleción disminuye la migración de las DCs, especialmente de as cDC1 al pLN. Finalmente, se demostró que la depleción transitoria de neutrófilos antes de las vacunaciones anula la capacidad de TRIMELVax para controlar el crecimiento tumoral. Estos resultados sugieren que TRIMELVax induce una activación más rápida y potente del sistema inmunitario innato, lo que favorece la coordinación y el direccionamiento de una respuesta inmunitaria adaptativa mediada por cDC1 más eficaz frente a los tumores malignos de melanoma.

5. SUMMARY

TRIMELVax is a novel immunotherapeutic technology against malignant melanoma, consisting of heat shock-conditioned human melanoma cell lysates (TRIMEL) combined with Concholepas concholepas hemocyanin as an adjuvant. This vaccine has demonstrated effectiveness *in vivo* in prophylactic and therapeutic protocols, significantly reducing tumor mass growth and increasing the survival of vaccinated mice challenged with murine B16F10 melanoma. While the clinical outlook for this vaccine holds great promise, many of the immunological factors involved in its anti-tumor effect remain unknown. In this study, we focused on investigating how TRIMELVax induces inflammation in the tissue microenvironment at the administration site, the recruitment of cells from the innate immunity and dendritic cells (DCs), and the role this local inflammation plays in the activation and massive migration of DCs to the draining popliteal lymph node (pLN).

For this purpose, C57BL/6 mice were injected with TRIMELVax, PBS, or the GVax vaccine in the rear footpad, and then sacrificed at different time points to obtain samples from the rear footpad. These samples were used to identify populations of innate immune cells and the presence of genes for cytokines and chemokines. Additionally, we studied the populations of DCs migrating from the injection site to the draining lymph node and the effect of neutrophil depletion on DC activation and migration. The first six hours post-injection were found to be crucial for the immune response generated by TRIMELVax.

TRIMELVax induces the overexpression of a specific pattern of proinflammatory cytokine and chemokine genes, unlike Gvax and PBS controls. Furthermore, a more acute innate immune response was observed at the administration site, characterized by rapid and potent recruitment of neutrophils, increased type 1 macrophages (M1), monocytes (mo), cDC1, Langerhans cells (LCs), and mo-DCs, along with a decrease in type 2 macrophages (M2). Additionally, the early inflammation induced by TRIMELVax led to greater migration of cDC1 to the pLN compared to Gvax or control groups. Interestingly, we found that neutrophils play a fundamental role in the vaccine's mechanism of action, as their depletion reduces DC migration, especially cDC1, to the pLN. Finally, transient neutrophil depletion prior to vaccinations was shown to nullify TRIMELVax ability to control tumor growth. These results suggest that TRIMELVax induces a faster and more potent activation of the innate immune system, facilitating the coordination and targeting of a more effective adaptive immune response mediated by cDC1 against malignant melanoma tumors.

6. INTRODUCCIÓN

6.1. Melanoma maligno incidencia y tratamiento

El Melanoma maligno (MM) es un tumor agresivo de piel que se genera como resultado de transformaciones malignas de los melanocitos. Dado que los melanocitos son células derivadas de la cresta neural, el melanoma puede desarrollarse además de la piel, en otros lugares a los cuales estas células migran durante el proceso embrionario, como por ejemplo el tracto gastrointestinal, el cerebro, los ojos y el tracto genitourinario^[1].

La incidencia de MM se encuentra en aumento lo cual lo convierte en un reto para la medicina y un serio problema de salud a nivel mundial^[2]. Este incremento puede estar asociado en gran medida con el envejecimiento de la población, cambios en los hábitos relacionados con una mayor exposición a los rayos UV, factores genéticos (historia familiar) e inmunosupresión^[3]. El MM se asocia con buena prognosis cuando es detectado y tratado en estadios iniciales de la enfermedad, sin embargo, en etapas avanzadas, el tratamiento es complejo e ineficiente, y el pronóstico se torna desfavorable; reportándose que aproximadamente el 90% de las muertes causadas por cáncer de piel está asociado a MM^[4].

El pilar de los tratamientos frente al MM localizado es la cirugía, la cual es efectiva en estadios tempranos de la enfermedad. Aproximadamente el 10% de los casos de MM son diagnosticados en fases avanzadas de la enfermedad por lo que son irreseccables o ya se encuentran en una fase metastásica^[5]. Además, a pesar de una gestión terapéutica más eficiente de los tumores, se observa que hasta un 50% de los pacientes progresan hacia la etapa IV de la enfermedad. Esto se atribuye al desarrollo de metástasis a través de la diseminación hematogena y la presencia de micrometástasis ocultas que se establecen antes de que el tumor primario sea detectado clínicamente^[6].

Durante las etapas avanzadas del MM se utilizan varias aproximaciones farmacológicas entre las que se encuentra el uso de quimioterapéuticos como Dacarbazina (DTIC) y su prodroga (Temozolomida), las cuales se asocian a bajas tasas de respuesta (12%) y frente a las cuales el melanoma ha desarrollado alta resistencia^[7]. También se utilizan fármacos dirigidos a inhibir las vías moleculares de señalización intracelular MAPK y PI3K que afectan mecanismos particulares en la progresión de MM^[8]. En este contexto se han utilizado sistemáticamente inhibidores de BRAF (Vemurafenib, Dabrafenib), inhibidores de MEK (Trametinib, Cobimetinib) e inhibidores de CKIT (Imatinib, Sunitinib, Dasatinib, Nilotinib)^[5,9,10]. El uso de terapias combinadas entre estos dos grupos de fármacos ha demostrado ser superior que la monoterapia, de manera tal que se ha

adoptado esta terapia como estándar para pacientes con MM con mutación de BRAFV600^[11]. La desventaja de estos tratamientos es que sólo un 40-50% de los melanomas presentan las mutaciones en BRAF o en MEK, y además se asocian con efectos adversos entre los que se pueden mencionar: erupción acneiforme, xerosis, diarrea, edema periférico, fatiga, náuseas, problemas visuales, disfunción ventricular y enfermedad pulmonar intersticial ^[12]. De ahí que se haga necesario encontrar nuevas aproximaciones terapéuticas que cuenten con una mayor eficacia clínica y que se relacionen con menos efectos adversos.

6.2. Sistema inmunológico

El sistema inmunológico es una red compleja de células y moléculas que proporcionan mecanismos de defensa innatos y adaptativos para el organismo. El sistema innato (SII) incluye barreras anatómicas y fisiológicas (piel, membranas y mucosas) y una diversidad de subtipos celulares y citoquinas / quimioquinas que constituyen la primera línea de defensa frente a diferentes microorganismos, siendo esencial para controlar infecciones bacterianas y además hacen una crucial contribución en la activación del sistema inmune adaptativo^[13]. Los componentes celulares de la inmunidad innata tales como las células asesinas naturales (NK- del inglés natural killer) y diversos tipos de células fagocíticas (macrófagos, monocitos y neutrófilos) reaccionan a estructuras conservadas en los patógenos y/o daño en los tejidos del microambiente, y señales de “peligro” a través de distintos receptores de reconocimiento de patrones (PRR- del inglés pattern recognition receptors)^[14,15] secretando factores inmunorreguladores como quimioquinas y citoquinas (pro-inflamatorias, anti-inflamatorias o reguladoras) y moléculas del sistema del complemento, las que inducen una inflamación local.

Por su parte el Sistema inmune adaptativo (SIA) es responsable de diferenciar los antígenos propios de los no propios, eliminar patógenos, células infectadas y producir memoria inmunológica^[13,15,16]. Además de estas funciones antipatógenas, el SIA es capaz de eliminar células cancerígenas. En lugar de portar varios receptores diferentes como es el caso de las células del SII, los linfocitos B (LB) y T (LT), que forman parte del sistema inmune adaptativo generan, por rearrreglo de sus genes de inmunoglobulinas y receptores de células T, respectivamente, gran cantidad de clones que expresan receptores con altísima diversidad y especificidad para reconocer antígenos (Ags) ya sea residuos peptídicos solubles en el caso de los receptores de LB o productos peptídicos en el contexto de los complejos principales de histocompatibilidad (MHC- del inglés major histocompatibility complex) en el caso de los receptores en los LT. De todas maneras, la

efectiva respuesta de la inmunidad adaptativa es dependiente en gran medida de las señales generadas en los procesos inflamatorios mediados por la inmunidad innata^[13].

El SIA puede ser dividido además en dos ramas fundamentales: la inmunidad mediada por anticuerpos (humoral) producidos por los LB y la inmunidad mediada por células (celular) de los LT. Si bien ambos componentes son esenciales para las respuestas inmunes efectivas, los mecanismos mediados por células desempeñan un papel fundamental en la eliminación de las células cancerígenas debido a las habilidades especiales que poseen los linfocitos TCD8⁺ citotóxicos (CTL) ^[17]. Todas las complejidades del sistema inmunitario trabajan en conjunto para proteger y eliminar cualquier elemento extraño del organismo.

6.3. La piel como órgano inmune

La piel es un compartimento crucial para la respuesta inmune, que requiere vigilancia constante sobre patógenos invasores, antígenos ambientales, acoplado con tolerancia a lo propio y a la microbiota que alberga^[18,19]. Durante los procesos inflamatorios, múltiples células del sistema inmune que atraviesan la piel o que residen en ella, son reclutadas para coordinar diversas respuestas inmunitarias comunicándose entre sí incluso con células no inmunitarias, como los queratinocitos, los nervios periféricos y la microbiota presente en la piel^[20].

Las células inmunes de la piel se encuentran distribuidas en dos capas principales: la epidermis y la dermis. En la epidermis se encuentran las células de Langerhans (LCs), las cuales son las únicas células presentadoras de antígenos (APCs- del inglés antigen-presenting cells) que residen entre los queratinocitos^[21]. Además, en los ratones encontramos dos subpoblaciones específicas de células T: los linfocitos T_{γδ} y los linfocitos T_{αβ} CD8⁺ residentes de memoria (CD8⁺T_{RM}). Por otra parte, en la dermis encontramos diferentes tipos de células de la inmunidad innata con ontogenia y funcionalidades distintas las cuales incluyen: Las DCs, macrófagos, mastocitos y células linfoides innatas (ILCs)^[22]. Además, en condiciones normales, un pequeño número de neutrófilos, monocitos y células T_{αβ} vigilan la dermis censando patógenos. Por otro lado, los monocitos, macrófagos, neutrófilos y las LCs juegan un papel fundamental en el reclutamiento y activación de DCs, las cuales son ampliamente reconocidas como la piedra angular del sistema inmunológico, ya que desempeñan un papel fundamental al establecer una conexión entre la respuesta inmunológica innata y adaptativa^[23–25].

Los macrófagos son células residentes de los tejidos los cuales tienen una gran plasticidad y flexibilidad. En presencia de Ags estos pueden polarizar la respuesta inmune innata hacia la

producción diferentes patrones de citoquinas. Se han identificado dos poblaciones principales de macrófagos: M1 (proinflamatorios) y M2 (antiinflamatorios). Los M1 son generados en presencia de IFN- γ o patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs- del inglés pathogen-associated molecular patterns) microbianos, y producen altos niveles de citoquinas pro-inflamatorias (interleuquina (IL)-1, IL-6, IL-12 y TNF- α entre otras), con elevada expresión de moléculas MHCII. Por otra parte, los M2 se generan en presencia de IL-4, IL-10 e IL-13, expresan bajos niveles de MHCII y muestran un tipo de respuesta anti-inflamatoria y de cicatrización mediante la producción de IL-10 y Arginasa^[26]. En los procesos inflamatorios agudos, posterior al reconocimiento de PAMPs o DAMPs (DAMPs- del inglés damage-associated molecular patterns) por los PRR en macrófagos, se activan variados genes que equipan a estas células con nuevas funciones, entre las que se encuentra la producción de citoquinas como TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-8 e IL-18. Las citoquinas TNF- α e IL-1 β tienen un papel fundamental sobre el endotelio causando vasodilatación y aumento de la expresión de moléculas de adhesión que posteriormente permiten la extravasación de neutrófilos desde la sangre hacia el foco inflamatorio. Las citoquinas IL-8 e IL-18 regulan la quimiotaxis y la activación de neutrófilos mientras que la IL-6 tiene un rol fundamental en la diferenciación de células mieloides en el sitio de inyección^[27].

Los monocitos son células efectoras del sistema inmunitario innato que se desplazan rápidamente desde la sangre periférica hacia los tejidos durante una inflamación a través de receptores de quimioquinas y reconociendo a los patógenos mediante sus PRR. Estas células desempeñan diversas funciones, entre ellas la producción de factores inflamatorios, la fagocitosis de células necróticas y la captación de moléculas tóxicas. En condiciones inflamatorias, los monocitos también pueden diferenciarse en DCs inflamatorias o macrófagos^[28]. Recientemente, los monocitos han adquirido importancia como reguladores importantes del desarrollo y progresión del cáncer, con diferentes subconjuntos poblacionales que parecen tener roles opuestos al permitir el crecimiento tumoral o prevenir la propagación metastásica de células cancerosas. Los monocitos también actúan como una fuente primaria de macrófagos asociados a tumores (TAMs) y DCs de larga vida que moldean el microambiente tumoral^[29].

Los neutrófilos son un componente esencial del sistema inmunológico innato, constituyen la primera línea de defensa del organismo para combatir infecciones, mantener la homeostasis y están dotados de un arsenal de receptores para reconocer múltiples PAMPs y DAMPs. No son células residentes de tejidos, sino que son muy abundantes en la circulación (70% de todos los leucocitos circulantes en humanos y entre 0- 20% en ratones)^[30]. En condiciones de daño o inflamación los neutrófilos son reclutados al sitio inflamatorio donde se activan y liberan quimioquinas y otros

factores que reclutan leucocitos al área local, incluyendo LT, DCs, monocitos, macrófagos y a otros neutrófilos^[28]. Sus principales funciones innatas incluyen la desgranulación, la fagocitosis y la liberación de trampas extracelulares de neutrófilos (NET: redes de ADN expulsadas y decoradas con proteínas microbicidas como mieloperoxidasa, elastasa y defensinas)^[31,32]. Por lo general, los neutrófilos tienen una vida útil corta de aproximadamente un día. Sin embargo, subproductos inflamatorios o citoquinas pueden activarlos y, dependiendo de la situación, su vida útil puede extenderse durante algunos días, lo que les permite participar en actividades más complejas, por ejemplo, en la interacción multicelular que ocurre en el microambiente tumoral (TME- del inglés tumor microenvironment) o en el microambiente local generado en respuesta a la administración de vacunas^[28,30]. Igualmente, estudios recientes indican que algunos neutrófilos pueden migrar a los linfonodos drenantes y presentar antígenos, corregular respuestas de LT^[33,34] y matar de manera dependiente de anticuerpos^[35].

Las LCs residen en la epidermis en condiciones estacionarias. Durante mucho tiempo se las consideraba como una subpoblación de DCs dadas sus capacidades migratorias; pero nuevas evidencias demuestran que derivan de linajes de macrófagos y no de DCs, por lo que actualmente son clasificadas como macrófagos residentes de tejidos^[36]. Se originan a partir de precursores embrionarios y se encuentran censando antígenos en la superficie epidérmica (propiedades que son características de los macrófagos), pero también son capaces de migrar hacia los ganglios linfáticos, lo que indica que comparten un diseño funcional con las DCs^[21]. Son células con una gran plasticidad pues son capaces de adaptarse a diferentes estímulos inmunitarios en la piel, tanto en áreas de inmunosupresión y/o tolerancia, como en respuestas proinflamatorias^[36]. En condiciones inflamatorias pueden activar LT residentes en la piel y además, en respuesta a IL-1 β , factor estimulante de colonias de granulocitos-macrófagos (GM-CSF) y el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) se incrementa su migración a los linfonodos drenantes y la consiguiente activación de LT lo cual indica que tienen un papel importante en la mediación de la fase adaptativa de la inmunidad cutánea^[37].

Las DCs por su parte se reconocen como una población heterogénea que comprende varios subconjuntos distintos en términos de su desarrollo, diferencias fenotípicas, localización y especialización funcional. Esta especialización funcional permite a las DC iniciar respuestas inmunitarias distintas en diferentes contextos inmunológicos^[23]. De forma general, las DCs pueden ser divididas principalmente en células dendríticas convencionales (cDCs) y no convencionales, como las células dendríticas plasmacitoides (pDCs) y las células dendríticas derivadas de

monocitos (moDCs). Por su parte las cDCs pueden agruparse en cDC1 y cDC2, excelentes en la presentación de antígenos mediada por MHC I y MHC II respectivamente^[38].

Como resultado del encuentro de las DCs con los Ags en combinación con el reconocimiento de DAMPs y señales de inflamación endógenas o exógenas se produce su maduración; proceso que incluye el incremento de la presentación de antígenos y de la densidad de moléculas coestimuladoras en la superficie celular (CD40, CD80 y CD86), la producción de citoquinas proinflamatorias y su migración hacia órganos linfoides secundarios donde los Ags previamente internalizados procesados y cargados en MHC son presentados a los LT^[39]. Importantemente las DCs tienen un rol fundamental en la respuesta inmune antitumoral, dado a que estas pueden detectar TAAs expresados en células cancerígenas, como por ejemplo proteínas mutadas o aberrantes^[40].

Las cDC1 se identifican por la expresión de XCR1^[13] y poseen mecanismos especializados para mediar el reconocimiento de Ags extracelulares, su procesamiento y presentación a LT CD8⁺ en un contexto de MHC I. Este proceso se denomina presentación cruzada y es fundamental en la generación de respuestas inmunes frente a tumores^[15]. Dentro de las DCs, las cDC1 son las células que preferentemente realizan presentación cruzada *in vivo*, debido a la alta expresión de genes codificantes para MHC-I, la alta producción endosomal de especies reactivas de oxígeno (ROS) y baja acidificación en los mismos, los cuales son indicativos de una eficiente presentación cruzada.

Además, las cDC1 tienen la capacidad de iniciar respuestas de LT *de novo* después de migrar a los ganglios linfáticos drenantes, así como de atraer células T, secretar citoquinas^[40] y presentar antígenos tumorales dentro del TME, mejorando la función de los CTL locales^[16]. La importancia de las cDC1 en la inmunidad antitumoral ha sido demostrada por varios estudios con ratones deficientes en Batf3 (deficientes de cDC1), los cuales muestran pérdida en la capacidad de rechazar tumores inmunogénicos trasplantables e incapacidad para soportar inmunoterapias basadas en células T, como la terapia adoptiva con células T o el bloqueo de puntos de control inmunológicos (ICB) (del inglés immune checkpoint blockade) (ICB)^[16,41-44]. Las cDC1 también pueden activar a LT CD4⁺ a través de la presentación de antígenos del MHC de clase II y pueden polarizar los LT CD4⁺ activados hacia un fenotipo Th1 a través de la secreción de IL-12^[45]. Aunque las cDC1 rara vez se encuentran en el microambiente tumoral, su presencia en el melanoma se ha vinculado con un aumento en la infiltración de LT^[44]; por lo tanto, se sugiere que, si los niveles de DC1 en el microambiente tumoral pudieran aumentarse, esto podría mejorar la eficacia de la inmunoterapia.

Las cDC2 por su parte se especializan en la presentación de antígenos mediada por MHCII y son las APCs más eficientes para la activación y expansión de los linfocitos T CD4⁺[46,47]. Son la población de DC más frecuente presente en la sangre, los órganos linfoides y los tejidos, y promueven una amplia gama de respuestas inmunológicas que incluyen Th1, Th2 y Th17 en contextos específicos, cuya principal función es mantener la respuesta inmune, en este caso, contra Ags tumorales^[18]. Su participación en este proceso estaría dada por la secreción de citoquinas como IFN- γ y TNF- α , las cuales potencian la respuesta inmune mediante la inducción de la expresión de MHC de clase I y II en las células tumorales y de presentación de antígenos, aumentando la inmunogenicidad del tumor^[19-21]. Además, la producción de IL-2 por parte de LT CD4⁺ residentes en los tumores incrementan el reclutamiento de LT CD8⁺ hacia el tumor, promueven su proliferación y potencian su capacidad citotóxica^[12]. Los LT CD4⁺ también tienen una función importante durante el proceso de activación de los LT CD8⁺. Se ha demostrado que cuando los LT CD4⁺ activados y LT CD8⁺ reconocen a su antígeno en una misma cDC1, la interacción que se produce entre CD40 de la cDC1 y CD40L del LT CD4⁺ estimula la activación y la memoria de los LT CD8⁺ ^[12,13,19].

Las pDCs se distinguen por su capacidad para producir grandes cantidades de IFN tipo I en respuesta a infecciones virales^[48]. Se encuentran principalmente en órganos linfoides y pueden migrar a través de la circulación sanguínea hacia los ganglios linfáticos^[46,47]. Además de su capacidad de respuesta inmunitaria innata, las pDC también pueden actuar como células presentadoras de antígeno y tienen una regulación distintiva de la expresión de MHC de clase II en la superficie celular que resulta en la presentación sostenida de complejos peptídicos-MHC y antígenos. Aunque se ha comprobado que las pDC humanas y de ratón pueden desencadenar la activación de los LT CD8⁺ en ciertas situaciones, por otra parte se cree que están involucradas en la inmunosupresión asociada al cáncer, en gran medida debido a su capacidad de estimular las poblaciones de LT reguladores (Treg) promotoras del tumor y su limitada capacidad de activar los LT naïve^[49].

Las moDCs se originan a partir de monocitos en respuesta a procesos inflamatorios o a una combinación de estímulos que incluyen GM-CSF, TNF- α e IL-4^[13]. Durante este proceso de diferenciación, los monocitos experimentan cambios en su morfología, función y expresión de marcadores de superficie para adquirir características propias de las DCs^[50,51]. Además de su papel en la presentación de antígenos, las moDCs producen citoquinas y moléculas de señalización que modulan la respuesta inmunitaria y la inflamación. Estas células tienen la capacidad de expandirse de manera significativa durante procesos infecciosos. También desempeñan un papel importante

en el transporte y transferencia de antígenos hacia otras subpoblaciones de DCs, en la presentación de antígenos durante la respuesta inmune contra el cáncer así como en la activación de los LT CD8⁺, lo cual las convierte en actores clave en la defensa del organismo contra patógenos y en la respuesta inmune antitumoral^[50,52,53].

