

UNIVERSIDAD DE CHILE - FACULTAD DE CIENCIAS - ESCUELA DE PREGRADO



**“CARACTERIZACIÓN DE LA MIGRACIÓN DE LINFOCITOS T  
ACTIVADOS POR CÉLULAS PRESENTADORAS DE  
ANTÍGENOS TUMORALES”**

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

**Ignacio Patricio Avalos Carrasco**

Director del Seminario de Título:

Dr. Flavio Andrés Salazar Onfray

Directora Patrocinante:

Dra. María Rosa Bono Merino

Enero 2015

Santiago - Chile



### INFORME DE APROBACIÓN SEMINARIO DE TÍTULO

Se informa a la Escuela de Pregrado de la Facultad de Ciencias, de la Universidad de Chile que el Seminario de Título, presentado por el **Sr. Ignacio Patricio Avalos Carrasco**

#### “CARACTERIZACIÓN DE LA MIGRACIÓN DE LINFOCITOS T ACTIVADOS POR CÉLULAS PRESENTADORAS DE ANTÍGENOS TUMORALES”

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

Director Seminario de Título:

Una firma manuscrita en tinta azul sobre una línea horizontal.

Comisión Revisora y Evaluadora

Presidente Comisión:

Una firma manuscrita en tinta azul sobre una línea horizontal.

Evaluador:

Una firma manuscrita en tinta azul sobre una línea horizontal.

Santiago de Chile,.....



## II. BIOGRAFÍA



Ignacio Avalos Carrasco nació el 2 de Abril del año 1991.

Estudió desde 1° a 6° año básico en el colegio Liahona, comuna de La Florida.

Continuó sus estudios en el liceo Instituto Nacional José Miguel Carrera desde 7° básico a 4° medio, egresando el año 2008 y dando la Prueba de Selección Universitaria (PSU) ese mismo año.

Ingresó a la Universidad de Chile el año 2009 a la carrera de Ingeniería en Biotecnología Molecular de la Facultad de Ciencias, egresando y obteniendo el grado de licenciado el año 2013.

Desde el año 2013 hasta la actualidad realizó su trabajo de Seminario de Título en el Laboratorio de Inmunología Anti Tumoral a cargo del Dr. Flavio Salazar Onfray. Además, entró el año 2014 al programa de Magíster en Ciencias Biológicas de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Chile.

#### IV. AGRADECIMIENTOS

Gracias a todos los integrantes de los laboratorios de Inmunología Anti Tumoral y Regulación e Inmunología del Cáncer de la Universidad de Chile por hacer tan amena mi estadía y ayudarme en todo lo posible con mi trabajo de título.

Gracias al Dr. Flavio Salazar por creer en mis capacidades y darme todas las herramientas necesarias para mi formación en su laboratorio.

Gracias a mis padres por siempre estar apoyándome, y darme la independencia y confianza necesarias para poder salir adelante frente a cualquier situación.

Gracias a mi polola Anita por estar siempre a mi lado y ser el pilar fundamental que me ha sostenido durante tanto tiempo incluso en las peores situaciones.

Gracias a mis amigos por ayudarme a aliviar el estrés, y estar disponibles para una buena conversación y para reírnos a carcajadas de cualquier cosa que se nos ocurriera.

Y gracias a los integrantes del equipo BioBronce V con los cuales practicamos casi todos los días, pasamos risas, alegrías y rabias, pero siempre seguimos mejorando para lograr nuestros objetivos.

“Hay una fuerza motriz más poderosa que el vapor, la electricidad y la energía atómica: la voluntad.” – Albert Einstein

## V. ÍNDICE DE CONTENIDOS

<b>Biografía</b>	ii
<b>Agradecimientos</b>	iii
<b>Índice de figuras</b>	vi
<b>Lista de abreviaturas</b>	vii
<b>Resumen</b>	
<b>Abstract</b>	
<b>Introducción</b>	1
Cáncer y melanoma	1
Sistema inmune y cáncer	4
Células dendríticas y presentación antigénica	6
Inmunidad celular y cáncer	8
Migración de linfocitos T y melanoma	10
Tratamientos actuales e inmunoterapia contra el melanoma	14
Hipótesis	19
Objetivos	19
Objetivo General	19
Objetivos Específicos	19
<b>Materiales y Métodos</b>	20
Separación de PBMC a partir de muestras de sangre periférica	20
Generación de Células Presentadoras de Antígenos Tumorales (TAPCells)	21
Purificación de linfocitos T desde PBL	22
Co-cultivo de linfocitos T con TAPCells alogénicas	22

Citometría de Flujo	23
Ensayos de migración <i>in vitro</i>	24
Análisis Estadístico	25
<b>Resultados</b>	<b>26</b>
TAPCells poseen fenotipo de células dendríticas maduras	26
TAPCells induce expresión de marcadores de activación en linfocitos T	28
TAPCells induce la expresión de receptores de quimioquinas asociados con migración hacia piel inflamada en linfocitos T	31
TAPCells induce la expresión de la integrina CD11a en linfocitos T	34
TAPCells aumentan la capacidad migratoria de linfocitos T y su respuesta frente a las quimioquinas CXCL10 y CXCL12	36
<b>Discusión</b>	<b>39</b>
<b>Conclusiones</b>	<b>48</b>
<b>Bibliografía</b>	<b>49</b>

## VII. ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> TAPCells poseen un fenotipo maduro.	<b>27</b>
<b>Figura 2.</b> TAPCells induce expresión de marcadores de activación en linfocitos T.	<b>30</b>
<b>Figura 3.</b> TAPCells induce la expresión de receptores de “homing” a tumor en LT.	<b>33</b>
<b>Figura 4.</b> TAPCells induce la expresión de CD11a en linfocitos T CD4 <sup>+</sup> y CD8 <sup>+</sup> .	<b>35</b>
<b>Figura 5.</b> Linfocitos T estimulados con TAPCells migran en mayor cantidad que los LT no activados en respuesta a las quimioquinas CXCL10 y CXCL12.	<b>38</b>

## VIII. LISTA DE ABREVIATURAS

ACK: Amonio-Cloruro-Potasio.

ACT: Transferencia Adoptiva de Células.

ADN: Ácido Desoxirribonucleico.

ARN: Ácido Ribonucleico.

ARNm: ARN mensajero.

BSA: Albúmina Sérica Bovina.

CAFs: Fibroblastos Asociados a Cáncer.

CCR: Receptor de quimioquinas tipo C-C.

CD: Cluster de diferenciación.

CPA: Célula Presentadora de Antígenos.

CTLA-4: Antígeno 4 del linfocito T citotóxico.

CTL: Linfocito T Citotóxico.

CXCR: Receptor de quimioquinas tipo C-X-C.

DAMPs: Patrones Moleculares Asociados a Daño.

DC: Célula Dendrítica.

DMSO: Dimetilsulfóxido.

DTH: Hipersensibilidad de Tipo Retardada.

FDA: Agencia de Administración de Alimentos y Medicamentos.

GM-CSF: Factor de Estimulación de Colonias Monocíticas y Granulocíticas.

HMGB1: Proteína B1 del grupo de alta movilidad.

ICAM-1: Molécula de Adhesión Intercelular 1.

iDC: Célula Dendrítica inmadura.

IMF: Intensidad Media de Fluorescencia.

IL: Interleuquina.

IFN- $\alpha$ : Interferón alfa.

IFN- $\gamma$ : Interferón gamma.

IP-10: Proteína 10 inducible por interferón gamma.

kDa: KiloDalton.

LB: Linfocito B.

LFA-1: Antígeno 1 asociado a la función de linfocitos.

LT: Linfocito T.

LT CD4<sup>+</sup>: Linfocito T Cooperador.

LT CD8<sup>+</sup>: Linfocito T Citotóxico.

LTv: Linfocito T virgen.

MHC-I: Complejo Principal de Histocompatibilidad de clase I.

MHC-II: Complejo Principal de Histocompatibilidad de clase II.

NK: Células Natural Killer.

PAMP: Patrón Molecular Asociado a Patógenos.

PBL: Linfocitos de Sangre Periférica.

PBMC: Células Mononucleares de Sangre Periférica.

PBS: Tampón Fosfato Salino.

PD-L1: Ligando de Muerte Programada 1.

PD-L2: Ligando de Muerte Programada 2.

PGE2: Prostaglandina E2.

PRR: Receptor de Reconocimiento de Patrones.

RGP: Fase de Crecimiento Radial

SDF-1: Factor 1 derivado de células estromales.

SFB: Suero Fetal Bovino.

TAPCells: Células Presentadoras de Antígenos Tumorales.

TARC: Quimioquina regulada por el timo y activación.

TCR: Receptor de Linfocitos T.

Th1: Linfocitos T CD4<sup>+</sup> cooperadores de tipo 1.

Th2: Linfocitos T CD4<sup>+</sup> cooperadores de tipo 2.

Th17: Linfocitos T CD4<sup>+</sup> cooperadores de tipo 17.

TILs: Linfocitos Infiltrantes de Tumor.

TLR: Receptor Tipo Toll.

TNF- $\alpha$ : Factor de Necrosis Tumoral alfa.

VCAM-1: Molécula de Adhesión de Células Vasculares 1.

VEGF: Factor de Crecimiento de Endotelio Vascular.

VGP: Fase de Crecimiento Vertical

VLA-4: Antígeno muy tardío 4.

## RESUMEN

El melanoma es el cáncer de piel con mayor mortalidad y uno de los cánceres que progresivamente ha aumentado su incidencia tanto en Chile como en el mundo. Debido a que las terapias convencionales contra este cáncer son poco efectivas en etapas tardías y generan gran cantidad de efectos secundarios, se investigan nuevas terapias alternativas o complementarias a las actuales. Una de estas estrategias comprende la manipulación del sistema inmune, lo que se denomina inmunoterapia del cáncer.

Las células dendríticas cumplen un rol fundamental en la inducción de la respuesta inmune, por lo que representan una importante herramienta para la generación de la inmunidad antitumoral. Estudios previos de nuestro laboratorio han demostrado que un 60% de los pacientes con melanoma avanzado vacunados con células dendríticas estimuladas con un lisado alogénico de células de melanoma, llamadas TAPCells registraron respuestas celulares con una correlación positiva entre la reacción de hipersensibilidad retardada (DTH) contra antígenos tumorales y la sobrevivencia de los pacientes. Los mecanismos efectores causantes de este resultado aún no han sido descritos completamente, y falta por investigar si las TAPCells inducen el "homing" de LT efectores al sitio tumoral. En este contexto, la hipótesis de este proyecto plantea que las TAPCells son capaces de inducir receptores de quimioquinas y moléculas de adhesión que permitan la migración de linfocitos T al tumor y a tejidos periféricos inflamados, como la piel. Nuestros resultados demuestran que las TAPCells son capaces de activar eficientemente linfocitos T alogénicos e inducir la expresión de los receptores de quimioquinas CCR4 en LT CD8<sup>+</sup>, CXCR4 en LT CD4<sup>+</sup> y CXCR3 en ambas poblaciones de linfocitos en comparación con las células sin estimular. Por otro lado, demostramos que las TAPCells inducen la expresión de la subunidad CD11a de

la integrina LFA-1, implicada en la extravasación de las células inmunes, tanto en linfocitos T CD4<sup>+</sup> como CD8<sup>+</sup>. Finalmente, ensayos de migración *in vitro*, demostraron una mayor movilidad de los LT estimulados con TAPCells en comparación a los controles, principalmente en respuesta a los ligandos de CXCR3 y CXCR4. En resumen, nuestros resultados muestran que las TAPCells son capaces de inducir en linfocitos T receptores de "homing" principalmente hacia piel inflamada y tumor, comprobando su capacidad de modular la migración *in vitro* de estas células. Este trabajo constituye un aporte para comprender mejor el rol de las TAPCells en la estimulación e inducción de la migración de linfocitos T.

## ABSTRACT

Melanoma is a type of skin cancer that causes the majority of deaths in Chile and the world and it is one of the cancers with the highest incidence on a global level. Due to the fact that conventional therapies against melanoma have little effectiveness in late stages and also generate a large number of secondary effects, it is necessary to develop new alternative or complementary therapies. One of these strategies is based on the manipulation of the immune system and it is referred to as cancer immunotherapy.

Dendritic cells have a fundamental role in the induction of the immune response. For this reason, these cells constitute an important tool in the generation and modulation of antitumor immunity. Previous studies from our laboratory have demonstrated that 60% of patients with advanced melanoma that have been vaccinated with dendritic cells stimulated with an allogeneic lysate of melanoma cells named TAPCells, showed cellular responses with a positive correlation between delayed type hypersensitivity reaction (DTH) against tumor antigens and patient survival. The effector mechanisms that cause this response have not been fully investigated and so far, there is no evidence as to whether TAPCells are competent to induce homing of effector T cells to the tumor site. In this project, we investigate if TAPCells induce chemokine receptor expression and adhesion molecules that allow T cells to migrate to the tumor and inflamed peripheral tissues like the skin. Our results demonstrate that TAPCells are capable of activating allogeneic T cells efficiently and induce expression of the chemokine receptors CCR4 on CD8<sup>+</sup> T cells, CXCR4 on CD4<sup>+</sup> T cells and CXCR3 on both lymphocyte populations compared to non-stimulated cells. On the other hand, we also demonstrate that TAPCells induce the expression of CD11a subunit of LFA-1

integrin, implicated in extravasation of the immune cells, on CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T lymphocytes. Finally, *in vitro* migration assays demonstrated a higher mobility of TAPCells-stimulated T cells compared with controls, mainly in response to CXCR3 and CXCR4 ligands. In summary, our results show that TAPCells are fully competent to induce homing receptor expression on T cells associated to migration to inflamed skin and tumor, proving their capacity to modulate *in vitro* migration of these cells. This work contributes to a better understanding of the role of TAPCells in stimulation and induction of T cell migration.

## INTRODUCCIÓN

### **Cáncer y melanoma.**

Tanto en Chile como en el mundo, el cáncer aparece como la segunda causa de muerte, sólo superado por las enfermedades cardiovasculares, con más de 7 millones de defunciones a nivel mundial para el año 2008. A nivel nacional, la tasa de mortalidad por cáncer era de 133 muertes por cada cien mil habitantes para el año 2009, con niveles de incidencia similares a los de países desarrollados (Garmendia y col., 2013). El cáncer se define como un conjunto de enfermedades producidas por la proliferación descontrolada de células anormales con la capacidad de invadir y destruir otros tejidos. Las células cancerosas adquieren características que las hacen muy diferentes de una célula normal: poseen fallas en la regulación de la división celular, en los mecanismos de chequeo de errores en la reproducción, además de pérdida de especialización y de las uniones que les permiten conformar un tejido. En humanos, se describe a la carcinogénesis como un proceso de varias etapas, que reflejan el efecto de alteraciones genéticas las cuales conducen a la transformación progresiva de células normales a células cancerosas altamente malignas (Hanahan & Weinberg, 2011). El cáncer comienza formando un tumor, el cual es capaz de producir daños a los tejidos adyacentes e invadir tejidos normales a través del torrente sanguíneo o linfático, proceso denominado metástasis (Abrams y col., 1950). La formación de una metástasis se desarrolla en varias etapas: (a) invasión local, donde las células malignas residentes de un tumor primario (origen del tumor) penetran el estroma a través de la matriz extracelular para comenzar a diseminarse; (b) angiogénesis o generación de nuevos vasos sanguíneos en el tumor, lo que aumenta su irrigación y capacidad de crecimiento; (c) intravasación, que consiste en la entrada de células tumorales al lumen de los vasos linfáticos o hacia la circulación sanguínea; (d)

supervivencia de células cancerígenas en la circulación sanguínea, lograda por un bajo porcentaje de las células (menos del 0,01% de las células tumorales circulantes generan nuevas colonias metastásicas) debido al estrés provocado por su separación de la matriz original, a los daños provocados por fuerzas hemodinámicas y por la acción de células del sistema inmune innato, como las células Natural Killer (NK); (e) alojamiento en órganos blanco, donde las células tumorales circulantes se adhieren a los vasos sanguíneos de un órgano determinado; (f) extravasación, consistente en la salida de las células tumorales desde la circulación hacia los tejidos blanco; y (g) colonización y formación de metástasis, en la cual las células cancerígenas logran sobrevivir al encuentro con el ambiente del tejido blanco y son capaces de proliferar en colonias y generar una metástasis, proceso que requiere la irrigación de nuevos vasos sanguíneos, donde el proceso de angiogénesis es fundamental (Morgan-Parkes, 1995; Valastyan & Weinberg, 2011).

