



VCH-FC
Biotecnología
F 634
C 01

UNIVERSIDAD DE CHILE - FACULTAD DE CIENCIAS - ESCUELA DE PREGRADO

“LOS LINFOCITOS T_c17 DAN ORIGEN A LINFOCITOS T CITOTÓXICOS ANTITUMORALES”

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

Felipe Matías Flores Santibáñez

Director del Seminario de Título:

Dr. Mario Roseblatt

Co-Directora del seminario de Título:

Dra. Daniela Sauma

Junio 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. Felipe Flores Santibáñez**

“Los linfocitos Tc17 dan origen a linfocitos T citotóxicos antitumorales”

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

Dr. Mario Roseblatt S.
Director Seminario de Título

Firma manuscrita en azul del Dr. Mario Roseblatt S. sobre una línea horizontal.

Dra. Daniela Sauma M.
Co-directora Seminario de Título

Firma manuscrita en azul de Dra. Daniela Sauma M. sobre una línea horizontal.

Comisión Revisora y Evaluadora

Dra. María Rosa Bono M.
Presidente Comisión

Firma manuscrita en azul de Dra. María Rosa Bono M. sobre una línea horizontal.

Dr. Jorge Martínez W.
Evaluador

Firma manuscrita en azul de Dr. Jorge Martínez W. sobre una línea horizontal.

Santiago de Chile,de Junio de 2015.

Biografía



Nací un 11 de diciembre, en Talcahuano, VIII Región, Chile. Cuando tenía un mes de vida, mis padres se mudaron a la capital. A medida que fui descubriendo el mundo, fue despertando en mí la curiosidad por mi entorno. Inspeccionar hormigas bajo la lupa, mirar programas como “*El Laboratorio de Dexter*” o “*El Profesor Rosa*” eran parte de mis entretenimientos de niño. Sin embargo, no fue hasta mi enseñanza media en el Liceo de Aplicación, que descubrí mi interés por la ciencia, en particular por la Biología y la complejidad de los seres vivos, motivado por mi estimada profesora de Biología Mónica Mardones. A los 17 años de edad, decidí entrar a la Universidad de Chile a estudiar Ingeniería en Biotecnología Molecular. Durante mis años en la Universidad, me maravillé con distintos cursos que alimentaron mi sed de conocimientos. Aprendí sobre los fotosistemas, los cnidarios, la glicólisis, el ciclo de Krebs e incluso a programar un Arduino. Entre todo este aprendizaje un tanto caótico, apareció la inmunología. La Dra. María Rosa Bono imprimió en mí un gran interés por esta área particular de la Biomedicina y sus impactos en la salud humana. Decidido a realizar mi tesis en este tópico, le pedí que me aceptara en su laboratorio y fue así como inicié mi carrera en la investigación. Durante este seminario de título he participado de diversas actividades tales como seminarios, cursos y congresos que me han permitido aprender y compartir experiencias con diversos grupos de investigación tanto a nivel nacional como internacional. Todas estas experiencias han contribuido a que mi interés por la ciencia siga vigente.

“Equipado con sus cinco sentidos, el hombre explora el universo a su alrededor, y a esta aventura la llama ciencia”. Edwin Hubble

*A mis padres, Tito y Gaby
por convertirme en un soñador...*

Agradecimientos

En primer lugar agradezco a mis tutores Daniela, María Rosa y Mario por guiarme en este camino, por creer en mí, y por motivarme y darme las herramientas para iniciar mi carrera como investigador. En especial a Daniela Sauma, por la paciencia, la disposición, las palabras de aliento y las incontables sesiones de discusión que dieron forma a este trabajo. También agradezco a mi comisión evaluadora por los aportes que permitieron mejorar el presente manuscrito.

Sin duda tengo mucho que agradecer a mi Familia. En primer lugar, agradecerles a mis padres Tito y Gaby, por el amor y apoyo incondicional que me han brindado constantemente. A mi madre le agradezco por enseñarme que los límites se los fija uno, y que con disciplina y decisión es posible alcanzar las metas. A mi padre, por enseñarme a soñar y a jugármela por mis sueños, por enseñarme a disfrutar y reír con cada momento. Les agradezco también a mis hermanos, Catalina y Pablo; y a los peques de la casa, el Vicentito y la Feñita porque sin sus alborotos nuestra casa sería demasiado aburrida.

A Víctor le agradezco por caminar junto a mí estos últimos años. Por apoyarme y entregarme cariño en el día a día. Por apañarme con mis locuras y aguantarme en mis días malos, y principalmente por hacerme feliz en tantos momentos.

Debo agradecer también a la Facultad de Ciencias de la Universidad de Chile, porque en su casa de estudios fue donde conocí a dos grandes personas que hasta el día de hoy me acompañan. Mis grandes amigos Conny y Pancho. A ustedes les debo las mayores alegrías de mi pasada por la Universidad. Innumerables recuerdos y momentos juntos que nunca olvidaré.

Agradezco también al Inmunolab, esa gran familia que me acogió durante estos años y que ocupó gran parte de mis días. Al "compañero aplicacionista" Leo, por siempre estar dispuesto a ayudar, por la buena onda y la alegría. A Juan José, por la paciencia y por todo lo enseñado en mis inicios en el lab. A la Domy, mi partner en el mesón, cuantas madrugadas y tardes-noches pasamos en el citómetro! A la Gaby por siempre estar dispuesta a escuchar mis millones de dudas. A la Vale y a la Naty por la buena energía. A la Coté por las conversaciones de tarde en la oficina de los "pregrado". A la Cami, Yessia y Sarah por las discusiones al final de las reuniones. A la Pame por su compromiso y buena disposición siempre. Y a Zoila por cuidar de nuestros queridos ratoncitos.

Finalmente quisiera agradecer a las instituciones que financiaron este trabajo: CONICYT (PFB-16), y FONDECYT (11121478 y 1100557).

Índice

Biografía.....	ii
Agradecimientos	iii
Índice	vi
Índice de figuras.....	viii
Lista de abreviaturas.....	ix
1. Resumen	1
2. Abstract	3
3. Introducción	5
3.1 Inmunidad anti-tumoral	5
3.2 Linfocitos infiltrantes del tumor y el balance entre células efectoras y reguladoras	6
3.3 Subtipos de linfocitos T CD4+	10
3.4 Subtipos de linfocitos T CD8+	11
3.5 Linfocitos Th17 y el cáncer.....	12
3.6 Linfocitos Tc17 y el cáncer.....	14
4. Hipótesis.....	18
5. Objetivos.....	18
5.1 Objetivo general.....	18
5.2 Objetivos específicos	18
6. Materiales y métodos	19
6.1 Materiales	19
6.1.1 Anticuerpos.....	19
6.1.2 Ratones	19
6.1.3 Líneas celulares y modelos tumorales	20
6.2 Métodos	21
6.2.1 Aislamiento de células de bazo, linfonodos y tumor	21
6.2.2 Generación de células Tc1 y Tc17 <i>in vitro</i>	22
6.2.3 Evaluación de moléculas de superficie por citometría de flujo.....	24
6.2.4 Evaluación de células productoras de citoquinas por citometría de flujo	24
6.2.5 Evaluación de marcadores funcionales de citotoxicidad por citometría de flujo	25

6.2.6	Cuantificación de la producción de citoquinas.....	26
6.2.7	<i>Cell Sorting</i>	27
6.2.8	Ensayo de citotoxicidad <i>in vitro</i>	27
6.2.9	Ensayo de inmunosupresión <i>in vitro</i>	28
6.2.10	Transferencia adoptiva de células Tc1 y Tc17	29
6.2.11	Análisis estadístico	30
7.	Resultados.....	31
7.1	Las células Tc17 endógenas no poseen marcadores de citotoxicidad y expresan altos niveles de la ectonucleotidasa CD73	31
7.2	Células Tc17 generadas <i>in vitro</i> no son citotóxicas y expresan altos niveles de CD73	35
7.3	Las células Tc17 generadas <i>in vitro</i> no tienen capacidad inmunosupresora .	40
7.4	Células Tc17 antígeno-específicas poseen actividad anti-tumoral contra un tumor establecido	44
7.5	En el microambiente tumoral las células Tc17 dan origen a células tipo Tc1 IFN- γ +GzmB ⁺ y retienen la expresión de CD73	45
8.	Discusión	48
9.	Resumen de resultados	55
10.	Conclusiones	57
11.	Bibliografía.....	58

Índice de figuras

Figura 1. Presencia de células Tc17 endógenas en ratones sanos y con tumor.....	32
Figura 2. Las células Tc17 endógenas no expresan granzima B.....	33
Figura 3. Las células Tc17 endógenas expresan las ectonucleotidasas CD39 y CD73.....	34
Figura 4. Generación de células Tc1 y Tc17 <i>in vitro</i>	35
Figura 5. Producción de citoquinas por células Tc1 y Tc17 generadas <i>in vitro</i>	36
Figura 6. Caracterización de células Tc1 y Tc17 generadas <i>in vitro</i>	38
Figura 7. Las células Tc17 generadas <i>in vitro</i> no son citotóxicas	39
Figura 8. Las células Tc17 generadas <i>in vitro</i> retrasan la proliferación de linfocitos T CD4+ en forma contacto-dependiente.....	41
Figura 9. La expresión de CD73 no les confiere capacidad inmunosupresora a las células Tc17.....	42
Figura 10. Las células Tc17 generadas <i>in vitro</i> retrasan la proliferación de linfocitos T CD4+ por competencia	43
Figura 11. Las células Tc17 poseen capacidad anti-tumoral contra un tumor establecido	44
Figura 12. Las células Tc17 dan origen a células tipo Tc1 IFN- γ + grzmB+ en el tumor	46
Figura 13. Las células Tc17 retienen la expresión de CD73 <i>in vivo</i>	47

Lista de abreviaturas

ADP:	Difosfato de adenosina
AMP:	Monofosfato de adenosina
anV:	Anexina V
ANOVA:	<i>Analysis of variance</i>
ATP:	Trifosfato de adenosina
CBA:	<i>Cytometric Bead Array</i>
CCL:	Ligando de quimioquina C-C
CCR:	Receptor de quimioquina C-C
CD:	<i>Cluster of Differentiation</i>
CTL:	Linfocito T Citotóxico (<i>Cytotoxic T Lymphocyte</i>)
CTLA4:	<i>Cytotoxic T Lymphocyte Associated protein 4</i>
DCs:	Células dendríticas (<i>Dendritic Cells</i>)
EAE:	Encefalomiелitis Autoimmune Experimental
ELISA:	<i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i>
FDA:	<i>Food and Drug Administration</i>
FMO:	Fluorescencia menos uno
Foxp3:	<i>Forkhead box P3</i>
GM-CSF:	<i>Granulocyte and Monocyte Colony Stimulating Factor</i>
gzmB:	Granzima B
HBSS:	<i>Hank's Balanced Salt Solution</i>
IDO:	Indoleamín 2,3-dioxigenasa
IFN:	Interferón
IL:	Interleuquina
IMDM:	<i>Iscove's Modified Dulbecco's Media</i>
LAG3:	<i>Lymphocyte activation gene 3</i>
MDSC:	Células mieloides supresoras (<i>Myeloid Derived Supressor Cell</i>)
MFI:	Intensidad Media de Fluorescencia (<i>Mean Fluorescence Intensity</i>)
MHC:	Complejo Principal de Histocompatibilidad (<i>Major Histocompatibility Complex</i>)
NK:	Asesinas naturales (<i>Natural Killer</i>)

ns: no significativo
OVA: Ovoalbúmina
PBS: *Phosphate Buffered Saline*
PD-1: *Programmed cell Death 1*
PD-L: *Programmed Death Ligand*
PI: Yoduro de Propidio (*Propidium Iodide*)
PLN: Linfonodo periférico (*Peripheral Lymph Node*)
PMA: *Phorbol 12-Myristate 13-Acetate*
ROR γ : *RAR related Orphan Receptor gamma*
RPMI: *Roswell Park Memorial Institute medium*
SEM: Error estándar de la media (*Standard Error of the Mean*)
SFB: Suero Fetal Bovino
STAT3: *Signal Transducer and Activator of Transcription 3*
Tc: T citotóxicos (*T cytotoxic*)
TCR: Receptor de Células T (*T Cell Receptor*)
TdLN: Linfonodo drenante del tumor (*Tumor Draining Lymph Node*)
TGF: *Transforming Growth Factor*
Th: T cooperador (*T helper*)
TILs: Linfocitos infiltrados al tumor (*Tumor Infiltrating Lymphocytes*)
TNF: *Tumor Necrosis Factor*
Treg: T regulador
VEGF: *Vascular Endothelial Growth Factor*

1. Resumen

El rol de los linfocitos T CD8+ productores de IL-17 (células Tc17) en la inmunidad tumoral es controversial. Por una parte, la troncalidad de las células T del linaje 17 en cuanto a su capacidad de autorenovarse y de dar origen a células efectoras productoras de interferón gama (IFN- γ), sugiere que las células Tc17 cumplirían un papel en la respuesta inmune anti-tumoral. Sin embargo, existe evidencia que los linfocitos Tc17, debido a su naturaleza pro-inflamatoria, favorecerían la carcinogénesis y el desarrollo tumoral al promover la angiogénesis y el reclutamiento de células inmunosupresoras al microambiente tumoral. Para definir el papel de las células Tc17 en la inmunidad tumoral, en este seminario se analizó la presencia y el fenotipo de las células Tc17 en un modelo murino de melanoma. Además se generaron células Tc17 *in vitro* y se evaluó la capacidad antitumoral de estas células en experimentos de transferencia adoptiva. Los resultados obtenidos indican que las células Tc17 generadas *in vitro* no expresan el marcador de citotoxicidad granzima B (gzmB) y muestran limitada capacidad citotóxica contra células de melanoma. Sin embargo, la transferencia adoptiva de células Tc17 antígeno-específicas a ratones con tumor resultó en la desaceleración del crecimiento tumoral, aunque con menor eficiencia en comparación a la transferencia de linfocitos T CD8+ productores de IFN- γ (células Tc1). Además, luego de la transferencia adoptiva se observó que en el tumor alrededor de un 60% de las células Tc17 transferidas se convierten a células tipo Tc1 IFN- γ + gzmB⁺, evidenciando el potencial antitumoral de estas células. En la misma línea, se observó que las células Tc17 producen IL-2 y conservan un patrón de migración típico de células T de memoria. Por otra parte, las células Tc17 muestran una alta expresión de las ectonucleotidasas CD39 y CD73, enzimas que se han relacionado con la capacidad de inhibir la respuesta inmune

antitumoral mediante la generación de adenosina extracelular. A pesar de esto, los linfocitos Tc17 generados *in vitro* no suprimen la proliferación de linfocitos CD4+ *in vitro* en una forma dependiente de CD39, CD73 o mediante la generación de adenosina extracelular. En conclusión, las células Tc17 muestran menor capacidad anti-tumoral que las células Tc1, sin embargo son capaces de persistir en los órganos linfoides, de autorenovarse, y de dar origen a células efectoras tipo Tc1 con propiedades anti-tumorales, todas características de células T troncales. Estos resultados abren nuevos horizontes para la explotación de estas características en el diseño de inmunoterapias anti-tumorales más efectivas.

2. Abstract

The role of IL-17-producing CD8⁺ T lymphocytes (Tc17 cells) in tumor immunity is still controversial. In one hand, the stemness observed in type 17 T cells in regard of their capacity to self-renew and give rise to effector interferon gamma (IFN- γ)-producing cells supports the idea that Tc17 cells could be playing a role in the anti-tumor immune response. However, there is evidence showing that Tc17 lymphocytes, owing to their pro-inflammatory nature, could favor carcinogenesis and tumor development by promoting angiogenesis and the recruitment of immunosuppressive cells to the tumor microenvironment. To define the role of Tc17 cells in tumor immunity, in this work we analyzed the presence and phenotype of Tc17 cells in a murine model of melanoma. In addition we generated Tc17 cells *in vitro* and evaluated the anti-tumoral capacity of these cells in adoptive transfer experiments. The results indicate that *in vitro* generated Tc17 cells show null expression of granzyme B (gzmB) and are poorly cytotoxic against melanoma cells. However, adoptive transfer of antigen-specific Tc17 cells into tumor-bearing mice resulted in a decrease in tumor growth, albeit with less efficiency compared to IFN- γ -producing CD8⁺ T lymphocytes (Tc1 cells). Moreover, after adoptive transfer we observed that near 60% of transferred Tc17 cells converted into Tc1-like IFN- γ ⁺ gzmB⁺ cells in the tumor, evidencing an anti-tumor potential. In the same line, Tc17 cells were able to secrete IL-2, and retained a migration pattern typical of memory T cells. On the other hand, Tc17 cells showed a high expression of CD39 and CD73 ectonucleotidases, both enzymes previously related to the inhibition of the anti-tumor immune response by the generation of extracellular adenosine. In spite of this, *in vitro* generated Tc17 cells did not suppress the proliferation of CD4⁺ lymphocytes in a CD39 or CD73-dependent manner or by the generation of extracellular adenosine. In conclusion, Tc17 cells show

lower anti-tumor capacity than Tc1 cells, however are able to persist in lymphoid organs, self-renew and give rise to anti-tumor Tc1-like effector cells, all features of stem-like T cells. These results open new horizons for the exploitation of these features in the design of more effective anti-cancer immunotherapies.

3. Introducción

3.1 Inmunidad anti-tumoral

Durante el desarrollo de un tumor las células tumorales deben adquirir progresivamente diversas características que les permitirán sobrevivir, proliferar e invadir nuevos tejidos (Hanahan y Weinberg, 2000, 2011). En este sentido, numerosos estudios desarrollados en las últimas décadas aportan evidencia científica que destaca entre estas características la capacidad de evadir la respuesta inmune anti-tumoral. Las primeras nociones de la existencia de una respuesta inmune anti-tumoral nacieron en los años 50' cuando Burnet y Thomas introdujeron por primera vez el concepto de inmunovigilancia (Burnet, 1957). Esta teoría establece que el sistema inmune patrulla constantemente en búsqueda células transformadas o malignas (tumorales), eliminándolas antes de la generación de un tumor clínicamente detectable. Aunque la mayor parte de las veces este mecanismo protege al organismo, el constante ataque ejercido por el sistema inmune sumado a la inestabilidad genómica de las células malignas dan origen a la selección de aquellas células capaces de escapar del control inmune anti-tumoral (inmunoedición). Esto da lugar al desarrollo de focos tumorales y a su establecimiento en el organismo hospedero aún cuando éste posea un sistema inmune competente (Dunn y col., 2002). Entre los mecanismos adquiridos por las células tumorales que les permiten eludir la respuesta inmune anti-tumoral se destacan la habilidad para evadir el reconocimiento (disminución de la expresión de moléculas del complejo de histocompatibilidad) y las moléculas efectoras del sistema inmune (expresión de proteínas anti-apoptóticas, deficiencia en señalización de apoptosis) (Rabinovich y col., 2007).

