

UCH-FC
MAG-B
F634
C.L



UNIVERSIDAD DE CHILE -FACULTAD DE CIENCIAS -ESCUELA DE POSTGRADO

“Los linfocitos Tc17 poseen características de linfocitos T de memoria”

Tesis entregada a la Universidad de Chile en cumplimiento parcial de los requisitos para optar al grado de:

Magíster en Ciencias Biológicas

Facultad De Ciencias
Universidad de Chile
Por

Felipe Matías Flores Santibáñez

Directora de Tesis:
Dra. María Rosa Bono

Co-Directora de Tesis:
Dra. Daniela Sauma

Enero 2017
Santiago – Chile

ESCUELA DE POSTGRADO – FACULTAD DE CIENCIAS – UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS

UNIVERSIDAD DE CHILE

INFORME DE APROBACION

TESIS DE MAGÍSTER

Se informa a la Escuela de Postgrado de la Facultad de Ciencias que la Tesis de Magíster presentada por el candidato,

Felipe Matías Flores Santibáñez

Ha sido aprobada por la comisión de evaluación de la tesis como requisito para optar al grado de Magíster en Ciencias Biológicas en el examen de defensa privada de tesis rendido el día 11 de enero de 2017.

Dr. María Rosa Bono M.
Directora de Tesis



Dra. Daniela Sauma M.
Co-directora de Tesis



Comisión de Evaluación de la Tesis

Dra. Verónica Palma
Presidente Comisión



Dr. Álvaro Lladser
Evaluador



Santiago de Chile, enero de 2017.

Lo importante es no dejar de hacerse preguntas...

Albert Einstein

BIOGRAFÍA



Nací el 11 de diciembre de 1989, en Talcahuano, VIII Región, Chile. Cuando tenía un mes de vida, mis padres se mudaron a Santiago, lugar donde crecí. Terminé mi enseñanza media en el Liceo de Aplicación y a los 17 años de edad, motivado con el mundo de la ciencia, decidí entrar a la Universidad de Chile a estudiar Ingeniería en Biotecnología Molecular. Luego de egresar del pregrado, realicé mi seminario de título en el laboratorio de Inmunología bajo la dirección de la Dra. María Rosa Bono, la Dra. Daniela Sauma y el Dr. Mario Rosemblatt, quienes han guiado mis primeros pasos en la investigación.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a la familia del Inmunolab por acogerme en estos 4 años. A mis tutores Daniela Sauma, María Rosa Bono y Mario Roseblatt por guiarme y motivarme a crecer como investigador. A los compañeros Domy, Cote, Gaby, Leo, Pame, Yessia, Zoila, Daniel, Sarah, Bárbara y Oscar por toda la ayuda brindada y las risas compartidas.

Agradezco también a mi Familia, a mis padres Tito y Gaby; a mis hermanos, Catalina y Pablo; y a los peques de la casa, el Vicentito y la Feñita por el amor y apoyo incondicional que me han brindado constantemente.

A Víctor le agradezco por acompañarme en este viaje, por aguantar mis frustraciones, y también por celebrar mis logros. Por apoyarme en mis desafíos personales, y por querer siempre lo mejor para mí. A mi amiga Cony, por estar siempre ahí, apoyándome en todas. A mi amiga Cote, por ese cariño que me has demostrado y esa alegría que contagias.

Finalmente quisiera agradecer a las instituciones que financiaron este trabajo: A los proyectos CONICYT (PFB-16), FONDECYT (11121478 y 1140431) y FONDEQUIP (EQM114137). Y también a la beca de financiamiento para mis estudios de posgrado CONICYT-PCHA/MagísterNacional/2014-22141202.

ÍNDICE

BIOGRAFÍA.....	iii
AGRADECIMIENTOS.....	iv
ÍNDICE.....	v
ÍNDICE DE FIGURAS.....	vii
ÍNDICE DE TABLAS.....	viii
LISTA DE ABREVIATURAS.....	ix
1. RESUMEN.....	1
2. ABSTRACT.....	3
3. INTRODUCCIÓN.....	5
3.1 Inmunidad adaptable y memoria inmunológica.....	5
3.2 Linfocitos T CD8+: vírgenes, efectores y de memoria.....	6
3.3 Modelo de potencial decreciente.....	9
3.4 Inmunoterapia contra el cáncer: Terapia adoptiva de linfocitos T.....	10
3.5 Diversidad funcional en los linfocitos T CD8+.....	12
3.6 Linfocitos Tc17 y su potencial antitumoral.....	13
4. HIPÓTESIS.....	16
5. OBJETIVOS.....	16
5.1 Objetivo general.....	16
5.2 Objetivos específicos.....	16
6. MATERIALES Y MÉTODOS.....	17
6.1 Materiales.....	17
6.1.1 Anticuerpos.....	17
6.1.2 Ratones.....	17
6.1.3 Células B16-OVA.....	18
6.2 Métodos.....	19
6.2.1 Aislamiento de células de bazo, linfonodos y tumor.....	19
6.2.2 Separación inmunomagnética de linfocitos T CD8+ totales.....	20
6.2.3 <i>Cell sorting</i> de linfocitos T CD8+ vírgenes.....	21
6.2.4 Generación de linfocitos Tc1 y Tc17 <i>in vitro</i>	21
6.2.5 Evaluación de moléculas de superficie por citometría de flujo.....	22

6.2.6	Evaluación de células productoras de citoquinas por citometría de flujo	22
6.2.7	Obtención y marcaje de células de sangre	23
6.2.8	PCR en tiempo real	24
6.2.9	Persistencia de linfocitos Tc1 y Tc17 <i>in vivo</i>	25
6.2.10	Expansión secundaria de linfocitos Tc1 y Tc17 <i>in vivo</i>	26
6.2.11	Modelo de protección antitumoral <i>in vivo</i>	26
6.2.12	Análisis estadístico	27
7.	RESULTADOS	28
7.1	Generación de linfocitos Tc17 <i>in vitro</i>	28
7.2	Fenotipo de linfocitos Tc17 generados <i>in vitro</i>	29
7.3	Perfil transcripcional de linfocitos Tc17 generados <i>in vitro</i>	32
7.4	Los linfocitos Tc17 persisten <i>in vivo</i> y muestran un fenotipo propio de linfocitos T de memoria	34
7.5	Los linfocitos Tc17 se expanden <i>in vivo</i> frente a un segundo desafío con el antígeno	37
7.6	Los linfocitos Tc17 confieren inmunidad antitumoral	41
8.	DISCUSIÓN	47
9.	RESUMEN DE RESULTADOS	54
10.	CONCLUSIONES	55
11.	BIBLIOGRAFÍA	56

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Generación de linfocitos Tc17 <i>in vitro</i>	28
Figura 2. Los linfocitos Tc17 generados <i>in vitro</i> son CD44 ^{hi} pero no expresan CD25 ni granzima B	30
Figura 3. Los linfocitos Tc17 generados <i>in vitro</i> producen altos niveles de IL-2.....	31
Figura 4. Los linfocitos Tc17 generados <i>in vitro</i> poseen un perfil transcripcional de linfocitos T de memoria.....	33
Figura 5. Persistencia de linfocitos Tc1 y Tc17 <i>in vivo</i>	35
Figura 6. Los linfocitos Tc17 muestran un fenotipo de linfocitos T de memoria <i>in vivo</i>	36
Figura 7. Los linfocitos Tc17 pueden expandirse <i>in vivo</i> frente a una segunda exposición al antígeno:.....	38
Figura 8. Los linfocitos Tc17 continúan mostrando un fenotipo de memoria luego de la expansión secundaria.....	40
Figura 9. Los linfocitos Tc17 confieren protección frente a un desafío tumoral	42
Figura 10. Los linfocitos Tc17 persisten en el órgano linfoide drenante del tumor	43
Figura 11. Los linfocitos Tc17 producen mayores niveles de IFN- γ e IL-2 en ratones con tumor	44
Figura 12. Los linfocitos Tc17 producen una respuesta polifuncional en ratones con tumor	46

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Partidores utilizados en el PCR en tiempo real.....	25
--	----

LISTA DE ABREVIATURAS

ANOVA	Análisis de varianza
Bcl	<i>B cell lymphoma</i>
Blimp-1	<i>PR domain zinc finger protein 1</i>
CCR	Receptor de quimioquina con motivo C-C
CD	Clúster de diferenciación
CFA	Adyuvante completo de Freund (<i>Complete Freund Adjuvant</i>)
Eomes	<i>Eomesodermin</i>
Foxp1	<i>Forkhead box protein P1</i>
GzmB	Granzima B (<i>granzyme B</i>)
HBSS	<i>Hank's Balanced Salt Solution</i>
Id3	<i>Inhibitor of DNA binding 3</i>
IFN	Interferón
IL	Interleuquina
IMDM	<i>Iscove's Modified Dulbecco's Media</i>
IMF	Intensidad media de fluorescencia
Klf	<i>Kruppel-like factor</i>
KLRG1	<i>Killer cell lectin-like receptor G1</i>
Lef-1	<i>Lymphoid enhancer binding factor 1</i>
MHC	Complejo principal de histocompatibilidad (<i>Major Histocompatibility Complex</i>)
MPEC	Célula efectora precursora de memoria (<i>Memory Precursor Effector Cell</i>)
ns	no significativo
OVA	Ovoalbúmina

PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i>
Pfn1	Perforina 1 (<i>perforin 1</i>)
PLN	Linfonodo periférico (<i>Peripheral Lymph Node</i>)
PMA	<i>Phorbol 12-Myristate 13-Acetate</i>
ROR	<i>RAR-related Orphan Receptor</i>
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute medium</i>
SFB	Suero Fetal Bovino
SLEC	Célula efectora de vida corta (<i>Short-Lived Effector Cell</i>)
T-bet	<i>T-box transcription factor 21</i>
Tc	T citotóxico
Tcf-7	<i>Transcription factor 7</i>
T _{CM}	T de memoria central (<i>Central Memory T cell</i>)
TCR	Receptor de células T
TdLN	Linfonodo drenante del tumor (<i>Tumor-draining Lymph Node</i>)
T _{EM}	T de memoria efectora (<i>Effector Memory T cell</i>)
TGF- β	<i>Transforming Growth Factor β</i>
T _N	T virgen (<i>Naive T cell</i>)
TNF	Factor de necrosis tumoral
T _{RM}	T de memoria residente (<i>Resident Memory T cell</i>)
Zeb2	<i>Zinc finger E-box-binding homeobox 2</i>

1. RESUMEN

Los linfocitos T CD8+ citotóxicos tipo 1 (Tc1) producen interferón (IFN)- γ y presentan una alta capacidad citotóxica. A pesar de esto, su desempeño en esquemas de inmunoterapia antitumoral está limitado por el hecho que son células senescentes incapaces de autorenovarse y sobrevivir a largo plazo. En este sentido, estudios recientes convergen en que los linfocitos T CD8+ de memoria serían los candidatos ideales para la terapia adoptiva antitumoral, puesto que tienen la capacidad de persistir y proteger al organismo en una amplia ventana de tiempo. Antecedentes de nuestro laboratorio y de la literatura sugieren que un subtipo particular de linfocitos T CD8+ caracterizados por la producción de interleuquina (IL)-17 (Tc17) tienen características compatibles con los linfocitos T de memoria, lo cual los convierte en potenciales candidatos para esquemas de inmunoterapia celular.

En este trabajo, nos propusimos evaluar el fenotipo y las propiedades funcionales de los linfocitos Tc17, de manera de dilucidar su potencial terapéutico antitumoral. Para lograr este objetivo, generamos linfocitos Tc1 y Tc17 mediante un protocolo de diferenciación *in vitro* y transferimos adoptivamente estas células en ratones C57BL/6. Los resultados obtenidos indican que los linfocitos Tc17 generados *in vitro* expresan mayores niveles de genes y proteínas relacionadas al fenotipo memoria (Tcf-7, Lef-1, Bcl-6, IL-2) y menores niveles de genes y proteínas relacionadas al programa efector (Tbet, Eomes, Blimp-1, CD25, GzmB, Pfn1, IFN- γ , TNF- α) en comparación a los linfocitos Tc1. Interesantemente, los linfocitos Tc17 mostraron mayor persistencia *in vivo* así como un fenotipo característico de células de memoria (CD127+KLRG1-) en contraste a los linfocitos Tc1 (CD127-KLRG1+). Asimismo, observamos que sólo los linfocitos Tc17

logran expandirse *in vivo* en respuesta a una segunda estimulación con el antígeno (expansión secundaria). Consistentemente con estos datos, la transferencia adoptiva de linfocitos Tc17 confiere inmunidad frente a un desafío tumoral, a diferencia de la transferencia adoptiva de linfocitos Tc1. Mecanísticamente, este resultado podría ser explicado en parte ya que la progenie de los linfocitos Tc17: (1) produce mayores niveles de las citoquinas antitumorales IL-2 e IFN- γ , (2) corresponden a células polifuncionales, y (3) presentan un patrón de migración central a través de los linfonodos.

En conjunto, los resultados obtenidos en esta tesis demuestran que los linfocitos Tc17 generados *in vitro* presentan un fenotipo y propiedades funcionales (persistencia y expansión secundaria) similares a los linfocitos T CD8+ de memoria. Interesantemente, esto se correlaciona con un mejor desempeño en un modelo de protección antitumoral. De esta forma, los datos recopilados en este trabajo aportan nuevas evidencias que destacan el potencial de los linfocitos Tc17 en el diseño de nuevos esquemas de inmunoterapia antitumoral más eficientes.

2. ABSTRACT

Type 1 cytotoxic CD8⁺ T (Tc1) cells produce interferon (IFN)- γ and are endowed with high cytotoxic capacity. In spite of this, their performance in immunotherapeutic regimens against cancer has been limited by the fact that they are senescent cells and thus are unable to self-renew and survive in the long term. In this line, recent studies have shown that memory CD8⁺ T lymphocytes are the ideal candidates for adoptive antitumor therapy, because they have the ability to persist and protect the organism in the long term. Data from our lab and the literature suggest that a particular subtype of CD8⁺ T lymphocytes characterized by the production of IL-17 (Tc17 cells) share characteristics with memory T lymphocytes, which makes them potential candidates for T cell immunotherapy.

In this work, we sought to evaluate the phenotype and functional properties of Tc17 cells, in order to elucidate their potential for antitumor immunotherapy. To achieve this goal, we generated Tc1 and Tc17 cells with an *in vitro* differentiation approach and then adoptively transferred these cells into C57BL/6 mice. The results show that *in vitro* generated Tc17 cells express higher levels of genes and proteins related to the memory phenotype (Tcf-7, Lef-1, Bcl-6, IL-2) and lower levels of genes and proteins related to the effector program (T-bet, Eomes, Blimp-1, CD25, GzmB, Pfn1, IFN- γ , TNF- α) compared to Tc1 cells. Interestingly, Tc17 cells showed a greater *in vivo* persistence as well as a memory-like T cell phenotype (CD127⁺ KLRG1⁻) in contrast to Tc1 lymphocytes (CD127⁻ KLRG1⁺). We also observed that only Tc17 cells were able to expand *in vivo* in response to a secondary stimulation with the antigen (secondary expansion). Consistently with these data, the adoptive transfer of Tc17 but not Tc1 cells confers immunity against a tumor challenge. Mechanistically, this result could be explained in part since the progeny

of the Tc17 cells; (1) produce higher levels of the antitumor cytokines interleukin (IL)-2 and IFN- γ , (2) are polyfunctional cells, and (3) have a central pattern of migration through lymph nodes.

Together, the results presented here demonstrate that *in vitro* generated Tc17 cells display a phenotype and functional properties (persistence and secondary expansion) similar to memory CD8⁺ T lymphocytes. Interestingly, this correlates with better performance in an antitumor protection model. Thus, the data collected in this work provide new evidence highlighting the potential of Tc17 lymphocytes in the design of novel and more effective immunotherapies against cancer.

3. INTRODUCCIÓN

3.1 Inmunidad adaptable y memoria inmunológica

El sistema inmune adaptable corresponde a un subconjunto de células, moléculas y procesos del sistema inmune que nos permiten eliminar o prevenir el crecimiento de organismos patógenos y/o células malignas. La respuesta inmune adaptable se puede clasificar en: (1) La respuesta humoral, que es mediada por linfocitos B y se encarga principalmente de la eliminación de patógenos extracelulares y sus toxinas; y (2) la respuesta celular que es mediada por linfocitos T y se encarga principalmente de la eliminación de patógenos intracelulares y células transformadas (Abbas y cols., 2014). Una de las cualidades fundamentales de la inmunidad adaptable es la memoria inmunológica, que nos permite “recordar” nuestro historial antigénico y responder con mayor intensidad frente a antígenos a los que hemos sido expuestos con anterioridad (Sallusto y cols., 2010). Esta propiedad nos permite gozar de inmunidad duradera y altamente eficiente contra patógenos infecciosos y es la base fundamental de las vacunas (Sallusto y cols., 2010). Además, avances recientes en el campo de la inmunología antitumoral sugieren que los linfocitos T de memoria serían los candidatos ideales en esquemas de inmunoterapia celular (Gattinoni y cols., 2012), puesto que conferirían inmunidad prolongada contra tumores primarios y posibles focos de metástasis. Por esta razón, numerosos esfuerzos han sido puestos en dilucidar los mecanismos que gobiernan la formación de los linfocitos T de memoria, de forma de utilizar dicha información en el diseño de nuevas estrategias de inmunoterapia más eficientes.

3.2 Linfocitos T CD8+: vírgenes, efectores y de memoria.

Entender el proceso de generación de linfocitos T de memoria requiere, en primera instancia, comprender el desarrollo de la respuesta inmune adaptable. En esta tesis, me centraré principalmente en los linfocitos T CD8+, clásicamente relacionados con la respuesta citotóxica y cuya función principal es la eliminación directa de células infectadas o transformadas a través de la inducción de apoptosis.

Previo al encuentro con el antígeno, los linfocitos T CD8+ transitan por nuestro organismo vía sistema circulatorio en un estado de reposo, con una baja tasa de proliferación y un bajo consumo energético, en cuyo caso reciben el nombre de linfocitos T vírgenes (Tough y Sprent, 1994; Hamilton y Jameson, 2012). Cada linfocito T CD8+ virgen presenta en su superficie múltiples copias de un único receptor denominado Receptor de Células T (TCR por *T cell receptor*), que no está codificado en la línea germinal, sino que surge a partir de un proceso de recombinación genética que ocurre durante la maduración de los linfocitos T. De esta forma, la respuesta inmune adaptable cuenta con un amplio repertorio de linfocitos T CD8+ que expresan TCRs únicos, cada uno de los cuales reconoce específicamente un péptido determinado unido a una molécula del complejo principal de histocompatibilidad clase I (MHC-I) (complejo péptido/MHC).

El inicio de la respuesta inmune adaptable se produce cuando el TCR de un linfocito T CD8+ virgen es estimulado de forma específica por el complejo péptido/MHC-I presentado por una célula dendrítica madura. Se requieren tres señales para activar a un linfocito T virgen: (1) el reconocimiento específico del complejo péptido/MHC, (2) señales co-estimuladoras y (3) citoquinas (Abbas y cols., 2014). Frente a estos

estímulos, el linfocito T se activa y prolifera, generando millones de linfocitos T específicos contra el antígeno (Blattman y cols., 2002), proceso conocido como expansión clonal. Además de un gran aumento en el número de células antígeno-específicas, los linfocitos T se diferencian hacia células T efectoras. Este “programa efector” les permite a los linfocitos T adquirir las funciones necesarias para ejecutar la respuesta inmune, como por ejemplo la formación de gránulos citotóxicos (granzimas y perforinas), la capacidad de secretar interferón gama (IFN- γ), o la expresión de receptores de quimioquinas que guiarán su migración hacia los sitios de inflamación.