De entre los distintos tipos de cáncer, el cáncer de piel es el más frecuente entre la población de piel blanca, con una creciente incidencia a nivel mundial, siendo el principal factor de riesgo para esta enfermedad los rayos ultravioletas provenientes del sol, los cuales se han vuelto más dañinos con el tiempo debido en parte, a la destrucción de la capa de ozono (Diepgen & Mahler, 2002). Existen principalmente tres sub-tipos de cáncer de piel: el carcinoma basocelular, el carcinoma de células escamosas y el melanoma maligno. Los dos primeros, son los tipos de cáncer de piel que aparecen en mayor frecuencia en la población, sin embargo, tienen una muy baja mortalidad. En cambio el melanoma, aunque es el menos frecuente, es el que más ha aumentado su incidencia a nivel mundial a través de los años (entre un 3-7% para las razas caucásicas) (Erdei & Torres, 2010), es el más agresivo debido a su alta capacidad de metástasis, y posee la mayor tasa de mortalidad (responsable del 90%

de las muertes por cáncer de piel) (Garbe y col., 2012). En Chile, entre 1983 y 2008 se registraron 2917 muertes por melanoma, equivalentes al 55,17% de todas las defunciones por cáncer de piel del periodo; de ellas, el 52,11% correspondió a hombres (Alonso, 2011). El melanoma se desarrolla a partir de células pigmentadas llamadas melanocitos, cuya función es la protección de la piel contra los rayos solares. El desarrollo de este tipo de tumor consta de varias etapas: la lesión más temprana es la formación de un nevus común (proliferación de células de la piel), el cual puede dar paso a un nevus displásico (de forma irregular), precursor del melanoma cutáneo. Posteriormente, el nevus pasa a una fase de crecimiento radial (RGP), primera etapa maligna reconocible, donde las células tumorales se encuentran confinadas en la epidermis o invadiendo de forma local, sin mostrar una mayor capacidad de crecimiento o metástasis. La siguiente etapa es la fase de crecimiento vertical (VGP), donde las células de melanoma infiltran la dermis y el tejido subcutáneo. Finalmente, la metástasis representa la etapa más avanzada de la progresión tumoral del melanoma (Hsu y col., 2002). El melanoma posee buen pronóstico en etapas tempranas, con mejorías de alrededor de un 85% de los pacientes mediante extirpación quirúrgica del tumor. Sin embargo, esto contrasta fuertemente con su alta mortalidad en etapas tardías, debido a que existen pocas opciones de tratamiento efectivo. Por esta razón, la detección temprana de esta enfermedad es crucial para la supervivencia de los pacientes (Friedman y col., 1985). En este sentido, el conocido acrónimo "ABCDE", el cual se refiere a las características anormales de los nevus melanocíticos: **A**simetría, **B**ordes irregulares, **C**oloración oscura o irregular, **D**íámetro mayor a 6 mm, y **E**volución en el tiempo (Abbasi y col., 2004), es una herramienta simple y útil para un diagnóstico rápido y acertado de este tipo de cáncer.

### **Sistema inmune y cáncer.**

El sistema inmune está constituido por una compleja red de órganos, tejidos y células que interactúan entre sí y con el resto del cuerpo, con la función de proteger al organismo frente a diversas amenazas que podrían dar origen a enfermedades u otros tipos de daño, como infecciones por bacterias, virus u hongos, o el desarrollo de tumores. Las células del sistema inmune son capaces de reconocer a los agentes externos potencialmente dañinos, y detectar posibles anormalidades en las células propias del organismo, como ocurre en el caso de las neoplasias.

La respuesta inmune se puede dividir en innata y adaptable según la especialización de cada una. La inmunidad innata corresponde a células y moléculas que actúan de manera rápida contra agentes extraños y representan la primera línea de defensa del organismo. Las células que forman parte de este tipo de respuestas, como macrófagos, "natural killer", granulocitos y células dendríticas entre otros, poseen receptores codificados en la línea germinal que reconocen estructuras conocidas como patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs). La inmunidad adaptativa en cambio, está formada principalmente por linfocitos T (LT) y linfocitos B (LB), los cuales poseen receptores que son generados por recombinación somática de varios genes. Este mecanismo genera un enorme repertorio de receptores con distintas especificidades para el reconocimiento de antígenos (moléculas capaces de generar una respuesta inmune) (Medzhitov & Janeway, 1997; Janeway & Medzhitov, 2002). Una de las características más importantes de la respuesta inmune adaptativa, ausente en la respuesta innata, es la generación de "memoria inmunológica". Luego de un primer encuentro con un agente extraño, parte de los linfocitos se transforman a células efectoras y otras a células de memoria, las cuales se mantienen en circulación en un estado inactivo y son capaces de reconocer y reaccionar rápidamente ante un

nuevo contacto con el mismo agente extraño. (Ahmed & Gray, 1996; Zinkernagel y col., 1996).

Además de proteger contra patógenos o agentes externos potencialmente dañinos para el organismo, el sistema inmune se mantiene en un estado de vigilancia para la destrucción de células tumorales. En la década del 50, fue formulada la hipótesis de la "inmunovigilancia", la cual describe que el sistema inmune de un organismo es capaz de reconocer antígenos presentes en células tumorales nacientes y eliminarlas antes de que el tumor se vuelva clínicamente evidente, por lo que el cáncer progresivo representaba un evento raro en donde las células tumorales escapaban del control del sistema inmune (Ochsenbein, 2002). A pesar de ser rechazada en su momento por la falta de evidencia, el conocimiento actual confirma la existencia de la inmunovigilancia y la incluye dentro de un proceso más general denominado "inmunoedición" del cáncer, encargado tanto de prevenir la formación de tumores como de seleccionar aquellos de baja inmunogenicidad y de esta manera promover el crecimiento tumoral (Dunn y col., 2002). El proceso de inmunoedición comprende principalmente tres grandes etapas, las cuales se han denominado "las 3 Es": Eliminación, Equilibrio y Escape. La etapa de eliminación representa el concepto original de inmunovigilancia, o sea, la erradicación del tumor en desarrollo; si esta fase es completada con éxito, la inmunoedición no continúa hacia las siguientes etapas. En la fase de equilibrio, el sistema inmune del organismo y cualquier célula tumoral capaz de superar la fase anterior, entran en un equilibrio dinámico, donde las células del sistema inmune ejercen una potente presión selectiva sobre las células tumorales capaz de contener, pero no eliminar completamente el tumor. Como resultado de esta fase, surge una nueva población de células cancerígenas con inmunogenicidad reducida. Finalmente, en la etapa de escape, las nuevas variantes de células tumorales

seleccionadas crecen en un ambiente inmunológicamente intacto, llegando a tumores clínicamente detectables. Para ello, las células cancerígenas emplean múltiples estrategias de evasión inmune para evitar la acción de las células tanto del sistema inmune innato como adaptativo (Dunn y col., 2004).

### **Células dendríticas y presentación antigénica.**

Una respuesta inmune antitumoral efectiva depende de la activación del sistema inmune adaptativo. Los linfocitos T por sí solos no reconocen antígenos solubles y necesitan que otras células les "presenten" los antígenos tumorales. Las células que realizan este trabajo son las llamadas células presentadoras de antígenos (CPA). Dentro de éstas, las células dendríticas (DCs) son las únicas capaces de activar LT vírgenes (LTv), es decir, linfocitos que no han tenido contacto con el antígeno para el cual expresan receptores específicos (TCR). Las DCs son centinelas del sistema inmune y se localizan en los tejidos periféricos que están en contacto con el medio externo, tales como piel, pulmones e intestino, entre otros. En estos sitios, las DCs se encuentran en un estado inmaduro y su función principal es capturar antígenos mediante distintos procesos tales como macropinocitosis, endocitosis mediada por receptores de lectina tipo C o receptores Fc, y la fagocitosis de virus, bacterias, células apoptóticas y necróticas (Banchereau & Steinman, 1998; Banchereau y col., 2000). Señales de inflamación o infección inducen la maduración de las DCs. Estos estímulos son detectados por receptores que reconocen patrones moleculares conservados asociados a patógenos (PAMPs), denominados receptores de reconocimiento de patrones (PRR). Entre los PRR, los receptores tipo Toll (TLR) son los más estudiados en células de mamíferos y tienen un rol clave en el reconocimiento de agentes microbianos (Akira y col., 2001; Takeuchi & Akira, 2010). En ausencia de infección,

ciertos factores celulares endógenos inducidos por estrés, radiación, lesiones relacionadas con isquemia y calor excesivo, también pueden gatillar respuestas inflamatorias mediadas por DCs. Estos factores se han denominado "señales de peligro" o DAMPs (de "Damage-Associated Molecular Patterns": patrones moleculares asociados a daño) y su reconocimiento es mediado por PRRs. Estas señales de peligro incluyen calreticulina (CRT), proteínas de shock térmico, el grupo de alta movilidad 1 (HMGB1),  $\beta$ -defensina, ácidos nucleicos, y ácido úrico; todos reconocidos por TLRs, integrinas o receptores tipo "scavenger" (Blanco y col., 2008). La señalización a través de los TLRs activa y madura fuertemente a las DCs (Kadowaki y col., 2001). Este proceso, incluye la redistribución hacia la superficie de las moléculas de histocompatibilidad (MHC) cargadas con antígenos, un aumento en la expresión de las moléculas de co-estimulación CD80/86 y del receptor CCR7, con la consecuente migración hacia las áreas T de los órganos linfoides donde presentan los antígenos procesados a los LT provocando la proliferación y diferenciación de éstos y la iniciación de la respuesta inmune adaptable (Thomas & Lipsky, 1996; Banchereau & Steinman, 1998). Para la activación óptima de los LT se requieren tres señales: el reconocimiento del complejo MHC-péptido por el TCR, la interacción de las moléculas co-estimuladoras expresadas en las DCs (CD40, CD80, CD86) con sus ligandos y receptores presentes en los LT, y finalmente la secreción y reconocimiento de citoquinas, las cuales participan en la polarización y proliferación de los LT (Palucka & Banchereau, 1999).

En humanos se han descrito principalmente dos tipos de DCs: las plasmocitoides, cuyo marcador principal en humanos es CD123, se originan a partir de progenitores linfoides, y cuando se activan por el reconocimiento de secuencias de ADN o ARN producen altas cantidades de interferón de tipo I (principalmente, IFN- $\alpha$  y

$\beta$ ) (Blanco y col., 2008); y las mieloides, cuyo marcador característico es CD11c y se originan a partir de progenitores mieloides (Thomas & Lipsky, 1996), siendo éstas últimas las que se presentan en mayor proporción en sangre y cuyo rol ha sido ampliamente estudiado en la inmunología del cáncer.

### **Inmunidad celular y cáncer.**

Los linfocitos T pueden dividirse en dos grandes grupos dependiendo del co-receptor que expresan junto al TCR: linfocitos T CD4<sup>+</sup> y linfocitos T CD8<sup>+</sup>. Los LT CD4<sup>+</sup> reconocen antígenos específicos presentados en el contexto de una molécula MHC de clase II y su función principal es modular la respuesta inmune mediante la secreción de citoquinas, participando en procesos como la activación y proliferación de los LT CD8<sup>+</sup>, la diferenciación de los linfocitos B, la activación de células del sistema inmune innato como los macrófagos, y la supresión de la respuesta inmune (Luckheeram y col., 2012). A la fecha, se han descrito cuatro principales tipos de LT CD4<sup>+</sup>: helper 1 o Th1, helper 2 o Th2, helper 17 o Th17 y los LT reguladores. Los Th1 se caracterizan por la expresión del factor de transcripción T-bet, por la secreción de IFN- $\gamma$ , y se ha descrito que participan en la respuesta inmune contra patógenos intracelulares, en procesos de autoinmunidad órgano-específicos y en la respuesta antitumoral. En cambio los linfocitos Th2 expresan el factor de transcripción maestro GATA-3, secretan principalmente IL-4, y están involucrados en la respuesta inmune contra parásitos extracelulares y en desórdenes de hipersensibilidad como las alergias. Por otro lado, los Th17 expresan el factor de transcripción ROR $\gamma$ t, secretan IL-17 cuando se activan y su función principal es participar en la respuesta inmune contra bacterias y hongos extracelulares (Zhu & Paul, 2008; Luckheeram y col., 2012). Finalmente, los LT reguladores se caracterizan por la expresión del factor de transcripción FOXP3 y están

encargados del mantenimiento de la tolerancia inmunológica, mediante la supresión activa de linfocitos auto-reactivos que reconocen antígenos propios con alta afinidad (Hori y col., 2003).

Por otro lado, los LT CD8<sup>+</sup> efectores, también llamados LT citotóxicos (CTLs), reconocen antígenos específicos presentados en un contexto de MHC de clase I, y su función principal es la eliminación de células extrañas mediante la secreción de citotoxinas tales como granzimas y perforinas, y a través de la acción de la molécula FasL. Como las moléculas MHC-I contienen péptidos derivados principalmente del medio intracelular, este es un mecanismo efectivo para destruir células infectadas con virus u otros patógenos intracelulares y células tumorales. Entre sus funciones está también la producción de citoquinas como IFN- $\gamma$  y TNF- $\alpha$ , patrón similar al de los LT CD4<sup>+</sup> Th1 (Mosmann y col., 1997).

Cuando se desarrolla un tumor, las DCs capturan y procesan antígenos derivados de las células tumorales, en presencia de estímulos inmunogénicos, y migran hacia el órgano linfóide secundario más cercano llamado "linfonodo drenante de tumor", donde activan LTV tanto CD4<sup>+</sup> como CD8<sup>+</sup>. Estos LT salen del linfonodo, y viajan a través del torrente sanguíneo hasta llegar al lugar de residencia del tumor, donde son capaces de ejercer su acción con el fin de eliminar las células cancerígenas (Mellman y col., 2011). Inicialmente, la investigación de la respuesta inmune antitumoral estuvo centrada en los CTLs debido a que son capaces de reconocer los complejos MHC-I-péptido expresados por las células tumorales y provocar su lisis directa. Además, poseen la habilidad para eliminar grandes masas tumorales *in vivo* (Toes y col., 1999). Sin embargo, con el paso del tiempo, numerosos estudios han demostrado un rol clave de los LT CD4<sup>+</sup> en la respuesta antitumoral. Su participación en este proceso estaría dada por la secreción de citoquinas como IFN- $\gamma$ , IL-2 e IL-12,

participando en la activación de las DCs, y mediante el reclutamiento y activación de células del sistema inmune innato tales como macrófagos y eosinófilos (Hung y col., 1998; Toes y col., 1999). En la actualidad, sabemos que los linfocitos T son las principales células involucradas en la respuesta inmune antitumoral y muchos estudios a lo largo del tiempo han demostrado que pacientes con cáncer que presentan una mayor proporción de linfocitos infiltrantes de tumor (TILs), poseen una mejor supervivencia (Yu & Fu, 2006).