De esta forma, el sistema inmune colabora indirectamente para moldear la generación de células malignas capaces de escapar a su control, originando un evento neoplásico. Una vez que un tumor alcanza la escala macroscópica, aumenta su complejidad y desarrolla nuevos mecanismos que activamente mantienen a raya al sistema inmune. Entre ellos, es fundamental la mantención de un microambiente tumoral inmunosupresor que atenúe la respuesta inmune anti-tumoral. Para esto, las células tumorales expresan o secretan moléculas y citoquinas inmunomoduladoras tales como TGF- β , IL-10, IDO, PD-L y adenosina. Además, las células tumorales pueden modificar el microambiente de forma de favorecer el reclutamiento de células inmunosupresoras, tales como linfocitos T reguladores (Treg) y células mieloides supresoras, ambas capaces de interferir en la actividad anti-tumoral de linfocitos efectores T *helper*, T citotóxicos y *Natural Killer* (NK), desarmando la respuesta anti-tumoral (Rabinovich y col., 2007; Zou, 2006).

3.2 Linfocitos infiltrantes del tumor y el balance entre células efectoras y reguladoras

En distintos tipos de tumores se ha encontrado que una componente importante del microambiente tumoral son células del sistema inmune, particularmente linfocitos, los que son llamados linfocitos infiltrantes del tumor (TILs por *Tumor Infiltrating Lymphocytes*). Diversos reportes indican que la presencia de TILs se corelaciona positivamente con la sobrevida de pacientes con cáncer de colon, cáncer de mama, cáncer de ovarios, tumores gastrointestinales y melanoma, entre otros (Galon y col., 2006; Rusakiewicz y col., 2013; Zhang y col., 2003; Mahmoud y col., 2011; Azimi y col., 2012). Parte de estas células infiltradas corresponderían a linfocitos T efectores específicos contra antígenos tumorales que estarían continuamente controlando el

crecimiento tumoral. Los principales protagonistas en dicha respuesta anti-tumoral son los linfocitos T CD8+ citotóxicos tipo 1 (Tc1), las células NK y los linfocitos T CD4+ cooperadores tipo 1 (Th1 por *T helper 1*).

En cuanto a los mecanismos involucrados en la eliminación de las células tumorales, tanto linfocitos Tc1 como células NK poseen receptores que les permiten reconocer a las células transformadas y eliminarlas mediante la inducción de apoptosis. Los linfocitos Tc1 poseen receptores de células T (TCR por *T Cell Receptor*) que reconocen péptidos antigénicos presentados en moléculas del complejo principal de histocompatibilidad clase I (MHC-I por *Major Histocompatibility Complex class I*). Por otra parte, las células NK eliminan células blanco cuya expresión de moléculas MHC-I es reducida (Kärre K y col., 1986), fenómeno observado en células transformadas como mecanismo de escape a la respuesta anti-tumoral. Además tanto los linfocitos Tc1 como células NK expresan receptores NKG2D que reconocen diversos ligandos expresados bajo condiciones de estrés celular y altas tasas de proliferación, ambas características propias de las células tumorales (Smyth y col., 2005). Luego de la activación de sus receptores, estas células liberan gránulos cargados de granzimas y perforinas induciendo la vía de las caspasas y desencadenando la apoptosis en las células blanco (Trapani y Smyth, 2002).

Por otra parte linfocitos Tc1, células NK y principalmente linfocitos Th1 secretan interferón- γ (IFN- γ) cuyo rol es pivote en la respuesta anti-tumoral. Los linfocitos Th1 son un subtipo de linfocitos T CD4+ por tanto expresan un TCR que reconoce péptidos antigénicos en un contexto MHC clase II. Una vez activados, su principal función es la secreción de citoquinas, siendo IFN- γ la principal entre éstas. Esta citoquina es capaz de inducir directamente la expresión de moléculas MHC clase I y II, activar a macrófagos y

células dendríticas, aumentar la diferenciación de linfocitos T CD4+ a linfocitos Th1 y potenciar la respuesta citotóxica de linfocitos NK y Tc1 (Schroder y col., 2004).

Sin embargo, un tumor en desarrollo posee mecanismos que le permiten contrarrestar la respuesta inmune anti-tumoral. Dentro de estos mecanismos es esencial el reclutamiento de células supresoras de la respuesta inmune al microambiente tumoral, como son los linfocitos Treg y células mieloides supresoras (MDSC por *Myeloid Derived Suppressor Cell*). Los linfocitos Treg son un subtipo de linfocitos T CD4+ caracterizados por la expresión del factor transcripcional maestro Foxp3 y corresponden a los principales represores de la respuesta inmune. Estas células se ven incrementadas en pacientes con tumor y en modelos animales de cáncer, y numerosos estudios correlacionan la presencia de estas células con un mal pronóstico de la enfermedad (Griffiths y col., 2007; Perrone y col., 2008; Bates y col., 2006). Entre sus funciones se encuentran la inhibición de la activación, proliferación y función efectora de linfocitos T, linfocitos B, células NK, células dendríticas y macrófagos. Los mecanismos utilizados por estas células para reprimir la respuesta inmune se pueden clasificar en: (i) Secreción de citoquinas inhibitorias (TGF β 1, IL-10, IL-35), (ii) Inducción de apoptosis en células efectoras (vía granzimas y perforinas); (iii) Disrupción metabólica, por ejemplo mediante la privación de señales de supervivencia como la IL-2 y; (iv) Inhibición de la maduración de células dendríticas a través de la expresión de ligandos inhibitorios (LAG3, CTLA4) (Vignali y col., 2008). Recientemente un nuevo mecanismo de supresión ha sido incorporado al armamento de los linfocitos Treg que involucra la expresión de las ectonucleotidasas CD39 y CD73, que permiten metabolizar el ATP extracelular para generar adenosina (Deaglio y col., 2007). CD39 cataliza la hidrólisis de ATP o ADP a AMP mientras que CD73 finaliza la reacción catalizando la hidrólisis de AMP a

adenosina. La adenosina es percibida por el receptor de adenosina A2A inhibiendo la activación, proliferación y la capacidad efectora de linfocitos T (Deaglio y col., 2007) además de favorecer la generación de linfocitos Treg inducibles a partir de linfocitos CD4+ vírgenes (Zarek y col., 2008).

Por otra parte, diversos reportes evidencian la acumulación de células mieloides supresoras (MDSC) en tumores de pacientes con cáncer y en modelos animales de la enfermedad (Diaz-Montero y col., 2009). Las MDSC son una población heterogénea de origen mieloides que se caracterizan por la capacidad de inhibir tanto la respuesta inmune innata como la adaptable, particularmente la respuesta mediada por células T. Los mecanismos a través de los cuales estas células suprimen la respuesta inmune son diversos, entre ellos la expresión de la enzima Arginasa-1, que depleta el microambiente tumoral de arginina, aminoácido esencial para la activación de linfocitos T y la maduración de células dendríticas (Rodríguez y col., 2004). Estas células también producen peroxinitrito (ONOO-), agente que media la nitración del TCR de los linfocitos T CD8+, interrumpiendo de esta forma la activación mediada por presentación antigénica (Nagaraj y col., 2007).

De esta forma, en el tumor existe una lucha constante entre células efectoras, cuya función es eliminar las células transformadas, y células reguladoras, que son utilizadas por el tumor en su propio beneficio para interferir en la respuesta inmune anti-tumoral. Se ha demostrado en modelos animales que en ratones deficientes en perforina, o deficientes en la señalización a través de IFN- γ existe mayor susceptibilidad al desarrollo de tumores inducidos y estos crecen a una mayor tasa que en ratones silvestres, demostrando la importancia de la inmunidad anti-tumoral (Dighe y col., 1994; Broek y col., 1996). Por otro lado, la eliminación de linfocitos Tregs en ratones portadores

de tumor favorece la eliminación del tumor en forma dependiente de linfocitos T CD8+ y células NK (Teng y col., 2010). En cuanto a los humanos, actualmente se han planteado numerosas inmunoterapias que aprovechan este escenario para combatir el cáncer, siendo una de ellas el uso del anticuerpo monoclonal anti-CTLA-4. CTLA-4 es una molécula expresada por linfocitos T luego de su activación, cuya función es inhibir la proliferación de linfocitos T funcionando como un punto de control de la respuesta inmune, por lo que su bloqueo mediante el uso del anticuerpo anti-CTLA-4 fortalece la respuesta anti-tumoral. Bajo el nombre genérico de Ipilimumab esta droga se encuentra aprobada por la FDA para el tratamiento contra melanoma desde el 2011 y existen estudios en curso para expandir su uso a otros tipos de cáncer (Wolchok y col., 2013). Todos estos antecedentes apoyan la existencia de un balance entre células efectoras y reguladoras en el microambiente tumoral como un punto crítico del desarrollo tumoral. Comprender la función que cumplen las células inmunes en la inmunidad antitumoral es de gran relevancia puesto que la aplicación de dichos conocimientos podría resultar en nuevos blancos terapéuticos para el tratamiento del cáncer.

3.3 Subtipos de linfocitos T CD4+

Durante la respuesta inmune anti-tumoral las células dendríticas, centinelas del sistema inmune, son capaces de procesar antígenos tumorales, migrar hacia el órgano linfoide más cercano y presentar estos antígenos a linfocitos T CD4+ vírgenes. Luego del encuentro con el antígeno en los órganos linfoides secundarios, los linfocitos T CD4+ pueden convertirse en células T efectoras con distintos fenotipos funcionales. Dentro de los linfocitos T CD4+ se definen distintos subtipos o linajes de linfocitos cooperadores o *helper* que se caracterizan por el patrón de citoquinas que producen. El compromiso hacia un linaje particular es determinado por las citoquinas presentes en el

microambiente durante la presentación antigénica. De esta forma el IFN- γ y la IL-12 inducen a las células T CD4+ vírgenes a diferenciarse hacia linaje tipo 1 (T *helper* 1 ó Th1) activando la expresión del factor transcripcional maestro T-bet; la presencia de IL-4 favorece la diferenciación hacia el linaje tipo 2 (Th2) a través de la activación del factor transcripcional maestro GATA-3; mientras que la presencia de TGF- β e IL-6 induce la diferenciación hacia el linaje tipo 17 (Th17) mediante la expresión del factor transcripcional maestro ROR γ t. Los linfocitos Treg corresponden a un cuarto linaje cuya diferenciación es inducida en presencia de TGF- β e IL-2 y cuyo factor transcripcional maestro es Foxp3. La activación de estos distintos programas genéticos genera diferencias funcionales en cuanto al patrón de citoquinas que estas células secretan. Por ejemplo, los linfocitos Th1 se caracterizan por la secreción de IFN- γ y son los principales coordinadores de la respuesta citotóxica frente a patógenos intracelulares (bacterias, virus) y tumores. Los linfocitos Th2 en cambio se caracterizan por la secreción de IL-4, IL-5 e IL-13 y organizan la respuesta contra patógenos extracelulares y la secreción de anticuerpos. Los linfocitos Th17 se caracterizan por la secreción de IL-17, IL-21 e IL-22 y participan en defensa contra agentes infecciosos como bacterias, virus, hongos y protozoos. Finalmente, los linfocitos Tregs son los principales represores de la respuesta inmune y cuentan con un variado arsenal de mecanismos que les permiten mantener la tolerancia (Murphy y Reiner, 2002).

3.4 Subtipos de linfocitos T CD8+

Los linfocitos CD8+ están clásicamente relacionados con la respuesta citotóxica. Los linfocitos Tc1 también conocidos como linfocitos T citotóxicos (CTL por *Cytotoxic T Lymphocyte*) corresponden al linaje por defecto de las células CD8+ y se caracterizan

por la secreción de IFN- γ y por la capacidad de inducir apoptosis en células infectadas o transformadas. Sin embargo evidencia reciente ha mostrado que existe heterogenicidad dentro del linaje CD8+, y al igual que ocurre con los linfocitos T CD4+ *helper*, diferencias en las señales presentes durante la activación de estos linfocitos dan lugar a la activación de programas transcripcionales alternativos. Así es posible distinguir linfocitos Tc1, Tc2, y CD8+ Tregs que comparten con sus pares CD4+ *helper* el programa genético y la firma de citoquinas producidas (Shrikant y col., 2010).

En los últimos años se ha descubierto un nuevo linaje dentro de los linfocitos CD8+, denominados Tc17. Estos linfocitos T CD8+ se caracterizan por la producción de la citoquina pro-inflamatoria IL-17 y por la expresión del factor transcripcional maestro ROR γ t (Huber y col., 2009). A diferencia de los linfocitos Tc1 citotóxicos, los linfocitos Tc17 no muestran expresión de granzimas y perforina, y no poseen actividad citotóxica contra células blanco cargadas de antígeno (Yen y col., 2011).

3.5 Linfocitos Th17 y el cáncer

Los linfocitos Th17 han sido ampliamente relacionados con diversos fenómenos de autoinmunidad (Komiyama y col., 2006), pero su principal función tiene lugar en la defensa contra agentes infecciosos como bacterias, virus, hongos y protozoos. Los linfocitos Th17 se encuentran en pacientes sanos en las mucosas como en el intestino o los pulmones, o incluso en la piel, donde forman parte de la barrera inmune (O'Quinn y col., 2008). Estas células han sido investigadas en el contexto tumoral, donde se ha encontrado que se acumulan en tumores de pacientes con cáncer de ovario, de próstata, de páncreas, de riñón, de mama, de colon, melanoma, entre otros (Kryczek y col., 2009; Sfanos y col., 2008; Su y col., 2010). Sin embargo, el rol que cumplen los linfocitos Th17

en la inmunidad tumoral es aún controversial, existiendo evidencia contradictoria que apoyaría tanto una función pro-tumoral como anti-tumoral.

En los estudios que sugieren que las células Th17 pueden promover la respuesta inmune anti-tumoral, se ha demostrado que las células Th17 infiltradas al tumor son capaces de producir citoquinas efectoras como IL-2 o IFN- γ , las que han sido relacionadas con la respuesta inmune contra el tumor (Kryczek y col., 2009). Además, la infiltración de estas células al microambiente tumoral tiene una correlación positiva con otras células efectoras como linfocitos Th1, Tc1 y células NK, mientras que tiene una correlación negativa con la infiltración de linfocitos Tregs (Curiel y col., 2004; Nuñez y col., 2012; Martin-Orozco y col., 2009). También, en un modelo animal el grupo de Restifo mostró que linfocitos Th17 generados *in vitro* inducen la eliminación de tumores en ratones en una forma dependiente de IFN- γ , incluso mostrando ser más efectivos que las células Th1 (Muranski y col., 2008). Más tarde, este mismo grupo además demostró que las células Th17 poseen características troncales, tales como la multipotencialidad en cuanto a la capacidad de dar origen a células productoras de IFN- γ , y la autorenovación ya que son capaces de proliferar y mantenerse por tiempos más largos que células terminalmente diferenciadas como los linfocitos Th1 (Muranski y col., 2011). Estos resultados sugieren que el rol anti-tumoral de los linfocitos Th17 radica en su capacidad de movilizar, expandir y/o potenciar otras poblaciones efectoras, principalmente mediante la producción de IFN- γ .

Sin embargo, otros estudios sugieren que las células Th17 cumplen un rol inmunosupresor, reprimiendo la respuesta inmune y favoreciendo de esta manera el inmunoescape tumoral. Se ha demostrado que linfocitos Th17 diferenciados en ausencia



de IL-23 no son patogénicos en el modelo murino de la esclerosis múltiple (EAE por *Experimental Autoimmune Encephalomyelitis*) e incluso producen la citoquina anti-inflamatoria IL-10 (McGeachy y col., 2007). Por otra parte, el grupo de Ghiringhelli ha reportado que linfocitos Th17 pueden, mediante la expresión de las ectonucleotidasas CD39 y CD73, producir adenosina extracelular, molécula inmunosupresora capaz de inhibir la proliferación y la función efectora de linfocitos T (Chalmin y col., 2012). La expresión de CD39 y CD73 sería inducida por IL-6 y TGF- β , principales citoquinas que promueven la diferenciación hacia el linaje tipo 17 (Chalmin y col., 2012). La expresión conjunta de estas ectonucleotidasas, permitiría metabolizar el ATP o ADP liberado por las células dañadas en el microambiente tumoral y transformarlo en adenosina, favoreciendo de esta manera la mantención del microambiente tumoral inmunosupresor. En ese trabajo se muestra además que la transferencia adoptiva de células Th17 a ratones con tumores favorece el crecimiento del tumor, y que esta función pro-tumoral depende de la expresión de CD39 por parte de las células Th17 (Chalmin y col., 2012).

3.6 Linfocitos Tc17 y el cáncer

Si bien los linfocitos Tc17 han sido menos estudiados que sus pares Th17, estudios recientes aportan evidencia que involucra a estas células en el desarrollo de enfermedades infecciosas, en fenómenos de autoinmunidad y también en el cáncer. Los linfocitos Tc17 secretan citoquinas inflamatorias clásicas del linaje tipo 17 (IL-17, IL-21, IL-22, TNF- α) y han sido encontrados en condiciones de inflamación crónica como lesiones de pacientes con esclerosis múltiple (Tzartos y col., 2008) y psoriasis (Res y col., 2010). La acumulación de células Tc17 ha sido observada en tumores humanos de pacientes con cáncer gástrico (Zhuang y col., 2012), de útero (Zhang y col., 2014), de cabeza y cuello (Tsai y col., 2012), de hígado (Kuang y col., 2010), de colon (Wu y col.,

2014) y también en diversos modelos de cáncer incluyendo el modelo murino de melanoma B16 (Kryczek y col., 2007). Sin embargo, la función que cumplen estas células en la inmunidad tumoral es controversial.

Dos estudios aportan evidencia a la hipótesis que las células Tc17 cumplirían un papel anti-tumoral en el desarrollo del cáncer. En el primero, el grupo de Restifo mostró que células Tc17 antígeno-específicas generadas *in vitro* muestran actividad anti-tumoral en ratones linfopénicos con melanoma establecido (Hinrichs y col., 2009). En este estudio, la función anti-tumoral fue relacionada con la capacidad de las células Tc17 de transformarse a un fenotipo productor de IFN- γ y a la capacidad de persistir por tiempos largos en los ratones receptores. Un segundo estudio, realizado por el grupo de Dutton mostró que células Tc17 antígeno-específicas muestran actividad anti-tumoral en el modelo de melanoma B16.OVA, la cual depende de la capacidad de producir IL-17, IFN- γ y TNF- α , citoquinas que mediarían el reclutamiento de linfocitos T, macrófagos y neutrófilos al microambiente tumoral favoreciendo la eliminación del tumor (García-Hernández y col., 2010).

No obstante, también existe evidencia que apoya la hipótesis que las células Tc17, a través de la producción de citoquinas inflamatorias, promueven el crecimiento tumoral. Actualmente es aceptado que la inflamación juega un rol crucial en el desarrollo del cáncer, contribuyendo a la proliferación, sobrevida y metástasis de las células tumorales (Grivennikov y col., 2010; Hanahan y Weinberg, 2011). La angiogénesis es uno de los principales vínculos entre la inflamación y el desarrollo tumoral, puesto que favorece la entrega de nutrientes al tumor así como también la metástasis. Una de las principales funciones pro-tumorales que se adjudican las células Tc17 tiene relación con la producción de IL-17 y su actividad pro-angiogénica. Estudios realizados en ratones

inmunodeficientes muestran que la aplicación exógena de IL-17 promueve la secreción de VEGF y otros factores pro-angiogénicos en células endoteliales y fibroblastos promoviendo la vascularización tumoral (Grivennikov y col., 2010; Numasaki y col., 2003, 2005). Consistentemente, se ha encontrado una correlación positiva entre la densidad vascular tumoral y la frecuencia de células Tc17 infiltradas en tumores (Zhang y col., 2014). Por otra parte, un estudio en pacientes con cáncer gástrico demostró que las células Tc17 promueven el reclutamiento de MDSC al microambiente tumoral mediante un mecanismo dependiente de la secreción de IL-17 (Zhuang y col., 2012). Además se ha demostrado que los linfocitos Tregs pueden promover la expansión y supervivencia de linfocitos Tc17, y en acuerdo con esto, se encontró una correlación positiva entre la frecuencia de linfocitos Tregs y Tc17 infiltrados en tumores de pacientes con cáncer de cabeza y cuello (Tsai y col., 2012). Además se ha correlacionado la frecuencia de células Tc17 infiltradas al tumor y parámetros clínico-patológicos del cáncer, existiendo correlación positiva con eventos de metástasis (Zhang y col., 2014) o la etapa de desarrollo del cáncer (Zhuang y col., 2012; Tsai y col., 2012), mientras que existe correlación negativa con el pronóstico de supervivencia del paciente (Zhuang y col., 2012).