El proceso de diferenciación hacia linfocitos T CD8+ efectores no es homogéneo, pudiéndose distinguir al menos dos subtipos de linfocitos T derivados de la expansión clonal: (1) Las células T efectoras de vida corta (SLECs, por *Short-Lived Effector Cells*) y (2) las células efectoras precursoras de memoria (MPECs, por *Memory Precursor Effector Cells*) (Kaech y cols., 2003). Las SLECs representan el 90–95% de los linfocitos T específicos durante el pico de la respuesta y su función principal es la eliminación de las células infectadas o transformadas. Tienen una alta tasa proliferativa ya que expresan altos niveles del receptor de alta afinidad para IL-2 (IL-2R α o CD25) (Kalia y cols., 2010). Asimismo expresan altos niveles de moléculas efectoras, como granzimas, perforinas e IFN- γ , y son células senescentes que se caracterizan por presentar una alta expresión del receptor inhibitorio KLRG1 (*Killer-cell lectin-like receptor G1*) (Kaech y cols., 2003). Por otro lado, las MPECs son las células que darán origen a los linfocitos T de memoria y representan el 5–10% de los linfocitos T específicos durante el pico de la respuesta. Tienen una baja tasa proliferativa y expresan bajos niveles del receptor de alta afinidad para IL-2 (Kalia y cols., 2010). Las MPECs poseen menor capacidad efectora que las SLECs, pero conservan propiedades como la sobrevivencia y la

autorenovación, dada por la expresión de proteínas anti-apoptóticas (Bcl-2) y receptores de factores de crecimiento (IL-7R α o CD127) (Kaech y cols., 2003). Estas dos subpoblaciones de linfocitos T activados coexisten hasta la eliminación del antígeno, evento que desencadena la fase de contracción en la cual las SLECs son eliminadas vía apoptosis.

Luego de la fase de contracción, las MPECs comienzan su diferenciación a linfocitos T de memoria, los que pueden clasificarse en al menos dos subtipos: Los linfocitos T de memoria central (T_{CM}, por *central memory T cell*) y los linfocitos T de memoria efectora (T_{EM}, por *effector memory T cell*) (Mueller y cols., 2013). Estos subtipos celulares difieren principalmente en su patrón de migración, capacidad proliferativa y capacidad efectora. Los linfocitos T_{CM} se caracterizan por expresar la integrina L-selectina (CD62L) y el receptor de quimioquinas CCR7, lo que les permite migrar a través de los órganos linfoides secundarios (Sallusto y cols., 1999; Masopust, 2001). Por el contrario los linfocitos T_{EM} no expresan CD62L ni CCR7, migran por la sangre y pueden entrar a los tejidos periféricos (Sallusto y cols., 1999; Masopust, 2001). Los T_{CM} tienen una mayor capacidad proliferativa que los T_{EM} ya que pueden secretar IL-2 (Wherry y cols., 2003). Esta propiedad les permite a los linfocitos T_{CM} montar una respuesta secundaria de mayor magnitud. Por otro lado, los T_{EM} poseen un mayor compromiso con el programa efector que los T_{CM}, lo que se manifiesta en una mayor expresión de moléculas efectoras como IFN- γ , granzimas y perforinas (Masopust, 2001). Este mayor grado de diferenciación les permite a los linfocitos T_{EM} responder de forma más rápida frente a la estimulación antigénica, lo que sumado a su presencia en los tejidos periféricos favorece la rápida eliminación de los patógenos antes de que éstos se multipliquen y/o propaguen por el organismo.

Además de las poblaciones de T_{CM} y T_{EM} previamente descritas, evidencia reciente ha mostrado la existencia de un nuevo subtipo de linfocitos T de memoria no circulantes que residen en el cerebro y las mucosas (pulmones, intestino y piel), los cuales han sido denominados linfocitos T de memoria residente (T_{RM} , por *resident memory T cell*) (Mueller y cols., 2013). Estos linfocitos de memoria muestran un fenotipo CD62L-CCR7- al igual que los T_{EM} , sin embargo los T_{RM} se caracterizan por expresar el marcador de activación CD69 y la integrina CD103 (Gebhardt y cols., 2009).

3.3 Modelo de potencial decreciente

En la literatura se han propuesto distintos mecanismos para explicar cómo se generan los diversos subtipos de linfocitos T CD8+ "efectores" y de "memoria" durante el desarrollo de la respuesta inmune (Kaech y Cui, 2012). El modelo de diferenciación progresiva o de potencial decreciente es el más aceptado actualmente y establece que los linfocitos T CD8+ vírgenes, dependiendo de la intensidad de las señales de activación que reciben, avanzan unidireccionalmente a través de una serie de estados de diferenciación que culminan en la generación de linfocitos T efectores de vida corta (SLECs) (Gattinoni y cols., 2011). De esta forma, en la escala de diferenciación, los linfocitos T vírgenes (T_N , por *T Naïve*) corresponden a las células menos diferenciadas, seguidas de los T_{CM} , los T_{EM} y finalmente las SLECs, que corresponden al estado terminalmente diferenciado (Gattinoni y cols., 2011). Este modelo se sustenta en la observación de cambios fenotípicos graduales desde el fenotipo T virgen hasta las SLECs. Por ejemplo, dos moléculas importantes en el *homing* a los órganos linfoides secundarios como CD62L y CCR7 se expresan en los linfocitos T vírgenes y T_{CM} pero no en los linfocitos T_{EM} ni en las SLECs (Sallusto y cols., 1999). Por otra parte, el receptor inhibitorio KLRG1, implicado en la mantención de la senescencia (Voehringer y cols.,

2001), es expresado progresivamente a medida que los linfocitos T maduran hacia un estado terminalmente diferenciado (Wirth y cols., 2010). En la misma línea, estudios de transcriptómica han mostrado que dos tercios de los genes que se expresan diferencialmente entre estas subpoblaciones celulares muestran un comportamiento progresivo en el orden T_N , T_{CM} , T_{EM} y SLECs (Willinger y cols., 2005; Gattinoni y cols., 2011). Por ejemplo, moléculas efectoras como granzimas y perforinas aumentan su expresión en el orden T_N , T_{CM} , T_{EM} y SLECs (Gattinoni y cols., 2011). Asimismo, factores de transcripción relacionados a la adquisición del fenotipo efector como T-bet, Eomes, Blimp-1, Id2 y Zeb2 aumentan su expresión progresivamente en el orden T_N , T_{CM} , T_{EM} y SLECs (Gattinoni y cols., 2011). Al contrario, factores de transcripción asociados con el fenotipo T virgen como los señalizadores de la vía Wnt- β -catenina Tcf-7 y Lef-1, miembros de la familia Klf y otros factores de transcripción como Foxp1 e Id3 disminuyen su expresión progresivamente en el orden T_N , T_{CM} , T_{EM} y SLECs (Gattinoni y cols., 2011). De esta forma, se establece un gradiente de estados de diferenciación a través de la cual los linfocitos T transitan unidireccionalmente (T virgen hacia SLECs). Esta visión cobra especial relevancia cuando se toma en consideración que propiedades funcionales como la supervivencia y proliferación de los linfocitos T son propias de los estados menos diferenciados (T_N y T_{CM}), y se pierden a medida que los linfocitos adquieren las propiedades efectoras de células terminalmente diferenciadas (T_{EM} y SLECs). Este hecho, como se discutirá a continuación, tiene importantes consecuencias a la hora de utilizar a los linfocitos T con fines terapéuticos.

3.4 Inmunoterapia contra el cáncer: Terapia adoptiva de linfocitos T

Históricamente han existido tres pilares para el tratamiento del cáncer: Cirugía, quimioterapia y radioterapia. Sin embargo, la inmunoterapia ha surgido como un posible

cuarto pilar, cuyo principio es promover los mecanismos propios del sistema inmune para reconocer y eliminar las células transformadas (Mellman y cols., 2011). Una de estas terapias es la terapia celular o terapia adoptiva de linfocitos T que consiste en administrar linfocitos T específicos contra antígenos tumorales en el paciente.

En diversos estudios clínicos se ha demostrado que los linfocitos T pueden eliminar tumores establecidos (Rosenberg y Restifo, 2015). Uno de los protocolos de tratamiento más utilizados consiste básicamente en la extracción de linfocitos T autólogos del tejido tumoral, la expansión de estos linfocitos T en cultivos *ex vivo*, y la reinfusión de éstas células en el paciente que ha sido previamente tratado con un régimen de depleción linfocítica (Dudley y cols., 2002). Este tipo de tratamiento ha tenido especial éxito en pacientes con melanoma metastásico, mostrando tasas de regresión cercanas al 50% y regresión completa en más del 20% de los pacientes (Dudley y cols., 2002; Rosenberg y cols., 2011). Se cree que el melanoma es susceptible a esta terapia debido a que presenta una alta tasa de mutaciones en comparación con otros tipos de cáncer (Lawrence y cols., 2013), lo que generaría posibles neoantígenos tumorales capaces de ser reconocidos por los linfocitos alojados en el tumor (Gubin y cols., 2014). No obstante, estudios clínicos recientes han adoptado otras estrategias para ampliar el alcance de la terapia adoptiva de linfocitos T a otros tipos de cáncer con resultados prometedores. Por ejemplo, se han obtenido tasas de respuesta completa superiores al 90% en pacientes con linfoma y leucemia tratados con linfocitos T que han sido modificados genéticamente para expresar receptores quiméricos contra el antígeno CD19 (Kochenderfer y cols., 2010; Maude y cols., 2014).

Sin embargo, una de las principales limitaciones de la terapia celular es la pérdida de función antitumoral *in vivo*, puesto que los linfocitos T CD8+ maduran hacia un estado

terminalmente diferenciado incapaz de persistir a largo plazo en el organismo hospedero (Crompton y cols., 2014). Si bien los linfocitos T efectores terminales son altamente citotóxicos y producen grandes cantidades de IFN- γ , pierden la capacidad de migrar a los órganos linfoides secundarios, producen menos IL-2 y son células senescentes (KLRG1), lo cual impacta negativamente su desempeño antitumoral (Gattinoni y cols., 2005). En este sentido, estudios preclínicos han demostrado que linfocitos T CD8+ menos diferenciados como los T_{CM} poseen un mayor potencial antitumoral que los linfocitos T_{EM}, debido a su capacidad de sobrevivir, proliferar, y dar origen a células efectoras continuamente (Klebanoff y cols., 2005; Gattinoni y cols., 2009, 2011). Asimismo, estudios clínicos de terapia adoptiva de linfocitos T en pacientes con melanoma han correlacionado positivamente el fenotipo de linfocitos T menos diferenciados con la efectividad de la terapia (Rosenberg y cols., 2011; Zhou y cols., 2005).

3.5 Diversidad funcional en los linfocitos T CD8+

Además de la diversidad que existe en cuanto al nivel de diferenciación de los linfocitos T CD8+, se ha demostrado que también existe heterogeneidad a nivel funcional. La literatura se ha centrado principalmente en el estudio de los linfocitos T citotóxicos de tipo 1 (Tc1) que corresponden al linaje por defecto de los linfocitos T CD8+. Sin embargo, estudios recientes sugieren que las señales presentes durante la activación de los linfocitos T CD8+ vírgenes dan lugar a la activación de programas funcionales alternativos, pudiéndose distinguir linfocitos Tc1, Tc2, Tc9 y Tc17 (Mittrücker y cols., 2014). Citoquinas como IL-2, IL-12 e IFN- γ promueven la diferenciación de los linfocitos T vírgenes hacia linfocitos Tc1, mientras que citoquinas como TGF- β e IL-6 promueven el programa Tc17 (Huber y cols., 2009). Cada uno de estos subtipos de

linfocitos T CD8⁺ se caracteriza por expresar factores transcripcionales maestros y moléculas efectoras específicas. Por ejemplo, los linfocitos Tc1 expresan el factor transcripcional maestro T-bet, secretan principalmente IFN- γ , y expresan moléculas citotóxicas como granzimas y perforinas. En contraste, los linfocitos Tc17 expresan el factor transcripcional maestro ROR γ t, se caracterizan por secretar la citoquina inflamatoria IL-17 y no expresan granzimas ni perforinas (Huber y cols., 2009; Yen y cols., 2009).

3.6 Linfocitos Tc17 y su potencial antitumoral

Estudios recientes involucran a los linfocitos Tc17 en el desarrollo de enfermedades infecciosas, en fenómenos de autoinmunidad y también en el cáncer. La acumulación de linfocitos Tc17 ha sido observada en tumores humanos de pacientes con cáncer gástrico (Zhuang y cols., 2012), de útero (Zhang y cols., 2014), de cabeza y cuello (Tsai y cols., 2012), de hígado (Kuang y cols., 2010), de colon (Wu y cols., 2014) y también en diversos modelos de cáncer incluyendo el modelo murino de melanoma B16 (Kryczek y cols., 2007).

Nuestro grupo en conjunto con otros autores hemos aportado evidencia que demuestra que los linfocitos Tc17 cumplen un papel antitumoral en el desarrollo del cáncer. Dos grupos independientes mostraron en estudios preclínicos que la terapia adoptiva con linfocitos Tc17 generados *in vitro* promueve la eliminación de tumores establecidos en ratones B6 (Hinrichs y cols., 2009; Garcia-Hernandez y cols., 2010). En esta misma línea, en nuestro laboratorio reportamos que ratones deficientes en el factor transcripcional maestro del linaje Tc17 (ratones *Ror γ ^{gfp/gfp}*) al ser desafiados con tumores transplantables presentan un crecimiento tumoral exacerbado con respecto a ratones

normales, apoyando la hipótesis que los linfocitos Tc17 contribuirían en la respuesta inmune antitumoral (Nuñez y cols., 2012).

El hecho que los linfocitos Tc17 generados *in vitro* no expresan moléculas citotóxicas como granzimas y perforinas (Huber y cols., 2009) y que no son capaces de inducir la apoptosis en células blanco cargadas con antígeno (Yen y cols., 2009) abre cuestionamientos respecto de los mecanismos que explicarían el potencial antitumoral de los linfocitos Tc17. En este sentido, el grupo de Dutton demostró que la efectividad de la terapia adoptiva de linfocitos Tc17 depende de la capacidad de estas células para producir IFN- γ , TNF- α e IL-17, citoquinas que mediarían el reclutamiento de linfocitos T, macrófagos y neutrófilos al microambiente tumoral favoreciendo la eliminación del tumor (García-Hernández y cols., 2010). Asimismo, el grupo de Restifo correlacionó la efectividad de la terapia adoptiva de linfocitos Tc17 con la capacidad de las células para transformarse *in vivo* a un fenotipo productor de IFN- γ (Hinrichs y cols., 2009). De esta forma, la capacidad antitumoral de los linfocitos Tc17 podría ser explicada gracias a su capacidad de transformarse a linfocitos productores de IFN- γ –tipo Tc1. En este sentido, estudios *in vitro* han demostrado que la estimulación de linfocitos Tc17 con IL-12 induce su reprogramación hacia células tipo Tc1 que expresan T-bet, producen IFN- γ y poseen capacidad citotóxica (Tajima y cols., 2011). Interesantemente, durante mi seminario de título pude comprobar que los linfocitos Tc17 se transforman *in vivo* en células tipo Tc1 IFN- γ + granzima B+ al ser transferidos a ratones con melanoma, favoreciendo la eliminación del tumor (Flores-Santibáñez y cols., 2015).

Por otra parte, otros antecedentes sugieren que los linfocitos Tc17 podrían corresponder a células en un estado de diferenciación más temprano que los linfocitos

Tc1. De acuerdo con esta idea, un estudio reciente demostró que los linfocitos Tc17 generados *in vitro* presentan acumulación de β -catenina y alta expresión de *Tcf-7* (Muranski y cols., 2011), lo que sugiere una señalización activa de la vía Wnt/ β -catenina, que es una de las vías importantes en la mantención del programa molecular de los linfocitos T de memoria. En la misma línea, el grupo de Restifo observó que los linfocitos Tc17 poseen mayor persistencia *in vivo* en comparación con linfocitos Tc1 en un modelo de terapia celular antitumoral (Hinrichs y cols., 2009). Además, se ha reportado que luego de la transferencia adoptiva en ratones con tumor, los linfocitos Tc17 presentan una alta expresión de la cadena alfa del receptor de IL-7 (CD127) (Yu y cols., 2013), lo que podría explicar su mayor capacidad de sobrevivida. Sin embargo, aun no es claro si los linfocitos Tc17 poseen otras cualidades funcionales propias de los linfocitos T de memoria, como la capacidad de montar una respuesta secundaria.

4. HIPÓTESIS

Los linfocitos Tc17 poseen características de linfocitos T de memoria y presentan mayor potencial antitumoral que los linfocitos Tc1

5. OBJETIVOS

5.1 Objetivo general

Evaluar las propiedades de memoria de los linfocitos Tc17 generados *in vitro* y estudiar su potencial antitumoral en comparación a los linfocitos Tc1

5.2 Objetivos específicos

5.2.1 Estudiar la expresión de moléculas relacionadas al fenotipo de memoria en los linfocitos Tc17 generados *in vitro*

5.2.2 Estudiar *in vivo* el fenotipo y la persistencia de linfocitos Tc17 generados *in vitro*

5.2.3 Estudiar *in vivo* la expansión secundaria de linfocitos Tc17 generados *in vitro*

5.2.4 Estudiar *in vivo* la actividad antitumoral de los linfocitos Tc17 generados *in vitro*

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 Materiales

6.1.1 Anticuerpos

Los anticuerpos (anti ratón) contra CD8a PECy7 (clon 53-6.7), CD8a APCeFluor780 (clon 53-6.7), CD16/32 (clon 93), CD25 PE (clon PC61.5), CD25 APC (clon PC61.5), CD45.1 eFluor450 (clon A20), CD45.2 PE-Cy7 (clon 104), CD62L FITC (clon MEL-14), CD62L PE (clon MEL-14), IL-17 eFluor660 (clon eBio17B7), IFN- γ eFluor660 (clon XMG1.2), IFN- γ FITC (clon XMG1.2), TNF- α FITC (clon MP6-XT22), IL-2 PECy7 (clon JES6-5H4) y V α 2 PE (clon B20.1) se obtuvieron en eBioscience. Los anticuerpos contra CD8a FITC (clon 53-6.7), CD44 APC (clon IM7), CD45.1 APC (clon A20), CD45.2 PerCPCy5.5 (clon 104), CD62L PECy7 (clon MEL-14), CD127 APC (clon A7R34), KLRG1 PE (clon 2F1/KLRG1), KLRG1 APC (clon 2F17KLRG1), IL-17 PE (clon TC11-18H10.1), granzima B Alexa Fluor647 (clon GB11) y V β 5 APC (clon MR9-4) se obtuvieron en BioLegend. El anticuerpo bloqueador α -IFN- γ (clon XMG1.2) y los anticuerpos activadores α -CD3 (clon 145-2C11) y α -CD28 (clon 37.51) se obtuvieron en BioLegend.