Para defenderse de la respuesta inmune antitumoral, las células cancerosas han desarrollado una serie de mecanismos capaces de evadir este ataque. Dentro de éstos encontramos la sobreexpresión de moléculas inmunoregulatoras como PD-L1/L2 en las células tumorales, la secreción de prostaglandina E2 (PGE2), arginasa (moléculas supresoras de LT) y VEGF (inhibe la infiltración de los LT al sitio tumoral), disminución de la expresión de moléculas MHC-I, lo que disminuye la presentación antigénica y el reconocimiento de las células tumorales por LT CD8<sup>+</sup>, y el reclutamiento de células inmunosupresoras, como LT reguladores y células mieloides supresoras, entre otros (Grivennikov y col., 2010; Mellman y col., 2011).

### **Migración de linfocitos T y melanoma**

Los linfocitos T efectores necesitan migrar y llegar a los tejidos dañados donde son necesitados. Para ello, expresan diversos repertorios de "moléculas de tráfico" y receptores que permiten su migración y acumulación en un tejido u órgano blanco determinado (Mora & von Andrian, 2006). Los linfocitos T vírgenes se mantienen en circulación migrando de un linfonodo a otro. Una vez activados por las DCs, adquieren la capacidad para migrar hacia la fuente de los antígenos presentados por las células dendríticas (Mora y col., 2003).

El fenómeno de tráfico celular tejido-específico o “homing” es regulado por diversas moléculas quimioattractantes llamadas quimioquinas, las cuales son secretadas por las células de los distintos tejidos del organismo. Las quimioquinas pertenecen a la familia más grande de citoquinas, con al menos 50 moléculas distintas identificadas hasta el momento (Bromley y col., 2008). Estas proteínas son homólogas entre sí y poseen pesos moleculares entre 8 y 10 kDa. Las quimioquinas regulan la motilidad y la adhesión celular mediante su unión a receptores presentes en la superficie de las células, denominados receptores de quimioquinas. Los receptores de quimioquinas pertenecen a una rama de la subfamilia y de los receptores de siete segmentos de transmembrana tipo rodopsina, y están diferencialmente expresados en todas las células del sistema inmune (Griffith y col., 2014). Estos receptores pueden ser divididos en dos grupos: los acoplados a proteína G, los cuales modulan las cascadas de señalización para afectar la movilidad celular a través de la regulación de procesos dependiente de actina y así modificar la maquinaria celular para generar el movimiento de la célula; y los receptores de quimioquinas atípicos, sin capacidad de señalización, que están encargados de mantener altas concentraciones de quimioquinas en lugares específicos, y disminuir los procesos inflamatorios, eliminando las quimioquinas de la circulación (Luster, 1998; Griffith y col., 2014).

Las quimioquinas ejercen su acción mediante gradientes de concentración las cuales son reconocidas por los linfocitos T u otras células, direccionándolas hacia la fuente secretora de estas moléculas (Bromley y col., 2008), además de proveer las señales necesarias para aumentar la afinidad de la interacción mediada por integrinas en el paso de las células por los vasos sanguíneos. Se ha descrito, que existe un incremento en la producción de quimioquinas durante la inflamación, lo que conlleva al

reclutamiento selectivo de células del sistema inmune al tejido inflamado (Luster, 1998).

Muchas publicaciones han demostrado la importancia de los receptores de quimioquinas en la migración de diversos tipos celulares hacia los tejidos del cuerpo, ya sea para mantener la homeostasis normal de los mismos o para responder a situaciones de peligro para el organismo. Por ejemplo, CCR7 es un receptor de quimioquinas capaz de unir los ligandos CCL19 y CCL21, y dirige la migración de DCs maduras y de distintos tipos de linfocitos vírgenes hacia tejidos linfoides secundarios (Charo & Ransohoff, 2006; Förster y col., 2008); CCR9 es un receptor que se une a la quimioquina CCL25 (TECK), la cual se secreta en el intestino, siendo importante en el "homing" celular hacia ese tejido (Mora y col., 2003); CCR10 se une a los ligandos CCL27 y CCL28 y se expresa principalmente en melanocitos y linfocitos que hacen "homing" a piel, y está involucrado en la migración hacia este tejido en condiciones de homeostasis, o sea, en estados no inflamatorios (Marelli-Berg y col., 2008).

En el caso particular del melanoma, existe un grupo de receptores de quimioquinas que son importantes para direccionar a los linfocitos T y otras células del sistema inmune hacia el tumor. El receptor CCR4, cuyo ligando principal es la quimioquina CCL17 (TARC), participa en la circulación de linfocitos T hacia piel en estado de homeostasis, y es inducida en este tejido, cuando existen procesos inflamatorios (Marelli-Berg y col., 2008). El receptor CXCR3, cuyo ligando de mayor afinidad es la quimioquina CXCL10 (IP-10), se ha descrito como el receptor más relevante en la migración de linfocitos T hacia sitios de inflamación (Griffith y col., 2014), otorgándole un papel fundamental en la respuesta antitumoral (Luster & Leder, 1993). Un estudio previo demostró que la co-expresión de los receptores CCR4 y CXCR3 en linfocitos T CD8<sup>+</sup> de pacientes con melanoma se correlaciona con una



mayor sobrevida sobre todo en estadios avanzados de la enfermedad, siendo CXCR3 el receptor clave en este fenómeno (Mullins y col., 2004).

Existen diversos tipos celulares, además de los pertenecientes al sistema inmune, capaces de secretar quimioquinas. En el caso de un tumor, éste se compone de células neoplásicas y células del compartimiento estromal entre las que se encuentran fibroblastos, miofibroblastos, células endoteliales y una variedad de células asociadas con el sistema inmune. Una fracción de las células estromales presentes en el tumor corresponde a fibroblastos asociados a cáncer (CAFs), los cuales poseen una alta secreción de la quimioquina CXCL12 (SDF-1) en condiciones estacionarias. Se ha documentado que esta quimioquina, ligando del receptor CXCR4, participa en los procesos de angiogénesis y metástasis tumoral (Orimo & Weinberg, 2006). Además, resultados previos de nuestro laboratorio han demostrado, mediante el uso de microarreglos de ADN, un aumento en la expresión del receptor CXCR4 en linfocitos de pacientes con melanoma avanzado respondedores a una inmunoterapia con DCs generada en nuestro laboratorio, al compararlos con pacientes no respondedores (los que no generan respuesta inmunológica).

Otro proceso clave en la migración de las células del sistema inmune hacia los lugares de inflamación es la entrada a los tejidos desde los vasos sanguíneos, proceso llamado "extravasación". Este proceso comienza con la interacción entre quimioquinas provenientes de las células endoteliales que componen la parte interna de los vasos sanguíneos, y los respectivos receptores presentes en la superficie de las células del sistema inmune. Esta interacción genera la activación de las integrinas (moléculas de adhesión) de los leucocitos, provocando cambios conformacionales y aumentando su afinidad por los ligandos en la membrana de las células endoteliales, permitiendo su adherencia y posteriormente su salida hacia los tejidos (Luster, 1998). Entre las

moléculas de adhesión más relevantes en el proceso de extravasación en linfocitos T se encuentran: la integrina LFA-1 (de "Lymphocyte Function-associated Antigen 1"), compuesta por dos subunidades llamadas CD11a y CD18, ligando de la molécula ICAM-1 (de "InterCellular Adhesion Molecule 1") expresada en la superficie de las células endoteliales (Bierer & Burakoff, 1988; Sallusto & Baggiolini, 2008); el ligando de P-selectina (CD162), cuyo receptor se expresa principalmente en endotelio y piel inflamada (Hamann & Syrbe, 2000); y la integrina  $\alpha 4\beta 1$ , también llamada VLA-4 (de "Very Late Antigen-4"), compuesta de las subunidades CD49d ( $\alpha 4$ ) y CD29 ( $\beta 1$ ), cuyo receptor en la superficie de las células endoteliales es la proteína VCAM-1 (de "Vascular cell adhesion molecule-1"), molécula que se expresa luego de la estimulación de las células endoteliales por citoquinas como TNF- $\alpha$  e IL-1 (Hamann & Syrbe, 2000; Sallusto & Baggiolini, 2008).

#### **Tratamientos actuales e inmunoterapia contra el melanoma.**

Los tratamientos convencionales para combatir el melanoma incluyen la cirugía (especialmente efectiva en etapas tempranas), la radioterapia y la quimioterapia. Estas terapias han mostrado efectos limitados y un alto porcentaje de los pacientes desarrolla efectos secundarios, tales como fatiga, pérdida de cabello, anemia, infertilidad, e inmunodeficiencia, entre otras (Garbe y col., 2012). Estos tratamientos contra el melanoma no son efectivos en la eliminación del tumor en los estadios más tardíos del cáncer. En el caso de la quimioterapia, su efectividad es reducida debido a que las células de melanoma presentan una elevada resistencia a la apoptosis celular, proceso inducido por la mayoría de las drogas quimioterapéuticas (Gray-Schopfer y col., 2007). Para el año 2011, la decarbazina era la única droga quimioterapéutica aprobada por la FDA para el tratamiento del melanoma (Chapman y col., 2011), haciendo necesario el

desarrollo de nuevos tratamientos. Recientemente, se han generado drogas dirigidas hacia blancos específicos en las células cancerosas. Estos blancos terapéuticos corresponden principalmente a proteínas de vías de señalización sobreactivadas o productos oncogénicos derivados de éstas, lo que hace a éstas células más sensibles a su inhibición (Gray-Schopfer y col., 2007). Un ejemplo de esto es la droga vemurafenib, potente inhibidor del gen BRAF mutante (gen mutado en el 40-60% de los pacientes con melanomas cutáneos), el cual produce una marcada acción antitumoral contra células de melanoma. Sin embargo, no todos los pacientes con melanoma poseen el gen BRAF mutado y un alto porcentaje de los pacientes tratados con esta droga desarrollan resistencia a la terapia (Chapman y col., 2011; Sosman y col., 2012).

Uno de los tratamientos alternativos de mayor interés e investigación en los últimos años es la llamada inmunoterapia antitumoral. La inmunoterapia se refiere a la estimulación del propio sistema inmune del paciente para el rechazo y destrucción del tumor. En 1893, William Coley demostró que la inoculación de extractos bacterianos a pacientes con cáncer, podía reducir masas tumorales (Cann y col., 2003), sentando las bases de la inmunoterapia. Ya en 1943, se demostró que la inmunización con tumores podía prevenir el crecimiento de tumores singénicos en ratones (Gross, 1943). Entre las décadas de los 80 y 90, se demostró que LT humanos tienen la capacidad de lisis específicamente tumores autólogos *in vitro* (Topalian y col., 1989), y que la estimulación de LT con células tumorales autólogas induce su proliferación y la secreción de citoquinas (Barth y col., 1991).

Hoy en día, existen tres aproximaciones para potenciar la respuesta inmune antitumoral mediante el desarrollo de inmunoterapias: (1) la estimulación no específica de la respuesta inmune antitumoral, mediante el uso de citoquinas o por la eliminación de señales inhibitorias para los linfocitos T, (2) la transferencia adoptiva de células

(ACT), los cuales se seleccionan y se expanden *ex vivo* y posteriormente se transfieren de nuevo al paciente, y (3) la inmunización activa (vacunas) para mejorar las respuestas endógenas antitumorales *in vivo*. Dentro de las primeras, el uso de Ipilimumab, un anticuerpo monoclonal humano que bloquea el receptor inhibitorio CTLA-4 ha mostrado ser efectivo en combinación con otros agentes, como citoquinas o vacunas, en el tratamiento de pacientes con cáncer metastásico (Hodi y col., 2010; Van den Eertwegh y col., 2012). A pesar de los resultados alentadores, se han documentado una serie de efectos adversos provocados por el uso de este anticuerpo, entre los que se encuentran fatiga, diarrea, colitis, toxicidad derivada de eventos autoinmunes, entre otros (Banaszynski & Kolesar, 2013). La transferencia adoptiva de linfocitos T es una forma de terapia de transfusión que consiste en la inyección de distintos subtipos de linfocitos T en los pacientes con el fin de eliminar un tumor y prevenir su recurrencia (June, 2007). En 1966, Southam y colaboradores demostraron que pacientes con cáncer avanzado a los cuales se les realizó una transferencia de leucocitos autólogos, presentaban una inhibición del crecimiento de los tumores subcutáneos (Southam y col., 1966). Este hallazgo sugirió que en el paciente existían leucocitos con un efecto inhibitorio específico hacia el crecimiento tumoral. Entre todos los distintos tipos de leucocitos, los LT CD8<sup>+</sup> son los que atraen mayor atención para su uso en esta terapia debido a su capacidad para destruir directamente las células tumorales. Además, poseen otras características como la facilidad de su manipulación genética y sus largos tiempos de vida. El éxito de este tipo de terapias depende principalmente de la óptima selección o modificación genética de LT específicos contra antígenos de tumor, y de inducir su correcta proliferación manteniendo sus funciones efectoras y capacidad de migración (June, 2007). A pesar de que la transferencia adoptiva de LT ha mostrado regresión de algunos tumores, falla en generar una

respuesta antitumoral en un alto porcentaje de los pacientes, lo cual podría deberse a factores como la migración de las células inyectadas o a la pobre expresión antigénica de los tumores (Rosenberg y col., 2008). Uno de los nuevos enfoques terapéuticos para tratar el cáncer es el desarrollo de vacunas de DCs que sean capaces de generar una respuesta inmune anti-tumoral específica con memoria inmunológica (Gilboa, 2007; Palucka & Banchereau, 2012). El protocolo más utilizado en los ensayos clínicos de pacientes con diferentes tipos de cáncer es el cultivo de monocitos de sangre periférica diferenciados a células dendríticas con GM-CSF e IL-4, las cuales se maduran *ex vivo* y se reinyectan en los pacientes (Palucka & Banchereau, 2012). A pesar de los resultados alentadores de algunos de estos ensayos clínicos, la mayoría de ellos han fallado en la correcta evaluación de la respuesta antitumoral y en la identificación de biomarcadores para la predicción de la respuesta clínica de los pacientes (Palucka & Banchereau, 2012).

En el Laboratorio de Inmunología Antitumoral de la Universidad de Chile, se han realizado estudios clínicos de fase I y II, basados en un nuevo tratamiento, el cual consiste en el uso de DCs autólogas cargadas con lisados tumorales alogénicos en pacientes con melanoma avanzado. Estos estudios demostraron que el 60% de los pacientes con melanoma maligno tratados con estas DCs desarrollaron respuestas inmunológicas, con una correlación positiva entre la reacción de hipersensibilidad retardada (DTH) contra antígenos tumorales y la sobrevida de los pacientes. Las DCs utilizadas, denominadas TAPCells (del inglés "Tumor Antigen Presenting Cells"), son células presentadoras de antígenos autólogas, generadas a partir de monocitos de sangre periférica y diferenciadas con las citoquinas GM-CSF e IL-4 (Salazar-Onfray y col., 2013). Estas células poseen la capacidad para activar LT melanoma-específicos y de esta manera activar una respuesta inmune antitumoral. Un componente esencial de

este tratamiento es la utilización de un lisado celular alogénico, obtenido de tres líneas celulares de melanoma: Mel 1, Mel 2 y Mel 3. Este lisado, denominado TRIMEL, contiene la mayoría de los antígenos asociados a melanoma descritos e induce una rápida maduración de las células dendríticas *in vitro*. Sin embargo, los antígenos por sí solos no son suficientes para inducir una óptima maduración de las DCs. Por esto, las células que constituyen este lisado son previamente sometidas a un condicionamiento con shock térmico. Datos obtenidos de nuestro laboratorio indican que este proceso gatilla la translocación de calreticulina y la liberación de HMGB1, las cuales actúan como señales de peligro o DAMPs, induciendo la presentación de antígenos y la óptima maduración de las DCs (Aguilera y col., 2011).