Estos antecedentes demuestran que existe una controversia respecto del papel que cumplen las células Tc17 en la inmunidad tumoral. Se ha demostrado que las células Tc17 corresponderían a un fenotipo más troncal que otras células efectoras (Muranski y col., 2011), actuando en la respuesta anti-tumoral mediante la generación de células efectoras anti-tumorales productoras de IFN- γ (Hinrichs y col., 2009; Garcia-Hernandez y col., 2010). En acuerdo con lo anterior, nuestro laboratorio demostró que ratones deficientes en el factor transcripcional maestro del linaje Tc17 (ratones *Ror γ ^{gfp/gfp}*) al ser desafiados con tumores transplantables presentan un crecimiento tumoral exacerbado

con respecto a ratones silvestres, apoyando la hipótesis que las células del linaje 17 (Th17 y Tc17) contribuirían en la respuesta inmune anti-tumoral (Nuñez y col., 2012). El objetivo de este seminario de título es aportar nuevas evidencias que permitan dilucidar el papel de las células Tc17 en el contexto de la inmunidad tumoral.

4. Hipótesis

Los linfocitos Tc17 poseen capacidad antitumoral.

5. Objetivos

5.1 Objetivo general

Estudiar la función de linfocitos Tc17 en el contexto tumoral.

5.2 Objetivos específicos

5.2.1 Caracterizar los linfocitos Tc17 en ratones con tumor.

5.2.2 Analizar la expresión de moléculas pro- y anti-tumorales en los linfocitos Tc17 generados *in vitro*.

5.2.3 Estudiar *in vivo* la función pro- o anti-tumoral de los linfocitos Tc17.

5.2.4 Estudiar la troncalidad de las células Tc17.

6. Materiales y métodos

6.1 Materiales

6.1.1 Anticuerpos

Los anticuerpos (anti ratón) contra CD3 FITC (clon 17A2), CD8a APCeFluor780 (clon 53-6.7), CD39 PE (clon 24DMS1), CD73 PE-Cy7 (clon TY/11.8), CD73 PerCP-eFluo710 (clon TY/11.8), IL-17 eFluor660 (clon eBio17B7), IFN- γ eFluor660 (clon XMG1.2), IFN- γ -FITC (clon XMG1.2), CD11c APC (clon N418), V α 2 PE (clon B20.1), CD16/32 (clon 93), CD25 PE (clon PC61.5), Perforina PE (clon eBioOMAK-D), CD107a eFluor660 (clon 1D4B), PD-1 FITC (clon J43), PD-L1 PE (clon MIH5), CTLA4 PE (clon UC10-4B9) y CD45.2 PE-Cy7 (clon 104) se obtuvieron en eBioscience; los anticuerpos contra V β 5 FITC (clon MR9-4) y Streptavidin FITC se obtuvieron en BD Pharmigen; y los anticuerpos contra CD4 APC (clon GK1.5), IAb FITC (clon 25-09-17), B220 APC (clon Ra3-6B2), V β 5 APC (clon MR9-4), CD45.1 APC (clon A20), LAG3 Biotina (clon C9B7W), IL-17 PE (clon TC11-18H10.1) y Granzima B Alexa Fluor647 (clon GB11) se obtuvieron en BioLegend.

6.1.2 Ratones

Ratones C57BL/6 (WT), OT-I, OT-II y B6.SJL-*Ptprca*^a *Pep3*^b/BoyJ (B6.SJL) (CD45.1), se obtuvieron en *The Jackson Laboratory* (Bar Harbor, USA). Los ratones OT-I contienen una inserción genética que en linfocitos T CD8⁺ lleva a la expresión de un TCR transgénico (cadenas V α 2 y V β 5) con especificidad contra un péptido de ovoalbúmina (OVA₂₅₇₋₂₆₄), presentado en contexto MHC-I H2-K^b. De la misma forma los linfocitos T CD4⁺ de ratones OT-II expresan un TCR transgénico (cadenas V α 2 y V β 5)

con especificidad contra un péptido de ovoalbúmina (OVA₃₂₃₋₃₃₉), presentado en contexto de MHC-II I-A^b. Todos los ratones se mantuvieron en el bioterio de la Fundación Ciencia y Vida en condiciones libres de patógenos específicos. Para los experimentos se utilizaron ratones entre 6 y 12 semanas de edad.

6.1.3 Líneas celulares y modelos tumorales

La línea tumoral de melanoma murino B16.F10 (B16) se obtuvo de ATCC. Las células B16 que expresan la ovoalbúmina, B16.OVA fueron donadas por el Dr. Randolph Noelle (Dartmouth Medical School, USA). Para la obtención de tumores intradérmicos, $1,5 \times 10^6$ (B16) ó $0,4 \times 10^6$ (B16.OVA) células se inyectaron por vía intradérmica (i.d.) en el flanco derecho del dorso de ratones de 6-10 semanas de edad. La evolución del tamaño de los tumores se evaluó cada dos o tres días mediante dos mediciones perpendiculares del tumor realizadas con un pie de metro. Ratones con tumores de 300 mm² o más se sacrificaron por razones bioéticas.

6.2 Métodos

6.2.1 Aislamiento de células de bazo, linfonodos y tumor

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

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

Tumores entre 50 y 150 mm² se extrajeron y disgregaron mecánicamente con una tijera en HBSS + 5% SFB. Luego, la suspensión celular y restos de tejido se llevaron a 5 mL con HBSS + 5% SFB y se realizó una digestión enzimática con 1 mg/mL de Colagenasa D (Roche) y 50 µg/mL de DNAsa I (Roche) a 37°C con agitación suave durante 30 minutos. Al terminar la digestión, el tejido se filtró a través de una malla de 70 µm (cell strainer, BD), se centrifugó a 500 x g durante 5 minutos a 4°C y las células se resuspendieron en 2 mL de buffer de lisis de glóbulos rojos y se incubaron por 5 minutos en hielo. Tras el tratamiento, las células se lavaron y luego resuspendieron en 3 mL de Percoll 40%. Con una pipeta Pasteur, se agregó el mismo volumen de Percoll

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

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

6.2.2 Generación de células Tc1 y Tc17 *in vitro*

Para obtener células Tc1 y Tc17 específicas contra OVA, se aislaron linfocitos T vírgenes a partir de bazo de ratones OT-I y se activaron, en diferentes condiciones polarizantes, en presencia de células dendríticas obtenidas a partir de bazo de ratones C57BL/6.

Los linfocitos T CD8+ se aislaron a partir del bazo de un ratón OT-I. Para esto, se perfundió el bazo de un ratón OT-I y se lisaron los glóbulos rojos (ver sección 6.2.1). Para purificar los linfocitos CD8+, las células obtenidas desde el bazo se incubaron con perlas magnéticas acopladas a anticuerpos α -CD8a (*CD8a (Ly2) MicroBeads mouse*, Miltenyi Biotec) (75 μ L de perlas por cada 100 millones de células) en Verseno + 0,5% SFB, durante 20 minutos a 4°C con agitación rotatoria suave. Luego de la incubación, las células se lavaron y resuspendieron en 1 mL de Verseno + 0,5% SFB. Los linfocitos T CD8 se purificaron mediante separación inmunomagnética (columnas LS, Miltenyi Biotec). La pureza de la preparación se verificó mediante citometría de flujo, obteniéndose siempre al menos un 80% de células CD8+.

Para obtener células dendríticas (DCs), se extrajo el bazo de un ratón C57BL/6, y se recibió en 5 mL de PBS + 10% SFB. Se disgregó con una tijera, y se realizó una digestión enzimática con 1 mg/mL de Colagenasa D (Roche) y 50 µg/mL de DNAsa I (Roche) a 37°C con agitación rotatoria leve durante 45 minutos. Al finalizar la incubación, la muestra se filtró con un *cell strainer* de 70 µm, se centrifugó a 600 x g durante 7 minutos a 4°C y se lisaron los glóbulos rojos (ver sección 6.2.1). Para purificar las DCs, las células obtenidas desde el bazo se incubaron con perlas magnéticas acopladas a anticuerpos α -CD11c (*CD11c MicroBeads mouse*, Miltenyi Biotec) (40µL de perlas por cada 100 millones de células) en Verseno + 0,5% SFB, durante 20 minutos a 4°C con agitación rotatoria suave. Luego de la incubación, las células se lavaron y resuspendieron en 1 mL de Verseno + 0,5% SFB. Las células dendríticas CD11c+ se purificaron mediante separación inmunomagnética (Columnas LS, Miltenyi Biotec). La pureza de la preparación se verificó mediante citometría de flujo, obteniéndose siempre al menos un 80% de células CD11c+.

Una vez obtenidas las DCs y los linfocitos T CD8+, las células se co-cultivaron a una proporción 1:5 (2 x 10⁴ DCs y 1 x 10⁵ linfocitos T CD8+ por pozo), en placas de 96 pocillos de fondo redondo, en presencia del anticuerpo activador α -CD3e (clon 145-2C11, eBioscience) a una concentración final de 1 µg/mL en medio IMDM suplementado con 10% de SFB, 0,25µg/mL de Fungizona y 0,05 µM de β -mercaptoetanol. Para polarizar los linfocitos T CD8+ hacia un fenotipo Tc17, el medio se suplementó con 2 ng/mL de rh-TGF- β 1 (eBioscience), 20 ng/mL de rm-IL-6 (R&D System) y 5 µg/mL del anticuerpo bloqueador α -IFN- γ (clon XMG1.2, BioLegend). Para polarizar los linfocitos T CD8+ hacia un fenotipo Tc1, el medio se suplementó con 10 ng/mL de rm-IL-12 (R&D Systems) y 10 ng/mL de IL-2 (eBioscience). El co-cultivo se incubó durante 4 días a 37°C

y 5% CO₂, luego de lo cual se recuperaron las células y se analizó su fenotipo mediante citometría de flujo.

6.2.3 Evaluación de moléculas de superficie por citometría de flujo

La caracterización fenotípica de las distintas poblaciones celulares se realizó por citometría de flujo multiparamétrica (FACSCanto II, BD Biosciences). Para la detección de moléculas de superficie mediante citometría de flujo, entre 0,1 y 1,0 x 10⁶ células se incubaron con un anticuerpo contra CD16/CD32 (Fc Block) en PBS + 2% SFB durante 20 minutos a 4°C y oscuridad para bloquear los receptores Fc. Luego, se lavaron las células con PBS + 2% SFB y centrifugaron a 600 x g por 7 minutos a 4°C. Posteriormente, las células incubaron con los respectivos anticuerpos fluorescentes y con *Fixable Viability Dye* eFluor780 (eBioscience) para descartar las células muertas, en PBS + 2% SFB durante 30 minutos a 4°C en oscuridad. Finalmente, las células se lavaron con PBS + 2% SFB, se centrifugaron a 600 x g durante 7 minutos a 4°C y se resuspendieron en 200 µL de PBS + 2% SFB para ser analizadas en el citómetro. Los datos de citometría se analizaron con el programa *FlowJo* (Tree Star, Inc.)

6.2.4 Evaluación de células productoras de citoquinas por citometría de flujo

Para analizar la expresión intracelular de citoquinas por parte de linfocitos T se realizó una activación policlonal *in vitro*. Células de bazo, de PLN, de tumor o linfocitos Tc1 o Tc17 generados *in vitro* se incubaron a 2 x 10⁶ células/mL en RPMI 10% SFB, en presencia de PMA 0,25 µM (Sigma), ionomicina 1 µg/mL (Sigma) y 1µL/mL de Brefeldina A (GolgiPlug, BD Biosciences), durante 4 horas a 37°C y 5% CO₂. Luego de la incubación, las células se centrifugaron a 600 x g durante 7 minutos a 4°C y se resuspendieron en PBS + 2% SFB. Las células se marcaron en superficie (ver sección

6.2.3) y posteriormente se centrifugaron a 600 x g por 7 minutos a 4°C. Para marcaje intracelular de citoquinas (IL-17A y IFN- γ), las células se fijaron y permeabilizaron, resuspendiéndolas en 200 μ L de *Cytofix/Cytoperm* (BD Biosciences) e incubándolas durante 20 minutos a 4°C en oscuridad. Al cabo de la incubación, las células se lavaron con 700 μ L de *Permwash* (BD Biosciences) y se centrifugaron a 700 x g durante 8 minutos a 4°C. Luego, las células se incubaron con los respectivos anticuerpos fluorescentes (α -IL-17A, α -IFN- γ) diluidos en 100 μ L de *Permwash* durante 30 minutos a 4°C en oscuridad. Finalmente, las células se lavaron con 700 μ L de *Permwash*, se centrifugaron a 700 x g por 8 minutos a 4°C y se resuspendieron en 200 μ L de PBS + 2% SFB para ser analizadas en el citómetro. Los datos de citometría se analizaron con el programa *FlowJo* (Tree Star, Inc.)

6.2.5 Evaluación de marcadores funcionales de citotoxicidad por citometría de flujo

Para analizar la expresión intracelular de Granzima B en linfocitos T de PLN o TdLN, las células T se activaron en forma policlonal *in vitro*. Para esto, se incubaron células de PLN o TdLN (ver sección 6.2.1) en placas de 96 pocillos de fondo redondo a 0,2 x 10⁶ células por pozo en 200 μ L de IMDM + 10% SFB suplementado con los anticuerpos activadores α -CD3e (clon 145-2C11, eBioscience) y α -CD28 (clon 37.51, Biolegend) ambos a una concentración final de 1 μ g/mL. Las células se incubaron 18 horas a 37°C y 5% CO₂, y posteriormente se centrifugaron a 600 x g por 7 minutos a 4°C y se resuspendieron en PBS + 2% SFB. Los linfocitos T de PLN o TdLN activados, se marcaron en superficie (ver sección 6.2.3). Luego del marcaje de superficie, las células se centrifugaron a 600 x g por 7 minutos a 4°C y se fijaron y permeabilizaron

resuspendiéndolas en 300 μ L de *Foxp3 Fixation/Permeabilization Buffer* (eBioscience) e incubándolas durante 20 minutos a 4°C en oscuridad. Al cabo de la incubación, las células se lavaron con 700 μ L de *Permeabilization Buffer* (BD Biosciences) y se centrifugaron a 700 x g durante 8 minutos a 4°C. Luego, las células se incubaron con el anticuerpo fluorescente α -gzmB diluido en 100 μ L de *Permeabilization Buffer* durante 30 minutos a 4°C en oscuridad. Finalmente, las células se lavaron con 700 μ L de *Permeabilization Buffer*, se centrifugaron a 700 x g por 8 minutos a 4°C y se resuspendieron en 200 μ L de PBS + 2% SFB para ser analizadas en el citómetro.

Para analizar la expresión en superficie de CD107a y la expresión intracelular de granzima B y Perforina en linfocitos Tc1 o Tc17 generados *in vitro* las células no se reactivaron. Las células se marcaron en superficie (sección 6.2.3) incluyendo el anticuerpo fluorescente α -CD107a. Luego del marcaje de superficie, las células se fijaron y permeabilizaron con *Foxp3 Fixation/Permeabilization Buffer* (eBioscience) (ver sección 6.2.5). Luego, las células se incubaron con los anticuerpos fluorescentes α -gzmB y α -Perforina diluidos en 100 μ L de *Permeabilization Buffer* durante 30 minutos a 4°C en oscuridad. Finalmente, las células se lavaron con 700 μ L de *Permeabilization Buffer*, se centrifugaron a 700 x g por 8 minutos a 4°C y se resuspendieron en 200 μ L de PBS + 2% SFB para ser analizadas en el citómetro. Los datos de citometría se analizaron con el programa *FlowJo* (Tree Star, Inc.)

6.2.6 Cuantificación de la producción de citoquinas

Linfocitos Tc1 o Tc17 generados *in vitro* se activaron a 1×10^6 células/mL en RPMI 10% SFB en presencia de PMA 0,25 μ M (Sigma) y Ionomicina 1 μ g/mL (Sigma) por 4 horas a 37°C y 5% CO₂. Luego de la activación se centrifugaron las células a 600

x g durante 7 minutos a 4°C, se recuperó el sobrenadante y se guardó a -80°C para posteriormente cuantificar las citoquinas producidas. Las citoquinas IL-2, IL-17, IFN- γ , TNF- α , IL-4, IL-6 e IL-10 se cuantificaron mediante CBA (Cytometric Bead Array) (kit *Th1/Th2/Th17*, eBioscience). La cuantificación de GM-CSF se realizó mediante un ELISA de captura (kit BD OptEIA, BD Biosciences).

6.2.7 Cell Sorting

En algunos casos se aislaron células Tc17 generadas *in vitro* mediante *cell sorting* en base a la expresión de IL-17 en superficie. Esto es posible debido a que la IL-17 forma heterodímeros con la IL-17F, la cual tiene dominios transmembrana, lo que permite la expresión transitoria de IL-17 en la superficie (Brucklacher-Waldert y col., 2009). Brevemente, células Tc17 generadas *in vitro* se estimularon a 2×10^6 células/mL con PMA 0,12 μ M (Sigma) y Ionomicina 0,5 μ g/mL (Sigma) por 4 horas a 37°C y 5% CO₂. Luego se realizó un marcaje en superficie con α IL-17A PE y α CD8a APCeFluor780 y posteriormente se aislaron las células CD8a+IL17A+ utilizando un *cell sorter* (FACSaria II, BD Biosciences).

