

**UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE MEDICINA
ESCUELA DE POSTGRADO
PROGRAMAS DE GRADOS ACADEMICOS**



**“¿PUEDEN LAS CÉLULAS DENDRÍTICAS MADURADAS
CON TRIMEL ACTIVAR CÉLULAS INKT CONTRA
MELANOMA HUMANO?”**

FELIPE ERNESTO FALCÓN BEAS

TESIS PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR EN CIENCIAS BIOMEDICAS

Director de Tesis: Dra. Mercedes López Nitsche

2017

**UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE MEDICINA
ESCUELA DE POSTGRADO**

INFORME DE APROBACION TESIS DE DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMEDICAS

Se informa a la Comisión de Grados Académicos de la Facultad de Medicina, que la Tesis de Doctorado en Ciencias Biomédicas presentada por el candidato

FELIPE ERNESTO FALCÓN BEAS

ha sido aprobada por la Comisión Informante de Tesis como requisito para optar al Grado de **Doctor en Ciencias Biomédicas** en Examen de Defensa de Tesis rendido el día 08 de Noviembre de 2017.

Dra. Mercedes López Nitsche
Directora de Tesis

COMISION INFORMANTE DE TESIS

DRA. BETTINA MÜLLER

DRA. CAROLINA HAGER R.

DR. MARIO ROSEMBLATT

DR. L. ARTURO FERREIRA V.
Presidente Comisión de Examen

DEDICATORIA

*A mi familia, por su apoyo incondicional
en todas las empresas que he llevado a cabo.*

*A mi pareja, por su colaboración con este proyecto
y su fortaleza en los momentos difíciles*

AGRADECIMIENTO

Quisiera agradecer a mi familia, que me han respaldado desde mi educación preescolar hasta mi formación de postgrado. A mi padre, por ser mi ejemplo a seguir en el día a día, por su guía y sus consejos. A mi madre, por su amor y apoyo incondicional y por enseñarme el trabajo duro. A mis hermanos Claudio y Cristián, por su constante preocupación por mí durante toda mi vida, por el cariño y el afecto y por enseñarme a vivir en el camino de la ciencia. Y a mi tía Elizabeth, por el cariño entregado durante todos estos años.

A mi pareja Jimena, por su apoyo en el desarrollo de este proyecto. Sin tu colaboración esto no podría haberse llevado a cabo. Por apoyarme cuando el camino era tortuoso. Por consolarme cuando habían fracasos y por celebrar conmigo en los aciertos.

A mis amigos y compañeros de laboratorio, por las conversaciones entre los experimentos. Por los consejos en el trabajo. Por hacer de esta experiencia más amena y feliz.

A los Dres. Patricio Cabané y Claudia Morales, por su participación en la obtención de muestras clínicas.

Y finalmente, a mi tutora la Dra. Mercedes López Nitsche, por su apoyo y consejo en el desempeño de esta tesis.

ÍNDICE

PORTADA	3
INFORME DE APROBACION TESIS DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMEDICAS	4
DEDICATORIA	5
AGRADECIMIENTO.....	6
ÍNDICE	7
RESUMEN	8
ABSTRACT	9
INTRODUCCIÓN	10
HIPÓTESIS	23
OBJETIVO GENERAL	23
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	23
MATERIALES Y MÉTODOS	24
RESULTADOS	31
DISCUSIÓN	40
BIBLIOGRAFÍA	46
FIGURAS COMPLEMENTARIAS	50

RESUMEN

Melanoma es la neoplasia cutánea más agresiva, con una incidencia ascendente a pesar de numerosos esfuerzos de prevención. En la actualidad existen diversas estrategias de tratamiento, sin embargo, no todos los pacientes responden a ellas. En nuestro laboratorio se ha ensayado una inmunoterapia basada en células dendríticas (DCs) maduras con un lisado de líneas celulares de melanoma (TRIMEL), que ha incrementado hasta 3 veces la sobrevida en pacientes que desarrollan una respuesta inmunológica de hipersensibilidad retardada (DTH+). Hasta la fecha no se han desarrollado avances en el estudio de la fracción no peptídica de este lisado ni de su capacidad de activar células iNKT, capaces de reconocer antígenos glicolipídicas en contexto CD1d. **Hipótesis:** Células iNKT infiltran tumores de pacientes con melanoma avanzado y son capaces de ser activadas in vitro por células dendríticas utilizadas en inmunoterapia antitumoral. **Objetivo General:** Determinar el rol en pacientes con melanoma de células iNKT infiltrantes de tumor y activadas por células dendríticas maduras ex vivo utilizadas en inmunoterapia antimelanoma. **Métodos:** Se determinaron células iNKT infiltrantes de tumor mediante inmunofluorescencia y se correlacionó su presencia en lesiones de melanoma primario en todos los estadios según *Breslow* con la sobrevida de la enfermedad. Se evaluó la capacidad de las fracciones glicolipídica y proteica de TRIMEL para inducir maduración en células dendríticas. Para este fin, las fracciones se obtuvieron mediante gradiente de densidad con MTBE (Metil-terbutil-éter) y se usaron para estimular DCs generadas en base a rhIL-4 y GM-CSF. En estas condiciones se evaluó la presencia de diversas moléculas de superficie y la producción de citoquinas. Para evaluar la capacidad de estas DCs de activar células iNKT, desde PBMC se aisló la población CD3⁺ mediante *cell-sorting* y cultivadas con distintas DCs generadas. Se analizó la proliferación celular utilizando el ensayo CFSE. También se evaluó la presencia de células iNKT mediante inmunofluorescencia en tacos de parafina de las DTH realizadas a pacientes de inmunoterapia. **Resultados:** Encontramos infiltración por células iNKT en todos los estadios de la enfermedad, siendo mayor en *Breslow* avanzados, sin una correlación con la sobrevida global. Al evaluar la maduración de DCs, esta fue mayor en el grupo estimulada con la fracción peptídica de TRIMEL. DCs estimuladas con la fracción glicolipídica de TRIMEL no mostraron diferencias con la condición no tratada. Al evaluar mediante ensayo de proliferación realizado con CFSE, se evidenció mayor proliferación en la condición tratada con la fracción peptídica. Finalmente, sólo en 1 de 3 pacientes en los que se analizó la presencia de iNKT en las DTH se encontraron estas células. **Conclusiones:** unificando todos los hallazgos discutidos previamente, células iNKT infiltran tumores de melanoma, las que podrían ser inducidas a proliferar por DCs estimuladas con la fracción peptídica de TRIMEL y de esa forma migrar a sitios inflamados como representan las lesiones DTH.

Abstract

Melanoma is the most aggressive skin tumor, with a growing incidence worldwide, despite of prevention strategies. Nowadays, there are several new therapies to treat it, however the overall survival continues to be low. Our lab has been studying a Dendritic Cell (DC) based immunotherapy matured with a melanoma cell lines lysate (TRIMEL), which has increased survival up to 3 times in patients that developed a delayed type hypersensitivity response (DTH+). To this date no studies have been made regarding the non peptidic fraction of this lysate or its capability to activate a subpopulation of T Cells called iNKT cells, characterized by their ability to recognize glycolipids in a CD1d manner. **Hypothesis:** iNKT Cells infiltrate melanoma patient's tumors and are capable to be activated in vitro by Dendritic cells **Main Objective:** To determinate the role of tumor infiltrating iNKT cells activated by matured Dendritic Cells ex vivo used in antimelanoma immunotherapy in melanoma patients **Methods:** The presence of tumor infiltrating iNKT Cells in primary melanoma in all of Breslow stages was evaluated by expression of TCR V α 24J α 18 by Immunofluorescence microscopy. To evaluate the capability of glycolipid and peptidic TRIMEL fraction to induce DCs maturation, they were isolated from TRIMEL using a MTBE (Metil-terbutil-ether) density gradient. Afterwards, these fractions were used to stimulate DCs generated with a rhIL-4 and GM-CSF protocol and surface molecules expression were assessed, as well as cytokine secretion. To evaluate DCs effectiveness to activate iNKT Cells' proliferation, CD3⁺ population was isolated from Buffy Coats using *cell-sorting* technology and they were cultured with DCs. Proliferation was accessed with CFSE dye assay. Finally, DTH infiltrating iNKT cells were asessed in paraffined embedded samples by immunofluorescence microscopy. **Results:** We found that iNKT cells infiltrated melanoma tumors in every Breslow stage, with higher infiltration on advanced stages,with no correlation with overall survival. The peptidic fraction of TRIMEL induced higher expression of maturation related surface molecules in addition to cytokine secretion, whereas glycolipidic fraction showed no difference with the untreated condition. iNKT cell had a higher proliferation rate when cultured with DCs treated with the peptidic fraction of TRIMEL. And finally, we found the infiltration of iNKT in 1 of the 3 patients DTH. **Conclusions:** Taking together all the previous results, iNKT cells infiltrate melanoma Tumors, and they could be induced to proliferate by DCs stimulated with the peptidic fraction of TRIMEL and as well supporting their migration to inflamed tissues like the DTH samples.

Introducción

Melanoma en Chile y el Mundo

El cáncer es una importante causa de muerte a nivel mundial, con un rápido incremento en su incidencia, lo que lo ha llevado a convertirse en la primera causa de muerte en países desarrollados. En países en vías de desarrollo, como Chile, es la segunda causa de muerte, solamente precedida por las enfermedades cardiovasculares¹. La organización mundial de la salud (OMS) reportó para el año 2008, 7,6 millones de muertes a nivel mundial debido a cánceres, proyectando un aumento de hasta 13,2 millones para el 2030².

Melanoma es un tumor cutáneo que deriva de los melanocitos, células pigmentarias que se encuentran mayoritariamente en la piel, pero también pueden ser encontradas en otros tejidos como mucosas y uvea³. Melanoma tiene relevancia a nivel mundial debido a su alta agresividad y letalidad, y a que su incidencia se ha mantenido con una pendiente ascendente⁴, a pesar de las campañas de prevención, representando el 90% de las muertes por cánceres cutáneos⁵. Melanoma tiene alta y rápida capacidad de diseminarse y generar metástasis, pudiendo comprometer prácticamente cualquier tejido⁶, lo que se traduce para el paciente en una supervivencia a 5 años menor al 20%⁷.

De acuerdo con cifras de la iniciativa GLOBOCAN (<http://globocan.iarc.fr>), en nuestro país se reportaron sobre 300 casos nuevos para el año 2012, con una incidencia mayor en mujeres. Localmente, contamos con el estudio de los Registros Poblacionales de Cáncer de las regiones de Antofagasta y Los Ríos y la provincia del Biobío, para el quinquenio 2003-2007, que se ha utilizado para estimar la incidencia de cánceres a nivel nacional⁸. Este ha mostrado que melanoma tiene un comportamiento diferente según el género del paciente. En hombres, se evidencia mayores tasas en Arica y Parinacota, Atacama, Valparaíso, Biobío, Araucanía, Los Ríos y Los Lagos, posiblemente relacionado con actividades laborales. En cambio, para las mujeres, melanoma tiene un comportamiento similar a lo largo del país⁸.

A nivel mundial tiene una incidencia de 232.130 casos por 100.000 habitantes y una mortalidad de 55.488 casos por 100.000 habitantes (Globocan 2012), representando una patología altamente letal. Si bien la resolución quirúrgica puede ser curativa en etapas precoces de la enfermedad, el melanoma en estadios avanzados se comporta de manera altamente agresiva con una alta tasa de recidiva⁹. Existen factores de riesgo de sufrir melanoma intrínsecos a cada sujeto como son el color de la piel o la presencia de mutaciones en genes supresores de tumores (como por ejemplo CDKN2A o CDK4), no obstante la exposición a radiaciones UV en edades tempranas es el factor desencadenante más relevante⁵, cuyas estrategias de prevención, como el uso de bloqueador solar, sólo han mostrado efectividad en algunos países como Australia. Es más, para el 2031 se pronostica que la incidencia de melanoma seguirá aumentando en países desarrollados como Estados Unidos, Reino Unido, Suecia y Noruega a pesar de los esfuerzos en estrategias de prevención¹⁰.

El diagnóstico de melanoma comienza con la evaluación de las lesiones por inspección directa por el clínico. El ABCDE, nemotecnia que resume las características de asimetría, bordes irregulares, heterocromía, diámetros irregulares y evolución de las lesiones, es un buen método de tamizaje, especialmente en profesionales entrenados. Tiene un mejor rendimiento cuando existe más de una característica alterada, sin embargo, puede no ser suficiente para el diagnóstico en algunos casos particulares¹¹. Por esta razón, se recomienda complementarla con la realización de la dermatoscopia, también conocida como microscopia de epiluminiscencia, técnica no invasiva que ha demostrado reducir la necesidad de biopsias, al mismo tiempo que aumenta la sensibilidad de la pesquisa⁵. Sin embargo, el diagnóstico definitivo de melanoma se realiza a través de la biopsia⁵.

El grosor de la lesión, medido, por ejemplo, por el índice de Breslow, es un importante factor pronóstico de mortalidad⁵. Este índice mide la profundidad de la lesión en milímetros, generando un factor altamente reproducible para el patólogo y que traduce una disminución logarítmica en la supervivencia hasta 8 mm, luego del cual

pierde capacidad de predecir progresión¹². Sin embargo, a pesar de esto, el 18% de los pacientes nuevos diagnosticados con melanoma presentan metástasis al diagnóstico, por lo que se hace necesario poder definir nuevos elementos para discriminar aquellos pacientes que evolucionarán negativamente lo más precozmente posible⁶. Por esta razón, actualmente además se evalúa la ulceración del tumor primario, el índice mitótico, y la presencia de melanoma en el linfonodo centinela para definir pronóstico desde el primer acercamiento¹³.

El tratamiento del melanoma avanzado ha tenido cambios en los últimos años. A mediados de los años 70s se desarrolló un agente quimioterapéutico denominado Dacarbazina^{6,14}, agente alquilante que fue, por muchos años, la terapia estándar. Dacarbazina demostró una respuesta clínica con incremento en la sobrevida libre de enfermedad entre el 5 al 35% de los pacientes según las series⁶, con una mediana de respuesta de 5 a 6 meses⁷, sin demostrar incremento en la sobrevida global de los pacientes^{15, 9, 16}.