Los mecanismos de acción de las TAPCells no están del todo descritos, sin embargo, se han investigado algunos de los procesos que podrían explicar, en parte, su efectividad. Se demostró que pacientes respondedores a la terapia, es decir DTH<sup>+</sup>, poseen LT CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> de memoria (CD45RO<sup>+</sup>) capaces de secretar citoquinas pro-inflamatorias luego de su estimulación *in vitro* (Aguilera y col., 2011). Así mismo, se observó que pacientes vacunados con TAPCells poseen tres veces más LT Th1 productores de IFN- $\gamma$  y dos veces más de LT Th17 productores de IL-17 respecto a los no respondedores (Durán y col., 2013). A pesar de esto, varios aspectos sobre la acción de las TAPCells faltan por ser resueltos. Uno de estos aspectos, es cómo estas DCs activan y direccionan a los LT para que ejerzan su acción sobre las células de melanoma. La caracterización del "homing" de los linfocitos T activados por TAPCells podría ayudar a entender de mejor manera los mecanismos de acción terapéuticos de estas células dendríticas, con el fin de diseñar mejores terapias contra el melanoma y otros tipos de cáncer.

### **Hipótesis**

TAPCells inducen receptores de quimioquinas y moléculas de adhesión que permiten la migración de linfocitos T al tumor y tejidos periféricos inflamados como la piel.

### **Objetivos**

#### **Objetivo General**

Analizar la capacidad de las TAPCells de inducir en linfocitos T el potencial de migrar a epitelios periféricos y al tumor con el fin de entender sus mecanismos de acción terapéuticos.

#### **Objetivos Específicos**

1. Estudiar la capacidad de las TAPCells de activar linfocitos T.
2. Evaluar la expresión de los receptores de quimioquinas CCR4, CXCR3 y CXCR4, en linfocitos T activados por TAPCells.
3. Evaluar la expresión de las moléculas de adhesión CD11a, PSGL-1 y la integrina  $\beta 1$ , en linfocitos T activados por TAPCells.
4. Analizar la capacidad de migración *in vitro* de linfocitos T activados por TAPCells.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Separación de PBMC a partir de muestras de sangre periférica.

Muestras de sangre, provenientes de donantes sanos ("buffy coats"), proporcionadas por el Centro Metropolitano de Sangre y Tejidos y por el Hospital del Salvador fueron utilizadas para la extracción de PBMC (Células Mononucleares de Sangre Periférica) mediante la generación de un gradiente de densidad por centrifugación. Brevemente, la sangre (50-80 ml por muestra) fue diluida en una razón 1:3 con una solución de PBS 1x y centrifugada a 1400 rpm por 5 minutos a 4°C. Posteriormente, el sobrenadante fue eliminado y las células de cada tubo fueron resuspendidas en 30 ml de PBS 1x. En la parte inferior de cada tubo, fueron añadidos lentamente 10 ml de Ficoll-Paque® ( $\delta=1,077$  g/ml; GE Healthcare) y posteriormente los tubos fueron centrifugados a 1250 rpm por 25 minutos a 18°C, dejando el freno de la centrífuga en 1 y la aceleración en 0. Luego de la centrifugación, se obtuvo el PBMC, anillo ubicado entre el plasma y los eritrocitos. Estas células se traspasaron a un tubo nuevo, se lavaron con PBS 1x y se centrifugaron a 1450 rpm por 5 minutos a 4°C. Se eliminó el sobrenadante y se les agregó 10 ml de buffer de lisis ACK (Amonio-Cloruro-Potasio) 1x estéril. Las células con la solución de lisis de eritrocitos fueron incubadas durante 10 minutos a 37°C y 5% CO<sub>2</sub>, para luego ser centrifugadas a 1250 rpm por 5 minutos a 4°C. El sobrenadante fue eliminado y las células fueron resuspendidas a la concentración deseada según los experimentos. La viabilidad celular fue comprobada mediante azul de tripán.

**Generación de Células Presentadoras de Antígenos Tumorales (TAPCells).**

El PBMC fue resuspendido en medio AIM-V<sup>®</sup> CTS (Gibco<sup>®</sup>, Life Technologies) a una concentración final de 20 millones de células por ml, y se incubó por dos horas a 37°C y 5% CO<sub>2</sub> (2 ml por pocillo) en placas de plástico de seis pocillos (Falcon<sup>®</sup>, BD Biosciences) para permitir la adherencia de los monocitos del PBMC a la superficie del plástico. Las células no adherentes o linfocitos de Sangre Periférica (PBL) obtenidos del sobrenadante de los pocillos, fue extraído y mantenido en medio RPMI 1640 (HyClone<sup>®</sup>, Thermo Scientific), suplementado con 10% v/v de Suero Fetal Bovino (SFB) (Corning Inc.) y 1% v/v de Penicilina/Estreptomina (HyClone<sup>®</sup>, Thermo Scientific), para su posterior utilización en co-cultivos con TAPCells alogénicas. Las células adherentes o monocitos, fueron cultivados por 48 horas en medio de cultivo AIM-V<sup>®</sup> CTS (Gibco<sup>®</sup>, Life Technologies) suplementado con 800 U/ml de GM-CSF (Miltenyi Biotec) y 500 U/ml de IL-4 (Miltenyi Biotec) para su diferenciación a células dendríticas. Para la generación de TAPCells, las células obtenidas fueron estimuladas por 24 horas adicionales con 100 µg/ml de TRIMEL<sup>®</sup>, 10 ng/ml de TNF-α (Miltenyi Biotec) y 1000 U/ml de IFN-α (Miltenyi Biotec). Las células dendríticas no estimuladas o inmaduras (iDC) correspondieron a células mantenidas en cultivo por las 24 horas adicionales sin lisado tumoral ni citoquinas. Posterior a cada cultivo, se realizó una citometría de flujo para evaluar marcadores de diferenciación típicos y moléculas de maduración. Una vez realizado esto, las TAPCells fueron congeladas a -80°C para su posterior utilización (6\*10<sup>5</sup>-7\*10<sup>5</sup> células por tubo) en medio de congelación (1 ml por tubo) compuesto de 90% SFB (Corning Inc.) + 10% DMSO (Tocris Bioscience).

### **Purificación de linfocitos T desde PBL.**

A partir del PBL obtenido según la sección anterior, se purificaron las células CD3<sup>+</sup> (linfocitos T) mediante la técnica de *cell sorting*, utilizando un equipo FACSAria II (BD Biosciences) perteneciente a la Fundación Ciencia & Vida. Brevemente, 200 millones de células de PBL fueron resuspendidas en 800 µl de medio de cultivo RPMI 1640 + 10% SFB + 1% Penicilina/Estreptomicina, y se adicionaron 10 µl de un anticuerpo α-hCD3, acoplado al fluoróforo eFluor450 (eBioscience; clon SK7). Las células fueron incubadas con el anticuerpo durante 20 minutos a 4°C y en oscuridad, para luego ser lavadas con 5 ml de medio de cultivo y centrifugadas a 2000 rpm por 5 minutos. Posteriormente, el sobrenadante fue eliminado y las células resuspendidas en medio RPMI 1640 + 10% SFB filtrado a una concentración de  $3,0 \cdot 10^7$  células por ml, para finalmente proceder a su purificación mediante *cell sorting*. La pureza de los linfocitos T obtenidos mediante esta técnica fue de, en promedio, un 90%.

### **Co-cultivo de linfocitos T con TAPCells alogénicas.**

Células dendríticas (TAPCells) fueron descongeladas y agregadas a los pocillos de una placa de 24 pocillos de fondo plano (Falcon<sup>®</sup>, BD Biosciences) a una concentración de  $6 \cdot 10^4$  células por ml, en medio RPMI 1640 + 10% SFB + 1% Penicilina/Estreptomicina por 2 horas. Posteriormente, se agregaron a los pocillos linfocitos T alogénicos (purificados desde sangre perteneciente a un individuo distinto del que se generaron las TAPCells utilizadas) obtenidos por *cell sorting* a una concentración de  $1,2 \cdot 10^6$  células por ml, en medio RPMI 1640 + 10% SFB + 1% Penicilina/Estreptomicina, quedando un volumen total de 1 ml por pocillo en una razón de 20:1 con las DCs. Como control negativo del experimento, se cultivaron linfocitos T ( $1,2 \cdot 10^6$  células por ml y por pocillo) sin células dendríticas, mientras que, como control

positivo se activaron linfocitos T de forma policlonal con el sobrenadante del hibridoma OKT3 (4 µg/ml) el cual posee anticuerpos α-CD3. Todos los cultivos fueron mantenidos por 5 días a 37°C y 5% CO<sub>2</sub>, agregando 150 U/ml de IL-2 (Miltenyi Biotec) a los días 1 y 4.

### **Citometría de Flujo.**

Las células dendríticas inmaduras (iDC) y TAPCells fueron caracterizadas fenotípicamente mediante citometría de flujo. Para ello, las células fueron resuspendidas en una solución de PBS 1x + 2% SFB (Corning Inc.) e incubadas por 20 minutos a 4°C (en oscuridad), con los respectivos anticuerpos monoclonales para analizar su correcta diferenciación y maduración: α-hCD11c (PE) (Thermo Scientific; clon BU15), α-hHLA-DRDPDQ (FITC) (BD Biosciences; clon Tu39), y α-hCD86 (PerCP-eFluor710) (eBioscience; clon IT2.2). Luego, las células fueron lavadas con 700 µl de PBS 1x + 2% SFB, y resuspendidas en 300 µl de buffer FACS (BD Biosciences) para finalmente ser analizadas en un citómetro de flujo FACSVerse (BD Biosciences).

Los linfocitos T provenientes de los co-cultivos fueron recolectados desde los pocillos de la placa mediante resuspensión por micropipeta para su posterior tinción extracelular. Las células provenientes de las diferentes condiciones fueron resuspendidas en PBS 1x + 2% SFB (Corning Inc.) e incubadas durante 20 minutos a 4°C (en oscuridad) con los siguientes anticuerpos monoclonales: α-hCD8 (FITC) (Thermo Scientific; clon MEM-31), α-hCD4 (APC-Cy7) (Biolegend; clon RPA-T4), α-hCD69 (PE) (BD Biosciences; clon FN50), α-hCD25 (PerCP) (eBioscience; clon BC96), α-mIgG1 k (PE) (eBioscience; clon P3.6.2.8.1), α-mIgG1 k (PerCP-Cy5.5) (eBioscience; clon P3.6.2.8.1), α-mIgG2a k (APC) (BD Biosciences; clon G155-178), α-

hCCR4 (PE) (BD Biosciences; clon 1G1),  $\alpha$ -hCXCR3 (PerCP-Cy5.5) (BD Biosciences; clon 1C6/CXCR3),  $\alpha$ -hCXCR4 (APC) (eBioscience; clon 12G5),  $\alpha$ -hCD11a (APC) (Biolegend; clon HI111),  $\alpha$ -hCD162 (APC) (eBioscience; clon FLEG), y  $\alpha$ -hCD29 (PerCP-eFluor710) (eBioscience; clon TS2/16). Luego, las células fueron lavadas con PBS 1x + 2% SFB, y resuspendidas en 300  $\mu$ l de buffer FACS (BD Biosciences) para finalmente ser analizadas en un citómetro de flujo FACSVerse (BD Biosciences). Para los análisis se utilizó el programa BD FACSuite.

### **Ensayos de migración *in vitro*.**

Se utilizaron ensayos de trans migración en placas de Transwell® (Corning Inc.) de 24 pocillos con membranas de policarbonato de 5  $\mu$ m de tamaño de poro. En el pocillo inferior se colocaron 600  $\mu$ l de medio RPMI 1640 + 0,1% BSA (Rockland Inc.) con 100 ng/ml de las quimioquinas hCCL17 (ligando de CCR4), hCXCL10 (ligando de CXCR3) o hCXCL12 (ligando de CXCR4) (R&D Systems), por separado; o medio sin quimioquinas (control). En el pocillo superior se agregaron 100  $\mu$ l de medio RPMI 1640 + 0,1% BSA que contenían  $5 \times 10^5$  linfocitos T no estimulados, activados de forma policlonal o estimulados con TAPCells alogénicas, según corresponda, los cuales fueron obtenidos a partir de los co-cultivos descritos en la sección anterior. Estas células se incubaron durante 3 horas a 37°C y 5% CO<sub>2</sub>, para posteriormente recolectar el medio de los pocillos inferiores mediante pipeteo reverso. Para el conteo absoluto de las células que migraron para cada condición, se utilizó una solución de "beads" (BD Biosciences) de concentración conocida (relación 1:1 hasta 1:5 con linfocitos T, según fabricante), la cual fue agregada a las soluciones de células a contar. El número absoluto de células se obtiene con la siguiente ecuación:

$$N^{\circ} \text{ absoluto células} = \frac{(N^{\circ} \text{ beads agregadas}) \cdot (N^{\circ} \text{ relativo de células})}{N^{\circ} \text{ relativo de beads}}$$

Los números relativos de "beads" y células se obtuvieron directamente desde la adquisición por citometría de flujo.

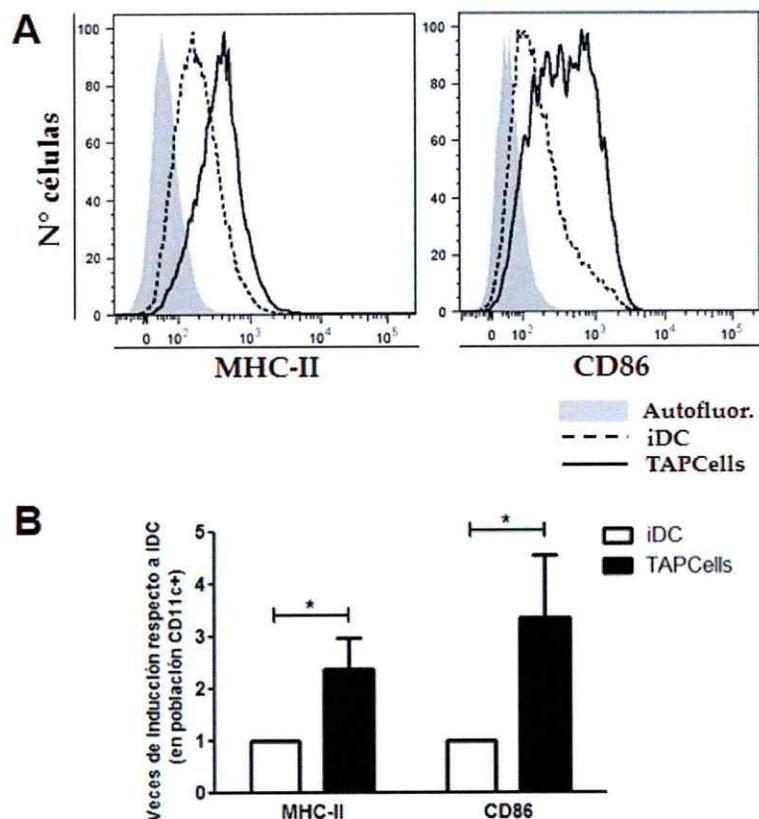
#### **Análisis estadístico.**

Para los análisis estadísticos se utilizó el programa computacional GraphPad Prism® (GraphPad Software Inc.). En el caso del análisis fenotípico de las células dendríticas utilizadas, se utilizó la prueba estadística de Mann-Whitney de dos colas, con un intervalo de confianza del 95%. Para el análisis y comparación de los distintos marcadores presentes en los linfocitos T luego de los co-cultivos se realizó la prueba estadística de Kruskal-Wallis con una prueba posterior de Dunns para comparar los distintos pares de condiciones. Finalmente, para el análisis de la migración *in vitro* de los linfocitos T estimulados o no estimulados se utilizó la prueba ANOVA de una vía con una prueba posterior de Tukey para comparar los distintos pares de condiciones. En todos los casos, se fijó el nivel de significancia mínimo en P menor a 0,05.

