



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE MEDICINA

DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO

**“MECANISMOS INVOLUCRADOS EN LA INDUCCIÓN DE RESPUESTAS INMUNES
ANTI- TUMORALES PROFILÁCTICAS Y TERAPÉUTICAS”**

**TESIS PRESENTADA PARA OBTENER EL GRADO DE:
DOCTORA EN CIENCIA BIOMÉDICAS**

PRESENTA:

LICENCIADA EN BIOLOGÍA JULIANA IDOYAGA

México, D.F.

2007



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Este trabajo fue realizado en la Unidad de Investigación en Enfermedades Autoinmunes de Centro Médico Nacional Siglo XXI, México D.F., en colaboración con el Laboratory of Cellular Physiology and Immunology, Rockefeller University, New York. Esta tesis doctoral fue dirigida por la Dra. Laura Bonifaz.

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Laura Bonifaz, por brindarme la oportunidad de realizar mi doctorado, por creer en mí y apoyarme en todo el camino. Al Dr. José Moreno, por abrirme las puertas de su laboratorio, permitirme colaborar con su grupo y desarrollar una parte importante de este trabajo de tesis doctoral en su laboratorio.

A mi comité tutorial. A César por estar presente en todo el camino. Adelaida, por las invaluable discusiones científicas. A Gloria, por aceptar el reto final.

Al Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas de la Universidad Nacional Autónoma de México. Al programa de Becas para extranjeros de la UNAM, por la beca que me fue otorgada. A la gente involucrada en la división de estudios de postgrado de la facultad de medicina, por ayudarme en todos los trámites que culminaron en esta tesis doctoral.

A la Coordinación de Investigación en Salud del Centro Médico Nacional Siglo XXI, IMSS, por las aportaciones brindadas para la realización de esta tesis.

Al banco de sangre, Centro Médico Nacional “La Raza”, IMSS, por permitirme usar el irradiador celular. En especial al Dr. David Flores-Huerta por sus consejos técnicos

A la Dra. Ingerborg Becker y al Dr. Pérez-Tamayo por permitirnos usar las instalaciones del bioterio. A toda la gente del bioterio de Hospital General, Facultad de Medicina, por el cuidado de nuestros animales.

Al Dr. Ralph Steinman, por brindarme la oportunidad de realizar parte de este trabajo de tesis en su laboratorio. Por su supervisión, consejos y dirección. A la gente del Laboratory of Cellular Physiology and Immunology, Rockefeller University, y en especial a Chae Gyu Park por las construcciones de los

anticuerpos recombinantes. A Godwin Nchinda y Hiroaki Hemmi por los consejos técnicos cotidianos.

Al Dr. Armando Isibasi y al Dr. Xavier Lozoya, por sus invaluables apoyos personales y laborales.

Al Dr. Polo Flores, por la lectura crítica de todos mis manuscritos y por introducirme en el mundo de las “Langerhans Cells”.

A Brian Pridgen y Sarah Flowers por la lectura de mis manuscritos.

A la gente del laboratorio en enfermedades autoinmunes, y en especial a Paty Rojo y Gibrán Pérez-Montesinos por los consejos técnicos y / o discusiones científicas y personales. A Evita por el apoyo técnico. A Daniel por mostrarme el camino que los extranjeros deben seguir.

A la gente del laboratorio en inmunoquímica, por inducir mi auto-superación. En especial a Néstor y Aarón por el apoyo experimental y sentimental. A Eli, Beto y familia por la contención emocional brindada. A Rosi y Héctor por el apoyo brindado.

A la gente de Centro Médico Nacional Siglo XXI. En especial a Silvia y Paty.

A Paula y Paulina, del Laboratory of Cellular Physiology and Immunology, por la ayuda técnica y sentimental. A Mabel e Irma por el apoyo emocional invaluable.

A Andrés Gottfried por la lectura paciente de esta tesis. Por la compañía en las largas horas de escritura. Porque nunca es tarde para darse una oportunidad.

DEDICATORIA

A mi mamá, por esta a mi lado cada día, sin importar la distancia. Por su amor y paciencia, por su apoyo en cada una de mis locuras. A mis hermanos, porque nunca dejaron de creer un poquito en mí. A mis abuelos, papi y mami, porque nunca me abandonaron y siempre participaron en cada momento de mi crecimiento. Por todo el amor que me dieron y todavía me siguen dando.

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN	1
1. CÁNCER	1
<u>1.1 CONCEPTOS GENERALES</u>	1
<u>1.2 INMUNOTERAPIA DEL CÁNCER</u>	3
2. CÉLULAS DENDRÍTICAS	4
<u>2.1 CONCEPTOS GENERALES</u>	4
<u>2.2 CD Y HEMATOPOYESIS</u>	5
<u>2.3 HETEROGENEIDAD DE LAS CD: SUBGRUPOS DE CD</u>	6
<u>2.4 CÉLULAS DENDRÍTICAS INMADURAS</u>	8
<u>2.4.1 Receptores C-lectina</u>	9
<u>2.5 MADURACIÓN DE LAS CD</u>	11
<u>2.5.1. Procesamiento y presentación antigénica</u>	12
<u>2.5.2. Maduración de las CD e inducción de distintas clases de respuestas inmunes</u>	15
<u>2.5.3. Maduración de las células dendríticas y tolerancia inmune</u>	16
<u>2.5.4. Maduración de las CD y problemas de terminología</u>	17
<u>2.5.5. Receptores tipo Toll</u>	18
<u>2.6 CD EN EL MICROAMBIENTE TUMORAL</u>	20
<u>2.6.1. Factores solubles</u>	20
<u>2.6.2. Moléculas inhibitoras</u>	22
<u>2.6.3. T reguladoras</u>	23
3. INMUNOTERAPIA DEL CÁNCER Y CD: MODELOS EXPERIMENTALES UTILIZADOS EN EL TRABAJO DE TESIS DOCTORAL	24
<u>3.1 MODELO I: VACUNACIÓN DE ANIMALES CON CD CARGADAS CON CÉLULAS TUMORALES APOPTÓTICAS EX VIVO</u>	24
<u>3.2 MODELO II: VACUNACIÓN DE ANIMALES CON CÉLULAS TUMORALES APOPTÓTICAS EN PRESENCIA DE α-GALACTOSILCERAMIDA IN VIVO</u>	25
<u>3.3 MODELO III: DIRECCIÓN DE ANTÍGENOS MODELOS A LAS CD UTILIZANDO ACS ANTI- EL RECEPTOR ENDOCÍTICO DEC205</u>	26
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	28
HIPÓTESIS	29
OBJETIVOS PROPUESTOS	30
MATERIALES Y MÉTODOS	32
1. ANIMALES	32
2. ANTICUERPOS Y REACTIVOS.....	32
3. CÉLULAS.....	33
<u>3.1 LÍNEAS CELULARES</u>	33
<u>3.2 HIBRIDOMAS</u>	33
<u>3.3 DETECCIÓN DE MICOPLASMA</u>	34
<u>3.4 MARCAJE DE CÉLULAS CON CFSE</u>	34
<u>3.5 SELECCIÓN POSITIVA DE CÉLULAS</u>	35

4. ANTICUERPOS MONOCLONALES Y SU PRODUCCIÓN.....	36
4.1 <u>PRODUCCIÓN DE ANTICUERPOS MONOCLONALES A PARTIR DE SOBRANADANTES DE CULTIVO</u>	36
4.2 <u>MARCAJE DE ANTICUERPOS MONOCLONALES</u>	36
4.3 <u>PRODUCCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE ANTICUERPOS RECOMBINANTES</u>	36
5. INDUCCIÓN Y DETECCIÓN DE LA APOPTOSIS	37
6. CÉLULAS DENDRÍTICAS	37
6.1 <u>OBTENCIÓN DE CD A PARTIR DE PRECURSORES DE MÉDULA ÓSEA</u>	37
6.2 <u>OBTENCIÓN DE UNA SUSPENSIÓN RICA EN CD DE BAZO O DE GANGLIOS LINFOIDES</u>	38
6.3 <u>OBTENCIÓN DE LAS CÉLULAS CD11c⁺ POR MEDIO DE SELECCIÓN POSITIVA</u>	39
7. CARACTERIZACIÓN DE LAS CD IN VIVO E IN VITRO	39
7.1 <u>CO-CULTIVO DE LAS CD CON CÉLULAS TUMORALES</u>	39
7.2 <u>CAPTACIÓN DE CÉLULAS TUMORALES POR CD IN VIVO</u>	40
7.2.1. <i>Evaluación por medio de citometría de flujo</i>	40
7.2.2. <i>Evaluación por medio de microscopía confocal</i>	40
7.3 <u>DETERMINACIÓN DE MARCADORES DE SUPERFICIE</u>	41
7.4 <u>DETERMINACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE CITOCINAS</u>	41
8. CÉLULAS T.....	41
8.1 <u>PREPARACIÓN DE ESPLENOCITOS</u>	41
8.2 <u>PREPARACIÓN DE CÉLULAS OT-I, OT-II Y DO11.10.</u>	42
8.3 <u>PROLIFERACIÓN DE CÉLULAS T <i>IN VIVO</i></u>	43
9. MICROSCOPIA.....	44
9.1 <u>TINCIÓN DE LC DE LA PIEL</u>	44
9.2 <u>TINCIÓN DE BAZO Y PLN PARA MICROSCOPIA</u>	45
10. MIGRACIÓN DE LAS LC A LOS PLN	45
11. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	46
CAPÍTULO I.....	47
I.I INDUCCIÓN Y DETECCIÓN DE APOPTOSIS DE CÉLULAS TUMORALES.....	48
I.II LAS CD SE DIFERENCIAN FENOTÍPICAMENTE EN PRESENCIA DE LAS CÉLULAS TUMORALES	50
I.III LAS CD FAGOCITAN CÉLULAS TUMORALES APOPTÓTICAS <i>IN VIVO</i> CUANDO LAS MISMAS SON ADMINISTRADAS EN FORMA ENDOVENOSA.....	54
I.IV LA ENDOCITOSIS DE CÉLULAS TUMORALES APOPTÓTICAS PRODUCE CAMBIOS RÁPIDOS EN LOS MARCADORES DE SUPERFICIE DE LAS CD <i>IN VIVO</i>	56
I.V LA DIFERENCIACIÓN DE LAS CD EN PRESENCIA DE LAS CÉLULAS TUMORALES NO INDUCE LA PRODUCCIÓN DE CITOCINAS.....	57
DISCUSIÓN	59
CAPÍTULO II	61
II.I LAS CD NO RESPONDEN A LIGANDOS DE TLR EN PRESENCIA DE LAS CÉLULAS TUMORALES	62