En años recientes, estudios en tumores de melanoma han mostrado que cerca del 60% de los pacientes presentan mutaciones en el gen BRAF, lo que permite mantener activada la vía de señalización MEK, estimulando la proliferación celular y transformación maligna de los tumores. De estas mutaciones, la más frecuente es la producida por una sustitución de una valina por glutamato en un segmento rico en glicina (V600E)¹⁷. Vemurafenib, y luego Dabrafenib, fueron los prototipos aprobados por la FDA (*US Food and Drug Administration*) para el tratamiento de melanoma no resecable con confirmación histológica de la presencia de esa mutación en BRAF. Los estudios con Vemurafenib han mostrado una mediana de sobrevida de 13,6 meses, sin embargo, también han mostrado que existe disminución de la efectividad de la terapia por mecanismos probablemente relacionados a la activación de la vía MAP Quinasa por mecanismos independientes a BRAF^{7, 18}. En el 2013, la FDA aprobó el uso de Trametinib, un inhibidor de quinasa de la vía MEK para el tratamiento de melanoma metastásico con mutación de BRAF. Los estudios mostraron un incremento en la progresión libre de enfermedad al comparar con

Dacarbazina, pero aún inferior a inhibidores de BRAF⁷. Por esta razón, se ha aprobado el uso de la combinación de un inhibidor de BRAF con un inhibidor de la vía MEK con menores efectos adversos y un incremento en la supervivencia libre de progresión de la enfermedad, probablemente por inhibición de los segundos a los mecanismos compensatorios de la activación paradójica de la vía MAP Kinasa⁷.

Inmunología en Melanoma

Melanoma es un tumor altamente inmunogénico. Esto ha sido no sólo evidenciado porque existe regresión espontánea de tumores en pacientes con melanoma, sino también porque se ha descrito respuesta inmune adaptativa tanto celular como humoral contra melanoma^{9,19}. Dentro de la respuesta adaptativa celular destaca inicialmente el descubrimiento de la presencia de linfocitos infiltrantes de tumor (TILs), lo que llevó a la observación que linfocitos T CD8⁺ podían reconocer antígenos asociados a melanoma. Luego se describió la respuesta mediada por linfocitos T CD4⁺ hasta la actualidad, donde se está estudiando la presencia de neoantígenos y su potencial uso en inmunoterapia^{19, 20}. Dentro de la respuesta humoral, se ha descrito respuesta en base a anticuerpos contra antígenos derivados de línea germinal, como MAGE y NY-ESO-1, y de antígenos de diferenciación de la vía melanosomal^{9,19}.

Inmunoterapia en Melanoma

En búsqueda de nuevas terapias, se han utilizado distintas estrategias modulando al sistema inmune para atacar tumores de melanoma. En 1995, la FDA aprobó el uso de IFN- α 2b para melanoma avanzado²¹, utilizando como fundamento estudios que mostraban respuesta clínica entre el 13-25% de los pacientes, con efectos duraderos sobre un año que permitían incrementar tanto la supervivencia global de los pacientes, así como la supervivencia libre de enfermedad⁹. Luego, en 1997, la FDA aprobó el uso de altas dosis de IL-2^{9, 21}, la que ha mostrado una respuesta del 15%, una mediana de respuesta de 8,9 meses y un 4% de los pacientes con efecto duradero a 62 meses de seguimiento²². Sin embargo, estas terapias llevan asociado

importantes efectos adversos, incluyendo el síndrome de extravasación capilar y nefro-neurotoxicidad⁷.

Con el incremento en el conocimiento sobre la inmunología del melanoma y la producción de anticuerpos monoclonales utilizables en el tratamiento de patologías, se inició el tratamiento de pacientes con melanoma avanzado con anticuerpos que permitieran la activación del sistema inmune. Ipilimumab, anticuerpo monoclonal anti CTLA-4 (*Cytotoxic T Lymphocyte Antigen-4*), molécula encargada de regular negativamente la respuesta inmune antitumoral, fue el primer tratamiento contra melanoma con resultados positivos en la sobrevida global²². Aprobado por la FDA en 2011, ha mostrado un incremento en la sobrevida global con una mediana de 10 meses, con sobrevida a 2 años del 25% de los pacientes. Sin embargo, es importante considerar que entre el 10-15% de los pacientes presentan reacciones adversas grado 3-4^{22,23}. Los últimos anticuerpos aprobados por la FDA para el tratamiento de melanoma son pembrolizumab y nivolumab, anticuerpos anti PD-1, que también han mostrado respuestas a largo plazo asociado a menos efectos adversos al comparar con otras terapias, incluyendo ipilimumab²³.

Además de las terapias descritas, otra estrategia de activar el sistema inmune incluye terapias celulares, por ejemplo, aquellas basadas en células dendríticas²⁴. Estas utilizan el conocimiento sobre el sistema inmune para montar respuestas contra células tumorales. El sistema inmune utiliza células en los tejidos que sensan señales de peligro, tanto endógenas (*DAMPs* o *Danger Associated Molecular Patterns*) como exógenas (*PAMPs* o *Patogen Associated Molecular Patterns*). Estas son reconocidas por receptores denominados *PRRs* (*Pattern Recognition Receptors*), entre los cuales destacan *TLRs* (*Toll Like Receptors*), *NOD-like receptor* (*NLR*) entre otros²⁵. Dentro de estos *DAMPs*, calreticulina, ATP y *HMGB-1* (*High-Motility Group Box 1*) tienen una potente capacidad de inducir respuestas antitumorales²⁶, los cuales, al ser reconocidos por un *PRR*, entregan señales de peligro a células del sistema inmune. En el caso de las células dendríticas, les permite aumentar su capacidad de capturar antígenos, procesarlos y presentarlos en

moléculas de histocompatibilidad mayor (*MHC* o *HLA* en humanos), al mismo tiempo que les permite migrar mediante la expresión en superficie de receptores de quimioquinas como CCR-7 y activar linfocitos T (LT) mediante moléculas coestimuladoras como CD80 y CD86^{25, 27}.

El estudio de LT ha permitido reconocer la especificidad de estas células³ hacia ciertas moléculas en cáncer que se han denominado antígenos asociados a tumores (TAA). En el caso de melanoma, los antígenos (MAA) más estudiados son gp100, tirosinasa, Melan-A, TRP-2 (*Tyrosinase-related protein*); algunos antígenos cáncer testicular como MAGE-A1 (*Melanoma Antigen-1*), NY-ESO-1; y algunos antígenos modificados o expresados aberrantemente como CDK-4 y MUM-1²⁸. Además, no sólo es relevante que estos linfocitos sean capaces de reconocer tumores, sino también de destruirlos. Es así, como la presencia de linfocitos infiltrantes de tumor (TILs) T CD8⁺, CD4⁺ T_H1, NK y linfocitos $\gamma\delta$ se han asociado a incremento en la sobrevida en distintos tipos de cáncer, mientras que linfocitos T CD4⁺ T_H2, se ha relacionado con un efecto contrario²⁸.

Inmunoterapia basada en células dendríticas

En nuestro laboratorio, se ha ensayado una inmunoterapia basada en células dendríticas, generadas *ex-vivo*, maduras usando un protocolo abreviado de 3 días con un lisado tumoral de 3 líneas de melanoma (TRIMEL) sometidos a estrés térmico. TRIMEL ha demostrado ser un potente estímulo de maduración para células dendríticas, induciendo la expresión de moléculas de presentación antigénica MHC I y II, moléculas de coestimulación CD80, CD83 y CD86 y del receptor de quimioquinas CCR-7, involucrado en la migración a linfonodo. Además, destaca la presencia de MAAs como MART-1, gp100, tirosinasa, NY-ESO1, MAGE1, MAGE3, MC1R, MCSP, survivina, y Her2/neu con capacidad de inducir respuestas inmunes adaptativas efectoras²⁹. La utilización de esta inmunoterapia basada en células dendríticas ha demostrado efectividad clínica en pacientes con melanoma avanzado, con un incremento de la mediana de sobrevida en los pacientes categorizados como respondedores que triplica a los no respondedores, utilizando como parámetro clínico

de comparación una prueba de respuesta cutánea de hipersensibilidad retardada o *DTH*³⁰. Así mismo, hemos demostrado inducción de respuestas inmunes celulares efectoras de tipo T_H1 y T_H17 así como incremento en los niveles de IL-17 plasmática en pacientes respondedores con disminución de los perfiles $Tr1$, Tregs y T_H3 y de los niveles plasmáticos de TGF- $\beta 1$ ³¹. Junto a esto, hemos evidenciado acrecentamiento en los niveles de anticuerpos anti NY-ESO1 posterior a la terapia, así como cambios en la expresión génica de moléculas relacionadas con el sistema inmune tales como, CXCR4, Fc γ RIIa, CLEC-2D y en MGC29506 en pacientes no respondedores (datos no publicados). Sin embargo, hasta la fecha no se ha profundizado el estudio de los componentes glicolípidicos del lisado tumoral TRIMEL que podrían funcionar como agonistas de PRR, ni tampoco su potencial rol de antígenos capaces de activar la respuesta de linfocitos T citotóxicos como son las células NKT.

Células NKT y modelos tumorales.

Las células NKT son una subpoblación de linfocitos T caracterizadas por su capacidad de activarse tanto por señales entregadas por su receptor de células T (TCR), además de señales mediadas por receptores activadores que también se expresan en las células NK, como por ejemplo, el receptor NKG2D³².

Los linfocitos NKT se encuentran en circulación periférica a baja frecuencia, representando entre el 0,01%-1% del total de linfocitos T CD3+. Presentan una alta variabilidad entre individuos y se les atribuye funciones en enfermedad infecciosa, alergia, autoinmunidad y vigilancia tumoral^{33, 34}. Estudios en tejidos periféricos y órganos linfoides secundarios han mostrado que, en humanos, existe un enriquecimiento en el mesenterio, donde representan aproximadamente el 10% de los linfocitos. Le sigue en frecuencia hígado, bazo, médula ósea y linfonodos^{35, 36}. Finalmente, estudios de los receptores de quimoquinas de células iNKT en sangre periférica han demostrado perfiles de destinación hacia tejidos, predominando CCR2, CCR5, CCR6, CXCR3 y CXCR6, lo que permite su direccionamiento a tejidos inflamados como, por ejemplo, el nicho tumoral³⁷. El estudio del TCR de estas células permitió diferenciar 2 subtipos principales: células *NKT tipo I* o invariante (iNKT) y células *NKT tipo II* o semi-invariante. Las primeras se caracterizan por un

TCR V α 24-J α 18 unido a una cadena V β 11 que permite reconocer antígenos glicolipídicos en contexto CD1d como por ejemplo α -galactosil ceramida. Las células NKT tipo II poseen repertorios de TCR más diversos, caracterizados por la ausencia de la cadena V α 24-J α 18, por reconocer antígenos en contexto CD1d, y por ser incapaces de reconocer la molécula α -galactosil ceramida³⁸.

CD1d pertenece a la familia de moléculas CD1, las cuáles se dividen en el grupo 1, conformado por CD1a, CD1b y CD1c y la del grupo 2 o CD1d³⁹. Corresponden a moléculas de presentación antigénica no polimórfica y son codificadas en el ser humano en el cromosoma 1⁴⁰. Estas presentan un bolsillo hidrofóbico y tienen rol en células presentadoras de antígeno profesionales, como por ejemplo, células dendríticas y los linfocitos B^{33, 34}.

CD1d se expresa constitutivamente en sangre y tejidos periféricos a diferencia de las otras moléculas CD1 que son inducibles por GM-CSF e IL-1 β ³⁹ y cumplen un rol en la presentación de antígenos lipídicos a linfocitos T. Si bien, las moléculas CD1 cumplen un rol en la defensa de infecciones como por *Mycobacterium tuberculosis*, CD1d se le ha descrito un rol más importante en el combate de otros patógenos *Borrelia burgdorferi* y *Helicobacter pylori*, así como en otros procesos patológicos, incluyendo cáncer⁴¹. Dentro de los antígenos que son reconocidos por NKT más estudiados se encuentra α -galactosil ceramida, molécula sintética derivada de esponjas marinas, con demostrada efectividad en inducir proliferación y activación de células iNKT. Sin embargo, también se han descrito antígenos exógenos en patógenos humanos como los ya mencionados, así como también se han estudiado lípidos propios con capacidad de unirse a CD1d y activar respuestas en células NKT. Entre estas destacan cardiolipina, esfingomiélin, plasmalogeno fosfatidilcolina, glicoesfingolipidos, fosfatidiletanolamina, fosfatidilinositol, e isoglobotrihexosilceramida (iGb3)^{42, 43}.

Estas células se caracterizan por expresar CD45RO, responder secretando rápidamente citoquinas de perfil T_H1 y T_H2, en una forma dependiente e independiente del TCR^{32, 36, 44}. Los antígenos activadores de células NKT también

favorecen la secreción de un perfil de citoquinas por sobre el otro, destacando el ejemplo de α -Gal-Cer como inductor de secreción de citoquinas del perfil T_H1 . Sin embargo, células iNKT sometidas a estimulaciones repetidas por α -Gal-Cer secretan IL-4 con baja o nula secreción de IFN- γ , lo que podría simular lo que pasa frente a estímulos inflamatorios crónicos, como, por ejemplo, una lesión maligna. Por esta razón, numerosos grupos se han enfocado en buscar antígenos que generen respuestas más puras en lo que a secreción de citoquinas respecta. Por ejemplo, fragmentos de menor tamaño de α -Gal-Cer, como por ejemplo OCH (molécula trunca derivada de α -Gal-Cer y que posee menor cantidad de carbohidratos), generan uniones menos estables entre el TCR y el complejo CD1d-lípido, lo que favorece la secreción de citoquinas de tipo T_H2 ^{45,46}.

Además, las células NKT pueden manifestar capacidad citolítica de manera dependiente del TCR^{32, 44} como independiente del TCR⁴⁷, como la evidenciada por NKG2D, que puede inducir citólisis *per se*, como potenciar la activación mediada por el TCR, especialmente frente antígenos débiles ³².