## RESULTADOS

### **TAPCells poseen fenotipo de células dendríticas maduras.**

Para que se desarrolle una respuesta inmune antitumoral eficiente, los linfocitos T CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> deben reconocer antígenos tumorales presentados por las células dendríticas (DCs) y activarse, lo que sucede cuando existe una correcta maduración de las DCs. Las DCs maduras aumentan la expresión de moléculas de presentación antigénica y de co-estimulación, entre las que destacan los Complejos Principales de Histocompatibilidad (MHC) de clase I y II, y las moléculas co-estimuladoras, CD80 y CD86 (Banchereau & Steinman, 1998). Por esta razón, analizamos si las células dendríticas presentadoras de antígenos tumorales (TAPCells) son fenotípicamente maduras y de esta manera, logran estimular linfocitos T. En congruencia con resultados previos de nuestro laboratorio, observamos un incremento estadísticamente significativo de la expresión de MHC-II y CD86 comparado con las células dendríticas inmaduras. Este aumento corresponde a  $2,38 \pm 0,58$  veces para MHC-II y de  $3,35 \pm 1,19$  veces para CD86 (considerando media  $\pm$  SEM) respectivamente (figuras 1A y 1B).



**Figura 1. TAPCells poseen un fenotipo maduro.** Células dendríticas diferenciadas a partir de monocitos de sangre periférica fueron estimuladas con TRIMEL, TNF- $\alpha$  e IFN- $\alpha$  por 24 horas (según lo descrito en Materiales y Métodos). Como control negativo de maduración, se utilizaron células dendríticas no estimuladas. Se analizó mediante citometría de flujo, la expresión de MHC-II y CD86 dentro de la población de células CD11c<sup>+</sup>. (A) Histogramas representativos de IMF para MHC-II y CD86 analizados en la población CD11c<sup>+</sup> para las condiciones de iDCs y TAPCells. El número de células mostrado en los histogramas para cada condición se encuentra normalizado. (B) Gráfico de barras que muestra la media  $\pm$  S.E.M. de las veces de inducción de la Intensidad Media de Fluorescencia (IMF) para cada marcador, relativo a iDC. Se muestran los resultados para 4 experimentos independientes; \* = P < 0,05. Autofluor. = Autofluorescencia de las DCs.

### **TAPCells induce expresión de marcadores de activación en linfocitos T.**

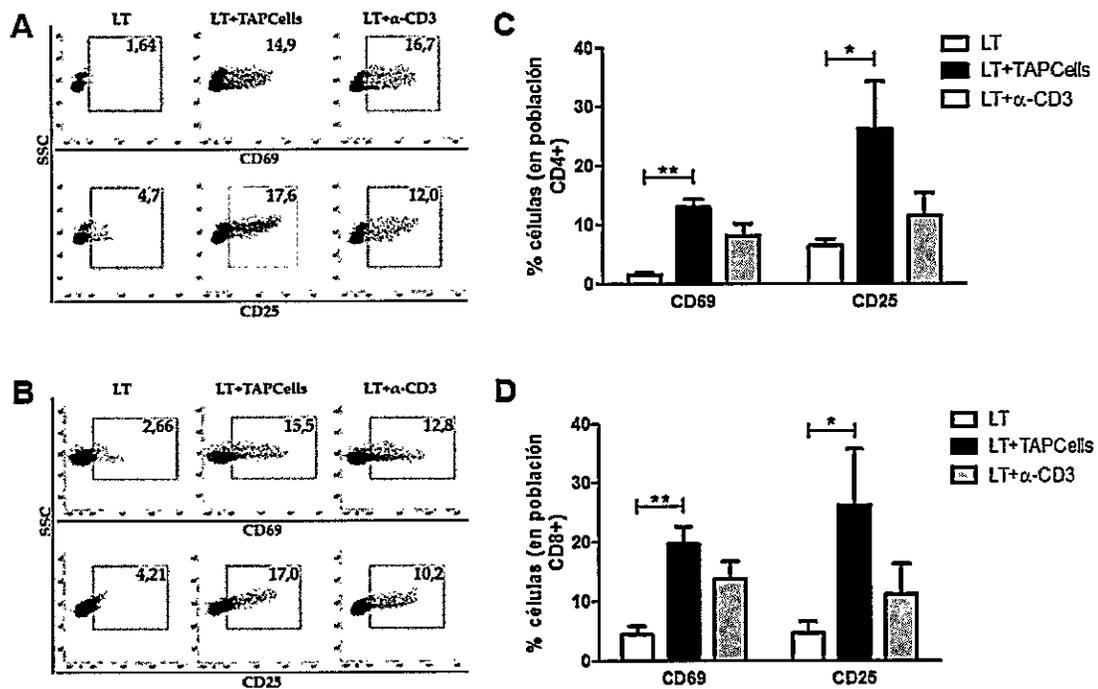
En la respuesta antitumoral, el rol de los linfocitos T, como efectores y orquestadores de la respuesta inmune, es fundamental. Los linfocitos efectores infiltran tumores murinos y humanos, y se ha demostrado que niveles elevados de linfocitos infiltrantes de tumor (TILs) están asociados con un mejor pronóstico del cáncer (Yu & Fu, 2006). Por ello, uno de los pasos críticos para el desarrollo de una respuesta antitumoral es la activación de los linfocitos T, proceso dependiente de las células dendríticas.

Como primera aproximación, realizamos una cinética de activación de 11 días utilizando LT no estimulados, estimulados con TAPCells alogénicas o activados de forma policlonal. Mediante este experimento, analizamos la expresión de los marcadores de activación CD25 y CD69 en LT CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup>, observando un alto nivel de activación al día 5 de cultivo para ambas poblaciones de LT al ser co-cultivados con TAPCells (datos no mostrados). Por este motivo, realizamos los futuros experimentos con linfocitos recolectados desde este día del co-cultivo.

Como se observa en la figura 2, LT CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> co-cultivados con TAPCells, aumentan significativamente la expresión de las moléculas de activación CD69 y CD25 comparados con los LT no estimulados. Para los LT CD4<sup>+</sup>, el porcentaje de células CD69<sup>+</sup> aumentó desde [1,61 ± 0,41] % en los LT no estimulados a [12,91 ± 1,41] % en los activados por TAPCells, mientras que en los CD8<sup>+</sup> se incrementó desde [4,49 ± 1,37] % a [19,68 ± 2,97] %. En el caso de CD25, el porcentaje de LT CD4<sup>+</sup> que expresan el marcador aumento desde un [6,47 ± 1,09] % en LT sin estímulo a un [26,26 ± 8,10] % en LT activados por las células dendríticas, y el de los LT CD8<sup>+</sup> creció de un [4,73 ± 1,97] % a un [26,29 ± 9,44] % (considerando [media ± SEM]) (figuras 2C y 2D). Asimismo, los porcentajes de LT positivos para estos marcadores fueron

similares para la estimulación con TAPCells y la activación policlonal con el sobrenadante de OKT3 (control positivo de activación) (figuras 2A y 2B). En concordancia con estos resultados, cuando analizamos la Intensidad Media de Fluorescencia (IMF) para los marcadores descritos, observamos que existe un aumento significativo de la expresión de ambas proteínas en los linfocitos T CD4<sup>+</sup> co-cultivados con TAPCells comparados con el control negativo (datos no mostrados). Este incremento en la IMF correspondió a  $2,18 \pm 0,23$  veces para CD69 y de  $3,81 \pm 1,82$  veces para CD25 (considerando media  $\pm$  SEM) respectivamente. Para los linfocitos T estimulados de forma policlonal con el sobrenadante de OKT3, observamos un aumento en los niveles de expresión de CD25 y CD69, pero no alcanza a ser significativamente diferente al compararla tanto con los LT no activados como con los estimulados con TAPCells (datos no mostrados).

En relación a los linfocitos T CD8<sup>+</sup> estimulados con TAPCells, también existe una significativa inducción en la expresión de CD69 y CD25 de en promedio el doble o superior al compararlos con el control negativo, reflejado en el aumento de la IMF para cada marcador (datos no mostrados). Este aumento fue de  $2,21 \pm 0,35$  veces para CD69 y de  $2,81 \pm 0,78$  veces para CD25 (considerando media  $\pm$  SEM) respectivamente. Por otro lado, al analizar los LT activados de forma policlonal, observamos un aumento significativo de la expresión de CD69 de  $1,75 \pm 0,25$  veces (media  $\pm$  SEM) respecto a los LT no estimulados (datos no mostrados). Por otro lado, tanto para linfocitos T CD4<sup>+</sup> como CD8<sup>+</sup>, no observamos diferencias en la expresión de CD25 entre los LT activados con sobrenadante de OKT3 y los no activados.



**Figura 2. TAPCells induce la expresión de marcadores de activación en linfocitos T.** Linfocitos T purificados por *cell sorting* fueron estimulados por 5 días con TAPCells alogénicas o con sobrenadante de OKT3 y se les analizó por citometría de flujo la expresión en superficie de los marcadores CD69 y CD25. Se muestran dot plots representativos del porcentaje de células positivas para CD69 y CD25 (números al interior de cada gráfico) en una ventana de LT CD4<sup>+</sup> (A) y CD8<sup>+</sup> (B), y gráficos de barras que muestran la media  $\pm$  S.E.M. del porcentaje de células positivas para CD69 y CD25 en la población de LT CD4<sup>+</sup> (C) y CD8<sup>+</sup> (D). Se muestran los resultados de 6 experimentos independientes; \* =  $P < 0,05$ ; \*\* =  $P < 0,01$ . LT = Linfocitos T no estimulados, LT+TAPCells = LT co-cultivados con TAPCells, LT+ $\alpha$ -CD3 = LT estimulados con sobrenadante de OKT3.

### **TAPCells induce la expresión de receptores de quimioquinas asociados con migración hacia tumor y piel inflamada en linfocitos T.**

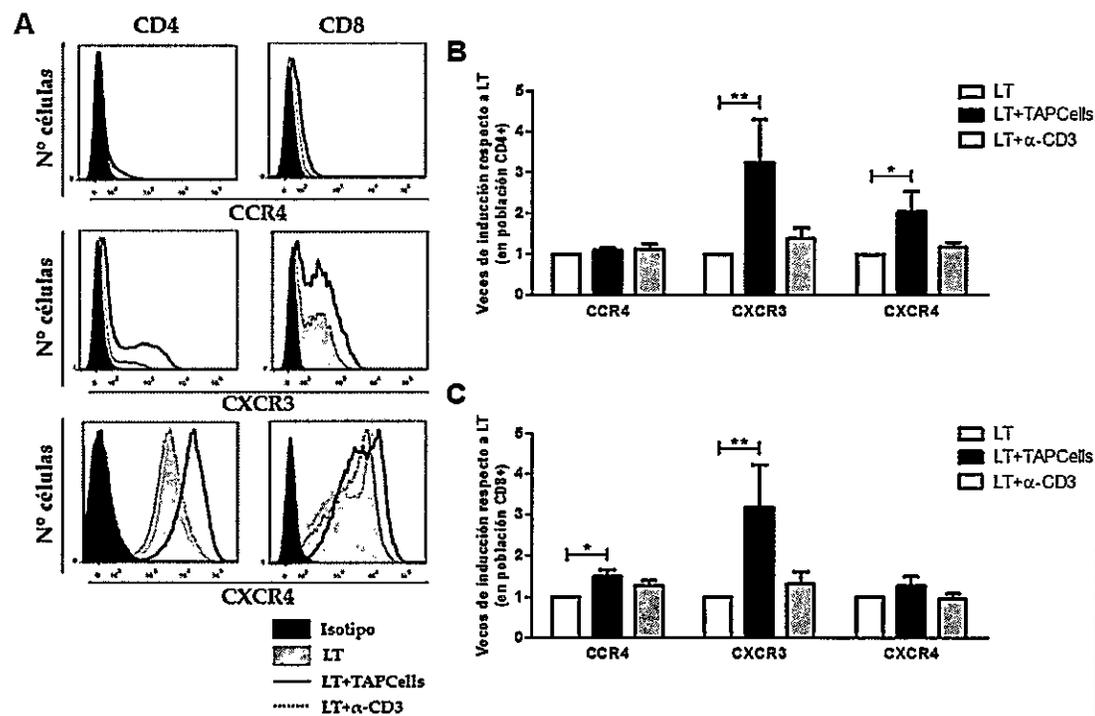
La respuesta inmune antitumoral requiere la activación de LT que migren al microambiente tumoral y eliminen a las células cancerosas. Resultados previos de nuestro laboratorio han demostrado que pacientes con melanoma avanzado tratados con la terapia TAPCells aumentan su supervivencia en un 60% de los casos y que linfocitos de pacientes respondedores a la terapia expresan mayores niveles de CXCR4 comparado con los que no responden (Salazar-Onfray y col., 2013). Por este motivo, nos interesó investigar si estas células dendríticas son capaces de inducir en LT alogénicos un fenotipo adecuado que les permita migrar hacia el tumor. Se ha documentado, que los receptores CCR4 y CXCR3 son importantes para la migración de linfocitos T hacia piel y sitios de inflamación respectivamente (Charo & Ransohoff, 2006; Marelli-Berg y col., 2008). Por todo lo anterior, evaluamos mediante citometría de flujo, la expresión de los receptores de *homing* CCR4, CXCR3 y CXCR4 en la superficie de los LT estimulados con TAPCells o de forma policlonal.

Como se observa en la figura 3, las TAPCells inducen en los LT CD4<sup>+</sup> un aumento significativo de la IMF de los receptores CXCR3 y CXCR4 comparado con los LT sin activar (figuras 3A y 3B). El incremento fue de  $3,23 \pm 1,06$  veces para CXCR3 y de  $2,03 \pm 0,49$  veces para CXCR4 (considerando media  $\pm$  SEM) comparado con los LT no estimulados. No obstante, la expresión del receptor CCR4 en los LT CD4<sup>+</sup> se mantuvo constante en todas las condiciones analizadas. Por lo demás, en LT activados policlonalmente no cambió la expresión de ninguno de los receptores analizados (figura 3B).

Cuando analizamos la población de linfocitos T CD8<sup>+</sup>, observamos que TAPCells inducen un aumento significativo de la expresión de CCR4 y de CXCR3 al

compararlos con los LT no activados (figuras 3A y 3C). En términos cuantitativos, la expresión de CCR4 se indujo  $1,49 \pm 0,17$  veces, mientras que la de CXCR3 lo hizo en  $3,18 \pm 1,05$  veces (considerando media  $\pm$  SEM). La expresión de CXCR4 se mantuvo constante en los LT CD8<sup>+</sup> en las condiciones analizadas (figuras 3A y 3C). Por otra parte, al igual que en el caso de los LT CD4<sup>+</sup>, no obtuvimos diferencias estadísticamente significativas entre los LT activados policlonalmente tanto al compararlos con los no activados como con los estimulados por TAPCells, con la cantidad de experimentos realizados (figura 3C).