II.II LA DIFERENCIACIÓN DE LAS CD INDUCIDA POR LAS CÉLULAS TUMORALES NO ES REVERTIBLE.....	65
DISCUSIÓN	68
CAPÍTULO III.....	70
III.I CONSTRUCCIÓN GENÉTICA DEL PÉPTIDO CTL DE LA PROTEÍNA E7 EN LA CADENA PESADA DEL ANTICUERPO ANTI DEC205.....	72
III.II FALTA DE INMUNOGENICIDAD DEL PÉPTIDO E7⁴³⁻⁷⁷ CUANDO EL MISMO ES DIRIGIDO A LAS CD VÍA EL RECEPTOR DEC205	74
III.III AUSENCIA DE RESPUESTA INMUNE DE MEMORIA LUEGO DE LA INMUNIZACIÓN CON ANTI-DEC205-E7⁴³⁻⁷⁷ EN PRESENCIA DE ADYUVANTE	76
DISCUSIÓN	79
CAPÍTULO IV	81
IV.I EL ANTICUERPO MONOCLONAL L31 RECONOCE LC Y DOS POBLACIONES DE CÉLULAS LANGERINA⁺ EN LOS GANGLIOS LINFOIDES PERIFÉRICOS DE ANIMALES BALB/C	82
IV.II LAS LC ES UNA POBLACIÓN DE CD PRESENTE EN PLN, CUYO FENOTIPO SUPERFICIAL ES MADURO	86
IV.III LA MISMA POBLACIÓN CD8⁺ CD11c⁺ DE CD EXPRESA LANGERINA Y DEC205 EN RATONES BALB/C.....	88
IV.IV EXPRESIÓN DIFERENCIAL DE CÉLULAS LANGERINA POSITIVAS EN LAS CEPAS C57BL/6 Y BALB/C.....	90
IV.V EL AC L31 PUEDE SER CAPTADO POR CD LUEGO DE SU INOCULACIÓN <i>IN VIVO</i>	91
DISCUSIÓN	94
CAPÍTULO V.....	96
V.I CONSTRUCCIÓN GENÉTICA DE OVA EN LA CADENA PESADA DEL ANTICUERPO ANTI-LANGERINA	97
V.II PRESENTACIÓN DE OVA LUEGO DE LA INOCULACIÓN DE LANGERINA-OVA <i>IN VIVO</i>	100
DISCUSIÓN	102
DISCUSIÓN GENERAL Y CONCLUSIONES.....	103
ABREVIATURAS.....	105
BIBLIOGRAFÍA.....	106

RESUMEN

La utilización de células tumorales autólogas como estrategia de inmunización data de la década de los años cincuenta: se encontró que cuando se inyectan células tumorales irradiadas que provienen de tumores inducidos químicamente en embriones de ratón, se puede inducir una respuesta inmune protectora en animales singénicos. El hecho de que la célula en su totalidad presente un gran espectro de epítopes, inclusive antígenos de regresión específicos para tumores individuales, es lo que impulsa el uso de la célula tumoral en su totalidad como fuente de antígenos para la inmunoterapia. Sin embargo, en la mayoría de los casos, la inoculación de células tumorales irradiadas induce respuestas inmunes limitadas y no induce el rechazo de tumores establecidos¹⁻³ (Idoyaga J; resultados no publicados). Por lo tanto, uno de los mayores retos de la inmunología en las últimas décadas ha sido entender los mecanismos de interacción entre las células tumorales y el sistema inmune.

La respuesta inmune anti-tumoral efectiva depende de a) la dirección de los antígenos tumorales a las células dendríticas (CD) en los órganos linfoides, y b) la activación o maduración de las CD que capturaron estos antígenos para que éstas sean capaces de inducir respuestas inmunes mediadas por células T. En esta tesis, se evaluaron estos dos puntos con el objetivo de inducir respuestas inmunes contra tumores establecidos (terapéuticas). El primer punto que se estudió fue la activación de las CD en presencia de las células tumorales. Las células tumorales han desarrollado varios mecanismos para evadir el sistema inmune, y actualmente se han identificado varias estrategias celulares y moleculares responsables de la evasión tumoral. Algunos de estos mecanismos tienen a las células del sistema inmune como blanco de su acción. Por ejemplo, en pacientes con cáncer y en animales con tumores se observa un defecto sistémico en las CD. En realidad, las células tumorales tienen la capacidad de bloquear la maduración de las CD, lo cual muestra un impedimento para el desarrollo de terapias utilizando células tumorales irradiadas como fuente de antígenos. La necesidad de generar CD funcionalmente maduras en el microambiente tumoral ha estimulado la utilización de los ligandos de receptores de tipo Toll (TLR) en las vacunas profilácticas y

terapéuticas. Sin embargo, en esta tesis se demuestra que un alto número de células tumorales interfieren con la activación de CD derivadas de médula ósea (BMCD) inducida por los ligandos de TLR, lipopolisacárido (LPS) y poly IC. Las células tumorales bloquean la inducción de MHCII y la inducción de las moléculas coestimuladoras CD40 y CD86, así como también la producción de citocinas IL-12, TNF- α e IL-6. Importante es el hecho que las células tumorales inducen moléculas inhibitoras (B7-H1, B7-DC y CD80) en las CD de bazo *in vivo* y en BMCD, inclusive en presencia de los ligandos de TLR. Además, luego de la exposición prolongada con las células tumorales, las BMCD purificadas y cultivadas en ausencia de células tumorales son incapaces de responder a los ligandos de TLR.

Si las células tumorales inducen la diferenciación de las CD a un fenotipo de no-respuesta, es necesario evitar el uso de las mismas como fuente de antígenos. Por esta razón, en esta tesis se examinó una estrategia alternativa para “cargar” a las CD, basada en la utilización de anticuerpos contra receptores endocíticos. En particular se dirigieron antígenos a dos receptores endocíticos de las CD: DEC205 y Langerina. Al igual que en otros trabajos publicados recientemente ⁴, aquí se demostró que la dirección del antígeno E7⁴³⁻⁷⁷ del papiloma humano a las CD vía anticuerpos anti el receptor endocítico DEC205, en presencia del agonista anti-CD40 y poly IC, es incapaz de inducir respuestas CD8⁺ antígeno-específicas. Debido a que las respuestas citotóxicas son esenciales para la inmunología tumoral, se decidió estudiar otros receptores endocíticos. En particular, se ha sugerido la presentación de antígenos en moléculas MHCI cuando los mismos son endocitados vía el receptor Langerina. El problema con Langerina es la ausencia de estudios detallados que comparen la expresión de esta molécula en distintas poblaciones de CD. Es por ello que en este trabajo se caracterizó la expresión de Langerina en las CD usando un nuevo anticuerpo monoclonal (L31) que reconoce el dominio extracelular del receptor. La expresión de Langerina fue detectada en células de Langerhans (LC) en la piel. Además, dos poblaciones de células Langerina⁺ fueron identificadas en los ganglios linfáticos periféricos (pLN). Una de esta poblaciones (1) fue CD11c^{baja} / CD8^{baja} / DEC205^{alta}. La otra población (2) fue CD11c^{alta} / CD8⁺ / DEC205⁺. Sin embargo, solo una de estas poblaciones (1) fue positiva para FITC luego de pintar las orejas, sugiriendo que esta población correspondía a LC que migraron de la piel. Por otra parte, los

ganglios linfáticos mesentéricos, el bazo y el timo de animales Balb/c solo contenían una población de células Langerina⁺, la cual correspondió a la población 2. Para determinar la capacidad de dirigir antígenos a las CD vía el receptor Langerina, y la presentación de los mismos en MHCI y MHCII, ovalbúmina fue conjugada genéticamente en el extremo carboxilo terminal del anticuerpo anti-Langerina. Luego de la inoculación de los anticuerpos recombinantes se observó la proliferación de células T transgénicas CD4⁺ y CD8⁺. Estos resultados sugieren fuertemente que la dirección de antígenos al receptor Langerina es una estrategia prometedora para la vacunación anti-tumoral.

Palabras clave: células dendríticas derivadas de médula ósea; células tumorales; inmunoterapia; ligandos de TLR, DEC205, Langerina

Los resultados presentados en esta tesis doctoral fueron / serán parcialmente publicados bajo el título:

- *“Tumor cells prevent mouse dendritic cell maturation induced by TLR ligands”*

Juliana Idoyaga, José Moreno, Laura Bonifaz. *Cancer Immunol Immunother*, 2007

- *“Production of monoclonal antibodies that recognize the extracellular domains of mouse Langerin/CD207”*

Cheolho Cheong*, **Juliana Idoyaga***, Yoonkyung Do, Maggi Pack, Sung Ho Park, Haekyung Lee, Young-Sun Kang, Jae-Hoon Choi, Jae Y. Kim, Anthony Bonito, Kayo Inaba, Sayuri Yamazaki, Ralph M. Steinman, and Chae Gyu Park.
Trabajo en preparación. * Estos autores contribuyeron igualmente en el trabajo.

TITLE: “MECHANISMS INVOLVE IN THE INDUCTION OF TUMOR IMMUNE RESPONSES FOR PROPHYLAXIS AND THERAPY”

Author: Juliana Idoyaga

Director: Dr. Laura Bonifaz

Institution: Research Unit on Autoimmune Diseases, Centro Médico Nacional Siglo XXI, Instituto Mexicano del Seguro Social, México D.F., México.

ABSTRACT

The use of autologous tumor cells as vaccines dates back to 1950s when it was found that chemically induced tumors of inbred mice, if injected as irradiated cells, could elicit protective immunity in syngeneic hosts. The prospect of rendering whole tumor cells immunogenic has been especially promising, because whole cells introduce a large spectrum of epitopes to the immune system, including critical regression antigens that may be specific to an individual tumor. Potentially, irradiated tumor cells thus constitute the richest source of antigen in immunotherapy. Unfortunately, however, in most cases the injection of irradiated tumor cells induces limited anti-tumor responses and fails to induce the rejection of established tumors¹⁻³ (Idoyaga J; unpublished data). Thus, improving the understanding of the mechanisms of action of these vaccines has remained a major goal over the past few decades.

An effective anti-tumor response depends on a) the delivery of tumor antigens to dendritic cells (DC) in lymphoid organs and b) DC activation or maturation so that the antigen capturing DC become capable of inducing T cell mediated immunity. In this thesis, we evaluated these two points with the aim of induce therapeutic immune responses against established tumors. The first point we evaluate was the activation of DC in the presence of tumor cells. Tumor cells have developed strategies to successfully evade the host immune system, and various molecular and cellular mechanisms responsible for tumor evasion have been identified. Certain of these mechanisms target immune anti-tumor effector

cells. This is due, for example, to systemic defects on DC derived from tumor bearing mice or patients. Tumor cells can evade the immune system through blocking DC maturation. However, for therapeutic purposes, is necessary to induce the full activation of DC in the tumor environment. It has been suggested that signaling via Toll-like receptors (TLR), which induced the full activation of DC, may be involved in the induction of prophylactic anti-cancer immunity and in the treatment of established tumors. In the present study we found that high numbers of tumor cells interfere with the bone marrow derived-DC (BMDC) activation induced by the TLR ligands LPS and poly IC. Tumor cells blocked TLR3- and TLR4- mediated induction of MHCII and the co-stimulatory molecules CD40 and CD86, as well as the cytokines IL-12, TNF- α and IL-6. Importantly, tumor cells induced inhibitory molecules (B7-DC, B7-H1 and CD80) on spleen DC *in vivo* and on BMDC, even in the presence of TLR ligands. Moreover, after a long exposure with tumor cells, purified BMDC were unable to respond to a second challenge with TLR ligands.

If tumor cells induce the differentiation of DC to a non-responsive phenotype, it is necessary to avoid the use of whole irradiated tumor cells as a source of antigen. For this reason, we then examined an alternative, protein-based approach, which involves targeting of defined antigens to maturing dendritic cells in lymphoid tissues, through two endocytic receptors: DEC205 and Langerin. We found, in agreement with recent published data ⁴, that DC targeting with anti-DEC205-E7⁴³⁻⁷⁷, in the presence of anti-CD40 and poly IC as maturation stimuli, failed to induce antigen specific CD8⁺ T cell responses. Because CD8 responses are essential in anti-tumor immunity, we decided to study other endocytic receptor, named Langerin. It was suggested that Langerin endocytosed-antigens are presented in MHCI molecules. However, the expression of Langerin in different DC populations is not well characterized in mouse. Here, we characterized the expression of Langerin in DC using a new monoclonal antibody (L31), which recognizes the extracellular domain of mouse Langerin. Cell-surface Langerin was detected in all epidermal Langerhans Cells (LC). Moreover, two populations of langerin⁺ cells were identified in peripheral lymph nodes (pLN). One population (1) was CD11c^{low/+} / CD8^{low} / DEC205^{high}. The other population was (2) CD11c^{high} / CD8⁺ / DEC205⁺. Only one of these two subsets was FITC⁺ following painting onto epidermis (1), showing that they were LC migrating from

skin. On the other hand, mesenteric LN (mLN), spleen and thymus of Balb/c mice contained only a single population of Langerin⁺ cells, corresponding to the subset 2. To assess the potential of targeting to DC with Langerin, and the presentation of antigens on major histocompatibility complex (MHC) class I *in vivo*, we genetically incorporate ovalbumin protein into a monoclonal antibody to the Langerin receptor. We found that a single dose of anti-Langerin-OVA initiated the proliferation of transgenic CD4⁺ and CD8⁺ T cells. These results showed that Langerin targeting could be used to deliver antigens to DC *in vivo*. This promising strategy can now be extended to an analysis of presentation and vaccination against specific tumor antigens.