En modelos tumorales, se ha observado presencia de células NKT infiltrantes de tumores con capacidad de secretar INF γ e IL-4. Por ejemplo, en modelo de melanoma metastásico murino B16, se evidenció que células NKT aisladas del timo enfrentadas a células tumorales secretaban altos niveles de IL-4, mientras que células NKT derivadas del hígado secretaban altos niveles de IFN γ . Esto sugiere que células iNKT presentan fenotipos diferentes según el tejido en el que se encuentren. Asimismo, iNKT en pulmón expresan altos niveles de IL-4, en contraste con células iNKT en piel, que expresan mayores niveles de IL-17³⁶. Estos resultados sugieren que existirían señales específicas expresadas en cada órgano que modularían el repertorio de respuesta que cada población de células NKT puede desarrollar, lo que haría factible la modulación de estas señales con la intención de generar intervenciones terapéuticas que induzcan perfiles de iNKT antitumorales⁴⁸. Esto, sumado a que esta subpoblación linfocitaria puede infiltrar tumores humanos y que esta infiltración, así como el número de células circulantes en sangre, se

correlacionan positivamente con la sobrevida a largo plazo, postulan a las células iNKT como interesantes candidatas para el desarrollo de inmunoterapias³⁷. Se han realizado diversos ensayos clínicos en pacientes con tumores de distintos orígenes histológicos, algunos de ellos han utilizado α -galcer como tratamiento adyuvante, sin incremento en la sobrevida⁴⁹. Otros han ensayado inmunoterapias usando células dendríticas tratadas con α -galcer en modelos de cáncer pulmonar no células pequeñas⁵⁰, cáncer de mama, cáncer de colon, hepatocarcinoma, melanoma, adenocarcinoma peritoneal, carcinoma de células renales, carcinoma prostático y carcinoma pulmonar⁵¹. Estos estudios han demostrado aumento en el reclutamiento de células iNKT específicamente en el sitio tumoral, así como incremento en células secretoras de IFN γ tanto en PBMC como en TILs⁵⁰ y aparición de síntomas relacionados con inflamación en sitios tumorales como son dolor local y elevación de exámenes de laboratorio⁵¹.

Dados estos antecedentes expuestos es que planteamos la siguiente hipótesis

Hipótesis

Células iNKT infiltran tumores de pacientes con melanoma avanzado y son capaces de ser activadas *in vitro* por células dendríticas utilizadas en inmunoterapia antitumoral.

Objetivo General

Determinar el rol en pacientes con melanoma de células iNKT infiltrantes de tumor y activadas por células dendríticas maduras *ex vivo* utilizadas en inmunoterapia antimelanoma.

Objetivos Específicos

- Determinar la presencia de células iNKT infiltrantes de tumor y correlacionar su presencia con la progresión de la enfermedad y sobrevida de pacientes con melanoma avanzado.
- Evaluar la capacidad de maduración de células dendríticas estimuladas con la fracción glicolipídica y proteica de TRIMEL.
- Evaluar la capacidad de activación de células iNKT por células dendríticas utilizadas en inmunoterapia antimelanoma
- Evaluar la capacidad de activación de células iNKT infiltrantes en una respuesta DTH en pacientes con melanoma tratados con inmunoterapia basada en células dendríticas.

Materiales y Métodos

Muestras Melanoma cutáneo

Con el objetivo de evaluar si la infiltración de células iNKT se correlaciona con la supervivencia de pacientes con melanoma en distintas etapas de la enfermedad, se obtuvieron muestras en parafina de tumores de melanoma y fichas clínicas de 68 pacientes desde el servicio de Anatomía Patológica del Hospital Clínico de la Universidad de Chile. El control se realizó con los segmentos sanos obtenidos del material de la biopsia. La obtención de las muestras fue aprobada por el comité de ética del Hospital Clínico de la Universidad de Chile.

Inmunofluorescencia

Para determinar la presencia de células iNKT en muestras de tumores de melanoma cutáneo, utilizamos la técnica de Microscopía por Inmunofluorescencia desde muestras de pacientes fijadas en parafina. Probamos utilizando el clon 6B11 conjugado a FITC (BD bioscience, USA), facilitado por la Dra. Carolina Hager Ribeiro, la proteína de fusión CD1d:Ig recombinante (BD bioscience, USA) cargada con KRN 7000 (α -Galactosyl Ceramide, Enzo Life Technologies, USA) dejando incubar durante la noche, a 37°C, cuya detección se realizó utilizando anticuerpo secundario pollo anti ratón, conjugado a Alexa 488® (Invitrogen, USA) y anticuerpo anti TCR V α 24, clon C15 (Beckman Coulter, USA), revelado con un anticuerpo cabra anti ratón conjugado a TexasRed (Abcam ab6787 EEUU). Además, las muestras fueron teñidas con anticuerpo Anti-CD3 (Abcam ab16669, EEUU), revelado con anticuerpo burro anti conejo conjugado a Alexa 488® (Invitrogen, USA)

Para favorecer la unión antígeno anticuerpo, las muestras fueron sometidas al proceso de recuperación antigénica mediante calor, en buffer citrato (pH: 6,00), en buffer EDTA (pH: 8,00) y en *Wash Buffer* 10X 0.05 mol/L Tris/HCl (pH: 9,00, DAKO, Dinamarca).

Para determinar recuento celular, se utilizó tinción nuclear con DAPI y se contaron células positivas en 20 campos, a una amplificación de 40x.

Se analizaron muestra en microscopio de fluorescencia *Olympus IX71/IX51*, cámara *Q Imaging Fast 1394*. Las muestras se registraron con el programa *Q-Capture Pro 7* y fueron analizadas con *Image J 1.46r*.

Muestras DTH

Dentro del protocolo de vacunación con TAPCells de pacientes con melanoma avanzado, se incluye la realización de una prueba clínica de DTH un mes posterior a la última dosis, con la intención de determinar respuesta inmunológica. De 3 pacientes recientemente vacunados, se obtendrá muestra cutánea de la respuesta DTH mediante biopsia *Punch* utilizando material desechable (Delasco). La mitad de esta muestra se disgregará mecánicamente el tejido y se incubará con rhIL-2 (150 UI/ml) por un periodo aproximado de 3 semanas hasta obtención de población suficiente para estudios mediante citometría de flujo para detección de células iNKT. La otra mitad se analizará mediante inmunofluorescencia, según protocolo ya mencionado, en muestra fijada en paraformaldehido 2% por 18 horas, a 4°C. Posteriormente serán lavadas con agua corriente y mantenidos en etanol de 70° hasta su deshidratación con etanoles de graduación ascendente. Luego son aclarados en Xilol, impregnados e incluidos en Paraplast (Histosec, Merk ,USA). A continuación, se obtienen cortes de 4-5 micrones de grosor, los que serán adheridos en portaobjetos silanizados (Esco, Switzerland).

TRIMEL y purificación de fracción peptídica y glicolipídica.

TRIMEL se obtiene de 3 líneas de melanoma sometidas a stress por calor y posteriormente lisadas. Así se logra una suspensión de segmentos celulares con distintas macromoléculas. Con la intención de evaluar el efecto de la fracción glicolipídica de TRIMEL, se realizó extracción según gradiente de densidad usando methyl-tert-butyl ether (MTBE)⁵². Brevemente, la muestra fue mezclada con metanol, para posteriormente agregarse MTBE. Se incubó por 1 hora a temperatura ambiente y se agregó agua bidestilada para separación de fases. Se incubó por 10 minutos a temperatura ambiente y luego se centrifugó por 10 minutos. Se retiró la fase superior y se repitió el procedimiento para la fase inferior, con el fin de aumentar el grado de

purificación. Luego, la muestra fue secada mediante calor y pesada para cálculo de concentración peso/volumen. Posteriormente ésta fue resuspendidas en medio PBS/Tween al 0,05%; una alícuota se guardó a -20°C para uso en cultivo. El resto se almacenó a -80°C. Como control, se realizó purificación de la fracción peptídica obtenido en el pellet, la que se cuantificó mediante espectrofotómetro con Bradford (Biorad, Eppendorf).

Para evaluar los contenidos de la fracción glicolipídica y la pureza de la separación, se utilizó espectrofotometría de masa de la Facultad de Ciencias Químicas, Universidad de Chile.

Generación de células dendríticas humanas

Sangre proveniente de donantes sanos (*Buffy coats*) obtenidas del banco de sangre del Hospital Clínico de la Universidad de Chile, fueron separadas por gradiente con *Ficoll-Hypaque* (Axis-Shield, Oslo, Noruega), obteniéndose Células Mononucleares de Sangre Periférica (PBMC). Estas fueron incubadas en placas de seis pocillos (Becton Dickinson, Hershey, EE.UU) a 37°C y 5% de CO₂, a una densidad de 30-40 x 10⁶ cel/ml de medio de cultivo AIM-V (Thermo Fisher Scientific EEUU). A continuación, se retiró el sobrenadante que contiene Linfocitos de Sangre Periférica (PBL) para mantener sólo las células adherentes (monocitos), que fueron incubadas a 37°C con 5% de CO₂, adicionando medio de cultivo AIM-V, enriquecido con 500U/ml de rhIL-4 (USBiological) y 800U/ml de rhGM-CSF (USBiological), durante 3 días. Al segundo día de cultivo, las células fueron maduras por 24 horas con distintos estímulos para obtener las diferentes DCs a analizar. Se utilizará 100µg/ml de TRIMEL (TRIMEL DCs) y concentraciones proporcionales de las fracciones peptídicas (PepDCs) y glicolipídicas (glicDCs). En un pocillo no se agregó estímulo de maduración, células dendríticas inmaduras (iDCs), en otro, se agregó α-galactosil ceramida 100 ng/ml (αgalDCs) los que fueron utilizados como controles tanto para los estudios de las moléculas de maduración de DCs, como para los ensayos de proliferación de iNKT. Finalmente, las DCs fueron recolectadas el día 3, para la posterior caracterización fenotípicas.

Expansión de células iNKT con feeders

Desde linfocitos de sangre periférica (PBL), se realizó tinción extracelular con anti TCR V α 24J α 18 conjugado a APC (eBioscience,EEUU) y anti TCR V β 11 conjugado a PE (Beckman Coulter, Francia). Posteriormente, la población doble positiva fue purificar por tecnología *Cell Sorting* FACSAriaIII[®](BD Biosciences,EEUU). Para la generación de *feeders* se irradió PBMC con 80gy. Posteriormente se cultivaron 100.000 con 10.000 iNKT purificadas en medio de cultivo RPMI(Corning, USA) suplementado con 10% de SFB (HyClone[™],EEUU) y 1% de antibióticos de amplio espectro (penicilina 100U/L, estreptomina (100 μ g/ml), ((HyClone[™],EEUU) y rhIL-2 (150UI/ml), en placas de 96 pocillos(Nunc[™], Dinamarca) ⁵³

Co-cultivo DCs células iNKT.

Células CD3⁺ fueron co-cultivadas con los distintos subtipos de DCs (iDCs, TRIMEL DCs, pepDCs, glicDCs y α galDCs) por 5 días en medio AIM-V libre de suero, en placas de 48 pocillos (Nunc[™], Dinamarca) en una relación DC:iNKT de 1:10 y a una concentración de 1 x 10⁶ células.

Ensayo de proliferación

Para la evaluación de la inducción de proliferación de la población linfocitaria tras los 5 días de co-cultivo de linfocitos CD3⁺, obtenidos por *cell sorting* FACSAriaIII[®](BD Biosciences,EEUU) a partir de PBMC de donantes sanos. Fueron teñidos con el colorante fluorescente *CFSE* a una concentración de 10⁻⁶ M, las células se sembraron en placas de 96(Nunc[™], Dinamarca) en una relación 2:1 de linfocitos con los distintos subtipos de DCs (iDCs, TRIMEL DCs, Pep DCs, glicDCs y α galDCs). Se evaluó la dilución del CFSE en las células (*CFSE*^{low}) por citometría de flujo. Los resultados fueron expresados como porcentaje respecto a las células con estímulo de proliferación inespecífico otorgado con 5 ng/ml de anticuerpo monoclonal OKT-3 (anti-CD3) y 150 U/ml de rhIL-2(USBiological)

Citometría de flujo

La caracterización fenotípica de las DCs y de las células iNKT se realizó mediante citometría de flujo, usando el citómetro Facsverse[®] (BD Biosciences,

EEUU) , los datos obtenidos fueron analizados en el programa FlowJo 8.7. Las distintas condiciones de DCs (iDCs , PepDCs, glicDCs y ogalDCs) fueron lavada con PBS 1x e incubadas con los siguientes anticuerpos monoclonales por 30 min a 4°C; anti-CD11c conjugado con ficoeritrina (PE), anti-HLA A, B, C, anti-HLA DR, DQ, DP, anti-CD80, anti-CD83, anti-CD86, anti-CD40, anti PD-L2, y AcMo anti-CD14 conjugados con isotiocianato de fluoresceína (*Fluorescein isothiocyanate*, FITC), anti CD1d conjugado a alofococianina (Allophycocyanin, APC) y AcMo anti-PDL-1 conjugado a APC (eBioscience,EE.UU). Transcurrido el tiempo, las células fueron lavadas y fijadas en paraformaldehído (PFA) 1x, lavadas nuevamente y resuspendidas en FACsbuffer (BD Biosciences,EEUU) para su posterior lectura en el citómetro de flujo.

Análisis de Secreción de Citoquinas

Se generaron DCs, según el protocolo anteriormente descrito, las cuales se co-cultivaron con la línea NIH3T3^{CD40L+}, en una razón de 1:1 por 24 horas posteriormente en el sobrenadante se determinaron con el kit *Cytometric Bead Array* (CBA,eBioscience, EEUU) citoquinas inflamatorias,IL-6,IL-10, IL-1 β , TNF- α y IL-12, según instrucciones del fabricante. Brevemente, a cada condición se le agregó 50 μ L del kit de detección y se incubaron por 3 horas a temperatura ambiente. Posteriormente se resuspendieron en buffer de lavado y se analizado en el citómetro de flujo

Análisis Estadístico

En el caso del análisis de muestras de melanoma, los análisis se expresaron como promedio de células detectadas por campo \pm la desviación estándar. Además, se realizó correlación con sobrevida utilizando análisis *Kaplan Meier*. Se determino en primer lugar la normalidad de acuerdo con el test *Shapiro-Wilk*. El análisis estadístico utilizado para los resultados de citometría, producción de citoquina y evaluación de la inducción o represión de perfiles linfocitarios. ya que las variables no tuvieron una distribución normal, se usó el test *Kruskal-Wallis* para identificar significancia entre los distintos grupos, y el test de *Mann-Whitney* para las

comparaciones entre dos variables. Se consideró como significativo un p *value* < 0,05, en una significancia de 95%. Los análisis estadísticos fueron realizados en el programa GraphPadPrism 5.