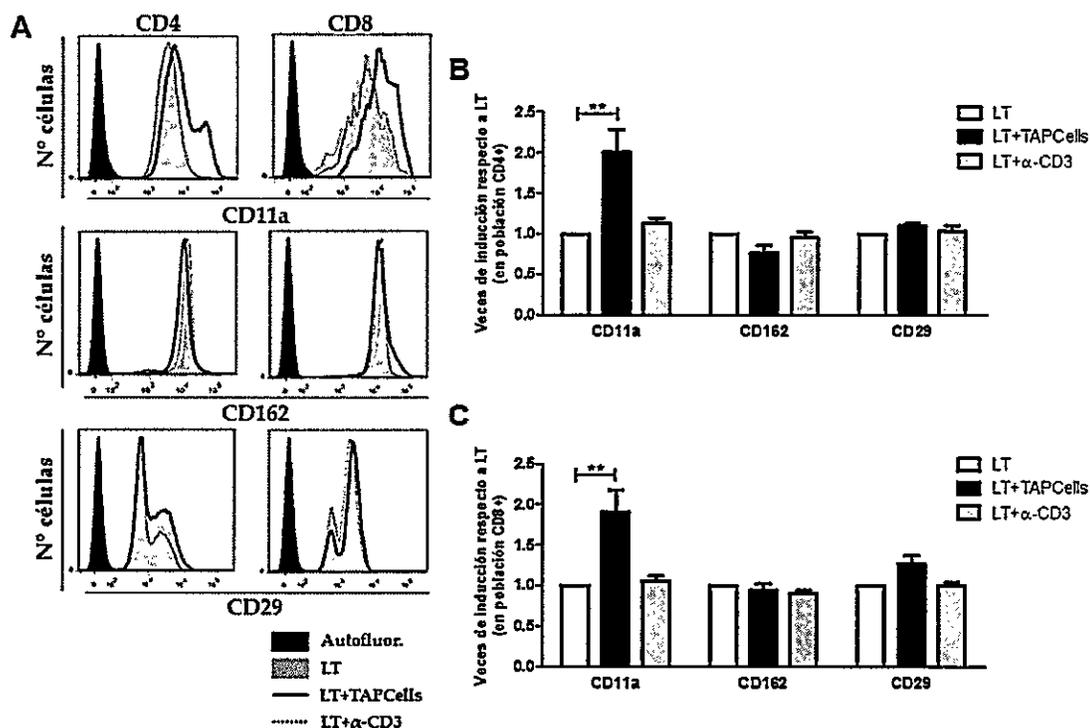


**Figura 3. TAPCells induce la expresión de receptores de “homing” a tumor en LT.** Linfocitos T purificados por *cell sorting* y estimulados por 5 días con TAPCells alogénicas o con sobrenadante de OKT3, fueron recolectados y se les analizó por citometría de flujo la expresión en superficie de los receptores de quimioquinas CCR4, CXCR3 y CXCR4. (A) Superposición de histogramas para la fluorescencia de los receptores de quimioquinas mencionados en una ventana de linfocitos T CD4<sup>+</sup> o CD8<sup>+</sup>. Experimento representativo de 6 experimentos diferentes. El número de células mostrado se encuentra normalizado. (B) y (C) Gráficos de barras que muestran la media  $\pm$  S.E.M. de las veces de inducción de la IMF para CCR4, CXCR3 y CXCR4, relativo a LT, tanto en la población de LT CD4<sup>+</sup> (B) como CD8<sup>+</sup> (C). Se muestran los resultados de 6 experimentos independientes; \* =  $P < 0,05$ ; \*\* =  $P < 0,01$ . Isotipo = Control de isotipo de anticuerpos, LT = Linfocitos T no estimulados, LT+TAPCells = LT co-cultivados con TAPCells, LT+α-CD3 = LT estimulados con sobrenadante de OKT3.

### **TAPCells induce la expresión de la integrina CD11a en linfocitos T.**

Para que un LT sea capaz de migrar hacia el sitio tumoral, necesita entrar a los tejidos desde la circulación. Para ello, existen moléculas de adhesión expresadas por las células del sistema inmune capaces de interactuar con ligandos o receptores presentes en las células endoteliales que componen el interior de los vasos sanguíneos (Hamann & Syrbe, 2000). Se ha descrito que varias moléculas de adhesión como LFA-1, P-Selectina y  $\alpha 4\beta 1$  aumentan su expresión en linfocitos en procesos inflamatorios, incluyendo varios tipos de cáncer. Por este motivo, analizamos por citometría de flujo la expresión de CD11a, subunidad de la integrina LFA-1; CD162, que es un ligando de P-selectina; y CD29, que es parte de la integrina  $\alpha 4\beta 1$ , en los linfocitos T estimulados de forma policlonal o con TAPCells.

Como se observa en la figura 4, LT CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> estimulados con TAPCells aumentan significativamente la expresión de la integrina CD11a. Este aumento fue de  $2,01 \pm 0,28$  veces para los LT CD4<sup>+</sup> y de  $1,91 \pm 0,27$  veces para los LT CD8<sup>+</sup> (considerando media  $\pm$  SEM) con respecto a los linfocitos no estimulados. No obtuvimos diferencias estadísticamente significativas en la expresión de CD11a al comparar los LT activados policlonalmente con los no activados o con los estimulados mediante TAPCells (figuras 4B y 4C). Por otra parte, no observamos variaciones en la expresión de CD162 y CD29 en ninguna de las poblaciones de LT, bajo ninguna de las condiciones analizadas. A pesar de esto, observamos una tendencia al aumento de la expresión de la molécula CD29 en LT CD8<sup>+</sup> estimulados con TAPCells, la cual no alcanza a ser significativa con el número de experimentos realizados (figuras 4B y 4C).



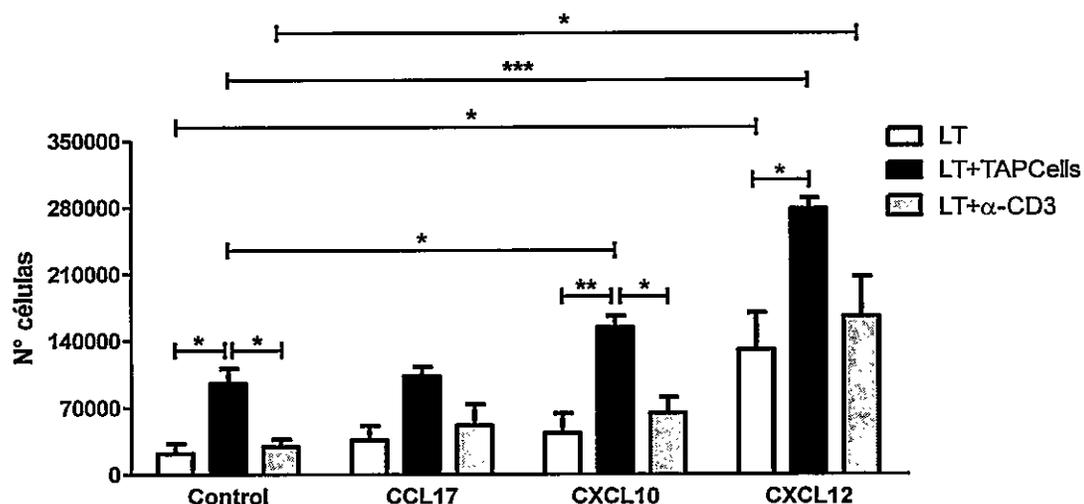
**Figura 4.** TAPCells induce la expresión de CD11a en linfocitos T CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup>. Se analizó por citometría de flujo la expresión de las moléculas de adhesión CD11a, CD162 y CD29 en linfocitos T purificados y estimulados por 5 días con TAPCells, con sobrenadante de OKT3, o no estimulados. (A) Superposición de histogramas representativos para la fluorescencia de las moléculas de adhesión descritas en una ventana de linfocitos T CD4<sup>+</sup> o CD8<sup>+</sup>. El número de células mostrado se encuentra normalizado. (B) y (C) Gráficos de barras que muestran la media  $\pm$  S.E.M. de las veces de inducción de la Intensidad Media de Fluorescencia (IMF) para CD11a, CD162 y CD29, relativo a LT, en LT CD4<sup>+</sup> (B) y LT CD8<sup>+</sup> (C). Se muestran los resultados para 6 experimentos independientes; \*\* = P < 0,01. Autofluor. = Autofluorescencia de los linfocitos, LT = Linfocitos T no estimulados, LT+TAPCells = LT co-cultivados con TAPCells, LT+ $\alpha$ -CD3 = LT estimulados con sobrenadante de OKT3.

### **TAPCells aumentan la capacidad migratoria de linfocitos T y su respuesta frente a las quimioquinas CXCL10 y CXCL12.**

Como se ha mencionado anteriormente, las células dendríticas son capaces de inducir la expresión de receptores específicos para la migración dirigida de los LT (Dudda y col., 2005). Estas señales dependen del lugar fisiológico donde ocurre la captura antigénica por parte de las DCs (Marelli-Berg y col., 2008). Para migrar, las células detectan mediante receptores específicos, gradientes de concentración de quimioquinas que las guían hacia el tejido donde se está produciendo la citoquina en cuestión o donde está en mayor concentración (Luster, 1998). Debido a que las TAPCells inducen respuestas antitumorales mediadas por LT en pacientes con melanoma (Aguilera y col., 2011), decidimos investigar si estas células dendríticas inducen la migración de LT hacia el sitio tumoral. Tomando esto en consideración, realizamos ensayos de migración *in vitro* de linfocitos T estimulados con TAPCells, utilizando las quimioquinas CCL17 (ligando de CCR4), CXCL10 (ligando de CXCR3) y CXCL12 (ligando de CXCR4).

Cuando determinamos el número absoluto de células que migraron para cada condición, observamos que los LT estimulados con TAPCells migraron en mayor número que los controles, independiente del ligando utilizado, incluso en la migración basal sin quimioquinas (figura 5). En el caso de la migración basal o inespecífica, la cantidad de células que migraron fue significativamente mayor en los LT estimulados con TAPCells al compararlos tanto con los LT sin estimular como con los activados policlonalmente. Entre estas dos últimas condiciones no hubo diferencias estadísticamente significativas en la migración. Cuando utilizamos CCL17 (quimioquina que actúa como ligando de CCR4) observamos que los linfocitos T estimulados con TAPCells migran en mayor número que los controles, sin embargo, este cambio no es

estadísticamente significativo. Al utilizar la quimioquina CXCL10 (ligando de CXCR3) observamos un incremento significativo de la migración en los LT estimulados con TAPCells respecto de los controles (figura 5). Cuantitativamente, la migración fue, en promedio, 2,8 veces mayor en los LT activados por TAPCells respecto a los LT activados policlonalmente. Por otro lado, si nos focalizamos solo en la migración de los LT activados por TAPCells en las condiciones con o sin el uso de quimioquinas, observamos una diferencia significativa en la migración de los linfocitos en respuesta a CXCL10 al compararlos con el control sin el uso de quimioattractantes. Finalmente, observamos que para el caso de CXCL12 (quimioquina ligando de CXCR4), los LT estimulados con TAPCells migran significativamente más que los LT no activados; sin embargo, no obtuvimos diferencias significativas al comparar los primeros con los LT activados policlonalmente, al menos para el número de experimentos realizados (figura 5). Adicionalmente, observamos una mayor inducción de la migración de los LT, ya sea activados o no, en respuesta a CXCL12 al compararlos con los controles sin quimioquinas.



**Figura 5. Linfocitos T estimulados con TAPCells migran en mayor cantidad que los LT no activados en respuesta a las quimioquinas CXCL10 y CXCL12.** Linfocitos T no estimulados o estimulados por 5 días con TAPCells alogénicas o con sobrenadante de OKT3, fueron utilizados en ensayos de transmigración, empleando las quimioquinas CCL17, CXCL10 y CXCL12 como quimioattractantes, por separado. Los gráficos de barras muestran la media  $\pm$  S.E.M. del número de células totales que migraron para cada quimioquina utilizada. Se muestran los resultados para 3 experimentos independientes; \* =  $P < 0,05$ ; \*\* =  $P < 0,01$ ; \*\*\* =  $P < 0,001$ . LT = Linfocitos T no estimulados, LT+TAPCells = LT co-cultivados con TAPCells, LT+ $\alpha$ -CD3 = LT estimulados con sobrenadante de OKT3, Control SQ = Control Sin Quimioquinas.

## DISCUSIÓN

Los linfocitos T cumplen un rol clave en la respuesta inmune antitumoral, ya sea induciendo la lisis de las células anormales presentes en el tumor a través de los LT CD8<sup>+</sup>, o mediante la secreción de citoquinas y reclutamiento de otras células inmunes mecanismo utilizado por los LT CD4<sup>+</sup> (Hung y col., 1998; Toes y col., 1999; Restifo y col., 2012).

Los LT deben reconocer antígenos específicos presentados por DCs maduras en los linfonodos para activarse y ejercer su función. En la respuesta antitumoral, esta interacción le otorga al LT activado la capacidad de migrar hacia el sitio del tumor. En este sitio, reconoce el antígeno específico en las células tumorales (definido por su TCR) con el cual fueron activados e induce su lisis (Lanzavecchia & Sallusto, 2001). Debido a esto, la generación de inmunoterapias basadas en la utilización de células dendríticas para combatir distintos tipos de cáncer ha surgido como una alternativa bastante atractiva (Figdor y col., 2004; Palucka & Banchereau, 2012). Hasta el momento se han realizado una serie de distintos estudios clínicos utilizando inmunoterapia basada en DCs para el tratamiento de diferentes tipos de tumores. Por ejemplo, podemos mencionar el uso de DCs maduras *ex vivo* con lisados tumorales o péptidos determinados para el tratamiento de melanoma metastásico, de cáncer de colon mediante DCs "cargadas" con ARN de tumores autólogos, la utilización de DCs derivadas de monocitos maduras con  $\alpha$ -galactosylceramida para el tratamiento de distintos tumores en estado avanzado, entre otros. La mayoría de los estudios de fase I y II que aplican este tipo de inmunoterapia han tenido dos problemas fundamentales: el cómo evaluar la eficiencia clínica de la inmunoterapia contra el cáncer y el poder correlacionar biomarcadores específicos en los pacientes con la eficiencia clínica del tratamiento (Palucka & Banchereau, 2012).

La inmunoterapia TAPCells contra melanoma, generada en nuestro laboratorio, ha mostrado muy buenos resultados aumentando a un promedio de 33 meses la esperanza de vida del 60% de los pacientes tratados (respondedores a la terapia) en comparación a los 11 meses de los pacientes no respondedores (Salazar-Onfray y col., 2013). Sin embargo, para incrementar la eficacia de esta inmunoterapia, debemos conocer los mecanismos celulares y moleculares involucrados en su acción.

Nuestros resultados demuestran que las TAPCells son capaces de activar linfocitos T alogénicos. Previamente a los co-cultivos de 5 días entre LT y DCs, realizamos una cinética de activación de LT estimulados por TAPCells y de los controles, observando una inducción temprana de CD69, cuya expresión llegó a un máximo entre los días 4 y 5 de co-cultivo para luego comenzar a disminuir, y una inducción más tardía de CD25, llegando a su máxima expresión entre los días 6 y 8 de co-cultivo (datos no mostrados). Estos datos se correlacionan con lo mencionado en la literatura, donde muestran que la expresión de CD69 comienza su inducción alrededor de 4 horas después de la presentación antigénica por parte de las DCs, mientras que la expresión de CD25 se induce a partir de entre 12-24 horas post-presentación (Maino y col., 1995; Rea y col., 1999). Considerando los datos anteriores, escogimos el día 5 para realizar el resto de las mediciones, debido a que en ese día obtuvimos una inducción alta tanto para CD69 como para CD25. Al quinto día de co-cultivo, LT estimulados con TAPCells mostraron niveles de expresión de CD69 similares a los presentes en los LT activados policlonalmente con sobrenadante de la línea celular OKT3 e incluso presentaron niveles mucho más altos de CD25 al compararlos tanto con los LT no activados como los estimulados con sobrenadante de OKT3. Ya que CD25 es parte del receptor de IL-2 y se expresa de forma tardía luego de la activación

de los LT (Caruso y col., 1997), es probable que las TAPCells induzcan la expresión de este receptor de manera más temprana que el sobrenadante de OKT3.