6.1.2 Ratones

Ratones C57BL/6, OT-I y B6.SJL-*Ptprca*^a *Pep3*^b/BoyJ (B6.SJL), se obtuvieron en *The Jackson Laboratory* (Bar Harbor, USA). Los ratones OT-I contienen una inserción genética que en linfocitos T CD8+ permite la expresión de un TCR transgénico (cadenas V α 2 y V β 5) con especificidad contra un péptido de ovoalbúmina (OVA₂₅₇₋₂₆₄), presentado

en contexto MHC-I H2-K^b. El fenotipo de los ratones OT-I fue verificado en cada experimento por citometría de flujo mediante un marcaje en sangre con anticuerpos contra CD8a, V α 2 y V β 5. Los ratones B6.SJL son ratones congénicos con la cepa C57BL/6, lo que significa que son genéticamente idénticos a excepción de un único locus que codifica la proteína CD45 (Ly5 o Ptrpc). Mientras que los ratones C57BL/6 y OT-I poseen el alelo CD45.2 (Ly5.2 o Ptrpc^b) en su genotipo, los ratones B6.SJL poseen el alelo CD45.1 (Ly5.1 o Ptrpc^a). Para los experimentos de co-transferencia adoptiva se cruzaron ratones OT-I (CD45.2) con ratones B6.SJL (CD45.1) y de la F1 se obtuvieron ratones OT-I que co-expresan las proteínas CD45.1 y CD45.2 (OT-I CD45.1/.2). Todos los ratones se mantuvieron en el bioterio de la Fundación Ciencia y Vida en condiciones libres de patógenos específicos. Para los experimentos se utilizaron ratones entre 6 y 12 semanas de edad.

6.1.3 Células B16-OVA

La línea celular tumoral de melanoma murino B16 que expresa la proteína ovoalbúmina (B16-OVA) fue donada por el Dr. Randolph Noelle (Dartmouth Medical School, USA)(Guo y cols., 2012).

6.2 Métodos

6.2.1 Aislamiento de células de bazo, linfonodos y tumor

Para la obtención de células de bazo, se extrajo el bazo del ratón y se recibió en una placa de Petri con 10 mL de RPMI + 10% SFB y se perfundió para obtener una suspensión celular. Esta suspensión se centrifugó a 600 x g durante 7 minutos a 4°C y el pellet de células se resuspendió en 2 mL de buffer de lisis de glóbulos rojos (RBC Lysis Buffer, eBioscience) y se incubó durante 5 minutos en hielo. Las células se lavaron con RPMI + 10% SFB y se resuspendieron en 10 mL del mismo medio

Para la obtención de células desde los linfonodos periféricos (PLN por *Peripheral Lymph Node*) o linfonodos drenantes del tumor (TdLN por *Tumor draining Lymph Node*), éstos se extrajeron y se disgregaron mecánicamente con una tijera. La suspensión celular se filtró por una malla metálica de 90 µm, y se llevó a un volumen de 5 mL con RPMI + 10% SFB.

Para la obtención de linfocitos infiltrantes de tumor se extrajeron los tumores y se disgregaron mecánicamente con una tijera en HBSS + 5% SFB. Luego, la suspensión celular y restos de tejido se llevaron a 5 mL con HBSS + 5% SFB y se realizó una digestión enzimática con 1 mg/mL de Colagenasa D (Roche) y 50 µg/mL de DNAsa I (Roche) a 37°C con agitación suave durante 30 minutos. Al terminar la digestión, el tejido se filtró a través de una malla de 70 µm (cell strainer, BD Biosciences), se centrifugó a 500 x g durante 5 minutos a 4°C y las células se resuspendieron en 2 mL de buffer de lisis de glóbulos rojos y se incubaron por 5 minutos en hielo. Tras el tratamiento, las células se lavaron y luego resuspendieron en 3 mL de Percoll 40%. Con una pipeta

Pasteur, se agregaron 3 mL de Percoll 70% bajo la suspensión celular, y se centrifugó a 750 x g durante 20 minutos a 25°C. Luego, se recuperaron las células mononucleares contenidas entre las dos fases y se traspasaron a otro tubo. Las células se lavaron con HBSS + 5% SFB de manera de eliminar el Percoll remanente. Finalmente, las células se resuspendieron en 3 mL de RPMI + 10% SFB.

Para determinar el número de células obtenido, se tomó una alícuota de la suspensión celular y se contaron las células en una cámara de Neubauer con tinción de azul de tripán.

6.2.2 Separación inmunomagnética de linfocitos T CD8+ totales

Para aislar los linfocitos T CD8+ totales se extrajeron células a partir del bazo y/o PLN de un ratón OT-I (ver sección 6.2.1) y se utilizó el kit de separación inmunomagnética *CD8a+ T cell Isolation kit* (Miltenyi Biotec). Las células de PLN y/o bazo se incubaron con el mix de anticuerpos acoplados a biotina (15 µL por cada 100 millones de células en 300 µL de Verseno + 0,5% SFB) (α -CD4 α -CD11b α -CD11c, α -CD19, α -B220, α -CD49b, α -CD105, α -MHC Class II, α -Ter119 y α -TCR $\gamma\delta$) durante 15 minutos a 4°C con agitación rotatoria. Luego de la incubación, las células se lavaron y se incubaron con perlas magnéticas acopladas a anticuerpos anti-biotina (30 µL por cada 100 millones de células en 300 µL de Verseno + 0,5% SFB) durante 15 minutos a 4°C con agitación rotatoria. Luego de la incubación las células se resuspendieron en 1 mL de Verseno + 0,5% SFB y se pasaron por una columna LD (Miltenyi Biotec). Se recuperó la fracción negativa que contiene los linfocitos T CD8+ totales y se centrifugaron las células a 600 x g a 4°C por 7 minutos.

6.2.3 Cell sorting de linfocitos T CD8+ vírgenes

Para aislar los linfocitos T CD8+ vírgenes se realizó un marcaje en superficie de las células obtenidas luego de la separación inmunomagnética (ver sección 6.2.2). Para esto, se incubaron 10 millones de linfocitos T CD8+ totales en 100 μ L de RPMI + 10% SFB con anticuerpos contra CD8a APCeF780, CD25 PE, CD62L FITC y CD44 APC durante 15 minutos a 4°C en oscuridad. Luego de la incubación se lavaron las células con RPMI + 10% SFB y se centrifugaron a 600 x g a 4°C por 7 min. A continuación, las células se resuspendieron en RPMI + 10% SFB y se aislaron los linfocitos T CD8+ vírgenes (CD8a⁺ CD25⁻ CD44^{lo} CD62L^{hi}) mediante *cell sorting* (FACS Aria III, BD Biosciences).

6.2.4 Generación de linfocitos Tc1 y Tc17 *in vitro*

Para obtener células Tc1 y Tc17 antígeno específicas, se purificaron linfocitos T CD8+ vírgenes de ratones OT-I (ver sección 6.2.2 y 6.2.3) y se activaron con α -CD3 (clon 145-2C11, Biolegend) y α -CD28 (clon 37.51, Biolegend) ambos a una concentración final de 1 μ g/mL. Además, para generar linfocitos Tc1 se agregó al cultivo IL-2 (10 ng/mL), mientras que para generar linfocitos Tc17 se agregó TGF- β 1 (2 ng/mL), IL-6 (20 ng/mL) y α -IFN- γ (5 μ g/mL). La activación se realizó en placas de 96 pocillos de fondo redondo a una concentración de 0,5 x 10⁶ células/mL en medio IMDM suplementado con 10% SFB, fungizona (0,25 μ g/mL) y β -mercaptoetanol (50 μ M) en un incubador a 37°C y 5% CO₂ por 4 días.

6.2.5 Evaluación de moléculas de superficie por citometría de flujo

La caracterización fenotípica de las distintas poblaciones celulares se realizó por citometría de flujo multiparamétrica (FACSCanto II, BD Biosciences). Para la detección de moléculas de superficie mediante citometría de flujo, entre $0,1$ y $1,0 \times 10^6$ células se incubaron con un anticuerpo contra CD16/CD32 (Fc Block) en PBS + 2% SFB durante 20 minutos a 4°C en oscuridad para bloquear los receptores Fc. Luego, se lavaron las células con PBS + 2% SFB y se centrifugaron a $600 \times g$ por 7 minutos a 4°C . Posteriormente, las células incubaron con los respectivos anticuerpos fluorescentes y con *Fixable Viability Dye* eFluor780 (eBioscience) para descartar las células muertas, en PBS + 2% SFB durante 30 minutos a 4°C en oscuridad. Finalmente, las células se lavaron con PBS + 2% SFB, se centrifugaron a $600 \times g$ durante 7 minutos a 4°C y se resuspendieron en $200 \mu\text{L}$ de PBS + 2% SFB para ser analizadas en el citómetro. Los datos de citometría se analizaron con el programa *FlowJo* (Tree Star, Inc.)

6.2.6 Evaluación de células productoras de citoquinas por citometría de flujo

Para analizar la expresión intracelular de citoquinas por parte de linfocitos T se realizó una activación policlonal *in vitro*. Células de bazo, de PLN, de tumor o linfocitos Tc1 o Tc17 generados *in vitro* se incubaron a 2×10^6 células/mL en RPMI 10% SFB, en presencia de PMA $0,25 \mu\text{M}$ (Sigma), ionomicina $1 \mu\text{g/mL}$ (Sigma) y $1 \mu\text{L/mL}$ de Brefeldina A (GolgiPlug, BD Biosciences), durante 4 horas a 37°C y 5% CO_2 . Luego de la incubación, las células se centrifugaron a $600 \times g$ durante 7 minutos a 4°C y se resuspendieron en PBS + 2% SFB. Las células se marcaron en superficie (ver sección 6.2.5) y posteriormente se centrifugaron a $600 \times g$ por 7 minutos a 4°C . Para el marcaje intracelular de citoquinas (IFN- γ , IL-17A, TNF- α e IL-2), las células se fijaron y

permeabilizaron, resuspendiéndolas en 200 μ L de *Cytofix/Cytoperm* (BD Biosciences) e incubándolas durante 20 minutos a 4°C en oscuridad. Al cabo de la incubación, las células se lavaron con 700 μ L de *Permwash* (BD Biosciences) y se centrifugaron a 700 x g durante 8 minutos a 4°C. Luego, las células se incubaron con los respectivos anticuerpos fluorescentes diluidos en 100 μ L de *Permwash* durante 30 minutos a 4°C en oscuridad. Finalmente, las células se lavaron con 700 μ L de *Permwash*, se centrifugaron a 700 x g por 8 minutos a 4°C y se resuspendieron en 200 μ L de PBS + 2% SFB para ser analizadas en el citómetro. Los datos de citometría se analizaron con el programa *FlowJo* (Tree Star, Inc.)

6.2.7 Obtención y marcaje de células de sangre

Para la recolección de muestras de sangre los ratones fueron calentados bajo una luz incandescente y con la ayuda de un bisturí se perforó la vena lateral de la cola. Entre 50 y 200 μ L de sangre fueron recibidos en un tubo con 50 μ L de heparina (Laboratorio Sanderson, 1000 U.I./mL). A continuación se tomaron 100 μ L de la sangre colectada y se incubaron con un anticuerpo contra CD16/CD32 (Fc Block) durante 20 minutos a temperatura ambiente en oscuridad para bloquear los receptores Fc. Luego, se agregó un mix de los anticuerpos contra moléculas de superficie deseados y se incubaron durante 30 minutos a temperatura ambiente en oscuridad. A continuación se agregó 1 mL de solución de lisis de glóbulos rojos (*BD FACS lysing solution*, BD Biosciences) y se incubó durante 10 minutos a temperatura ambiente en oscuridad. Luego se centrifugó a 600 x g durante 7 minutos a temperatura ambiente y se resuspendieron las células en PBS + 2% FBS para ser analizadas en el citómetro. Los datos de citometría se analizaron con el programa *FlowJo* (Tree Star, Inc.)

6.2.8 PCR en tiempo real

Para analizar la expresión de los mRNA de *tcf7*, *lef1*, *bcl6*, *gzmb*, *pfn1*, *prdm1*, *klf2*, *tbx21*, *eomes* y *hprt* en linfocitos T CD8+ vírgenes, Tc1 y Tc17 se realizó PCR en tiempo real. Los linfocitos T CD8+ vírgenes fueron aislados desde bazo y/o PLN de ratones OT-I mediante *cell sorting* (ver sección 6.2.3). Los linfocitos Tc1 y Tc17 fueron generados *in vitro* (ver sección 6.2.4). Se extrajo mRNA a partir de 5–10 x10⁶ linfocitos T CD8+ vírgenes o 1–3 x10⁶ linfocitos Tc1 o Tc17. Para la extracción de mRNA se utilizó el kit EZNA total RNA (Ω Bio-Tek) con digestión de DNA en columna (DNase set RNase free, Ω Bio-Tek) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. A continuación se cuantificó el mRNA en un espectrofotómetro (NanoPhotometer, IMPLEN) y se sintetizó cDNA a partir de 1 µg de mRNA. Para la síntesis de cDNA se utilizó el kit *Superscript First Strand Synthesis System for RT-PCR* (Thermo Scientific) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Al cDNA sintetizado se le agregaron 4 volúmenes de agua libre de nucleasas y se guardó a -20°C. Para la reacción de PCR en tiempo real se utilizaron 5 µL de cDNA, 10 µL de *Brilliant II SYBR Green qPCR Master Mix* (Agilent Technologies), partidores (375–800 nM) y agua libre de nucleasas hasta un volumen final de 20 µL. Todas las reacciones fueron realizadas usando un sistema Stratagene Mx3000P (Agilent Technologies) en 40 ciclos utilizando una temperatura de denaturación de 95°C, temperatura de annealing de 58°C y temperatura de elongación de 72°C. Los niveles de expresión relativos de los fragmentos amplificados fueron calculados utilizando el ΔC_t entre el gen de interés y el gen constitutivo *hprt* (hipoxantina-guanina fosforibosiltransferasa). Además los datos fueron normalizados respecto a la expresión relativa de la muestra de linfocitos T CD8+ vírgenes. Las secuencias de los partidores utilizados para las reacciones de PCR en tiempo real se muestran en la tabla 1.

Tabla 1. Partidores utilizados en el PCR en tiempo real.

Gen	Sentido (5'→3')	Antisentido (5'→3')
<i>tcf7</i>	CAATCTGCTCATGCCCTACC	CTTGCTTCTGGCTGATGTCC
<i>lef1</i>	TGAGTGCACGCTAAAGGAGA	CTGACCAGCCTGGATAAAGC
<i>bcl6</i>	CTGCAGATGGAGCATGTTGT	CACCCGGGAGTATTTCTCAG
<i>gzmb</i>	TGCTGCTAAAGCTGAAGAGTAAG	CGTGTTTGAGTATTTGCCATTG
<i>pfn1</i>	GATGTGAACCCTAGGCCAGA	GGTTTTTGACCAGGCGAAA
<i>prdm1</i>	GACGGGGTACTTCTGTTCA	GGCATTCTTGGGAAGTGTGT
<i>tbx21</i>	AGCAAGGACGGCGAATGTT	GGGTGGACATATAAGCGGTTC
<i>eomes</i>	GCGCATGTTTCCTTTCTTGAG	GGTCGGCCAGAACCACTTC
<i>klf2</i>	TGTGAGAAATGCCTTTGAGTTACTG	CCCTTATAGAAATACAATCGGTCATAGTC
<i>hprt</i>	CTCCTCAGACCGCTTTTTGC	TAACTGGTTCATCATCGCTAATC

6.2.9 Persistencia de linfocitos Tc1 y Tc17 *in vivo*

Se generaron linfocitos Tc1 y Tc17 *in vitro* desde un ratón OT-I (CD45.2+) (ver sección 6.2.4). Se transfirieron adoptivamente 1×10^6 células Tc1 o Tc17 por vía intravenosa en ratones congénicos B6.SJL (CD45.1+). Luego de 24 horas se inmunizó cada ratón con 500 μ g de proteína OVA (Sigma-Aldrich) por vía intraperitoneal. En el día 10 después de la transferencia adoptiva, se obtuvieron muestras de sangre (ver sección 6.2.7) y se analizaron por citometría de flujo.

6.2.10 Expansión secundaria de linfocitos Tc1 y Tc17 *in vivo*

Se generaron linfocitos Tc1 y Tc17 *in vitro* (ver sección 6.2.4). Los linfocitos Tc1 fueron generados a partir de ratones OT-I CD45.2 mientras que los linfocitos Tc17 fueron generados a partir de ratones OT-I CD45.1/2. El día de la transferencia, los linfocitos Tc1 y Tc17 se contaron en un microscopio con tinción de azul de tripán y se mezclaron a una razón 1:1. A continuación se evaluó la razón inicial (input) en el citómetro haciendo un marcaje contra CD45.1 y CD45.2. Se tomaron 2×10^6 células totales de esta mezcla y se transfirieron adoptivamente por vía intravenosa en ratones congénicos B6.SJL (CD45.1+). Con esta estrategia se pueden distinguir los linfocitos Tc1 transferidos (CD45.1-CD45.2+), los linfocitos Tc17 transferidos (CD45.1+CD45.2+) y los leucocitos endógenos (CD45.1+CD45.2-). El día 1 después de la transferencia adoptiva se inmunizaron los ratones con 500 μ g de proteína OVA (Sigma-Aldrich) por vía intraperitoneal. El día 30 después de la transferencia adoptiva se re-inmunizaron los ratones con 500 μ g de proteína OVA (Sigma-Aldrich) y 500 μ L de Adyuvante Completo de Freund (CFA, Sigma) por vía intraperitoneal. En los días 11, 25 y 34 después de la transferencia adoptiva se obtuvieron muestras de sangre y se analizaron por citometría de flujo. Finalmente, el día 36 después de la transferencia adoptiva los ratones fueron sacrificados y se analizaron las células del bazo por citometría de flujo.

6.2.11 Modelo de protección antitumoral *in vivo*

Se generaron linfocitos Tc1 y Tc17 *in vitro* desde un ratón OT-I (CD45.2+) (ver sección 6.2.4). Se transfirieron adoptivamente 1×10^6 células Tc1 o Tc17 por vía intravenosa en ratones congénicos B6.SJL (CD45.1+). Como grupo control se inyectaron ratones con el vehículo (PBS). En el día 1 y en el día 13 después de la transferencia

adoptiva se inmunizaron los ratones con 500 µg de proteína OVA (Sigma-Aldrich) por vía intraperitoneal. En el día 14 después de la transferencia adoptiva los ratones fueron desafiados con 1×10^6 células B16-OVA (ver sección 6.1.3). Para el desafío tumoral los ratones fueron anestesiados con sevoflurano inhalatorio (SEVOrane, Abbott Laboratories). Una vez dormidos, se les inyectaron $1,0 \times 10^6$ células B16-OVA por vía intradérmica en el flanco derecho del dorso. La evolución del tamaño de los tumores se evaluó cada dos o tres días mediante dos mediciones perpendiculares del tumor realizadas con un pie de metro. Ratones con tumores mayores a 300 mm^2 se sacrificaron por razones bioéticas. En el día 34 los ratones fueron sacrificados y se analizaron las células del TdLN y tumor mediante citometría de flujo.

6.2.12 Análisis estadístico

Para el análisis estadístico entre dos grupos de datos se utilizó el test t de Student de dos colas. Para el análisis estadístico entre más de dos grupos se utilizó análisis de varianza (ANOVA) de una vía con post prueba de Tukey. Para el análisis estadístico de las curvas de expansión secundaria y crecimiento tumoral entre distintos tratamientos se utilizó una prueba de ANOVA de 2 vías y post prueba de Bonferroni. Todos los análisis estadísticos se realizaron utilizando el programa GraphPad Prism 6 (GraphPad Software, San Diego, CA, EUA). Se considera la significancia estadística con un valor de $p < 0,05$. (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$)

7. RESULTADOS

7.1 Generación de linfocitos Tc17 *in vitro*

Para estudiar el fenotipo y función de los linfocitos Tc17 utilizamos un protocolo de diferenciación *in vitro*. Brevemente, aislamos linfocitos T CD8+ vírgenes (CD8+ CD25- CD62L^{hi} CD44^{lo}) desde el bazo y/o linfonodos periféricos (PLN) de ratones OT-I y los estimulamos con los anticuerpos activadores α -CD3 y α -CD28. Además se agregó IL-2 a los cultivos para generar linfocitos Tc1 o TGF- β 1, IL-6 y el anticuerpo bloqueador α -IFN- γ para generar linfocitos Tc17. Luego de 4 días de diferenciación analizamos la producción de citoquinas en los linfocitos Tc1 y Tc17 diferenciados (Figura 1). En la condición de diferenciación hacia células Tc1 obtuvimos un 93,9 \pm 2,5 % de células productoras de IFN- γ que no producen IL-17A (0,3 \pm 0,1 %). Por otra parte, en la condición de diferenciación hacia células Tc17 obtuvimos un 87,0 \pm 2,7 % de células productoras de IL-17A y un 6,7 \pm 2,7 % de células que producen IFN- γ .