6.4. Neutrófilos y dinámica inmunológica en la piel.

Debido a su robusta reactividad frente a patógenos, los neutrófilos generalmente no son células residentes de tejidos; en cambio, como mencionábamos anteriormente, se producen y almacenan en grandes reservas en la médula listos para ser liberados a la circulación. Los monocitos también se originan en la médula ósea, y los monocitos circulantes pueden dar origen a macrófagos y DCs. A diferencia de los neutrófilos, los macrófagos residentes en los tejidos son menos inmunorreactivos, lo cual es una característica importante que les permite patrullar los tejidos en busca de patógenos^[28]. Luego de que los macrófagos residentes en los tejidos reconocen PAMPs o DAMPs se activan y producen quimioattractantes de neutrófilos, como CXCL1, CXCL2, IL-1 α y proteína quimioattractante de monocitos-1 (MCP-1) lo cual tiene como resultado un rápido flujo de neutrófilos hacia el sitio de infección^[54]. Además, los macrófagos actúan para prolongar la supervivencia de los neutrófilos mediante la producción de una variedad de factores de crecimiento como el GM-CSF, el factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF) y TNF- α . Este evento marca típicamente el inicio de la inflamación. Evidentemente, los neutrófilos, monocitos y macrófagos trabajan en conjunto para potenciar la respuesta inmune innata contra los patógenos; sin embargo, es importante que esta relación esté regulada de manera estricta, ya que podría contribuir a una inflamación excesiva y al inicio de algunas patologías^[54].

Una vez reclutados, los neutrófilos son capaces de inducir una segunda oleada de respuesta inflamatoria. En primer lugar, el fenotipo de los neutrófilos se altera para adaptarse al entorno cambiante. A medida que esto ocurre, los neutrófilos regulan la liberación de factores quimioatrayentes, como la catepsina G y el azurocidin, que están involucrados en el reclutamiento de otras células del sistema inmune, en particular monocitos/macrófagos. El mecanismo subyacente implica la regulación al alza de varias moléculas de adhesión en el endotelio, incluyendo la molécula de adhesión intercelular-1 (ICAM-1), la molécula de adhesión celular vascular-1 (VCAM-1) y la selectina E. Además, los neutrófilos son capaces de alterar la permeabilidad vascular induciendo cambios en la estructura citoesquelética de las células endoteliales, promoviendo así la trans migración de otras poblaciones de células de la inmunidad

innata. De esta manera se genera un bucle de retroalimentación que involucra procesos inflamatorios adicionales aguas abajo^[54].

Por otra parte, el reclutamiento de neutrófilos, monocitos y macrófagos al foco inflamatorio, así como su activación, conducen a la producción de un conjunto de quimioquinas como CCL2, CCL20, CCL5, CCL22, CCXL17, CXCL9, CXCL10, CXCL11 las cuales inducen el reclutamiento de las DCs hacia la piel^[55-57]. Las DCs son cruciales para conectar la inmunidad innata y la inmunidad adaptativa, desempeñando un papel fundamental en la promoción de la defensa inmunológica y el mantenimiento de la tolerancia inmunitaria. El movimiento de diferentes subpoblaciones de DCs a través de tejidos linfoides y no linfoides es esencial para la activación y regulación de la inflamación y la inmunidad mediadas por estas. La quimiotaxis y migración de las DCs son desencadenadas por la interacción entre quimioquinas y sus receptores, y reguladas por diversos mecanismos intracelulares, como modificaciones proteicas, reprogramación epigenética, remodelación metabólica y reorganización del citoesqueleto, adaptándose de manera específica a cada tejido^[58,59].

6.5. Respuesta inmune antitumoral.

Para que se genere una respuesta inmune antitumoral eficiente, es necesario que se desarrollen una serie de eventos conocidos como Ciclo de Inmunidad- Cáncer^[60]; donde se interrelacionan el SII y el SIA^[61] y donde las DCs tienen un rol primordial^[62]. Este proceso comienza con la generación de antígenos tumorales: antígenos asociados a tumor (TAA) y antígenos tumor específicos (TSA). Las DCs capturan y procesan antígenos tumorales en un contexto proinflamatorio dado principalmente por citoquinas proinflamatorias producidas por células de la inmunidad innata al mismo tiempo que reconocen PAMPs/ DAMPs, que son liberados por las células tumorales que mueren a través de muerte celular inmunogénica (ICD- del inglés immunogenic cell death) ya sea de forma natural o inducida mediante diferentes tratamientos o condiciones de estrés^[63,64]. Este proceso genera la maduración de las mismas lo cual conlleva a un incremento de moléculas coestimuladoras, la producción de citoquinas y la migración hacia el órgano linfoide secundario más cercano^[65].

Una vez en los linfonodos las DCs presentan los péptidos de antígenos internalizados y procesados en moléculas MHC. Los péptidos cargados en moléculas MHCII son presentados a linfocitos T CD4⁺ y los péptidos cargados en un contexto de MHCI pueden ser presentados cruzadamente a los linfocitos T CD8⁺ vírgenes lo cual conlleva a su proliferación y a la activación de sus capacidades citotóxicas; proceso que es crucial para la generación de una respuesta inmune antitumoral^[13,15,66].

Finalmente, los LT activados migran hacia el tumor y atacan a las células cancerosas que moribundas liberan aún más TAAs lo que refuerza la respuesta inmunológica contra el cáncer^[60].

Cada paso de este ciclo de respuesta está regulado por múltiples factores, algunos estimulantes y otros inhibidores. Los factores estimulantes promueven la respuesta inmunitaria, mientras que las moléculas inhibitorias evitan que el proceso se descontrole y provoque autoinmunidad. Desafortunadamente, las células cancerosas cuentan con varios mecanismos para evitar que el SI las reconozca y las ataque^[67]. El primero es disminuir la expresión de MHCI, que es necesario para que los linfocitos se activen en presencia de antígenos extraños. Además, algunas células tumorales disminuyen la expresión de moléculas coestimuladoras de las APCs mediante alteraciones del microambiente y que son esenciales para la activación completa de las células T. Por ejemplo, la proteína CTLA-4 presente en los LT activados pueden interactuar con las moléculas CD80/CD86 en las APC, lo que bloquea la activación de las células T produciendo anergia o apoptosis^[60,68]. Estos mecanismos impiden que los Ags tumorales sean presentados adecuadamente, lo que permite que las células tumorales pasen desapercibidas para el sistema inmunológico^[69]. Otra forma de evasión inmunitaria del cáncer es a través de la interacción de las proteínas PD-L1 o PD-L2 presentes en las células cancerosas que interactúa con la proteína PD-1 en LT activados, lo que inhibe su activación y provoca su agotamiento en el TME.

6.6. Neutrófilos: intercomunicación con DCs y respuesta inmune antitumoral.

Los neutrófilos tienen un rol dual antagónico en el contexto del cáncer; se les ha asociado tanto con respuestas antitumorales como protumorales. Su heterogeneidad funcional es plástica y puede ser modulada por estímulos ambientales, lo cual ha impulsado investigaciones que buscan estrategias terapéuticas dirigidas a manipular a estas células^[31]. Los neutrófilos se polarizan hacia fenotipos proinflamatorios/antitumorales (N1) o antiinflamatorios/protumorales (N2) en respuesta a señales ambientales de citoquinas/quimioquinas^[70]. Cuando está presente el GM-CSF, se favorece la polarización hacia N1 mientras que la presencia del factor de crecimiento transformante (TGF)- β en un contexto tumoral favorece el perfil N2^[71]. Interesantemente, en la sangre de pacientes con melanomas, la terapia con IFN tipo I pareció promover un fenotipo N1 en los neutrófilos y se demostró *in vivo* en modelos de tumores murinos que los IFN tipo I influyen en la polaridad de los neutrófilos hacia este fenotipo. También hubo evidencia de que el IFN- β podría promover un fenotipo antitumoral en los neutrófilos^[31]. Esto evidencia que la plasticidad entre los fenotipos N1 y N2 puede ser manipulada para producir respuestas deseadas en el entorno tumoral^[72].

Por otra parte, aunque las DCs son generalmente células residentes en tejidos y los neutrófilos son un componente principal de la sangre, estos leucocitos se relacionan en sitios de inflamación y en órganos linfoides. Los neutrófilos, se desplazan rápidamente hacia áreas de lesión o inflamación, donde se ha demostrado que desempeñan funciones en el reclutamiento, activación y maduración de las DCs^[73]. Los neutrófilos producen quimioquinas y productos antimicrobianos que reclutan DCs inmaduras al área local, y las DCs inmaduras también producen factores que reclutan neutrófilos, lo que puede amplificar la colocalización y promover la interacción entre neutrófilos y DCs^[74]. Se ha demostrado que los neutrófilos apoptóticos después de fagocitar patógenos pueden actuar como fuente de antígenos para que las DCs los capturen y los presenten a los LT^[71]. También se ha demostrado que las NETs generadas por neutrófilos pueden inducir la producción de quimioquinas que son responsables de atraer más neutrófilos al foco inflamatorio, indicando que la producción de estas puede resultar en la amplificación de la presencia y función de los mismos^[31].

En otro contexto, estudios realizados de las interacciones entre neutrófilos y DCs han demostrado que los neutrófilos pueden estimular a las DCs para promover su activación mediante diferentes mecanismos^[73]. Se ha demostrado que los neutrófilos activan la maduración de las mo-DCs *in vitro* en un proceso que involucra el TNF- α y el contacto célula-célula a través de la molécula de adhesión intercelular específica de DCs (SIGN)/CD209 y Mac-1, y que estas DCs activadas apoyan la formación de respuestas Th1^[75].

Además, se ha demostrado que en un contexto proinflamatorio, los neutrófilos pueden adquirir un fenotipo de APC (mediante la regulación al alza de las moléculas de MHC II y las moléculas coestimuladoras CD80/CD86); pueden migrar a los linfonodos drenantes y desencadenar la activación de las células T CD4⁺^[33]. Así mismo se ha demostrado que existe un subtipo especializado de neutrófilos que fue identificado en estadios iniciales de los tumores, los cuales, son capaces de hacer presentación cruzada de antígenos a LT CD8⁺^[76]. Interessantemente, otros reportes similares indican que la activación de los receptores Fc γ R convierte a los neutrófilos en APCs que presentan antígenos a los LT CD8⁺ para inducir la inmunidad antitumoral en modelos de melanoma^[77]. Sin embargo la capacidad de los neutrófilos asociados al tumor para activar vías inmunes adaptativas disminuye a medida que los tumores progresan, lo cual demuestra el rol fundamental que tienen estas células en el inicio de la respuesta inmune antitumoral^[30].

Existe muy poca información sobre eventos tempranos durante la inmunización contra tumores. Las observaciones de que los neutrófilos pueden modular a las DCs sugieren que éstos pueden ser actores contribuyentes importantes en la organización de respuestas inmunes adaptativas

antitumorales, por lo que mejorar nuestra comprensión de la interacción entre estas dos poblaciones celulares durante la vacunación con TRIMELVax, ayudaría a entender los mecanismos involucrados en la inmunización contra el cáncer y generarían oportunidades para mejorar las vacunas.

6.7. Inmunoterapias contra cáncer y TAPCells®.

Dado el importante rol que juega el sistema inmune en el control y eliminación de las células tumorales, se han desarrollado terapias que buscan mejorar o activar la respuesta del sistema inmune de los pacientes. En este sentido, la inmunoterapia ha surgido como una aproximación revolucionaria al tratamiento del cáncer^[78]. El principal propósito de las inmunoterapias contra el cáncer son inducir activamente respuestas inmunes contra antígenos tumorales, y revertir la inmunosupresión/tolerancia en el microambiente tumoral, destruyendo de forma efectiva los tumores^[79].

Desde el 2011 la FDA (Food and Drug Administration) y la EMA (European Medicines Agency) han aprobado varias inmunoterapias contra melanoma maligno las cuales incluyen: los tratamientos de ICB como el anticuerpo anti-CTLA4 (Ipilimumab), y anti-PD1 (Nivolumab y Pembrolizumab)^[68], y la utilización del virus oncolítico talimogene laherparepvec (T-VEC)^[80]. Estos biofármacos han sido eficaces en el tratamiento de MM ya sea usados como monoterapias o como terapias combinadas entre sí. No obstante, existe un grupo significativo de pacientes que presentan resistencia primaria o adquirida a estos tratamientos y una serie de efectos inflamatorios adversos^[2,5,9,78,81], lo cual demuestra la necesidad de la realización de estudios que impliquen la utilización de combinaciones óptimas y/o nuevas terapias para el tratamiento de melanoma.

En este contexto, las vacunas terapéuticas contra el cáncer, incluido el melanoma maligno, surgen como una promesa debido a su potencial seguridad, especificidad y respuesta antitumoral de larga duración^[82,83]. Las vacunas contra el cáncer involucran la administración exógena de Ags combinados con adyuvantes que activan a las DCs. Su objetivo está centrado en estimular el sistema inmune de los pacientes contra antígenos tumorales específicos para controlar el crecimiento tumoral, inducir la regresión de los tumores establecidos, combatir la fase metastásica y la recurrencia de los tumores^[12].

De forma general se han descrito tres tipos de plataformas para el desarrollo de vacunas en el tratamiento de cáncer: vacunas celulares, vacunas de vectores virales y vacunas moleculares (peptídicas, péptidos sintéticos largos (SLP), DNA y RNA). La eficacia de las vacunas terapéuticas

contra cáncer depende de varios factores fundamentales como: I.) la entrega de TAAs de alta calidad a las DCs II.) la óptima activación de las DCs, III.) una fuerte inducción y amplificación de CTL específicos contra péptidos derivados de TAA, IV.) la activación y proliferación de linfocitos T CD4+ los cuales son indispensables para promover la respuesta efectora y de memoria de los CTL, V.) la infiltración sostenida del microambiente tumoral, VI.) la durabilidad/mantenimiento de la respuesta en el tiempo VII.) la reducción de los elementos supresores o inhibidores del sistema inmune. De esta manera se garantizaría una respuesta que potencia un balance positivo hacia la activación de la respuesta inmune y por consiguiente la regresión de los tumores y la reducción de los efectos adversos no específicos^[82,84,85].

Una de las plataformas de vacunas más estudiadas en las últimas décadas es el uso de DCs como sistemas de liberación de TAA debido a su habilidad para fagocitar, procesar y presentar antígenos tumorales^[86]. Existen dos estrategias fundamentales para condicionar a las DCs y que puedan ejercer su función como células presentadoras de antígenos. La primera consiste en la vacunación canónica, donde usualmente las DCs son cargadas con Ags tumorales seguido de su administración en los pacientes^[86]. En este proceso las DCs que son aisladas o generadas *in vitro* a partir de sangre periférica de pacientes pueden ser activadas y cargadas con antígenos mediante pulsación de péptidos correspondientes a TAAs o neoantígenos, electroporación de mRNA (TriMix DCs), transducción lentiviral (SMART- DCs), fusión con células tumorales^[87] o estimuladas con lisados tumorales completos *ex vivo* (DCs- Vaccines)^[84].

La segunda consiste en la vacunación *in situ*, donde la captación antigénica y el reconocimiento inmune de los tumores está mediado por la liberación local de los Ags tumorales a través de terapias y tratamientos estándares como por ejemplo el uso de lisados tumorales como fuentes directas de Ags y la quimioterapia, irradiación o la crio-ablación como mecanismos para inducción de ICD^[86,88], un tipo de muerte celular donde la inducción de estrés celular culmina en la muerte de las células tumorales y la exposición en la membrana celular de calreticulina, la liberación extracelular de moléculas claves como: ATP, HMBG1 o proteínas de estrés celular, que incrementan la activación, las capacidades fagocíticas y maduración de DCs; lo que finalmente mejora la presentación de Ags a los LT^[67,88,89].

Durante los últimos veinte años el Laboratorio de Inmunología Antitumoral (LIAT) ha realizado contribuciones sustanciales al campo de la inmunoterapia del cáncer basada en el uso de la tecnología TAPCells®, una vacuna de DC autólogas generadas a partir de monocitos de sangre periférica del propio paciente y posteriormente estimuladas con TRIMEL, un lisado proveniente

de tres líneas celulares de melanoma metastásico previamente sometidas a estrés (shock) térmico. Las TAPCells® han sido empleadas en estudios clínicos para el tratamiento de melanoma maligno^[90] y cáncer de próstata resistente a castración^[91] con resultados clínicos verificables. Aunque los resultados son alentadores, existe un porcentaje de pacientes que no responden a la terapia. Esto puede estar relacionado con que las DCs poseen una heterogeneidad fenotípica y funcional considerable, identificándose varios subtipos celulares con diferentes funciones. Por otro lado, el proceso de transferencia tecnológica de las TAPCells® es altamente personalizado y requiere de una logística compleja, dado que se basa en la utilización de células sanguíneas autólogas. Esto hace necesario la búsqueda de nuevas formas de administrar los antígenos tumorales directamente en el paciente, en un contexto proinflamatorio adecuado capaz de generar una respuesta potente, efectiva y duradera.

6.8. TRIMELVax una vacuna terapéutica contra melanoma maligno.

Durante décadas se ha intentado generar vacunas derivadas de líneas celulares tumorales con limitado éxito^[84]. Un ejemplo es GVAX®, una vacuna convencional que consiste en células autólogas de melanoma B16 modificadas para secretar GM-CSF^[92,93], la cual ha demostrado una limitada eficacia en ensayos clínicos de pacientes con diferentes tipos de cáncer, incluyendo melanoma avanzado, siendo efectiva solo cuando es aplicada junto a terapias basadas en el uso de anticuerpos contra bloqueadores de punto de control inmunológicos^[82,94-96].

En este sentido, en el Laboratorio de Inmunología Antitumoral (LIAT) está desarrollando una innovadora vacuna que puede ser administrada de forma directa en pacientes con melanoma maligno, llamada TRIMELVax. Su formulación consiste en una mezcla de TRIMEL y la hemocianina del molusco chileno *C. Concholepas* (CCH) como adyuvante el cual se conoce que promueve el reclutamiento de células al sitio de inyección a través de la inflamación aguda y la interacción con receptores de patrones moleculares (PRRs) en las APCs que conducen a su activación^[97,98].

El lisado tumoral derivado de tres líneas alogénicas de melanoma humano (Mel1, Mel2 y Mel3) contiene un variado repertorio de antígenos asociados a melanoma (MAAs) como por ejemplo: MART-1/MelanA, gp100, MC1R, MAGE, GAGE, NY-ESO-1 y Tyrosinasa^[99]. Se demostró que el condicionamiento de estas líneas tumorales con HS favorece la producción de DAMPs como, por ejemplo: translocación de calreticulina (CRT) a la membrana celular, la liberación de HGMB1^[99] e induce la expresión génica de proteínas de shock térmico (HSPA6, CRYAB, HSPB3, DNAJB8, HSPA1L, DNAJC5G, HSPA1B, CRYAA, HSPA1A, DNAJB1, SERPINH1,

DNAJC5B, BAG3, HSPH1, HSPB1, DNAJB7) y DNAJB13) las cuales inducen una óptima activación de las DCs y una eficiente presentación cruzada.

Estudios previos realizados por Gleisner y cols^[100] han demostrado que TRIMELVax, utilizado como tratamiento preventivo y terapéutico, muestra una eficiente capacidad para controlar el crecimiento de tumores y aumentar la supervivencia en un modelo murino de melanoma B16F10, induciendo respuestas tanto celulares como humorales. Se demostró que los lisados tumorales humanos (TRIMEL) y murinos (B16F10) son mayoritariamente fagocitados por células dendríticas tipo 1 (cDC1), lo que promueve la activación de estas células y la presentación cruzada de antígenos tumorales. Además, se observó la presencia de anticuerpos específicos contra el melanoma en los ratones vacunados^[100].

Adicionalmente, se comprobó que TRIMELVax ejerce una modulación sobre el microambiente tumoral, facilitando una mayor infiltración intratumoral de cDC1 y linfocitos T CD8+. Específicamente, se ha identificado una subpoblación de linfocitos T CD8+ PD-1^{low} que se relaciona con un menor agotamiento funcional y con respuestas efectoras necesarias para controlar el crecimiento del tumor^[100,101]. Basándonos en estos resultados, TRIMELVax se posiciona como un candidato prometedor en el desarrollo de una vacuna contra el melanoma maligno, si bien aún quedan por desentrañar los mecanismos y el papel de los componentes del sistema inmunológico que condicionan su eficacia, especialmente en modelos experimentales y en pacientes.

Como detallamos anteriormente el inicio de las respuestas inmunes en los tejidos periféricos específicamente en la piel y en los linfonodos drenantes es un proceso complejo que requiere de muchos pasos e interacciones entre componentes celulares y moleculares del sistema inmune innato, siendo el reclutamiento de macrófagos, neutrófilos y DCs al sitio de inyección y el transporte de los antígenos mediante distintos subtipos de DCs desde la periferia hasta los linfonodos dos pasos críticos para la posterior activación de los LT y su direccionamiento hacia el tumor^[39].

Además, los neutrófilos están siendo reconocidos como células altamente adaptables y sofisticadas, capaces de sintetizar nuevos componentes y con una vida útil potencialmente prolongada. Los nuevos conceptos de heterogeneidad y plasticidad de los neutrófilos han revelado que, en situaciones patológicas, estos pueden diferenciarse en subconjuntos distintos con características y funciones específicas. Estos subconjuntos seguramente añadirán complejidad a las interacciones entre los neutrófilos y otros tipos de células inmunitarias y consideramos que pueden tener un papel interesante en el mecanismo de acción de TRIMELVax, contribuyendo así

a una respuesta inmunitaria efectiva. De ahí que resulte relevante comprender cómo actúan en el microambiente tisular periférico poblaciones de macrófagos, neutrófilos, LCs, DCs y sus mediadores moleculares luego de la administración de TRIMELVax, para lograr la óptima activación y maduración de DCs y evaluar las distintas poblaciones de DCs involucradas en el proceso de presentación de Ags tumorales en los linfonodos drenantes.