6.2.8 Ensayo de citotoxicidad *in vitro*

Para evaluar la capacidad citotóxica de células efectoras se realizó un ensayo de citotoxicidad *in vitro*. Para esto, 2×10^4 células B16-F10 (células blanco) resuspendidas en 200 μ L de RPMI + 10% SFB suplementado con β -mercaptoetanol (0,05 μ M) se sembraron en placas de 96 pocillos de fondo plano. Luego de 24 horas se aspiró el medio y se agregó medio fresco suplementado con péptido OVA₂₅₇₋₂₆₄ (30nM) y se incubaron por 2 horas a 37°C y 5% CO₂, luego de lo cual se aspiró el medio y se agregaron distintas

concentraciones de células efectoras Tc1 o Tc17 en 200 μ L de medio fresco. Luego de 4 horas de incubación a 37°C y 5% CO₂ se recuperaron las células en suspensión y se recuperaron las células adherentes incubando con tripsina por 10 minutos a 37°C. Las células recuperadas se centrifugaron a 600 x g por 7 minutos a 4°C y se resuspendieron en 100 μ L PBS + 2% SFB. Para discriminar entre células efectoras (CD45.2+) y células blanco (CD45.2-) se realizó un marcaje en superficie (ver sección 6.2.3) con el anticuerpo fluorescente α CD45.2. Luego del marcaje las células se centrifugaron a 600 x g por 7 minutos a 4°C y resuspendieron en 100 μ L de *Binding Buffer* (10 mM HEPES, 140 mM NaCl, 2,5 mM CaCl₂, pH = 7,4) que contenía 1 μ L de Anexina V-FITC (BD Biosciences) y 2 μ L de yoduro de propidio (50 μ g/mL) (Sigma). Las células se incubaron por 20 minutos a temperatura ambiente en oscuridad. Luego de la incubación se agregaron 300 μ L de *Binding Buffer* y se analizó la muerte celular por citometría de flujo. Para el cálculo del porcentaje de lisis específica se utilizó la fórmula:

$$\% \text{ lisis específica} = \frac{100 \times (\% \text{ lisis muestra} - \% \text{ lisis basal})}{100 - \% \text{ lisis basal}}$$

Dónde: %lisis muestra = lisis en presencia de una proporción de células efectoras (Tc)

%lisis basal = lisis en ausencia de células efectoras

6.2.9 Ensayo de inmunosupresión *in vitro*

Los linfocitos T CD4+ se aislaron desde el bazo de ratones OT-II mediante separación inmunomagnética utilizando perlas α -CD4 (*CD4 (L3T4) MicroBeads mouse*, Myltenyi biotec) (ver sección 6.2.2). Los linfocitos T CD4+ purificados se centrifugaron a 600 x g por 7 minutos a 4°C y luego se resuspendieron a 1 x 10⁷ células/mL en PBS suplementado con 1 μ L/mL de *Cell Trace Violet* (Life Technologies). Las células se

incubaron 20 minutos a 37°C en oscuridad y luego se agregaron 5 volúmenes de RPMI + 10% SFB. Luego de 5 minutos las células se centrifugaron a 600 x g por 7 minutos a 4°C y se resuspendieron en IMDM + 10% SFB, 0,25µg/mL de Fungizona y 0,05 µM de β-mercaptoetanol a la concentración deseada. Los linfocitos T CD4+ marcados se cultivaron en placas de 96 pocillos de fondo redondo a 5 x 10⁴ células por pozo en 200 µL y se activaron con péptido OVA₃₂₃₋₃₃₉ (2µM) en presencia de 2 x 10⁴ DCs (ver sección 6.2.2). Además, se agregaron linfocitos Tc1 o Tc17 generados *in vitro* (ver sección 6.2.2) en distintas proporciones respecto de los linfocitos T CD4+. Algunos ensayos se realizaron en presencia de AMP 100 µM (Sigma), sustrato de CD73, o en presencia de APCP 500 µM (Sigma) un inhibidor específico de CD73. Otros ensayos se realizaron en placas *Transwell* (diámetro del poro de 0,4 µm, Corning Life Sciences) cultivando a los linfocitos CD4+ y las DCs en el compartimento inferior, y las células Tc1 o Tc17 en el compartimento superior. Los co-cultivos se incubaron a 37°C y 5% CO₂ por 96 horas, luego de lo cual se recuperaron las células y se analizó la dilución de *Cell Trace Violet* por citometría de flujo.

6.2.10 Transferencia adoptiva de células Tc1 y Tc17

Al día 10 posterior a la inyección i.d. de células tumorales (B16.OVA) (ver sección 6.1.3), 1 x 10⁶ células Tc17 o Tc1 generadas *in vitro* a partir de ratones OT-I (ver sección 6.2.2) se inyectaron en el ratón por vía intravenosa (i.v.) en la vena lateral de la cola. El crecimiento del tumor se evaluó haciendo dos mediciones perpendiculares al tumor utilizando un pie de metro. Cuando el protocolo experimental lo requirió, los ratones se sacrificaron para analizar las células transferidas mediante citometría de flujo.

6.2.11 Análisis estadístico

Para el análisis estadístico entre dos grupos de datos se utilizó la prueba de Mann-Whitney de dos colas. Para el análisis estadístico de las curvas de crecimiento tumoral entre distintos tratamientos se utilizó una prueba de ANOVA de 2 vías y post prueba de Bonferroni. Todos los análisis estadísticos se realizaron utilizando el programa GraphPad Prism 5 (GraphPad Software, San Diego, CA, EUA). Se considera la significancia estadística con un valor de $p < 0,05$. (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$)

7. Resultados

7.1 Las células Tc17 endógenas no poseen marcadores de citotoxicidad y expresan altos niveles de la ectonucleotidasa CD73

La frecuencia y fenotipo de las células CD8⁺ endógenas productoras de IL-17 (Tc17) fue analizado mediante citometría de flujo en bazo y linfonodos periféricos (PLN por *Peripheral Lymph Node*) de ratones C57BL/6 sanos (sin tumor). Como se observa en la figura 1, el porcentaje de células Tc17 en bazo de ratones sin tumor corresponde a un $0,07 \pm 0,01$ % de las células CD8⁺, mientras que en el PLN es diez veces superior ($0,75 \pm 0,08$ % de las células CD8⁺).

En pacientes humanos y modelos animales de cáncer se ha demostrado una expansión de células Tc17 en el tumor (Zhuang y col., 2012; Kryczek y col., 2007), por lo cual se utilizó el modelo de melanoma murino (B16) para estudiar la frecuencia y fenotipo de las células Tc17 en el tumor y en los órganos linfoides asociados. Como se observa en la figura 1A, el porcentaje de células Tc17 en el bazo ($0,29 \pm 0,04$ %) y en el órgano linfoide asociado al tumor (TdLN por *Tumor draining Lymph Node*) ($2,11 \pm 0,42$ %) de ratones con tumor es 3 veces mayor en comparación a ratones sin tumor. Por otra parte, en el tumor se observó un $0,12 \pm 0,03$ % de células Tc17 (figura 1A,1B).

Para entender la función que cumplen las células Tc17 en la inmunidad antitumoral, estudiamos las propiedades citotóxicas de las células Tc17 y las comparamos a las células Tc1, que son los linfocitos T CD8⁺ citotóxicos clásicos. Para esto, células Tc1 (CD8⁺IFN- γ ⁺) y células Tc17 (CD8⁺IL17-A⁺) de órganos linfoides de ratones sanos o con tumor se activaron *in vitro* con α -CD3 más α -CD28 y se analizó la expresión del marcador clásico de citotoxicidad Granzima B (gzmB). Como se observa

en la figura 2, las células Tc17 endógenas tanto de ratones sanos como de ratones con tumor no expresan gzmB, a diferencia de las células Tc1. Este resultado apoya la hipótesis que las células Tc17 corresponden a un linaje independiente de las Tc1 y que poseen una función distinta a la citotoxicidad.

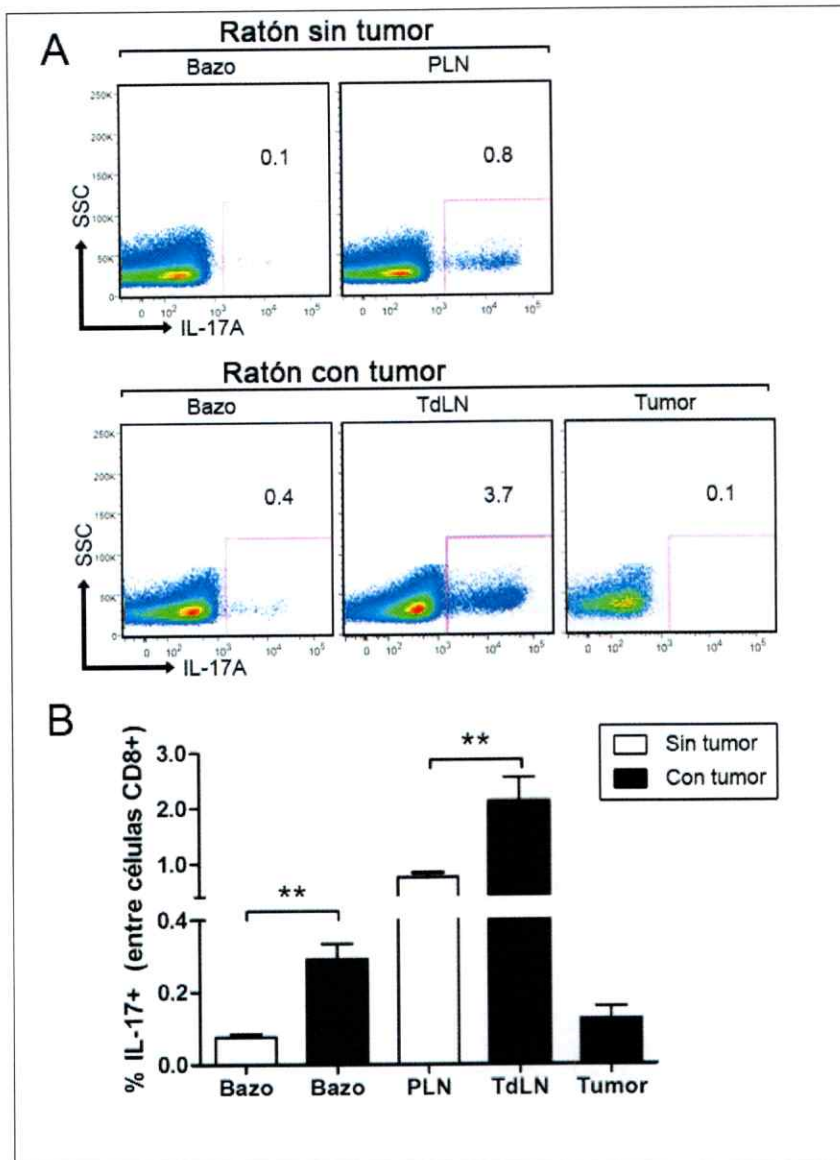


Figura 1. Presencia de células Tc17 endógenas en ratones sanos y con tumor. (A) Porcentaje de células Tc17 (CD8+IL-17A+) en bazo, PLN, TdLN o tumor de ratones C57BL/6 sanos o con tumor (B16). (B) Cuantificación de los resultados en A (n = 7). Las barras indican la media \pm SEM. ** p<0,01 test de Mann-Whitney.

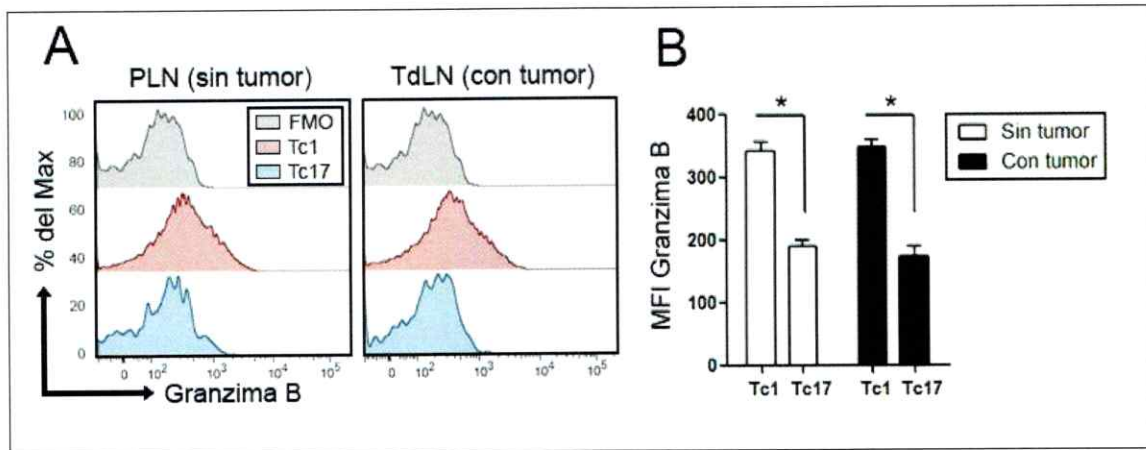


Figura 2. Las células Tc17 endógenas no expresan granzima B. (A) Histogramas de la expresión de granzima B en células Tc1 (CD8+IFN- γ +) (rojo) y Tc17 (CD8+IL-17A+) (azul) de PLN o TdLN luego de 18 hrs. de activación *in vitro* con α -CD3 y α -CD28. El histograma gris corresponde al control negativo FMO (fluorescence minus one). (B) Cuantificación de la intensidad media de fluorescencia (MFI por Mean Fluorescence Intensity) para granzima B (n = 4). Las barras indican la media \pm SEM. * p<0,05 test de Mann-Whitney

Antecedentes de la literatura demuestran que los linfocitos Th17 reguladores expresan las ectonucleotidasas CD39 y CD73 (Chalmin y col., 2012). Puesto que las células Tc17 no expresan el marcador citotóxico gzmB (Figura 2), estudiamos la expresión de las ectonucleotidasas CD39 y CD73 en la superficie de estas células. En la figura 3 se observa que células Tc17 tienen mayor expresión de ambas ectonucleotidasas en comparación a las células Tc1.

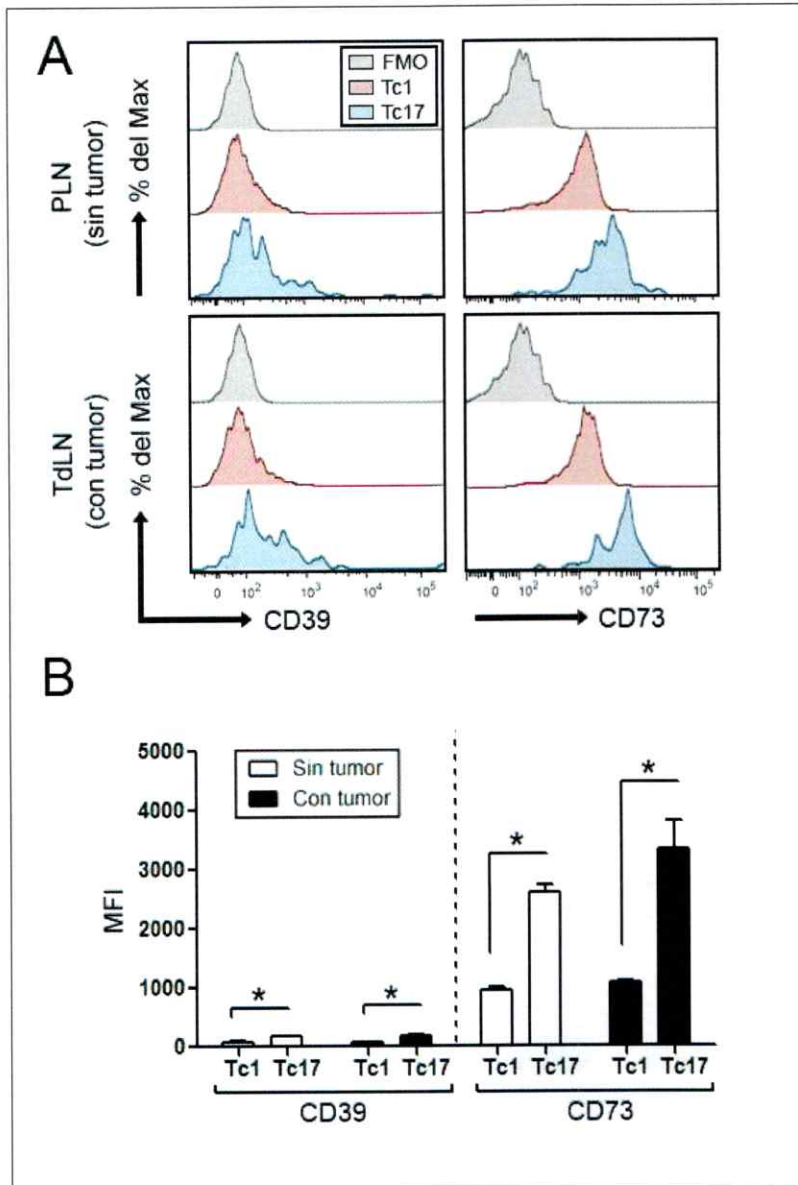


Figura 3. Las células Tc17 endógenas expresan las ectonucleotidasas CD39 y CD73. (A) Histogramas de la expresión de CD39 y CD73 en células Tc1 (CD8+IFN- γ +) (rojo) y Tc17 (CD8+IL-17A+) (azul) de PLN o TdLN. El histograma gris corresponde al control negativo FMO (*fluorescence minus one*). (B) Cuantificación ($n = 4$) de la intensidad media de fluorescencia para CD39 y CD73. Las barras indican la media \pm SEM. * $p < 0,05$ test de Mann-Whitney.

7.2 Células Tc17 generadas *in vitro* no son citotóxicas y expresan altos niveles de CD73

Para elucidar el rol funcional de las células Tc17, se generaron células Tc1 y Tc17 *in vitro* y analizamos en estas células la expresión de marcadores de citotoxicidad, marcadores inhibitorios de la respuesta inmune y la producción de citoquinas. Para la generación de células *in vitro*, linfocitos T CD8⁺ obtenidos desde bazo de ratones C57BL/6 se activaron *in vitro* con α -CD3 y DCs, en presencia de TGF- β , IL-6 y α -IFN- γ para la generación de Tc17, y de IL-2 e IL-12 para la generación de Tc1. Luego de 4 días de polarización se analizó el fenotipo de las células Tc1 y Tc17 diferenciadas. Para analizar la producción de citoquinas las células se activaron con PMA y Ionomicina durante 4 horas en presencia de GolgiPlug (Brefeldina). Luego de esto, se analizaron las citoquinas intracelulares por citometría de flujo (Figura 4A). Bajo la condición de polarización a Tc17 se logró generar un $70,8 \pm 3,3$ % de células productoras de IL-17A

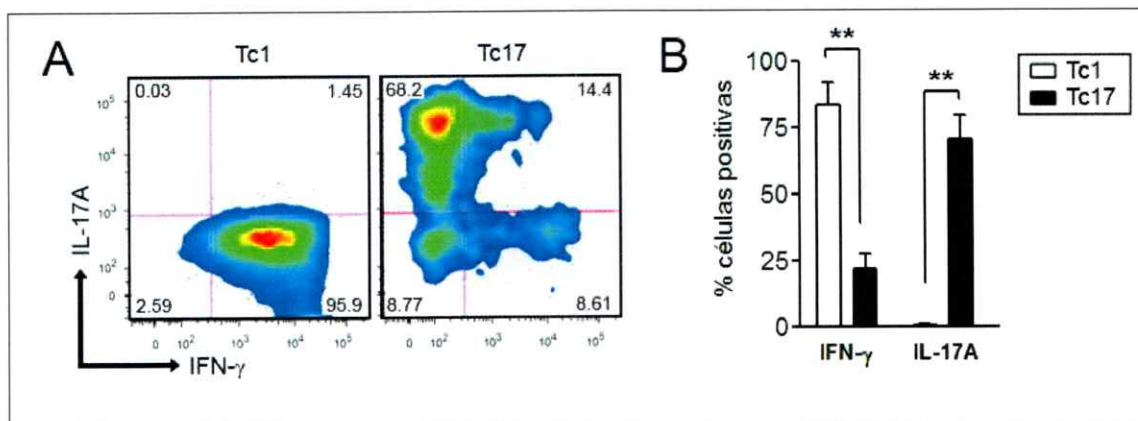


Figura 4. Generación de células Tc1 y Tc17 *in vitro*. Se aislaron células CD8⁺ totales de bazo y se co-cultivaron con DCs y α -CD3 (1 μ g/mL) en presencia de IL-6, TFG β y α -IFN- γ para generar células Tc17, o IL-2 e IL-12 para generar células Tc1. (ver sección 6.2.2 en materiales y métodos) (A) Análisis por citometría de flujo de citoquinas intracelulares en células Tc1 y Tc17 generadas *in vitro* luego de 4 hrs de activación *in vitro* con PMA y Ionomicina en presencia de GolgiPlug (Brefeldina). (B) Cuantificación del porcentaje de células IFN- γ ⁺ o IL-17A⁺ en los cultivos de generación de Tc1 y Tc17. Las barras indican la media \pm SEM. ** $p < 0,01$ test de Mann-Whitney.

y un $21,9 \pm 2,2$ % de células productoras de IFN- γ (figura 4A,B). Por otra parte bajo la condición de polarización a Tc1 se logró generar un $83,7 \pm 3,1$ % de células productoras de IFN- γ que no producen IL-17A (figura 4A,B).