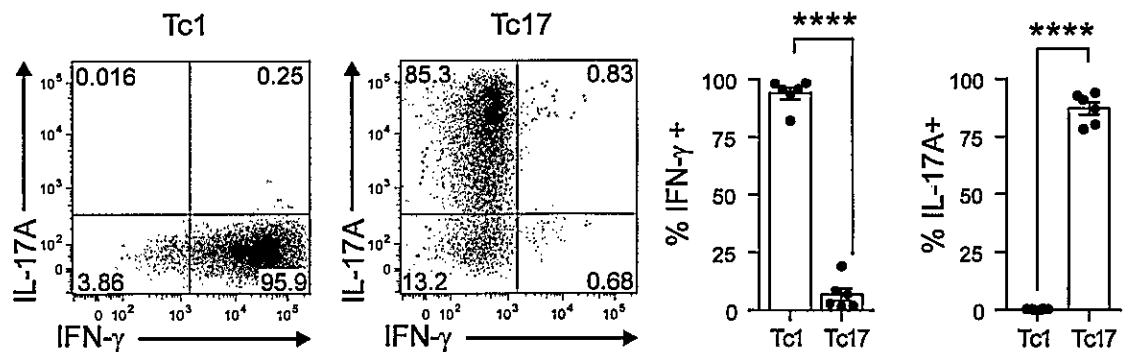


Figura 1. Generación de linfocitos Tc17 *in vitro*. Se aislaron linfocitos T CD8+ vírgenes y se activaron con α -CD3 y α -CD28 durante 4 días en presencia de IL-2 para generar linfocitos Tc1 o en presencia de TGF- β 1, IL-6 y α -IFN- γ para generar linfocitos Tc17. Luego de 4 días las células se reactivaron con PMA e ionomicina en presencia de brefeldina A durante 4 horas y se analizó producción de IFN- γ e IL-17A mediante tinción intracelular y citometría de flujo. Las barras representan el promedio de células positivas para cada citoquina \pm error estándar de la media (n=6). **** p < 0.0001 test t de Student.

7.2 Fenotipo de linfocitos Tc17 generados *in vitro*

A continuación evaluamos la expresión de CD44, CD62L, CD25, granzima B, TNF- α e IL-2 en los linfocitos Tc1 y Tc17 generados *in vitro*. La expresión de CD44 es clásicamente utilizada para discriminar entre linfocitos T vírgenes que expresan bajos niveles de CD44 (CD44^{lo}) y linfocitos T con experiencia antigénica (T efectores y T de memoria) que expresan altos niveles de CD44 (CD44^{hi}) (Budd y cols., 1987). En la figura 2 se muestra que tanto los linfocitos Tc1 como los linfocitos Tc17 muestran una alta expresión de CD44, lo que sugiere que en ambas condiciones los linfocitos fueron eficientemente activados. Por otra parte, la L-selectina o CD62L es una molécula de adhesión que es expresada por linfocitos T vírgenes y T de memoria central (T_{CM}), y cuya función es permitir la entrada de los linfocitos T a los tejidos linfoides secundarios (Sallusto y cols., 1999). Al evaluar la expresión de CD62L en los linfocitos Tc1 y Tc17 generados *in vitro* observamos que los linfocitos Tc1 poseen una mayor expresión de esta selectina en comparación con los linfocitos Tc17 (64,0 \pm 11,3% contra un 16,2 \pm 7,4%) (Figura 2).

Además analizamos la expresión de granzima B (GzmB), proteasa presente en los gránulos citotóxicos de los linfocitos T citotóxicos y cuya función es inducir la apoptosis en las células blanco. En acuerdo con datos de la literatura (Huber y cols., 2009), observamos que los linfocitos Tc17 no expresan GzmB a diferencia de los linfocitos Tc1 que muestran una alta expresión de GzmB (Figura 2). Interesantemente, los linfocitos Tc1 muestran una alta expresión de la cadena alfa del receptor de IL-2 (CD25), a diferencia de los linfocitos Tc17 (Figura 2).

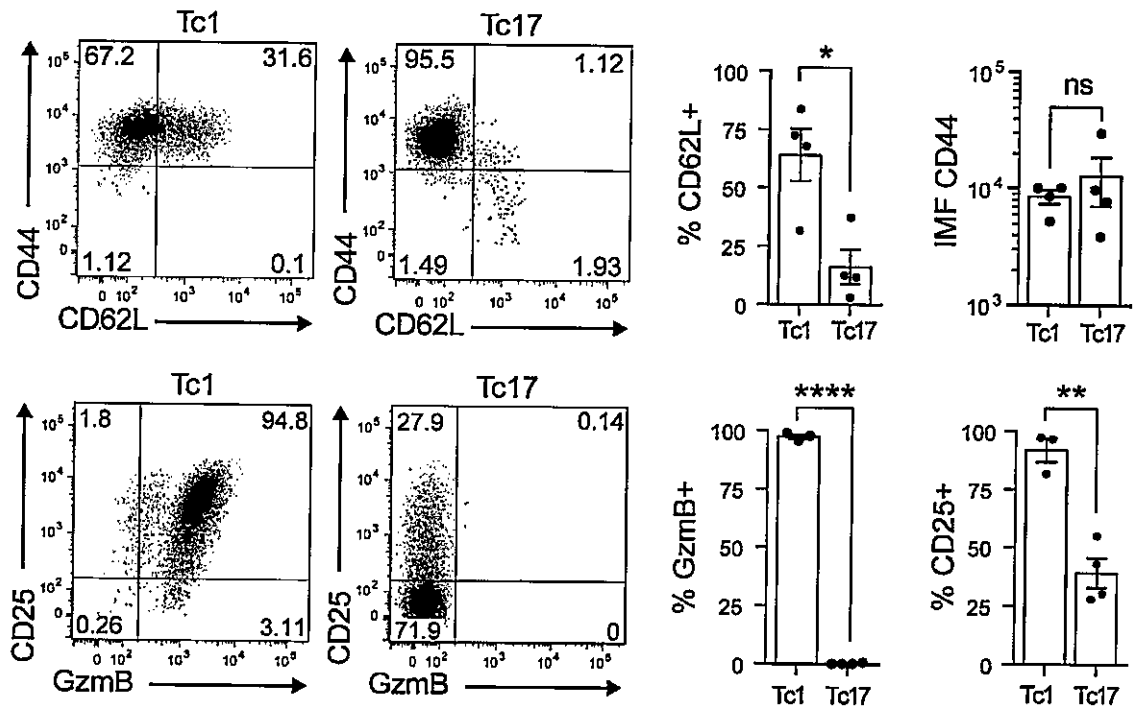


Figura 2. Los linfocitos Tc17 generados *in vitro* son CD44^{hi} pero no expresan CD25 ni granzima B. Se generaron linfocitos Tc1 y Tc17 *in vitro* y se evaluó la expresión de CD62L, CD44, CD25 y granzima B mediante citometría de flujo. Las barras representan el promedio de células positivas para CD62L, GzmB y CD25 y el promedio de la intensidad media de fluorescencia (IMF) para CD44 ± error estándar de la media (n=3-4). * p < 0.05, ** p < 0.01 **** p < 0.0001 test t de Student.

Finalmente observamos que tanto los linfocitos Tc1 como los linfocitos Tc17 producen IL-2 y TNF- α (figura 3). Sin embargo, los linfocitos Tc17 muestran mayores niveles de IL-2 que los linfocitos Tc1, y por el contrario, los linfocitos Tc1 poseen mayores niveles de TNF- α que los linfocitos Tc17. Si bien el TNF- α es producido tanto por las células T de memoria como por las células T efectoras, la producción de IL-2 está restringida a poblaciones de linfocitos T menos diferenciadas, como linfocitos T vírgenes y T_{CM} (Sallusto y cols., 1999; Newell y cols., 2012).

En resumen, los linfocitos Tc1 generados *in vitro* poseen una mayor expresión de moléculas relacionadas al fenotipo efector (CD25, GzmB, IFN- γ , TNF- α) en comparación con los linfocitos Tc17. Además, los linfocitos Tc17 producen IL-2, al tiempo que expresan bajos niveles de CD25, ambas características relacionadas al fenotipo T de memoria (Sallusto y cols., 1999; Newell y cols., 2012; Arsenio y cols., 2014). Todos estos datos sugieren que los linfocitos Tc17 corresponderían a un estado de menor diferenciación similar a los linfocitos T de memoria, mientras que los linfocitos Tc1 estarían más cerca del fenotipo T efector terminalmente diferenciado.

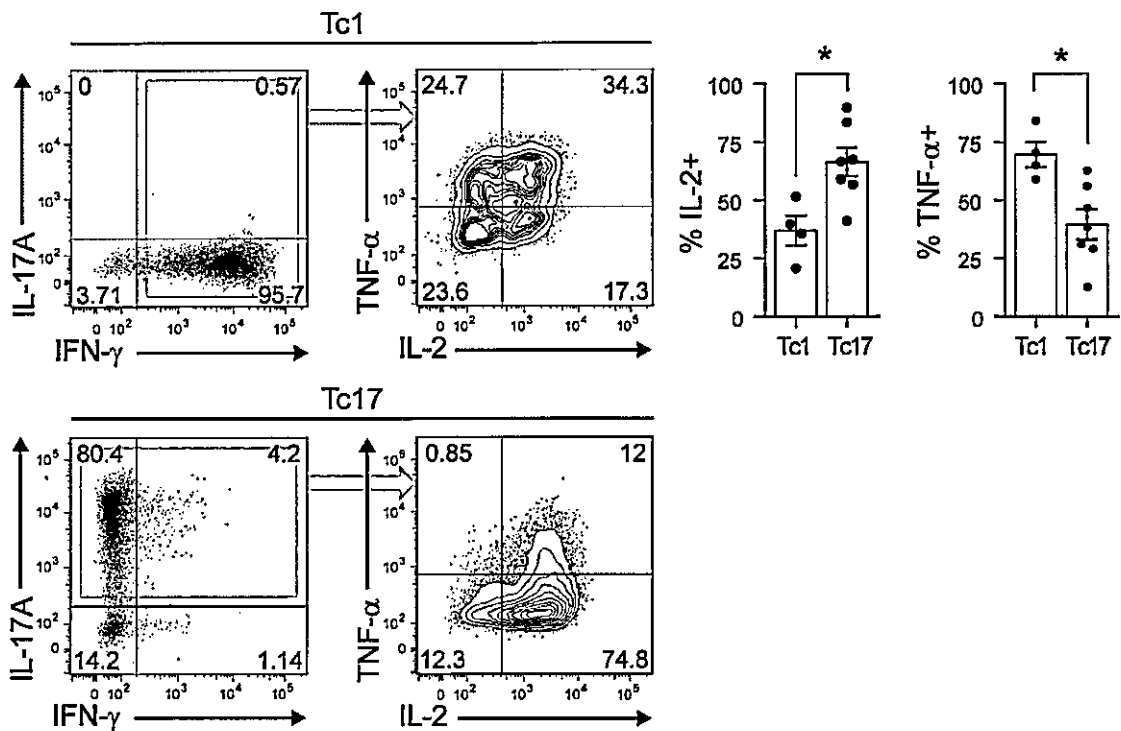


Figura 3. Los linfocitos Tc17 generados *in vitro* producen altos niveles de IL-2. Se generaron linfocitos Tc1 y Tc17 *in vitro*. Luego de 4 días las células se reactivaron con PMA e ionomicina en presencia de brefeldina A durante 4 horas y se analizó producción de IFN- γ , IL-17A, TNF- α e IL-2 mediante tinción intracelular y citometría de flujo. A la izquierda se muestra la expresión de IFN- γ e IL-17A en los linfocitos Tc1 y Tc17 generados *in vitro*. A continuación se muestra la expresión de TNF- α e IL-2 en una ventana IFN- γ + para los linfocitos Tc1 o en una ventana IL-17A+ para los linfocitos Tc17. Las barras representan el promedio de células positivas para cada citoquina \pm error estándar de la media (n=4-7). * p < 0.05 test t de Student.

7.3 Perfil transcripcional de linfocitos Tc17 generados *in vitro*

Un área que ha tenido considerable atención en los últimos años es la identificación de factores transcripcionales implicados en la regulación de la diferenciación de los linfocitos T hacia el fenotipo memoria vs efector (Chang y cols., 2014). Con el objetivo de determinar el estado de diferenciación de los linfocitos Tc1 y Tc17 generados *in vitro* medimos la expresión de los transcritos de algunos de estos factores transcripcionales (*tcf7*, *lef1*, *bcl6*, *prdm1*, *tbx21*, *eomes*, *klf2*) y moléculas efectoras (*gzmb*, *prf1*) mediante PCR en tiempo real.

Estudios recientes han demostrado que los factores Tcf-7, Lef-1, Bcl-6 y Klf-2 son expresados principalmente por linfocitos T de memoria, y cumplen un rol fundamental en la autorenovación, supervivencia y capacidad migratoria del fenotipo memoria (Gattinoni y cols., 2009, 2011; Cui y cols., 2011; Ichii y cols., 2002; Takada y cols., 2011). Interesantemente, observamos que los linfocitos Tc17 expresan mayores niveles de los mRNA *tcf7*, *lef1* y *bcl6* en comparación a linfocitos Tc1 (Figura 4), mientras que expresan similares niveles de *klf2* que los linfocitos Tc1 (Figura 4).

Por el contrario, los factores T-bet, Eomes y Blimp-1 se expresan principalmente en linfocitos T efectores, y participan en la adquisición del fenotipo efector induciendo la expresión de moléculas efectoras como IFN- γ , granzimas y perforinas (Joshi y cols., 2007; Pearce y cols., 2003; Rutishauser y cols., 2009). En acuerdo con lo anterior, observamos que los linfocitos Tc1 muestran mayores niveles de los mensajeros para T-bet (*tbx21*), Eomes (*eomes*), Blimp-1 (*prdm1*), granzima B (*gzmb*) y perforina 1 (*pfn1*) en comparación con los linfocitos Tc17 (Figura 4).

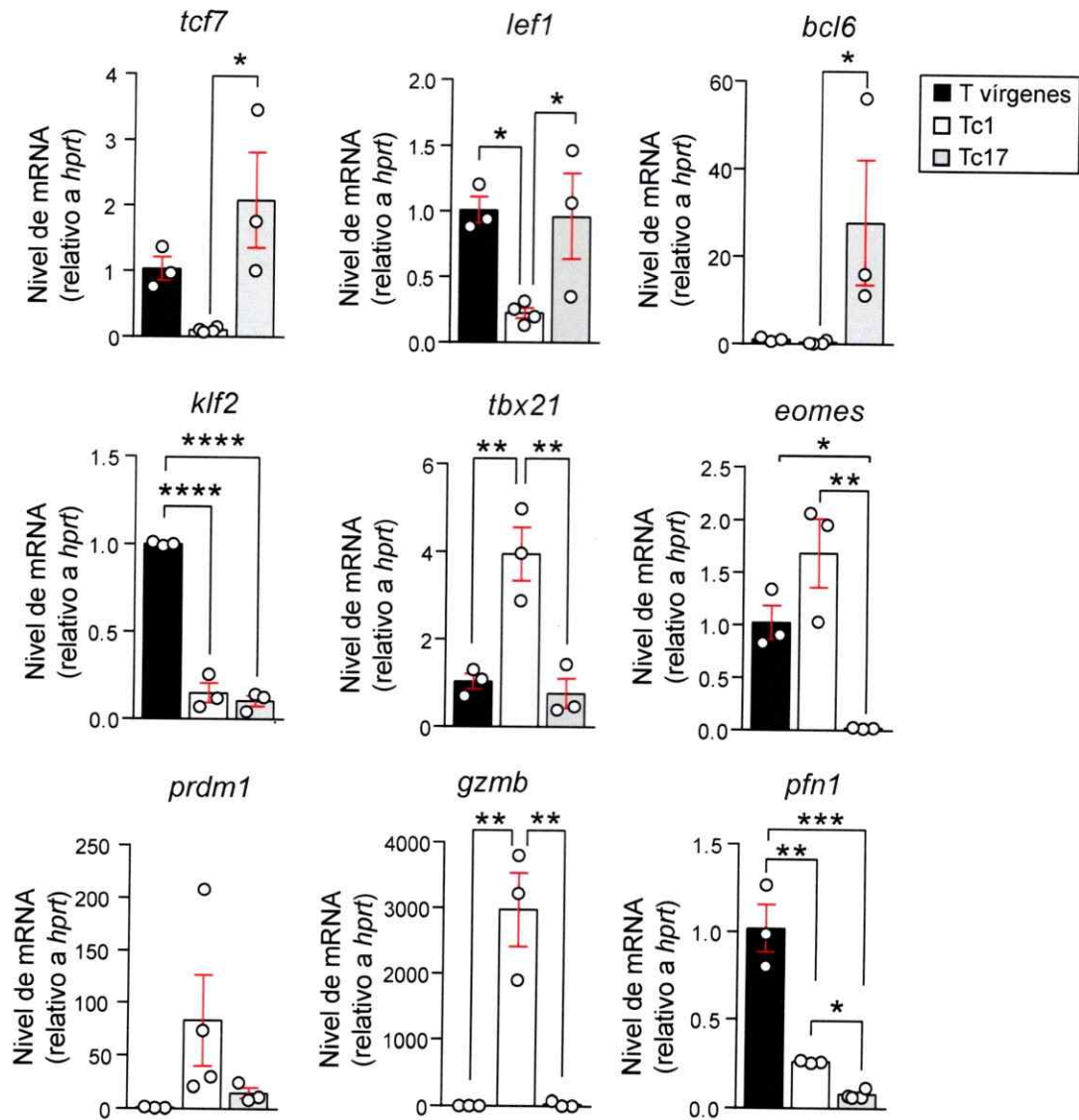


Figura 4. Los linfocitos Tc17 generados *in vitro* poseen un perfil transcripcional de linfocitos T de memoria. Se analizó la expresión transcripcional de *tcf7*, *lef1*, *bcl6*, *gzmb*, *pfn1*, *prdm1*, *tbx21*, *eomes* y *klf2* en linfocitos Tc1 y Tc17 generados *in vitro*. Los gráficos muestran la expresión relativa de los mRNA respecto a la expresión del gen constitutivo *hprt*, normalizada respecto a la expresión de los linfocitos T vírgenes. Las barras representan el promedio de expresión \pm error estándar de la media (n=3–4). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$ ANOVA de una vía.

En conjunto, los datos hasta aquí expuestos demuestran que los linfocitos Tc17 generados *in vitro* tienen un fenotipo y perfil transcripcional compatible con el de los linfocitos T CD8+ de memoria. Poseen baja expresión de moléculas relacionadas con el fenotipo T efector (CD25, GzmB, Pfn1, IFN- γ , TNF- α , Blimp-1, T-bet y Eomes) y alta expresión de moléculas relacionadas al fenotipo T de memoria (IL-2, Tcf-7, Lef-1, Bcl-6).