7. HIPÓTESIS

TRIMELVax induce una inflamación aguda temprana, caracterizada por una mayor densidad local de genes para citoquinas y quimioquinas proinflamatorias y un rápido y potente reclutamiento de neutrófilos, que potencian la migración de las cDC1 a los linfonodos drenantes favoreciendo el control del crecimiento tumoral.

8. OBJETIVOS.

8.1. Objetivo general:

Caracterizar el efecto temprano de TRIMELVax sobre la producción aguda de factores solubles (citoquinas y quimioquinas) y poblaciones celulares de la respuesta inmune innata que favorecen la generación de una respuesta inmune antitumoral efectiva, con el fin de aportar en las estrategias de inmunoterapia contra el cáncer.

8.2. Objetivos específicos:

1. Evaluar el efecto temprano de TRIMELVax en el microambiente del sitio de inyección, especialmente el análisis genes para citoquinas y quimioquinas y la infiltración de células del sistema inmune innato específicamente neutrófilos, DCs, monocitos y macrófagos.
2. Analizar el efecto de la vacuna TRIMELVax, sobre la migración masiva de las cDC1s y otras poblaciones de células presentadoras de antígenos a los linfonodos drenantes.
3. Determinar el efecto de los neutrófilos de la respuesta temprana a la inmunización con TRIMELVax sobre la migración de las cDC1 a los linfonodos drenantes y su impacto en la capacidad de eliminar tumores.

9. MATERIALES Y MÉTODOS

9.1. Animales.

Ratones C57Bl/6 *wild-type* de entre 6 y 12 semanas fueron comprados y mantenidos en las facilidades para ratones de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile en condiciones libres de patógenos. Todos los procedimientos realizados en este trabajo fueron aprobados por el Comité Institucional de Cuidado y Uso de Animales (CICUA) de la Universidad de Chile. Certificación CBA1074-MED-UCH.

9.2. Líneas celulares y reactivos.

La línea de melanoma murino B16F10 (ATCC CRL-6475) fue donada por el Dr. Álvaro Lladser de la Fundación Ciencia&Vida, y por la Dra. María Rosa Bono de la Universidad de Chile. Las líneas celulares Mel1, Mel2 y Mel3 fueron establecidas en el laboratorio a partir de linfonodos metastásicos de 3 pacientes con melanoma maligno. La línea celular murina B16F10/mGM-CSF (GVAX®) fue adquirida en RIKEN BioResource Research Center (Riken BRC Cell Bank, ref RCB1158). Las líneas celulares B16F10, Mel1, Mel2, Mel3 y B16F10/ mGM-CSF fueron mantenidas en medio RPMI 1640 (CORNING, ref 10-041-CMR) y DMEM (CORNING, ref 10-013-CMR) respectivamente, suplementados con 10% de suero fetal bovino (FBS) (CORNING, ref 35-010-CV) además, de los antibióticos penicilina y streptomina (PS) 1% (CORNING, ref 30-002-CI) en un incubador a 37°C con 5% de CO₂. La hemocianina proveniente de *Concholepas Concholepas* (CCH) fue donada por la Dra. María Inés Becher (Biosonda, lot:21112020). El 5-(and 6) – Carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester (CFSE) fue adquirido en ThermoFisher (ThermoFisher Scientific, ref 65-0850-84).

9.3. Preparación de lisados de líneas tumorales.

La preparación de TRIMEL se realizó de acuerdo a lo descrito por Aguilera y cols^[99]. De forma resumida, una mezcla en iguales proporciones de Mel1, Mel2 y Mel3, a una concentración final de 8x10⁶ células/mL, se incubó por 1 hora a 42°C seguido de 2 horas a 37°C. Finalmente, las células se lisan con tres ciclos de congelación/descongelación en nitrógeno líquido, y se almacenan a -80°C hasta su posterior uso. Para la preparación del lisado de B16F10 se utiliza el mismo procedimiento.

9.4. Preparación de vacunas

a. TRIMELVax.

Se formula al momento de la vacunación. TRIMEL previamente generado se mezcla en proporción 1:1 con el lisado de B16F10, y se adicionan 200ug de CCH por dosis.

b. GVAX®.

Al momento de la vacunación se descongelan y formulan 1×10^6 células B16F10/mGM-CSF (GVAX) previamente irradiadas con 150 Gry en 30 μ L de PBS 1X.

9.5. Reclutamiento de poblaciones celulares en modelo de almohadilla plantar trasera.

Ratones C57Bl6 recibieron en la almohadilla plantar trasera la administración subcutánea (*s.c*) de 30 μ L de los siguientes tratamientos: a) TRIMELVax, b) GVAX y c) PBS como control de vehículo. Los ratones fueron eutanasiados a las 6, 12 y 24 horas posteriores a los tratamientos. Se determina el grado de induración en el sitio de administración utilizando un caliper digital, para luego tomar muestras de biopsias (de todo el cojinete plantar) y analizar la composición celular mediante citometría de flujo (FACS). Se identifican las poblaciones basadas en los siguientes marcadores: M1(CD45⁺ CD11b⁺ F4/80⁺ CD206⁺), M2(CD45⁺ CD11b⁺ F4/80⁺ CD206⁻), neutrófilos (CD45⁺ CD11b⁺ F4/80⁻ Ly6G⁺), monocitos (CD45⁺ CD11b⁺ F4/80⁻ Ly6C⁺), moDCs (CD45⁺ CD11b⁺ F4/80⁻ Ly6C⁺ MHCII⁺), cDC1 (CD45⁺ CD11c⁺ MHCII⁺ CD11b⁻ CD24⁺), LC_{piel} (CD45⁺ CD11c⁺ MHCII⁺ CD11b⁺ CD24⁺ CD26⁻), cDC2_{piel} (CD45⁺ MHCII⁺ CD11b⁺ CD24⁻ CD26⁺), LC_{pLN} (CD45⁺ CD11c⁺ MHCII⁺ CD11b⁺ CD24⁺), cDC2_{pLN} (CD45⁺ CD11c⁺ MHCII⁺ CD11b⁺ CD24⁻).

9.6. Ensayo de migración con CFSE.

Grupos de ratones C57Bl6 fueron inmunizados por vía *s.c* en la almohadilla plantar trasera con 30 μ L de los siguientes tratamientos: TRIMELVax, GVAX o PBS. Posteriormente, se administran 20 μ L de CFSE por vía *s.c* en la misma almohadilla plantar que previamente recibió la inmunización con los diferentes tratamientos de estudio a distintos tiempos luego de la inyección y 24 horas previas a la eutanasia de los animales. Los animales fueron eutanasiados a los tiempos 0, 12, 24, 48 y 72 horas y se extrajo el pLN. Para los análisis a los tiempos 12 y 24 horas el CFSE se administra 2 horas posteriores a la administración de los tratamientos experimentales. Para los análisis de las 48 y 72 horas, el CFSE se administra a las 24 horas posteriores a los tratamientos. Luego de la eutanasia y extracción del pLN se identifican mediante FACS las poblaciones de DCs que migran desde el sitio de inyección hasta el pLN (DCs-CFSE⁺). En los experimentos de depleción de neutrófilos, los ratones recibieron los siguientes tratamientos experimentales: PBS, TRIMELVax, TRIMELVax + anticuerpo anti- Ly6G, TRIMELVax + anticuerpo anti- IgG; siguiendo el mismo esquema de tratamiento previamente descrito.

9.7. Depleción de neutrófilos.

Para los estudios de migración con CFSE, la depleción de los neutrófilos se realizó 24 horas antes de la administración de los tratamientos de estudio, mediante la administración intraperitoneal de una dosis de 20 μ g del anticuerpo monoclonal Ly6G (1A8) (BioXCell, Cat: BE0075-1) o el anticuerpo monoclonal rat

IgG2a (2A3 BioXCell, Cat: BE0089) como control de isotipo. Para la depleción de los neutrófilos en el modelo murino de crecimiento tumoral, el anticuerpo monoclonal anti Ly6G y el anticuerpo control de isotipo, fueron administrados en los distintos grupos de ratones a los días 0, 5 y 11 posteriores a la inoculación con la línea celular de melanoma maligno murino B16F10. Se midió la eficacia de la depleción de los neutrófilos mediante el análisis de la presencia de los mismos en sangre periférica. del anticuerpo anti Ly6G y del control de isotipo y se analizó mediante citometría de flujo de sangre total.

9.8. Ensayo de crecimiento tumoral.

Ratones C57Bl6 fueron inoculados al día 0 de forma *s.c* con 2.5×10^4 de células B16F10 en la parte baja del flanco derecho. A los días 1, 6 y 12 posteriores al desafío tumoral recibieron la inmunización *s.c* de TRIMELVax o PBS en el flanco contrario. Se realizaron mediciones del crecimiento tumoral a los días 8, 10, 12, 14, 16 y 18 posteriores a la inoculación de los tumores. Finalmente, los ratones fueron eutanasiados al día 18. En los experimentos donde se incluye GVAX los ratones fueron vacunados de forma intradérmica (*i.d*) a los días 3, 9 y 12 posteriores a la inoculación de los tumores y se siguió el mismo esquema para la medición del volumen tumoral y eutanasia. El volumen tumoral se calcula mediante la siguiente fórmula: $vt = \frac{L \cdot A^2}{2}$ donde L (largo), A (ancho).

9.9. Recolección y procesamiento de muestras:

Piel. Se recolecta toda la almohadilla plantar, y se trata con una solución de Dispase II 1,6 mg/mL (Merck, ref 04942078001) en PBS 1X (CORNING, ref 46-013-CM) durante 120 min a 37°C y 5% de CO₂. Luego las muestras fueron disgregadas mecánicamente e incubadas en una solución enzimática de Colagenase 1,5 mg/mL (Roche, ref 11088866001) y DNase I (Roche, ref 10104159001) 0,5 mg/mL en PBS 1X suplementado con FBS (2%) por 60 min a 37°C y agitación. La suspensión obtenida fue filtrada utilizando un *cell strainer* de 70 µm (BD Falcon, ref 352350). Finalmente, el filtrado fue centrifugado y el precipitado resuspendido en PBS 1X suplementado con FBS (2%). Luego las suspensiones celulares fueron separadas para ser analizadas mediante FACS o RT-qPCR.

Linfonodos. Los pLN fueron disgregados mecánicamente, para luego ser incubadas con una solución enzimática que contiene RPMI 1640 suplementado con SFB (2%), Colagenase 1,5 mg/mL y DNase I 0,5 mg/mL durante 45 min a 37°C. Posteriormente las muestras son filtradas a través de *cell strainer* 70 µm, se centrifugan y resuspenden en RPMI suplementado con FBS (2%).

Sangre. Se extraen 30 µL de sangre desde la vena central de la cola de los ratones de los grupos experimentales, los cuales se depositan en un tubo eppendorf que contiene 20 µL de heparina sódica

(Ascend Laboratories, ref UK814X), para posteriormente realizar citometría de sangre total mediante citometría de flujo multiparamétrica.

9.10. Citometría de Flujo.

Las suspensiones celulares de piel y pLN fueron lavadas con PBS 1X e incubadas 20 min con una solución que contiene el marcador de viabilidad Live/Dead Fixable Aqua Dead Cell Stain Kit (Thermo Fisher Scientific, ref L34966). Posteriormente, las suspensiones celulares fueron incubadas 10 min con TrueStain Fc γ (CD16/32, clone 93) seguido de una incubación de 30 min con la mezcla de anticuerpos según el protocolo de tinción y finalmente lavadas dos veces con PBS 1X suplementado con FSB (2%). Los anticuerpos utilizados fueron los siguientes: CD3-BV510 (clone 17A2), CD19-BV510 (clone 6D5), CD11b-BV421 (clone M1/70), Ly6C-BV605 (clone HK1.4), xcr1-BV650 (clone ZET), Ly6G- BV711 (clone 1A8), CD45-PerCP/Cy5.5 (clone 30-F11), F4/80- (clone MB8), Sirp1a- AF700 (clone P84), MHCII- APC/H7 (clone M5/114.15.2), CD86- AF488 (clone GL-1), CD206- AF647 (clone MR5D3), CD24- PE/Cy7 (clone M1-69), CD26- FITC (clone H194-112), B220- PE (clone RA3-6B2), y CD11c- PE/Dazzle594 (clone N418), todos Biolegend. Para las muestras de sangre, se adicionan 10 μ L de la solución TrueStain Fc γ (clone 93) y se incuban por 10 minutos para posteriormente adicionar las mezclas de anticuerpos los que se incuban finalmente durante 30 minutos. Luego se lisan los glóbulos rojos por 10 minutos con el *buffer* de lisis BD Pharm Lyse (BD Biosciences, ref 555899), y se centrifugan a 1800 RPM durante 5 minutos a temperatura ambiente. Finalmente, las muestras fueron adquiridas en los citómetros de flujo FORTESSA X20 o BD FACSVersé (BD Biosciences) ubicados en los laboratorios de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile. Los datos obtenidos fueron analizados mediante FlowJo versión 10.6.2.

9.11. Expresión de citoquinas y quimioquinas en la almohadilla plantar trasera.

La cuantificación de la expresión de citoquinas y quimioquinas en la almohadilla plantar trasera se realizó mediante RT-qPCR utilizando el RT² Profiler PCR Array (Qiagen, ref 330231) siguiendo las instrucciones del fabricante. De forma resumida, las muestras de piel fueron disgregadas como se describe anteriormente y las suspensiones celulares fueron resuspendidas en *Buffer* RLT (Plus RNeasy Plus lysis Buffer Qiagen, ref 1030963) y mantenidas a -80°C hasta su utilización. Para la extracción de RNA total y su conversión a cDNA se utilizó el RT² First Strand Kit 12 (Qiagen, ref 330401). Las reacciones de qPCR se realizaron en el QuantumStudio 3 Real- Time PCR (Applied BiosystemsTM), y se utilizó el RT² SYBR Green ROXTM qPCR Mastermix (Qiagen, ref 330520). Los datos obtenidos fueron normalizados usando la media de un panel de genes *housekeeping* (Actb, B2m, Gadph, Gusb, Hsp90ab1). Para la cuantificación génica relativa se utilizó el método de $\Delta\Delta C_t$ y luego se calculó el cambio de expresión como $2^{(-\Delta\Delta C_t)}$. Cada muestra

experimental fue analizada por duplicado y corresponde a un pool del RNA de las suspensiones celulares de biopsias de 3 ratones independientes del mismo grupo experimental. Los RNA provenientes del grupo tratado con PBS se consideran como el grupo control.

9.12. Análisis estadístico.

Los resultados fueron expresados como promedio \pm SEM de un experimento, cuyo tamaño de muestra varía entre $n=5$ y $n=6$. Todos los datos fueron analizados utilizando GraphPad Prism 8.0.2. La normalidad de los datos se analizó utilizando los test de Shapiro-Wilk test y Kolmogorov-Smirnov test. Para el análisis de las varianzas entre tratamientos y entre dosis se utilizó ANOVA de múltiples vías seguido de un post-test Turkey. Un valor de $p < 0.05$ se toma como estadísticamente significativo (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$).

10. RESULTADOS

10.1. TRIMELVax induce la expresión temprana de un perfil proinflamatorio de genes de citoquinas y quimioquinas en el sitio de inmunización.

Para entender como TRIMELVax modula el microambiente subcutáneo periférico, estudiamos mediante un array de RT- qPCR, 84 genes para citoquinas y quimioquinas expresados en el sitio de inyección a las 6 y 24 horas después de los tratamientos con TRIMELVax y GVax. Para esto, ratones C57Bl6 fueron inyectados (*s.c*) en la almohadilla plantar trasera con 30 μ L de cada uno de los productos de estudio, fueron eutanasiados a los tiempos señalados, se tomaron muestras de piel de todo el cojinete plantar y se disgregaron mecánica y enzimáticamente para obtener suspensiones celulares, desde las cuales se realizó la extracción de mRNA, la síntesis de cDNA y posteriormente el qPCR (Figura 1A).

Nuestros resultados muestran que desde las 6 horas TRIMELVax, a diferencia de GVax, induce una potente sobreexpresión de genes para citoquinas, quimioquinas y factores de crecimiento proinflamatorios en el sitio de inoculación (Figura 1C). Observamos además que a las 6 horas posteriores al tratamiento con TRIMELVax se detectan 49 genes sobreexpresados, mientras que a las 24 horas se detectaron 19 genes sobreexpresados y tres genes inhibidos (*Ccl24*, *Adipoq*, *IL18*). Por otro lado, el tratamiento con GVax a las 6 horas induce la sobreexpresión de 16 genes y la inhibición de otros tres genes (*xcl1*, *IL2* y *Thpo*), mientras que a las 24 horas se induce la expresión de 23 genes y la inhibición de otros tres genes (*Tnfsf10*, *IL17a*, *Adipoq*) (Figura 1B). Esto sugiere que TRIMELVax favorece una mayor sobreexpresión de genes proinflamatorios comparado con GVax en ambos tiempos de estudio.

De los genes sobreexpresados luego del tratamiento con TRIMELVax, se detectan 19 genes que codifican para quimioquinas a las 6 horas, y disminuyen a nueve genes a las 24 horas. Para el tratamiento con GVax observamos que a las 6 horas hay nueve genes sobreexpresados que disminuye a siete a las 24 horas (Tabla 1). Realizamos un análisis de los perfiles de citoquinas inducidos por los tratamientos con TRIMELVax y GVax, y observamos que a las 6 horas posteriores al tratamiento con TRIMELVax se induce la sobreexpresión de 17 genes para citoquinas de los cuales 11 son citoquinas proinflamatorias y seis para citoquinas anti inflamatorias. A las 24 horas posteriores al mismo tratamiento encontramos que se sobreexpresan cuatro genes para citoquinas, tres de ellos para citoquinas pro inflamatorias y uno para anti inflamatorias. Para el grupo tratados con GVax se observa que a las 6 horas posteriores al tratamiento se sobreexpresan tres genes para citoquinas, de los cuales dos son proinflamatorios y

uno antiinflamatorio, mientras que a las 24 horas observamos la sobreexpresión de ocho citoquinas: cinco proinflamatorias y tres antiinflamatorias (Figura 1C y Tabla 1).

Con el fin de identificar los genes que pudieran estar asociados con el perfil de reclutamiento observado luego de la inyección de TRIMELVax, nos centramos en estudiar aquellos que se encontraban sobreexpresados exclusivamente para esta vacuna a las 6 y 24 horas. Para esto los genes sobreexpresados para los cuatro grupos de estudio fueron agrupados mediante un diagrama de Venn dependiendo del tratamiento y del tiempo (Figura 1D), lo que nos permitió definir la distribución de los mismos.

Encontramos que el tratamiento con TRIMELVax a las 6 horas induce la sobreexpresión de 18 genes que no se comparten con otro grupo de estudio. Entre estos genes destacan las citoquinas IL15 y IL17, y las quimioquinas Cxcl1, CxCL10 y CxCL11 las cuales participan en el reclutamiento y activación de neutrófilos^[57,58]. Además, encontramos la sobreexpresión de los factores de crecimiento Lif y Csf1 que pueden actuar regulando la diferenciación de monocitos a macrófagos y la supervivencia de neutrófilos y macrófagos en el sitio de vacunación (Figura 1C y D)^[59,60]. Se ha demostrado que Csf1 (M-CSF) es un factor fundamental en la diferenciación de monocitos a macrófagos^[61], lo cual unido con la sobreexpresión de citoquinas pro inflamatorias como TNF- α favorecen la diferenciación hacia el perfil de macrófagos M1. Adicionalmente, sólo para los grupos tratados con TRIMELVax a las 6 y 24 horas se sobreexpresan los genes para las quimioquinas Cxcl9 y Cxcl13, los cuales son producidos por macrófagos y tienen asociadas diversas funciones en el reclutamiento de macrófagos, NK y LT y B (Figura 3 D y E)^[62,63,64]; así como de la quimioquina Ccl19, ligando para CCR7 el cual regula la migración de las DCs a los linfonodos drenantes^[65] y Cxcl12 que regula la movilización de las DDCs en la dermis y el movimiento de las LCs desde la epidermis a las dermis^[102,103].