INTRODUCCIÓN

1. CÁNCER

1.1 CONCEPTOS GENERALES

Rudolf Virchow fue el primero en observar infiltración leucocitaria en tumores en 1863 y por primera vez se sugirió una relación funcional entre inflamación y el crecimiento celular descontrolado. A pesar de esas observaciones tempranas, no fue hasta 1909 cuando Paul Ehrlich predijo que el crecimiento de carcinomas ocurría con alta frecuencia en ausencia del sistema inmune. Cincuenta años más tarde, Burnet y Thomas hipotetizaron la existencia de inmunovigilancia tumoral: la resistencia del sistema inmunológico del huésped al desarrollo del cáncer ⁵. Este concepto ha sido ampliamente cuestionado por décadas debido a la falta de evidencia experimental ^{6, 7}. Sin embargo, en este momento existen varios reportes que prueban fehacientemente el reconocimiento y la eliminación de tumores por el sistema inmune. R. Shreiber y colaboradores demostraron que ratones deficientes en el gen de activación de la recombinación (RAG2^{-/-}), necesario para el rearreglo somático de los receptores antigénicos de los linfocitos T, B, células asesinas naturales (NK) y linfocitos T asesinos naturales (NKT), son más propensos a desarrollar tumores espontáneos y más susceptibles a tumores inducidos por carcinógenos que los ratones salvajes ⁸⁻¹³. Estas observaciones comprueban que linfocitos de la respuesta inmune innata y linfocitos de la respuesta inmune adaptativa están involucrados en la prevención del desarrollo tumoral. Además, estudios con IFN- γ ^{8, 10-12} y perforina ^{10, 14, 15} demuestran que estas moléculas inmunológicas están involucradas en la resistencia del huésped a tumores.

Las implicaciones de estos estudios son que el sistema inmune tiene la capacidad de reconocer y eliminar células transformadas, demostrando que la teoría de la inmunovigilancia es correcta. Sin embargo, la inmunovigilancia representa solo una parte de la compleja relación entre el sistema inmune y el cáncer ^{6, 16}. La asociación compleja entre el sistema inmune y las células tumorales se puede observar en trabajos en donde se comparó la inmunogenicidad

de tumores derivados de animales inmunocomprometidos con animales inmunocompetentes. En esos estudios, 20/20 tumores derivados de animales inmunodeficientes RAG2^{-/-} crecen en forma progresiva cuando son transplantados en huéspedes RAG2^{-/-} ⁸. Sin embargo, 8/20 tumores provenientes de ratones RAG2^{-/-} son rechazados luego de ser transplantados en animales salvajes. Estos hallazgos muestran que los tumores desarrollados en un microambiente inmunodeficiente son más inmunogénicos que los tumores desarrollados en huéspedes inmunocompetentes. Esta demostración funcional de la capacidad del sistema inmune de “modelar” la inmunogenicidad tumoral ha permitido el desarrollo de una nueva hipótesis denominada immunoedición ^{6, 16}. Esta nueva hipótesis no solamente incorpora la noción de inmunovigilancia, sino que también reconoce que el fenotipo inmunogénico del tumor se encuentra continuamente “modelado” por la selección impuesta por el sistema inmune.

La immunoedición del cáncer es un proceso dinámico que involucra tres fases: la eliminación, el equilibrio y el escape. La eliminación representa el concepto clásico de inmunovigilancia: células y moléculas del sistema inmune innato y adaptativo que poseen la capacidad de erradicar las células transformadas y proteger al huésped de la formación del cáncer. Sin embargo, a pesar de que muchas de las células transformadas son erradicadas por el sistema inmune, variantes nuevas resistentes al sistema inmune pueden emerger. Estas variantes son consecuencia de miles de mutaciones ^{17, 18} generadas en el inestable genoma tumoral ¹⁹. La “metamorfosis” genómica de las células tumorales puede eventualmente generar fenotipos nuevos con inmunogenicidad reducida. Mientras que estas mutaciones en las células tumorales son estocásticas, el tumor emerge como consecuencia de la selección impuesta por el sistema inmune, progresando a la fase de escape del proceso de immunoedición. Por lo tanto, la capacidad del sistema inmune de proteger al huésped del cáncer induce la generación de tumores con habilidad de sobrevivir en un microambiente inmunogénico. La implicación clínica de esta hipótesis es que la mayoría de los tumores desarrollados en humanos pueden haber sufrido “modelado inmunogénico” como resultado del proceso de immunoedición.

1.2 INMUNOTERAPIA DEL CÁNCER

Con el reconocimiento de la notable habilidad del sistema inmune de defender al organismo en contra de células transformadas, se ha desarrollado una nueva forma de tratamiento oncológico, la inmunoterapia. La clave de la inmunoterapia oncológica está en reforzar al sistema inmune de forma tal que este sea capaz de combatir las células cancerosas ²⁰. Actualmente, muchas formas de inmunoterapia están siendo exploradas en investigaciones de laboratorio y ensayos clínicos. Estas incluyen la activación no específica del sistema inmune con componentes microbianos o citoquinas, la transferencia adoptiva de anticuerpos o linfocitos T antígeno específicos, y la vacunación.

La activación no específica del sistema inmune puede ser llevada a cabo con componentes microbianos, los cuales incluyen entre otros a la BCG, C. Parvo y la endotoxina ²¹⁻²³, los cuales son capaces de modificar la respuesta inmune y, bajo ciertas circunstancias, causar la regresión tumoral o frenar el crecimiento ²⁴. Por otra parte, las citocinas incluyendo a la interleucina 1 y 2, interferón I ($INF\alpha$, β y γ), el factor necrosante tumoral (TNF), factores de crecimiento de las células B y factores hematopoyéticos de crecimiento (como los factores estimuladores de colonias, CSF) inducen la activación no específica de la respuesta inmune a distintos niveles ^{25, 26}.

Uno de los adelantos más importantes de la inmunología es la habilidad de producir anticuerpos monoclonales (mAc) en grandes cantidades, los cuales pueden ser dirigidos a antígenos (Ags) cancerosos específicos. La principal limitación del uso de anticuerpos es que las proteínas blanco se tienen que expresar en la superficie celular. Por el contrario, el blanco de las células T son péptidos derivados generalmente de proteínas intracelulares, las cuales son presentadas en la superficie celular en complejos mayor de histocompatibilidad (MHC) ²⁷. La identificación de antígenos asociados a tumores (TAA) en humanos ^{28, 29} permitió el desarrollo de la transferencia adoptiva de células T antígeno específicas.

La estrategia más atractiva es, sin embargo, la vacunación. Esto se debe a que las vacunas permiten la inducción de linfocitos T efectores y linfocitos T de memoria ³⁰⁻³². Las vacunas contra el cáncer están compuestas por Ags tumorales

administrados con catalizadores químicos adecuados para estimular una respuesta inmune contra un tipo de cáncer específico.

Se han desarrollado varias estrategias de vacunación en pacientes con cáncer, las cuales incluyen el uso de células tumorales autólogas o alogénicas (las cuales pueden ser modificadas para expresar citocinas), péptidos, proteínas y vacunas de DNA³²⁻³⁵. A pesar que los resultados obtenidos han sido variables, en muchos casos se ha inducido una respuesta inmune específica pero se ha observado regresión tumoral limitada. Estas estrategias se basan en el encuentro “azaroso” de la vacuna con las células presentadoras de antígeno (APC) del huésped. Las APC por excelencia son las células dendríticas (CD). La falta de encuentro del antígeno con las CD puede resultar en la ausencia de respuesta inmune. Por otra parte, el encuentro “inapropiado”, por ejemplo con CD inactivadas o con algunos subgrupos de CD, pueden silenciar la respuesta inmune³⁶. Estas dos situaciones podrían explicar la falta de eficacia de las vacunas contra el cáncer.

2. CÉLULAS DENDRÍTICAS

2.1 CONCEPTOS GENERALES

La respuesta no específica innata y la respuesta antígeno específica adaptativa actúan en forma sinérgica para erradicar organismos patogénicos a través de la acción de células del sistema inmune y proteínas efectoras que incluyen proteínas del complemento, anticuerpos, citocinas y factores citolíticos. La respuesta inmune adaptativa es inducida, coordinadas y reguladas por las CD^{37, 38}. Esto se debe a que las CD poseen ciertas características que les permiten llevar a cabo su función de presentar el antígeno e inducir respuesta inmune:

- Su localización. Las CD están correctamente posicionadas en las mucosas y en los tejidos linfoides, lo cual les permite capturar el antígeno.
- La presentación del antígeno. Las CD poseen un sistema endocítico especializado, el cual incluye un gran número de receptores para la captura del antígeno y la importación de los mismos a compartimientos especializados en el procesamiento.

- Maduración. Las CD se diferencian en respuesta a un gran espectro de microorganismos y otros estímulos ambientales. Los caminos de diferenciación de las CD determinan luego la especialización funcional de los linfocitos T (ej. Linfocitos T de ayuda de tipo 1 o 2).
- Subgrupos. Las CD se pueden dividir en subpoblaciones con distintas propiedades para la respuesta inmune innata y adaptativa.

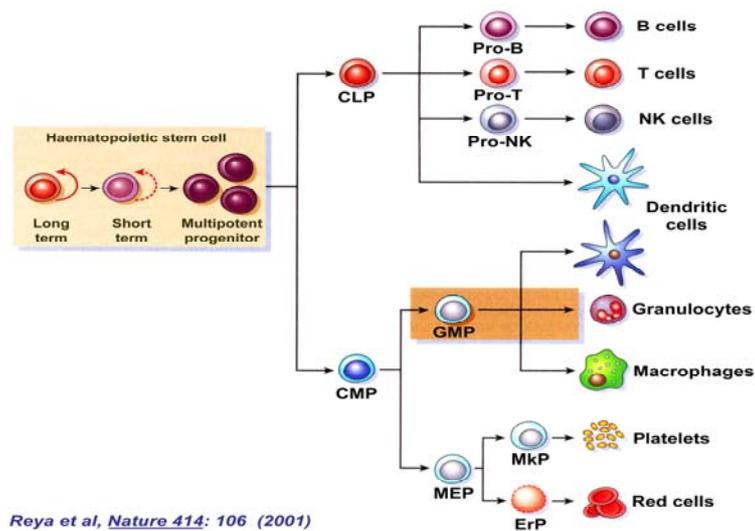
Estas características son las que permiten que las CD modulen todos los elementos de la respuesta inmune:

- Las CD poseen la capacidad de presentar péptidos a células T vírgenes, induciendo una respuesta inmune celular que involucra linfocitos T CD4⁺ y linfocitos T CD8⁺.
- Las CD son importantes en la respuesta humoral, debido a su capacidad de activar linfocitos B vírgenes³⁹ y de memoria⁴⁰.
- Las CD pueden activar NK⁴¹ y NKT⁴².

En conclusión, las CD son un blanco fundamental y una importante herramienta en la vacunación.