7.4 Los linfocitos Tc17 persisten *in vivo* y muestran un fenotipo propio de linfocitos T de memoria

A continuación decidimos determinar si los linfocitos Tc17 poseen las propiedades funcionales características de las células T de memoria. En primera instancia, evaluamos la persistencia de las células *in vivo*, que da cuenta de la capacidad de sobrevivir y/o proliferar. Para cumplir este objetivo, generamos linfocitos Tc1 o Tc17 OVA-específicos desde un ratón OT-I CD45.2 y los transferimos adoptivamente en ratones congénicos B6.SJL CD45.1 (ver sección 6.1.2 y 6.2.9). Con este sistema podemos rastrear las células transferidas ya que expresan el alelo CD45.2 a diferencia de las células endógenas del ratón receptor, que expresan el alelo CD45.1. Un grupo de ratones recibió células Tc1 y otro grupo recibió células Tc17. Para activar los linfocitos de forma antígeno-específica, 24 horas después de la transferencia adoptiva se inyectaron por vía intraperitoneal 500 μ g de proteína OVA por ratón (Figura 5A). El día 10 se extrajeron muestras de sangre y se analizó por citometría de flujo la presencia de células transferidas (CD8+CD45.2+). Como se observa en la figura 5B, tanto los linfocitos Tc1 como los linfocitos Tc17 lograron mantenerse en los ratones hasta el día 10, y no se observaron diferencias significativas en la frecuencia de células transferidas (CD8+CD45.2+) entre los dos grupos de ratones.

Además de la persistencia, evaluamos la expresión de CD62L, CD44, CD127, KLRG1 y CD25 en las células transferidas. Interesantemente, los linfocitos Tc17 transferidos mostraron mayor expresión de las proteínas relacionadas al fenotipo memoria CD44, CD62L (L-selectina) y CD127 (IL-7R α) en comparación con los linfocitos Tc1 transferidos (Figura 6). Por el contrario, los linfocitos Tc1 transferidos mostraron mayores niveles del marcador de senescencia KLRG1, en comparación con los linfocitos Tc17 transferidos (Figura 6). Además, se observó baja o nula expresión de CD25 en las células transferidas de ambos grupos de ratones (Figura 6).

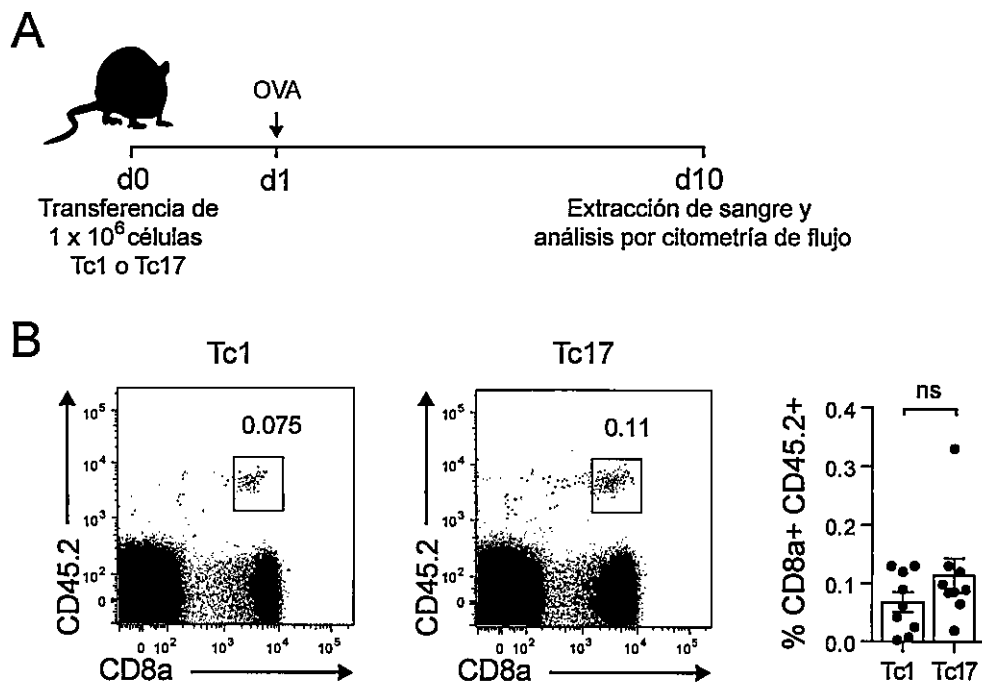


Figura 5. Persistencia de linfocitos Tc1 y Tc17 *in vivo*. (A) Se generaron linfocitos Tc1 y Tc17 *in vitro* desde un ratón OT-I (OVA-específicos CD45.2+) y se transfirieron 1×10^6 linfocitos Tc1 o Tc17 en ratones B6.SJL (CD45.1+). Al día siguiente se inmunizaron los ratones con 500 μ g de proteína OVA por ratón por vía intraperitoneal. Luego de 10 días se analizó la frecuencia de las células transferidas en la sangre de los ratones receptores mediante citometría de flujo. (B) En los gráficos de citometría se muestra la frecuencia de linfocitos Tc1 o Tc17 transferidos (CD8+CD45.2+). Las barras representan el promedio de la frecuencia \pm error estándar de la media (n=9). ns no significativo, test t de Student.

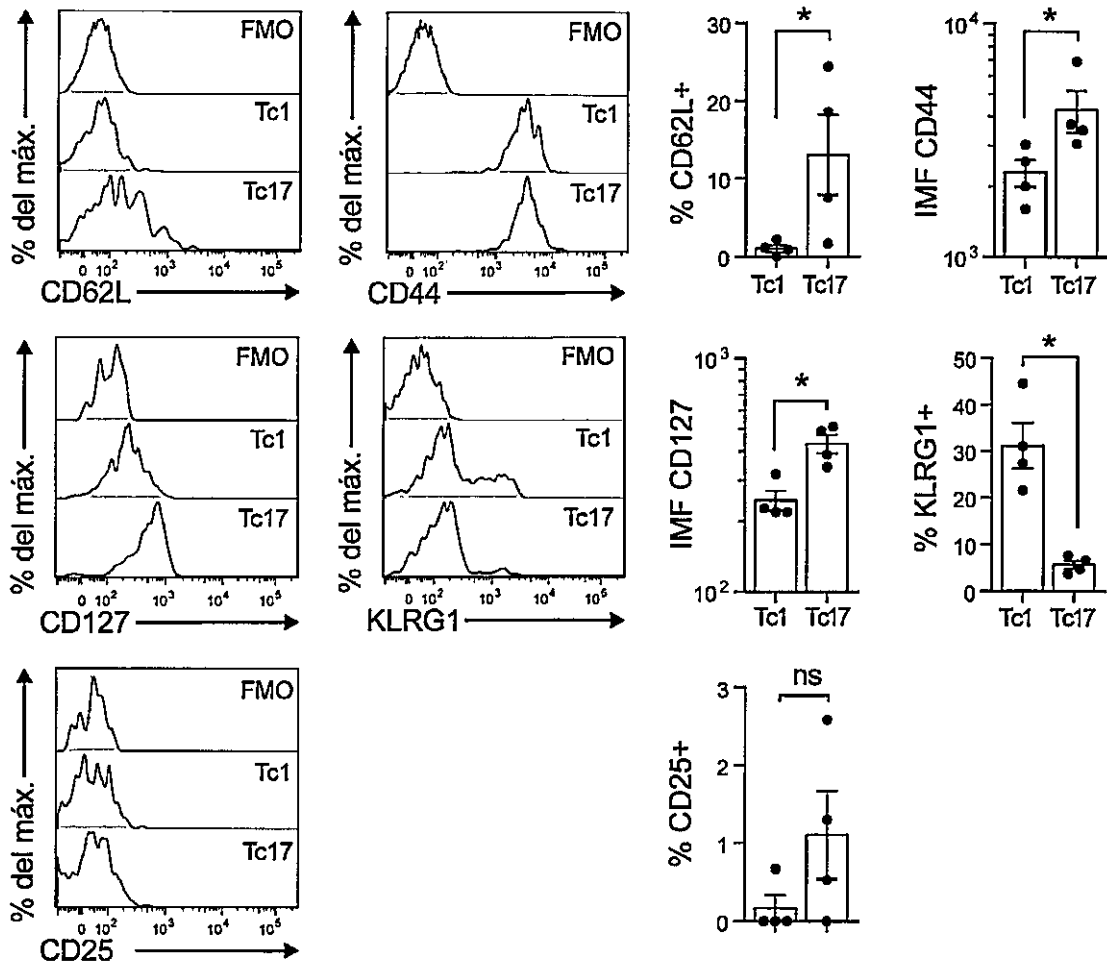


Figura 6. Los linfocitos Tc17 muestran un fenotipo de linfocitos T de memoria *in vivo*. Se generaron linfocitos Tc1 y Tc17 *in vitro* desde un ratón OT-I (OVA-específicos CD45.2+) y se transfirieron 1×10^6 linfocitos Tc1 o Tc17 en ratones B6.SJL (CD45.1+). Al día siguiente se inmunizaron los ratones con 500 μ g de proteína OVA por ratón por vía intraperitoneal. Luego de 10 días se analizó el fenotipo de las células transferidas en la sangre de los ratones receptores mediante citometría de flujo. Las barras representan el promedio de células positivas para CD62L, KLRG1 y CD25 y el promedio de la intensidad media de fluorescencia (IMF) para CD44 y CD127 \pm error estándar de la media (n=4). * $p < 0.05$ test t de Student.

7.5 Los linfocitos Tc17 se expanden *in vivo* frente a un segundo desafío con el antígeno

Los resultados de este trabajo muestran que los linfocitos Tc17 presentan características similares a los linfocitos T de memoria, como la capacidad de secretar IL-2 (Figura 3), la expresión de un perfil transcripcional menos diferenciado (Figura 4) y la expresión de CD127 y CD62L *in vivo* (Figura 6). Por esta razón decidimos evaluar la expansión secundaria *in vivo* de los linfocitos Tc17 y compararla con los linfocitos Tc1, cuyo fenotipo se asemeja a linfocitos T efectores terminalmente diferenciados.

Para lograr este objetivo, se co-transferieron adoptivamente linfocitos Tc1 (OT-I CD45.2) y Tc17 (OT-I CD45.1/2) OVA-específicos generados *in vitro* en ratones congénicos B6.SJL CD45.1. Con este sistema es posible rastrear independientemente los linfocitos Tc1 transferidos (CD45.1-CD45.2+) y Tc17 transferidos (CD45.1+CD45.2+), y a la vez diferenciarlos de las células endógenas del ratón receptor (CD45.1+CD45.2-). Los linfocitos Tc1 y Tc17 se mezclaron y se co-transferieron en un solo grupo de ratones (Figura 7A). La composición de la mezcla al momento de inyectarlas se muestra en la figura 7B y corresponde a un 67% de células Tc17 y un 33% de células Tc1. Al día siguiente (día 1) los ratones recibieron una dosis de proteína OVA intraperitoneal (Figura 7A). En los días 11 y 25 se extrajeron muestras de sangre de los ratones y se evaluó la persistencia de los linfocitos Tc1 y Tc17 transferidos (Figura 7C). De acuerdo a los datos mostrados en la figura 7D, en los días 11 y 25 se mantuvo la composición de las células transferidas, observándose alrededor de un 69% de células Tc17 (CD45.1+CD45.2+) y un 31% de células Tc1 (CD45.1-CD45.2+). Además, el número de células Tc1 y Tc17 transferidas no cambió significativamente entre los días 11 y 25 (Figura 7E).

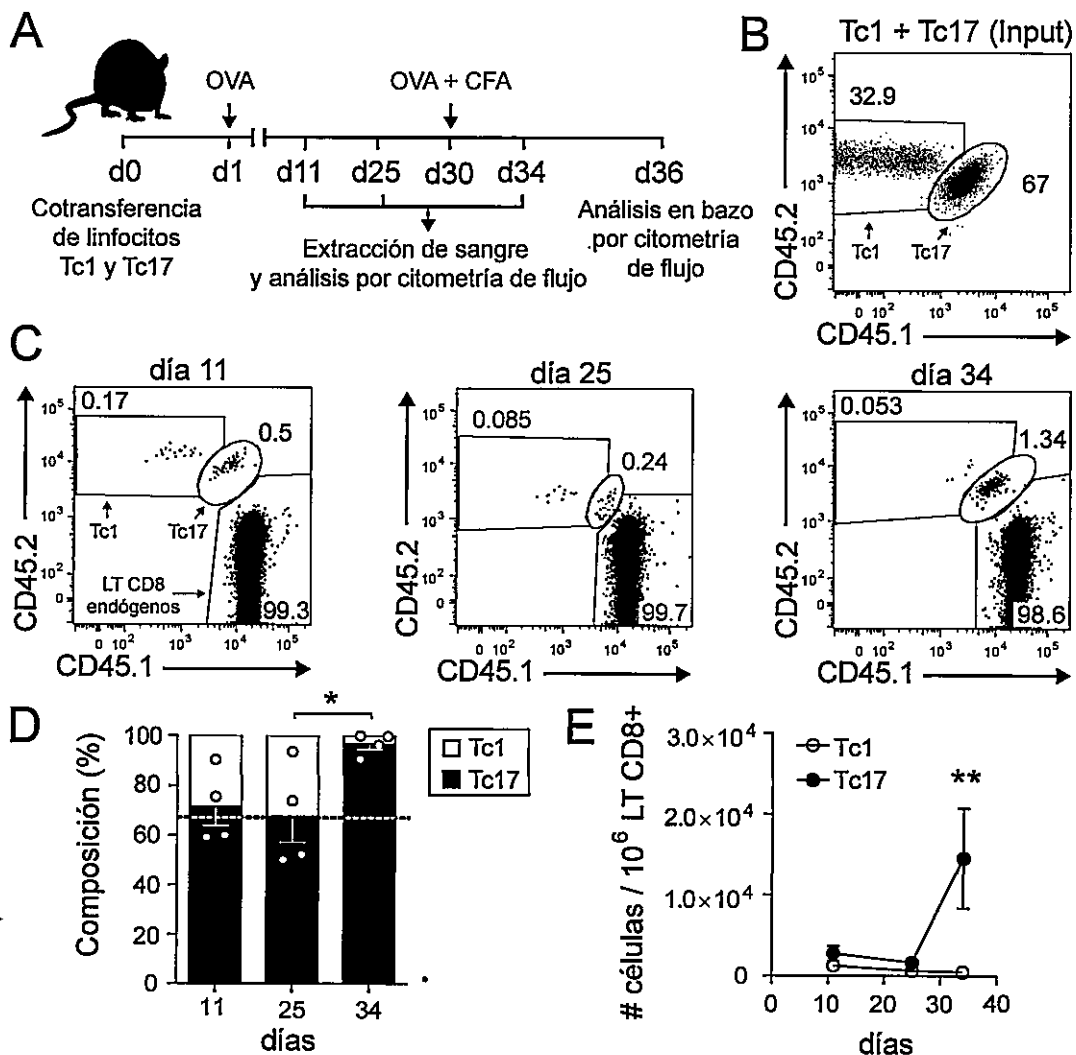


Figura 7. Los linfocitos Tc17 pueden expandirse *in vivo* frente a una segunda exposición al antígeno. (A) Se generaron linfocitos Tc1 desde un ratón OT-I CD45.2+ y linfocitos Tc17 desde un ratón OT-I CD45.1+/CD45.2+. Los linfocitos Tc1 y Tc17 se mezclaron y se co-transferieron 2×10^6 células totales en ratones B6.SJL CD45.1+. Al día siguiente los ratones recibieron una dosis intraperitoneal de proteína OVA y treinta días después fueron re-inmunizados con proteína OVA y CFA. En los días 11, 25 y 34 post transferencia se analizó la frecuencia de células transferidas en la sangre de los ratones receptores mediante citometría de flujo. En el día 36 se sacrificaron los ratones y se analizó el bazo por citometría de flujo. (B) Input de linfocitos Tc1 y Tc17 transferidos. (C) Expresión de CD45.1 y CD45.2 en linfocitos T CD8+ de sangre obtenida los días 11, 25 y 34 post-transferencia. (D) Composición de linfocitos transferidos (Tc17 y Tc1) en la sangre obtenida en los días 11, 25 y 34 post-transferencia (n=4). La línea roja punteada muestra el input. * $p < 0.05$ ANOVA de una vía. (E) Frecuencia de linfocitos Tc1 y Tc17 transferidos por millón de linfocitos T CD8+ totales en la sangre recuperada los días 11, 25 y 34 post-transferencia (n=4). ** $p < 0.01$ ANOVA de dos vías.

En el día 30 los ratones recibieron un desafío con proteína OVA y Adyuvante Completo de Freund (CFA) por vía intraperitoneal (Figura 7A). Cuatro días después del desafío (día 34) se analizó la presencia de células Tc1 y Tc17 en la sangre (Figura 7C). Interesantemente, el desafío antigénico cambió significativamente la composición de las células transferidas en favor de los linfocitos Tc17 (Figura 7D). Además, en la figura 7E se muestra que sólo los linfocitos Tc17 se expandieron en respuesta al estímulo antigénico, a diferencia de los linfocitos Tc1 que continuaron en fase de contracción.

Seis días después del desafío con OVA y CFA (día 36) analizamos el fenotipo de la progenie secundaria de los linfocitos Tc1 y Tc17 en el bazo de los animales (Figura 8A). No fue posible realizar el análisis fenotípico de los linfocitos Tc1 debido a la baja cantidad células encontradas (Figura 8A), de forma que sólo se muestra el análisis de los linfocitos Tc17 (Figura 8B). Interesantemente, la progenie de los linfocitos Tc17 está compuesta principalmente de células CD44^{hi} CD127⁺ KLRG1⁻, de las cuales un 29,6 ± 3,7% expresa CD62L (Figura 8B). Además, un 19,0 ± 2,5% de las células mantiene la producción de IL-17, mientras que un 54,6 ± 7,3% induce la expresión de IFN- γ (Figura 8B). Por otra parte un 24,0 ± 6,3% de células produce IL-2, mientras que un 21,2 ± 4,4% de las células produce TNF- α (Figura 8B).

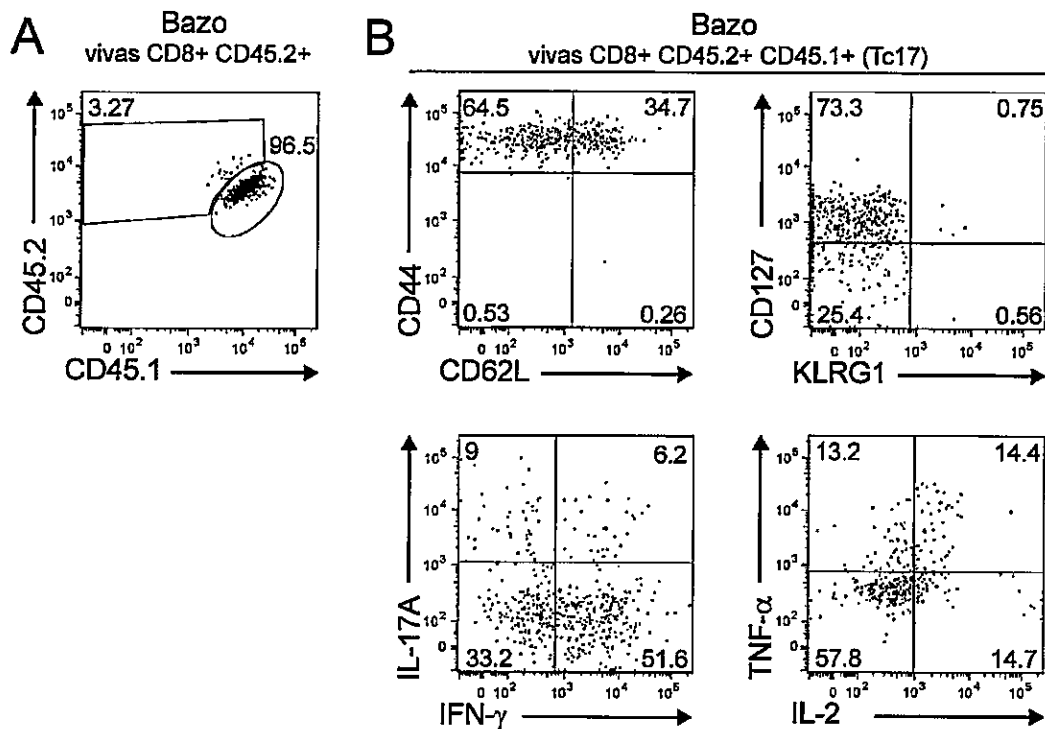


Figura 8. Los linfocitos Tc17 continúan mostrando un fenotipo de memoria luego de la expansión secundaria. Se generaron linfocitos Tc1 desde un ratón OT-I CD45.2+ y linfocitos Tc17 desde un ratón OT-I CD45.1+/CD45.2+. Los linfocitos Tc1 y Tc17 se mezclaron y se co-transferieron 2×10^6 células totales en ratones B6.SJL CD45.1+. Al día siguiente los ratones recibieron una dosis intraperitoneal de proteína OVA y treinta días después fueron re-inmunizados con proteína OVA y CFA. En el día 36 se sacrificaron los ratones y se analizó el fenotipo de los linfocitos Tc17 en el bazo. (A) Expresión de CD45.1 y CD45.2 en una ventana de células CD8+ CD45.2+ (transferidas) en el bazo de ratones receptores. (B) Expresión de CD44, CD62L, CD127, KLRG1, IFN- γ , IL-17A, TNF- α e IL-2 en linfocitos Tc17 transferidos (CD8+CD45.1+CD45.2+). Imagen representativa entre 4 ratones.