Resultados

Objetivo nº1: “Determinar la presencia de células iNKT infiltrantes de tumor y correlacionar su presencia con la progresión de la enfermedad y sobrevida de pacientes con melanoma avanzado”

Con la intención de poder determinar la presencia de células iNKT en muestras de tumores de melanoma cutáneo, utilizamos la técnica de Microscopía por Inmunofluorescencia desde muestras de pacientes fijadas en parafina. Para detectar la presencia de estas células probamos diferentes estrategias, comenzando por el clon 6B11 conjugado a FITC (BD bioscience, USA), facilitado por la Dra. Carolina Hager Ribeiro y con la proteína de fusión CD1d:Ig recombinante (BD bioscience, USA) cargada con KRN 7000 (α -Galactosyl Ceramide, Enzo Life Technologies, USA), cuya detección se realizó utilizando anticuerpo secundario *chicken* anti *mouse*, conjugado a Alexa 488® (Invitrogen, USA). Ambos anticuerpos fueron utilizados posterior al proceso de recuperación antigénica mediante calor, en buffer citrato (pH: 6,00) y en buffer EDTA (pH: 8,00). Sin embargo, utilizando esta metodología, no fuimos capaces de identificar marca positiva tanto en tonsila, como en tejido hepático (dato no mostrado). Por esta razón, basándonos en el trabajo de Tachibana y cols. ⁽³⁹⁾ probamos el anticuerpo anti TCR V α 24, clon C15 (Beckman Coulter, USA), en tonsila, hígado y adenocarcinoma de colon, recuperado mediante calor, utilizando buffer citrato (pH: 6,00), en buffer EDTA (pH: 8,00) y en Wash Buffer 10X 0.05 mol/L Tris/HCl (pH: 9,00, DAKO, Dinamarca). Utilizando este último buffer fuimos capaces de detectar células positivas en tonsila y adenocarcinoma de colon (Figura 1), encontrando una mayor concentración de las mismas en este último tejido, el que fue considerado como control positivo.

Posteriormente, analizamos la expresión de células TCR V α 24 conjugado a Texas red® y CD3 conjugado a Alexa 488® en muestras de melanoma cutáneo obtenidas del servicio de Anatomía Patológica del Hospital Clínico de la

Universidad de Chile. Interesantemente, se encontró coexpresión de ambos marcadores en células iNKT, (Figura 2).

Posteriormente, en colaboración con el Dr. Patricio Cabané Toledo, Cirujano Endocrinológico del Hospital Clínico de la Universidad de Chile, y de la Dra. Claudia Morales Huber, Anatomopatóloga del mismo centro, se inició estudio retrospectivo de fichas clínicas con la intención de identificar pacientes con melanoma.

Se analizaron 68 pacientes, de los cuáles la edad promedio fue de 58 años (± 16). El 44% de los sujetos eran hombres y la gran mayoría se encontraba en estadios precoces de la enfermedad según índice *Breslow* (51% con *Breslow* ≤ 1 mm). El seguimiento promedio de la muestra fue de 81 meses (± 39 meses). El 96% de los tumores se encontraban infiltrados por células CD3⁺, mientras que el 53% lo hizo con células iNKT (Tabla 1).

Similar a lo reportado por la literatura, Existe correlación entre profundidad de infiltración por células de melanoma (medido por índice *Breslow*) con la sobrevida global de los pacientes. Por esta razón, correlacionamos este parámetro en nuestra muestra, evidenciando que aquellos pacientes con índice *Breslow* > 2 muestran una sobrevida significativamente menor que los pacientes *Breslow* 1 y 2 (Fig. 3.A.). Además, tratamos de correlacionar la sobrevida en nuestra muestra con la infiltración por células CD3⁺, no encontrando diferencias significativas en la sobrevida de aquellos pacientes con tumores con alta infiltración ($>p50$) versus tumores con baja infiltración ($<p50$) (Fig. 3.B.). Asimismo, comparamos la infiltración por células CD3⁺ con el índice de *breslow*, no encontrando correlación entre ambos parámetros (Fig. 3.C.)

En otro sentido, buscamos identificar si existía una correlación entre infiltración por células CD3⁺ con la infiltración por células iNKT, no encontrando tal correlación sugiriendo que podrían corresponder a fenómenos independientes (Fig. 3.D, E.).

Luego, decidimos comparar si existía diferencias en los tumores según índice de *Breslow* con la infiltración por células iNKT, encontrando que en aquellos tumores con *Breslow* > 2, existía una mayor infiltración por células iNKT (Fig. 3.F.).

Finalmente, para analizar la posibilidad que otros factores intrínsecos a los pacientes pudieran ser factores confundentes a la hora de analizar nuestros resultados, comparamos la infiltración por células iNKT y CD3⁺ en tumores de melanoma según edad del paciente al diagnóstico (Fig 3.G,H.) y según género (dato no mostrado), sin encontrar diferencias en ambos factores.

Finalmente, al realizar comparación en la supervivencia de los pacientes según el grado de infiltración por células NKT, no se encontraron diferencias significativas entre aquellos sujetos que tenían infiltración en comparación con aquellos sin infiltración. (Figura 4A) Tampoco se encontraron diferencias al comparar con el nivel *Breslow* (Figura 4B y 4C).

Objetivo nº 2: “*Evaluar la capacidad de maduración de células dendríticas estimuladas con la fracción glicolípida y proteica de TRIMEL*”.

Con el objetivo de evaluar los componentes de la fracción glicolípida de TRIMEL sobre células dendríticas (DC) y sobre células NKT, realizamos separación de las fases con posterior análisis por espectrometría de masa. En la figura 5A se describe el protocolo de extracción usado. Básicamente, la muestra es mezclada con metanol y luego con Metil-ter butil-eter (MTBE). Se mantiene la muestra mezclándose por 1 hora a temperatura ambiente en Agitador y se agrega agua bidestilada para separación de fases. Se incuba por 10 minutos a temperatura ambiente y luego se centrifuga por 10 minutos a 1000 g. Se retira la fase superior y se repite el procedimiento para la fase inferior, con el fin de aumentar el grado de purificación. Con la intención de seleccionar el mejor método de purificación para su posterior uso en cultivo, se probó concentrador *Integrated SpeedVac® System ISS110, Savant* del programa de inmunología de la

Universidad de Chile; centrifugación a 1000 g en tubo Amicron Ultra-15 para filtración; y evaporación de solvente por temperatura en baño termorregulador a 80°C bajo campana para su peso para cálculo de concentración peso/volumen. De los tres métodos analizados, sólo la última técnica nos permitió mantener la esterilidad e integridad de la muestra, para uso en cultivos celulares. Finalmente, ésta es resuspendida en medio PBS/Tween al 0,05%. Posterior a su aislamiento, se evaluó la presencia de aminoácidos en la fracción glicolípídica mediante su determinación por espectrofotometría con reactivo de Bradford (Sigma-Aldrich, USA), lo que arrojó igual Densidad Óptica que PBS/Tween.

Con la intención de determinar las moléculas presentes en la fracción glicolípídica de TRIMEL, analizamos la muestra por espectrometría de masa MALDI-TOF (Facultad de Ciencias Químicas, Universidad de Chile), usando 3 matrices (CHCA, CMBT, DHB). En la figura 5B se muestra el perfil de espectros obtenidos. Las macromoléculas encontradas corresponden a estructuras lipídicas (ácidos grasos, glicerolípidos, glicerofosfolípidos, lípidos prenoles, sacarolípidos, esfingolípidos, lípidos esteroides). No se encontraron en este análisis estructuras aminoacídicas y sólo se detectaron trazas de lípido A. De esta manera, podemos concluir, que el método de purificación nos permite extraer una cantidad suficiente de lípidos, con una pureza adecuada para cultivo celular (Figura 4).

Dentro de las moléculas encontradas, destacan derivados de prostaglandinas como Tetranor-Prostaglandin FM y *Prostaglandina F2 α -11-acetate methyl ester*, con potenciales efectos pro inflamatorios. Sin embargo, la mayoría de estas moléculas tienen efecto sobre el sistema inmune inhibiendo funciones importantes en el proceso de inflamación:

Monodiacilglicerol: Lípido con altos niveles de ácidos grasos poliinsaturados, principalmente encontrado en mielina y oligodendrocitos con efectos antiinflamatorios en líneas de condrocitos inhibiendo la producción de IL-6 y PGE2⁵⁴, además de disminuir la migración de neutrófilos a sitios inflamados⁵⁵

Familia de las Resolvinas D: Resolvin D1, molécula que ha sido estudiada en modelo murino de infarto con un rol en inducir el clearance de células necróticas, al tiempo que reducen la generación de fibrosis⁵⁶. Resolvin D1 y D2, inhiben de manera dosis dependiente la adhesión y migración de monocitos, al mismo tiempo que disminuyen la producción de superóxido y de genes pro inflamatorios⁵⁷. Resolvin D3 bloquea la transmigración de neutrófilos mientras aumenta la fagocitosis por macrófagos⁵⁸

Ácido Ximeninico inhibe de manera dosis dependiente la producción de Leucotrieno B4, Thromboxane B2 y 6-ketoprostaglandina F1 alpha⁵⁹.

Ácido esterlúutico es un potente inhibidor del stress de retículo y de la inflamación causada por 7-ketocholesterol (7KCh), molécula relacionada con enfermedades como aterosclerosis, enfermedad de Alzheimer y degeneración macular asociada a la edad⁶⁰.

ruscogenina se ha relacionado con inducir una disminución en la actividad de NF- κ B tanto *in vivo* como *in vitro*, así como inhibir la expresión de ICAM-1 y de la proteína quimioattractante de monocitos 1⁶¹.

Penogenina: es una molécula que ha sido estudiada por su capacidad *in vitro* de inhibir la proliferación e inducir apoptosis en líneas tumorales HepG2⁶².

Así mismo, otra molécula llamada Bufalina ha sido probada en estudios *in vivo* por su efecto en disminuir la proliferación de células tumorales, al tiempo que aumenta la apoptosis de las mismas y disminuyen las metástasis pulmonares⁶³.

La vitamina D y sus derivados (1-Hidroxi vitamina D3 celobiosa, 3-Deoxivitamina D3, Vitamina D4, Vitamina D7) tiene efectos sobre monocitos y células dendríticas inhibiendo la secreción de citoquinas IL-1, IL-6, IL-8, IL-12 and TNF- α , mientras que las preserva en estado semi-inmaduro⁶⁴.

De esta manera, hemos encontrado algunas macromoléculas que, según literatura, podrían tener efectos sobre DCs. Habiendo logrado la separación de las

fracciones de TRIMEL, se estimularon DCs con sus fracciones glicolípida y peptídica. Utilizando dosis crecientes de glicolípidos que no afectaran la viabilidad celular de DCs, no logramos evidenciar inducción de moléculas de activación en las mismas. Esto sugiere que la fracción glicolípida de TRIMEL no contiene DAMPs en cantidad suficiente como para inducir maduración en DCs. Por su parte, al estimular DCs con las fracciones peptídicas de TRIMEL, la reconstitución de ambas fracciones o TRIMEL, evidenciamos que éstas son capaces de inducir la expresión de las moléculas CD80, CD86, CCR7 CD40 y PD-L1 (Figura 6; N=8).

Finalmente, mediante co cultivo con fibroblastos transfectados con CD40L, se buscó identificar la secreción de citoquinas IL-10, IL-6, IL-1 β , IL-12, TNF- α por parte de DCs. En este contexto, no se identificó diferencias entre las condiciones PEP DC, REC DC y TRIMEL DC, sugiriendo que los glicolípidos de TRIMEL no inducen la secreción de estas citoquinas (Figura 7; N=5)

Objetivo n°3: “Evaluación de la capacidad de activación de células iNKT por células dendríticas utilizadas en inmunoterapia anti melanoma”

Dados los resultados obtenidos en la espectrometría de masa, encontramos 2 moléculas que, según literatura, podrían ser procesadas y presentadas a células iNKT por parte de las DCs ^{38, 65} que son **GlcA β -Cer** y **GalCer**. Curiosamente, dentro de este análisis encontramos presencia de la molécula **Sulfatide**, antígeno ícono de células NKT tipo II, que tienen un potencial inmunoregulador ^{38,41}.

Para analizar si DCs maduras con las fracciones de TRIMEL inducen proliferación de células iNKT, realizamos aislamiento de población linfocitaria mediante la tecnología de Cell sorting. Luego, estas células fueron cultivadas con DCs alogénicas y se evaluó el porcentaje de células TCR V α 24J α 18⁺ CFSE^{low} (Figura 8). Se evidenció proliferación en todas las condiciones con respecto al control de células CD3⁺ solas. Se evidenció que las células estimuladas con las fracciones de TRIMEL inducían mayor proliferación de células iNKT que las células CD3⁺ solas y que las TOLDCs y de manera similar que el control positivo.

Además, no se encontraron diferencias significativas entre las condiciones estimuladas con las fracciones de TRIMEL salvo entre la condición reconstituida contra TRIMEL DCs (Figura 9).

Objetivo nº4: *“Evaluación de la capacidad de activación de células iNKT infiltrantes en una respuesta DTH en pacientes con melanoma tratados con inmunoterapia basada en células dendríticas”.*

Se obtuvieron muestras de DTH de 3 pacientes con melanoma avanzado sometidos a inmunoterapia con TAPCells para análisis de presencia de células iNKT, las cuales fueron teñidas para la expresión del marcador CD3⁺ TCR V α 24⁺ evidenciando en 1 de 3 pacientes infiltración por células iNKT (Figura 10).

Discusión

La terapia TAPCell es una inmunoterapia basada en células dendríticas que ha mostrado ser clínicamente efectiva tanto en modelo de melanoma, como en adenocarcinoma prostático⁶⁶. Sin embargo, hasta la fecha los mecanismos inmunopatológicos que explican esta eficiencia no han sido del todo esclarecidos. Las células iNKT son linfocitos con rol en inmunovigilancia de tumores, con la potencialidad de un rol dual, tanto del perfil T_H1 como del perfil T_H2^{32,44}. En este trabajo tratamos de identificar si estas células tenían un rol en el combate de tumores de melanoma, así como si la inmunoterapia TAPCell podía favorecer la proliferación y, potencialmente, invasión de células a tumores, tanto *in vivo* como *in vitro*.

Evidenciamos que células iNKT son capaces de infiltrar tumores de melanoma cutáneo en todos los estadios de la enfermedad según Breslow, dato no reportado en la literatura hasta la fecha. Para esto, fue necesario obtener la aprobación del comité de ética del Hospital Clínico de la Universidad de Chile, procedimiento que fue realizado previo a la obtención de las muestras, gracias a la colaboración del Servicio de Anatomía Patológica de la misma institución. El índice Breslow se correlaciona con la sobrevida de pacientes con melanoma, considerando que como factor único, predice una sobrevida en etapa 1 (< 1 mm) de un 92% a 10 años, mientras que tumores en etapa 4 (>4 mm) de un 50%. De esta manera, a pesar de no poder contar con datos clínicos de nuestros pacientes, la aplicación de este índice permite validar la sobrevida de nuestra cohorte.