Para caracterizar las células Tc17 generadas *in vitro*, se analizó el patrón de citoquinas (IL-10, IL-17A, IFN- γ , TNF- α , IL-6, IL-4, IL-2, GM-CSF) secretado por estas células (figura 5). Para esto se estimuló el mismo número de células Tc1 o Tc17 con PMA y Ionomicina por 4hrs y se cuantificaron las citoquinas en el sobrenadante mediante citometría de flujo (CBA) o ELISA. En concordancia con los datos de citometría (figura 4), se observó que las células Tc1 mostraron mayor producción de IFN- γ que las células Tc17, mientras que sólo las células Tc17 produjeron IL-17A (figura 5). Notablemente, las células Tc17 también produjeron mayores niveles de TNF- α , IL-2 y GM-CSF (figura 5) que las células Tc1, y menores niveles de la citoquina anti-inflamatoria IL-10 (figura 5).

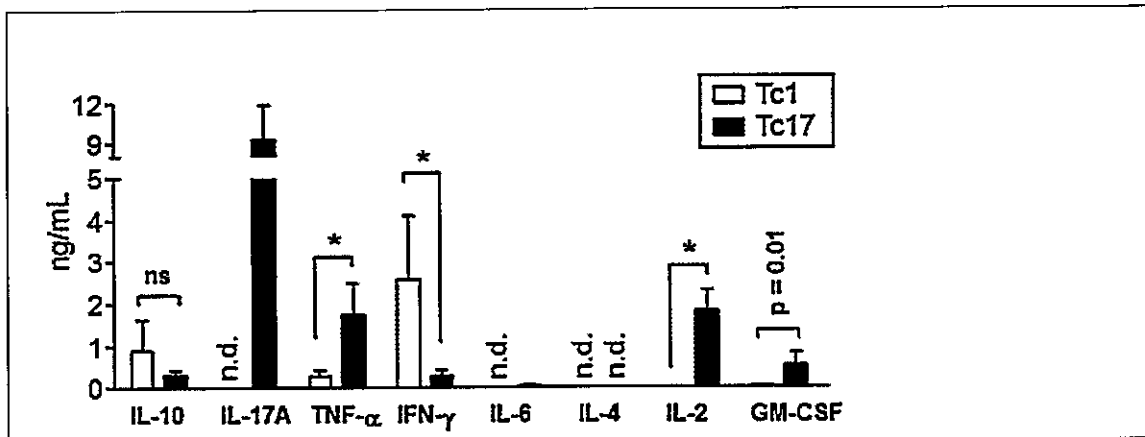


Figura 5. Producción de citoquinas por células Tc1 y Tc17 generadas *in vitro*. Células Tc1 o Tc17 generadas *in vitro* (ver sección 6.2.2 en materiales y métodos) se re-activaron a 1×10^6 células/mL con PMA y Ionomicina por 4 horas. En los sobrenadantes colectados se cuantificó la presencia de IL-10, IL-17A, TNF- α , IFN- γ , IL-6, IL-4, IL-2 (CBA) y GM-CSF (ELISA) (n=3-4). Las barras indican la media \pm SEM. ns: no significativo; nd: no detectado; * $p < 0,05$; test Mann-Whitney.

Además se analizó la expresión de marcadores clásicos del linaje citotóxico (granzima B, perforina, CD107a) y de marcadores relacionados a la inhibición de la respuesta inmune (CD39, CD73, PD-1, PD-L1, CTLA4, LAG3) (figura 6). Al evaluar la expresión de las ectonucleotidasas CD39 y CD73 en la superficie de las células Tc1 y Tc17 generadas *in vitro* se encontró que las células Tc17 generadas *in vitro* no expresan CD39, mientras que las células Tc1 expresan fuertemente esta enzima (figura 6A,B). Por otra parte, las células Tc17 poseen una mayor expresión de CD73 que las células Tc1 (figura 6A,B), similar a lo que ocurre con las poblaciones endógenas (figura 3). Si bien no se encontraron diferencias significativas en cuanto a la expresión de otras moléculas inhibitorias como PD-1, PD-L1, CTLA-4 y LAG3 entre las células Tc1 y Tc17 generadas *in vitro*, las células Tc1 muestran en general una mayor expresión de estas moléculas (figura 6A,B).

Interesantemente, las células Tc17 generadas *in vitro* no expresan granzima B intracelular mientras que todas las células Tc1 expresan este marcador (figura 6A,B), resultado que concuerda con lo observado en las células Tc17 endógenas (figura 2). Por otra parte, la expresión de perforina y CD107a (marcador de degranulación) fue menor en células Tc17 que en células Tc1 (figura 6A,B). Estos resultados sugieren que las células Tc17 generadas *in vitro*, al igual que las células Tc17 endógenas, no poseen capacidad citotóxica.

Para evaluar directamente la capacidad citotóxica de las células Tc17, se generaron células Tc1 y Tc17 desde un ratón OT-I, cuyos linfocitos T CD8⁺ expresan un receptor de células T (TCR) transgénico que reconoce el péptido OVA₂₅₇₋₂₆₄ en un contexto H2-K^b. Células blanco B16 (>95% viabilidad) se cargaron con el péptido

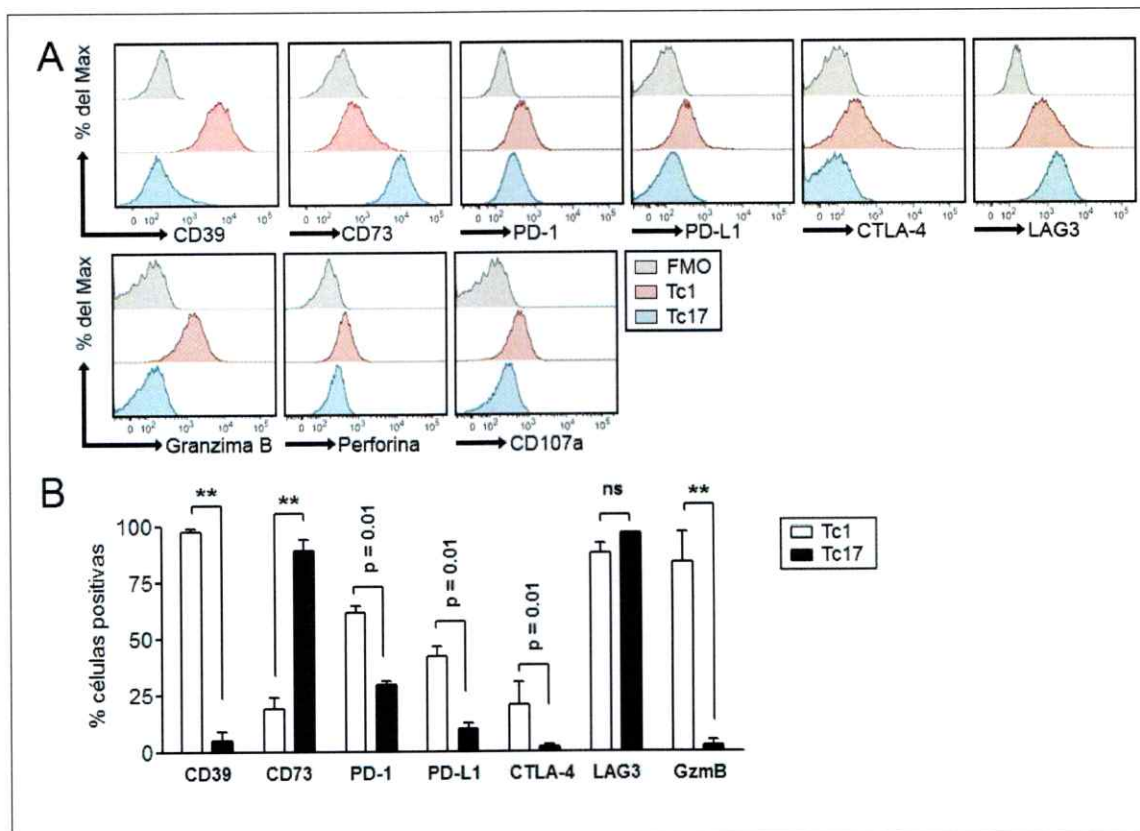


Figura 6. Caracterización de células Tc1 y Tc17 generadas *in vitro*. Se generaron células Tc1 y Tc17 *in vitro* (ver sección 6.2.2 en materiales y métodos) y se analizó su fenotipo por citometría de flujo. (A) Histogramas de la expresión de marcadores de células T citotóxicas (granzima B, perforina y CD107a) y de marcadores inhibitorios (CD39, CD73, PD-1, PD-L1, CTLA4, LAG3) en células Tc1 (rojo) o Tc17 (azul) generadas *in vitro*. El histograma gris corresponde al control negativo FMO (fluorescence minus one). CD107a y perforina (n=1) (B) Cuantificación de la expresión de granzima B (GzmB), CD39, CD73, PD-1, PD-L1, CTLA4 y LAG3 en células Tc1 y Tc17 generadas *in vitro* (n=3-6). Las barras indican la media \pm SEM del porcentaje de células positivas. ns: no significativo; ** p<0,001 test Mann-Whitney.

OVA₂₅₇₋₂₆₄ y se incubaron por 4 horas con distintas proporciones de células Tc17 o Tc1 generadas *in vitro*. Luego de la incubación se analizó la muerte celular en la población blanco por citometría de flujo mediante un marcaje doble con yoduro de propidio (PI por *propidium iodide*) y anexina V (anV). Este marcaje permite distinguir células vivas (anV- PI-), células apoptóticas (anV+ PI-) y células muertas (anV+ PI+). Como se observa en la figura 7A, las células B16 solas mantienen un alto porcentaje de viabilidad

durante el ensayo (87% vivas, 7% apoptóticas, 6% muertas) (figura 7A). En presencia de células Tc1 en una proporción 10:1 (Tc1:B16) se observa la inducción de apoptosis en las células blanco (23% vivas, 61% apoptóticas, 14% muertas) (figura 7A). En contraste, en presencia de células Tc17 en una proporción 10:1 (Tc17:B16) se observa una menor inducción de apoptosis (70% vivas, 20% apoptóticas, 8% muertas) (figura 7A). Sin embargo, el efecto citotóxico sólo fue dependiente del número de células efectoras en el caso de las Tc1 (figura 7B). Este resultado sugiere que la diferencia de las células Tc1, las células Tc17 no poseen capacidad citotóxica frente a células tumorales cargadas con antígeno.

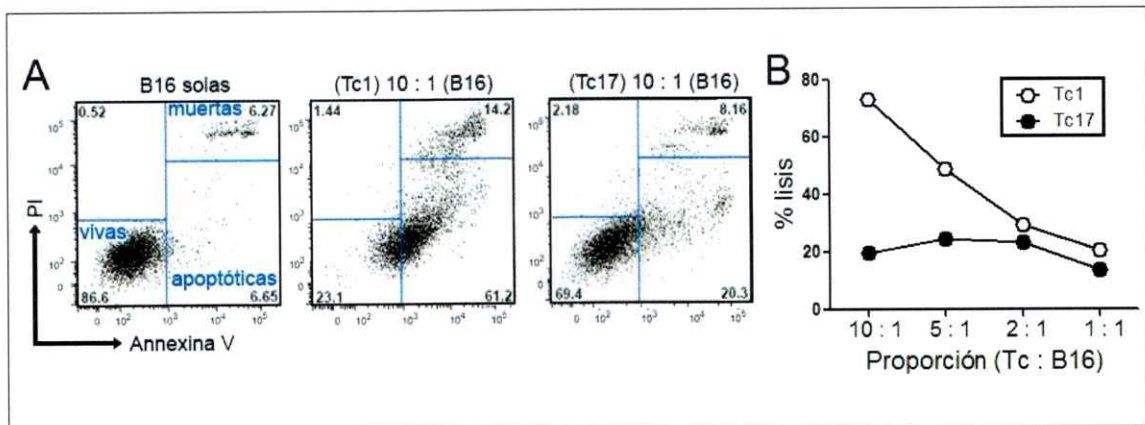


Figura 7. Las células Tc17 generadas *in vitro* no son citotóxicas. Células blanco (B16) cargadas con péptido OVA₂₅₇₋₂₆₄ se incubaron con células Tc1 o Tc17 OVA-específicas (OT-I) y luego de 4 horas se evaluó la apoptosis en las células B16 por citometría de flujo (ver sección 6.2.8 en materiales y métodos). (A) Gráficos de citometría de flujo en la población B16 (CD45-) que muestran el marcaje de anexina V (anV) yoduro de propidio (PI). A la izquierda: células B16 incubadas solas; al centro: células B16 incubadas con Tc1 en proporción 10:1 (Tc1:B16); a la derecha: células B16 incubadas con Tc17 en proporción 10:1 (Tc17:B16). (B) El gráfico muestra el porcentaje de lisis específica en función de la proporción de células efectoras (Tc1 ó Tc17) : células blanco (B16). n = 1.

El conjunto de estos resultados indican que las células Tc17 generadas *in vitro* son distintas a las células Tc1 puesto que: (i) no son citotóxicas; (ii) secretan un patrón de citoquinas distinto a las Tc1, que incluye a las citoquinas inflamatorias IL-17A, IL-2, TNF- α y GM-CSF; (iii) expresan altos niveles de la ectonucleotidasa CD73.

7.3 Las células Tc17 generadas *in vitro* no tienen capacidad inmunosupresora

La alta expresión de la ectonucleotidasa CD73 sugiere un rol inmunosupresor por parte de las células Tc17. Para dilucidar esta hipótesis se realizó un ensayo de supresión *in vitro* en el cual se evaluó la proliferación de linfocitos T CD4+ en presencia o ausencia de células Tc17. Para el ensayo se utilizaron linfocitos T CD4+ de un ratón OT-II, cuyos linfocitos T CD4+ presentan un TCR transgénico que reconoce el péptido OVA₃₂₃₋₃₃₉ en el contexto I-A^b. Los linfocitos T CD4+ se activaron utilizando DCs cargadas con el péptido OVA₃₂₃₋₃₃₉. Las células Tc17 utilizadas para el ensayo se generaron *in vitro* y posteriormente se aislaron mediante *cell sorting* en base a la expresión de IL-17A en superficie (Brucklacher-Waldert y col., 2009). La proliferación de los linfocitos T CD4+ se evaluó por citometría de flujo midiendo la dilución del fluorocromo *Cell Trace Violet*. Para esto, los linfocitos T CD4+ se marcaron con Cell Trace Violet previo a la activación *in vitro*. Las propiedades de este fluorocromo permiten que luego de cada división celular, la fluorescencia de cada célula hija corresponda a la mitad de la fluorescencia de la célula madre, esto permite la formación de picos de fluorescencia que dan cuenta de cada ciclo de división celular. El resultado mostrado en la figura 8A indica que en presencia de células Tc17 existe un retardo en la proliferación de los linfocitos T CD4+ en comparación al control sin Tc17. Notablemente, este retraso no ocurre en presencia de células Tc1.

Para dilucidar si el retardo en la proliferación observado en los ensayos de supresión *in vitro* es mediado por factores solubles se utilizó un sistema *Transwell* que no permite el contacto célula-célula (diámetro del poro = 0,4 μm) pero sí el paso de moléculas solubles. Las células T CD4+ se activaron en el compartimento inferior mientras que las células Tc17 se cultivaron en el compartimento superior. En estos experimentos no observamos disminución en la proliferación de los linfocitos T CD4+ en presencia de células Tc17 (figura 8B), sugiriendo que el retraso en la proliferación observado previamente requiere de contacto célula-célula.

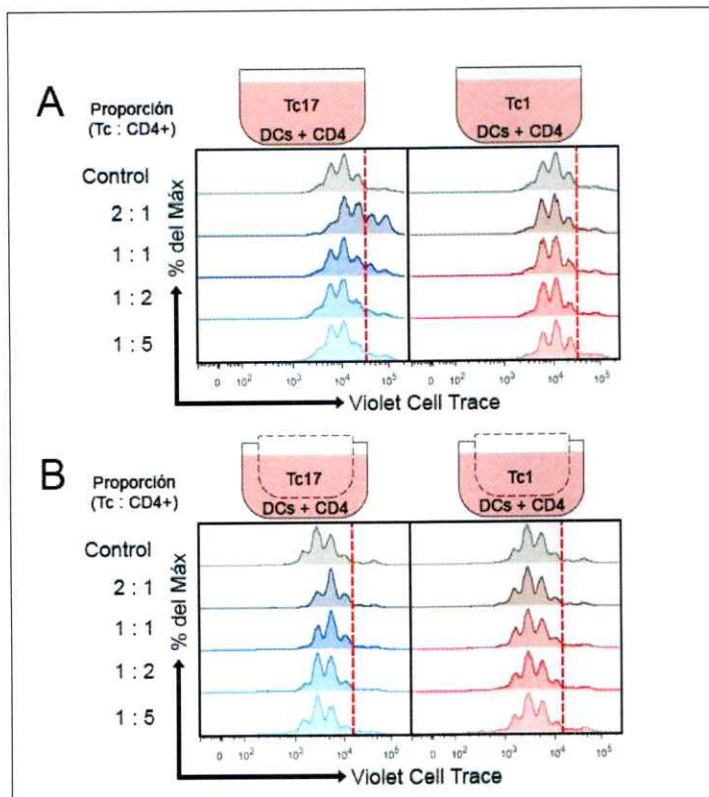


Figura 8. Las células Tc17 generadas *in vitro* retrasan la proliferación de linfocitos T CD4+ en forma contacto-dependiente. (A,B) Ensayo de supresión de la proliferación de linfocitos T CD4+ marcados con *Violet Cell Trace* activados por 96 hrs con células dendríticas y OVA₃₂₃₋₃₃₉, en presencia de linfocitos Tc17 (azul) o Tc1 (rojo) en distintas proporciones. Como control se activaron linfocitos T CD4+ en ausencia de células Tc (gris). (B) Ensayo de supresión en sistema *Transwell*. El esquema muestra la distribución de las células CD4+ y Tc1 o Tc17 presentes en el ensayo.

Para determinar si el retraso en la proliferación de los linfocitos T CD4 depende de la expresión de CD73 por parte de las células Tc17 se realizaron los ensayos en presencia de APCP, un inhibidor específico de CD73. En la figura 9A se muestra que la inhibición de CD73 no disminuye el retraso en la proliferación de los linfocitos T CD4+. Además, la adición de AMP, sustrato de CD73, tampoco incrementa el efecto supresor (figura 9B). Estos resultados sugieren que la expresión de CD73 en las células Tc17 no les confiere capacidad inmunosupresora.