2.2 CD Y HEMATOPOYESIS

Las CD están ampliamente distribuidas en el organismo, a pesar de componer una pequeña porción (0.1-1%) de las células en los tejidos linfoides y no linfoides. Estudios tempranos indicaron que las CD se originan en la médula ósea⁴³ a partir de un progenitor hematopoyético (HPC) bajo el control de factores de crecimiento y de contacto célula-célula con las células estromales de la médula ósea. De este progenitor pluripotentes derivan dos linajes (también pluripotentes): el progenitor común linfoide (CLP) para las células B, T y NK y el progenitor común linfoide (CMP) para granulocitos, monocitos, macrófagos, eritrocitos y megacariocitos^{44, 45}. Estudios recientes demostraron que las CD se pueden generar de un progenitor linfoide o de un progenitor mieloide^{46, 47} (Esquema 1).



Esquema 1. Modelo teórico del origen de las CD de ratón. Se ha propuesto que la diferenciación de las CD proviene directamente de precursores mieloides o linfoides. Adaptado de Traver y col; *Science* 2000.

Las CD, granulocitos y macrófagos se pueden generar de precursores de médula ósea crecidos en medio semisólido en presencia del factor estimulador de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF), lo cual confirma que estas células comparten un precursor en común^{48, 49}. Las CD generadas bajo estas condiciones tienen la capacidad de migrar a la región rica en linfocitos T en los ganglios linfoides (LN) y tienen alta capacidad de activar linfocitos T vírgenes en ensayos de proliferación de linfocitos alogénicos (MLR).

2.3 HETEROGENEIDAD DE LAS CD: SUBGRUPOS DE CD

Los subgrupos de CD están definidos por su fenotipo único, su funcionalidad y la presencia en los tejidos linfoides. Cinco subgrupos de CD han sido identificados en los tejidos linfoides de animales vírgenes⁵⁰⁻⁵⁶. Las CD maduras en el ratón expresan altos niveles de MHCII y expresan la integrina CD11c, por lo tanto, la co-expresión de estos dos marcadores ha sido utilizada para definir las CD fenotípicamente⁵⁷. Por otra parte, cinco otros marcadores pueden ser utilizados para definir los subgrupos de CD: CD4, homodímero CD8 α , DEC205, 33D1 y recientemente Langerina (CD207)⁵⁸⁻⁶⁰. En ratón, un 20 % de las CD del bazo y de LN tienen un fenotipo CD4⁻ CD8 α ⁺ DEC205⁺. En el bazo y los

ganglios linfoides periféricos (pLN, ganglios que drenan la piel) el 80 % de las CD son CD8⁻ y pueden ser divididas en dos subgrupos: la mayoría expresa CD4 y un subgrupo minoritario que no expresa CD4 pero expresa CD11b. Estos dos subgrupos pueden expresar 33D1^{58, 61}. Además, en pLN se pueden encontrar dos poblaciones más que derivan de células de Langerhans (LC) y CD dermales de la piel. Las LC se localizan en la epidermis en su estado no activado, mientras que las CD dermales se localizan en la dermis en su estado no activado. Luego de la activación, o inclusive en estado de reposo, estas células pueden migrar a los pLN y expresar un fenotipo maduro caracterizado por altos niveles de MHCII y moléculas co-estimuladoras⁵². Estas dos poblaciones expresan niveles medianos-altos de DEC205 y niveles bajos-negativos de CD8 α . La distinción entre estas dos poblaciones se puede lograr, sin embargo, utilizando el marcador Langerina. Las LC expresan Langerina, mientras que las CD dermales no⁵⁹.

El equivalente de las CD plasmocitoides (pDC) de humano se han descrito recientemente en ratón⁶²⁻⁶⁵. Estas células tienen un fenotipo único: CD45RA^{alto}, B220⁺, CD11c^{bajo}, CD11b⁻ y MHCII^{bajo}. Además, algunas de estas células pueden expresar CD8 α . Las pDC expresan TLR7 y TLR9. Funcionalmente, las pDC se caracterizan por la habilidad de producir grandes cantidades de IFN de tipo I en respuesta a la estimulación viral^{66, 67}, induciendo así una respuesta citotóxica potente⁶⁶.

Recientemente se ha descrito un nuevo subgrupo de CD^{68, 69}, denominadas IKDC (CD asesinas productoras de IFN). Estas células parecerían ser distintas al resto de las CD debido a la expresión de marcadores de superficie, la secreción de grandes cantidades de IFN de tipo I y la capacidad de inducir la muerte celular programada (apoptosis) de células blanco. Sin embargo, se necesitan más estudios para caracterizar la función y el linaje de estas células. Por el momento, estas células parecerían ser más similares a las NK que a las CD.

La presencia de múltiples subgrupos de CD sugiere que distintas CD se deben especializar para ciertas funciones, incluyendo la inducción de tolerancia periférica y la estimulación inmune efectiva. Así, hay varios reportes que sugieren diferencias funcionales entre subgrupos de CD, aunque todavía no se ha podido establecer la relación exacta entre la especialización funcional y la población de CD. Por ejemplo, las células CD8⁺ DEC205⁺ son las únicas CD capaces de fagocitar células apoptóticas en los bazos de ratones⁷⁰ y tienen la capacidad de

inducir tolerancia periférica ⁷¹⁻⁷⁴. Sin embargo, se ha demostrado también que esta población de CD tiene la capacidad de inducir respuestas de tipo Th1 ^{75, 76} debido a la secreción de grandes cantidades de IL-12. Estos resultados demuestran que las CD exhiben alta plasticidad funcional modulada por el microambiente ^{77, 78}.

2.4 CÉLULAS DENDRÍTICAS INMADURAS

En el sistema inmune en reposo, las CD están localizadas en los tejidos periféricos y poseen características que las convierten en las células apropiadas para monitorear la presencia de organismos patogénicos en el ambiente ³⁸. Estas células poseen altos niveles RNA mensajero que codifica para MHCII y proteína MHCII en el citoplasma, pero baja expresión en la membrana. Además, las CD inmaduras tienen baja expresión en la superficie de moléculas coestimuladoras (ejemplo, CD40 y CD86) y no son capaces de producir IL-12, citocina necesaria para la proliferación de linfocitos T. Sin embargo estas células expresan una gran cantidad de receptores que pueden reconocer en forma específica moléculas relacionadas con organismos patogénicos. Estos receptores incluyen receptores de tipo Toll ⁷⁹ (TLRs), los cuales tienen la capacidad de reconocimiento de un amplio espectro de moléculas ⁸⁰. Estos receptores proveen la conexión entre la respuesta inmune innata y la respuesta inmune adaptativa por su rol en la activación y maduración de las CD.

Las CD inmaduras son altamente endocíticas y poseen la capacidad de capturar Ags mediante distintos mecanismos, entre ellos la micropinocitosis, fagocitosis y endocitosis mediada por receptor. La endocitosis mediada por receptor permite la incorporación de macromoléculas a través de regiones especializadas de la membrana plasmática. Las CD poseen numerosos receptores involucrados en la endocitosis:

- FcR: FcRI/CD64, FcRII/CD32 y FcRIII/CD16 ⁸¹.
- Receptores para complemento, CR3 y CD4 ⁸².
- Receptores para proteínas “heat-shock” (HSPs). Recientemente se ha identificado en CD murinas el receptor CD91, el cual es un receptor para las HSP gp96 y HSP 70 derivadas de células infectadas o tumorales ⁸³.

- Receptores “scavengers” (SRs). Son glicoproteínas de membrana que unen lipoproteínas de baja densidad y están implicados en la internalización de bacterias. Entre los SRs expresados en las CD se encuentra el CD36 (SR de clase B) que participa en la internalización de células apoptóticas ^{84, 85}.
- Lectinas y receptores tipo C-lectina. Muchas de estas lectinas son miembros de la familia de lectinas tipo C dependiente de calcio (C-lectinas). Esta familia de moléculas tiene la capacidad de unir carbohidratos derivados de organismos patogénicos ⁸⁶. Además, estas lectinas son importantes en la migración de las CD y su interacción con linfocitos.
- Receptores para la fagocitosis eficiente de células necróticas y apoptóticas ⁸⁷⁻⁹¹. Numerosas moléculas involucradas en la captación de células muertas, incluyendo las integrinas $\alpha\beta3$ y $\alpha\beta5$ que actúan en cooperación con CD36 ^{87, 92} y los receptores más recientemente descritos MER y receptores de fosfatidil serina (PSR) ^{93, 94}. La continua endocitosis de material apoptótico en estado de reposo puede ser un mecanismo importante para mantener la tolerancia periférica ⁹⁵.

A pesar que las CD inmaduras tienen alta capacidad de capturar Ags, estas poseen baja capacidad de procesar y presentar dichos Ags a los linfocitos T ⁹⁶ para inducir una respuesta inmune. Por el contrario, las CD inmaduras tienen la capacidad de inducir tolerancia de células T en la periferia ^{74, 97}.

2. 4. 1 Receptores C-lectina

Los receptores C-lectina son un grupo de moléculas presentes en LC y CD especializadas en la captura de Ags. Las C-lectinas unen azúcares dependiendo de calcio, utilizando para ello dominios altamente conservados: dominios de reconocimiento de carbohidratos (CRD). Las C-lectinas se pueden sintetizar en forma soluble o como proteínas de membrana. Las proteínas unidas a membrana están diseñadas para la captura de organismos patogénicos y su posterior degradación y presentación en MHC. Las lectinas solubles funcionan ligando y opsonizando microorganismos, aunque también pueden tener un papel en el transporte de los Ags.

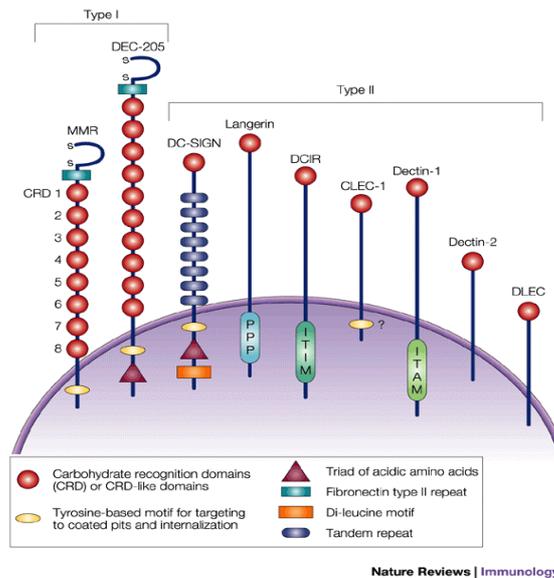
Algunos ejemplos de C-lectinas solubles incluyen las proteínas A y D surfactante del pulmón (SP-A y SP-D)⁹⁸, las cuales son colectinas secretadas a la cara luminal de las células epiteliales pulmonares. La proteína de unión a manosa (MBP), es otra colectina soluble presente en el plasma. Luego de la unión con su ligando, las colectinas se asocian con sus receptores en la superficie celular y aumentan la fagocitosis de los organismos patogénicos por macrófagos.

Las C-lectinas membranales se clasifican en dos grupos dependiendo de la orientación del extremo amino terminal: las C-lectinas de tipo I y las C-lectinas de tipo II, con el extremo amino terminal extracelular o intracelular, respectivamente (Esquema 2). Las C-lectinas de tipo I en las CD contienen varios CRD, mientras que las C-lectinas de tipo II identificadas hasta el momento contienen un solo CRD.

DEC205 es un receptor C-lectina tipo I descrito como un receptor multilectina específico de las CD, a pesar que ninguno de los diez CRD de este receptor contiene secuencias consenso de unión de calcio y/o carbohidratos. La cola citoplasmática del DEC205 contiene secuencias que regulan el transporte de este receptor a vesículas intracelulares y su reciclado a la superficie celular⁹⁹. Además, el DEC205 contiene motivos de tirosinas para su internalización en vesículas revestidas de clatrina¹⁰⁰.