Encontramos que no existe una correlación directa entre la infiltración linfocitaria con la infiltración por células iNKT, lo que sugiere que estas podrían estar modulando el nicho tumoral, volviéndolas un potencial factor pronóstico independiente. Sin embargo, no fuimos capaces de demostrar efecto en la sobrevida de los pacientes, posiblemente por las características de nuestra cohorte, caracterizada principalmente por pacientes en etapas precoces de la enfermedad. En modelo murino, se ha evidenciado que la activación de células iNKT contribuyen a la maduración de DCs, lo que favorece la activación de

linfocitos CD4⁺ y CD8⁺ antígeno específico, lo que se ha evidenciado *in vivo* al administrar α -galactosil ceramida asociado a OVA ⁴⁷. Es más, la inoculación de células mieloides supresoras (MDSC) cargadas con α -galactosil ceramida asociado a antígeno Her-2/neu mejora la supervivencia en modelo tumoral de adenocarcinoma de colon murino transfectado con ese antígeno ⁶⁷. Esto asociado a la capacidad citotóxica de células iNKT ^{32, 44, 47} permite hipotetizar que su presencia en el nicho tumoral permitiría desviar la respuesta inmune hacia una actividad antitumoral. Como fue descrito previamente, estas células se encuentran en baja proporción infiltrando tejidos, siendo principalmente en sitios relacionados con el sistema inmune ^{35, 36}. Sin embargo, pueden invadir tejidos inflamados de manera específica. Un trabajo experimental que utilizaba inmunoterapia en pacientes con Cáncer pulmonar no células pequeñas, en los que se inoculaba DCs derivada de monocitos cargadas con α -galactosil ceramida, mostró que la infiltración en pulmón sano era muy baja (<0,05% de la población mononuclear), pero que en el tumor de pacientes aumentaba 8 veces ⁵⁰.

Además, previamente se evidenció que una respuesta mediada por linfocitos T_H17 en modelo murino Trp-1 de melanoma B16 traduciría mayor supervivencia de los ratones ⁶⁸. Esto considerando que se ha reportado que en esta especie las células iNKT cutáneas tienden a tener un perfil de citoquinas caracterizado por secreción de IL-17 ³⁶ y que en el protocolo TAPCell, los pacientes con respuesta DTH⁺ tienen un aumento de la proporción de células CD4⁺IL-17⁺, permite pensar que la activación de células iNKT en modelo melanoma traduciría una mayor capacidad del sistema de combatir estos tumores.

Interesantemente, si bien esperábamos una inducción en los marcadores de superficie de DCs estimuladas con las fracciones glicolípida de TRIMEL, no fuimos capaces de ver este efecto, contrario a lo descrito en la literatura, en donde monocitos CD14⁺ estimulados con sulfatide y β -GalCer aumentan su expresión de CD86 y HLA-II. Esto se debe probablemente a la exposición temprana a estas moléculas durante el periodo de diferenciación de DCs que module este proceso, más que a su capacidad de inducir maduración ⁶⁹. Además, los hallazgos

obtenidos en la espectrometría de masa permiten confirmar estos resultados, dado que la gran mayoría de las macromoléculas encontradas son metabolitos de moléculas con un rol antiinflamatorio (como aquellas derivadas de la vitamina D entre otras)⁶⁴. Aún más, no encontramos diferencias en la secreción de citoquinas IL-10, IL-6, IL-1 β , IL-12, TNF- α entre las DCs tratadas con TRIMEL, la fracción peptídica de TRIMEL y la fracción reconstituida con glicolípidos, apoyando los resultados previamente descritos, donde el rol en la activación de DCs sería dependiente de la fracción peptídica de TRIMEL.

Las células iNKT representan el 0,01%-1% del total de linfocitos T CD3⁺³³,³⁴. Por esta razón, para la realización de cultivos celulares se requiere de su expansión. Sin embargo, esta estrategia fue difícil de llevar a cabo, dado que para conseguir un número adecuado de células, el paso por procesos sucesivos de estimulación las lleva a un estado de hiporrespuesta que asemeja al proceso de agotamiento de linfocitos. Para sobrellevar esta complicación hemos generado colaboraciones con los Dres. Derek Doherty de St. James's Hospital, Irlanda y Leandro Carreño post-doc Fellow en Albert Einstein College of Medicine EEUU, quienes gentilmente nos donaron células iNKT previamente expandidas. Sin embargo, estas no pudieron ser usadas para estudio, por dificultades en el transporte. Por esta razón, decidimos ensayar el efecto que DCs maduras con TRIMEL tuvieran sobre iNKT dentro de una condición más fisiológica como es dentro del grupo de células CD3⁺ totales. En este protocolo experimental, pudimos ver que las DCs maduras con TRIMEL inducían proliferación de estas células de manera similar que un control positivo con DCs maduras con LPS y α Gal ceramida, sugiriendo que la inmunoterapia con TAPCells puede tener un efecto sobre las células iNKT, aunque no podemos dilucidar si este efecto es directo, o mediado por linfocitos CD3⁺ no iNKT. Sin embargo, hasta la fecha este es el único protocolo que ha mostrado ser capaz de activar células iNKT utilizando DCs maduras con lisados tumorales humanos, lo que abre paso al estudio de ligandos endógenos dentro del nicho tumoral que ayude a modular la respuesta inmune antitumoral.

De acuerdo a nuestros hallazgos, la fracción peptídica de TRIMEL mediaría este efecto sobre la proliferación de células iNKT. TRIMEL tiene DAMPs, como Calreticulina y HMGB1, que han sido estudiados en el laboratorio que son capaces de inducir maduración de DCs así como favorecer la presentación cruzada y de esta manera, generar la activación de linfocitos T CD8⁺ ²⁹. Además, *in vivo*, demostramos proliferación de linfocitos T CD4⁺ en pacientes tratados con TAPCells que presentaron una respuesta DTH⁺, sugiriendo que existen moléculas en TRIMEL que permiten inducir maduración de DCs hacia APCs que puedan activar respuestas inmunes adaptativas^{31, 70}. De esta manera, podemos hipotetizar que estos mismos mecanismos que modulan la activación de linfocitos T $\alpha\beta$ clásicos pueden regular la activación de células iNKT de manera CD1d dependiente o independiente ^{32,44}. De acuerdo a nuestros experimentos, no pudimos determinar si existen antígenos glicolipídicos en TRIMEL que pudieran ser reconocidos por células iNKT, sin embargo, células NKT pueden ser inducidas a activarse por contacto célula-célula así como factores solubles ^{32,44}, por lo que la activación por DCs maduras con TRIMEL puede ocurrir por diferentes mecanismos, los cuáles requieren de futuros experimentos para poder ser comprendidos. Además, debido a las dificultades obtenidas en nuestro modelo, no podemos descartar que factores secretados por linfocitos T $\alpha\beta$ clásicos pudieran regular la proliferación de células NKT, dado que nuestro cultivo fue con células CD3 totales. En este mismo punto, si bien sabemos que para la proliferación de linfocitos T no NKT, se requiere una respuesta inmune mediada por moléculas altamente variables como son MHC-I y MHC-II, para la activación de células NKT se requiere de la expresión de antígenos glicolipídicos en contexto de una molécula de presentación antigénica poco variable como es CD1d⁴⁰. De esta manera, creemos que el utilizar un cultivo alogénico de DCs con linfocitos T CD3⁺ no genera la activación de células NKT inespecíficamente como ocurriría con la respuesta alogénica que se vería en células T no NKT.

Es más, con la intención de poder evidenciar si esta activación por protocolo TAPCell traduce un enriquecimiento de células iNKT en el nicho de la respuesta de tipo DTH, analizamos biopsias de las lesiones, evidenciando que

sólo 1 de 3 biopsias analizadas presentaban células iNKT en ella. La DTH traduce una respuesta inmune de memoria específica contra antígenos de TRIMEL³⁰, por lo que la presencia de células iNKT en el tejido permite hipotetizar que existe activación y proliferación *in vivo* de estas células en pacientes que responden a la terapia TAPCells.

Aun así, unificando los hallazgos discutidos previamente podrían sugerir que la terapia TAPCell podría inducir la proliferación de células iNKT y favorecer su migración a sitios inflamados.

Bibliografía

1. Popat, K., McQueen, K. & Feeley, T. W. The global burden of cancer. *Best Pract. Res. Clin. Anaesthesiol.* **27**, 399–408 (2013).
2. Biemar, F. & Foti, M. Global progress against cancer-challenges and opportunities. *Cancer Biol. Med.* **10**, 183–6 (2013).
3. Aris, M., Barrio, M. M. & Mordoh, J. Lessons from cancer immunoediting in cutaneous melanoma. *Clin. Dev. Immunol.* **2012**, (2012).
4. Prüss-üstün, A., Zeeb, H., Mathers, C. & Repacholi, M. Solar Ultraviolet Radiation: Global burden of disease from solar ultraviolet radiation. *World Health* **55**, 987–999 (2006).
5. Fink, C. & Haenssle, H. A. Non-invasive tools for the diagnosis of cutaneous melanoma. *Ski. Res. Technol.* 1–11 (2016). doi:10.1111/srt.12350
6. Wick, M. R. & Gru, A. A. Metastatic melanoma: Pathologic characterization, current treatment, and complications of therapy. *Semin. Diagn. Pathol.* **33**, 204–218 (2016).
7. Hashim, P. W., Friedlander, P. & Goldenberg, G. Systemic therapies for late-stage melanoma. *J. Clin. Aesthet. Dermatol.* **9**, 36–40 (2016).
8. Ministerio de Salud. Primer informe de registros poblacionales de cáncer de Chile. Quinquenio 2003-2007. *Minist. Salud* 178 (2012).
9. Davar, D., Tarhini, A. A. & Kirkwood, J. M. Adjuvant immunotherapy of melanoma and development of new approaches using the neoadjuvant approach. *Clin. Dermatol.* **31**, 237–250 (2013).
10. Whiteman, D. C., Green, A. C. & Olsen, C. M. The Growing Burden of Invasive Melanoma: Projections of Incidence Rates and Numbers of New Cases in Six Susceptible Populations through 2031. *J. Invest. Dermatol.* **136**, 1161–1171 (2016).
11. Tsao, H. *et al.* Early detection of melanoma: Reviewing the ABCDEs. *Ymj* **72**, 717–723 (2015).
12. Mandalà, M. & Massi, D. Tissue prognostic biomarkers in primary cutaneous melanoma. *Virchows Arch.* **464**, 265–281 (2014).
13. Cintolo, J. A. *et al.* Local immune response predicts survival in patients with thick (t4) melanomas. *Ann Surg Oncol* **20**, 3610–3617 (2013).
14. Xin, Y. *et al.* Meta-Analysis of the Safety and Efficacy of Interferon Combined With Dacarbazine Versus Dacarbazine Alone in Cutaneous Malignant Melanoma. *Medicine (Baltimore)*. **95**, e3406 (2016).
15. Luke, J. J. & Schwartz, G. K. Chemotherapy in the management of advanced cutaneous malignant melanoma. *Clin. Dermatol.* **31**, 290–297 (2013).
16. Forschner, A., Heinrich, V., Pflugfelder, A., Meier, F. & Garbe, C. The role of radiotherapy in the overall treatment of melanoma. *Clin. Dermatol.* **31**, 282–289 (2013).
17. Guadarrama-Orozco, J. A. *et al.* Braf V600E mutation in melanoma: translational current scenario. *Clin. Transl. Oncol.* **18**, 863–871 (2016).
18. Nikolaou, V., Stratigos, A., Bafaloukos, D. & Katsambas, A. Antiangiogenic and antiapoptotic treatment in advanced melanoma. *Clin. Dermatol.* **31**, 257–263 (2013).
19. Koller, K. M. *et al.* Malignant melanoma—The cradle of anti-neoplastic immunotherapy. *Critical Reviews in Oncology/Hematology* **106**, 25–54 (2016).
20. Verdegaal, E. M. E. *et al.* Neoantigen landscape dynamics during human melanoma-T cell interactions. *Nature* **536**, 91–5 (2016).
21. Lee, C., Collichio, F., Ollila, D. & Moschos, S. Historical review of melanoma treatment and outcomes. *Clin. Dermatol.* **31**, 141–147 (2013).
22. Gogas, H., Polyzos, A. & Kirkwood, J. Immunotherapy for advanced melanoma: Fulfilling the promise. *Cancer Treatment Reviews* **39**, 879–885 (2013).

23. Somasundaram, R. & Herlyn, M. Nivolumab in combination with ipilimumab for the treatment of melanoma. *Expert Rev. Anticancer Ther.* **15**, 1135–1141 (2015).
24. Vanneman, M. & Dranoff, G. Combining immunotherapy and targeted therapies in cancer treatment. *Nat Rev Cancer* **12**, 237–251 (2012).
25. Goutagny, N., Estornes, Y., Hasan, U., Lebecque, S. & Caux, C. Targeting pattern recognition receptors in cancer immunotherapy. *Target. Oncol.* **7**, 29–54 (2012).
26. Krysko, O., Løve Aaes, T., Bachert, C., Vandenabeele, P. & Krysko, D. V. Many faces of DAMPs in cancer therapy. *Cell Death Dis.* **4**, e631 (2013).
27. Vega, M. T. M. A new era for innate immunity. *Allergol et Immunopathol* **36**, 164–175 (2008).
28. Maio, M. Melanoma as a model tumour for immuno-oncology. *Ann. Oncol.* **23**, (2012).
29. Aguilera, R. *et al.* Heat-shock induction of tumor-derived danger signals mediates rapid monocyte differentiation into clinically effective dendritic cells. *Clin. Cancer Res.* **17**, 2474–2483 (2011).
30. López, M. N. *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 ??-expressing T cells. *J. Clin. Oncol.* **27**, 945–952 (2009).
31. Durán-Aniotz, C. *et al.* The immunological response and post-treatment survival of DC-vaccinated melanoma patients are associated with increased Th1/Th17 and reduced Th3 cytokine responses. *Cancer Immunol. Immunother.* **62**, 761–772 (2013).
32. Kuylensstierna, C. *et al.* NKG2D performs two functions in invariant NKT cells: Direct TCR-independent activation of NK-like cytotoxicity and co-stimulation of activation by CD1d. *Eur. J. Immunol.* **41**, 1913–1923 (2011).
33. Juno, J. A., Keynan, Y. & Fowke, K. R. Invariant NKT Cells: Regulation and Function during Viral Infection. *PLoS Pathog.* **8**, (2012).
34. Godfrey, D. I., Stankovic, S. & Baxter, A. G. Raising the NKT cell family. *Nat. Immunol.* **11**, 197–206 (2010).
35. Berzins, S. P., Smyth, M. J. & Baxter, A. G. Presumed guilty: natural killer T cell defects and human disease. *Nat. Rev. Immunol.* **11**, 131–42 (2011).
36. Pereira, C. S. & Macedo, M. F. CD1-restricted T cells at the crossroad of innate and adaptive immunity. *J. Immunol. Res.* **2016**, (2016).
37. Metelitsa, L. S. Anti-tumor potential of type-I NKT cells against CD1d-positive and CD1d-negative tumors in humans. *Clin. Immunol.* **140**, 119–129 (2011).
38. Rossjohn, J., Pellicci, D. G., Patel, O., Gapin, L. & Godfrey, D. I. Recognition of CD1d-restricted antigens by natural killer T cells. *Nat. Rev. Immunol.* **12**, 845–57 (2012).
39. Moody, D. B. & Cotton, R. N. Four pathways of CD1 antigen presentation to T cells. *Curr. Opin. Immunol.* **46**, 127–133 (2017).
40. Shiina, T. *et al.* Genomic Anatomy of a Premier Major Histocompatibility Complex Paralogous Region on Chromosome 1q21-q22 Genomic Anatomy of a Premier Major Histocompatibility Complex Paralogous Region on Chromosome 1q21 – q22. *Genome Res.* 789–802 (2001). doi:10.1101/gr.175801
41. Joyce, S., Girardi, E. & Zajonc, D. M. NKT cell ligand recognition logic: molecular basis for a synaptic duet and transmission of inflammatory effectors. *J. Immunol.* **187**, 1081–1089 (2011).
42. Issazadeh-Navikas, S. NKT cell self-reactivity: Evolutionary master key of immune homeostasis? *J. Mol. Cell Biol.* **4**, 70–78 (2012).
43. Brutkiewicz, R. R. CD1d Ligands: The Good, the Bad, and the Ugly. *J. Immunol.*