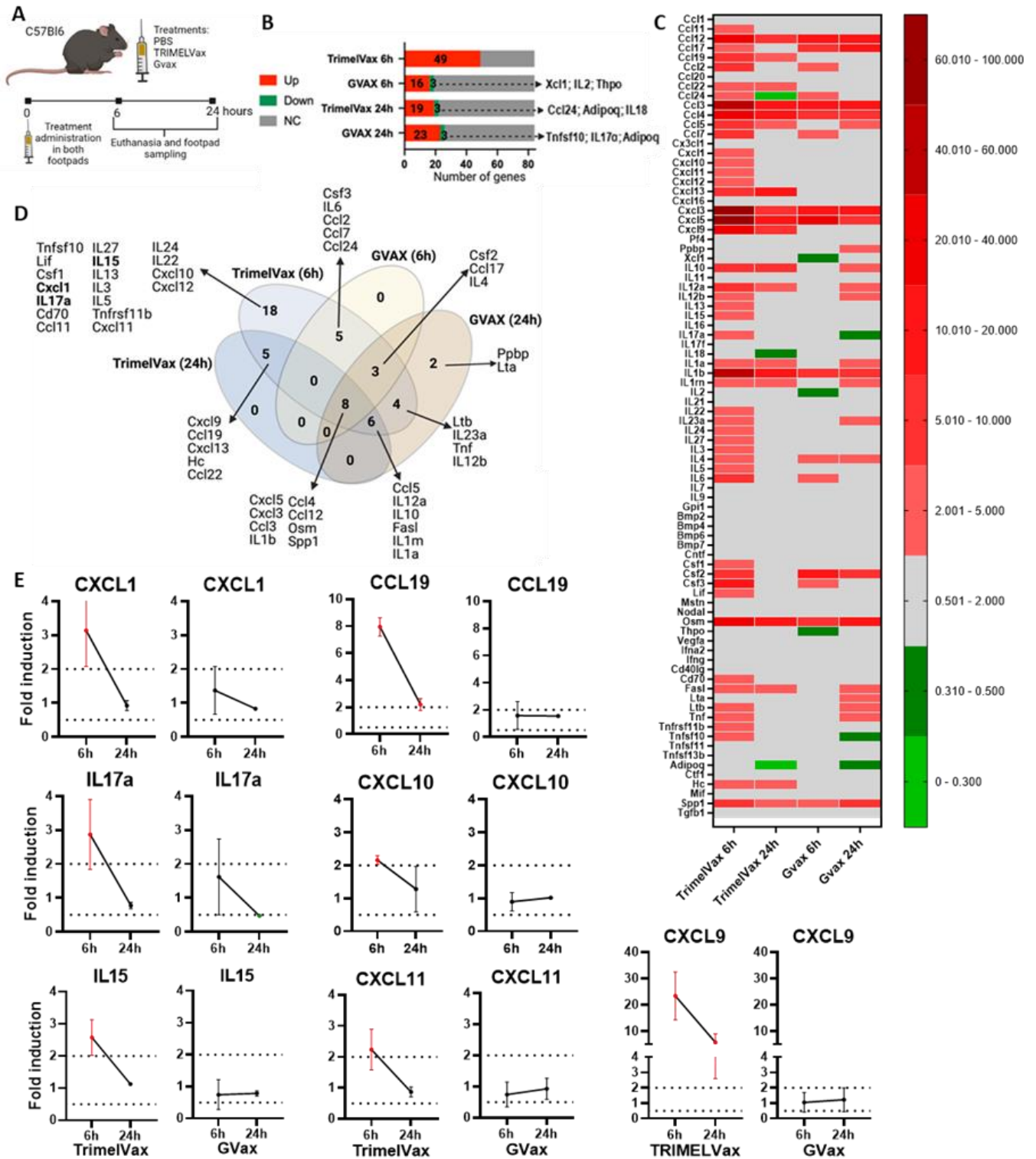


Figura 1: TRIMELVax induce una potente sobreexpresión de un patrón específico de quimioquinas y citoquinas proinflamatorias. **A**, representación esquemática del protocolo de tratamiento. **B**, cuantificación del número de genes que están regulados al alza o la baja en los diferentes tratamientos (TRIMELVax o GVax). **C**, Mapa de calor (Heat Map) que muestra los rangos de valores de veces de inducción para los 84 genes de la placa de RT-qPCR, cada cuadrado del mapa corresponde a un gen y

compara los tratamientos TRIMELVax y GVax en diferentes tiempos (colores en verde corresponden a genes regulados a la baja y los tonos en rojo corresponden a los regulados al alza). **D**, Diagrama de Venn. Gráfica los genes que son sobreexpresados en los diferentes tratamientos a diferentes tiempos y la relación que existe entre ellos. **E**, comparación entre TRIMELVax y GVax 6 horas y 24 horas para genes relacionados con reclutamiento de neutrófilos al sitio de inyección y con la migración de DCs a los linfonodos drenantes. Los datos fueron analizados usando el método de $\Delta\Delta\text{Ct}$ usando como control en grupo tratado con PBS. Se toman como valores de corte >2 y $<0,5$ para establecer los genes regulados al alza y la baja respectivamente. Se muestran los resultados de dos experimentos independientes donde cada muestra corresponde a una mezcla del mRNA de tres ratones.

Tabla 1: Resumen de genes sobreexpresados para quimioquinas y citoquinas en los grupos tratados con TRIMELVax y GVax a las 6 horas y 24 horas.

Genes UP-regulated	TREATMENTS			
	TRIMELVax 6h	TRIMELVax 24h	GVax 6h	GVax 24h
Total	49	19	16	23
Cytokines Genes	17	4	3	8
Pro Inflammatory Cytokines	11 (TNF, <i>IL1a</i> , <i>Il1b</i> , <i>IL3</i> , <i>IL5</i> , <i>IL6</i> , <i>Il12a</i> , <i>Il12b</i> , <i>IL15</i> , <i>IL17a</i> , <i>IL27</i>)	3 (<i>IL1a</i> , <i>Il1b</i> , <i>Il12a</i>)	2 (<i>Il1b</i> , <i>IL6</i>)	5 (TNF, <i>IL1a</i> , <i>Il1b</i> , <i>Il12a</i> , <i>Il12b</i>)
Anti Inflammatory Cytokines	6 (<i>IL4</i> , <i>IL10</i> , <i>IL13</i> , <i>IL22</i> , <i>IL23a</i> , <i>IL24</i>)	1 (<i>IL10</i>)	1 (<i>IL4</i>)	3 (<i>IL4</i> , <i>IL10</i> , <i>IL23a</i>)
Chemokines	19 (<i>Ccl2</i> , <i>Ccl3</i> , <i>Ccl4</i> , <i>Ccl5</i> , <i>Ccl7</i> , <i>Ccl11</i> , <i>Ccl12</i> , <i>Ccl17</i> , <i>Ccl19</i> , <i>Ccl22</i> , <i>Ccl24</i> , <i>Cxcl1</i> , <i>Cxcl3</i> , <i>Cxcl5</i> , <i>Cxcl9</i> , <i>Cxcl10</i> , <i>Cxcl11</i> , <i>Cxcl12</i> , <i>Cxcl13</i>)	12 (<i>Ccl3</i> , <i>Ccl4</i> , <i>Ccl5</i> , <i>Ccl12</i> , <i>Ccl19</i> , <i>Ccl22</i> , <i>Cxcl3</i> , <i>Cxcl5</i> , <i>Cxcl9</i> , <i>Cxcl13</i>)	9 (<i>Ccl2</i> , <i>Ccl3</i> , <i>Ccl4</i> , <i>Ccl7</i> , <i>Ccl12</i> , <i>Ccl17</i> , <i>Ccl24</i> , <i>Cxcl3</i> , <i>Cxcl5</i> , <i>Cxcl13</i>)	7 (<i>Ccl3</i> , <i>Ccl4</i> , <i>Ccl5</i> , <i>Cxcl3</i> , <i>Cxcl5</i> , <i>Ccl12</i> , <i>Ccl17</i>)

10.2. TRIMELVax induce el reclutamiento secuencial de poblaciones celulares específicas de la inmunidad innata al sitio de administración.

Para evaluar el efecto temprano de TRIMELVax sobre poblaciones celulares de la inmunidad innata e identificar factores diferenciadores del mecanismo de acción de la vacuna con respecto a la vacuna GVax, ratones C57BL6 fueron tratados en la almohadilla plantar trasera con PBS, TRIMELVax y GVax y fueron eutanasiados a las 6, 12 y 24 horas luego del tratamiento (Figura 2A). Observamos que a las 6 horas posterior a la inyección se produce un engrosamiento macroscópico significativamente mayor de los cojinetes plantares de los grupos tratados con TRIMELVax y GVax comparados con el grupo control inyectado con PBS (Figura 2B), lo que revela una inducción de procesos inflamatorios locales. A las 12 horas, la induración dada por el tratamiento con GVax llega a su máximo y desciende a las 24 horas. En cambio, TRIMELVax incrementa la induración a las 12 horas, y lo sigue haciendo hasta las 24 horas. La inflamación en

el sitio de inyección a las 6 y 24 horas para los ratones tratados con TRIMELVax es significativamente mayor que PBS y GVAX (Figura 2B). Lo que nos sugiere un efecto único para TRIMELVax que se mantiene por más tiempo que con GVAX o PBS.

Se analizó mediante citometría de flujo multiparamétrica el infiltrado celular en el sitio de administración y observamos que el tratamiento con TRIMELVax induce un marcado aumento de neutrófilos y monocitos, comparado con los controles, desde las 6 horas posteriores a la inyección, y estos niveles se incrementan a las 12 y 24 horas siendo los principales responsables del engrosamiento de los cojinetes. Por otro lado, el tratamiento con GVAX induce un incremento de neutrófilos y monocitos, comparado con PBS, pero sólo a partir de las 12 horas y se mantiene a las 24 horas. Los macrófagos de tipo 1 (M1), descritos como inflamatorios, aumentan en respuesta al tratamiento con TRIMELVax a las 24 horas. Los macrófagos de tipo 2 (M2), que se han descrito como anti inflamatorios, se incrementan para el grupo TRIMELVax, sólo a las 6 horas y luego vuelven a niveles comparables al control. No observamos cambios en los niveles de los macrófagos de tipo 1 para el grupo tratado con GVAX, aunque si se observa un incremento de los macrófagos de tipo 2 a las 6 y 12 horas (Figura 2D).

Cuando analizamos las poblaciones de células dendríticas (Figura 3) observamos que las cDC1 se ven aumentadas significativamente desde las 12 horas en el grupo tratado con TRIMELVax comparado con PBS y que se mantiene hasta las 24 horas, a diferencia del grupo tratado con GVAX donde se observa un incremento significativo a las 12 horas pero que a las 24 horas disminuye a valores similares al PBS (Figura 3C). En el caso de las cDC2 no se observan diferencias significativas entre grupos a las 6 y a las 12 horas luego de los tratamientos, pero sí a las 24 horas donde se puede apreciar que son superiores para el grupo TRIMELVax comparado con PBS y GVAX (Figura 3B, C). El máximo reclutamiento de las mismas se presenta a las 12 horas y comienza a disminuir a las 24 horas (Figura 3C). Adicionalmente, observamos un aumento significativo de las moDCs y las LCs desde las 12 horas en respuesta a los tratamientos de TRIMELVax y GVAX con respecto a PBS y que se ve incrementado a las 24 horas.

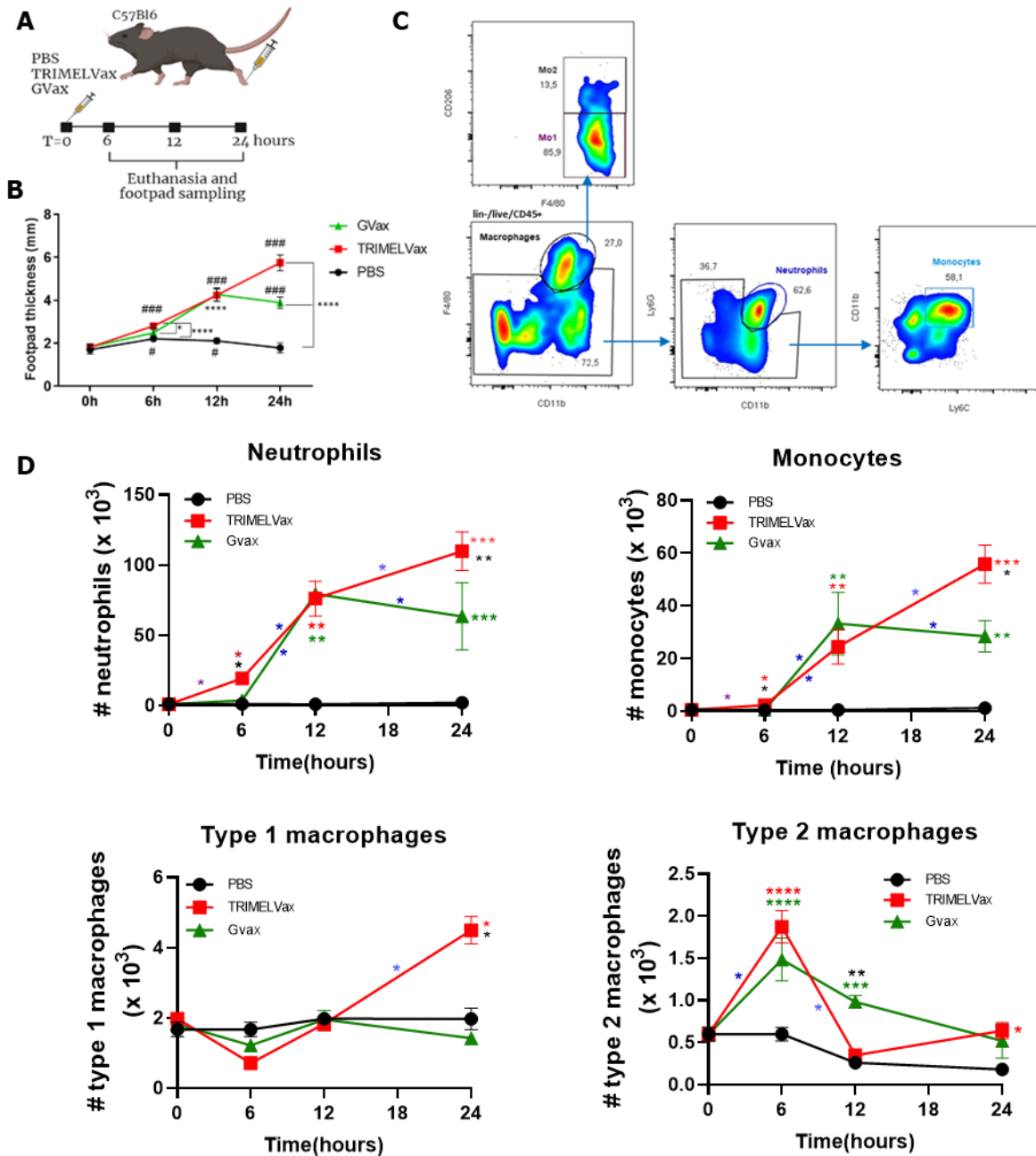


Figura 2: TRIMELVax induce un rápido y marcado reclutamiento de neutrófilos y monocitos; además de un incremento en los macrófagos M1 y una disminución de los macrófagos M2. **A**, representación esquemática del protocolo de tratamiento. **B**, cuantificación de la inflamación en el cojinete plantar de los ratones tratados. **C**, estrategia de análisis utilizada para la identificación de poblaciones de monocitos (Mo), macrófagos tipo 1 (M1) y tipo 2 (M2) y neutrófilos (Neu). **D**, cuantificación de los datos de citometría de flujo multiparamétrica (FACS) de los números absolutos de células en suspensiones celulares de las biopsias del cojinete plantar trasero. Los resultados muestran la media \pm SEM, de dos experimentos independientes (n=2-3), *p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001, ****p < 0.0001. En **D**, (*) diferencias entre PBS/TRIMELVax, (*) diferencias entre PBS/GVax, (*) diferencias entre

TRIMELVax/GVax, (*) diferencias 0/6 horas, (**) diferencias entre 6/ 12 o 24 horas, (***) diferencias 12/24 horas, ANOVA de 2 vías, post Test Tukey's (múltiples comparaciones).

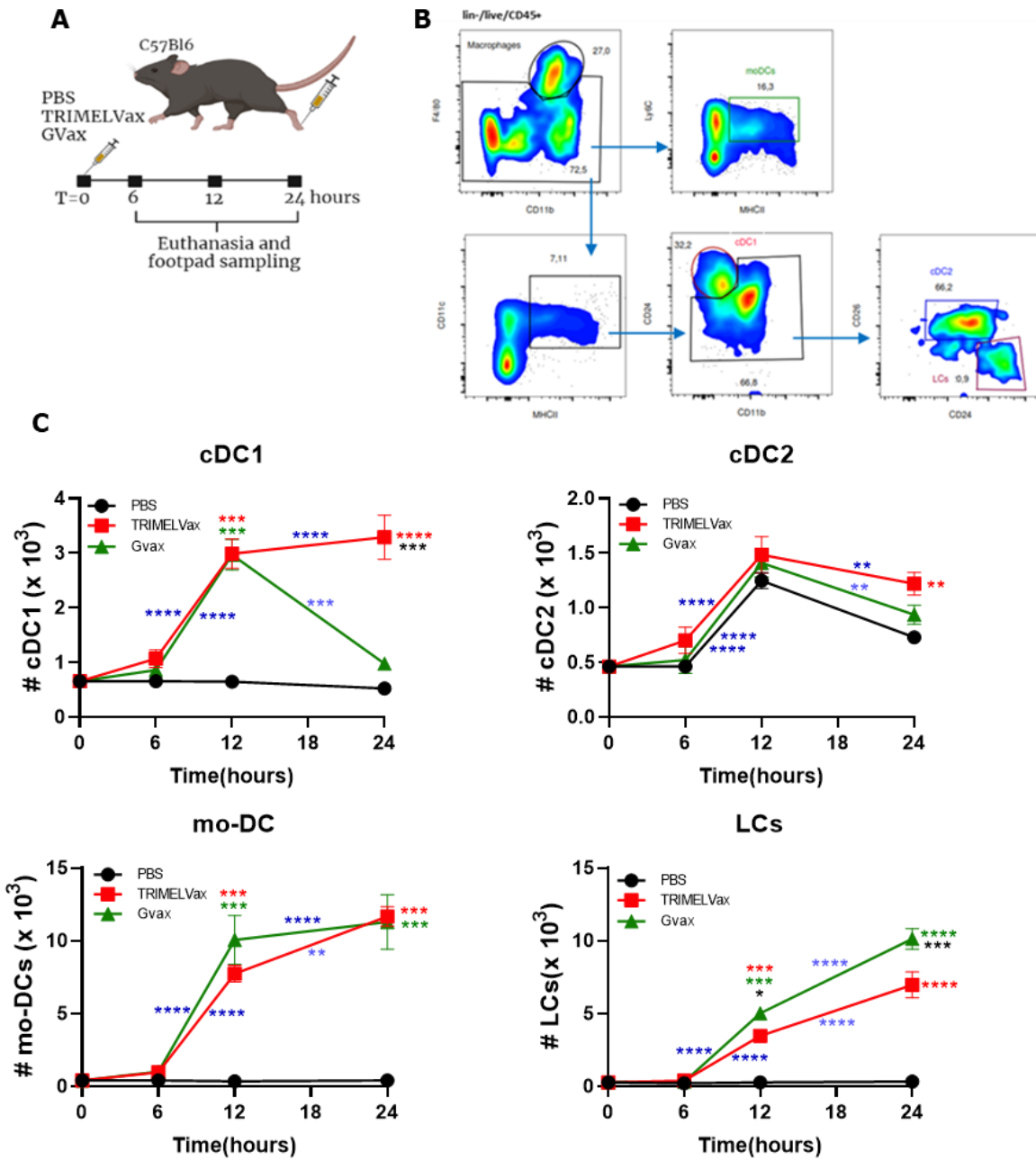


Figura 3: TRIMELVax induce el reclutamiento sostenido de cDC1, así como un aumento de poblaciones de cDC2, mo-DCs y LCs en el sitio de vacunación. **A**, representación esquemática del protocolo de tratamiento. **B**, estrategia de análisis utilizada para identificar subpoblaciones de cDC1, cDC2, moDCs y LCs. **C**, cuantificación de datos obtenidos de citometría de flujo multiparamétrica (FACS) de los números absolutos de células en suspensiones celulares de las biopsias de almohadilla plantar trasera. Los resultados muestran la media \pm SEM, de dos experimentos independientes (n=2-3), *p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001, ****p < 0.0001. En **D**, (*) diferencias entre PBS/TRIMELVax, (**) diferencias entre

PBS/GVax, (*) diferencias entre TRIMELVax/GVax, (*) diferencias 0/6 horas, (*) diferencias entre 6/ 12 o 24 horas, (*) diferencias 12/24 horas, ANOVA de 2 vías, post Test Tukey's (múltiples comparaciones).

10.3. La depleción transitoria de los neutrófilos disminuye el reclutamiento de DCs al linfonodo poplíteo (pLN) en ratones tratados.

Luego de evaluar el efecto de TRIMELVax sobre la generación de la respuesta inmune innata local, donde destaca el rápido reclutamiento de neutrófilos al sitio de vacunación y la generación de un marcado ambiente proinflamatorio; nos propusimos estudiar que poblaciones de DCs que migran desde la almohadilla plantar trasera hacia los pLN, que es el lugar natural de drenaje del tejido plantar, así como el efecto que tienen los neutrófilos en la migración de las DCs a los pLN.

Para esta fase del estudio empleamos el ensayo de migración desde la almohadilla plantar al pLN estandarizado por Vishnu Priya Bollampalli y cols^[104], donde se administra CFSE en la almohadilla plantar de ratones C57BL/6. El CFSE es comúnmente utilizado para la tinción de células *in vitro* y para la medición de proliferación celular; sin embargo, en este estudio es administrado para marcar directamente las células de la piel *in situ*. De esta manera se identifican las células que se movilizan desde la piel hacia el pLN en un periodo de 24 horas luego de la administración de los tratamientos, permitiendo estudiar la migración aguda durante tiempos definidos^[104].

Para la depleción transitoria de los neutrófilos, se implementó un modelo donde se administran 20 µg del anticuerpo anti Ly6G (1A8) de forma *i.p* en ratones C57Bl6, de esta manera los neutrófilos se mantienen depletados por un período de 96 horas (Figura Suplementaria 2B y D), la eficiencia de la depleción se controla mediante la medición de los neutrófilos en sangre periférica antes de la administración de TRIMELVax (Figura Suplementaria 2C).

Al analizar de forma general la presencia de DCs en el pLN, observamos que no hay diferencias significativas entre los grupos de estudio a las 12 y 24 horas, sin embargo, a las 48 horas se observa un incremento significativo para el grupo tratado con TRIMELVax comparado con PBS y con GVax (Figura 4C) y que disminuye significativamente cuando se depletan los neutrófilos. A las 72 horas encontramos que se incrementan los niveles de las DCs totales con respecto a las 48 horas y que los grupos TRIMELVax, GVax y TRIMELVax + anti Ly6G son significativamente superiores al grupo tratado con PBS. Así mismo se aprecia que el grupo GVax es significativamente superior a TRIMELVax y que en este tiempo no se observa disminución de las

DCs totales cuando se depletan los neutrófilos. Todos estos resultados sugieren que los neutrófilos están relacionados con el proceso de migración de las DCs a los linfonodos drenantes.

Posteriormente analizamos las subpoblaciones de DCs (cDC1, cDc2, LCs y moDCs) en el pLN y su comportamiento en el tiempo (Figura 4D y E). Interesantemente, observamos que desde las 12 horas se produce un incremento de las cDC1 en el pLN en respuesta al tratamiento con TRIMELVax, que disminuye a las 24 horas y que luego se incrementa significativamente a las 48 horas con respecto a los grupos tratados con PBS y GVax y se mantiene a las 72 horas. Asimismo, la depleción de los neutrófilos disminuye significativamente la infiltración de cDC1 demostrando que los neutrófilos tienen un efecto en la movilización de esta subpoblación a los linfonodos drenantes (Figura 4D y E). En el caso de los animales tratados con GVax no hay diferencias significativas con el grupo control de vehículo (PBS) hasta las 72 horas donde se obtiene su valor máximo.