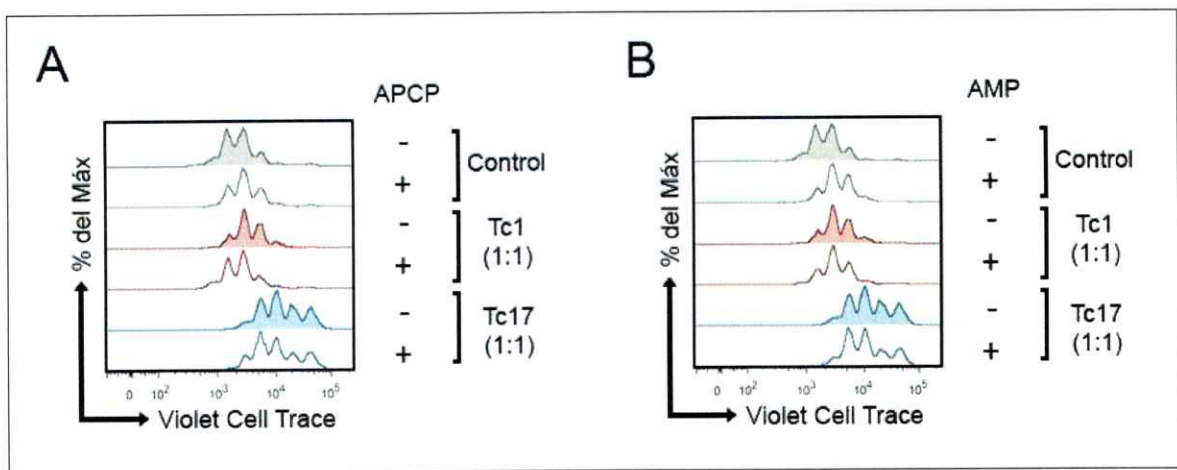


Figura 9. La expresión de CD73 no les confiere capacidad inmunosupresora a las células Tc17. Ensayo de supresión de la proliferación de linfocitos T CD4+ (ver sección 6.2.9 en materiales y métodos) en presencia de células Tc1 (rojo) ó Tc17 (azul) en proporción 1:1 (Tc:CD4+). (A) Ensayo de supresión en presencia (+) o ausencia (-) de APCP (500 μ M), un inhibidor de CD73. (B) Ensayo de supresión en presencia o ausencia de AMP exógeno (100 μ M), sustrato de CD73.

Con el fin de investigar las causas del retardo en la proliferación de los linfocitos T CD4+ determinamos el número de linfocitos T presentes al final del ensayo de supresión. Si bien al inicio del ensayo de supresión la cantidad de células Tc17 y de linfocitos T CD4+ era idéntica, al cabo de 96 horas las células Tc17 superan al número de linfocitos T CD4+ en $6,3 \pm 1,2$ veces (figura 10A). En cambio, la cantidad de células

Tc1 al final del ensayo es menor que la cantidad de linfocitos T CD4+ ($0,35 \pm 0,08$ veces) (figura 10A). Este efecto se debe en parte a que las células Tc17 se expanden 8,6 veces su número inicial, a diferencia de las células Tc1, que sólo se expanden 1,7 veces (figura 10B). Esta observación sumada a la dependencia de contacto célula-célula en el retardo de la proliferación de los linfocitos T CD4+ sugiere que el efecto inhibitorio puede deberse a una competencia por la co-estimulación de las células dendríticas. Para probar esta hipótesis realizamos un ensayo de proliferación agregando 8 veces más células Tc1 respecto de los linfocitos T CD4+. En la figura 10C se muestra que en esta condición experimental se produce un retardo en la proliferación de los linfocitos T CD4+ similar a la observada en presencia de células Tc17. Estos resultados sugieren que la inhibición en la proliferación observada en los linfocitos T CD4+ activados en presencia de células Tc17 sería más bien consecuencia de la alta tasa proliferativa de las células Tc17, y no de la presencia de un mecanismo inmunosupresor.

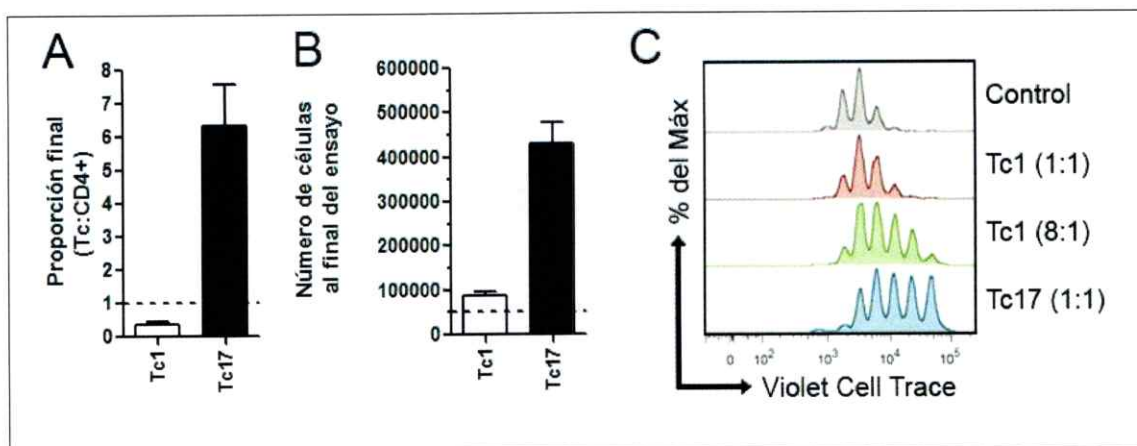


Figura 10. Las células Tc17 generadas *in vitro* retrasan la proliferación de linfocitos T CD4+ por competencia. Ensayo de supresión de la proliferación de linfocitos T CD4+ (ver sección 6.2.9 en materiales y métodos). (A) Proporción de células Tc:CD4+ luego de 96 hrs de co-cultivo. La línea punteada indica la proporción inicial (1:1) (n = 3). (B) Número de células Tc1 ó Tc17 luego de 96 horas de co-cultivo. La línea punteada indica el número de células Tc1 ó Tc17 iniciales (50.000) (n = 3). (C) Ensayo de supresión en presencia de células Tc1 en proporción 8:1 (Tc:CD4+).

7.4 Células Tc17 antígeno-específicas poseen actividad anti-tumoral contra un tumor establecido

Para determinar la función de las células Tc17 *in vivo*, realizamos una transferencia adoptiva de células Tc17 o Tc1 en ratones con tumor, y evaluamos la progresión del tamaño tumoral. Células Tc17 o Tc1 generadas *in vitro* desde un ratón OT-I se administraron vía intravenosa en ratones C57BL/6 portadores de tumores B16 modificados genéticamente para expresar la proteína exógena ovoalbúmina (B16-OVA). En este modelo, el tumor presenta el péptido OVA₂₅₇₋₂₆₄ en un contexto H2-K^b siendo capaz de activar a los linfocitos T CD8⁺ del ratón OT-I. La cinética de crecimiento tumoral de los ratones tratados con células Tc17 o Tc1 o vehículo (PBS) (Figura 11) muestra que las células Tc1 retardan eficientemente el crecimiento tumoral. Sorprendentemente, las células Tc17 también presentaron actividad anti-tumoral, siendo menos efectivas que las células Tc1 en combatir el crecimiento tumoral.

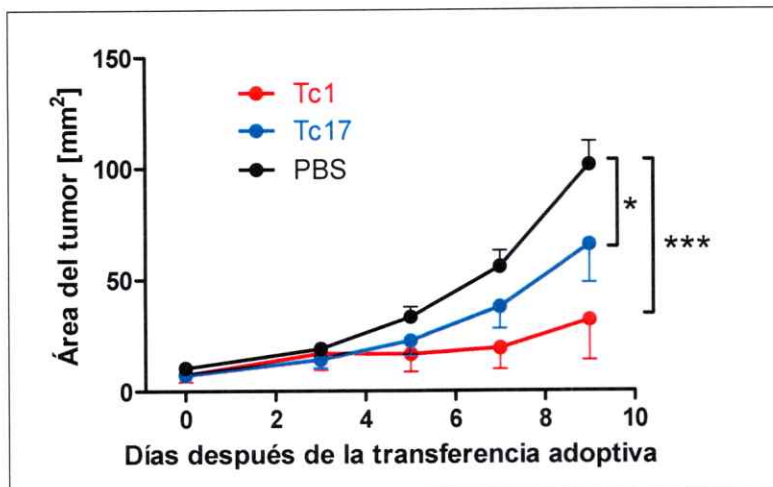


Figura 11. Las células Tc17 poseen capacidad anti-tumoral contra un tumor establecido. Ratones B6.SJL se inyectaron intradérmicamente con $0,4 \times 10^6$ células B16.OVA y después de 10 días se les transfirió intravenosamente 1×10^6 células Tc1 (rojo) o Tc17 (azul) generadas *in vitro* a partir de un ratón OT-I. Un grupo control fue inyectado con el vehículo (PBS). El área de los tumores fue monitoreada cada 2 o 3 días usando un pie de metro. Se muestra la media \pm SEM del área de los tumores luego de la transferencia adoptiva ($n \geq 8$ por grupo). * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$; ANOVA de dos vías.

7.5 En el microambiente tumoral las células Tc17 dan origen a células tipo Tc1 IFN- γ +GzmB⁺ y retienen la expresión de CD73

Puesto que las células Tc17 presentan actividad anti-tumoral y que de acuerdo a antecedentes de la literatura las células del linaje tipo 17 muestran plasticidad, decidimos evaluar la persistencia del fenotipo Tc17 de las células transferidas a los ratones con tumor. Las células transferidas fueron rastreadas gracias a la expresión del alelo CD45.2 expresado en los linfocitos OT-I, ya que las células endógenas de los ratones B6.SJL expresan el alelo CD45.1. En la figura 12A se muestra el porcentaje de células recuperadas luego de la transferencia de células Tc1 o Tc17 antígeno-específicas a ratones con tumor (B16.OVA), recolectadas desde el linfonodo drenante (TdLN) o desde el tumor 7 días después de la transferencia. No se observaron diferencias significativas en el tumor al comparar la frecuencia de células CD8a+CD45.2+ provenientes de las células Tc17 o Tc1 transferidas (figura 12A). En contraste, sólo la progenie de las células Tc17 transferidas fue capaz de movilizarse al órgano linfoide drenante (figura 12A), una característica propia de células T indiferenciadas (Klebanoff y col., 2005). Por otra parte, se observó que alrededor de un 50% de la progenie de las células Tc17 retienen el programa tipo 17, dado que mantienen la capacidad de producir IL-17 tanto en el TdLN como en el tumor (figura 12B). Sin embargo, en el microambiente tumoral alrededor de un 60% de ellas adquiere un fenotipo tipo Tc1, mostrando una alta expresión de IFN- γ (figura 12B), citoquina clásica del linaje tipo 1. Además, se observó que en el tumor alrededor de un 30% de la progenie de las células Tc17 adquiere propiedades citotóxicas (figura 12C), mientras que prácticamente toda la progenie de las células Tc1 es citotóxica (figura 12C). De esta forma, las células Tc17 pueden dar origen a más células Tc17, es decir autorenovarse. Además pueden dar origen a células efectoras tipo Tc1 (IFN-

γ +gzmB+), lo cual demuestra la multipotencialidad de las células Tc17 y les confiere propiedades anti-tumorales.

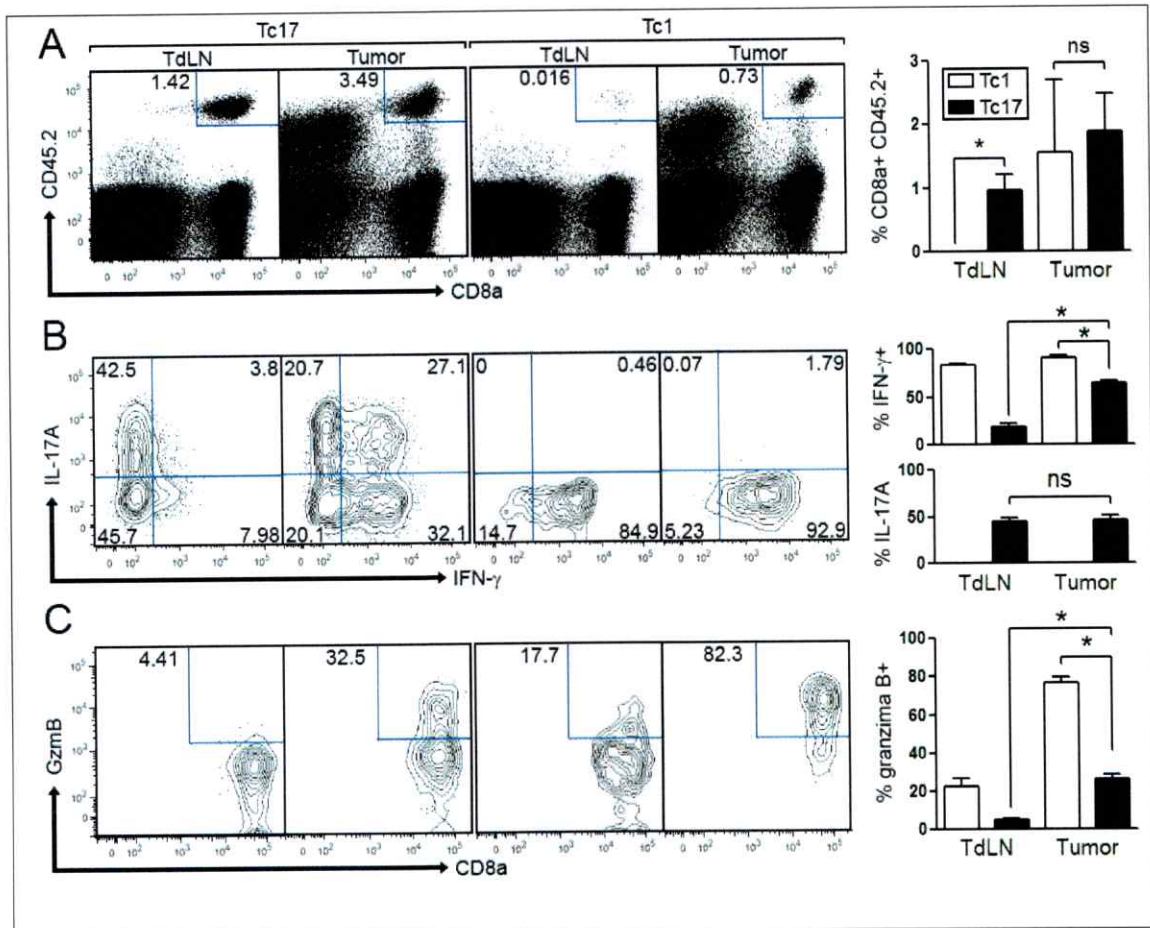


Figura 12. Las células Tc17 dan origen a células tipo Tc1 IFN- γ + gzmB+ en el tumor. Ratones B6.SJL (CD45.1+) se inyectaron intradérmicamente con $0,4 \times 10^6$ células B16.OVA y después de 10 días se les transfirió intravenosamente 1.0×10^6 células Tc1 o Tc17 generadas *in vitro* a partir de linfocitos T de un ratón OT-I (CD45.2+). Luego de 7 días se sacrificaron los ratones y se rastrearon las células transferidas en TdLN y tumor usando el marcador congénico CD45.2. Se muestra el porcentaje de las células transferidas recolectadas CD8a+CD45.2+ (A), y la expresión de IL-17A, IFN- γ (B) y granzima B (C) en la población de células transferidas. A la derecha se muestra la cuantificación de un experimento (n = 3-4). Las barras indican la media \pm SEM. ns, no significativo; *p<0,05; test de Mann-Whitney.

Por otra parte, la progenie de las células Tc17 transferidas mostró *in vivo* un fenotipo CD39-CD73+ (figura 13) similar al observado en las células Tc17 generadas *in vitro* (figura 6). Interesantemente, a pesar de retener la expresión de CD73 *in vivo*, las células Tc17 desempeñan un papel anti-tumoral (figura 11) al dar origen a células efectoras tipo Tc1 IFN- γ +gzmB+ (figura 12B,C). El conjunto de estos resultados confirman que la expresión de CD73 en las células Tc17 no está relacionada con propiedades inmunosupresoras.

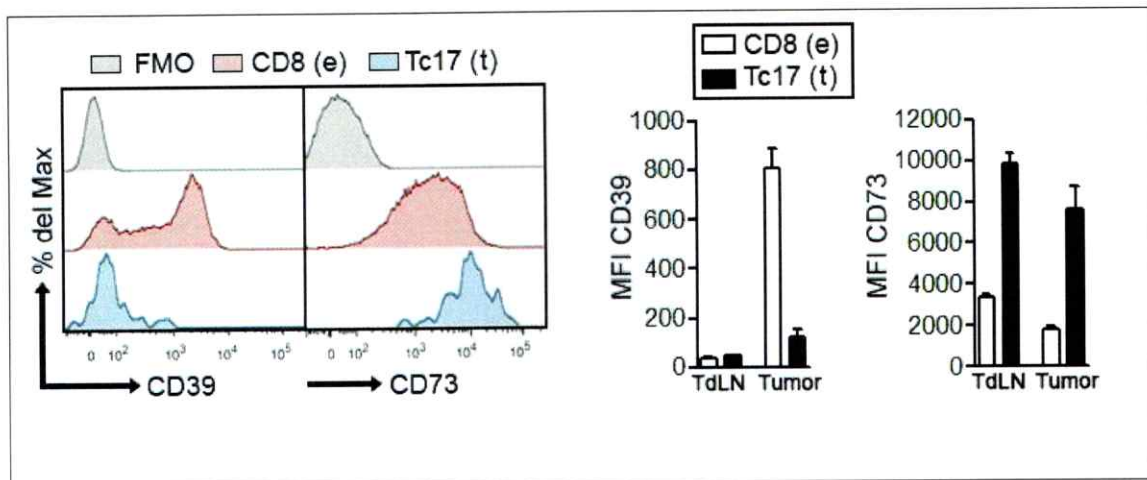


Figura 13. Las células Tc17 retienen la expresión de CD73 *in vivo*. Ratones B6.SJL se inyectaron intradérmicamente con $0,4 \times 10^6$ células B16.OVA y después de 10 días se les transfirió intravenosamente 1.0×10^6 células Tc17 generadas *in vitro* a partir de un ratón OT-I. Luego de 7 días se sacrificaron los ratones y se rastrearon las células transferidas en TdLN y tumor usando el marcador congénico CD45.2. A la izquierda se muestran histogramas de la expresión de CD39 y CD73 en la población de células CD8 endógenas (CD8a+CD45.2-) y en la población de células Tc17 transferidas (CD8a+CD45.2+) recolectadas desde el tumor. A la derecha se muestra la cuantificación de las medias de fluorescencia (MFI) para CD39 y CD73. Las barras indican la media \pm SEM (n = 3). (e): endógenas; (t): transferidas

8. Discusión

El cáncer es una enfermedad compleja que involucra interacciones entre el tumor y células del sistema inmune (Finn, 2008). Por una parte, el sistema inmune puede reaccionar contra antígenos tumorales generando una respuesta anti-tumoral que implica la eliminación de las células transformadas por células efectoras especializadas (Th1, Tc1, NK). Por otra parte, el tumor es capaz de evadir la respuesta inmune anti-tumoral manteniendo un microambiente inmunosupresor mediante la expresión y/o secreción de moléculas inmunomoduladoras (TGF- β , IL-10, IDO, adenosina) o mediante la atracción de células que activamente suprimen la respuesta efectora anti-tumoral (Tregs, MDSCs). Sin embargo, el papel que cumplen las células Tc17 en este escenario es aún controversial.