7.6 Los linfocitos Tc17 confieren inmunidad antitumoral

De acuerdo a los resultados presentados anteriormente, podemos afirmar que los linfocitos Tc17 persisten *in vivo* (Figura 5 y 6) y son capaces de montar una respuesta secundaria frente a la estimulación antigénica *in vivo* (Figura 7 y 8). Estas propiedades funcionales han sido descritas en la literatura como ventajosas en esquemas de inmunoterapia antitumoral (Gattinoni y cols., 2012). Por esta razón, decidimos evaluar la capacidad antitumoral de los linfocitos Tc17 en un esquema de protección antitumoral. Con este fin, se generaron *in vitro* células Tc1 y Tc17 OVA-específicas desde un ratón OT-I CD45.2 y se transfirieron independientemente en dos grupos de ratones B6.SJL CD45.1. Además, como grupo control se trataron ratones con el vehículo (PBS) (Figura 9A). En los días 1 y 13 los ratones recibieron una dosis de proteína OVA por vía intraperitoneal, y en el día 14 fueron inyectados por vía intradérmica con células de melanoma que expresan la proteína OVA (B16-OVA) (Figura 9A). A partir del día 14, se registró el área tumoral en los 3 grupos de animales y la cinética de crecimiento de los tumores se muestra en la figura 9B. Interesantemente, los ratones tratados con células Tc17 presentaron un crecimiento tumoral disminuido respecto del grupo control (PBS) (Figura 9B). Por el contrario, los ratones que recibieron células Tc1 presentaron un crecimiento tumoral similar al control no tratado (PBS) (Figura 9B).

Al término de la cinética tumoral, se analizó la presencia de células transferidas en el órgano linfoide drenante del tumor (TdLN, por *Tumor-draining Lymph Node*) y en los tumores de los animales tratados con linfocitos Tc1 y Tc17 (Figura 10). Interesantemente, en los TdLN de los ratones tratados con linfocitos Tc17 encontramos un mayor porcentaje de células transferidas (CD8+CD45.2+) en comparación con los

ratones tratados con linfocitos Tc1 (Figura 10). En cambio, en el tumor, la frecuencia de células transferidas fue similar para ambos grupos de ratones (Figura 10).

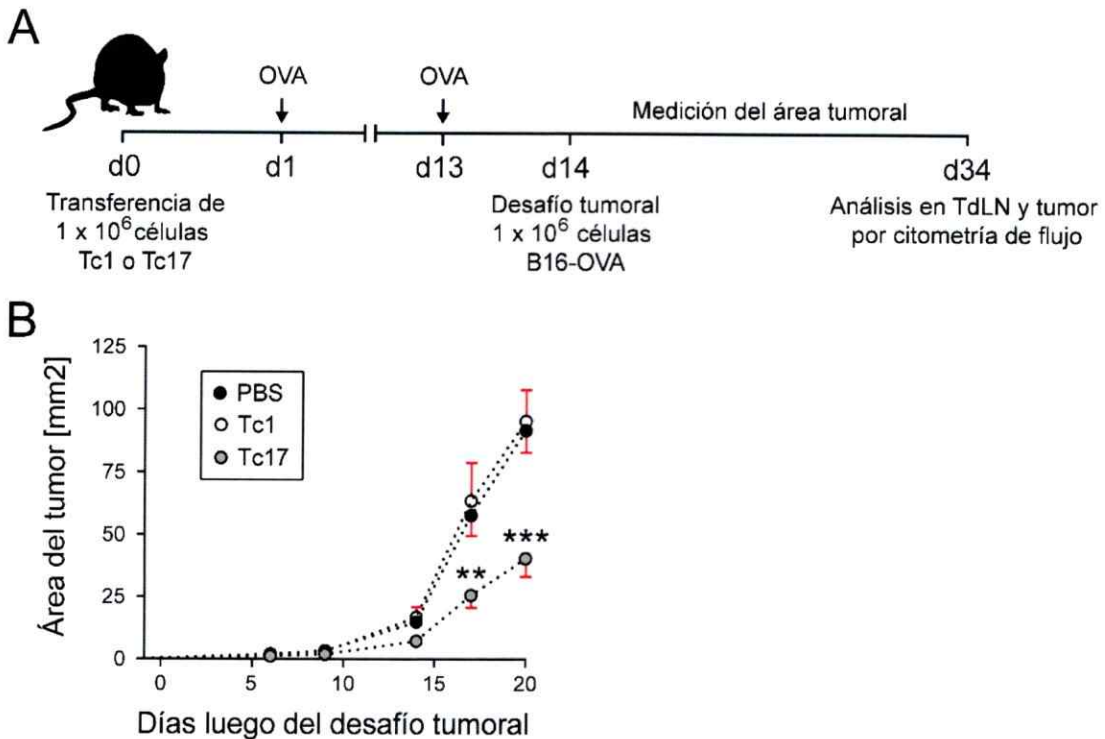


Figura 9. Los linfocitos Tc17 confieren protección frente a un desafío tumoral. (A) Se generaron linfocitos Tc1 y Tc17 *in vitro* desde un ratón OT-I (OVA-específicos CD45.2+) y se transfirieron 1×10^6 linfocitos Tc1 o Tc17 en ratones B6.SJL (CD45.1+). Al día siguiente y el día 13 post-transferencia se inmunizaron los ratones con 500 μ g de proteína OVA por ratón por vía intraperitoneal. En el día 14 post-transferencia se desafiaron los ratones con 1×10^6 células tumorales B16-OVA por vía intradérmica y se monitoreó el crecimiento tumoral los días siguientes. Se sacrificaron los ratones en el día 34 post-transferencia y se analizó el órgano linfoide drenante del tumor (TdLN) y el tumor por citometría de flujo. (B) Cinética de crecimiento tumoral de ratones tratados con Tc1, Tc17 o vehículo (PBS). Los puntos en el gráfico representan el promedio de cada grupo \pm error estándar de la media (n=8). ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ ANOVA de dos vías.

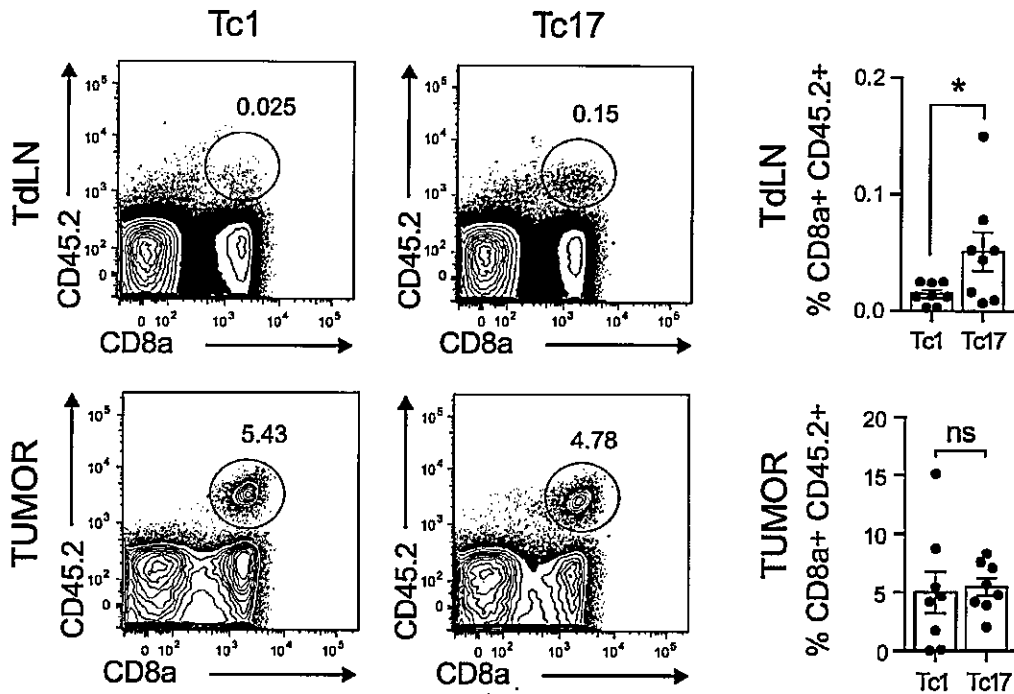


Figura 10. Los linfocitos Tc17 persisten en el órgano linfoide drenante del tumor. Se generaron linfocitos Tc1 y Tc17 *in vitro* desde un ratón OT-I (OVA-específicos CD45.2+) y se transfirieron 1×10^6 linfocitos Tc1 o Tc17 en ratones B6.SJL (CD45.1+). Al día siguiente y el día 13 post-transferencia se inmunizaron los ratones con 500 μ g de proteína OVA por ratón por vía intraperitoneal. El día 14 post-transferencia se desafiaron los ratones con 1×10^6 células tumorales B16-OVA por vía intradérmica. Se sacrificaron los ratones el día 34 post-transferencia y se analizaron las células del órgano linfoide drenante del tumor (TdLN) y del tumor por citometría de flujo. En los gráficos se muestra la frecuencia de células transferidas (CD8+CD45.2+) en el TdLN y en el tumor. Las barras representan el promedio de cada grupo \pm error estándar de la media (n=8). * $p < 0.05$, test t de Student.

Además de analizar la presencia de las células transferidas, también analizamos su capacidad de producir citoquinas. La figura 11 muestra el análisis de la expresión de IFN- γ , IL-17, IL-2 y TNF- α de la progenie de los linfocitos Tc1 y Tc17 destacados en la figura 10. Interesantemente, tanto en el TdLN como en el tumor los linfocitos Tc17 mostraron mayor producción IL-2 que los linfocitos Tc1 (Figura 11). Además, en TdLN

los linfocitos Tc17 mostraron mayor producción de IFN- γ en comparación a los linfocitos Tc1 (Figura 11).

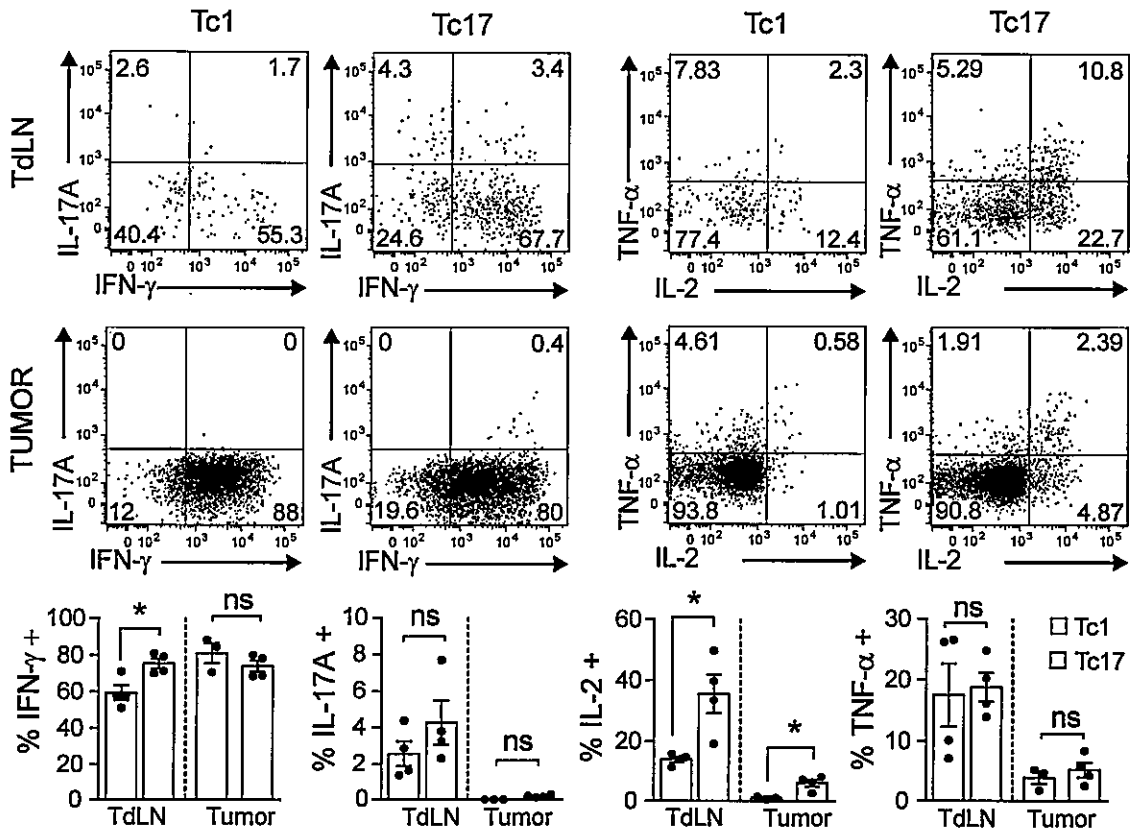


Figura 11. Los linfocitos Tc17 producen mayores niveles de IFN- γ e IL-2 en ratones con tumor. Análisis de las células Tc1 y Tc17 encontradas en el TdLN y el tumor el día 34 (ver figura 10). Las células se activaron con PMA e ionomicina en presencia de brefeldina A durante 4 horas y se analizó producción de citoquinas mediante tinción intracelular y citometría de flujo multiparamétrica. En los gráficos se muestra la producción de IFN- γ , IL-17A, TNF- α e IL-2 en los linfocitos Tc1 o Tc17 transferidos (CD8+CD45.2+). Las barras representan el promedio de células positivas para cada citoquina \pm error estándar de la media (n=3-4). * p < 0.05, test t de Student.

En la literatura se ha demostrado que los linfocitos T capaces de secretar múltiples citoquinas simultáneamente (ej IL-2+ TNF- α + IFN- γ +), conocidos como linfocitos T “polifuncionales”, son más eficientes en la eliminación de patógenos y tumores en comparación con los linfocitos que secretan sólo una citoquina (ej. IFN- γ) (Seder y cols., 2008; Yuan y cols., 2008). Para determinar la polifuncionalidad de la progenie de los linfocitos Tc1 y Tc17 transferidos se realizó un análisis más fino de los datos mostrados en la figura 11. En la figura 12A se muestran gráficos de torta que representan la distribución de las células respecto de las citoquinas que producen, desde células que no producen ninguna de las 4 citoquinas medidas, hasta células que producen simultáneamente las 4 citoquinas medidas. Además, se muestra esta misma distribución de frecuencias en un histograma para TdLN (Figura 12B) y tumor (Figura 12C). En estos gráficos es posible visualizar que en el TdLN la progenie de los linfocitos Tc17 presenta mayor polifuncionalidad que la progenie de los linfocitos Tc1. Por el contrario, en el tumor no se observan diferencias significativas en cuanto a la polifuncionalidad y ambos tipos celulares muestran principalmente producción sólo de una citoquina.

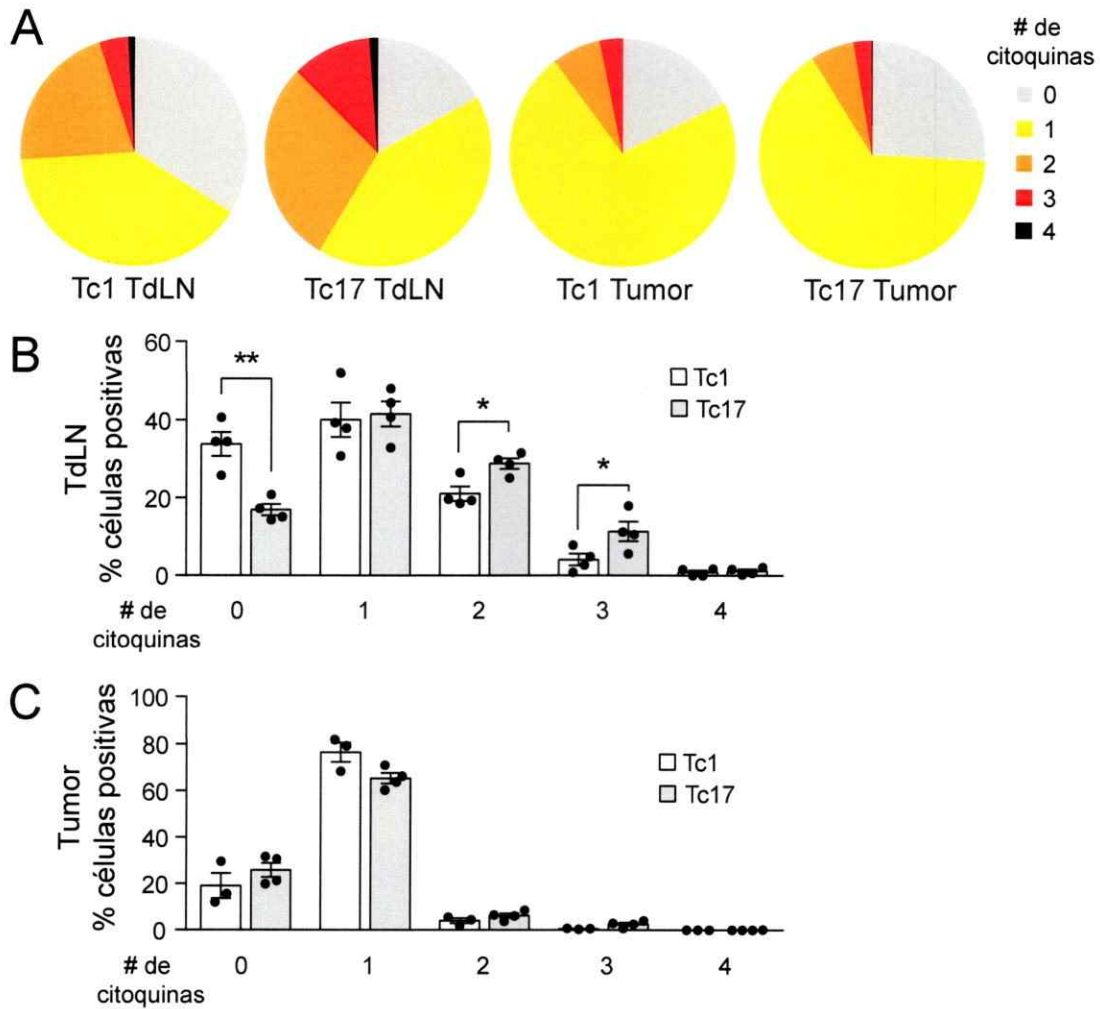


Figura 12. Los linfocitos Tc17 producen una respuesta polifuncional en ratones con tumor. Análisis de polifuncionalidad de las células Tc1 y Tc17 a partir de los datos mostrados en la figura 11. (A) Los gráficos de torta muestran la distribución de frecuencias de células Tc1 o Tc17 transferidas (CD8+CD45.2+) de acuerdo a la cantidad de citoquinas diferentes que producen simultáneamente desde 0 hasta 4 (IFN- γ , IL-17A, TNF- α , IL-2) en el TdLN y el tumor. (B–C) Histogramas de células Tc1 o Tc17 transferidas (CD8+CD45.2+) que producen simultáneamente desde 0 hasta 4 citoquinas en TdLN (B) o tumor (C). Las barras representan el promedio de frecuencia de células positivas en cada grupo \pm error estándar de la media (n=3–4). * p < 0.05, test t de Student.