- 177, 769–775 (2006).
44. Seino, K.-I. & Taniguchi, M. Functionally distinct NKT cell subsets and subtypes. *J. Exp. Med.* **202**, 1623–6 (2005).
 45. Mallevaey, T. *et al.* A molecular basis for NKT cell recognition of CD1d-self-antigen. *Immunity* **34**, 315–326 (2011).
 46. Tashiro, T. Structure-activity relationship studies of novel glycosphingolipids that stimulate natural killer T-cells. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **76**, 1055–1067 (2012).
 47. Keller, C. W., Freigang, S. & Lünemann, J. D. Reciprocal crosstalk between dendritic cells and natural Killer T Cells: Mechanisms and therapeutic potential. *Front. Immunol.* **8**, 1–13 (2017).
 48. Crowe, N. Y. *et al.* Differential antitumor immunity mediated by NKT cell subsets in vivo. *J. Exp. Med.* **202**, 1279–88 (2005).
 49. Giaccone, G. *et al.* A phase I study of the natural killer T-cell ligand alpha-galactosylceramide (KRN7000) in patients with solid tumors. *Clin. Cancer Res.* **8**, 3702–3709 (2002).
 50. Nagato, K. *et al.* Accumulation of activated invariant natural killer T cells in the tumor microenvironment after ??-galactosylceramide-pulsed antigen presenting cells. *J. Clin. Immunol.* **32**, 1071–1081 (2012).
 51. Nicol, A. J., Tazbirkova, A. & Nieda, M. Comparison of clinical and immunological effects of intravenous and intradermal administration of ??-GalactosylCeramide (KRN7000)-pulsed dendritic cells. *Clin. Cancer Res.* **17**, 5140–5151 (2011).
 52. Matyash, V., Liebisch, G., Kurzchalia, T. V., Shevchenko, A. & Schwudke, D. Lipid extraction by methyl-tert-butyl ether for high-throughput lipidomics. *J. Lipid Res.* **49**, 1137–46 (2008).
 53. Sharma, A. A., Chew, L., Ladd, M., Jen, R. & Lavoie, P. M. Ex vivo purification and characterization of human invariant natural killer T cells. *J. Immunol. Methods* **373**, 1–7 (2011).
 54. Ulivi, V. *et al.* Anti-inflammatory activity of monogalactosyldiacylglycerol in human articular cartilage in vitro: activation of an anti-inflammatory cyclooxygenase-2 (COX-2) pathway. *Arthritis Res. Ther.* **13**, R92 (2011).
 55. Larsen, E., Kharazmi, A., Christensen, L. P. & Christensen, S. B. An antiinflammatory galactolipid from rose hip (*Rosa canina*) that inhibits chemotaxis of human peripheral blood neutrophils in vitro. *J. Nat. Prod.* **66**, 994–995 (2003).
 56. Kain, V. *et al.* Resolvin D1 activates the inflammation resolving response at splenic and ventricular site following myocardial infarction leading to improved ventricular function. *J. Mol. Cell. Cardiol.* **84**, 24–35 (2015).
 57. Miyahara, T. *et al.* D-series resolvin attenuates vascular smooth muscle cell activation and neointimal hyperplasia following vascular injury. *FASEB J.* **27**, 2220–2232 (2013).
 58. Dalli, J. *et al.* Resolvin D3 and aspirin-triggered resolvin D3 are potent immunoresolvents. *Chem. Biol.* **20**, 188–201 (2013).
 59. Croft, K. D., Beilin, L. J. & Ford, G. L. Differential inhibition of thromboxane B2 and leukotriene 84 biosynthesis by two naturally occurring acetylenic fatty acids. *Biochim. Biophys. Acta (BBA)/Lipids Lipid Metab.* **921**, 621–624 (1987).
 60. Huang, J. D., Amaral, J., Lee, J. W., Larrayoz, I. M. & Rodriguez, I. R. Sterculic acid antagonizes 7-ketocholesterol-mediated inflammation and inhibits choroidal neovascularization. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Biol. Lipids* **1821**, 637–646 (2012).
 61. Lu, H.-J. *et al.* Ruscogenin ameliorates diabetic nephropathy by its anti-inflammatory and anti-fibrotic effects in streptozotocin-induced diabetic rat. *BMC Complement. Altern. Med.* **14**, 110 (2014).

62. Kx, L., Tan, J., Wang, B., Lx, X. & Zheng, C. In-vitro Antitumor Activity and Antifungal Activity of Pennogenin Steroidal Saponins from paris *Polyphylla* var . *yunnanensis*. **10**, 279–286 (2011).
63. Zhang, Z.-J., Yang, Y.-K. & Wu, W.-Z. Bufalin attenuates the stage and metastatic potential of hepatocellular carcinoma in nude mice. *J. Transl. Med.* **12**, 57 (2014).
64. Aranow, C. Vitamin D and Immune System. *J Investig Med* **59**, 881–886 (2011).
65. Gapin, L., Godfrey, D. I. & Rossjohn, J. Natural Killer T cell obsession with self-antigens. *Curr. Opin. Immunol.* **25**, 168–173 (2013).
66. Gonzalez, F. E. *et al.* Tumor cell lysates as immunogenic sources for cancer vaccine design. *Hum. Vaccin. Immunother.* **10**, 3261–3269 (2014).
67. Ko, H., Lee, J., Kim, Y., Lee, K. & Kang, C. Immunosuppressive myeloid-derived suppressor cells can be converted into immunogenic APCs with the help of activated NKT cells: an alternative cell-based antitumor vaccine. *J Immunol* **182**, 1818–1828 (2009).
68. Muranski, P. *et al.* Tumor-specific Th17-polarized cells eradicate large established melanoma. *Blood* **112**, 362–373 (2008).
69. Buschard, K., Månsson, J. E., Roep, B. O. & Nikolic, T. Self-Glycolipids Modulate Dendritic Cells Changing the Cytokine Profiles of Committed Autoreactive T Cells. *PLoS One* **7**, 6–12 (2012).
70. Salazar-Onfray, F., Pereda, C., Reyes, D. & López, M. N. TAPcells, the Chilean dendritic cell vaccine against melanoma and prostate cancer. *Biol. Res.* **46**, 431–440 (2013).

Figuras Complementarias

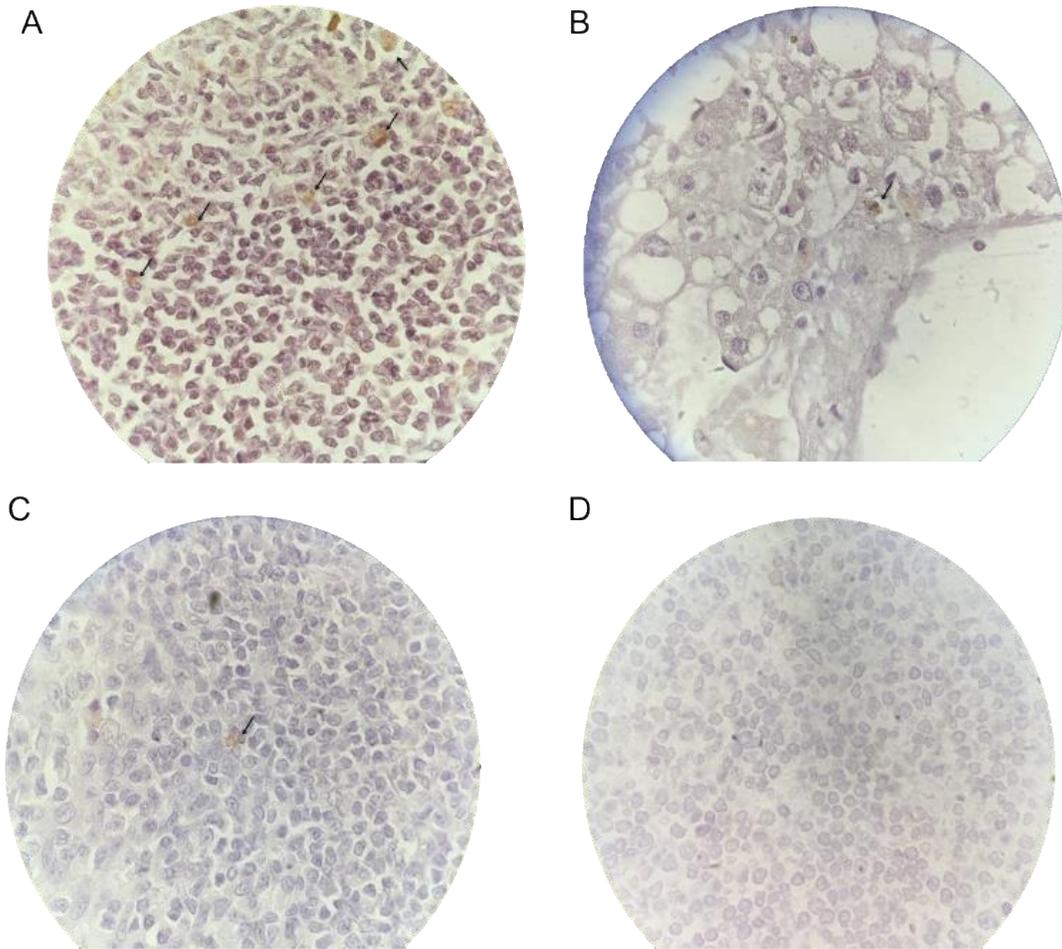


Figura 1: Determinación de células Va24⁺ por Inmunohistoquímica. A. Adenocarcinoma de colon, donde se muestran 5 células positivas. B. Hepatocarcinoma donde se muestra 1 célula positiva. C. Tonsila palatina, donde se evidencia 1 célula positiva. D. Tonsila palatina, control negativo. Imágenes tomadas desde Microscopio en aumento 60x.

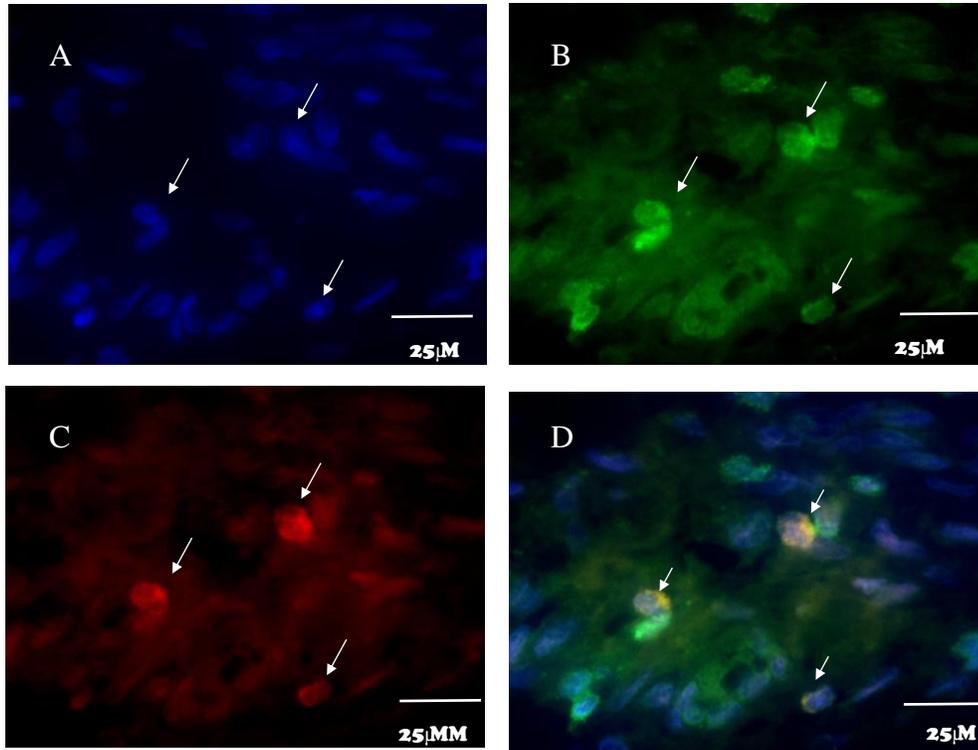


Figura 2: Determinación de células $V\alpha 24^+$ por Inmunofluorescencia en células de melanoma. A. Muestra de melanoma teñida con DAPI para marca nuclear. B. Muestra de melanoma teñida con anticuerpo anti CD3 y anticuerpo secundario anti conejo conjugado a *Alexa Fluor 488*. C. Muestra de melanoma teñida con anticuerpo anti TCR $V\alpha 24$ y anticuerpo secundario anti ratón conjugado a Texas Red. D. Muestra de melanoma fusionada para integrar los distintos colores. Se evidencia 3 células con marca positiva concordante con células iNKT.

Variable	Muestra
Número de pacientes	68
Edad ($\chi \pm DS$)	58,6 ($\pm 15,94$)
Índice de masculinidad	44%
Tiempo de seguimiento, meses ($\chi \pm DS$)	81,15 ($\pm 38,78$)
Índice <i>Breslow</i>	2,09 ($\pm 1,29$)
≤ 1 mm	51,4%
> 1 mm	48,6%
tumores infiltrados por Células CD3 ⁺ (n,%)	65 (96%)
tumores infiltrados por Células iNKT (n,%)	36 (53%)
Tabla 1: Resumen de la muestra de pacientes analizados.	