Recientemente se ha descrito un nuevo receptor C-lectina de tipo II denominado Langerina (CD207). Langerina es producido por LC en la epidermis¹⁰¹ y se localiza en vesículas especializadas denominadas Birbeck¹⁰². El dominio intracelular de Langerina contiene motivos ricos en prolina como sitio potencial para la traducción de señales.

Evidencia reciente sugiere que los receptores C-lectinas se expresan diferencialmente en varios subgrupos de CD. Existen diferencias importantes en la producción y expresión de receptores C-lectina en CD y LC. Actualmente, estos receptores C-lectina sirven para la identificación y caracterización de distintos subgrupos de CD. Sin embargo, sería importante determinar si estas diferencias en la expresión reflejan diferencias en la capacidad de capturar Ags y la habilidad de presentar los mismos a linfocitos CD4⁺ y/o CD8⁺ para la inducción de inmunidad o tolerancia.



Esquema 2. Dos tipos de receptores tipo C-lectinas son producidos por LC y DC. Los receptores C-lectina tipo I (MMR y DEC205) contienen el extremo amino terminal con repeticiones ricas en cisteínas (S-S) y 8-10 CRD, los cuales unen sus ligandos dependiendo de Ca^{2+} . Los receptores C-lectinas tipo II contienen un solo CRD en el extremo carboxilo terminal extracelular. Los extremos citoplasmáticos de las C-lectinas son diversos y contienen varios motivos conservados los cuales son importantes para la captura del Ag. Adaptado de Figdor; Nat Rev Immunol 2002.

2.5 MADURACIÓN DE LAS CD

Se reconoce que las CD existen en dos estados: inmaduras y maduras. En su estado inmaduro, como se mencionó anteriormente, las CD poseen un fenotipo que refleja la función especializada de capturar Ags. Las CD en este estado son incapaces de activar una respuesta inmune mediada por linfocitos T, pero pueden inducir tolerancia. Sin embargo, cuando las CD son expuestas a ciertos estímulos, éstas sufren un proceso de maduración, en el cual adquieren la capacidad de ser potentes activadoras de los linfocitos T.

La maduración de las CD esta asociada con la reducción en la capacidad de endocitosis de Ags debido a una pérdida en los receptores antigénicos y una disminución de la macropinocitosis y fagocitosis^{86, 103}. Por el contrario, la maduración esta relacionada con un aumento en la eficiencia de procesamiento antigénico, un aumento en la vida media de los complejos MHC-péptido en la superficie celular¹⁰⁴, y un aumento en la expresión de moléculas coestimularoras, por ejemplo CD80 y CD86¹⁰⁵. Esta expresión elevada en la superficie y bajo

recambio de moléculas MHCI y MHCII es requisito indispensable para la presentación efectiva de Ags a linfocitos CD8⁺ y CD4⁺. Además, para la activación de linfocitos T también se requiere de la expresión de moléculas coestimuladoras. La maduración también involucra una modificación en la expresión de los receptores de quemocinas y moléculas de adhesión, lo cual permite la migración de las CD de la periferia a la zona T de los órganos linfoides secundarios^{106, 107}.

2.5.1. Procesamiento y presentación antigénica

Una vez que los Ags han sido capturados, las CD poseen la capacidad de procesar los mismos eficientemente para su presentación a través de moléculas MHC clase I, II y moléculas CD1.

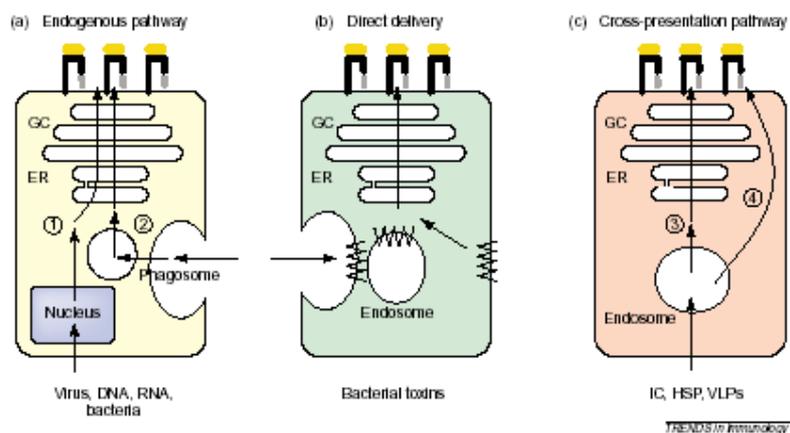
Las moléculas MHC son glicoproteínas de membrana. La diferencia más importante entre las moléculas MHC clase I y II se debe tanto a la estructura como al origen de los péptidos que ensamblan y llevan a la superficie celular.

Las moléculas MHCI se ensamblan con péptidos derivados de proteínas sintetizadas en el citoplasma, por ejemplo a partir de proteínas de origen viral, y son reconocidos por los linfocitos T citotóxicos (CTL) a través del receptor de la célula T (TCR) y del co-receptor CD8, los cuales se van a encargar de matar a las células infectadas. La degradación de proteínas en el citosol se lleva a cabo por un complejo multicatalítico de proteasas llamado proteosoma. Para ser degradadas, las proteínas son introducidas en el proteosoma y allí son clivadas en péptidos que son luego transportados al retículo endoplásmico (RE) por proteínas llamadas TAP o transportadores asociados al procesamiento antigénico (TAP-1 y TAP-2). En el RE, los péptidos son ensamblados en las moléculas MHCI. El ensamble del complejo MHCI con el péptido depende de la asociación inicial de la cadena α del MHC con la cadena β_2 -microglobulina y luego con el péptido. Todo el proceso de ensamblaje depende de proteínas accesorias. Luego de haberse ensamblado con el péptido, las moléculas MHCI abandonan el RE para llegar a la superficie celular.

Las proteínas que son internalizadas por fagocitosis o endocitosis, como así también una gran cantidad de organismos patogénicos que replican dentro de vesículas intracelulares, son degradados dentro de estas vesículas por proteasas presentes en los lisosomas, las cuales son activadas por el pH ácido. Las

moléculas MHCII que son sintetizadas recientemente deben ser transportadas del RE a las vesículas para unirse con los péptidos, pero para ello se debe prevenir la unión prematura de estas moléculas con péptidos presentes en el RE. Este ensamblaje es prevenido por la unión de moléculas MHCII con una proteína llamada cadena invariante asociada a MHCII (Ii). Además de prevenir la unión de péptidos en el RE, la Ii tiene la función de dirigir las moléculas MHCII hacia las vesículas de bajo pH donde deben ensamblarse con los péptidos. Una vez en el compartimiento ácido, se produce el clivaje de la Ii, dejando un pequeño fragmento llamado CLIP o péptido de cadena invariante asociado a MHCII, el cual debe ser desplazado para permitir la unión del péptido derivado de la proteólisis y el transporte del complejo MHCII-péptido hacia la superficie celular.

Generalmente, los péptidos presentados en el contexto MHCI provienen de la degradación de proteínas que son sintetizadas endógenamente. Esto tiene sentido biológico ya que de esta forma los CTL reconocen y matan a las células infectadas con el organismo patogénico y no a células no infectadas que fagocitaron el mismo. Las CD, sin embargo, poseen la capacidad de iniciar una respuesta CD8 sin que las mismas se encuentren infectadas con el organismo patogénico. Es decir, las CD son capaces de presentar Ags exógenos, capturados por endocitosis o fagocitosis en un contexto MHCI. Este mecanismo se denomina presentación cruzada o “cross-presentación”¹⁰⁸⁻¹¹⁰. En el siguiente esquema se resumen las tres formas en las cuales se podría estimular una respuesta citotóxica.



Esquema 3. Estrategias utilizadas para presentar Ags. A) Síntesis del Ag: DNA o RNA viral, virus y sus proteínas o bacterias fagocitadas que puede escapar del fagosoma. En estos, los Ags pueden seguir un camino que involucra la degradación en el proteosoma, el transporte vía TAP y la unión del péptido en MHC clase I (vía clásica). **B)** La toxina de la bacteria llega al citoplasma directamente, cruzando la membrana en distintos lugares ya sea luego de la endocitosis o la membrana plasmática. **C)** Presentación cruzada de complejos inmunes, HSPs, células apoptóticas y otros Ags que son endocitados y llegan al citosol por mecanismos desconocidos. En algunos casos los Ags no pasan al citosol sino que son traslocados directamente a una molécula MHCI reciclada. Adaptado de Moron y col; Trens in Immunology, 2004.

Una forma en que las CD podrían presentar Ags exógenos en moléculas MHCI sería la entrada del Ag al citosol. En la actualidad existe evidencias claras que demuestran que esto ocurre. La habilidad de transportar material del endosoma al citosol parece ser una característica constitutiva de algunos compartimentos endocíticos de las CD.

La presentación cruzada no es importante solamente para la activación de células T en infecciones virales o antígenos tumorales, sino también en condiciones de no-inflamación para inducir tolerancia a Ags no expresados en las CD ¹¹¹.

Las moléculas CD1 son similares en estructura a las moléculas MHCI, pero a diferencia de las mismas, mapean fuera de la región MHC. Estas moléculas se expresan en CD, monocitos y algunos timocitos y tienen función de presentación antigénica, pero se diferencia de MHCI en dos aspectos esenciales: a pesar que CD1 y MHCI son similares en su organización y asociación con β_2 -microglobulina ¹¹², CD1 se comporta como una molécula MHCII ya que no es retenida en el RE y la unión con los Ags ocurre en vesículas. Por lo tanto el Ag que se une a CD1 deriva de la ruptura lisosomal de Ags extracelulares. La segunda característica distintiva de las moléculas CD1 es que son capaces de unir y presentar glicolípidos. La relación entre la capacidad de unión de glicolípidos y la estructura de CD1 no es clara, pero estudios estructurales revelaron que CD1 poseen un bolsillo hidrofóbico que es ideal para la unión del Ag lipídico ¹¹³. Las células NKT son células que reconocen moléculas CD1 mediante su receptor TCR poco variable.

El compuesto α -galactosilceramida (α GalCer) es un compuesto sintético basado en la estructura de lípidos semejantes aislados de esponja marina, que ha

mostrado la inducción de regresión tumoral en modelos experimentales. Taniguchi y col han demostrado que el efecto anti-tumoral de α GalCer depende de células NKT y de la presentación de la misma en moléculas CD1d ^{26, 114}. Además el reconocimiento de α GalCer es una característica compartida por NKT humanas y murinas ¹¹⁵⁻¹¹⁷.

2.5.2. Maduración de las CD e inducción de distintas clases de respuestas inmunes

Las CD son inmunogénicas ya que proveen a las células T con varias señales necesarias para la activación e inducción de inmunidad. La primera señal es la señal Ag-específica, recibida como resultado de la unión del TCR con el péptido presentado en moléculas MHC. La segunda señal se refiere a la coestimulación y es proveída por señales positivas provenientes de varios receptores ¹⁰⁵, entre ellos CD86 expresado en las CD activas y su interacción con CD28 en los linfocitos T. Las CD proveen otras señales a las células T que determinan su diferenciación a células efectoras, como por ejemplo la diferenciación a linfocitos T de ayuda de tipo 1 (Th1) o de tipo 2 (Th2) y/o CTL ¹¹⁸.