Las células dendríticas inducen en los LT la expresión de receptores de quimioquinas específicos mediante señales que dependen del lugar fisiológico (microambiente) donde ocurre la captura antigénica por parte de las DCs (Dudda y col., 2005; Marelli-Berg y col., 2008). En el caso de la migración hacia piel, los principales receptores de quimioquinas que se expresan en los LT son CCR4, presente en condiciones homeostáticas y cuya expresión aumenta bajo estados inflamatorios; y CCR10, presente en células con una función de "inmunovigilancia" en este tejido (Bromley y col., 2008; Griffith y col., 2014). Entre los receptores de quimioquinas que se expresan en linfocitos T, los de mayor interés para nuestro trabajo fueron CCR4 por su papel en la migración hacia piel, CXCR3 por su importancia en la migración celular hacia sitios de inflamación, y CXCR4 debido a la alta secreción de su ligando por parte de células en el estroma tumoral. Cuando analizamos la expresión de los receptores de quimioquinas, observamos que la mayor inducción ocurrió en los LT estimulados con TAPCells, específicamente en CXCR3 el cual incrementó su expresión en alrededor de tres veces, tanto en linfocitos T CD4<sup>+</sup> como CD8<sup>+</sup>, en comparación con el control negativo. Tomando en consideración la positiva respuesta clínica de los pacientes a la inmunoterapia TAPCells, nuestros resultados concuerdan con estudios previos, donde se ha demostrado la influencia del receptor CXCR3 en la migración de linfocitos T en enfermedades que causan inflamación de tejidos (como el caso del melanoma o enfermedades inflamatorias crónicas), y con estudios clínicos que han mostrado una mayor expectativa de vida en pacientes con melanoma que presentan un incremento en la expresión de CXCR3 en sus linfocitos T, principalmente en los LT CD8<sup>+</sup> (Mullins y col., 2004). En el caso de CCR4, su expresión se vio aumentada en los LT CD8<sup>+</sup>

activados mediante TAPCells, reafirmando la capacidad que tendrían las DCs producidas en nuestro laboratorio para generar un fenotipo en los linfocitos T que les permita su migración hacia piel inflamada, al menos en los LT CD8<sup>+</sup>. Estos datos se correlacionan con un estudio mencionado anteriormente que muestra que los pacientes afectados con melanoma en etapa III que poseen una mayor co-expresión de CCR4 y CXCR3 en la superficie de sus LT CD8<sup>+</sup> cuentan con una mayor supervivencia (Mullins y col., 2004). Con respecto al receptor CXCR4, obtuvimos un aumento de aproximadamente el doble en su expresión en los LT CD4<sup>+</sup> estimulados mediante TAPCells al compararlos con el control negativo de activación. Esto concuerda con resultados previos del laboratorio que demostraron un aumento en la expresión de CXCR4 tanto en linfocitos B como T en los pacientes con melanoma avanzado respondedores a la inmunoterapia TAPCells, mediante microarreglos de ARNm. Sin embargo, en ese entonces no se realizó el análisis sobre las subpoblaciones de linfocitos T CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup>, por lo que este trabajo nos indica de forma más clara las moléculas inducidas por las TAPCells sobre cada población de LT. La inducción de la expresión de CXCR4 sugiere que los linfocitos T CD4<sup>+</sup> activados por TAPCells tienen la capacidad para migrar hacia el sitio tumoral debido a la alta secreción de CXCL12 de parte de las células presentes en el lugar. Sin embargo, aún falta por descubrir el por qué el aumento en la expresión de CXCR4 se da en los LT CD4<sup>+</sup>, pero no en los CD8<sup>+</sup>. Por otra parte, no observamos diferencias para ninguno de los receptores entre los controles negativos y positivos de activación, por lo que la inducción de los que ya hemos mencionado se debería a la acción de las células dendríticas generadas y no solo a la activación de los LT. Esto concuerda con lo señalado en la literatura, debido a que las DCs al momento de la activación de los LT, les entregan señales específicas capaces de inducir la expresión de receptores asociados a la migración hacia tejidos

particulares (Dudda y col., 2005). Uno de los procesos más importantes en la migración de las células del sistema inmune hacia los lugares donde deben ejercer su acción es la salida de las células desde la circulación hacia los tejidos, proceso llamado extravasación, en el cual es necesaria la interacción entre las células del sistema inmune y las células endoteliales presentes al interior de los vasos sanguíneos. En este sentido, las moléculas de adhesión son fundamentales para la generación de estas interacciones (Luster, 1998). Cuando analizamos las moléculas de adhesión CD11a, CD162 y CD29 en los LT activados con TAPCells y controles, observamos que CD11a, subunidad de la integrina LFA-1, posee una mayor expresión en los LT CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> estimulados con TAPCells al compararlos con los controles utilizados. Por otro lado, ninguna de las otras dos moléculas de adhesión analizadas en los LT (CD162 y CD29) presentó diferencias en sus niveles de expresión en superficie bajo ninguna de las condiciones analizadas, y aunque se ve una ligera tendencia al aumento para CD29 en ambos grupos de LT, esta no llega a ser significativa al compararlos con los controles. Desde la literatura tenemos que la molécula LFA-1 está involucrada en el proceso de entrada de los LT a los tejidos desde la circulación y su ligando es la integrina ICAM-1 presente en la superficie de las células endoteliales, y cuya expresión se ve aumentada bajo condiciones inflamatorias y es afectada por diversas citoquinas. Sin embargo, la interacción LFA-1 – ICAM-1 no es la única vía de adhesión para la ocurrencia del proceso de extravasación (Dustin & Springer, 1988). Nuestros resultados sugieren que las interacciones claves para la migración y entrada de los LT estimulados por TAPCells a los tejidos y, en este caso, hacia el sitio tumoral están mediadas, principalmente, por la vía de adhesión dependiente de LFA-1 e ICAM-1, y no por otras vías dependientes de, por ejemplo, el ligando de P-selectina y  $\alpha 4\beta 1$ , moléculas también estudiadas en este trabajo. Sin embargo, también existe la

posibilidad de que la expresión de las distintas moléculas analizadas sea dependiente de señales presentes en el microambiente donde se localizan las células o del tiempo luego de la activación de los LT, en cuyo caso la máxima expresión de las demás moléculas de adhesión estudiadas podría ser más temprana o tardía que en el caso de CD11a, situación que no fue estudiada en este trabajo. Cabe destacar que la integrina LFA-1 no sólo es importante en el proceso de migración y extravasación de los LT sino que también posee un papel en la interacción de los linfocitos con otros tipos de células, como por ejemplo, células presentadoras de antígenos o células blanco, influyendo en procesos como la proliferación de los linfocitos y la citotoxicidad de los LT CD8<sup>+</sup> (Marlin & Springer, 1987; Springer y col., 1987), por lo que el aumento en la expresión de esta molécula de adhesión en los LT activados por TAPCells sugiere un posible efecto sobre estos eventos. Debido a lo anteriormente mencionado, la mayor expresión de LFA-1 en los LT CD8<sup>+</sup> activados por TAPCells podría estar aumentando la capacidad citotóxica de estos linfocitos contra las células de melanoma, sin embargo, éste es un aspecto que falta por investigar.

Finalmente, realizamos ensayos de trans migración *in vitro* con el objetivo de analizar la migración de los LT activados por TAPCells y LT controles al utilizar las quimioquinas ligando de los receptores CCR4, CXCR3 y CXCR4. Teniendo en cuenta los tres receptores de quimioquinas analizados, utilizamos sus ligandos de mayor afinidad y/o más estudiados como quimioattractantes para los LT. Nuestros resultados muestran que bajo todas las condiciones analizadas, ya sea con o sin el uso de quimioattractantes, los LT estimulados por TAPCells migran en mayor cantidad que ambos controles utilizados. Dado que observamos que los LT activados con TAPCells incrementan la expresión de los receptores de quimioquinas CCR4, CXCR3 y CXCR4, al menos en alguna de sus poblaciones, ya sea CD4<sup>+</sup> o CD8<sup>+</sup>, buscamos corroborar

que la migración de los LT activados con las células dendríticas fuera superior a la de los controles al utilizar las quimioquinas ligando de los receptores ya mencionados. Lo anterior fue confirmado, aunque el aumento en la cantidad de células que migraron frente a las distintas quimioquinas fue significativo solo al utilizar CXCL10 y CXCL12 con el número de experimentos realizados.

La unión entre una quimioquina y su receptor activa cascadas de señalización que derivan en la regulación de procesos dependientes de actina y por lo tanto afectan la movilidad celular (Luster, 1998), por lo que el aumento en la cantidad de células migrantes al utilizar quimioquinas respecto a los controles solo con medio, y bajo cualquiera de las condiciones, concuerda con lo presente en la literatura, sobre todo en el caso de CXCL10 y CXCL12 cuyos receptores, CXCR3 y CXCR4 respectivamente, fueron los de mayor expresión en los LT analizados. Este aumento es especialmente evidente en el caso de los LT estimulados con TAPCells, lo cual podría deberse tanto a una mayor inducción de la migración por parte de las quimioquinas utilizadas como al aumento de la migración basal de los LT.

Un aspecto a destacar es el aumento en la migración inespecífica (sin uso de quimioquinas) de los LT al ser estimulados por TAPCells. En la literatura, se describe que la migración celular se inicia con la polarización de la célula y cambios subsecuentes en la forma de la misma, procesos dependientes de la reorganización del citoesqueleto. Estos cambios involucran principalmente a los microtúbulos para el proceso de polarización, y al citoesqueleto de actina para la migración. Las fuerzas que median la migración celular son generadas y mantenidas por redes de filamentos de actina interactuando entre ellos, con intermediarios que los regulan, y con la matriz extracelular. La regulación de las estructuras formadas depende de una variedad de moléculas, entre las cuales destacan la familia de las Rho GTPasas (Gardel y col.,

2010; Rottner & Stradal, 2011). Considerando los antecedentes mencionados, nuestros resultados sugieren que las TAPCells serían capaces de inducir modificaciones en el citoesqueleto de actina o en las moléculas reguladoras de los procesos de reestructuración del citoesqueleto en los LT, de manera de aumentar, por ejemplo, la velocidad de movimiento de estas células. Sin embargo, en la literatura solo se describe que en la interacción DC-LT existe una disminución en la velocidad de movimiento de los linfocitos durante la activación para que luego su movilidad vuelva a niveles similares a los de LT vírgenes (Hugues y col., 2004; Miller y col., 2004). Por ello, actualmente no poseemos antecedentes sobre la capacidad de las células dendríticas para aumentar la movilidad basal de los LT, aspecto que falta por ser investigado.

A pesar de los alentadores resultados obtenidos, aún quedan muchos aspectos por ser investigados en relación al efecto de las TAPCells sobre la migración u otras funciones de los LT. El principal de ellos es la confirmación de nuestros resultados *in vivo* mediante la realización de ensayos de "homing" en modelo murino, para corroborar que la migración de los LT inducida por las TAPCells permita su llegada al tumor en un contexto fisiológico. Otro aspecto que se debe abordar es la utilización de DCs maduras con otros tipos de antígenos o estímulos para la activación de los LT, con el objetivo de analizar la especificidad de la inducción del repertorio de receptores estudiados en este trabajo, en los LT estimulados mediante TAPCells. Por otro lado, aún quedan una serie de preguntas por contestar, surgidas desde los resultados obtenidos en este trabajo, entre las que podemos mencionar el por qué los aumentos de CCR4 y CXCR4 se dan solo en un tipo de población de linfocitos T, el cómo podría estar afectando el aumento de LFA-1 en ciertos procesos de los linfocitos como la

citotoxicidad mediada por LT CD8<sup>+</sup>, o qué procesos celulares estarían siendo afectados por las TAPCells para provocar el aumento en la motilidad de los linfocitos T.

En resumen, nuestros resultados muestran que las TAPCells son capaces de inducir un fenotipo adecuado en los LT para su migración hacia el sitio tumoral, contribuyendo a un mejor entendimiento del rol de las TAPCells en la estimulación e inducción de la respuesta antitumoral mediada por linfocitos T, dando bases para el mejoramiento de la inmunoterapia basada en estas células dendríticas.

## CONCLUSIONES

A partir del estudio realizado en este trabajo, observamos que las TAPCells son capaces de activar LT alogénicos eficientemente, lo que se vio reflejado en un aumento en la expresión de las moléculas CD69 y CD25 con respecto al control negativo. Además, evidenciamos que las TAPCells inducen la expresión de receptores de quimioquinas importantes en la migración a piel y hacia el sitio tumoral, obteniendo un incremento en los niveles de CCR4 en LT CD8<sup>+</sup>, CXCR4 en LT CD4<sup>+</sup> y de CXCR3 en ambas poblaciones de LT, al comparar tanto con el control negativo de activación como con los LT policlonalmente activados. En paralelo, al analizar la expresión de moléculas de adhesión en los LT estimulados por TAPCells, observamos un aumento en la integrina CD11a, subunidad de LFA-1, al compararlos con ambos controles utilizados. Por último, la capacidad migratoria de los LT activados por TAPCells fue demostrada *in vitro*, observándose un aumento en la motilidad de las células debido a su estimulación por las DCs y una inducción de la migración en presencia de las quimioquinas CXCL10 y CXCL12, ligando de los receptores CXCR3 y CXCR4, respectivamente.

Considerando los resultados obtenidos en este trabajo, confirmamos que las TAPCells son capaces de inducir en los LT un fenotipo adecuado que les permita migrar hacia el sitio tumoral, comprobando lo que planteamos inicialmente en nuestra hipótesis. Sin embargo, aún falta por dilucidar si este fenotipo es inducido específicamente por las TAPCells y no por DCs maduras con otro tipo de antígenos y/o estímulos. Por otra parte, también logramos observar la inducción de la migración *in vitro* de los LT estimulados por TAPCells al utilizar las quimioquinas ligando de los receptores analizados, resultado que ahora debe ser comprobado mediante los experimentos *in vivo* respectivos.

## BIBLIOGRAFÍA

1. Abbasi, N. R., Shaw, H. M., Rigel, D. S., Friedman, R. J., McCarthy, W. H., Osman, I., & Polsky, D. 2004. Early diagnosis of cutaneous melanoma: revisiting the ABCD criteria. *Jama*. **292**: 2771-2776.
2. Abrams, H. L., Spiro, R., & Goldstein, N. 1950. Metastases in carcinoma. Analysis of 1000 autopsied cases. *Cancer*. **3**: 74-85.
3. Ahmed, R., & Gray, D. 1996. Immunological memory and protective immunity: understanding their relation. *Science*. **272**: 54-60.
4. Akira, S., Takeda, K., & Kaisho, T. 2001. Toll-like receptors: critical proteins linking innate and acquired immunity. *Nature immunology*. **2**: 675-680.
5. Alonso, F. 2011. Epidemiología del Melanoma Cutáneo en Chile. *Rev. Med. Clin. Condes*. **22**: 459-465.
6. Banaszynski, M., & Kolesar, J. M. 2013. Vemurafenib and ipilimumab: New agents for metastatic melanoma. *American Journal of Health-System Pharmacy*. **70**: 1205-1210.
7. Banchereau, J., Briere, F., Caux, C., Davoust, J., Lebecque, S., Liu, Y. J., & Palucka, K. 2000. Immunobiology of dendritic cells. *Annual review of immunology*. **18**: 767-811.
8. Banchereau, J., & Steinman, R. M. 1998. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature*. **392**: 245-252.
9. Barth Jr, R. J., Mulé, J. J., Asher, A. L., Sanda, M. G., & Rosenberg, S. A. 1991. Identification of unique murine tumor associated antigens by tumor infiltrating lymphocytes using tumor specific secretion of interferon- $\gamma$  and tumor necrosis factor. *Journal of immunological methods*. **140**: 269-279.
10. Bierer, B. E., & Burakoff, S. J. 1988. T cell adhesion molecules. *The FASEB journal*. **2**: 2584-2590.
11. Blanco, P., Palucka, A. K., Pascual, V., & Banchereau, J. 2008. Dendritic cells and cytokines in human inflammatory and autoimmune diseases. *Cytokine & growth factor reviews*. **19**: 41-52.
12. Bromley, S. K., Mempel, T. R., & Luster, A. D. 2008. Orchestrating the orchestrators: chemokines in control of T cell traffic. *Nature immunology*. **9**: 970-980.
13. Cann, S. H., Van Netten, J. P., & Van Netten, C. 2003. Dr William Coley and tumour regression: a place in history or in the future. *Postgraduate medical journal*. **79**: 672-680.
14. Caruso, A., Licenziati, S., Corulli, M., Canaris, A. D., De Francesco, M. A., Fiorentini, S., & Turano, A. 1997. Flow cytometric analysis of activation markers on stimulated T cells and their correlation with cell proliferation. *Cytometry*. **27**: 71-76.
15. Chapman, P. B., Hauschild, A., Robert, C., Haanen, J. B., Ascierto, P., Larkin, J., & McArthur, G. A. 2011. Improved survival with vemurafenib in melanoma with BRAF V600E mutation. *New England Journal of Medicine*. **364**: 2507-2516.
16. Charo, I. F., & Ransohoff, R. M. 2006. The many roles of chemokines and chemokine receptors in inflammation. *New England Journal of Medicine*. **354**: 610-621.
17. Diepgen, T. L., & Mahler, V. 2002. The epidemiology of skin cancer. *British Journal of Dermatology*. **146**: 1-6.