En cuanto a las cDC2 encontramos que para los grupos tratados con TRIMELVax y GVax se produce un aumento gradual a partir de las 24 horas y que se incrementa significativamente desde las 48 horas con respecto al grupo PBS. Observamos que, para el grupo tratado con TRIMELVax, a las 48 horas las cDC2 son significativamente superior a los grupos PBS y GVax respectivamente. Así mismo encontramos que el valor máximo de esta población para ambas vacunas se encuentra a las 72 horas. Notablemente cuando se realiza la depleción de los neutrófilos se produce una menor movilización de esta población a las 48 horas posteriores al tratamiento con TRIMELVax, efecto que se pierde a las 72 horas pues no se observan diferencias entre el grupo TRIMELVax+ anti Ly6G vs TRIMELVax (Figura 4D y E).

Al evaluar las LCs observamos que ambas vacunas tienen un comportamiento similar, que se caracteriza por un incremento significativamente superior al grupo tratado con PBS desde las 48 horas que alcanza su máximo valor a las 72 horas. Además, no hay diferencias entre TRIMELVax y GVax con el grupo donde se realiza la depleción de los neutrófilos, lo cual demuestra que los neutrófilos no tienen un efecto sobre la migración de las LCs al pLN.

En el caso de las moDCs encontramos que, para TRIMELVax se incrementan significativamente a las 48 horas comparado con los grupos PBS y GVax y se mantienen a las 72 horas. Observamos además que cuando se depletan los neutrófilos, la migración disminuye a las 48 horas, y se compensa a las 72 horas. En el caso de GVax pudimos apreciar que solamente hay diferencias significativas con el grupo PBS a las 72 horas posteriores a la vacunación (Figura 4D y E)

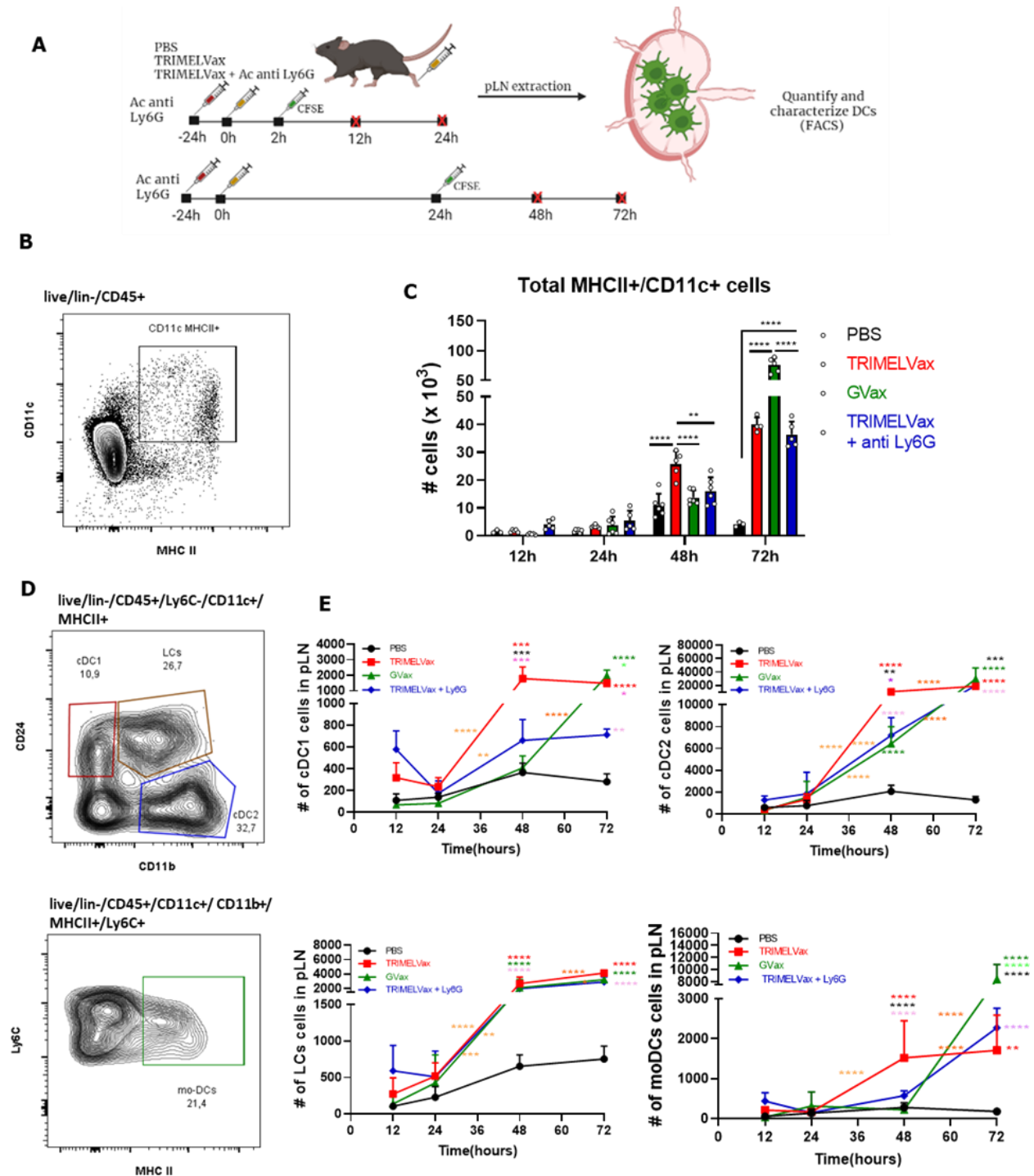


Figura 4: La depleción de los neutrófilos disminuye el reclutamiento temprano de las dendríticas totales, así como de las subpoblaciones de cDC1, cDc2 y moDCs al pLN. **A**, representación esquemática del protocolo de tratamiento. **B**, diagrama de puntos representativo de la selección para células CD11c+/MHC II+. **C**, cuantificación de las células CD11c+/MHC II+. **D**, diagrama de puntos representativo para la selección de cDC1, cDC2, moDCs y LCs. **E**, cuantificación de los datos de citometría de flujo multiparamétrica (FACS) de los números absolutos de las diferentes subpoblaciones de DCs. Los resultados muestran la media \pm SEM, de dos experimentos independientes ($n=2-3$), * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$,

*** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$, ANOVA de 2 vías, post Test Tukey's (múltiples comparaciones). En E, (*) diferencias entre PBS/TRIMELVax, (*) diferencias entre PBS/GVax, (*) diferencias entre TRIMELVax/GVax, (*) diferencias anti Ly6G/TRIMELVax, (*) diferencias 12/24 horas, (*) diferencias 24/48 horas, (*) diferencias 48/72 horas.

Luego analizamos las células positivas para CFSE que son aquellas que provienen directamente de la almohadilla plantar tratada y las negativas que pueden ser residentes del pLN o que provienen de otros tejidos. Como control en el estudio se midió la presencia de la marca a CFSE en el pLN contralateral y donde pudimos apreciar que se mantiene negativo para la tinción (Figura 5A, panel inferior). En el análisis global de las DCs presentes en el pLN observamos que las DCs presentes son mayoritariamente CFSE⁻ (Figura 5A y B). Para las células CFSE⁺ encontramos un aumento en el número de células a partir de las 48 horas para los grupos tratados con TRIMELVax y GVax con respecto a PBS y que se incrementa a las 72 horas posteriores al tratamiento. En el caso de las células CFSE⁻ encontramos que el grupo tratado con TRIMELVax es significativamente superior a los tratados con PBS y GVax respectivamente a las 48 horas y que continúan incrementándose a las 72 horas; aunque a este tiempo hay diferencias significativas entre TRIMELVax y GVax con PBS, pero no entre sí. Interesantemente observamos que cuando se depletan los neutrófilos disminuye significativamente el número de DCs a las 48 horas tanto para las células CFSE⁺ como para las CFSE⁻ (Figura 5B) y que estas diferencias desaparecen a las 72 horas.

Al analizar la distribución de la marca de CFSE en las subpoblaciones de DCs observamos que para todas las subpoblaciones estudiadas (cDC1, cDC2, LCs y moDCs) se mantiene una presencia mayoritaria de aquellas que son CFSE⁻ en el pLN (Figura 5C-F). En el caso de las cDC1 encontramos que la subpoblación cDC1 CFSE⁺ tiene una tendencia a migrar en olas que se caracteriza por un incremento significativamente superior a las 48 horas para el grupo TRIMELVax comparado con PBS y GVax, pero que disminuye a las 72 horas. En el caso de las cDC1 CFSE⁻ encontramos que se incrementan significativamente a las 48 horas con respecto a GVax y a PBS y que se mantiene a las 72 horas posteriores al tratamiento.

En el caso de GVax encontramos un comportamiento similar para ambos tipos de células (CFSE⁺ y CFSE⁻); un aumento significativo solamente a las 72 horas (Figura 5C). Cuando se depletan los neutrófilos podemos apreciar una disminución en la presencia de las cDC1 CFSE⁺ en el pLN a las 48 horas; que desaparece a las 72 horas; contrario a las cDC1 CFSE⁻ donde hay una disminución en la movilización de las mismas a las 48 horas con respecto a TRIMELVax y este efecto se mantiene aún a las 72 horas.

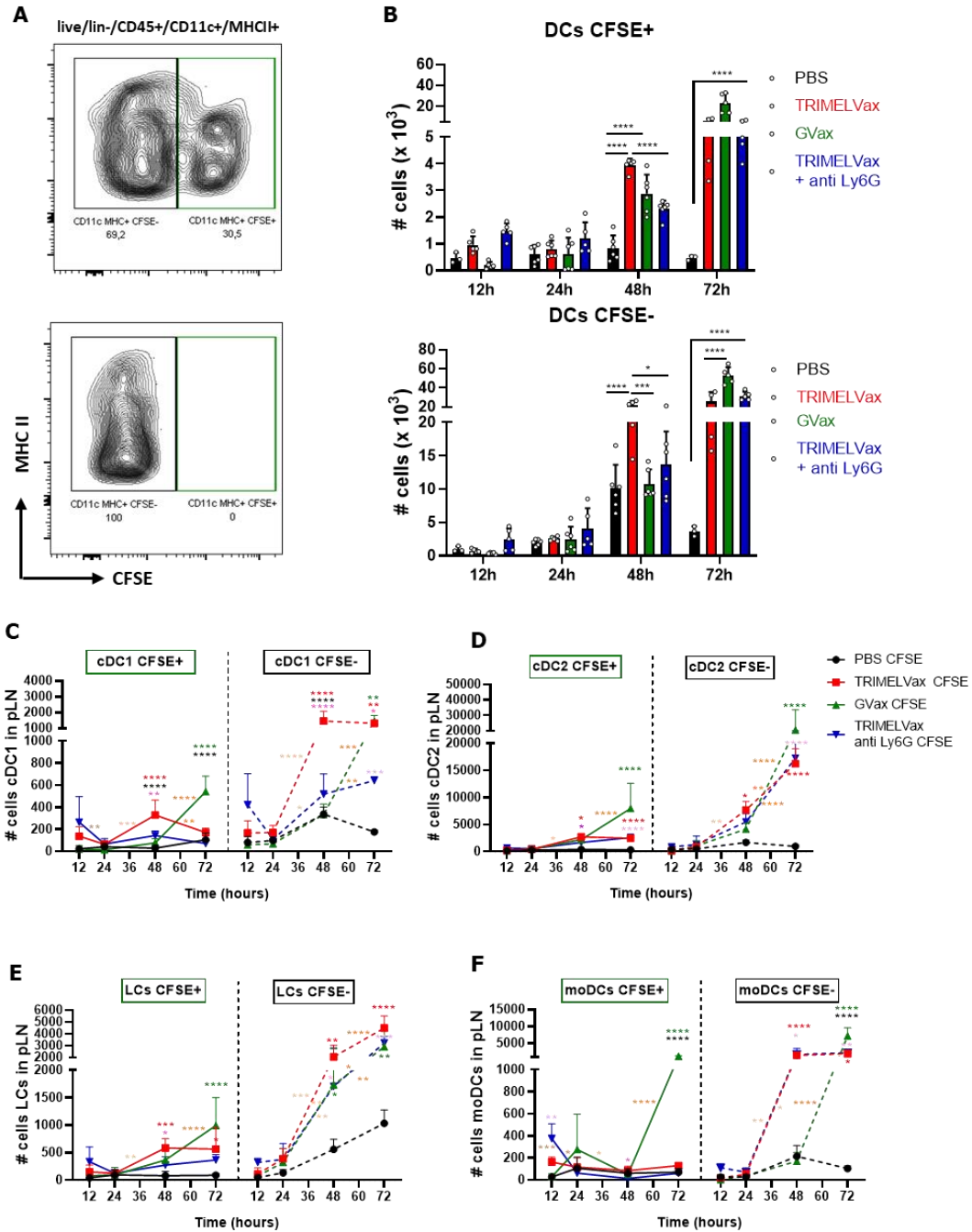


Figura 5: TRIMELVax induce un aumento en el número total de células dendríticas CFSE+ y CFSE- en el pLN, y este efecto se reduce cuando los neutrófilos son eliminados de forma transiente. A, diagrama de puntos representativo de la selección para DCs generales CFSE+ y CFSE-. **B,** cuantificación de los números absolutos de células CD11c+/MHC II+ CFSE+ y CD11c+/MHC II+ CFSE- en el pLN. **C-F,** cuantificación de subpoblaciones de DCs CFSE+ y CFSE-. Los resultados muestran la media \pm SEM, de dos experimentos independientes (n=2-3), *p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001, ****p < 0.0001, ANOVA de 2 vías, post Test Tukey's (múltiples comparaciones). En **C-F,** (*) diferencias entre PBS/TRIMELVax,

(*) diferencias entre PBS/GVAX, (*) diferencias entre TRIMELVax/GVAX, (*) diferencias anti Ly6G/TRIMELVax, (*) diferencias 12/24 horas, (*) diferencias 24/48 horas, (*) diferencias 48/72 horas.

En el caso de las cDC2 y las LCs (Figura 5D) observamos un comportamiento similar donde, a las 48 horas las LCs CFSE⁺ se incrementan significativamente para el grupo tratado con TRIMELVax con respecto a PBS y GVAX, y se mantienen a las 72 horas posteriores al tratamiento. Para el grupo GVAX vimos que estas poblaciones se incrementan significativamente con respecto a PBS solo a las 72 horas. En el caso de las LCs CFSE⁻ pudimos apreciar que para TRIMELVax hay un incremento significativo desde las 48 horas con respecto a PBS y que continúan incrementándose hasta su valor máximo a las 72 horas. Respecto a GVAX, se aprecia un aumento en las cDC2 CFSE⁻ con respecto a PBS, únicamente a las 72 horas, mientras que en las LCs CFSE⁻ se observa un incremento significativo desde las 48 horas y se mantiene hasta las 72 horas. Al depletar los neutrófilos encontramos que a las 48 horas hay una disminución en las poblaciones cDC2 y LCs CFSE⁺ que desaparece a las 72 horas mientras que en las subpoblaciones CFSE⁻, solo observamos diferencias significativas entre los grupos TRIMELVax y TRIMELVax+ anti Ly6G para las LCs a las 72 horas.

Las moDCs CFSE⁺ se mantienen constantes en el tiempo para el grupo tratado con TRIMELVax comparado con el grupo PBS en todos los tiempos de estudio; contrario al grupo tratado con GVAX donde a las 72 horas se incrementan significativamente con respecto a PBS y TRIMELVax (Figura 5D). Las moDCs CFSE⁻ para el grupo tratado con TRIMELVax se incrementan significativamente comparado con PBS y GVAX desde las 48 horas y se mantienen constantes a las 72 horas. En el caso de GVAX, vemos una respuesta más desfasada en el tiempo pues las moDCs CFSE⁻ se incrementan significativamente solamente a las 72 horas posteriores al tratamiento. Cuando se depletan los neutrófilos encontramos que no hay efecto sobre las moDCs CFE⁺, contrario a las moDCs CFSE⁻ donde se observa una disminución de las mismas a las 48 horas pero que se recuperan a las 72 horas.

10.4. La depleción transitoria de neutrófilos durante la vacunación disminuye la capacidad de TRIMELVax para controlar el crecimiento del volumen tumoral.

Como observamos que los neutrófilos modulan la migración de las DCs al pLN nos propusimos evaluar el efecto que tendría la depleción transitoria de esta población en el momento de vacunación con TRIMELVax en un modelo terapéutico. Observamos que TRIMELVax controla el crecimiento tumoral en ratones inmunocompetentes tal como lo reportado por Gleisner y cols^[100]. Interesantemente observamos que cuando los neutrófilos son depletados al momento de

la administración de TRIMELVax, la vacuna pierde la capacidad para controlar el crecimiento de los tumores de B16F10 a tal punto que no hay diferencias significativas entre PBS y el grupo TRIMELVax + anti Ly6G, demostrando que los neutrófilos inducidos tempranamente por TRIMELVax pueden tener un papel fundamental en el mecanismo de acción de TRIMELVax.

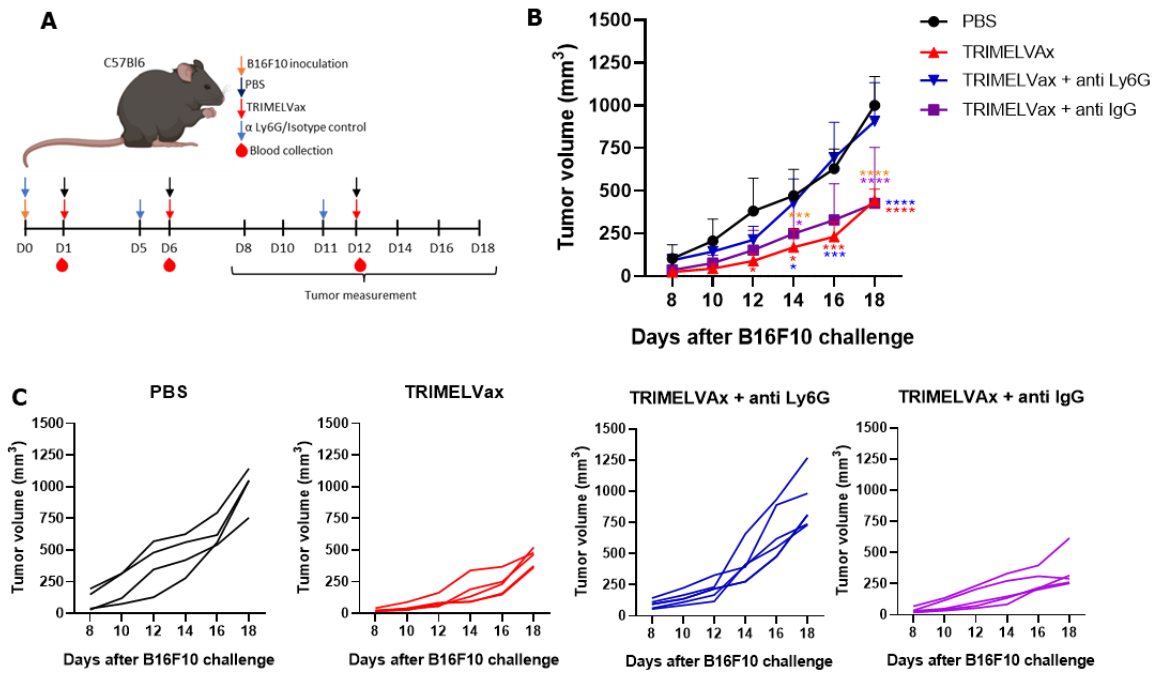


Figura 7: La ausencia de neutrófilos en el momento de la vacunación disminuye la capacidad de TRIMELVax para controlar el crecimiento tumoral. A, representación esquemática del modelo terapéutico usado. **B,** curvas del crecimiento tumoral de ratones desafiados con B16F10. Cada punto representa la media del volumen tumoral \pm SEM por grupo (n=5). **C,** curvas de crecimiento tumoral para ratones independientes en cada grupo de tratamiento en el tiempo. En **B,** (*) diferencias entre PBS/TRIMELVax, (*) diferencias entre TRIMELVax/TRIMELVax + anti Ly6G, (*) diferencias entre PBS/ TRIMELVax anti IgG +, (*) diferencias TRMELVax anti IgG/ TRIMELVax + anti Ly6G.

11. DISCUSIÓN

Una pregunta que ha perdurado en el campo de la inmunoterapia es si las inmunizaciones con antígenos tumorales pueden operar como una vacuna *in situ* capaz de desencadenar nuevas respuestas mediadas por LT CD8⁺ dirigidas contra los tumores^[82-84]. Para lograr este propósito, las vacunas requieren que las cDC1 maduras transporten antígenos asociados al tumor desde el sitio de vacunación hasta los LN drenantes para su presentación cruzada a los LT CD8⁺ o en su lugar, transferir el antígeno a otros subconjuntos de cDC1 en los ganglios linfáticos para la presentación cruzada y la inducción de respuestas mediadas por LT citotóxicos^[13,23,105]. La activación de las poblaciones de APCs como las cDC1 es mediado por un conjunto de señales proinflamatorias locales, tempranas y robustas que coordinan una respuesta antitumoral adaptativa específica contra antígenos asociados a tumor capaces de controlar el crecimiento tumoral mediante diferentes mecanismos de reconocimiento y destrucción^[64,106].

Trabajos previos realizados en el LIAT demuestran que TRIMELVax como vacuna contra MM induce la maduración de las DCs específicamente las cDC1 y la consecuente presentación cruzada de TAA a LT DC8⁺; así mismo se demostró que controlaba el crecimiento de los tumores tanto en modelos profilácticos como terapéuticos lo cual correlacionaba además con una mayor infiltración intratumoral de cDC1 y LT CD8⁺ PD-L1^{lo}^[100]. De ahí que resulta importante identificar el efecto temprano que tiene la TRIMELVax sobre la activación del SII en el sitio de inyección y que finalmente promovería la migración de las DCs, específicamente las cDC1 a los LN drenantes y que estarían condicionando la respuesta adaptativa observada previamente.