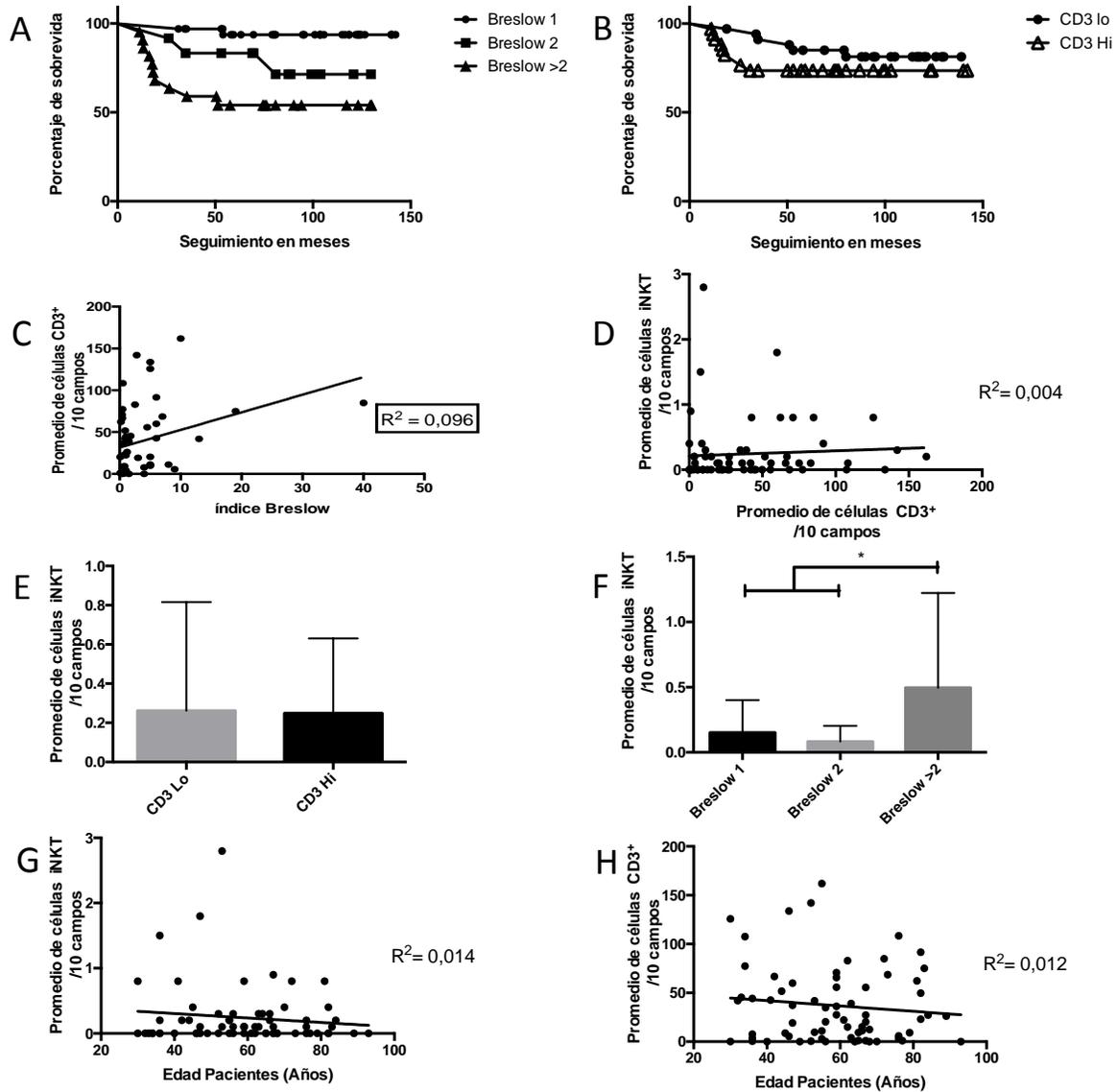


Figura 3: Células iNKT infiltran tumores de melanoma, tanto en estadios precoces como avanzados de la enfermedad, independiente del grado de infiltración de células CD3⁺. **A.** Curva Kaplan-Meier para el índice *Breslow*, que muestra menor supervivencia en pacientes con tumores avanzados ($p < 0,001$). **B.** Curva Kaplan-Meier para la infiltración por CD3⁺, que no muestra diferencia en esta población entre infiltración alta (>50) contra infiltración baja. **C.** Correlación entre índice de *Breslow* e infiltración por células CD3⁺, que no muestra correlación. **D y E.** Correlación entre infiltración por células CD3⁺ y células iNKT. No se evidencia diferencias significativas en infiltración por iNKT en tumores con alto nivel de infiltración por CD3⁺ y bajo nivel de infiltración. **F.** Infiltración por células iNKT en tumores según Índice *Breslow*. Tumores en estadios *Breslow* >2 tienen mayores niveles de infiltración por células iNKT ($p = 0,03$). **G.** Correlación entre Edad de pacientes e infiltración por células iNKT que no demuestra correlación. **H.** Correlación entre Edad de pacientes e infiltración por células CD3⁺ que no demuestra correlación.

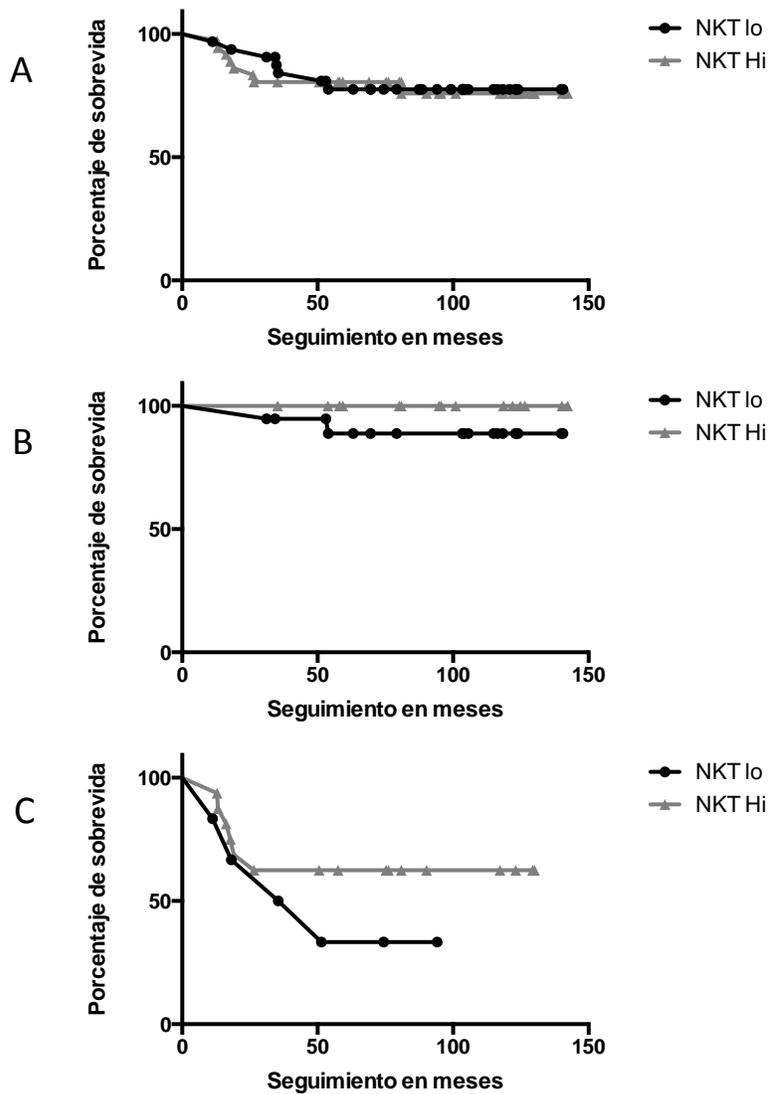
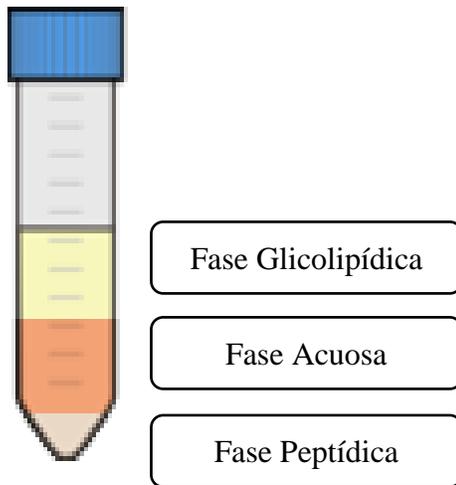


Figura 4: Grado de infiltración por células NKT en muestras de melanoma no se correlaciona con incremento en la supervivencia de pacientes en todos los estadios de la enfermedad. A. No existe diferencia significativa en la supervivencia global de pacientes con melanoma en todas las etapas con el grado de infiltración de células iNKT. **B.** Curva Kaplan Meier en pacientes pesquisados en etapa *Breslow 1*. **C.** Curva Kaplan Meier en pacientes pesquisados en etapas *Breslow > 2*. NKT lo: sin infiltración por iNKT; NKT hi: Con infiltración por iNKT.

A



B

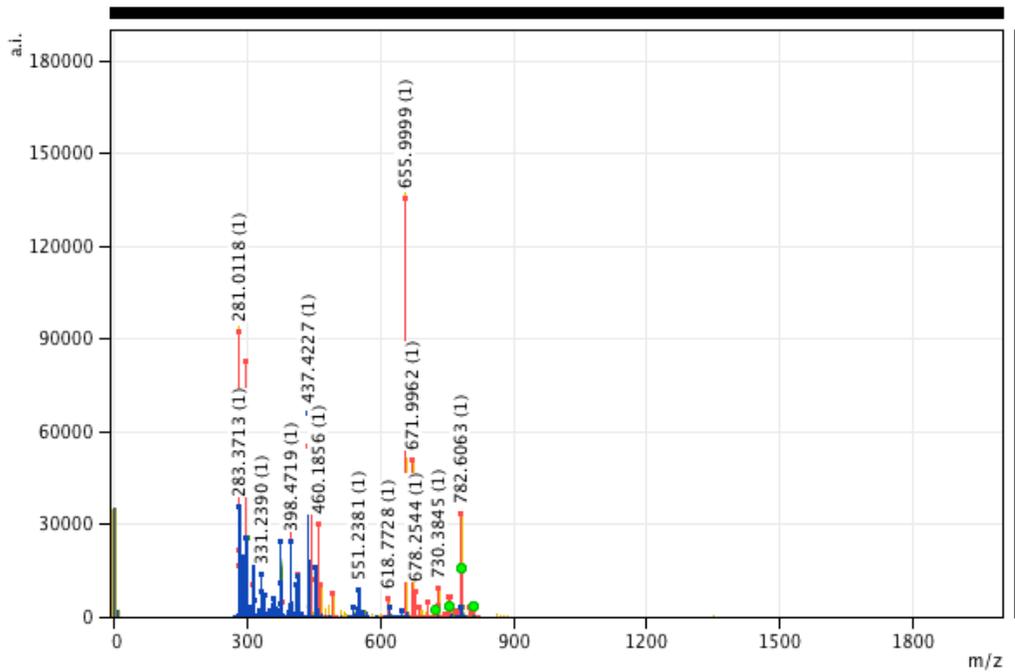


Figura 5: Análisis de la purificación de Glicolípidos presentes en TRIMEL. A. Representación del método de extracción de glicolípidos presentes en TRIMEL. La fracción glicolípida fue analizada por espectrometría de masa. **B.** Gráfico m/z de glicolípidos de TRIMEL.

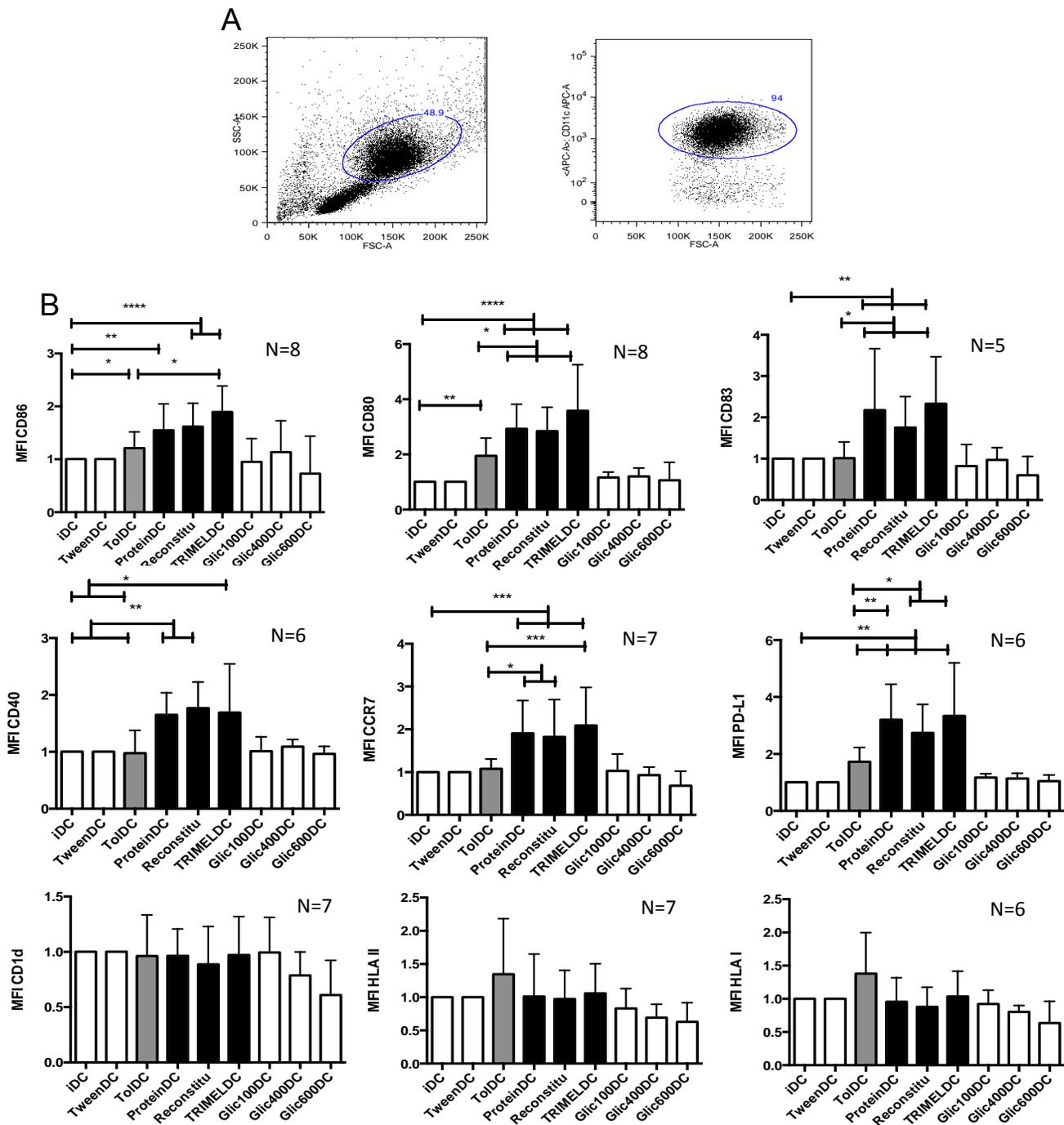


Figura 6: Glicolípidos presentes en TRIMEL no inducen la expresión de moléculas de maduración en DCs. Células Dendríticas fueron estimuladas con dosis crecientes de Glicolípidos y se graficó la inducción de marcadores de superficie de maduración. **A.** Dot plot representativo de la población CD11c⁺. **B.** Fracción glicolipídica de TRIMEL no induce la expresión de marcadores de superficie, en comparación con células tratadas sólo con el vehículo de glicolípidos (PBS Tween 0,05%). Por su parte, la fracción peptídica, la condición reconstituida de TRIMEL (fracción peptídica + 100 µg de Glicolípidos) o TRIMEL son capaces de inducir la expresión de CD80, CD83, CD86, CD40, CCR7 y PD-L1. (N=8) (Se grafica media ± DS; se analizaron resultados usando *Mann-Whitney* de una cola, para muestras no pareadas; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$)