18. Dudda, J. C., Lembo, A., Bachtanian, E., Huehn, J., Siewert, C., Hamann, A., & Martin, S. F. 2005. Dendritic cells govern induction and reprogramming of polarized tissue-selective homing receptor patterns of T cells: important roles for soluble factors and tissue microenvironments. *European journal of immunology*. **35**: 1056-1065.
19. Dunn, G. P., Bruce, A. T., Ikeda, H., Old, L. J., & Schreiber, R. D. 2002. Cancer immunoediting: from immunosurveillance to tumor escape. *Nature immunology*. **3**: 991-998.
20. Dunn, G. P., Old, L. J., & Schreiber, R. D. 2004. The three Es of cancer immunoediting. *Annu. Rev. Immunol.* **22**: 329-360.
21. Durán-Aniotz, C., Segal, G., Salazar, L., Pereda, C., Falcón, C., Tempio, F., & López, M. N. 2013. The immunological response and post-treatment survival of DC-vaccinated melanoma patients are associated with increased Th1/Th17 and reduced Th3 cytokine responses. *Cancer Immunology, Immunotherapy*. **62**: 761-772.
22. Dustin, M. L., & Springer, T. A. 1988. Lymphocyte function-associated antigen-1 (LFA-1) interaction with intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) is one of at least three mechanisms for lymphocyte adhesion to cultured endothelial cells. *The Journal of cell biology*. **107**: 321-331.
23. Erdei, E., & Torres, S. M. 2010. A new understanding in the epidemiology of melanoma. *Expert Rev Anticancer Ther.* **10**: 1811-1823.
24. Figdor, C. G., de Vries, I. J. M., Lesterhuis, W. J., & Melief, C. J. 2004. Dendritic cell immunotherapy: mapping the way. *Nature medicine*. **10**: 475-480.
25. Förster, R., Davalos-Misslitz, A. C., & Rot, A. 2008. CCR7 and its ligands: balancing immunity and tolerance. *Nature Reviews Immunology*. **8**: 362-371.
26. Friedman, R. J., Rigel, D. S., & Kopf, A. W. 1985. Early detection of malignant melanoma: The role of physician examination and self-examination of the skin. *CA: a cancer journal for clinicians*. **35**: 130-151.
27. Garbe, C., Peris, K., Hauschild, A., Saiag, P., Middleton, M., Spatz, A., & Eggermont, A. M. 2012. Diagnosis and treatment of melanoma. European consensus-based interdisciplinary guideline—update 2012. *European journal of cancer*. **48**: 2375-2390.
28. Gardel, M. L., Schneider, I. C., Aratyn-Schaus, Y., & Waterman, C. M. 2010. Mechanical integration of actin and adhesion dynamics in cell migration. *Annual review of cell and developmental biology*. **26**: 315-333.
29. Garmendia, M. L., Ruiz, P., & Uauy, R. 2013. Obesity and cancer in Chile: estimation of population attributable fractions. *Revista médica de Chile*. **141**: 987-994.
30. Gilboa, E. 2007. DC-based cancer vaccines. *Journal of Clinical Investigation*. **117**: 1195-1203.
31. Gray-Schopfer, V., Wellbrock, C., & Marais, R. 2007. Melanoma biology and new targeted therapy. *Nature*. **445**: 851-857.
32. Griffith, J. W., Sokol, C. L., & Luster, A. D. 2014. Chemokines and Chemokine Receptors: Positioning Cells for Host Defense and Immunity. *Annual review of immunology*. **32**: 659-702.
33. Grivnenkov, S. I., Greten, F. R., & Karin, M. 2010. Immunity, inflammation, and cancer. *Cell*. **140**: 883-899.
34. Gross, L. 1943. Intradermal immunization of C3H mice against a sarcoma that originated in an animal of the same line. *Cancer Research*. **3**: 326-333.

35. Hamann, A., & Syrbe, U. 2000. T-cell trafficking into sites of inflammation. *Rheumatology*. **39**: 696-699.
36. Hanahan, D., & Weinberg, R. A. 2011. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*. **144**: 646-674.
37. Hodi, F. S., O'Day, S. J., McDermott, D. F., Weber, R. W., Sosman, J. A., Haanen, J. B., & Urba, W. J. 2010. Improved survival with ipilimumab in patients with metastatic melanoma. *New England Journal of Medicine*. **363**: 711-723.
38. Hori, S., Nomura, T., & Sakaguchi, S. 2003. Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. *Science*. **299**: 1057-1061.
39. Hsu, M. Y., Meier, F., & Herlyn, M. 2002. Melanoma development and progression: a conspiracy between tumor and host. *Differentiation*. **70**: 522-536.
40. Hugues, S., Fetler, L., Bonifaz, L., Helft, J., Amblard, F., & Amigorena, S. 2004. Distinct T cell dynamics in lymph nodes during the induction of tolerance and immunity. *Nature immunology*. **5**: 1235-1242.
41. Hung, K., Hayashi, R., Lafond-Walker, A., Lowenstein, C., Pardoll, D., & Levitsky, H. 1998. The central role of CD4<sup>+</sup> T cells in the antitumor immune response. *The Journal of experimental medicine*. **188**: 2357-2368.
42. Janeway Jr, C. A., & Medzhitov, R. 2002. Innate immune recognition. *Annual review of immunology*. **20**: 197-216.
43. June, C. H. 2007. Principles of adoptive T cell cancer therapy. *Journal of Clinical Investigation*. **117**: 1204-1212.
44. Kadowaki, N., Ho, S., Antonenko, S., de Waal Malefyt, R., Kastelein, R. A., Bazan, F., & Liu, Y. J. 2001. Subsets of human dendritic cell precursors express different toll-like receptors and respond to different microbial antigens. *The Journal of experimental medicine*. **194**: 863-870.
45. Lanzavecchia, A., & Sallusto, F. 2001. Regulation of T cell immunity by dendritic cells. *Cell*. **106**: 263-266.
46. Luckheeram, R., Zhou, R., Verma, A., & Xia, B., 2012. CD4<sup>+</sup>T Cells: Differentiation and Functions. *Clinical and Developmental Immunology*. **2012**: 1-12.
47. Luster, A. D. 1998. Chemokines—chemotactic cytokines that mediate inflammation. *New England Journal of Medicine*. **338**: 436-445.
48. Luster, A. D., & Leder, P. 1993. IP-10, a -C-X-C- Chemokine, Elicits a Potent Thymus-dependent Antitumor Response In Vivo. *J. Exp. Med.* **178**: 1057-1065.
49. Luther, S. A., Bidgol, A., Hargreaves, D. C., Schmidt, A., Xu, Y., Paniyadi, J., & Cyster, J. G. 2002. Differing activities of homeostatic chemokines CCL19, CCL21, and CXCL12 in lymphocyte and dendritic cell recruitment and lymphoid neogenesis. *The Journal of Immunology*. **169**: 424-433.
50. Maino, V. C., Suni, M. A., & Ruitenberg, J. J. 1995. Rapid flow cytometric method for measuring lymphocyte subset activation. *Cytometry*. **20**: 127-133.
51. Marelli-Berg, F. M., Cannella, L., Dazzi, F., & Mirenda, V. 2008. The highway code of T cell trafficking. *The Journal of pathology*. **214**: 179-189.
52. Marlin, S. D., & Springer, T. A. 1987. Purified intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) is a ligand for lymphocyte function-associated antigen 1 (LFA-1). *Cell*. **51**: 813-819.
53. Medzhitov, R., & Janeway, C. A. 1997. Innate immunity: the virtues of a nonclonal system of recognition. *Cell*. **91**: 295-298.
54. Mellman, I., Coukos, G., & Dranoff, G. 2011. Cancer immunotherapy comes of age. *Nature*. **480**: 480-489.

55. Miller, M. J., Safrina, O., Parker, I., & Cahalan, M. D. 2004. Imaging the single cell dynamics of CD4<sup>+</sup> T cell activation by dendritic cells in lymph nodes. *The Journal of experimental medicine*. **200**: 847-856.
56. Mora, J. R., Bono, M. R., Manjunath, N., Weninger, W., Cavanagh, L. L., Roseblatt, M., & von Andrian, U. H. 2003. Selective imprinting of gut-homing T cells by Peyer's patch dendritic cells. *Nature*. **424**: 88-93.
57. Mora, J. R., & von Andrian, U. H. 2006. T-cell homing specificity and plasticity: new concepts and future challenges. *Trends in immunology*. **27**: 235-243.
58. Morgan-Parkes, J. H. 1995. Metastases: mechanisms, pathways, and cascades. *AJR. American journal of roentgenology*. **164**: 1075-1082.
59. Mosmann, T. R., Li, L., & Sad, S. 1997. Functions of CD8 T-cell subsets secreting different cytokine patterns. In *Seminars in immunology*. **9**: 87-92.
60. Mullins, I. M., Slingluff, C. L., Lee, J. K., Garbee, C. F., Shu, J., Anderson, S. G., & Mullins, D. W. 2004. CXC chemokine receptor 3 expression by activated CD8<sup>+</sup> T cells is associated with survival in melanoma patients with stage III disease. *Cancer research*. **64**: 7697-7701.
61. Nickoloff, B. J., & Turka, L. A. 1994. Immunological functions of non-professional antigen-presenting cells: new insights from studies of T-cell interactions with keratinocytes. *Immunology today*. **15**: 464-469.
62. Ochsenbein, A. F. 2002. Principles of tumor immunosurveillance and implications for immunotherapy. *Cancer gene therapy*. **9**: 1043-1055.
63. Orimo, A., & Weinberg, R. A. 2006. Stromal fibroblasts in cancer: a novel tumor-promoting cell type. *Cell cycle*. **5**: 1597-1601.
64. Palucka, K., & Banchereau, J. 1999. Dendritic cells: a link between innate and adaptive immunity. *Journal of clinical immunology*. **19**: 12-25.
65. Palucka, K., & Banchereau, J. 2012. Cancer immunotherapy via dendritic cells. *Nature Reviews Cancer*. **12**: 265-277.
66. Randolph, G. J. 2001. Dendritic cell migration to lymph nodes: cytokines, chemokines, and lipid mediators. *Seminars in immunology*. **13**: 267-274.
67. Rea, I. M., McNerlan, S. E., & Alexander, H. D. 1999. CD69, CD25, and HLA-DR activation antigen expression on CD3<sup>+</sup> lymphocytes and relationship to serum TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , and sIL-2R levels in aging. *Experimental gerontology*. **34**: 79-93.
68. Restifo, N. P., Dudley, M. E., & Rosenberg, S. A. 2012. Adoptive immunotherapy for cancer: harnessing the T cell response. *Nature Reviews Immunology*. **12**: 269-281.
69. Rosenberg, S. A., Restifo, N. P., Yang, J. C., Morgan, R. A., & Dudley, M. E. 2008. Adoptive cell transfer: a clinical path to effective cancer immunotherapy. *Nature Reviews Cancer*. **8**: 299-308.
70. Rottner, K., & Stradal, T. E. 2011. Actin dynamics and turnover in cell motility. *Current opinion in cell biology*. **23**: 569-578.
71. Salazar-Onfray, F., Pereda, C., Reyes, D., & López, M. N. 2013. TAPCells, the Chilean dendritic cell vaccine against melanoma and prostate cancer. *Biological research*. **46**: 431-440.
72. Sallusto, F., & Baggiolini, M. 2008. Chemokines and leukocyte traffic. *Nature immunology*. **9**: 949-952.
73. Sosman, J. A., Kim, K. B., Schuchter, L., Gonzalez, R., Pavlick, A. C., Weber, J. S., & Ribas, A. 2012. Survival in BRAF V600-mutant advanced melanoma treated with vemurafenib. *New England Journal of Medicine*. **366**: 707-714.

74. Southam, C. M., Brunschwig, A., Levin, A. G., & Dizon, Q. S. 1966. Effect of leukocytes on transplantability of human cancer. *Cancer*. **19**: 1743-1753.
75. Springer, T. A., Dustin, M. L., Kishimoto, T. K., & Marlin, S. D. 1987. The lymphocyte function associated LFA-1, CD2, and LFA-3 molecules: cell adhesion receptors of the immune system. *Annual review of immunology*. **5**: 223-252.
76. Takeuchi, O., & Akira, S. 2010. Pattern recognition receptors and inflammation. *Cell*. **140**: 805-820.
77. Thomas, R., & Lipsky, P. E. 1996. Dendritic cells: origin and differentiation. *Stem Cells*. **14**: 196-206.
78. Toes, R. E., Ossendorp, F., Oeffringa, R., & Melief, C. J. 1999. CD4 T cells and their role in antitumor immune responses. *The Journal of experimental medicine*. **189**: 753-756.
79. Valastyan, S., & Weinberg, R. A. 2011. Tumor metastasis: molecular insights and evolving paradigms. *Cell*. **147**: 275-292.
80. Topalian, S. L., Solomon, D. I. A. N. E., & Rosenberg, S. A. 1989. Tumor-specific cytolysis by lymphocytes infiltrating human melanomas. *The Journal of Immunology*. **142**: 3714-3725.
81. Van den Eertwegh, A. J., Versluis, J., van den Berg, H. P., Santegoets, S. J., van Moorselaar, R. J. A., van der Sluis, T. M., & Gerritsen, W. R. 2012. Combined immunotherapy with granulocyte-macrophage colony-stimulating factor-transduced allogeneic prostate cancer cells and ipilimumab in patients with metastatic castration-resistant prostate cancer: a phase 1 dose-escalation trial. *The lancet oncology*. **13**: 509-517.
82. Yu, P., & Fu, Y. X. 2006. Tumor-infiltrating T lymphocytes: friends or foes?. *Laboratory investigation*. **86**: 231-245.
83. Zhu, J., & Paul, W. E. 2008. CD4 T cells: fates, functions, and faults. *Blood*. **112**: 1557-1569.
84. Zinkernagel, R. M., Bachmann, M. F., Kündig, T. M., Oehen, S., Pirchet, H., & Hengartner, H. 1996. On immunological memory. *Annual review of immunology*. **14**: 333-367.