Los resultados de este estudio muestran que efectivamente TRIMELVax induce una respuesta local aguda más rápida y potente que la vacuna comparador GVax. Gvax es un ejemplo de vacuna basada en células tumorales transducidas con el gen GM-CSF que demostró efectos antitumorales débiles en modelos preclínicos de cáncer, incluido el melanoma B16F10^[95]. En efecto, GVax y otras vacunas células tumorales completas han mostrado tasas de respuesta objetiva bajas y mejoras muy limitadas en la supervivencia de los pacientes lo que sugiere un potencial inmunogénico subóptimo de estos enfoques en el caso del melanoma^[94,95,95]. No obstante, en nuestro modelo experimental GVax mostró una capacidad de control de crecimiento tumoral similar a TRIMELVax, pero dada su composición diferente es probable que los mecanismos involucrados en la respuesta sean diferentes.

Interesantemente, logramos demostrar que desde las 6 horas luego de la administración de TRIMELVax se produce la sobreexpresión en el sitio de inoculación de un conjunto de genes para

citoquinas, quimioquinas y factores de crecimiento con un perfil mayoritariamente proinflamatorio en comparación con GVax. Así mismo encontramos que también se encuentran sobreexpresados genes para citoquinas con un perfil antiinflamatorio; respuesta que puede estar condicionada en gran medida por la presencia de poblaciones de macrófagos residentes de tejidos ya sean de perfiles M1 como M2, así como por el reclutamiento de neutrófilos y monocitos al sitio de vacunación. De igual manera las células epiteliales y los queratinocitos, en respuesta a señales de daño o peligro, producen citoquinas y quimioquinas que son responsables de las primeras olas de monocitos y neutrófilos al sitio de vacunación ^[54,107].

En un análisis más profundo detectamos que TRIMELVax produce un perfil de respuesta particular pues hay un conjunto de 23 genes que se sobreexpresan exclusivamente en los animales tratados con TRIMELVax y que 18 de estos estaban sobreexpresados a las 6 horas; contrario a GVax donde no hay genes exclusivos a las 6 horas, ninguno entre 6 y 24 horas, lo que sugiere que la respuesta inmune innata inicial de TRIMELVax es distinta, más rápida y potente.

Un aspecto bien interesante es que entre los genes sobreexpresados exclusivamente en los grupos tratados con TRIMELVax se encuentran un conjunto de moléculas que regulan la activación y el reclutamiento de los neutrófilos a los focos inflamatorios. Encontramos sobreexpresados los genes para IL15 e IL17 α . La IL17 α que han sido reportados como inductores del reclutamiento/activación de los neutrófilos ^[108]. Así mismo la IL5 estimula la capacidad fagocítica de los neutrófilos y potencia la producción de IL17 ^[109], generando por lo tanto un ciclo de reclutamiento y activación de estas células. Igualmente encontramos la sobreexpresión de las quimioquinas Cxcl1, que es una potente reclutadora de neutrófilos ^[110], y por lo tanto estas señales pudieran favorecer el reclutamiento y consiguiente activación de neutrófilos en el sitio de inyección.

También observamos que se encuentran sobreexpresadas las quimioquinas Cxcl9, Cxcl10 y Cxcl11, las cuales comparten el receptor CXCR3 que se relaciona con quimiotaxis, diferenciación y activación de macrófagos, DCs, monocitos y neutrófilos ^[55]. De igual manera se ha demostrado que el eje Cxcl9/CXCR3 está involucrado en el reclutamiento de macrófagos y NK ^[62]. Por otra parte, se ha demostrado que el eje Cxcl13/CXCR3, CXCR5 está relacionado con el reclutamiento de LB y LT foliculares ayudadores (T_{FH}) a los sitios de inflamación formando estructuras linfoides ectópicas (ELS). Se ha descrito que los ELS son estructuras dinámicas donde las células se organizan conociéndose como órganos linfoides terciarios (TLOs). Pueden aparecer en el transcurso de varios procesos entre los que encontramos el cáncer y en respuesta a mediadores

inflamatorios como son las quimioquinas y citoquinas; y favorecen la activación del sistema inmune [63,64]. En este estudio no analizamos la presencia de poblaciones de NK, LB o LT en el sitio de inyección, pero sería interesante evaluar en estudios futuros la presencia de los mismos, así como la posible formación de ELS en respuesta al tratamiento con TRIMELVax, lo cual aportaría una gran ventaja en el estudio de posibles mecanismos de funcionamiento.

Otro hallazgo interesante de abordar, es que el tratamiento con TRIMELVax induce la sobreexpresión del gen para Ccl19, quimioquina producida por células dendríticas maduras y que se ha reportado ser la única quimioquina que activa la internalización del receptor CCR7, su desensibilización y la consecuente migración de las DCs a los linfonodos drenantes; además se reporta que esta quimioquina puede incrementar la capacidad fagocítica de las DCs [65]. Por lo tanto, su sobre expresión podría favorecer la captación TRIMELVax y la migración de las APC a los linfonodos drenantes.

Además, vimos que el gen para la quimioquina CxCl12 estaba sobreexpresado exclusivamente para TRIMELVax a las 6 horas. Esta quimioquina se ha reportado que es importante en la movilización de las LCs desde la epidermis hacia la dermis y del movimiento de las DDCs en la dermis [102,103], este aspecto sería fundamental en la dinámica de las DCs y LCs en la piel luego de la vacunación.

La inducción aguda de la respuesta inmune innata mediada por TRIMELVax debe depender de su composición. A diferencia de GVax, nuestra vacuna incluye el lisado TRIMEL de melanoma humano y el lisado de B16F10 que también es condicionado con heat-shock generando probablemente una presencia más amplia de DAMPs. Adicionalmente la vacuna TRIMELVax se inyecta en presencia del adyuvante CCH, cuyo mecanismo de acción involucra el reconocimiento de los polisacáridos presentes en su estructura por TLR4 y CLR (receptores de lectinas tipo C) como los MR (receptores de manosa), MGL (del inglés: macrophage galactose lectin) y DC-SIGN presentes en células de la inmunidad innata [111,112] y queratinocitos locales, lo que puede estar influyendo en sus propiedades proinflamatorias tempranas.

Para caracterizar de manera detallada el compartimento de células mieloides y APC, realizamos un análisis adicional mediante citometría de flujo a diferentes tiempos (6,12 y 24 horas) posteriores a la vacunación. Inicialmente observamos un rápido y marcado reclutamiento de neutrófilos para el grupo tratado con TRIMELVax a diferencia de GVax y que continúa incrementándose hasta las 24 horas. Esto puede ser atribuido al hecho de que cuando los queratinocitos, las células residentes de tejidos como los macrófagos o DCs residentes, reconocen a TRIMELVax, se

producen un conjunto de moléculas como TNF- α , IL-1B, IL-6, CxCL1 las cuales actúan como activadores del endotelio y quimioatrayentes de neutrófilos y monocitos y cuyos genes se encuentran elevados en la piel de los ratones tratados con TRIMELVax a las 6 horas post administración ^[54].

Adicionalmente, observamos un incremento en la infiltración de monocitos los cuales son células muy versátiles y que tienen la capacidad de diferenciarse posteriormente a moDCs, LCs y a diferentes subpoblaciones de macrófagos. Este incremento puede estar también condicionado por las particularidades de la vacuna TRIMELVax, la cual está compuesta por lisados de células tumorales sometidas a estrés térmico ricas en DAMPs que funcionan como señales atrayentes para las células del sistema inmune que patrullan los tejidos periféricos ^[45].

Sumado a esto, encontramos un incremento de macrófagos tipo 1 con un perfil proinflamatorio y una disminución de los macrófagos tipo 2 o antiinflamatorios en los animales tratados con TRIMELVAX comparado con PBS y con GVAX. Se ha demostrado que, una vez los monocitos son reclutados a los tejidos, pueden diferenciarse en macrófagos tipo M1 o M2, y que el GM-CSF y el Csf-1 desempeñan un papel fundamental en esta diferenciación. Además, el microambiente presente en el sitio de inyección promueve la polarización de los macrófagos hacia uno u otro perfil, de manera tal que un microambiente proinflamatorio favorecería el perfil M1, mientras que un perfil antiinflamatorio favorecería el fenotipo M2^[46]. Por lo tanto, el incremento de los macrófagos M1 en el grupo tratado con TRIMELVax puede estar asociado con la generación de un microambiente predominantemente inflamatorio evidenciado por la potenciación de genes con un perfil de citoquinas proinflamatorias en el sitio de inyección (TNF- α , IL-1 α , IL1 β , IL-6, IL-12 α) así como la regulación al alza de los genes para los factores de crecimiento Lif y Csf1 que a su vez actúan regulando la diferenciación de monocitos a macrófagos y la supervivencia de neutrófilos y macrófagos^[113]. Igualmente observamos que en el sitio de inyección se encontraba elevada le gen para la quimioquina para CxCL9 y se ha demostrado que el eje Cxcl9/CXCR3 está involucrado en el reclutamiento de macrófagos al sitio de vacunación^[55].

Nos planteamos entonces, que este rápido y diferencial reclutamiento de células del SII, especialmente neutrófilos, es fundamental para promover el reclutamiento de DCs al sitio de inyección, así como su posterior migración a los linfonodos drenantes. Esto porque se ha demostrado que una vez que los neutrófilos se encuentran en los focos inflamatorios, son capaces de modular el microambiente tisular mediante la producción de quimioquinas y citoquinas proinflamatorias que son claves para el reclutamiento, activación de las DCs en el sitio de

inyección y su posterior movilización a los LNs ^[67,69]. Además, se ha evidenciado que puede existir interacción célula-célula entre las DCs y los neutrófilos a mediante DC-SIGN (receptor Lectina Tipo C) o CD18 presente en las DCs, con las integrinas Mac-1 o ICAM-1 respectivamente presentes en los neutrófilos lo cual puede favorecer la activación y funcionalidad de las mismas^[68].

Al analizar las poblaciones de DCs en el sitio de inyección observamos que interesantemente las cDC1 en los animales tratados con TRIMELVax se incrementan tempranamente y se mantienen elevadas durante más tiempo que en los tratamientos controles. Este incremento sostenido de las cDC1 para el grupo tratado con TRIMELVax puede estar asociado con dos factores principales. El primero de estos está relacionado con los DAMPs que aporta la vacuna y que como mencionamos previamente actúan como señales de encuéntrame/cómeme y los efectos del adyuvante CCH. El segundo puede estar asociado con las citoquinas proinflamatorias y quimioquinas producidas principalmente por los neutrófilos y monocitos que fueron reclutados desde las 6 horas al sitio de inyección los que generan un ciclo de activación con la consecuente producción de quimioquinas como CCL19, CXCL10, CXCL11 y CXCL9 que favorecen el reclutamiento de las DCs al sitio de vacunación y su posterior migración a los pLN respectivamente^[55].

Igualmente observamos que a las 24 horas del tratamiento con GVax los niveles de cDC1 disminuyen a valores semejantes a PBS, no siendo así en el grupo tratado con TRIMELVax que se mantiene alto; lo cual puede estar asociado con la movilización prolongada de estas células al pLN. Así mismo que las cDC1 se mantengan incrementadas a las 24 horas luego de la administración de TRIMELVax pudiera estar asociado con una migración tardía al pLN, o a que el reclutamiento de las cDC1 al sitio de inyección sea constante, lo que generaría un equilibrio entre el reclutamiento y la migración al pLN.

Al analizar las cDC2 observamos que su máximo se encuentra a las 12 horas luego de los tratamientos incluidos el PBS y que solo a las 24 horas hay diferencias entre grupos, particularmente entre TRIMELVax con PBS y GVax. Este comportamiento podría estar relacionado con la existencia de dos poblaciones de cDC2 que comparten características fenotípicas semejantes, pero con funciones diferentes: cDC2B (T-bet⁻) que se caracteriza por mayor producción de TNF- α e IL-6 y por lo tanto favorece respuestas pro inflamatorias y que justificaría su incremento en los grupos tratados con las vacunas. La segunda población son las cDC2A (T-bet⁺) relacionadas con respuestas anti inflamatorias, reparación de tejidos y además tienen disminuida la capacidad para polarizar LT vírgenes ^[47-49] y por lo tanto justificaría que para

el grupo tratado con PBS los niveles se encuentren elevados a las 12 horas. En este estudio no se analizó la diferenciación entre las subpoblaciones, pero podríamos hipotetizar que la respuesta de cDC2 observada hasta las 12 horas puede estar dada mayoritariamente por el perfil cDC2A que responderían al daño mecánico causado por la inyección, y que la respuesta a las 24 horas corresponde al perfil cDC2B.

De igual manera detectamos un incremento de las moDCs y las LCs desde las 12 horas para los grupos tratados con TRIMELVax y GVAX comparado con PBS. Se ha reportado que una vez los monocitos clásicos Ly6C^{hi} son reclutados a la dermis, principalmente por la vía de CCR2 y en presencia de estímulos proinflamatorios pueden diferenciarse a moDCs [50,51] y a LCs de vida corta que además pueden migrar a los linfonodos drenantes y activar LT [1,2]. Por otra parte, este incremento de las LCs en el tiempo para los grupos de TRIMELVax y GVAX puede estar dado a que la migración de estas células a los linfonodos drenantes ocurre en dos fases. Primero, las LCs viajan desde la epidermis hasta la dermis, una vez ahí expresan el receptor CCR7 lo que les permite su migración a los linfonodos drenantes [52-54]. Este paso adicional puede ser la razón de la migración tardía de las LCs a los linfonodos comparado con las DCs dermales.

El inicio de la activación del SIA en los ganglios linfáticos es un proceso que comprende un conjunto de eventos y mecanismos de interacción celular. Un hito crucial en este proceso es el movimiento de los componentes antigénicos desde el sitio de la infección hasta los ganglios linfáticos que drenan la zona afectada y las células dendríticas desempeñan un papel fundamental en la captura y transporte de estos antígenos desde las superficies del cuerpo, como la piel [105].

La respuesta inflamatoria aguda inducida por TRIMELVax, caracterizada por un incremento rápido de neutrófilos (40 veces superior al PBS y a GVAX), el reclutamiento sostenido de cDC1 y la presencia de un amplio perfil de citoquinas y quimioquinas proinflamatorias nos conduce a pensar que puede existir un vínculo especial entre los neutrófilos y las cDC1, esto porque como mencionamos anteriormente evidencias recientes demuestran que mediante varios mecanismos, los neutrófilos pueden modular el reclutamiento hacia los sitios inflamatorios, la activación y migración de las DCs hacia los linfonodos drenantes [73,74]. De ahí que nos enfocáramos en estudiar las distintas poblaciones de DCs que migran desde el sitio de inyección hacia los LN drenantes y el papel que tendrían los neutrófilos en este mecanismo.

El análisis cinético de los subtipos de DCs totales en el pLN nos permitió corroborar que el tiempo es fundamental en el mecanismo de acción de TRIMELVax y que es específico para cada población. Observamos que hay un marcado incremento en el pLN de las poblaciones cDC1, cDC2

y moDCs para el grupo tratado con TRIMELVax con respecto a PBS y GVax, especialmente durante las primeras 48 horas postvacunación. Esto, especulamos, puede ser consecuencia de la rápida respuesta proinflamatoria mediada por los neutrófilos en el sitio de inyección y que favorecería la rápida movilización de las DCs al pLN.

Luego analizamos la fracción de las DCs que provienen directamente desde del sitio de inyección (DCs-CFSE⁺) y observamos un comportamiento particular para el caso de las cDC1. Para el grupo tratado con TRIMELVax, a las 48 horas solamente las cDC1 son significativamente superiores al grupo GVax, lo cual nos conduce a pensar que efectivamente el microambiente proinflamatorio agudo generado por nuestra vacuna favorece una migración específica de las cDC1 desde el sitio de inoculación al pLN. Además observamos que las cDC1-CFSE⁺ en nuestra vacuna tienen una tendencia a migrar en forma de olas a diferencia de las cDC2, moDCs o LCs provenientes del sitio de inoculación, mientras que para GVax el comportamiento responde a incremento paulatino. Esta migración secuencial revestiría gran importancia pues permitiría que las cDC1 presenten los antígenos tumorales de forma consecutiva a diferentes poblaciones de LT en los linfonodos drenantes, los cuales a su vez pueden tener funciones especializadas en la eliminación de los tumores, permitiendo una activación selectiva de los LT más adecuados para combatir los tumores. Además, aseguraría una adecuada coordinación temporal de los eventos inmunológicos conduciendo finalmente a respuestas inmunitarias coordinadas y específicas^[114,115].

Con la sospecha de que pudiese existir una relación entre los neutrófilos locales de la respuesta temprana a TRIMELVax y las cDC1 nos propusimos evaluar si efectivamente la depleción transitoria de los mismos afectaría la migración de las APCs, específicamente las cDC1 al pLN.

Validando nuestra hipótesis descubrimos que los neutrófilos tienen un efecto relevante sobre el número total de las cDC1, cDC2 y moDCs que llegan al pLN pues observamos que cuando son depletados el número de DCs se ve disminuido. Especialmente, encontramos un efecto marcado en las cDC1 ya que su número se mantiene disminuido incluso a las 72 horas, a diferencia de las cDC2 y las moDCs que se recuperan prontamente. Esto nos conduce a pensar que hay determinadas señales aportadas específicamente por los neutrófilos en el sitio de inyección que son indispensables para la movilización de las cDC1 a los linfonodos drenantes lo que sería interesante dilucidar en estudios posteriores. Por otra parte, postulamos que la recuperación de las cDC2 y las moDCs a las 72 horas puede estar asociado con un efecto compensatorio por parte de los monocitos y los M1 que se encuentran el sitio inflamatorio en respuesta a TRIMELVax, que

proporcionan las señales proinflamatorias necesarias para la activación y migración de las mismas al pLN.

Otro aspecto relevante que es importante resaltar es que la administración de TRIMELVax en un modelo reduccionista y de forma local mantiene la capacidad de inducir un efecto sistémico más allá del sitio de inyección y del linfonodo drenante principal (pLN). Esto, ya que al analizar las poblaciones de DCs CFSE⁻ en pLN encontramos que predominaban por sobre las DCs CFSE⁺. Consideramos que este hallazgo puede estar relacionado a una respuesta sistémica que afectaría células inmunitarias circulantes y en otros órganos y tejidos, no limitadas al sitio de la inyección, lo que ayudaría a controlar el crecimiento tumoral en diferentes partes del organismo.

Curiosamente observamos que a las 48 horas, las cDC1-CFSE⁻, son las únicas DCs que se incrementan significativamente con respecto a GVAX y que la depleción de los neutrófilos también tiene un efecto importante sobre la movilización de las mismas. Esto demuestra que los neutrófilos pueden estar teniendo un efecto no solo sobre las cDC1 que vienen desde el sitio de inyección, sino que también pueden estar involucrados en mecanismos sistémicos más complejos que esperamos dilucidar en el futuro.

Dado que está demostrado que TRIMELVax controla eficientemente el crecimiento de los tumores^[100], que se ha demostrado que las cDC1 son indispensables para generar una respuesta inmune efectiva frente al melanoma en nuestro y otros modelos^[23,44,45,100,105] y que las actuales evidencias muestran que la depleción de los neutrófilos afecta la migración de las cDC1 a los LN drenantes, consideramos evaluar el efecto de la depleción transitoria de los neutrófilos durante la vacunación sobre la capacidad de TRIMELVax de controlar el crecimiento tumoral. Basándonos en el modelo terapéutico murino de B16F10 previamente utilizado^[100], se depletaron los neutrófilos 24 horas antes de cada administración de TRIMELVax mediante la inyección *i.p* de 20µg/dosis del anticuerpo anti-ly6G.

Tal como lo esperábamos, se observó que al depletar los neutrófilos de forma transitoria los efectos mediados por TRIMELVax desaparecen y los tumores crecen a niveles semejantes al control no inmunizado, indicando que estas células pueden tener un rol fundamental en el mecanismo de acción de TRIMELVax, el que podría estar directamente relacionados con la modulación de la migración específica de cDC1 a los LNs. Para descartar un posible rol directo de los neutrófilos en el control del crecimiento tumoral, en futuros experimentos se aplicará el mismo esquema de inmunización y depleción en un modelo profiláctico y se desafiará con el tumor animales

previamente inmunizados, lo que permitirá concluir que la depleción de neutrófilos afecta el estímulo de la inmunidad adaptiva.

Las evidencias en este trabajo apoyan la hipótesis de que la efectividad de TRIMELVax se sostiene en la inducción de una respuesta local aguda rápida y potente, lo cual garantizaría una respuesta adaptativa más específica capaz de controlar el crecimiento de los tumores. Además, identificamos a los neutrófilos como actores potenciales que modulan de forma multifuncional la inducción de una respuesta antitumoral efectiva mediada por TRIMELVax. Postulamos que uno de los mecanismos por los cuales TRIMELVax desencadena su respuesta inmune antitumoral está relacionado directamente con el reclutamiento temprano y diferencial de los neutrófilos al sitio de inyección en respuesta a señales proinflamatorias liberadas por células inmunes residentes y epiteliales, así como a los DAMPs aportados por la vacuna. Estos neutrófilos, al interactuar con otras células del sistema inmune, contribuyen a generar un microambiente altamente inflamatorio y propicio para la activación de diferentes poblaciones de la inmunidad innata, particularmente las DCs en las cuales pueden influir sobre su maduración y migración a los dLN.

Estimamos, que además de su impacto local, la adquisición por parte de los neutrófilos de un perfil de APCs y su movilización hacia los dLN podría tener implicaciones significativas en la amplificación y regulación de la respuesta inmunitaria adaptativa, lo que potencialmente se traduce en una respuesta antitumoral más efectiva, lo que se debería estudiar a continuación.