8. DISCUSIÓN

Actualmente, la terapia adoptiva de linfocitos T es una de las estrategias más prometedoras para el tratamiento del cáncer (Rosenberg y cols., 2011). Sin embargo, una de sus principales limitaciones radica en que las células T CD8⁺ maduran hacia un estado de diferenciación terminal incapaz de sobrevivir y proliferar *in vivo* (Crompton y cols., 2014). Estudios pioneros en este tipo de inmunoterapia supusieron que un mayor número de células altamente efectoras sería la mejor opción a la hora de combatir tumores establecidos. Sin embargo, al poco tiempo fue evidente que la baja persistencia *in vivo* de las células terminalmente diferenciadas las incapacitaba para esta tarea. En este sentido, diversos estudios pre-clínicos han demostrado que células menos diferenciadas como las células T de memoria son mejores candidatos para la inmunoterapia celular, puesto que conservan la capacidad de sobrevivir y proliferar, al tiempo que pueden originar nuevas células efectoras con potente actividad antitumoral (Gattinoni y cols., 2011; Klebanoff y cols., 2005). En el trabajo aquí expuesto, observamos que los linfocitos Tc17 generados *in vitro* poseen un fenotipo similar a los linfocitos T CD8⁺ de memoria y son capaces de responder *in vivo* frente a una exposición secundaria al antígeno, a diferencia de linfocitos Tc1. Interesantemente, estas propiedades correlacionan con un mejor desempeño antitumoral en un modelo de terapia celular adoptiva, acompañado de un patrón de migración central y la capacidad de respuesta polifuncional, ambas características ventajosas para la efectividad de la terapia.

Abundante evidencia en la literatura converge en que la señalización de la vía Wnt- β -catenina promueve la adquisición del fenotipo T de memoria, mientras que restringe la

diferenciación de los linfocitos T CD8+ hacia células T efectoras terminales (Zhou y cols., 2010; Zhao y cols., 2010; Gattinoni y cols., 2011). Interesantemente, en esta tesis observamos que los linfocitos Tc17 generados *in vitro* muestran una alta expresión de los transductores de la vía Wnt- β -catenina Tcf-7 y Lef-1, similar al fenotipo reportado en linfocitos T de memoria (Gattinoni y cols., 2011). Esto cobra especial relevancia ya que estudios realizados por el grupo de Restifo han demostrado que la activación farmacológica de la vía Wnt es suficiente para restringir la diferenciación terminal en los linfocitos T CD8+ (Gattinoni y cols., 2009, 2011), favoreciendo la generación de linfocitos T de memoria altamente indiferenciados con un potente potencial terapéutico (Gattinoni y cols., 2009, 2011).

Bcl-6 es otro factor importante en la mantención del fenotipo memoria y se ha reportado que se acumula a medida que los linfocitos T CD8+ transitan hacia el fenotipo memoria *in vivo* (Cui y cols., 2011). Consistentemente, se ha demostrado que la sobreexpresión de Bcl-6 en linfocitos T CD8+ promueve la generación de linfocitos T_{CM} *in vivo* (Ichii y cols., 2002; Cui y cols., 2011). El hecho que los linfocitos Tc17 expresen mayores niveles de Bcl-6, Tcf-7 y Lef-1 podría ser consecuencia de la estimulación de la vía IL-6/STAT-3. Diversas citoquinas relacionadas al programa Tc17 como IL-6, IL-21 e IL-23 estimulan la fosforilación de STAT-3, que induce la expresión de ROR γ t e IL-17, y reprime la expresión de granzima B e IFN- γ (Yen y cols., 2009; Huber y cols., 2009). Interesantemente, se ha reportado en la literatura que STAT-3 controla la expresión de Bcl-6 (Cui y cols., 2011) y Tcf-7 (Durant y cols., 2010) en linfocitos T CD8+ y CD4+, respectivamente. De hecho, linfocitos T CD8+ deficientes en STAT3 son de vida corta, fallan en la generación de linfocitos T_{CM} *in vivo*, y presentan una menor expresión de Bcl-6 en comparación a células normales (Cui y cols., 2011). De esta forma, la señalización

de la vía IL-6/STAT-3 podría contribuir a la adquisición del programa molecular T de memoria observado en los linfocitos Tc17. En acuerdo con esta hipótesis, se ha demostrado que linfocitos T CD8+ que tienen alta expresión del receptor para IL-6 poseen mayor potencial para originar células de memoria en comparación con los linfocitos T CD8+ que expresan menores niveles del receptor para IL-6 (Castellino y cols., 2007).

Por otra parte, los factores transcripcionales T-bet, Eomes y Blimp-1 cooperan en la adquisición del programa T efector terminal, induciendo la expresión de genes propios del fenotipo efector como IFN- γ , GzmA, GzmB, Prf1 y KLRG1, mientras que reprimen la expresión de genes propios del fenotipo memoria como Tcf-7, Id3, CD62L y CCR7 (Pearce y cols., 2003; Joshi y cols., 2007; Rutishauser y cols., 2009; Xin y cols., 2016). En la literatura se ha reportado que linfocitos T CD8+ deficientes para T-bet/Eomes (Intlekofer y cols., 2008) o T-bet/Blimp-1 (Xin y cols., 2016) presentan una deficiencia en la diferenciación hacia el fenotipo efector *in vivo*, mientras que expresan moléculas relacionadas al fenotipo memoria y espontáneamente activan el programa Tc17 (Ror α , Ror γ t, IL-17, IL-23R, Ccr6). De esta forma, T-bet, Eomes y Blimp-1 actuarían reprimiendo el fenotipo memoria y simultáneamente el conjunto de genes relacionados al programa Tc17. En acuerdo con lo anterior, en este trabajo nosotros observamos que los linfocitos Tc17 generados *in vitro* presentan baja expresión de T-bet, Eomes y Blimp-1 al tiempo que expresan bajos niveles de las proteínas efectoras IFN- γ , GzmB y Pfn1.

Dentro de las principales propiedades funcionales de los linfocitos T de memoria se encuentra la capacidad de (1) persistir por tiempos largos en el organismo hospedero y (2) conservar el potencial para montar una respuesta secundaria contra el antígeno.

La capacidad de los linfocitos T de memoria de mantenerse *in vivo* depende principalmente de la exposición a citoquinas como IL-7 e IL-15 (Goldrath y cols., 2002), que favorecen la supervivencia de las células induciendo la expresión de proteínas antiapoptóticas como Bcl-2 (Hamilton y Jameson, 2012). En este trabajo observamos que los linfocitos Tc17 muestran una alta expresión de la cadena alfa del receptor para IL-7 (CD127) *in vivo*, similar a lo reportado en la literatura (Yu y cols., 2013), lo que sugiere que los linfocitos Tc17 podrían presentar ventajas en la supervivencia a largo plazo. En acuerdo con esta idea, observamos que en el modelo de inmunoterapia antitumoral los linfocitos Tc17 lograron persistir en el órgano linfático drenante del tumor, a diferencia de los linfocitos Tc1. De esta forma, estos resultados sugieren que la señalización vía IL-7 podría favorecer la supervivencia *in vivo* de los linfocitos Tc17, aunque más experimentos son necesarios para demostrarlo.

Una propiedad fundamental para inducir una respuesta secundaria eficiente es la capacidad que tienen los linfocitos T de memoria de proliferar en respuesta a la estimulación antigénica (expansión secundaria). En esta tesis observamos que a diferencia de los linfocitos Tc1, los linfocitos Tc17 lograron expandirse *in vivo* luego de una exposición secundaria al antígeno. Esta cualidad se ha relacionado con la producción y señalización autocrina de IL-2 (Feau y cols., 2011), y consecuentemente se ha reportado que linfocitos T con un menor grado de diferenciación (T_{CM}) producen mayores niveles de IL-2 en comparación a linfocitos T más diferenciados (T_{EM}) (Sallusto y cols., 1999; Newell y cols., 2012; Klebanoff y cols., 2005). Consecuentemente, en esta tesis observamos que un alto porcentaje de los linfocitos Tc17 generados *in vitro* produce IL-2, e incluso una fracción de la progenie secundaria de los linfocitos Tc17 continúa produciendo IL-2 *in vivo*.

Interesantemente, sólo los linfocitos Tc17 fueron encontrados en los órganos linfoides (bazo y linfonodos) de los ratones después de la estimulación antigénica secundaria. Este patrón de migración a través de los órganos linfoides es característico de los linfocitos T de memoria central, y depende de la expresión de L-selectina (CD62L) y del receptor de quimioquina CCR7 (Sallusto y cols., 1999; Masopust, 2001). Paradójicamente, observamos que los linfocitos Tc17 generados *in vitro* no expresan CD62L al momento de la transferencia adoptiva, ni tampoco expresan el factor transcripcional Klf-2, que gobierna la expresión de *sell* (gen que codifica CD62L). Sin embargo, una fracción de los linfocitos Tc17 son capaces de re-expresar CD62L *in vivo*, y mantienen la expresión de CD62L *in vivo* incluso después de la estimulación antigénica secundaria. Esta propiedad de migrar a través de los órganos linfoides podría permitir el contacto de los linfocitos Tc17 con células dendríticas y de esta manera favorecer la respuesta secundaria. En este sentido, estudios previos han relacionado positivamente la capacidad de los linfocitos T de migrar a los linfonodos con una mayor efectividad en esquemas de inmunoterapia celular antitumoral (Klebanoff y cols., 2005; Gattinoni y cols., 2011).

Diversos reportes de la literatura han destacado la superioridad de los linfocitos T de memoria en esquemas de terapia adoptiva antitumoral, debido a que son capaces de sobrevivir, proliferar y dar origen a células efectoras continuamente (Klebanoff y cols., 2005; Gattinoni y cols., 2009, 2011). En este sentido se ha planteado en la literatura que los linfocitos T de memoria comparten con las células madre de otros tejidos características "troncales" como la autorenovación y multipotencialidad, ya que pueden dar origen a linfocitos T efectoras terminalmente diferenciados (Gattinoni y cols., 2012; Graef y cols., 2014). Interesantemente, en este trabajo observamos que una parte de la

progenie secundaria de los linfocitos Tc17 retiene características de células menos diferenciadas, como la producción de IL-2 o la expresión de CD62L (autorenovación); mientras que otra fracción adquiere la capacidad de producir IFN- γ (multipotencialidad).

Tanto el fenotipo como las propiedades funcionales observadas en los linfocitos Tc17 (persistencia, expansión secundaria, migración a los linfonodos, autorenovación y multipotencialidad) sugieren fuertemente que los linfocitos Tc17 poseen cualidades idóneas para su uso en terapias adoptivas antitumorales. En acuerdo con esta idea, nuestro grupo junto a otros autores hemos demostrado que la terapia adoptiva con linfocitos Tc17 generados *in vitro* en ratones con melanoma promueve la eliminación de tumores establecidos (Hinrichs y cols., 2009; Garcia-Hernandez y cols., 2010; Flores-Santibanez y cols., 2015) mediante un mecanismo dependiente de la producción de IFN- γ (Garcia-Hernandez y cols., 2010). Sin embargo, la efectividad terapéutica de los linfocitos Tc17 ha sido cuestionada por estudios que muestran que los linfocitos Tc1 son más eficientes que los linfocitos Tc17 en la erradicación de tumores establecidos en base al número de células transferidas (Garcia-Hernandez y cols., 2010; Flores-Santibanez y cols., 2015). En contraste con este antecedente, en esta tesis observamos que la transferencia adoptiva de linfocitos Tc17 generados *in vitro* confiere inmunidad antitumoral, mientras que los linfocitos Tc1 no logran proteger a los ratones frente al desafío tumoral. En este sentido, es posible conciliar estos resultados argumentando que la alta capacidad efectora de los linfocitos Tc1 es importante para mediar una rápida eliminación de las células tumorales en una primera etapa, mientras que las cualidades de memoria de los linfocitos Tc17 sustentarían un ataque continuo en el tiempo, confiriendo inmunidad por periodos más largos. Sumado a esto, observamos que los linfocitos Tc17 producen más IL-2 y presentan características polifuncionales, siendo

capaces de producir simultáneamente diversas citoquinas (IL-17, IFN- γ , TNF- α , IL-2). Producir una respuesta polifuncional sería una propiedad importante de los linfocitos Tc17 ya que este tipo de respuesta se ha relacionado con una mayor protección frente a patógenos virales y tumores (Seder y cols., 2008; Yuan y cols., 2008).

9. RESUMEN DE RESULTADOS

- Los linfocitos Tc17 generados *in vitro* presentan una mayor expresión de genes y proteínas relacionadas al fenotipo memoria (Tcf-7, Lef-1, Bcl-6, IL-2) y una menor expresión de genes y proteínas relacionadas al programa efector (T-bet, Eomes, Blimp-1, CD25, GzmB, Pfn1, IFN- γ , TNF- α) en comparación a los linfocitos Tc1 generados *in vitro*
- Los linfocitos Tc17 persisten *in vivo* y muestran un fenotipo CD127+KLRG1- característico de células de memoria
- Los linfocitos Tc17 se expanden *in vivo* en respuesta a una segunda estimulación con el antígeno (expansión secundaria)
- Una fracción de la progenie secundaria de los linfocitos Tc17 se mantiene como células Tc17 tipo memoria (CD62L+ IL-17+ IL-2+), mientras que la otra fracción se transforma en linfocitos T efectores IFN- γ +
- La transferencia adoptiva de linfocitos Tc17 confiere inmunidad frente a un desafío tumoral
- Los linfocitos Tc17 se mantienen circulando en los órganos linfoides secundarios de los ratones con tumor y responden de manera polifuncional

10. CONCLUSIONES

En conjunto, los resultados obtenidos en esta tesis demuestran que los linfocitos Tc17 generados *in vitro* presentan un fenotipo y propiedades funcionales (persistencia y expansión secundaria) similares a los linfocitos T CD8+ de memoria. Interesantemente, esto se correlaciona con un mejor desempeño en un modelo de protección antitumoral. De esta forma, podemos concluir que los linfocitos Tc17 corresponderían a un estado de diferenciación temprano, que retiene características propias de las células de memoria, siendo capaces de persistir y migrar a través de los órganos linfoides secundarios, y también dar origen a células efectoras tipo Tc1 con propiedades antitumorales. El conjunto de datos presentados en esta tesis aportan nuevas evidencias que destacan el potencial de los linfocitos Tc17 en el diseño de nuevos esquemas de inmunoterapia antitumoral más eficientes.

11. BIBLIOGRAFÍA

- Abbas, A.K., A.H. Litchman, and S. Pillai. 2014. Cellular and Molecular Immunology. 8th ed. Elsevier, Philadelphia.
- Arsenio, J., B. Kakaradov, P.J. Metz, S.H. Kim, G.W. Yeo, and J.T. Chang. 2014. Early specification of CD8+ T lymphocyte fates during adaptive immunity revealed by single-cell gene-expression analyses. *Nat. Immunol.* 15:365–372.
- Blattman, J.N., R. Antia, D. Sourdive, X. Wang, S.M. Kaech, K. Murali-Krishna, J. Altman, and R. Ahmed. 2002. Estimating the Precursor Frequency of Naive Antigen-specific CD8 T Cells. *J. Exp. Med.* 195:657–664.
- Budd, R.C., J. Cerottini, C. Horvath, C. Bron, T. Pedrazzini, R.C. Howe, and H.R. Macdonald. 1987. Distinction of virgin and memory T lymphocytes. Stable acquisition of the Pgp-1 glycoprotein concomitant with antigenic stimulation. *J. Immunol.* 138:3120–3129.
- Castellino, F., R.N. Germain, I. Prememory, C.D.T. Cells, F. Castellino, and R.N. Germain. 2007. Chemokine-Guided CD4 + T Cell Help Enhances Generation of IL-6R α high IL-7R α high Prememory CD8 + T Cells. *J. Immunol.* 178:778–787.
- Chang, J.T., E.J. Wherry, and A.W. Goldrath. 2014. Molecular regulation of effector and memory T cell differentiation. *Nat. Immunol.* 15:1104–15.
- Crompton, J.G., M. Sukumar, and N.P. Restifo. 2014. Uncoupling T-cell expansion from effector differentiation in cell-based immunotherapy. *Immunol. Rev.* 257:264–276.
- Cui, W., Y. Liu, J.S. Weinstein, J. Craft, and S.M. Kaech. 2011. An Interleukin-21-Interleukin-10-STAT3 Pathway Is Critical for Functional Maturation of Memory CD8 + T Cells. *Immunity.* 35:792–805.
- Dudley, M.E., J.R. Wunderlich, P.F. Robbins, J.C. Yang, P. Hwu, D.J. Schwartzentruber, S.L. Topalian, R. Sherry, N.P. Restifo, A.M. Hubicki, M.R. Robinson, M. Raffeld, P. Duray, C.A. Seipp, L. Rogers-freezer, K.E. Morton, S.A. Mavroukakis, D.E. White, and S.A. Rosenberg. 2002. Cancer Regression and Autoimmunity in Patients After Clonal Repopulation with Antitumor Lymphocytes. *Science.* 298:850–855.
- Durant, L., W.T. Watford, L. Ramos, A. Laurence, G. Vahedi, L. Wei, H. Takahashi, H. Sun, Y. Kanno, F. Powrie, and J.J.O. Shea. 2010. Diverse Targets of the Transcription Factor STAT3 Contribute to T Cell Pathogenicity and Homeostasis. *Immunity.* 32:605–615.
- Feau, S., R. Arens, S. Togher, and S.P. Schoenberger. 2011. Autocrine IL-2 is required for secondary population expansion of CD8 + memory T cells. *Nat. Immunol.* 12:908–913.
- Flores-Santibanez, F., D. Fernandez, D. Meza, G. Tejon, L. Vargas, L. Varela-Nallar, S. Arredondo, V. Guixe, M. Roseblatt, M.R. Bono, and D. Sauma. 2015. CD73-mediated adenosine production promotes stem cell-like properties in mouse Tc17 cells. *Immunology.* 146:582–594.