Existen diversos reportes sobre la habilidad de las CD de dirigir diferentes clases de inmunidad ^{119, 120}. Es claro ahora que citocinas como IL-12, IL-18 y IFN- γ , las cuales pueden ser producidas por las CD, inducen el cebado de las células T CD4⁺ y su diferenciación a Th1. Estas citocinas pueden influenciar directamente a los linfocitos T, y la producción por CD es amplificada por retroalimentación positiva proveída por linfocitos T diferenciados ^{121, 122}. Estas citocinas pueden también activar NK, las cuales producen IFN- γ y indirectamente promueven el mismo tipo de inmunidad ¹²³. Las CD también pueden promover respuestas de tipo Th2 ^{124, 125}, probablemente mediante la expresión selectiva de distintos miembros de la familia de ligandos Jagged y Notch ¹²⁶. Además, las CD están implicadas en la inducción de la diferenciación de células CD4⁺ a células T reguladoras ¹²⁷ (Treg) o a células CD4⁺ productoras de IL-17 ¹²⁸.

2.5.3. Maduración de las células dendríticas y tolerancia inmune

El sistema inmune puede discriminar entre un amplio rango de estímulos, permitiendo o previniendo la inducción de respuestas inmunes, lo cual lleva a inmunidad o tolerancia respectivamente.

Las CD pueden inducir y mantener la tolerancia inmune²⁰, tanto a nivel central como a nivel periférico. Existe amplia evidencia que indica que las CD en estado de reposo, es decir, en ausencia de exposición a señales de maduración, tolerizan en la periferia a linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺^{36, 129}. Se cree que esto representa un proceso fisiológico importante designado para eliminar aquellos linfocitos T autoreactivos que escapan la delección tímica y que potencialmente podrían ser activados por CD maduras que expresan al mismo tiempo Ags foráneos y Ags propios en la infección¹²⁹.

Se ha cuestionado la necesidad de tolerancia periférica dado que muchos Ags periféricos promueven tolerancia central debido a su expresión génica promiscua en células epiteliales medulares tímicas, proceso modulado por el regulador autoinmune AIRE^{130, 131}. En realidad, la deficiencia en AIRE resulta en el síndrome autoinmune indicando que el mecanismo de tolerancia periférica no puede compensar totalmente la ineficiencia de la tolerancia central. Sin embargo, es claro que la selección negativa en el timo no es suficiente para la eliminar todas las clonas autoreactivas de linfocitos T, ya que en ratones en donde se compromete el desarrollo o la acción de células Treg, se induce autoinmunidad¹³². Esto debe ser especialmente cierto en el caso de Ags propios que no necesariamente tienen acceso al timo o Ags que se expresan tardíamente en la vida adulta. Por lo tanto, existe un requerimiento para la tolerancia periférica, la cual ocurre en el órgano linfoide y es mediada por CD. CD inmaduras que presentan Ags a células T en ausencia de apropiada coestimulación inducen la anergia de células T (estado de las células T caracterizado por la incapacidad de producción de IL-2 y la incapacidad de proliferar), la depleción de células T o la inducción de células Treg con capacidad de secretar IL-10^{36, 133, 134}.

En el contexto de la inmunología tumoral, la inmunidad o tolerancia tumoral significa el éxito o el fracaso del sistema inmune de rechazar el tumor. El ambiente tumoral, el cual consiste en células del sistema inmune, células tumorales, células estromales y células de la matriz extracelular, es un campo de

batalla en el proceso neoplásico, acogiendo la proliferación, supervivencia y migración de las células tumorales. Sin embargo, el tumor no solamente pueden crecer y diseminarse, además puede mimetizar algunos caminos de señalización tolerogénicos, escapando así a la inmunidad tumoral.

2.5.4. Maduración de las CD y problemas de terminología

El término maduración ha sido interpretado erróneamente por algunos investigadores como una descripción fenotípica en lugar de una descripción funcional, es decir, alta expresión en la superficie de moléculas MHC, CD40, CD80 y CD86, debido a que la expresión de estas moléculas frecuentemente se correlaciona con la habilidad de iniciar una respuesta T. Sin embargo, recientemente este concepto ha sido cuestionado debido a algunas observaciones que muestran que CD maduras fenotípicamente no siempre promueven inmunidad T y pueden, en realidad, inducir tolerancia ^{135, 136}.

Los problemas surgieron cuando se examinó el fenotipo de las CD tolerogénicas. Se observó que las CD tolerogénicas pueden expresar niveles sustanciales de moléculas coestimuladoras y otros marcadores de maduración ^{135, 136}. En realidad, la expresión de moléculas coestimuladoras es necesario, generalmente, para la inducción de tolerancia ^{137, 138} y en algunos sistemas experimentales se ha observado que las CD realmente inmaduras, que no presentan marcadores de maduración, son ignoradas por los linfocitos T en vez de inducir tolerancia ¹³⁵. Esta dicotomía entre la expresión de marcadores de maduración y la función de las CD es aparente también en el hecho que altos niveles de CD40, CD80, CD86 y MHCII no predicen de manera confiable la inmunogenicidad de las CD. Por ejemplo, CD deficientes en CD40 no pueden iniciar una respuesta T CD4⁺ o CD8⁺ ¹³⁹. Igualmente, CD expuestas a niveles endógenos de mediadores inflamatorios *in vivo*, no pueden iniciar una respuesta T CD4⁺, pero muestran características convencionales de maduración, incluyendo la habilidad de estimular la proliferación de linfocitos T vírgenes tan eficientemente como CD inmunogénicas ¹⁴⁰.

Otra contradicción surge cuando se estudian a algunas subpoblaciones de CD. Por ejemplo, los descendientes de LC en los pLN, en estado de reposo, expresan niveles altos de marcadores de maduración comparables a los niveles

expresados en condiciones inflamatorias⁶⁰. Si se descarta la idea de que las LC son constitutivamente inmunogénicas¹⁴¹, esto indicaría nuevamente que el fenotipo de las CD no inmunogénicas se asemeja al de las CD inmunogénicas.

El problema fundamental es que, lamentablemente, no se ha encontrado la molécula que envíe una señal de activación y que al mismo tiempo sea un verdadero marcador de maduración. Por ejemplo, la expresión de CD80 y CD86 por las CD y su interacción con CD28 en las células T, es crucial para enviar la señal coestimuladora que promueve la supervivencia de los linfocitos T, la progresión del ciclo celular y la estabilidad de mRNA de la IL-2¹⁴². Sin embargo, se ha observado que tanto CD80 como CD86 pueden interactuar también con CTLA4, un regulador negativo de la activación de los linfocitos T, aunque la afinidad de CD80 por CTLA4 es mayor que la afinidad de este por CD28¹⁴³. Igualmente, OX40L, 4-1BB ligando y CD70 pueden contribuir a la inmunidad pero también pueden inhibir la activación de los linfocitos T¹⁴⁴.

En conclusión, las CD funcionalmente inmaduras pueden expresar marcadores de maduración y las CD que expresan marcadores de maduración no necesariamente son funcionalmente maduras. Otros parámetros además del fenotipo de las CD son necesarios para determinar el estado funcional de las mismas.

2.5.5. Receptores tipo Toll

El camino principal por el cual se induce la activación y maduración de las CD y se promueven las señales necesarias para la activación de los linfocitos T vírgenes ocurre vía el reconocimiento de organismos patogénicos por receptores específicos. Las CD detectan patrones moleculares conservados que son únicos en el mundo microbiano e invariantes entre distintos tipos de organismos patogénicos¹⁴⁵. El blanco de estos patrones de reconocimiento (PAMP) son detectados por receptores de reconocimiento de patrones (PRR), los cuales indican la presencia de una infección al huésped.

Los receptores de tipo Toll (TLR) es una familia de PRR bien caracterizados en mamíferos. A pesar que el número exacto de genes puede variar entre distintas especies, la mayoría de los mamíferos poseen entre 10 y 15 TLR, los cuales detectan varios PAMP¹⁴⁶, incluyendo lipopolisacárido (LPS)

(detectado por el TLR4), lipoproteínas bacterianas y ácidos lipoteicoicos (detectados por el TLR2), flagelina (detectado por el TLR5), secuencias CpG de ADN no metilado (detectado por el TLR9), ARN de doble cadena (detectado por el TLR3), y ARN viral de simple cadena (detectado por el TLR7) ¹⁴⁷⁻¹⁵⁰. Los TLR 1, 2, 4, 5 y 6 están especializados en el reconocimiento de productos bacterianos únicos que no se encuentran en el huésped. La detección de estos productos se debe simplemente a una discriminación entre lo propio y lo extraño. Los TLR 3, 7, 8 y 9, por el contrario, se especializan en el reconocimiento viral y de ácidos nucleicos, los cuales no son únicos al mundo microbiano. En este caso, la discriminación entre lo propio y lo extraño no se debe a la naturaleza molecular del ligando sino más bien por su accesibilidad a los TLR. Estos TLR están localizados en compartimientos intracelulares ^{151, 152} y reconocen los ácidos nucleicos virales en endosomas-lisosomas tardíos ^{148, 149, 153}. En condiciones normales los ácidos nucleicos del huésped no son accesibles a estos compartimientos, por lo tanto no activan a los TLR.

Además de ser específicos para distintos ligandos, los TLR son distintos en las vías de transducción que ellos activan. Estas diferencias dependen en el reclutamiento de adaptadores citoplasmáticos que se asocian con la región intracitoplasmática de los TLR ¹⁵⁴. Finalmente, la señalización vía TLR induce la activación de varios factores de transcripción, incluyendo NF- κ B y IRFs y se induce la expresión de varios genes que permiten una amplia variedad de respuestas inmunes.

Como se explicó anteriormente, las CD inmaduras funcionan principalmente como células que capturan Ags, mientras que las CD maduras funcionan como células presentadoras de Ags. Así, las CD inmaduras son poco inmunogénicas y pueden incluso inducir tolerancia: la inoculación intra-ganglio de CD inmaduras derivadas de monocitos estimulados con GM-CSF y IL-4 no inducen respuestas inmunes marcadas, mientras que las CD maduras del mismo paciente sí ¹⁵⁵. Sin embargo, el método utilizado actualmente para inducir la maduración de las CD con una mezcla de citocinas pro-inflamatorias (IL-1 β , TNF, IL-6 y PGE2) ¹⁵⁶ no ha demostrado ser eficaz y tiene que ser comparada en paralelo con otros estímulos. Es por ello importante identificar estímulos que induzcan el programa adecuado de activación de las CD: CD con capacidad de inducir CTL específicas y ausencia de células Treg.

Los ligandos de TLR son atractivos para inducir la maduración de las CD por varias razones:

- Las CD activadas con ligandos de TLR producen IL-6, citocina que inhibe la función de las células Treg¹⁵⁷.
- CD activadas con ligandos de TLR tienen capacidad de activar células NK y NKT¹⁵⁸
- Las CD maduras con ligandos de TLR tienen capacidad de inducir respuestas de memoria¹⁵⁹.
- La señalización vía TLR promueve la presentación cruzada de Ags por las CD e induce la activación de CTL¹⁶⁰.

Por lo tanto, se podría especular que la estimulación de CD con agonistas de TLR podría ser un método efectivo de terapia anti-tumoral.

2.6 CD EN EL MICROAMBIENTE TUMORAL

Las CD maduras tienen la capacidad de inducir fuertes respuestas Th1 y son consideradas potentes inductoras de respuestas inmunes. Sin embargo, la presencia de CD funcionalmente inmunogénicas (maduras) es muy raro en tumores humanos de ovario¹⁶¹, mama¹⁶², próstata¹⁶³ y renales¹⁶⁴. Esto puede ser causado por un defecto en el reclutamiento de las CD, un defecto en la diferenciación o un defecto en la maduración de las CD en el microambiente tumoral. Actualmente, existe amplia evidencia que documenta la supresión de la maduración y la diferenciación de las CD por factores presentes en el microambiente tumoral.