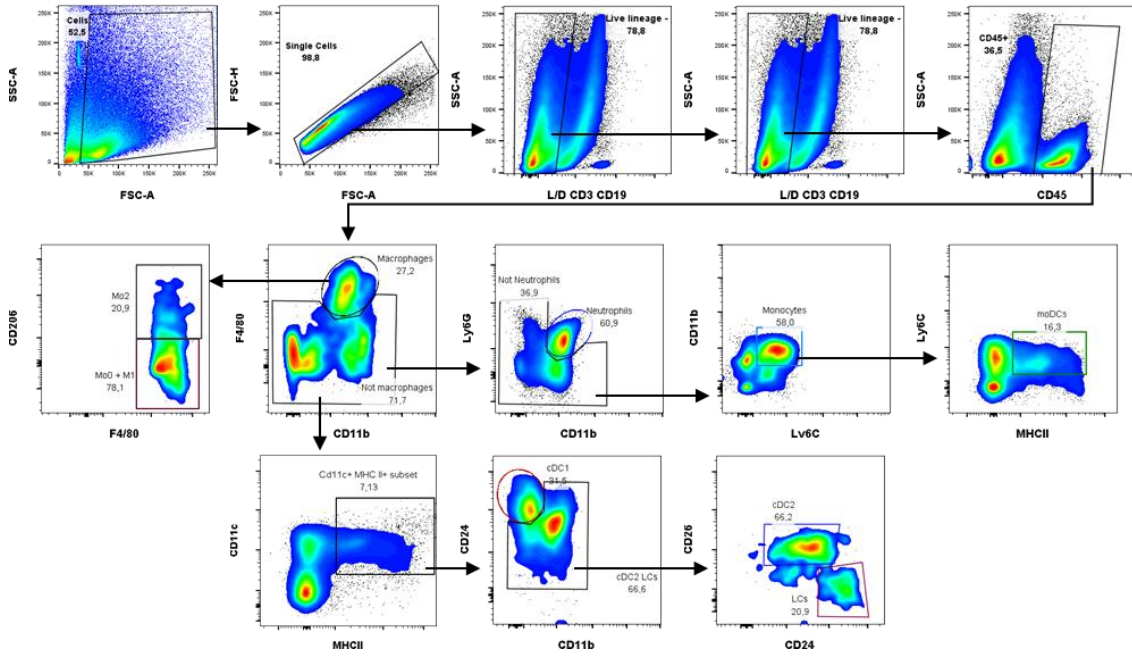
De igual manera consideramos que este estudio nos deja varias interrogantes que se deben abordar en el futuro cercano, como por ejemplo investigar el posible efecto que tiene la depleción transitoria de los neutrófilos sobre el crecimiento tumoral y la composición del TME en estos ratones. Por otra parte, se deben estudiar los mecanismos mediante los cuales los neutrófilos se estarían comunicando con las DCs específicamente con las cDC1; así como la presencia de neutrófilos con perfiles de APCs tanto en la piel como en los pLNs. Así mismo, sería interesante evaluar si los neutrófilos en sangre a tiempos diversos pueden ser utilizados como marcadores tempranos de la eficacia de la terapia.

12. CONCLUSIONES

La vacuna TRIMELVax induce una respuesta innata aguda particular, más temprana y potente que otras vacunas antitumorales (GVAx). Luego de la identificación de un perfil de expresión génica caracterizado por la presencia temprana de citoquinas proinflamatorias y quimioquinas en el sitio de inyección, los neutrófilos emergen como mediadores tempranos específicos que condicionan el reclutamiento y migración a los linfonodos drenantes de poblaciones de cDC1 las cuales se ha demostrado son cruciales para la generación de una eficiente respuesta adaptativa antitumoral. Así mismo la depleción transitoria de los neutrófilos anula el efecto antitumoral inducido por TRIMELVax, lo que sugiere que estas poblaciones celulares tienen un rol importante en el mecanismo de acción de la vacuna. Finalmente, teniendo en consideración estos hallazgos postulamos que los neutrófilos pueden tener un valor potencial como biomarcadores celulares tempranos para evaluar la eficacia de la terapia.

13. FIGURAS SUPLENTARIAS

A. Estrategia de análisis para poblaciones de la inmunidad innata en la almohadilla plantar trasera



B. Estrategia de análisis de poblaciones de DCs en el pLN.

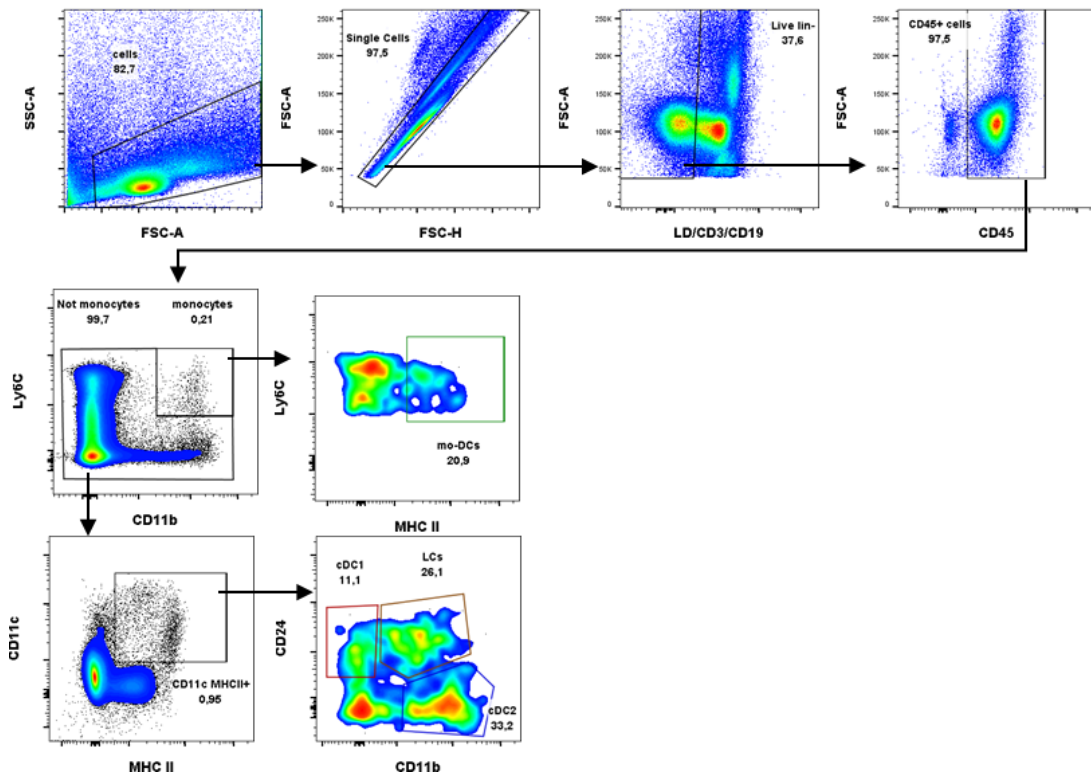


Figura Suplementaria 1. Estrategias de análisis utilizadas en el documento. A. Análisis de poblaciones de la inmunidad innata en la piel de almohadilla plantar trasera de ratones tratados, utilizado en las figuras 2 y 3. **B.** Análisis de poblaciones de DCs en el pLN, usadas en figuras 4, 5 y 6.

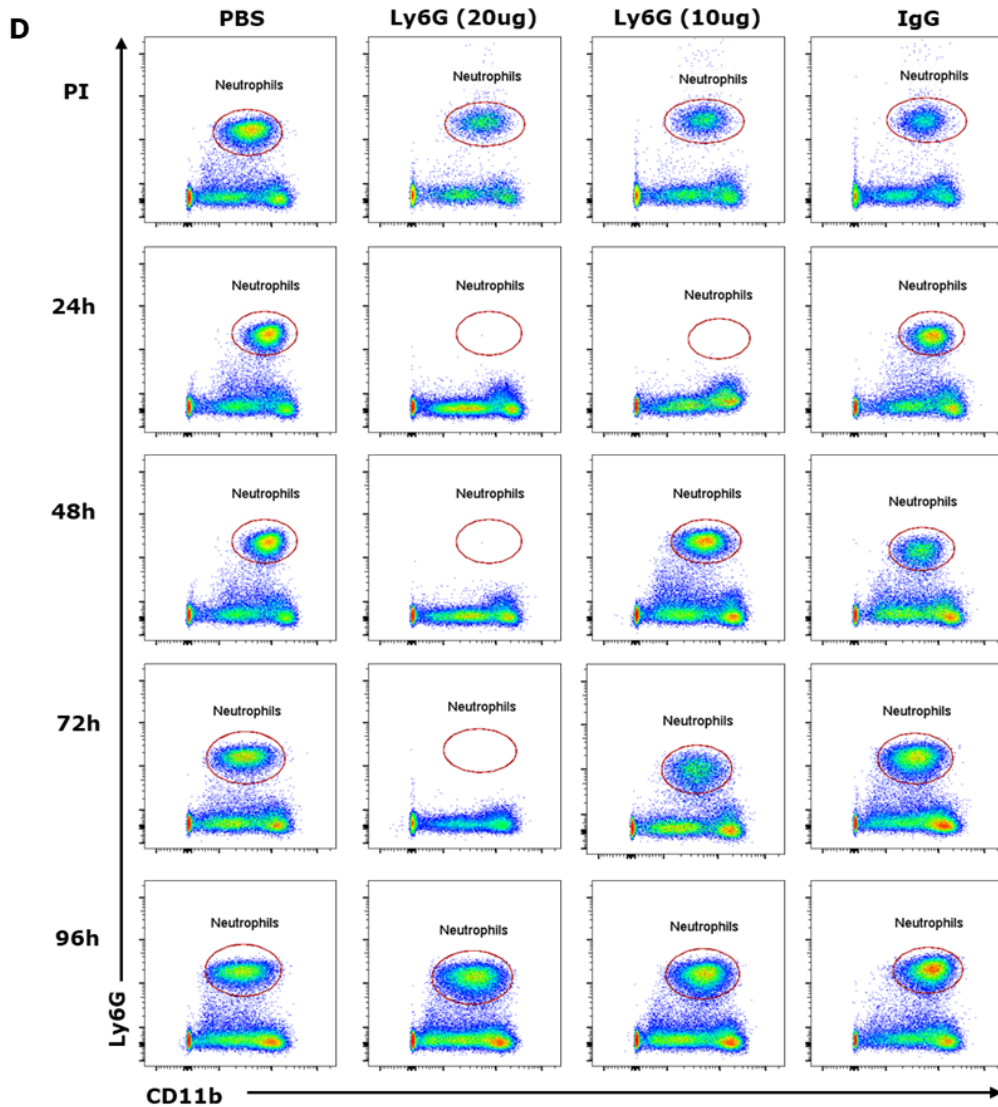
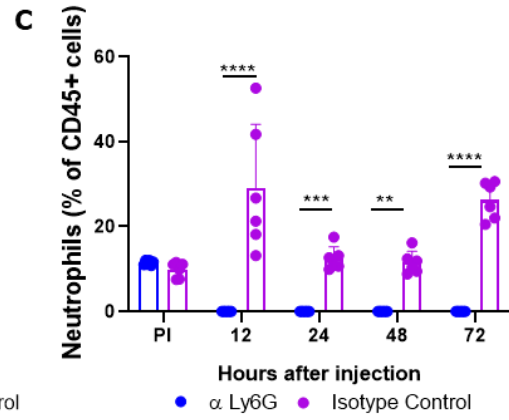
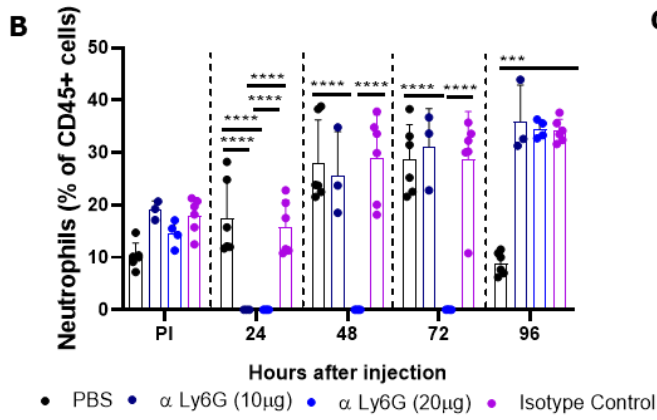
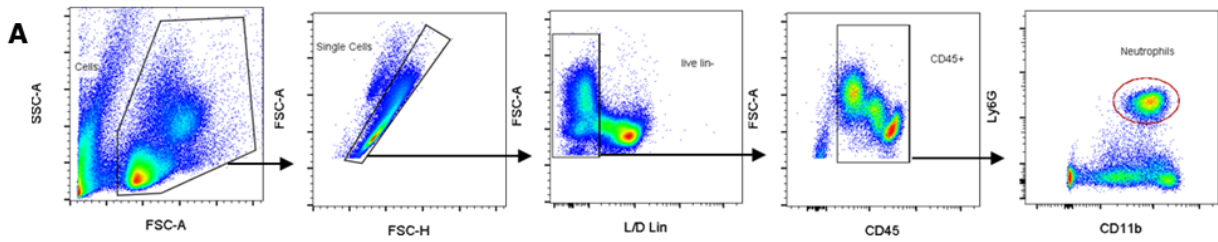


Figura Suplementaria 2: Control de depleción de neutrófilos en sangre. A. Estrategia de análisis de neutrófilos en sangre periférica. **B.** Frecuencia de neutrófilos de población CD45+ en diferentes tiempos. **C.** Frecuencia de neutrófilos de población CD45+ en experimento de migración con CFSE. **D.** Gráficos de puntos representativos de neutrófilos en sangre a diferentes tiempos. En B-C se grafica la media \pm SEM de dos experimentos independientes, n=3-6, ***p<0.001, ****p<0.0001, ANOVA de 2 vías, post Test Tukey's (múltiples comparaciones).

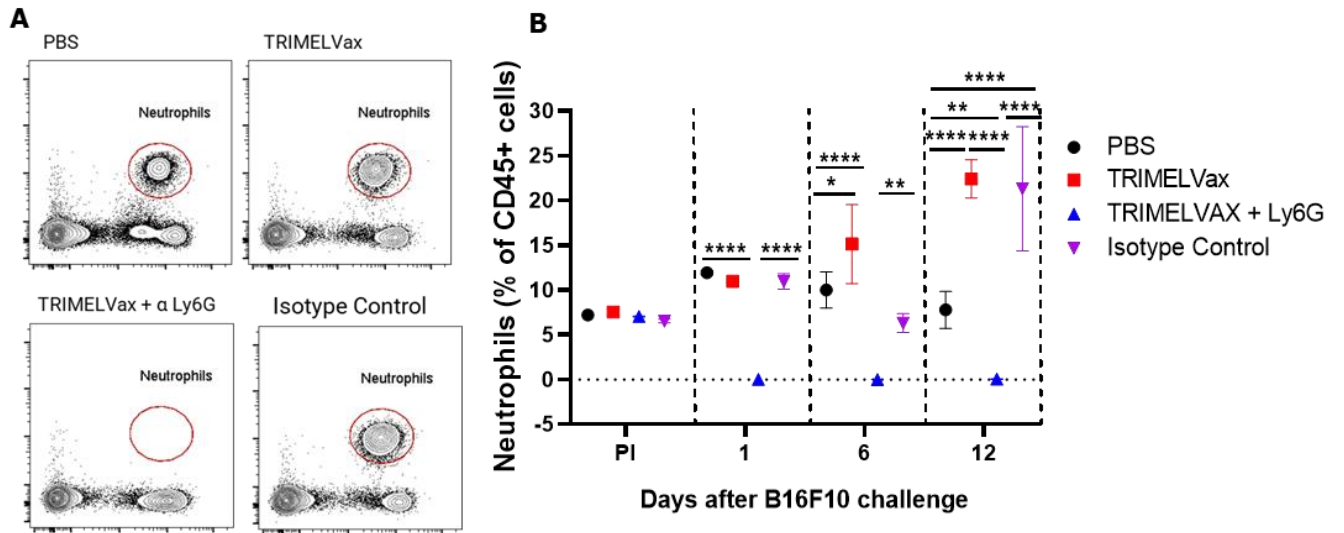


Figura Suplementaria 3. Evaluación de la frecuencia de neutrófilos en sangre de ratones en modelo de evaluación de crecimiento tumoral. A. Gráficos de puntos representativos de neutrófilos en sangre. **B.** Frecuencia de neutrófilos de población CD45+ en modelo de crecimiento tumoral. En **B** se grafica la media \pm SEM de un experimento, $n=5$, $***p<0.001$, $****p<0.0001$, ANOVA de 2 vías, post Test Tukey's (múltiples comparaciones).

14. BIBLIOGRAFÍA

1. Zhu S, Sun C, Zhang L, Du X, Tan X, Peng S. Incidence Trends and Survival Prediction of Malignant Skin Cancer: A SEER-Based Study. *Int J Gen Med* 2022;Volume 15:2945-56.
2. Franklin C, Livingstone E, Roesch A, Schilling B, Schadendorf D. Immunotherapy in melanoma: Recent advances and future directions. *Eur J Surg Oncol EJSO* 2017;43(3):604-11.
3. Rathore M, Girard C, Ohanna M, Tichet M, Ben Jouira R, Garcia E, et al. Cancer cell-derived long pentraxin 3 (PTX3) promotes melanoma migration through a toll-like receptor 4 (TLR4)/NF- κ B signaling pathway. *Oncogene* 2019;38(30):5873-89.
4. Drexler K, Drexler H, Geissler EK, Berneburg M, Haferkamp S, Apfelbacher C. Incidence and Mortality of Malignant Melanoma in Relation to Dermatologist Density in Bavaria. *Adv Ther* 2021;38(11):5548-56.
5. Leonardi G, Falzone L, Salemi R, Zanghì A, Spandidos D, Mccubrey J, et al. Cutaneous melanoma: From pathogenesis to therapy (Review). *Int J Oncol* [Internet] 2018 [citado 2022 abr 4];Available from: <http://www.spandidos-publications.com/10.3892/ijo.2018.4287>
6. Switzer B, Piperno-Neumann S, Lyon J, Buchbinder E, Puzanov I. Evolving Management of Stage IV Melanoma. *Am Soc Clin Oncol Educ Book* 2023;(43):e397478.
7. Chapman PB, Einhorn LH, Meyers ML, Saxman S, Destro AN, Panageas KS, et al. Phase III Multicenter Randomized Trial of the Dartmouth Regimen Versus Dacarbazine in Patients With Metastatic Melanoma. *J Clin Oncol* 1999;17(9):2745-2745.
8. Siena ÁDD, Praça JR, Araújo LF, de Barros II, Peronni K, Molfetta G, et al. Whole transcriptome analysis reveals correlation of long noncoding RNA ZEB1-AS1 with invasive profile in melanoma. *Sci Rep* [Internet] 2019 [citado 2019 ago 24];9(1). Available from: <http://www.nature.com/articles/s41598-019-47363-6>
9. Domingues B, Lopes J, Soares P, Populo H. Melanoma treatment in review. *ImmunoTargets Ther* 2018;Volume 7:35-49.
10. Zhao Y, Adjei AA. The clinical development of MEK inhibitors. *Nat Rev Clin Oncol* 2014;11:385.
11. Ascierto PA, Kirkwood JM, Grob JJ, Simeone E, Grimaldi AM, Maio M, et al. The role of BRAF V600 mutation in melanoma. *J Transl Med* [Internet] 2012 [citado 2019 ago 24];10(1). Available from: <https://translational-medicine.biomedcentral.com/articles/10.1186/1479-5876-10-85>
12. Rodríguez R, Parra A, González S, Molgó M, Droppelmann N, Acevedo F, et al. Entendiendo las terapias actuales en melanoma metastásico. *Rev Médica Chile* 2016;144(11):1448-58.
13. Embgenbroich M, Burgdorf S. Current Concepts of Antigen Cross-Presentation. *Front Immunol* [Internet] 2018 [citado 2019 abr 4];9. Available from: <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fimmu.2018.01643/full>
14. Murphy TL, Murphy KM. Dendritic cells in cancer immunology. *Cell Mol Immunol* 2022;19(1):3-13.
15. Cruz FM, Colbert JD, Merino E, Kriegsman BA, Rock KL. The Biology and Underlying Mechanisms of Cross-Presentation of Exogenous Antigens on MHC-I Molecules. *Annu Rev Immunol* 2017;35(1):149-76.
16. Böttcher JP, Reis e Sousa C. The Role of Type 1 Conventional Dendritic Cells in Cancer Immunity. *Trends Cancer* 2018;4(11):784-92.