- Garcia-Hernandez, M.D.L.L., H. Hamada, J.B. Reome, S.K. Misra, M.P. Tighe, and R.W. Dutton. 2010. Adoptive transfer of tumor-specific Tc17 effector T cells controls the growth of B16 melanoma in mice. *J. Immunol.* 184:4215–27.
- Gattinoni, L., C.A. Klebanoff, D.C. Palmer, C. Wrzesinski, K. Kerstann, Z. Yu, S.E. Finkelstein, M.R. Theoret, S.A. Rosenberg, and N.P. Restifo. 2005. Acquisition of full effector function in vitro paradoxically impairs the in vivo antitumor efficacy of adoptively transferred CD8⁺ T cells. *J. Clin. Invest.* 115:1616–1626.
- Gattinoni, L., C. a Klebanoff, and N.P. Restifo. 2012. Paths to stemness: building the ultimate antitumour T cell. *Nat. Rev. Cancer.* 12:671–84.
- Gattinoni, L., E. Lugli, Y. Ji, Z. Pos, C.M. Paulos, M.F. Quigley, J.R. Almeida, E. Gostick, Z. Yu, C. Carpenito, E. Wang, D.C. Douek, D. a Price, C.H. June, F.M. Marincola, M. Roederer, and N.P. Restifo. 2011. A human memory T cell subset with stem cell-like properties. *Nat. Med.* 17:1290–7.
- Gattinoni, L., X.-S. Zhong, D.C. Palmer, Y. Ji, C.S. Hinrichs, Z. Yu, C. Wrzesinski, A. Boni, L. Cassard, L.M. Garvin, C.M. Paulos, P. Muranski, and N.P. Restifo. 2009. Wnt signaling arrests effector T cell differentiation and generates CD8⁺ memory stem cells. *Nat. Med.* 15:808–13.
- Gebhardt, T., L.M. Wakim, L. Eidsmo, P.C. Reading, W.R. Heath, and F.R. Carbone. 2009. Memory T cells in nonlymphoid tissue that provide enhanced local immunity during infection with herpes simplex virus. *Nat. Immunol.* 10:524–30.
- Goldrath, A.W., P. V Sivakumar, M. Glaccum, M.K. Kennedy, M.J. Bevan, C. Benoist, D. Mathis, and E.A. Butz. 2002. Cytokine Requirements for Acute and Basal Homeostatic Proliferation of Naive and Memory CD8⁺ T Cells. *J. Exp. Med.* 195:1515–22.
- Graef, P., V.R. Buchholz, C. Stemberger, M. Flossdorf, L. Henkel, M. Schiemann, I. Drexler, T. Höfer, S.R. Riddell, and D.H. Busch. 2014. Serial Transfer of Single-Cell-Derived Immunocompetence Reveals Stemness of CD8⁺ Central Memory T Cells. *Immunity.* 41:116–126.
- Gubin, M.M., X. Zhang, H. Schuster, E. Caron, J.P. Ward, T. Noguchi, Y. Ivanova, J. Hundal, C.D. Arthur, W. Krebber, G.E. Mulder, M. Toebes, M.D. Vesely, S.S.K. Lam, A.J. Korman, J.P. Allison, G.J. Freeman, A.H. Sharpe, E.L. Pearce, T.N.M. Schumacher, R. Aebersold, H.-G. Rammensee, C.J.M. Melieffl, E.R. Mardis, W.E. Gillanders, M.N. Artyomov, and R.D. Schreiber. 2014. Checkpoint blockade cancer immunotherapy targets tumour-specificmutant antigens. *Nature.* 515:577–581.
- Guo, Y., K. Pino-Lagos, C.A. Ahonen, K.A. Bennett, J. Wang, J.L. Napoli, R. Blomhoff, S. Sockanathan, R.A. Chandraratna, E. Dmitrovsky, M.J. Turk, and R.J. Noelle. 2012. A retinoic acid-rich tumor microenvironment provides clonal survival cues for tumor-specific CD8⁺ T cells. *Cancer Res.* 72:5230–5239.
- Hamilton, S.E., and S.C. Jameson. 2012. CD8 T cell quiescence revisited. *Trends Immunol.* 33:224–230.
- Hinrichs, C.S., A. Kaiser, C.M. Paulos, L. Cassard, L. Sanchez-Perez, B. Heemskerk, C. Wrzesinski, Z. a Borman, P. Muranski, and N.P. Restifo. 2009. Type 17 CD8⁺ T cells display enhanced antitumor immunity. *Blood.* 114:596–9.
- Huber, M., S. Heink, H. Grothe, A. Guralnik, K. Reinhard, K. Elflein, T. Hünig, H.-W.

- Mittrücker, A. Brüstle, T. Kamradt, and M. Lohoff. 2009. A Th17-like developmental process leads to CD8(+) Tc17 cells with reduced cytotoxic activity. *Eur. J. Immunol.* 39:1716–25.
- Ichii, H., A. Sakamoto, M. Hatano, S. Okada, H. Toyama, S. Taki, M. Arima, Y. Kuroda, and T. Tokuhisa. 2002. Role for Bcl-6 in the generation and maintenance of memory CD8 + T cells. *Nat. Immunol.* 3:558–563.
- Intlekofer, A.M., A. Banerjee, N. Takemoto, S.M. Gordon, C.S. DeJong, H. Shin, C.A. Hunter, E.J. Wherry, and S.L. Reiner. 2008. Anomalous Type 17 Response to Viral Infection by CD8+ T Cells Lacking T-bet and Eomesodermin. *Science.* 321:408–411.
- Joshi, N.S., W. Cui, A. Chandele, H.K. Lee, D.R. Urso, J. Hagman, L. Gapin, and S.M. Kaech. 2007. Inflammation Directs Memory Precursor and Short-Lived Effector CD8 + T Cell Fates via the Graded Expression of T-bet Transcription Factor. *Immunity.* 27:281–295.
- Kaech, S.M., and W. Cui. 2012. Transcriptional control of effector and memory CD8+ T cell differentiation. *Nat. Rev. Immunol.* 12:749–761.
- Kaech, S.M., J.T. Tan, E.J. Wherry, B.T. Konieczny, C.D. Surh, and R. Ahmed. 2003. Selective expression of the interleukin 7 receptor identifies effector CD8 T cells that give rise to long-lived memory cells. *Nat. Immunol.* 4:1191–8.
- Kalia, V., S. Sarkar, S. Subramaniam, W.N. Haining, K.A. Smith, and R. Ahmed. 2010. Prolonged Interleukin-2Ra Expression on Virus-Specific CD8+ T Cells Favors Terminal-Effector Differentiation In Vivo. *Immunity.* 32:91–103.
- Klebanoff, C.A., L. Gattinoni, P. Torabi-parizi, K. Kerstann, A.R. Cardones, S.E. Finkelstein, D.C. Palmer, P.A. Antony, S.T. Hwang, S.A. Rosenberg, T.A. Waldmann, and N.P. Restifo. 2005. Central memory self tumor-reactive CD8 γ T cells confer superior antitumor immunity compared with effector memory T cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 102:9571–9576.
- Kochenderfer, J.N., W.H. Wilson, J.E. Janik, M.E. Dudley, M. Stetler-stevenson, S.A. Feldman, I. Maric, M. Raffeld, D.N. Nathan, B.J. Lanier, R.A. Morgan, and S.A. Rosenberg. 2010. Eradication of B-lineage cells and regression of lymphoma in a patient treated with autologous T cells genetically engineered to recognize CD19. *Blood.* 116:4099–4103.
- Kryczek, I., S. Wei, L. Zou, S. Altuwajri, W. Szeliga, J. Kolls, A. Chang, and W. Zou. 2007. Cutting edge: Th17 and regulatory T cell dynamics and the regulation by IL-2 in the tumor microenvironment. *J. Immunol.* 178:6730–3.
- Kuang, D.-M., C. Peng, Q. Zhao, Y. Wu, L.-Y. Zhu, J. Wang, X.-Y. Yin, L. Li, and L. Zheng. 2010. Tumor-activated monocytes promote expansion of IL-17-producing CD8+ T cells in hepatocellular carcinoma patients. *J. Immunol.* 185:1544–9.
- Lawrence, M.S., P. Stojanov, P. Polak, G. V Kryukov, K. Cibulskis, A. Sivachenko, S.L. Carter, C. Stewart, C.H. Mermel, S.A. Roberts, A. Kiezun, P.S. Hammerman, A. McKenna, Y. Drier, L. Zou, A.H. Ramos, T.J. Pugh, N. Stransky, E. Helman, J. Kim, D. Auclair, G. Saksena, D. Voet, M. Noble, D. Dicara, P. Lin, L. Lichtenstein, D.I. Heiman, T. Fennell, M. Imielinski, B. Hernandez, E. Hodis, S. Baca, A.M. Dulak, J. Lohr, D. Landau, C.J. Wu, J. Melendez-zajgla, A. Hidalgo-miranda, A. Koren, S.A.

- Mccarroll, J. Mora, C.W.M. Roberts, J.A. Biegel, K. Stegmaier, A.J. Bass, L.A. Garraway, M. Meyerson, T.R. Golub, D.A. Gordenin, S. Sunyaev, E.S. Lander, and G. Getz. 2013. Mutational heterogeneity in cancer and the search for new cancer-associated genes. *Nature*. 499:214–218.
- Masopust, D. 2001. Preferential Localization of Effector Memory Cells in Nonlymphoid Tissue. *Science*. 291:2413–2417.
- Maude, S., N. Frey, P. Shaw, R. Aplenc, D.M. Barrett, N.J. Bunin, A. Chew, V.E. Gonzalez, Z. Zheng, S.F. Lacey, Y.D. Mahnke, J.J. Melenhorst, S.R. Rheingold, A. Shen, D.T. Teachey, B.L. Levine, C.H. June, D.L. Porter, and S.A. Grupp. 2014. Chimeric Antigen Receptor T Cells for Sustained Remissions in Leukemia. *N. Engl. J. Med.* 371:1507–1517.
- Mellman, I., G. Coukos, and G. Dranoff. 2011. Cancer immunotherapy comes of age. *Nature*. 480:480–489.
- Mittrücker, H.-W., A. Visekruna, and M. Huber. 2014. Heterogeneity in the Differentiation and Function of CD8(+) T Cells. *Arch. Immunol. Ther. Exp.* 62:449–458.
- Mueller, S.N., T. Gebhardt, F.R. Carbone, and W.R. Heath. 2013. Memory T Cell Subsets, Migration Patterns, and Tissue Residence. *Annu. Rev. Immunol.* 31:137–161.
- Muranski, P., Z. a Borman, S.P. Kerkar, C. a Klebanoff, Y. Ji, L. Sanchez-Perez, M. Sukumar, R.N. Regeer, Z. Yu, S.J. Kern, R. Roychoudhuri, G. a Ferreyra, W. Shen, S.K. Durum, L. Feigenbaum, D.C. Palmer, P. a Antony, C.-C. Chan, A. Laurence, R.L. Danner, L. Gattinoni, and N.P. Restifo. 2011. Th17 cells are long lived and retain a stem cell-like molecular signature. *Immunity*. 35:972–85.
- Newell, E.W., N. Sigal, S.C. Bendall, G.P. Nolan, and M.M. Davis. 2012. Cytometry by Time-of-Flight Shows Combinatorial Cytokine Expression and Virus-Specific Cell Niches within a Continuum of CD8 + T Cell Phenotypes. *Immunity*. 36:142–152.
- Nuñez, S., J.J. Saez, D. Fernandez, F. Flores-Santibañez, K. Alvarez, G. Tejon, P. Ruiz, P. Maldonado, Y. Hidalgo, V. Manriquez, M.R. Bono, M. Roseblatt, and D. Sauma. 2012. Th17 cells contribute to anti-tumor immunity and promote the recruitment of th1 cells to the tumor. *Immunology*. 139:61–71.
- Pearce, E.L., A. Martins, C.M. Krawczyk, A.S. Hutchins, V.P. Zediak, C. Mao, H. Shen, N. Cereb, S.Y. Yang, and S.L. Reiner. 2003. Control of Effector CD8+ T Cell Function by the Transcription Factor Eomesodermin. *Science*. 302:1041–1043.
- Rosenberg, S.A., and N.P. Restifo. 2015. Adoptive cell transfer as personalized immunotherapy for human cancer. *Science*. 348:62–68.
- Rosenberg, S.A., J.C. Yang, R.M. Sherry, U.S. Kammula, M.S. Hughes, G.Q. Phan, D.E. Citrin, N.P. Restifo, P.F. Robbins, J.R. Wunderlich, K.E. Morton, C.M. Laurencot, S.M. Steinberg, D.E. White, and M.E. Dudley. 2011. Durable Complete Responses in Heavily Pretreated Patients with Metastatic Melanoma Using T-Cell Transfer Immunotherapy. *Clin. Cancer Res.* 17:4550–4557.
- Rutishauser, R.L., G.A. Martins, S. Kalachikov, A. Chandele, I.A. Parish, E. Meffre, J. Jacob, K. Calame, and S.M. Kaech. 2009. Transcriptional Repressor Blimp-1 Promotes CD8 + T Cell Terminal Differentiation and Represses the Acquisition of Central Memory T Cell Properties. *Immunity*. 31:296–308.

- Sallusto, F., A. Lanzavecchia, K. Araki, and R. Ahmed. 2010. Review From Vaccines to Memory and Back. *Immunity*. 33:451–463.
- Sallusto, F., D. Lenig, R. Förster, M. Lipp, and a Lanzavecchia. 1999. Two subsets of memory T lymphocytes with distinct homing potentials and effector functions. *Nature*. 401:708–712.
- Seder, R.A., P.A. Darrah, and M. Roederer. 2008. T-cell quality in memory and protection: implications for vaccine design. *Nat. Rev. Immunol.* 8:247–258.
- Tajima, M., D. Wakita, T. Satoh, H. Kitamura, and T. Nishimura. 2011. IL-17/IFN- γ double producing CD8⁺ T (Tc17/IFN- γ) cells: a novel cytotoxic T-cell subset converted from Tc17 cells by IL-12. *Int. Immunol.* 23:751–9.
- Takada, K., X. Wang, G. Hart, O.A. Odumade, M.A. Weinreich, K.A. Hogquist, and S. Jameson. 2011. KLF2 is required for trafficking but not quiescence in post-activated T cells. *J. Immunol.* 186:775–783.
- Tough, D.F., and J. Sprent. 1994. Turnover of Naive- and Memory-phenotype T Cells. *J. Exp. Med.* 179:1127–1135.
- Tsai, J.-P., M.-H. Lee, S.-C. Hsu, M.-Y. Chen, S.-J. Liu, J.T. Chang, C.-T. Liao, A.-J. Cheng, P. Chong, C.-L. Chu, C.-R. Shen, and H.-W. Chen. 2012. CD4⁺ T Cells Disarm or Delete Cytotoxic T Lymphocytes under IL-17-Polarizing Conditions. *J. Immunol.* 189:1671–9.
- Voehringer, D., C. Blaser, P. Brawand, H. Raulet, T. Hanke, H. Pircher, D. Voehringer, C. Blaser, P. Brawand, D.H. Raulet, and T. Hanke. 2001. Viral Infections Induce Abundant Numbers of Senescent CD8 T Cells. *J. Immunol.* 167:4838–4843.
- Wherry, E.J., V. Teichgräber, T.C. Becker, D. Masopust, S.M. Kaech, R. Antia, U.H. von Andrian, and R. Ahmed. 2003. Lineage relationship and protective immunity of memory CD8 T cell subsets. *Nat. Immunol.* 4:225–34.
- Willinger, T., T. Freeman, H. Hasegawa, T. Willinger, A.J. McMichael, and M.F. C Callan. 2005. T Cell Subsets Central Memory from Effector Memory CD8 Molecular Signatures Distinguish Human Molecular Signatures Distinguish Human Central Memory from Effector Memory CD8 T Cell Subsets 1. *J Immunol.* 175:5895–5903.
- Wirth, T.C., H.H. Xue, D. Rai, J.T. Sabel, T. Bair, J.T. Harty, and V.P. Badovinac. 2010. Repetitive antigen stimulation induces stepwise transcriptome diversification but preserves a core signature of memory CD8⁺ T cell differentiation. *Immunity*. 33:128–140.
- Wu, P., D. Wu, C. Ni, J. Ye, W. Chen, G. Hu, Z. Wang, C. Wang, Z. Zhang, W. Xia, Z. Chen, K. Wang, T. Zhang, J. Xu, Y. Han, T. Zhang, X. Wu, J. Wang, W. Gong, S. Zheng, F. Qiu, J. Yan, and J. Huang. 2014. $\gamma\delta$ T17 Cells Promote the Accumulation and Expansion of Myeloid-Derived Suppressor Cells in Human Colorectal Cancer. *Immunity*. 17:1–16.
- Xin, A., F. Masson, Y. Liao, S. Preston, T. Guan, R. Gloury, M. Olshansky, J. Lin, P. Li, T.P. Speed, G.K. Smyth, M. Ernst, W.J. Leonard, M. Pellegrini, S.M. Kaech, S.L. Nutt, W. Shi, G.T. Belz, and A. Kallies. 2016. A molecular threshold for effector CD8 + T cell differentiation controlled by transcription factors. *Nat. Immunol.* 17:422–32.
- Yen, H.-R.H., T.T.J. Harris, S. Wada, J.F. Grosso, D. Getnet, M. V Goldberg, K.-L. Liang, T.C. Bruno, K.J. Pyle, S.-L. Chan, R. a Anders, C.L. Trimble, A.J. Adler, T.-Y. Lin,

- D.M. Pardoll, C.-T. Huang, and C.G. Drake. 2009. Tc17 CD8 T cells: functional plasticity and subset diversity. *J. Immunol.* 183:7161–8.
- Yu, Y., H.-I. Cho, D. Wang, K. Kaosaard, C. Anasetti, E. Celis, and X.-Z. Yu. 2013. Adoptive Transfer of Tc1 or Tc17 Cells Elicits Antitumor Immunity against Established Melanoma through Distinct Mechanisms. *J. Immunol.* 190:1873–81.
- Yuan, J., S. Gnjatic, H. Li, S. Powel, H.F. Gallardo, E. Ritter, G.Y. Ku, A.A. Jungbluth, N.H. Segal, T.S. Rasalan, G. Manukian, Y. Xu, R. Roman, S.L. Terzulli, M. Heywood, E. Pogoriler, G. Ritter, L.J. Old, J.P. Allison, and J.D. Wolchok. 2008. CTLA-4 blockade enhances polyfunctional NY-ESO-1 specific T cell responses in metastatic melanoma patients with clinical benefit. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 105:20410-15.
- Zhang, Y., F. Hou, X. Liu, D. Ma, Y. Zhang, B. Kong, and B. Cui. 2014. Tc17 cells in patients with uterine cervical cancer. *PLoS One.* 9:e86812.
- Zhao, D., S. Yu, X. Zhou, S. Jodie, W. Held, V.P. Badovinac, and J.T. Harty. 2010. Constitutive Activation of Wnt Signaling Favors Generation of Memory CD8 T Cells. *J. Immunol.* 184:1191–1199.
- Zhou, J., X. Shen, J. Huang, J. Richard, S.A. Rosenberg, P.F. Robbins, J. Zhou, X. Shen, J. Huang, R.J. Hodes, S.A. Rosenberg, and P.F. Robbins. 2005. Telomere Length of Transferred Lymphocytes Correlates with In Vivo Persistence and Tumor Regression in Melanoma Patients Receiving Cell Transfer Therapy. *J. Immunol.* 175:7046–7052.
- Zhou, X., S. Yu, D.-M. Zhao, J.T. Harty, V.P. Badovinac, and H.-H. Xue. 2010. Differentiation and persistence of memory CD8(+) T cells depend on T cell factor 1. *Immunity.* 33:229–40.
- Zhuang, Y., L.-S. Peng, Y.-L. Zhao, Y.Y. Shi, X.-H. Mao, W. Chen, K.C. Pang, X.-F. Liu, T. Liu, J.-Y. Zhang, H. Zeng, K.-Y. Liu, G. Guo, W.-D. Tong, Y.Y. Shi, B. Tang, N. Li, S. Yu, P. Luo, W.-J. Zhang, D.-S. Lu, P.-W. Yu, and Q.-M. Zou. 2012. CD8(+) T Cells That Produce Interleukin-17 Regulate Myeloid-Derived Suppressor Cells and Are Associated With Survival Time of Patients With Gastric Cancer. *Gastroenterology.* 951–62.