2.6.1. Factores solubles

El microambiente tumoral se caracteriza por la falta de moléculas que promueven la diferenciación de las CD, como el GM-CSF y la IL-4 y la falta de citocinas que inducen respuestas Th1 (IL-12, IL-18 y IFN- γ), pero abundancia en moléculas que suprimen la diferenciación y la función de las CD:

- Grandes cantidades del factor de crecimiento vascular (VEGF). Las células tumorales son grandes productoras de VEGF¹⁶⁵, aumentando el

nivel del mismo en el microambiente tumoral. VEGF fue la primera molécula reportada con capacidad de suprimir la diferenciación y maduración de las CD ¹⁶⁶.

- IL-6 y el factor estimulador de colonias de macrófagos (M-CSF). Se demostró que las células tumorales y los macrófagos en el microambiente tumoral pueden producir estos factores solubles, los cuales tienen la capacidad de diferenciar las CD a macrófagos. Esta diferenciación es causada por un aumento en la expresión del receptor de M-CSF ¹⁶⁷. Se han encontrado niveles elevados de IL-6 y de la proteína C-reactiva (CRP) en sangre periférica y ascitis de pacientes con cáncer ovárico ¹⁶⁵.
- Un gran número de tumores expresan altos niveles de ciclooxigenasa-2 (COX2) ^{168, 169}. COX2 promueve la producción de prostaglandina E2 (PGE2) en el microambiente tumoral y este último suprime la diferenciación y la función de las CD ^{170, 171}.
- Las células tumorales, macrófagos en el microambiente tumoral y/o células Treg tienen la capacidad de producir IL-10 y el factor β transformante de crecimiento (TGF- β), los cuales suprimen también la maduración y función de las CD ¹⁷².
- Neuroblastomas, melanomas y otros tumores producen grandes cantidades de gangliosidos los cuales pueden suprimir la diferenciación de CD humanas ^{173, 174}.

Altos niveles en VEGF, IL-6, M-CSF, TGF- β , IL-10, COX2, PGE2, gangliosidos y otras moléculas supresoras y bajos niveles en GM-CSF, IL-4, IL-12 y IFN- γ causan un patrón aberrante en el microambiente tumoral. Este desbalance de citocinas en el microambiente tumoral bloquea la diferenciación y maduración de las CD. Mientras CD funcionalmente maduras pueden inducir potentes respuestas inmunes Ag-específicas ¹⁷⁵, CD inmaduras o parcialmente diferenciadas inducen células Treg ^{133, 134} o la no respuesta de las células T ⁷⁴. Por lo tanto, estas CD inmaduras o parcialmente diferenciadas pueden funcionar como “CD reguladoras” y son componentes importantes en el microambiente tumoral.

2.6.2. Moléculas inhibidoras

Además de inhibir la maduración y diferenciación de las CD, los factores presentes en el microambiente tumoral pueden inducir la expresión de moléculas inhibidoras en las CD, afectando así la capacidad de las mismas de activar una respuesta anti-tumoral Ag específica ¹⁷⁶.

Se ha identificado recientemente un nuevo miembro de la familia B7 denominado B7-H1. Existe aproximadamente un 25% de homología entre CD80, CD86 y B7-H1 ¹⁷⁷. Distintos factores en el microambiente tumoral estimulan la expresión de B7-H1 en las CD. Por otra parte, un número significativo de células T asociadas a tumores son Treg ¹⁷⁸ las cuales expresan PD-1, el ligando para B7-H1 ¹⁷⁸. La interacción entre B7-H1 y PD-1 inhibe la producción de IL-12 por las CD, lo cual reduce su inmunogenicidad ¹⁷⁹, y el bloqueo de B7-H1 con anticuerpos aumenta la activación de linfocitos T mediada por CD ¹⁷⁹ y reduce el tamaño de carcinomas de ovario humanos transplantados en ratones ¹⁷⁹. El bloqueo de PD-1 (uno de los ligandos de B7-H1) por manipulación genética (células PD-1^{-/-}) o con el tratamiento con anticuerpos, eficientemente inhibe la diseminación del melanoma B16 o el cáncer de colon CT26, acompañado de un aumento en el número de células T efectoras ¹⁸⁰. Por lo tanto, el aumento en la expresión de B7-H1 en las CD en el microambiente tumoral es un mecanismo nuevo para la evasión inmune del tumor.

Entre las moléculas inhibidoras más estudiadas se encuentra el CTLA4, el cual se expresa en los linfocitos T luego de su activación. Por otra parte, células Treg de ratón expresan constitutivamente CTLA4 ^{181, 182}. La interacción de CTLA4 con su ligando en las CD envía señales inhibitorias ¹⁸³ a los linfocitos T. Interesante es el hecho que CTLA4 puede interactuar con CD80 y CD86 en las CD, pero la afinidad de CD80 por este ligando parecería ser mayor que la afinidad del mismo por CD28 ¹⁴³.

La expresión de IDO ha sido documentada en CD murinas y humanas ¹⁸⁴. IDO cataliza la lisis oxidativa del triptófano, aminoácido esencial para la proliferación y diferenciación de células T. Las CD IDO⁺ disminuyen la cantidad de triptófano libre y por lo tanto bloquean la progresión del ciclo celular. Esto previene la expansión clonal de células T y promueve la muerte de células T por apoptosis ¹⁸⁴. Se han encontrado CD IDO⁺ en cáncer de mama y en ganglios

linfoides de drenaje de pacientes con cáncer de mama, colon, pulmón y páncreas¹⁸⁴. Además, el tratamiento de ratones con un inhibidor de IDO (1-metilriptófano), disminuye en forma significativa el crecimiento tumoral¹⁸⁵. Cabe destacar que la expresión de IDO en CD murinas aumenta luego de la inoculación de anticuerpos anti-CTLA4¹⁸⁵, indicando que células que expresan CTLA4, por ejemplo células Treg, inducen la expresión de IDO en CD en el microambiente tumoral.

En conclusión, las CD en el microambiente tumoral expresan altos niveles de moléculas inhibitoras (B7-H1, IDO), reduciendo así la capacidad de inducir respuestas inmunes Ag-específicas.

2.6.3. T reguladoras

Las células Treg se definen como células T que poseen la capacidad de inhibir la respuesta inmune influyendo la actividad de otros tipos celulares¹⁸⁶. Las Treg CD4⁺ se dividen en dos subgrupos: las Treg naturales (CD4⁺ CD25⁺) o las Treg inducidas (IL-10 Treg)¹⁸⁷⁻¹⁸⁹.

Las células Treg son componentes cruciales de la inmunosupresión tumoral. Se ha observado un aumento de las células Treg CD4⁺ CD25⁺ funcionalmente activas en pacientes con cáncer^{190, 191}. Además, la administración de Acs anti-CD25^{192, 193} o Acs anti-CTLA4¹⁹⁴ en ratones con tumores aumenta la eficiencia de las terapias y disminuye el tamaño tumoral. Estos estudios indican que tanto las células CD25⁺ como las células CTLA4⁺ son esenciales para el crecimiento tumoral.

Varios factores producidos por tumores pueden inducir la diferenciación de células Treg. En particular, IL-10 y TGF- β producido por tumores de ovario favorecen e inducen la diferenciación de células Treg. Por otra parte, CD productoras de IDO o CD con alta expresión de moléculas inhibitoras poseen alta capacidad de interactuar con células Treg vía PD-1 y/o CTLA4 (sección 2.6.2).

Este aumento en las células Treg en el microambiente tumoral favorece las condiciones tolerizantes y reduce la capacidad de eliminar el tumor. La depleción o inhibición de las células Treg puede ser una estrategia prometedora para inducir inmunidad anti-tumoral.

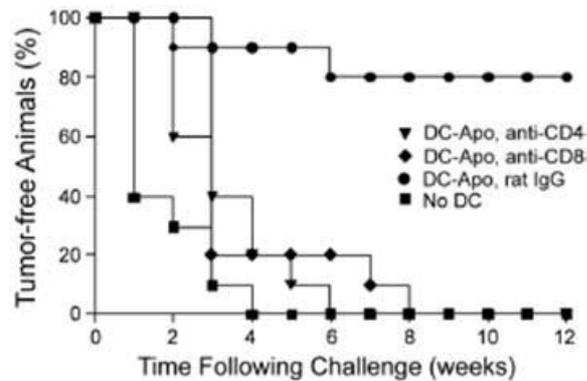
3. INMUNOTERAPIA DEL CÁNCER Y CD: MODELOS EXPERIMENTALES UTILIZADOS EN EL TRABAJO DE TESIS DOCTORAL

Tres modelos experimentales permitieron plantear el objetivo de esta tesis doctoral^{2, 195, 196}. La alumna de doctorado y la tutora académica participaron activamente en estos modelos experimentales murinos.

3.1 MODELO I: VACUNACIÓN DE ANIMALES CON CD CARGADAS CON CÉLULAS TUMORALES APOPTÓTICAS EX VIVO

En este modelo experimental murino, las CD derivadas de médula ósea fueron cultivadas con células tumorales apoptóticas por 12 hs. Ratones C57Bl/6 fueron vacunados en forma s.c. una vez por semana por cuatro veces consecutivas con estas CD cargadas. En la quinta semana los ratones fueron desafiados con células tumorales viables. Ocho de cada diez animales permanecieron libres de tumores luego del desafío. La protección observada fue de larga duración (animales desafiados diez semanas luego de la vacunación permanecieron libres de tumor) y dependiente de células CD4⁺ y CD8⁺ (Esquema 4).

La ventaja de este modelo murino es que el uso de CD mostró ser eficiente para la inmunoterapia protectora del cáncer. La desventaja de este modelo experimental es que para inducir respuestas inmunes protectoras es necesario la inoculación consecutiva de la vacuna por cuatro semanas. La inoculación de la vacuna por dos o tres semanas muestra limitada protección a posteriores desafíos con células tumorales viables (resultados no publicados). Por otra parte, en este modelo, no se logró la eliminación de tumores establecidos (resultados no publicados). Estos resultados sugieren un defecto en la vacuna. Probablemente ese defecto está relacionado con el hecho que solamente un 0.5 % de las CD inoculadas llegan al LN, es decir, esta vacuna muestra una deficiencia en la migración de las CD a las zonas ricas en células T para la presentación del Ag.



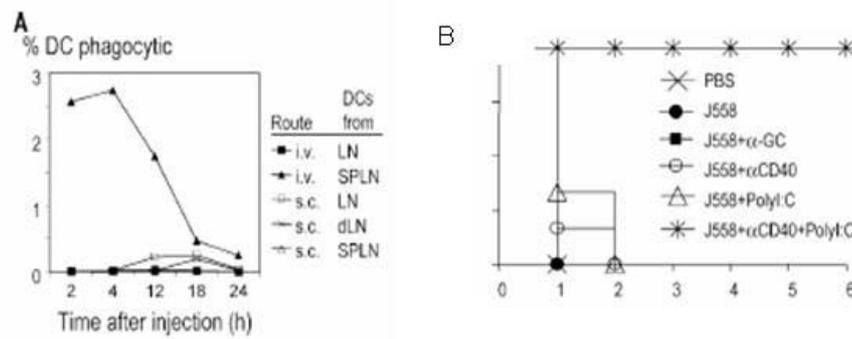
Esquema 4. Protección en contra de células tumorales B16 luego de la vacunación con CD cargadas con células tumorales apoptóticas. Ratones C57Bl/6 fueron vacunados con CD cargadas con células tumorales apoptóticas semanalmente por cuatro semanas. Una semana más tarde, los ratones fueron desafiados con células B16 viables. En algunos experimentos, los animales vacunados fueron tratados con Acs anti-CD4, anti-CD8 o IgG normal de rata, un día después y el día del desafío con células tumorales viables. Los ratones fueron monitoreados día por medio y se consideraron positivos cuando el tumor era palpable. Se muestra un experimento representativo de dos. Adaptado de Goldzmid y col; Journal of Immunol 2003.