17. Binnewies M, Mujal AM, Pollack JL, Combes AJ, Hardison EA, Barry KC, et al. Unleashing Type-2 Dendritic Cells to Drive Protective Antitumor CD4+ T Cell Immunity. *Cell* 2019;177(3):556-571.e16.
18. Schlitzer A, McGovern N, Ginhoux F. Dendritic cells and monocyte-derived cells: Two complementary and integrated functional systems. *Semin Cell Dev Biol* 2015;41:9-22.
19. Janela B, Patel AA, Lau MC, Goh CC, Msallam R, Kong WT, et al. A Subset of Type I Conventional Dendritic Cells Controls Cutaneous Bacterial Infections through VEGF α -Mediated Recruitment of Neutrophils. *Immunity* 2019;50(4):1069-1083.e8.
20. Matejuk A. Skin Immunity. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)* 2018;66(1):45-54.
21. Collin M, Milne P. Langerhans cell origin and regulation: *Curr Opin Hematol* 2016;23(1):28-35.
22. Kabashima K, Honda T, Ginhoux F, Egawa G. The immunological anatomy of the skin. *Nat Rev Immunol* 2019;19(1):19-30.
23. Noubade R, Majri-Morrison S, Tarbell KV. Beyond cDC1: Emerging Roles of DC Crosstalk in Cancer Immunity. *Front Immunol* 2019;10:1014.
24. Prokopi A, Tripp CH, Tummers B, Hornsteiner F, Spoeck S, Crawford JC, et al. Skin dendritic cells in melanoma are key for successful checkpoint blockade therapy. *J Immunother Cancer* 2021;9(1):e000832.
25. Zanna MY, Yasmin AR, Omar AR, Arshad SS, Mariatulqabtbah AR, Nur-Fazila SH, et al. Review of Dendritic Cells, Their Role in Clinical Immunology, and Distribution in Various Animal Species. *Int J Mol Sci* 2021;22(15):8044.
26. Delves PJ, Martin SJ, Burton DR, Roitt IM. *Roitt's Essential Immunology* [Internet]. 13th edition. West Sussex: John Wiley and Sons; 2017. Available from: <https://lccn.loc.gov/2016022210>
27. Leung BP, Culshaw S, Gracie JA, Hunter D, Canetti CA, Campbell C, et al. A Role for IL-18 in Neutrophil Activation. *J Immunol* 2001;167(5):2879-86.
28. Patel AA, Ginhoux F, Yona S. Monocytes, macrophages, dendritic cells and neutrophils: an update on lifespan kinetics in health and disease. *Immunology* 2021;163(3):250-61.
29. Olingy CE, Dinh HQ, Hedrick CC. Monocyte heterogeneity and functions in cancer. *J Leukoc Biol* 2019;106(2):309-22.
30. Quail DF, Amulic B, Aziz M, Barnes BJ, Eruslanov E, Fridlender ZG, et al. Neutrophil phenotypes and functions in cancer: A consensus statement. *J Exp Med* 2022;219(6):e20220011.
31. Chan L, Wood GA, Wootton SK, Bridle BW, Karimi K. Neutrophils in Dendritic Cell-Based Cancer Vaccination: The Potential Roles of Neutrophil Extracellular Trap Formation. *Int J Mol Sci* 2023;24(2):896.
32. Papayannopoulos V. Neutrophil extracellular traps in immunity and disease. *Nat Rev Immunol* 2018;18(2):134-47.
33. Castell SD, Harman MF, Morón G, Maletto BA, Pistoiresi-Palencia MC. Neutrophils Which Migrate to Lymph Nodes Modulate CD4+ T Cell Response by a PD-L1 Dependent Mechanism. *Front Immunol* 2019;10:105.
34. Vono M, Lin A, Norrby-Teglund A, Koup RA, Liang F, Loré K. Neutrophils acquire the capacity for antigen presentation to memory CD4+ T cells in vitro and ex vivo. *Blood* 2017;129(14):1991-2001.

35. Matlung HL, Babes L, Zhao XW, Van Houdt M, Treffers LW, Van Rees DJ, et al. Neutrophils Kill Antibody-Opsonized Cancer Cells by Trogoptosis. *Cell Rep* 2018;23(13):3946-3959.e6.
36. Otsuka M, Egawa G, Kabashima K. Uncovering the Mysteries of Langerhans Cells, Inflammatory Dendritic Epidermal Cells, and Monocyte-Derived Langerhans Cell-Like Cells in the Epidermis. *Front Immunol* 2018;9:1768.
37. Deckers J, Hammad H, Hoste E. Langerhans Cells: Sensing the Environment in Health and Disease. *Front Immunol* 2018;9:93.
38. Merad M, Sathe P, Helft J, Miller J, Mortha A. The Dendritic Cell Lineage: Ontogeny and Function of Dendritic Cells and Their Subsets in the Steady State and the Inflamed Setting. *Annu Rev Immunol* 2013;31(1):563-604.
39. Alfaro C, Oñate C, Rodríguez A, Pérez-Gracia JL, Fernández de Sanmamed M, Melero I. Células dendríticas especializadas en presentación de antígenos exógenos a linfocitos T citotóxicos. *An Sist Sanit Navar* 2013;36(3):519-37.
40. De Winde CM, Munday C, Acton SE. Molecular mechanisms of dendritic cell migration in immunity and cancer. *Med Microbiol Immunol (Berl)* 2020;209(4):515-29.
41. Broz ML, Binnewies M, Boldajipour B, Nelson AE, Pollack JL, Erle DJ, et al. Dissecting the Tumor Myeloid Compartment Reveals Rare Activating Antigen-Presenting Cells Critical for T Cell Immunity. *Cancer Cell* 2014;26(5):638-52.
42. Salmon H, Idoyaga J, Rahman A, Leboeuf M, Remark R, Jordan S, et al. Expansion and Activation of CD103 + Dendritic Cell Progenitors at the Tumor Site Enhances Tumor Responses to Therapeutic PD-L1 and BRAF Inhibition. *Immunity* 2016;44(4):924-38.
43. Sanchez-Paulete AR, Cueto FJ, Martinez-Lopez M, Labiano S, Morales-Kastresana A, Rodriguez-Ruiz ME, et al. Cancer Immunotherapy with Immunomodulatory Anti-CD137 and Anti-PD-1 Monoclonal Antibodies Requires BATF3-Dependent Dendritic Cells. *Cancer Discov* 2016;6(1):71-9.
44. Spranger S, Dai D, Horton B, Gajewski TF. Tumor-Residing Batf3 Dendritic Cells Are Required for Effector T Cell Trafficking and Adoptive T Cell Therapy. *Cancer Cell* 2017;31(5):711-723.e4.
45. Ferris ST, Durai V, Wu R, Theisen DJ, Ward JP, Bern MD, et al. cDC1 prime and are licensed by CD4+ T cells to induce anti-tumour immunity. *Nature* 2020;584(7822):624-9.
46. Anderson DA, Murphy KM, Briseño CG. Development, Diversity, and Function of Dendritic Cells in Mouse and Human. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2018;10(11):a028613.
47. Macri C, Pang ES, Patton T, O'Keeffe M. Dendritic cell subsets. *Semin Cell Dev Biol* 2018;84:11-21.
48. Mitchell D, Chintala S, Dey M. Plasmacytoid dendritic cell in immunity and cancer. *J Neuroimmunol* 2018;322:63-73.
49. Zhou B, Lawrence T, Liang Y. The Role of Plasmacytoid Dendritic Cells in Cancers. *Front Immunol* 2021;12:749190.
50. Pourahmad R, Rezaei N. Role of Monocyte-Derived Dendritic Cells (MoDCs) in Tumor Immune Response [Internet]. En: Rezaei N, editor. *Handbook of Cancer and Immunology*. Cham: Springer International Publishing; 2023 [citado 2023 may 16]. página 1-18. Available from: https://link.springer.com/10.1007/978-3-030-80962-1_20-1
51. Shin KS, Jeon I, Kim BS, Kim IK, Park YJ, Koh CH, et al. Monocyte-Derived Dendritic Cells Dictate the Memory Differentiation of CD8+ T Cells During Acute Infection. *Front Immunol* 2019;10:1887.

52. Larson SR, Atif SM, Gibbings SL, Thomas SM, Prabagar MG, Danhorn T, et al. Ly6C+ monocyte efferocytosis and cross-presentation of cell-associated antigens. *Cell Death Differ* 2016;23(6):997-1003.
53. Sharma MD, Rodriguez PC, Koehn BH, Baban B, Cui Y, Guo G, et al. Activation of p53 in Immature Myeloid Precursor Cells Controls Differentiation into Ly6c+CD103+ Monocytic Antigen-Presenting Cells in Tumors. *Immunity* 2018;48(1):91-106.e6.
54. Prame Kumar K, Nicholls AJ, Wong CHY. Partners in crime: neutrophils and monocytes/macrophages in inflammation and disease. *Cell Tissue Res* 2018;371(3):551-65.
55. Tokunaga R, Zhang W, Naseem M, Puccini A, Berger MD, Soni S, et al. CXCL9, CXCL10, CXCL11/CXCR3 axis for immune activation – A target for novel cancer therapy. *Cancer Treat Rev* 2018;63:40-7.
56. Gschwandtner M, Derler R, Midwood KS. More Than Just Attractive: How CCL2 Influences Myeloid Cell Behavior Beyond Chemotaxis. *Front Immunol* 2019;10:2759.
57. Martín-Fontecha A, Lanzavecchia A, Sallusto F. Dendritic Cell Migration to Peripheral Lymph Nodes [Internet]. En: Lombardi G, Rizzo-Vasquez Y, editores. *Dendritic Cells*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2009 [citado 2019 feb 5]. página 31-49. Available from: http://link.springer.com/10.1007/978-3-540-71029-5_2
58. Bollampalli VP. DENDRITIC CELL MIGRATION TO DRAINING LYMPH NODE AND T-CELL PRIMING TO BACILLE CALMETTE- GUÉRIN. :52.
59. Feng M, Zhou S, Yu Y, Su Q, Li X, Lin W. Regulation of the Migration of Distinct Dendritic Cell Subsets. *Front Cell Dev Biol* 2021;9:635221.
60. Le I, Dhandayuthapani S, Chacon J, Eiring AM, Gadad SS. Harnessing the Immune System with Cancer Vaccines: From Prevention to Therapeutics. *Vaccines* 2022;10(5):816.
61. Fearon DT, Locksley RM. The Instructive Role of Innate Immunity in the Acquired Immune Response. *Sci New Ser* 1996;272(5258):50-4.
62. Drutman SB, Trombetta ES. Dendritic Cells Continue To Capture and Present Antigens after Maturation In Vivo. *J Immunol* 2010;185(4):2140-6.
63. Gamrekelashvili J, Greten TF, Korangy F. Immunogenicity of necrotic cell death. *Cell Mol Life Sci* 2015;72(2):273-83.
64. Fucikova J, Kepp O, Kasikova L, Petroni G, Yamazaki T, Liu P, et al. Detection of immunogenic cell death and its relevance for cancer therapy. *Cell Death Dis* 2020;11(11):1013.
65. Lühr JJ, Alex N, Amon L, Kräter M, Kubánková M, Sezgin E, et al. Maturation of Monocyte-Derived DCs Leads to Increased Cellular Stiffness, Higher Membrane Fluidity, and Changed Lipid Composition. *Front Immunol* 2020;11:590121.
66. Blander JM. Regulation of the Cell Biology of Antigen Cross-Presentation. *Annu Rev Immunol* 2018;36(1):717-53.
67. Garg AD, Martin S, Golab J, Agostinis P. Danger signalling during cancer cell death: origins, plasticity and regulation. *Cell Death Differ* 2014;21(1):26-38.
68. Wojtukiewicz MZ, Rek MM, Karpowicz K, Górska M, Polityńska B, Wojtukiewicz AM, et al. Inhibitors of immune checkpoints—PD-1, PD-L1, CTLA-4—new opportunities for cancer patients and a new challenge for internists and general practitioners. *Cancer Metastasis Rev* 2021;40(3):949-82.

69. Liu M, Guo F. Recent updates on cancer immunotherapy. *Precis Clin Med* 2018;1(2):65-74.
70. Masucci MT, Minopoli M, Carriero MV. Tumor Associated Neutrophils. Their Role in Tumorigenesis, Metastasis, Prognosis and Therapy. *Front Oncol* 2019;9:1146.
71. Di Pilato M, Esteban M. Neutrophil and vaccine. *Cell Cycle* 2015;14(11):1615-6.
72. Kalafati L, Mitroulis I, Verginis P, Chavakis T, Kourtzelis I. Neutrophils as Orchestrators in Tumor Development and Metastasis Formation. *Front Oncol* 2020;10:581457.
73. Li Y, Wang W, Yang F, Xu Y, Feng C, Zhao Y. The regulatory roles of neutrophils in adaptive immunity. *Cell Commun Signal* 2019;17(1):147.
74. Schuster S, Hurrell B, Tacchini-Cottier F. Crosstalk between neutrophils and dendritic cells: a context-dependent process. *J Leukoc Biol* 2013;94(4):671-5.
75. van Gisbergen KPJM, Sanchez-Hernandez M, Geijtenbeek TBH, van Kooyk Y. Neutrophils mediate immune modulation of dendritic cells through glycosylation-dependent interactions between Mac-1 and DC-SIGN. *J Exp Med* 2005;201(8):1281-92.
76. Singhal S, Bhojnagarwala PS, O'Brien S, Moon EK, Garfall AL, Rao AS, et al. Origin and Role of a Subset of Tumor-Associated Neutrophils with Antigen-Presenting Cell Features in Early-Stage Human Lung Cancer. *Cancer Cell* 2016;30(1):120-35.
77. Mysore V, Cullere X, Mears J, Rosetti F, Okubo K, Liew PX, et al. FcγR engagement reprograms neutrophils into antigen cross-presenting cells that elicit acquired anti-tumor immunity. *Nat Commun* 2021;12(1):4791.
78. Yu Z, Si L. Immunotherapy of patients with metastatic melanoma. *Chin Clin Oncol* 2017;6(2):20-20.
79. Banday AH, Jeelani S, Hruby VJ. Cancer vaccine adjuvants – recent clinical progress and future perspectives. *Immunopharmacol Immunotoxicol* 2015;37(1):1-11.
80. Jenkins FG, Johnson JE, Collichio F, Ollila DW. Talimogene laherparepvec and novel injectable oncolytic viruses in the management of metastatic melanoma. *J Transl Genet Genomics [Internet]* 2021 [citado 2022 oct 20]; Available from: <https://jtgjournal.com/article/view/4245>
81. Mishra H, Mishra PK, Ekielski A, Jaggi M, Iqbal Z, Talegaonkar S. Melanoma treatment: from conventional to nanotechnology. *J Cancer Res Clin Oncol* 2018;144(12):2283-302.
82. Hollingsworth RE, Jansen K. Turning the corner on therapeutic cancer vaccines. *Npj Vaccines* 2019;4(1):7.
83. Shae D, Baljon JJ, Wehbe M, Becker KW, Sheehy TL, Wilson JT. At the bench: Engineering the next generation of cancer vaccines. *J Leukoc Biol* 2020;108(4):1435-53.
84. Saxena M, van der Burg SH, Melief CJM, Bhardwaj N. Therapeutic cancer vaccines. *Nat Rev Cancer* 2021;21(6):360-78.
85. Kim CG, Sang YB, Lee JH, Chon HJ. Combining Cancer Vaccines with Immunotherapy: Establishing a New Immunological Approach. *Int J Mol Sci* 2021;22(15):8035.
86. Harari A, Graciotti M, Bassani-Sternberg M, Kandalaf LE. Antitumour dendritic cell vaccination in a priming and boosting approach. *Nat Rev Drug Discov* 2020;19(9):635-52.

87. Avigan D, Rosenblatt J, Kufe D. Dendritic/Tumor Fusion Cells as Cancer Vaccines. *Semin Oncol* 2012;39(3):287-95.
88. Zhou J, Wang G, Chen Y, Wang H, Hua Y, Cai Z. Immunogenic cell death in cancer therapy: Present and emerging inducers. *J Cell Mol Med* 2019;23(8):4854-65.
89. Hernandez C, Huebener P, Schwabe RF. Damage-associated molecular patterns in cancer: a double-edged sword. *Oncogene* 2016;35(46):5931-41.
90. López MN, Pereda C, Segal G, Muñoz L, Aguilera R, González FE, et al. Prolonged Survival of Dendritic Cell–Vaccinated Melanoma Patients Correlates With Tumor-Specific Delayed Type IV Hypersensitivity Response and Reduction of Tumor Growth Factor β -Expressing T Cells. *J Clin Oncol* 2009;27(6):945-52.
91. Rojas-Sepúlveda D, Tittarelli A, Gleisner MA, Ávalos I, Pereda C, Gallegos I, et al. Tumor lysate-based vaccines: on the road to immunotherapy for gallbladder cancer. *Cancer Immunol Immunother* 2018;67(12):1897-910.
92. Dranoff G, Jaffee E, Lazenby A, Golumbek P, Levitsky H, Brose K, et al. Vaccination with irradiated tumor cells engineered to secrete murine granulocyte-macrophage colony-stimulating factor stimulates potent, specific, and long-lasting anti-tumor immunity. *Proc Natl Acad Sci* 1993;90(8):3539-43.
93. Eager R, Nemunaitis J. GM-CSF Gene-Transduced Tumor Vaccines. *Mol Ther* 2005;12(1):18-27.
94. Kusumoto M, Umeda S, Ikubo A, Aoki Y, Tawfik O, Oben R, et al. Phase 1 clinical trial of irradiated autologous melanoma cells adenovirally transduced with human GM-CSF gene. *Cancer Immunol Immunother* 2001;50(7):373-81.
95. Soiffer R, Hodi FS, Haluska F, Jung K, Gillessen S, Singer S, et al. Vaccination With Irradiated, Autologous Melanoma Cells Engineered to Secrete Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor by Adenoviral-Mediated Gene Transfer Augments Antitumor Immunity in Patients With Metastatic Melanoma. *J Clin Oncol* 2003;21(17):3343-50.
96. Nemunaitis J, Jahan T, Ross H, Stermann D, Richards D, Fox B, et al. Phase 1/2 trial of autologous tumor mixed with an allogeneic GVAXs vaccine in advanced-stage non-small-cell lung cancer. *Cancer Gene Ther* :8.
97. Pizarro-Bauerle J, Maldonado I, Sosoniuk-Roche E, Vallejos G, López MN, Salazar-Onfray F, et al. Molluscan Hemocyanins Activate the Classical Pathway of the Human Complement System through Natural Antibodies. *Front Immunol* [Internet] 2017 [citado 2019 sep 11];8. Available from: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fimmu.2017.00188/full>
98. Zhong TY, Arancibia S, Born R, Tampe R, Villar J, Del Campo M, et al. Hemocyanins Stimulate Innate Immunity by Inducing Different Temporal Patterns of Proinflammatory Cytokine Expression in Macrophages. *J Immunol* 2016;196(11):4650-62.
99. Aguilera R, Saffie C, Tittarelli A, Gonzalez FE, Ramirez M, Reyes D, et al. Heat-Shock Induction of Tumor-Derived Danger Signals Mediates Rapid Monocyte Differentiation into Clinically Effective Dendritic Cells. *Clin Cancer Res* 2011;17(8):2474-83.
100. Gleisner MA, Pereda C, Tittarelli A, Navarrete M, Fuentes C, Ávalos I, et al. A heat-shocked melanoma cell lysate vaccine enhances tumor infiltration by prototypic effector T cells inhibiting tumor growth. *J Immunother Cancer* 2020;8(2):e000999.
101. Thommen DS, Koelzer VH, Herzig P, Roller A, Trefny M, Dimeloe S, et al. A transcriptionally and functionally distinct PD-1+ CD8+ T cell pool with predictive potential in non-small-cell lung cancer treated with PD-1 blockade. *Nat Med* 2018;24(7):994-1004.

102. Kabashima K, Shiraishi N, Sugita K, Mori T, Onoue A, Kobayashi M, et al. CXCL12-CXCR4 Engagement Is Required for Migration of Cutaneous Dendritic Cells. *Am J Pathol* 2007;171(4):1249-57.
103. Ouwehand K, Santegoets SJAM, Bruynzeel DP, Scheper RJ, de Gruijl TD, Gibbs S. CXCL12 is essential for migration of activated Langerhans cells from epidermis to dermis. *Eur J Immunol* 2008;38(11):3050-9.
104. Bollampalli VP, Nylén S, Rothfuchs AG. A CFSE-based Assay to Study the Migration of Murine Skin Dendritic Cells into Draining Lymph Nodes During Infection with Mycobacterium bovis Bacille Calmette-Guérin. *J Vis Exp [Internet]* 2016 [citado 2019 feb 5];(116). Available from: <http://www.jove.com/video/54620/a-cfse-based-assay-to-study-migration-murine-skin-dendritic-cells>
105. Balan S, Radford KJ, Bhardwaj N. Unexplored horizons of cDC1 in immunity and tolerance [Internet]. En: *Advances in Immunology*. Elsevier; 2020 [citado 2022 may 17]. página 49-91. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0065277620300390>
106. Pérez-Baños A, Gleisner MA, Flores I, Pereda C, Navarrete M, Araya JP, et al. Whole tumour cell-based vaccines: tuning the instruments to orchestrate an optimal antitumour immune response. *Br J Cancer [Internet]* 2023 [citado 2023 jul 18]; Available from: <https://www.nature.com/articles/s41416-023-02327-6>
107. Piipponen M, Li D, Landén NX. The Immune Functions of Keratinocytes in Skin Wound Healing. *Int J Mol Sci* 2020;21(22):8790.
108. Flannigan KL, Ngo VL, Geem D, Harusato A, Hirota SA, Parkos CA, et al. IL-17A-mediated neutrophil recruitment limits expansion of segmented filamentous bacteria. *Mucosal Immunol* 2017;10(3):673-84.
109. Jabri B, Abadie V. IL-15 functions as a danger signal to regulate tissue-resident T cells and tissue destruction. *Nat Rev Immunol* 2015;15(12):771-83.
110. Sawant KV, Poluri KM, Dutta AK, Sepuru KM, Troshkina A, Garofalo RP, et al. Chemokine CXCL1 mediated neutrophil recruitment: Role of glycosaminoglycan interactions. *Sci Rep* 2016;6(1):33123.
111. Jiménez JM, Salazar ML, Arancibia S, Villar J, Salazar F, Brown GD, et al. TLR4, but Neither Dectin-1 nor Dectin-2, Participates in the Mollusk Hemocyanin-Induced Proinflammatory Effects in Antigen-Presenting Cells From Mammals. *Front Immunol* 2019;10:1136.
112. Villar J, Salazar ML, Jiménez JM, Campo MD, Manubens A, Gleisner MA, et al. C-type lectin receptors MR and DC-SIGN are involved in recognition of hemocyanins, shaping their immunostimulatory effects on human dendritic cells. *Eur J Immunol* 2021;51(7):1715-31.
113. Rojo R, Raper A, Ozdemir DD, Lefevre L, Grabert K, Wollscheid-Lengeling E, et al. Deletion of a Csf1r enhancer selectively impacts CSF1R expression and development of tissue macrophage populations. *Nat Commun* 2019;10(1):3215.
114. Ugur M, Mueller SN. T cell and dendritic cell interactions in lymphoid organs: More than just being in the right place at the right time. *Immunol Rev* 2019;289(1):115-28.
115. Eisenbarth SC. Dendritic cell subsets in T cell programming: location dictates function. *Nat Rev Immunol* 2019;19(2):89-103.