En este trabajo se observó un aumento significativo en la frecuencia de células Tc17 tanto en bazo como en TdLN de ratones con tumor con respecto a ratones sanos (figura 1). En acuerdo con esta idea, distintos reportes muestran la acumulación de células Tc17 en tumores de pacientes con cáncer y de modelos murinos de la enfermedad (Kryczek y col., 2007). Se ha reportado que en el microambiente tumoral existen altas concentraciones de citoquinas como TGF- β e IL-6, producidas por células dendríticas y monocitos entre otras, las cuales mediarían la inducción del programa Tc17. En acuerdo con esta idea, se ha demostrado que monocitos infiltrados en tumores de hígado y estómago pueden inducir la generación de linfocitos Tc17 mediante la secreción de las citoquinas IL-6, IL-1 β e IL-23 (Kuang y col., 2010; Zhuang y col., 2012). Sin embargo aún no hay suficiente evidencia para definir si las células Tc17 serían programadas en el tumor mismo, o si es que su acumulación sería más bien

consecuencia de un proceso de migración. En este sentido, se ha visto que las células Tc17 expresan los receptores de quimioquina CCR4 y CCR6 en tumores de hepáticos (Kuang y col., 2010) lo que les permitiría migrar en respuesta a las quimioquinas CCL22 y CCL20 respectivamente, ambas presentes en el microambiente tumoral (Viola y col., 2012).

Las células Tc17 han sido definidas como un linaje independiente de los clásicos linfocitos Tc1 citotóxicos. Una de las principales características funcionales que distingue a las células Tc17 es la carencia de actividad citotóxica. En este trabajo comprobamos que las células Tc17 endógenas de ratones sanos y de ratones con tumor, a diferencia de las células Tc1, no expresan granzima B luego de su activación (figura 2) confirmando que las células Tc17 cumplen un papel distinto a la eliminación directa de células transformadas. Por otra parte, la polarización *in vitro* de células CD8+ hacia el linaje Tc17 genera células que no expresan moléculas relacionadas a la actividad citotóxica como granzima B, perforina y CD107a (figura 6). Más aun, células Tc17 antígeno-específicas generadas *in vitro* no poseen actividad citotóxica contra células tumorales cargadas con el antígeno específico (figura 7). En acuerdo con estos resultados, otros estudios en ratones también han encontrado limitada actividad citotóxica en células Tc17 generadas *in vitro* (Huber y col., 2009; Hamada y col., 2009; Saxena y col., 2012; Yen y col., 2011) y en células Tc17 endógenas infiltradas al sistema nervioso central en el modelo murino de la esclerosis múltiple (EAE, por *Experimental Autoimmune Encephalomyelitis*) (Huber y col., 2009). Importantemente, se ha observado que células Tc17 infiltradas en tumores humanos de hígado y estómago no expresan los marcadores de citotoxicidad como granzima B, perforina y CD107a (Kuang y col., 2010; Zhuang y col., 2012).

Si bien las células Tc17 no poseen actividad citotóxica, existen estudios que las involucran con la respuesta anti-tumoral. El grupo de Restifo demostró que células Tc17 antígeno-específicas generadas *in vitro* carecen de actividad citotóxica y expresan niveles bajos de IFN- γ , sin embargo la transferencia adoptiva de estas células en conjunto con IL-2 recombinante permitió la eliminación de melanomas establecidos en ratones linfopénicos (Hinrichs y col., 2009). Los autores observaron que 5 días después de la transferencia adoptiva, la totalidad de las células transferidas adquirieron la capacidad de secretar IFN- γ adjudicándole a esta citoquina el efecto anti-tumoral (Hinrichs y col., 2009). Por otra parte, el grupo de Dutton demostró que células Tc17 antígeno-específicas son alrededor de 50 veces menos efectivas que células Tc1 en la erradicación de melanomas establecidos en ratones (Garcia-Hernandez y col., 2010). En este caso la eliminación del tumor demostró ser dependiente de la secreción de IL-17, IFN- γ y TNF- α por parte de las células Tc17 lo que indujo el reclutamiento de otras poblaciones efectoras (principalmente neutrófilos y macrófagos) capaces de combatir el tumor. Los autores concluyeron que las células Tc17 poseen una limitada capacidad anti-tumoral, cuyos mecanismos son en parte compartidos con las células Tc1 (por ejemplo la secreción de IFN- γ y TNF- α) sugiriendo que la transformación de las células Tc17 a un fenotipo Tc1 podría explicar su capacidad antitumoral (Garcia-Hernandez y col., 2010). En acuerdo con estos reportes, en este trabajo observamos que las células Tc17 antígeno-específicas generadas *in vitro* disminuyeron el crecimiento tumoral en un modelo murino de melanoma, siendo esta capacidad anti-tumoral menor en comparación con células Tc1 (figura 11). Las células Tc17 generadas *in vitro* producen TNF- α , además de IL-2 y GM-CSF (figura 5), citoquinas que estimulan la activación de linfocitos T y la maduración de células dendríticas, componentes importantes de la respuesta anti-

tumoral. Interesantemente se observó que luego de la transferencia adoptiva de células Tc17 en ratones con tumor, gran parte de las células transferidas adquieren el fenotipo Tc1 (IFN- γ + gzmB+) (figura 12B,C). Si bien las células Tc17 generadas *in vitro* no presentan actividad citotóxica *per se* (figura 6 y 7), la capacidad de dar origen a células citotóxicas tipo Tc1 podría explicar su capacidad anti-tumoral.

Cabe destacar que parte de las células transferidas también retuvo la capacidad de secretar IL-17 (figura 12B), renovando la población de células Tc17 progenitoras. Tanto la autorenovación como la multipotencialidad son características troncales propias de células T indiferenciadas. Actualmente es aceptado que la capacidad anti-tumoral de células T CD8+ se correlaciona inversamente con su estado de maduración, principalmente debido a que células terminalmente diferenciadas pierden la capacidad de autorenovarse y sobrevivir (Gattinoni y col., 2012). En un estudio realizado por el grupo de Restifo en linfocitos T CD4+, ellos demostraron que las células Th17 corresponden a un estado previo, menos diferenciado, y más troncal que las células Th1, siendo más efectivas en la erradicación de melanomas establecidos en ratón en comparación a células Th1 terminalmente diferenciadas. En este mismo estudio también mencionan que las células Tc17 generadas *in vitro* presentan un perfil transcripcional compatible con un estado menos diferenciado (Muranski y col., 2011). La capacidad de producir IL-2 también ha sido relacionada con estados menos diferenciados en células T, en contraste con células terminalmente diferenciadas que pierden esta capacidad (Gattinoni y col., 2012). En este trabajo, se observó que las células Tc17 producen mayores niveles de IL-2 que las células Tc1 (figura 5) apoyando la hipótesis que las células Tc17 corresponden a un estado menos diferenciado que las células Tc1. Por otra parte, observamos que sólo las células Tc17 migran al órgano linfoide drenante del tumor

(figura 12A), donde podrían entrar en contacto con células dendríticas y de esta manera ser activadas. Este patrón de migración es propio de células CD8+ menos diferenciadas, como las células de memoria, y ha sido relacionado en estudios previos a mayor efectividad en esquemas de inmunoterapia celular anti-tumoral (Klebanoff y col., 2005). Sin embargo, las células Tc17 son menos efectivas que las células Tc1 para erradicar tumores establecidos, lo que podría explicarse por el tiempo que tardan las células Tc17 en dar origen a células Tc1.

En contraste con la hipótesis que las células Tc17 contribuirían a la eliminación del tumor, otros autores convergen en que las células Tc17 por su naturaleza pro-inflamatoria y no citotóxica estarían más bien favoreciendo el crecimiento tumoral, por ejemplo mediante la actividad pro-angiogénica de la IL-17 (Zhang y col., 2014) o el reclutamiento de poblaciones inmunosupresoras como MDSC al microambiente tumoral (Zhuang y col., 2012). Recientemente, se ha reportado la existencia de linfocitos Th17 regulatorios, capaces de inhibir la activación de la respuesta inmune por ejemplo mediante la secreción de IL-10 (Esplugues y col., 2011). En este trabajo en cambio, se observó que las células Tc17 generadas *in vitro* producen bajos niveles de IL-10 (figura 5), comparables a los secretados por células Tc1 efectoras. De la misma forma, las células Tc17 mostraron niveles de expresión similares a las células Tc1 en moléculas inhibitorias como LAG3, CTLA4, PD-1 y PDL-1 (figura 6).

Por otra parte, el grupo de Ghiringhelli caracterizó una población de células Th17 regulatorias, las que mediante la expresión de las ectonucleotidasas CD39 y CD73 generarían adenosina extracelular, molécula inmunosupresora capaz de inhibir la respuesta inmune anti-tumoral (Chalmin y col., 2012). En este seminario se observó que células Tc17 endógenas de ratones sanos y de ratones con tumor poseen una expresión

significativamente mayor de las ectonucleotidasas CD39 y CD73 en comparación a las células Tc1 endógenas (figura 3). En acuerdo con esto, las células Tc17 polarizadas *in vitro* expresan mayores niveles de CD73 que las células Tc1 generadas *in vitro*, sin embargo expresan menores niveles de CD39 en comparación a las células Tc1 (figura 6). Además observamos que *in vivo* las células Tc17 mantienen la expresión de CD73 luego de la transferencia adoptiva en ratones con tumor (figura 13). En un trabajo anterior se demostró que la expresión de CD39 y CD73 puede ser inducida por TGF- β e IL-6, citoquinas claves en la polarización hacia el linaje 17 (Chalmin y col., 2012). La IL-6 induce la activación del factor transcripcional STAT3 en linfocitos T CD4+, que a su vez promueve la expresión de CD39 y CD73 a nivel transcripcional por unión directa a sus promotores. Por su parte, TGF- β induce la inhibición de la expresión de Gfi-1, un represor de la expresión de CD39 y CD73 (Chalmin y col., 2012). Dado que TGF- β e IL-6 son las citoquinas que inducen el programa Tc17, es esperable que el mismo mecanismo opere en estas células para incrementar la expresión de CD39 y CD73 en su superficie. Por otra parte, se ha demostrado que la activación de linfocitos T *in vitro* induce la expresión de CD39 (Regateiro y col., 2011) lo que explicaría el aumento de CD39 en las células Tc1 generadas *in vitro*.

Tanto CD39 como CD73 son altamente expresadas en la superficie de linfocitos Tregs y Th17 regulatorios, siendo la generación de adenosina extracelular uno de los mecanismos utilizados por estos linfocitos para cumplir su función regulatoria (Whiteside y col., 2011; Deaglio y col., 2007; Romio y col., 2011; Chalmin y col., 2012). La adenosina extracelular es percibida por diversos tipos celulares y señala a través de 4 receptores acoplados a proteínas G denominados A1, A2A, A2B y A3. La activación del receptor A2A en linfocitos T resulta en la activación de la enzima adenilato ciclasa

incrementándose los niveles intracelulares de AMP cíclico, lo que conlleva a la inhibición de: (i) la proliferación (Huang y col., 1997), (ii) la secreción de citoquinas como IL-2 e IFN- γ (Lappas y col., 2005) y (iii) la función citotóxica (Raskovalova y col., 2007). En relación con lo anterior, en este trabajo se observó que las células Tc17 generadas *in vitro* pueden retardar la proliferación de linfocitos T CD4+ aunque mediante un mecanismo dependiente de contacto célula-célula (figura 8). Además, ni la inhibición farmacológica de CD73 ni la adición de AMP (sustrato de CD73) afectaron la capacidad inhibitoria de las células Tc17 (figura 9), descartando que la generación de adenosina extracelular vía CD73 contribuya al mecanismo de inmunosupresión de estas células. Por otra parte, observamos que al final del ensayo las células Tc17 se expandieron hasta 8 veces su número inicial, mientras que las células Tc1 mantuvieron su número (figura 10A,B). Es posible que la inhibición en la activación de los linfocitos T CD4+ observada en presencia de células Tc17 se deba a una limitación espacial en el contacto de los linfocitos CD4+ con las células dendríticas, fenómeno conocido como *cold target inhibition* y reportado en ensayos de supresión *in vitro* similares (Szymczak-Workman y col., 2009). Esta hipótesis fue confirmada con los ensayos realizados con una alta proporción de células Tc1 (figura 10C). Estos resultados demuestran que la expresión de CD73 en la superficie de las células Tc17 no les otorga propiedades inmunosupresoras. Además, el hecho que las células Tc17 mantengan la expresión de CD73 luego de la transferencia adoptiva (figura 13) aun cuando desempeñan un rol anti-tumoral (figura 11), descarta que CD73 les confiera capacidad inmunosupresora a las células Tc17. Sin embargo, más experimentos son necesarios para dilucidar el papel que cumpliría la ectonucleotidasa CD73 en los linfocitos Tc17.

9. Resumen de resultados

- Existe una acumulación de células Tc17 en órganos linfoides de ratones con tumor en comparación con ratones sanos.
- Las células Tc17 endógenas de ratones sanos y con tumor no expresan granzima B, a diferencia de las células Tc1 endógenas. Al mismo tiempo, expresan niveles significativamente mayores de las ectonucleotidasas CD39 y CD73 en comparación con células Tc1.
- Células Tc17 generadas *in vitro* producen menores niveles de IL-10 y poseen mayores niveles de CD73 que células Tc1 generadas *in vitro*. Además, secretan un patrón de citoquinas distinto a las células Tc1, que incluye IL-17, IL-2, TNF- α y GM-CSF.
- A diferencia de las células Tc1, las células Tc17 generadas *in vitro* no poseen actividad citotóxica contra células tumorales cargadas de antígeno.
- Las células Tc17 generadas *in vitro* no son capaces de suprimir la proliferación de linfocitos T CD4 *in vitro*.
- La transferencia adoptiva de células Tc17 antígeno-específicas en ratones con tumor produce una desaceleración del crecimiento tumoral.
- Luego de la transferencia adoptiva de células Tc17 a ratones con tumor, las células Tc17 retienen la capacidad de migrar al órgano linfoide drenante.

- En el microambiente tumoral alrededor de un 60% de las células Tc17 transferidas se transforman a células productoras de IFN- γ , mientras que un 30% adquiere expresión de granzima B.
- En el microambiente tumoral, las células Tc17 transferidas retienen la expresión de CD73.

10. Conclusiones

En conjunto, los resultados expuestos en este seminario de título demuestran que las células Tc17 secretan citoquinas anti-tumorales (IL-2, TNF- α , GM-CSF) y dan origen a linfocitos T efectores citotóxicos (tipo Tc1) IFN- γ + gzmB+ contribuyendo de esta forma a la respuesta inmune antitumoral. Por otra parte, las células Tc17 expresan altos niveles de la ectonucleotidasa CD73, sin embargo carecen de capacidad inmunosupresora. En conclusión, las células Tc17 presentan un fenotipo troncal, siendo capaces de persistir en los órganos linfoides, de autorenovarse, y de dar origen a células efectoras tipo Tc1 con propiedades anti-tumorales. Estas características abren nuevos horizontes para el diseño de inmunoterapias anti-tumorales más efectivas.

11. Bibliografía

- Azimi, F., R. a Scolyer, P. Rumcheva, M. Moncrieff, R. Murali, S.W. McCarthy, R.P. Saw, and J.F. Thompson. 2012. Tumor-infiltrating lymphocyte grade is an independent predictor of sentinel lymph node status and survival in patients with cutaneous melanoma. *J. Clin. Oncol.* 30:2678–83.
- Bates, G.J., S.B. Fox, C. Han, R.D. Leek, J.F. Garcia, A.L. Harris, and A.H. Banham. 2006. Quantification of regulatory T cells enables the identification of high-risk breast cancer patients and those at risk of late relapse. *J. Clin. Oncol.* 24:5373–80.
- Broek, B.M.E. Van Den, K. David, F. Ossendorpfl, R.T. Spirosvamvakas, W.K. Lutz, C.J.M. Melieffl, R.M. Zinkernagel, and H. Hengartner. 1996. Decreased tumor surveillance in perforin-deficient mice. *J. Exp. Med.* 184:1781–90.
- Brucklacher-Waldert, V., K. Steinbach, M. Lioznov, M. Kolster, C. Hölscher, and E. Tolosa. 2009. Phenotypical characterization of human Th17 cells unambiguously identified by surface IL-17A expression. *J. Immunol.* 183:5494–501.
- Burnet, S.M. 1957. Cancer - A biological approach. *Br. Med. J.* 1:841–847.
- Chalmin, F., G. Mignot, M. Bruchard, A. Chevriaux, F. Végran, A. Hichami, S. Ladoire, V. Derangère, J. Vincent, D. Masson, S.C. Robson, G. Eberl, J.R. Pallandre, C. Borg, B. Ryffel, L. Apetoh, C. Rébé, and F. Ghiringhelli. 2012. Stat3 and Gfi-1 transcription factors control Th17 cell immunosuppressive activity via the regulation of ectonucleotidase expression. *Immunity.* 36:362–73.
- Curiel, T.J., G. Coukos, L. Zou, X. Alvarez, P. Cheng, P. Mottram, M. Evdemon-Hogan, J.R. Conejo-Garcia, L. Zhang, M. Burow, Y. Zhu, S. Wei, I. Kryczek, B. Daniel, A. Gordon, L. Myers, A. Lackner, M.L. Disis, K.L. Knutson, L. Chen, and W. Zou. 2004. Specific recruitment of regulatory T cells in ovarian carcinoma fosters immune privilege and predicts reduced survival. *Nat. Med.* 10:942–9.
- Deaglio, S., K.M. Dwyer, W. Gao, D. Friedman, A. Usheva, A. Erat, J.-F. Chen, K. Enyoloji, J. Linden, M. Oukka, V.K. Kuchroo, T.B. Strom, and S.C. Robson. 2007. Adenosine generation catalyzed by CD39 and CD73 expressed on regulatory T cells mediates immune suppression. *J. Exp. Med.* 204:1257–65.
- Diaz-Montero, C.M., M.L. Salem, M.I. Nishimura, E. Garrett-Mayer, A. David J. Cole, and A.J. Montero. 2009. Increased circulating myeloid-derived suppressor cells correlate with clinical cancer stage, metastatic tumor burden, and doxorubicin–cyclophosphamide chemotherapy. *Cancer Immunol. Immunother.* 58:49–59.
- Dighe, a S., E. Richards, L.J. Old, and R.D. Schreiber. 1994. Enhanced in vivo growth and resistance to rejection of tumor cells expressing dominant negative IFN gamma receptors. *Immunity.* 1:447–56.