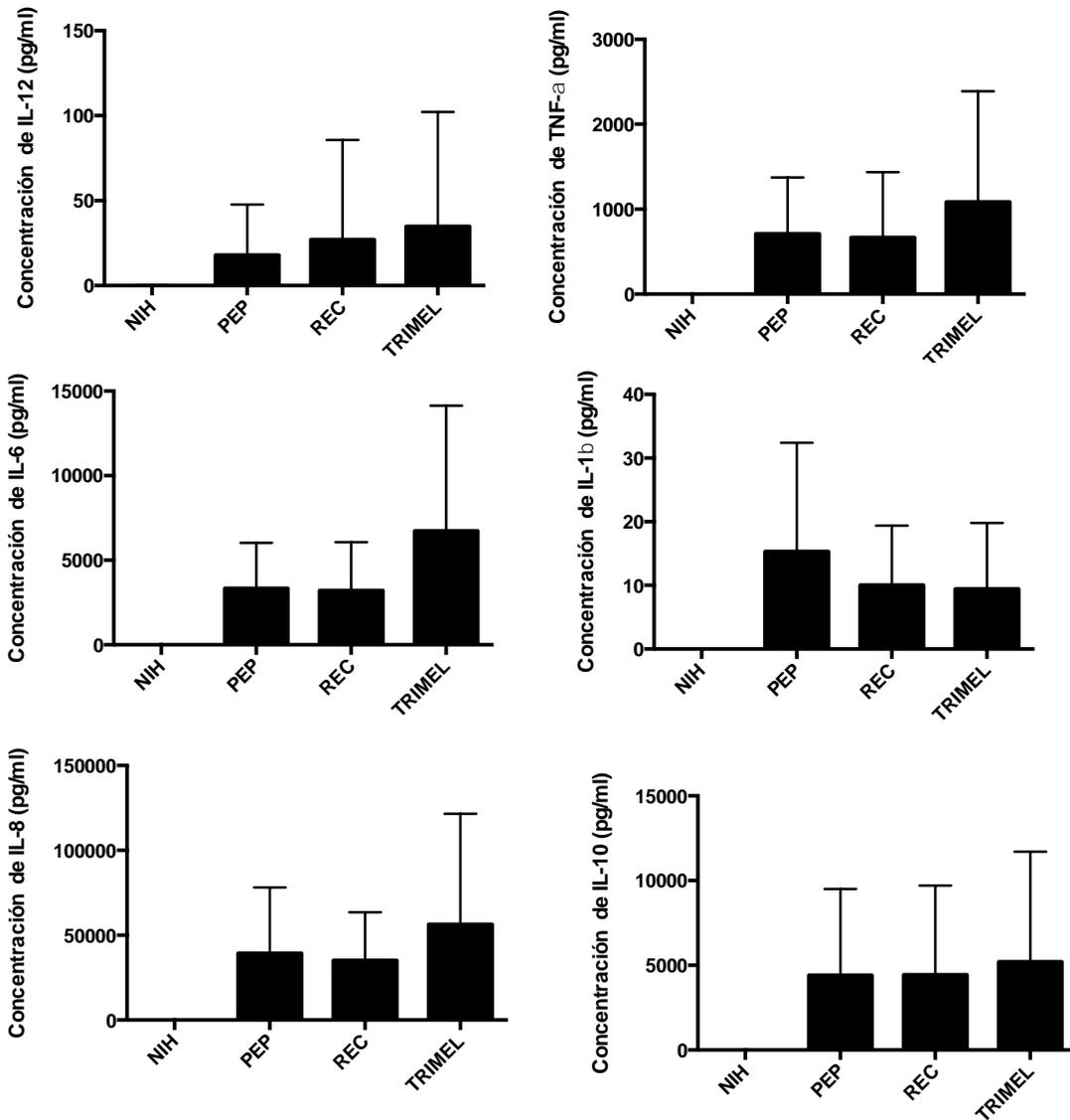


Figura 7: Glicolípidos presentes en TRIMEL no inducen la secreción de citoquinas IL-12, TNF- α , IL-10, IL-6, IL-1 β , IL-8 por parte de DCs. Células Dendríticas fueron estimuladas con péptidos y glicolípidos de TRIMEL y se graficó la secreción de citoquinas medidas mediante CBA kit (eBioscience). No se evidenciaron diferencias entre las condiciones evaluadas.

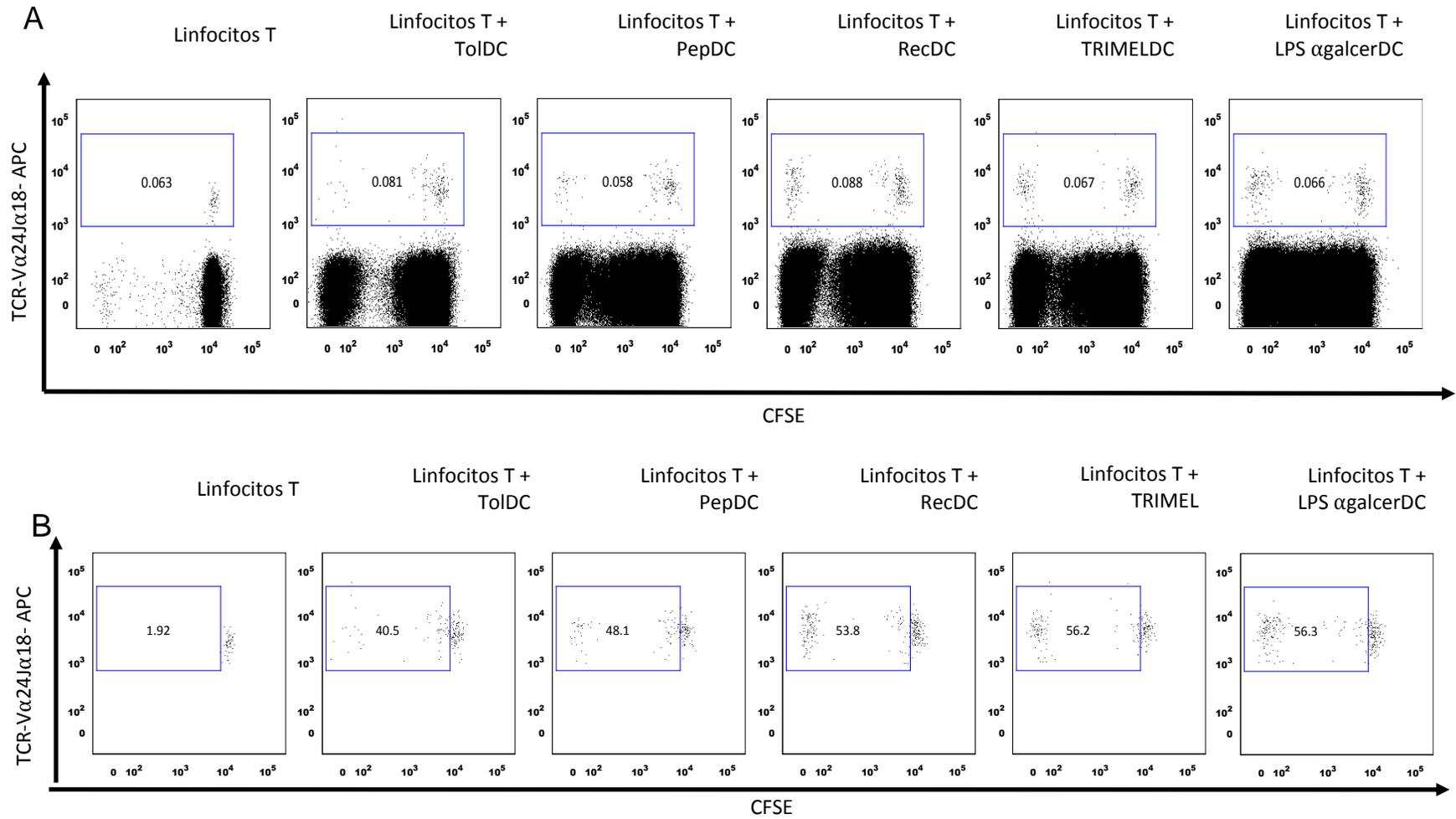


Figura 8: DCs maduras con fracciones peptídicas de TRIMEL inducen proliferación de células linfocitarias. A Dot plot representativo de ensayo de proliferación de células linfocitarias. Estrategia de *gating* en población TCR Va24Ja18. **B** *Dotplot* representativo de población de células TCR Va24Ja18⁺ CFSE^{low}

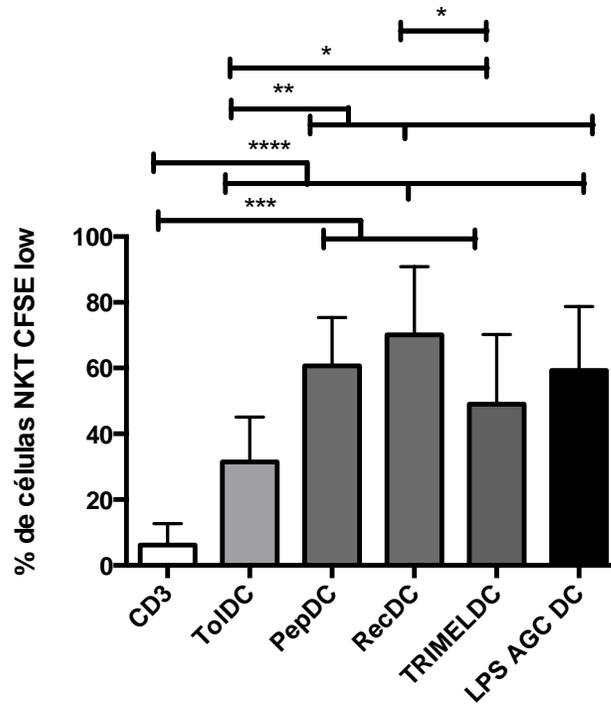


Figura 9: DCs maduras con fracciones peptídicas de TRIMEL inducen proliferación de células linfocitarias. Gráfico resumen diferencia en porcentaje de células TCR V α 24J α 18⁺ CFSE^{low} para diferentes condiciones. Células CD3⁺ cultivadas con DCs maduras con las fracciones de TRIMEL inducen proliferación de células TCR V α 24J α 18⁺ CFSE^{low} de manera similar que células maduras con LPS y α galcer. Interesantemente, todas estas condiciones inducen mayor proliferación de estas células que las cultivadas con el protocolo ToIDC, N=9 (Se grafica media \pm DS; se analizaron resultados usando *Mann-Whitney* de una cola, para muestras no pareadas; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$)

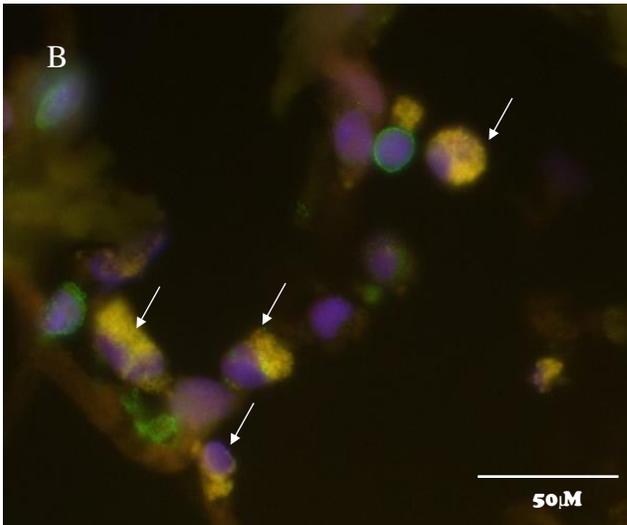
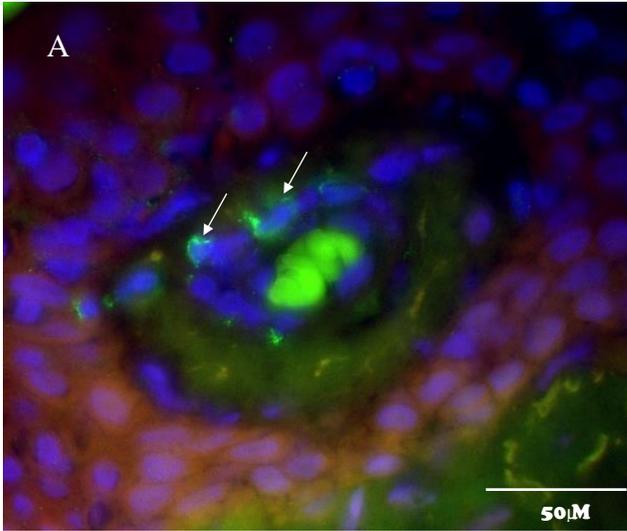


Figura 10: Detección de células iNKT en biopsias de DTH de pacientes sometidos a protocolo TAPCells. Imagen representativa de muestras de DTH de 3 pacientes sometidos a protocolo TAPCells. En los 3 pacientes se evidenció infiltración por células CD3⁺. En B se puede evidenciar infiltración por células CD3⁺ Vα24⁺.