- Dunn, G.P., A.T. Bruce, H. Ikeda, L.J. Old, and R.D. Schreiber. 2002. Cancer immunoeediting : from immuno- surveillance to tumor escape. *Nat. Immunol.* 3:991–998.
- Esplugues, E., S. Huber, N. Gagliani, A.E. Hauser, T. Town, Y.Y. Wan, W. O'Connor, A. Rongvaux, N. Van Rooijen, A.M. Haberman, Y. Iwakura, V.K. Kuchroo, J.K. Kolls, J. a Bluestone, K.C. Herold, and R. a Flavell. 2011. Control of TH17 cells occurs in the small intestine. *Nature.* 475:514–8.
- Finn, O.J. 2008. Cancer Immunology. *N. Engl. J. Med.* 358:2704–14.
- Galon, J., A. Costes, F. Sanchez-Cabo, A. Kirilovsky, B. Mlecnik, C. Lagorce-Pagès, M. Tosolini, M. Camus, A. Berger, P. Wind, F. Zinzindohoué, P. Bruneval, P.-H. Cugnenc, Z. Trajanoski, W.-H. Fridman, and F. Pagès. 2006. Type, density, and location of immune cells within human colorectal tumors predict clinical outcome. *Science.* 313:1960–4.
- Garcia-Hernandez, M.D.L.L., H. Hamada, J.B. Reome, S.K. Misra, M.P. Tighe, and R.W. Dutton. 2010. Adoptive transfer of tumor-specific Tc17 effector T cells controls the growth of B16 melanoma in mice. *J. Immunol.* 184:4215–27.
- Gattinoni, L., C. a Klebanoff, and N.P. Restifo. 2012. Paths to stemness: building the ultimate antitumour T cell. *Nat. Rev. Cancer.* 12:671–84.
- Griffiths, R.W., E. Elkord, D.E. Gilham, V. Ramani, N. Clarke, P.L. Stern, and R.E. Hawkins. 2007. Frequency of regulatory T cells in renal cell carcinoma patients and investigation of correlation with survival. *Cancer Immunol. Immunother.* 56:1743–53.
- Grivennikov, S.I., F.R. Greten, and M. Karin. 2010. Immunity, inflammation, and cancer. *Cell.* 140:883–99.
- Hamada, H., M.D.L.L. Garcia-Hernandez, J.B. Reome, S.K. Misra, T.M. Strutt, K.K. McKinstry, A.M. Cooper, S.L. Swain, and R.W. Dutton. 2009. Tc17, a unique subset of CD8 T cells that can protect against lethal influenza challenge. *J. Immunol.* 182:3469–81.
- Hanahan, D., and R. a Weinberg. 2011. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell.* 144:646–74.
- Hanahan, D., and R.A. Weinberg. 2000. The Hallmarks of Cancer. *Cell.* 100:57–70.
- Hinrichs, C.S., A. Kaiser, C.M. Paulos, L. Cassard, L. Sanchez-Perez, B. Heemskerk, C. Wrzesinski, Z. a Borman, P. Muranski, and N.P. Restifo. 2009. Type 17 CD8+ T cells display enhanced antitumor immunity. *Blood.* 114:596–9.

- Huang, S., S. Apasov, M. Koshiba, and M. Sitkovsky. 1997. Role of A2a extracellular adenosine receptor-mediated signaling in adenosine-mediated inhibition of T-cell activation and expansion. *Blood*. 90:1600–10.
- Huber, M., S. Heink, H. Grothe, A. Guralnik, K. Reinhard, K. Elflein, T. Hünig, H.-W. Mittrücker, A. Brüstle, T. Kamradt, and M. Lohoff. 2009. A Th17-like developmental process leads to CD8(+) Tc17 cells with reduced cytotoxic activity. *Eur. J. Immunol.* 39:1716–25.
- Kärre K, Ljunggren HG, Piontek G, and Kiessling R. 1986. Selective rejection of H-2-deficient lymphoma variants suggests alternative immune defence strategy. *Nature*. 319:675–8.
- Klebanoff, C.A., L. Gattinoni, P. Torabi-parizi, K. Kerstann, A.R. Cardones, S.E. Finkelstein, D.C. Palmer, P.A. Antony, S.T. Hwang, S.A. Rosenberg, T.A. Waldmann, and N.P. Restifo. 2005. Central memory self Tumor-reactive CD8 γ T cells confer superior antitumor immunity compared with effector memory T cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102:9571–9576.
- Komiyama, Y., S. Nakae, T. Matsuki, a. Nambu, H. Ishigame, S. Kakuta, K. Sudo, and Y. Iwakura. 2006. IL-17 Plays an Important Role in the Development of Experimental Autoimmune Encephalomyelitis. *J. Immunol.* 177:566–573.
- Kryczek, I., M. Banerjee, P. Cheng, L. Vatan, W. Szeliga, S. Wei, E. Huang, E. Finlayson, D. Simeone, T.H. Welling, A. Chang, G. Coukos, R. Liu, and W. Zou. 2009. Phenotype, distribution, generation, and functional and clinical relevance of Th17 cells in the human tumor environments. *Blood*. 114:1141–9.
- Kryczek, I., S. Wei, L. Zou, S. Altuwaijri, W. Szeliga, J. Kolls, A. Chang, and W. Zou. 2007. Cutting edge: Th17 and regulatory T cell dynamics and the regulation by IL-2 in the tumor microenvironment. *J. Immunol.* 178:6730–3.
- Kuang, D.-M., C. Peng, Q. Zhao, Y. Wu, L.-Y. Zhu, J. Wang, X.-Y. Yin, L. Li, and L. Zheng. 2010. Tumor-activated monocytes promote expansion of IL-17-producing CD8⁺ T cells in hepatocellular carcinoma patients. *J. Immunol.* 185:1544–9.
- Lappas, C.M., J.M. Rieger, and J. Linden. 2005. A2A Adenosine Receptor Induction Inhibits IFN- Production in Murine CD4⁺ T Cells. *J. Immunol.* 174:1073–80.
- Mahmoud, S.M. a, E.C. Paish, D.G. Powe, R.D. Macmillan, M.J. Grainge, A.H.S. Lee, I.O. Ellis, and A.R. Green. 2011. Tumor-infiltrating CD8⁺ lymphocytes predict clinical outcome in breast cancer. *J. Clin. Oncol.* 29:1949–55.
- Martin-Orozco, N., P. Muranski, Y. Chung, X.O. Yang, T. Yamazaki, S. Lu, P. Hwu, N.P. Restifo, W.W. Overwijk, and C. Dong. 2009. T helper 17 cells promote cytotoxic T cell activation in tumor immunity. *Immunity*. 31:787–98.

- McGeachy, M.J., K.S. Bak-Jensen, Y. Chen, C.M. Tato, W. Blumenschein, T. McClanahan, and D.J. Cua. 2007. TGF-beta and IL-6 drive the production of IL-17 and IL-10 by T cells and restrain T(H)-17 cell-mediated pathology. *Nat. Immunol.* 8:1390-7.
- Muranski, P., A. Boni, P. Antony, L. Cassard, K.R. Irvine, A. Kaiser, C.M. Paulos, D.C. Palmer, C.E. Touloukian, K. Ptak, L. Gattinoni, C. Wrzesinski, C.S. Hinrichs, K.W. Kerstann, L. Feigenbaum, C.-C. Chan, and N.P. Restifo. 2008. Tumor-specific Th17-polarized cells eradicate large established melanoma. *Blood.* 112:362-73.
- Muranski, P., Z. Borman, S.P. Kerkar, C. Klebanoff, Y. Ji, L. Sanchez-Perez, M. Sukumar, R.N. Reger, Z. Yu, S.J. Kern, R. Roychoudhuri, G. Ferreyra, W. Shen, S.K. Durum, L. Feigenbaum, D.C. Palmer, P. Antony, C.-C. Chan, A. Laurence, R.L. Danner, L. Gattinoni, and N.P. Restifo. 2011. Th17 cells are long lived and retain a stem cell-like molecular signature. *Immunity.* 35:972-85.
- Murphy, K.M., and S.L. Reiner. 2002. The lineage decisions of helper T cells. *Nat. Rev. Immunol.* 2:933-44.
- Nagaraj, S., K. Gupta, V. Pisarev, L. Kinarsky, S. Sherman, L. Kang, D.L. Herber, J. Schneck, and D.I. Gabrilovich. 2007. Altered recognition of antigen is a mechanism of CD8+ T cell tolerance in cancer. *Nat. Med.* 13:828-35.
- Numasaki, M., J. Fukushi, M. Ono, S.K. Narula, P.J. Zavodny, T. Kudo, P.D. Robbins, H. Tahara, and M.T. Lotze. 2003. Interleukin-17 promotes angiogenesis and tumor growth. *Blood.* 101:2620-7.
- Numasaki, M., M. Watanabe, T. Suzuki, H. Takahashi, a. Nakamura, F. McAllister, T. Hishinuma, J. Goto, M.T. Lotze, J.K. Kolls, and H. Sasaki. 2005. IL-17 Enhances the Net Angiogenic Activity and In Vivo Growth of Human Non-Small Cell Lung Cancer in SCID Mice through Promoting CXCR-2-Dependent Angiogenesis. *J. Immunol.* 175:6177-6189.
- Nuñez, S., J.J. Saez, D. Fernandez, F. Flores-Santibañez, K. Alvarez, G. Tejon, P. Ruiz, P. Maldonado, Y. Hidalgo, V. Manriquez, M.R. Bono, M. Roseblatt, and D. Sauma. 2012. Th17 cells contribute to anti-tumor immunity and promote the recruitment of th1 cells to the tumor. *Immunology.* 139:61-71.
- O'Quinn, D.B., M.T. Palmer, Y.K. Lee, and C.T. Weaver. 2008. Emergence of the Th17 pathway and its role in host defense. *In Advances in immunology.* Elsevier Inc. 115-63.
- Perrone, G., P.A. Ruffini, V. Catalano, C. Spino, D. Santini, P. Mureto, C. Spoto, C. Zingaretti, V. Sisti, P. Alessandrini, P. Giordani, A. Cicetti, S. D'Emidio, S. Morini, A. Ruzzo, M. Magnani, G. Tonini, C. Rabitti, and F. Graziano. 2008. Intratumoral FOXP3-positive regulatory T cells are associated with adverse prognosis in radically resected gastric cancer. *Eur. J. Cancer.* 44:1875-82.

- Rabinovich, G.A., D. Gabrilovich, and E.M. Sotomayor. 2007. Immunosuppressive Strategies That Are Mediated By Tumor Cells. *Annu Rev Immunol.* 25:267–296.
- Raskovalova, T., A. Lokshin, X. Huang, Y. Su, M. Mandic, H.M. Zarour, E.K. Jackson, and E. Gorelik. 2007. Inhibition of cytokine production and cytotoxic activity of human antimelanoma specific CD8+ and CD4+ T lymphocytes by adenosine-protein kinase A type I signaling. *Cancer Res.* 67:5949–56.
- Regateiro, F.S., D. Howie, K.F. Nolan, E.I. Agorogiannis, D.R. Greaves, S.P. Cobbold, and H. Waldmann. 2011. Generation of anti-inflammatory adenosine by leukocytes is regulated by TGF- β . *Eur. J. Immunol.* 41:2955–65.
- Res, P.C.M., G. Piskin, O.J. de Boer, C.M. van der Loos, P. Teeling, J.D. Bos, and M.B.M. Teunissen. 2010. Overrepresentation of IL-17A and IL-22 producing CD8 T cells in lesional skin suggests their involvement in the pathogenesis of psoriasis. *PLoS One.* 5:e14108.
- Rodriguez, P.C., D.G. Quiceno, J. Zabaleta, B. Ortiz, A.H. Zea, M.B. Piazuelo, A. Delgado, P. Correa, J. Brayer, E.M. Sotomayor, S. Antonia, J.B. Ochoa, and A.C. Ochoa. 2004. Arginase I Production in the Tumor Microenvironment by Mature Myeloid Cells Inhibits T-Cell Receptor Expression and Antigen-Specific T-Cell Responses. *Cancer Res.* 64:5839–5849.
- Romio, M., B. Reinbeck, S. Bongardt, S. Hüls, S. Burghoff, and J. Schrader. 2011. Extracellular purine metabolism and signaling of CD73-derived adenosine in murine Treg and Teff cells. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 301:C530–9.
- Rusakiewicz, S., M. Semeraro, M. Sarabi, M. Desbois, C. Locher, R. Mendez, N. Vimond, A. Concha, F. Garrido, N. Isambert, L. Chaigneau, V. Le Brun-Ly, P. Dubreuil, I. Cremer, A. Caignard, V. Poirier-Colame, K. Chaba, C. Flament, N. Halama, D. Jäger, A. Eggermont, S. Bonvalot, F. Commo, P. Terrier, P. Opolon, J.-F. Emile, J.-M. Coindre, G. Kroemer, N. Chaput, A. Le Cesne, J.-Y. Blay, and L. Zitvogel. 2013. Immune infiltrates are prognostic factors in localized gastrointestinal stromal tumors. *Cancer Res.* 73:3499–510.
- Saxena, A., S. Desbois, N. Carrié, M. Lawand, L.T. Mars, and R.S. Liblau. 2012. Tc17 CD8+ T Cells Potentiate Th1-Mediated Autoimmune Diabetes in a Mouse Model. *J. Immunol.* 189:3140–9.
- Schroder, K., P.J. Hertzog, T. Ravasi, and D.A. Hume. 2004. Interferon- γ : an overview of signals, mechanisms and functions. *J. Leukoc. Biol.* 75:163–89.
- Sfanos, K.S., T.C. Bruno, C.H. Maris, L. Xu, C.J. Thoburn, A.M. DeMarzo, A.K. Meeker, W.B. Isaacs, and C.G. Drake. 2008. Phenotypic analysis of prostate-infiltrating lymphocytes reveals TH17 and Treg skewing. *Clin. Cancer Res.* 14:3254–61.
- Shrikant, P. a, R. Rao, Q. Li, J. Kesterson, C. Eppolito, A. Mischo, and P. Singhal. 2010. Regulating functional cell fates in CD8 T cells. *Immunol. Res.* 46:12–22.

- Smyth, M.J., J. Swann, E. Cretney, N. Zerafa, W.M. Yokoyama, and Y. Hayakawa. 2005. NKG2D function protects the host from tumor initiation. *J. Exp. Med.* 202:583–8.
- Su, X., J. Ye, E.C. Hsueh, Y. Zhang, D.F. Hoft, and G. Peng. 2010. Tumor microenvironments direct the recruitment and expansion of human Th17 cells. *J. Immunol.* 184:1630–41.
- Szymczak-Workman, A.L., C.J. Workman, and D. a a Vignali. 2009. Cutting edge: regulatory T cells do not require stimulation through their TCR to suppress. *J. Immunol.* 182:5188–92.
- Teng, M.W.L., J.B. Swann, B. von Scheidt, J. Sharkey, N. Zerafa, N. McLaughlin, T. Yamaguchi, S. Sakaguchi, P.K. Darcy, and M.J. Smyth. 2010. Multiple antitumor mechanisms downstream of prophylactic regulatory T-cell depletion. *Cancer Res.* 70:2665–74.
- Trapani, J. a, and M.J. Smyth. 2002. Functional significance of the perforin/granzyme cell death pathway. *Nat. Rev. Immunol.* 2:735–47.
- Tsai, J.-P., M.-H. Lee, S.-C. Hsu, M.-Y. Chen, S.-J. Liu, J.T. Chang, C.-T. Liao, A.-J. Cheng, P. Chong, C.-L. Chu, C.-R. Shen, and H.-W. Chen. 2012. CD4+ T Cells Disarm or Delete Cytotoxic T Lymphocytes under IL-17-Polarizing Conditions. *J. Immunol.* 189:1671–9.
- Tzartos, J.S., M. a Friese, M.J. Craner, J. Palace, J. Newcombe, M.M. Esiri, and L. Fugger. 2008. Interleukin-17 production in central nervous system-infiltrating T cells and glial cells is associated with active disease in multiple sclerosis. *Am. J. Pathol.* 172:146–55.
- Vignali, D. a a, L.W. Collison, and C.J. Workman. 2008. How regulatory T cells work. *Nat. Rev. Immunol.* 8:523–32.
- Viola, A., A. Sarukhan, V. Bronte, and B. Molon. 2012. The pros and cons of chemokines in tumor immunology. *Trends Immunol.* 33:496–504.
- Whiteside, T.L., M. Mandapathil, and P. Schuler. 2011. The Role of the Adenosinergic Pathway in Immunosuppression Mediated by Human Regulatory T Cells (Treg). *Curr. Med. Chem.* 18:5217–5223.
- Wolchok, J.D., F.S. Hodi, J.S. Weber, J.P. Allison, W.J. Urba, C. Robert, S.J. O'Day, A. Hoos, R. Humphrey, D.M. Berman, N. Lonberg, and A.J. Korman. 2013. Development of ipilimumab: a novel immunotherapeutic approach for the treatment of advanced melanoma. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1291:1–13.

- Wu, P., D. Wu, C. Ni, J. Ye, W. Chen, G. Hu, Z. Wang, C. Wang, Z. Zhang, W. Xia, Z. Chen, K. Wang, T. Zhang, J. Xu, Y. Han, T. Zhang, X. Wu, J. Wang, W. Gong, S. Zheng, F. Qiu, J. Yan, and J. Huang. 2014. $\gamma\delta$ T17 Cells Promote the Accumulation and Expansion of Myeloid-Derived Suppressor Cells in Human Colorectal Cancer. *Immunity*. 17:1–16.
- Yen, H., T.J. Harris, S. Wada, J.F. Grosso, D. Getnet, M. V Goldberg, K. Liang, T.C. Bruno, K.J. Pyle, S. Chan, A. Anders, C.L. Trimble, A.J. Adler, T. Lin, D.M. Pardoll, C. Huang, and C.G. Drake. 2011. Tc17 CD8 T Cells: Functional Plasticity and Subset Diversity. *J. Immunol.* 183:7161–7168.
- Zarek, P.E., C.-T. Huang, E.R. Lutz, J. Kowalski, M.R. Horton, J. Linden, C.G. Drake, and J.D. Powell. 2008. A2A receptor signaling promotes peripheral tolerance by inducing T-cell anergy and the generation of adaptive regulatory T cells. *Blood*. 111:251–9.
- Zhang, L., J.R. Conejo-Garcia, D. Katsaros, P. a Gimotty, M. Massobrio, G. Regnani, A. Makrigiannakis, H. Gray, K. Schlienger, M.N. Liebman, S.C. Rubin, and G. Coukos. 2003. Intratumoral T cells, recurrence, and survival in epithelial ovarian cancer. *N. Engl. J. Med.* 348:203–13.
- Zhang, Y., F. Hou, X. Liu, D. Ma, Y. Zhang, B. Kong, and B. Cui. 2014. Tc17 cells in patients with uterine cervical cancer. *PLoS One*. 9:e86812.
- Zhuang, Y., L.-S. Peng, Y.-L. Zhao, Y.Y. Shi, X.-H. Mao, W. Chen, K.C. Pang, X.-F. Liu, T. Liu, J.-Y. Zhang, H. Zeng, K.-Y. Liu, G. Guo, W.-D. Tong, Y.Y. Shi, B. Tang, N. Li, S. Yu, P. Luo, W.-J. Zhang, D.-S. Lu, P.-W. Yu, and Q.-M. Zou. 2012. CD8(+) T Cells That Produce Interleukin-17 Regulate Myeloid-Derived Suppressor Cells and Are Associated With Survival Time of Patients With Gastric Cancer. *Gastroenterology*. 951–62.
- Zou, W. 2006. Regulatory T cells, tumour immunity and immunotherapy. *Nat. Rev. Immunol.* 6:295–307.