3.2 MODELO II: VACUNACIÓN DE ANIMALES CON CÉLULAS TUMORALES APOPTÓTICAS EN PRESENCIA DE α -GALACTOSILCERAMIDA *IN VIVO*

Basado en los resultados del modelo I que demostraron que las CD podían ser cargadas *ex vivo* con células tumorales apoptóticas e inducir inmunidad protectora pero no terapéutica, fue objetivo de este modelo (II) investigar si las CD podrían ser cargadas *in vivo* con células tumorales apoptóticas. La hipótesis fue que un mayor número de CD maduras cargadas con el Ag inducirían inmunidad terapéutica. Para esto, células de mieloma murino fueron inoculadas i.v. en ratones Balb/c. Se demostró que las células tumorales son capturadas por las CD CD11c⁺ CD8⁺ del bazo. Además, cuando se inocularon las células tumorales en presencia de α -galactosilceramida, glicolípido que induce la maduración de las CD vía la activación de NKT, se observa protección a desafíos posteriores con células tumorales viables. En este trabajo, se demostró también, que la protección es dependiente de linfocitos CD4⁺ y CD8⁺ (Esquema 5).

Las desventajas de este modelo experimental son varias. En primer lugar, para obtener respuesta inmune profiláctica es necesario la inoculación de grandes cantidades de células tumorales irradiadas (20×10^6 células tumorales

apoptóticas), lo cual sugiere, nuevamente, la ineficiencia en la dirección de Ag a las CD. Por otra parte, en este modelo se observa inmunidad anti-tumoral profiláctica, pero no se logra rechazar tumores establecidos (inmunidad terapéutica, resultados no publicados). Interesante es el hecho que no cualquier estímulo de maduración de las CD puede ser utilizado para la inducción de inmunidad anti-tumoral profiláctica: LPS (resultados no mostrados) y poly IC (Esquema 5) fracasaron en inducir inmunidad anti-tumoral, mientras que α GalCer y poly IC + anti-CD40 permiten la “correcta” maduración de las CD y la inducción de respuestas inmunes anti-tumorales.

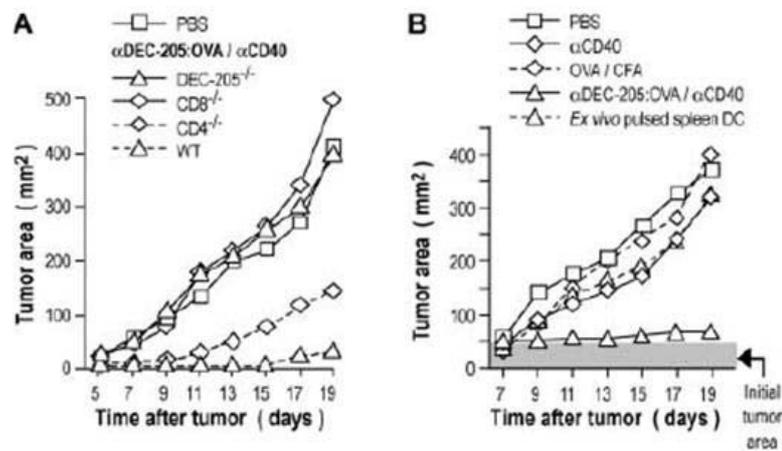


Esquema 5. Células tumorales irradiadas inoculadas i.v. en presencia de α GalCer inducen protección anti-tumoral. A) Cinética de endocitosis de 20×10^6 células tumorales irradiadas luego de la inoculación i.v. o s.c. B) Los ratones fueron vacunados con 20×10^6 células tumorales irradiadas en presencia del estímulo indicado. 7 días más tarde, los ratones fueron desafiados con células tumorales viables. Adaptado de Liu y col; J.Exp.Med 2005.

3.3 MODELO III: DIRECCIÓN DE ANTÍGENOS MODELOS A LAS CD UTILIZANDO ACS ANTI- EL RECEPTOR ENDOCÍTICO DEC205

DEC205 es un receptor endocítico tipo C-lectina expresado en las CD. En este modelo experimental se conjuga químicamente el Ag modelo OVA en el Ac anti- DEC205 con el objetivo de dirigir el Ag a todas las CD CD11c⁺ CD8⁺ de bazo y LN *in vivo*. Luego de una sola inoculación con Acs anti- DEC205-OVA se observa dirección sistémica y específica del Ag a las CD. Además, cuando los Acs son inoculados en presencia del agonista anti-CD40, se observa proliferación y

activación de linfocitos CD4⁺ y CD8⁺ indicando la presentación del Ag en complejos MHCI y MHCII. Por otra parte, cuando los animales vacunados con Acs anti-DEC205-OVA en presencia del agonista anti-CD40 son desafiados con células tumorales B16 que expresan OVA (MO4) se observa protección profiláctica y terapéutica (Esquema 6). Este resultado sorprendente sugiere que la correcta dirección de Ags a las CD y la activación de las mismas son esenciales para inducir respuestas inmunes anti-tumorales terapéuticas.



Esquema 6. Inmunización con una dosis única de Acs anti-DEC205-OVA y anti-CD40 induce resistencia a tumores. A) Los ratones fueron vacunados con Acs anti-DEC205-OVA en presencia del agonista anti-CD40. 60 días más tarde, los ratones fueron desafiados con células tumorales viables que expresan OVA. B) Los ratones fueron primero inoculados con células tumorales MO4 viables y una semana más tarde fueron inmunizados con una dosis de Acs anti-DEC205-OVA en presencia del agonista anti-CD40. Adaptado de Bonifaz y col; J.Exp.Med 2004.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La inmunoterapia del cáncer tiene como objetivo principal manipular el sistema inmune para inducir el rechazo de tumores establecidos. Para ello se han diseñado varias estrategias en modelos murinos y en pacientes. Sin embargo, generalmente los beneficios obtenidos son parciales. En particular, nosotros trabajamos con tres modelos murinos anti-tumorales. En dos de estos modelos, células tumorales irradiadas fueron utilizadas como fuente de antígenos, y en el tercero, un antígeno específico fue dirigido a las CD *in vivo* vía Acs anti el receptor endocítico DEC205. A pesar que los tres modelos utilizan a las CD como mediadoras en la inducción de respuestas inmunes, la utilización de células tumorales irradiadas como fuente de antígenos impide la inducción de respuestas inmunes terapéuticas. Por el contrario, cuando el antígeno es dirigido a las CD vía Acs anti el receptor endocítico DEC205, se inducen respuestas inmunes anti-tumorales profilácticas y terapéuticas.

Dado que las CD son moduladoras centrales en el inicio de las respuestas inmunes, la inducción de respuestas anti-tumorales terapéuticas podría depender de: a) la correcta dirección del Ag, y b) la activación funcional de las CD. Por lo tanto, el estudio detallado y la comparación de estos dos puntos en los modelos anteriormente mencionados permitirán determinar las condiciones necesarias y el mecanismo de inducción de respuestas inmunes terapéuticas.

HIPÓTESIS

La ausencia de respuestas inmunes anti-tumorales terapéuticas cuando se utilizan a las células tumorales irradiadas como fuente de antígenos se debe a:

- A) a un bajo número de CD cargadas con antígenos tumorales, y/o
- B) la activación inadecuada de las CD en presencia de las células tumorales

OBJETIVOS PROPUESTOS

Para proponer el objetivo de esta tesis nos basamos en nuestros resultados previos que demuestran que las CD cargadas con células tumorales irradiadas *in vitro* e *in vivo* pueden ser utilizadas para generar inmunidad anti-tumoral profiláctica pero no terapéutica. Por el contrario, la inmunización con Ags dirigidos a las CD vía Acs anti receptores específicos induce inmunidad profiláctica y terapéutica. Por lo tanto, el objetivo principal de esta tesis doctoral fue **determinar si la inducción de respuestas inmunes terapéuticas depende de a) la eficiente captura del antígeno por las CD, y b) la correcta activación/maduración de las CD.**

En particular se consideró:

La inducción de la “correcta” activación / maduración de las CD fue evaluada con el modelo que utiliza de células tumorales como fuente de antígenos. Los objetivos fueron específicamente estudiar:

- a) El estado de activación de las CD luego de la interacción con las células tumorales irradiadas *in vivo* e *in vitro*. Dentro de este contexto se realizaron experimentos que determinaron i) la expresión de marcadores de superficie de las CD co-cultivadas con las células tumorales apoptóticas, ii) la secreción de citocinas por estas mismas células, iii) la capacidad de las CD de fagocitar Ag tumorales *in vivo*, iv) el estado de maduración de las CD luego de la endocitosis de esos antígenos tumorales *in vivo*. **(Capítulo I).**
- b) La utilización de distintos estímulos que inducen normalmente la activación funcional de las CD con el objetivo de inducir CD cargadas con células tumorales irradiadas con capacidad de iniciar potentes respuestas inmunes terapéuticas. Para ello se evaluó la expresión de marcadores de superficie y la secreción de citocinas de CD cultivadas con células tumorales irradiadas en presencia de ligandos de TLR. **(Capítulo II).**

La captura eficiente del antígeno por las CD fue evaluada con el modelo que dirige antígenos a las CD vía anticuerpos anti receptores endocíticos. Los objetivos fueron específicamente:

- c) Diseñar una estrategia de vacunación dirigiendo antígenos tumorales a las CD maduras, evitando así la utilización de células tumorales apoptóticas como fuente de antígenos e incrementando el número de CD cargadas con Ags tumorales. Para cumplir con este objetivo, se evaluó la eficacia de la vacunación con Acs anti-DEC205 conjugado genéticamente con la proteína E7 del papiloma humano. **(Capítulo III).**
- d) Estudiar la expresión de un nuevo receptor tipo C-lectina, llamado Langerina, como potencial blanco para la dirección de Ags tumorales a las CD. **(Capítulo IV).**
- e) Finalmente, fue objetivo de esta tesis doctoral estudiar las consecuencias de dirigir el antígeno modelo OVA a las células dendríticas vía anticuerpos anti el receptor Langerina. **(Capítulo V).**

MATERIALES Y MÉTODOS

1. ANIMALES

Durante el desarrollo de esta tesis doctoral fueron utilizados ratones C57BL/6 (B6; H-2^b) y ratones BalB/cByJ (H-2^d) hembras de 6-8 semanas de edad provenientes de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), Harlam o de Jackson Laboratories (USA). Se han descrito los ratones transgénicos OT-I (provistos por el Dr. Carbone, Universidad de Melbourne, Parkville, Victoria, Australia), ratones OT-II y ratones DO11.10 (Jackson laboratory). Los ratones fueron mantenidos bajo condiciones específicas libres de organismos patogénicos en ambientes con temperatura controlada y ciclos de luz/oscuridad regulados. Todos los experimentos fueron llevados a cabo según normas éticas locales.

2. ANTICUERPOS Y REACTIVOS

Anti CD16/32, Acs anti-MHCII, CD40, CD86, CD80, CD69, I-A^b, I-E^k, CD11b y Rat IgG2a conjugados con FITC, Ac conjugado con PE anti B7-DC, B7-H1, IL-12, TNF- α , IL-6 y Acs conjugados con APC (aloficocianina) anti-CD11c son de BD Biosciences (San Diego, CA) o de BD PharMingen (San Diego, CA). Acs de oveja conjugado con bolitas magnéticas anti-IgG son de Dynal (Lake Success, NY) y Acs conjugados con micro bolitas magnéticas (microbeads[®]) anti-CD11c, CD19, CD5 y CD8 son de Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach, Ger). Otros reactivos utilizados fueron RPMI 1640 (Gibco BRL), solución buffer salina (PBS, Gibco BRL), HANKS (Gibco BRL), suero fetal bovino (FBS; Gibco BRL, Life Technologies, MD, o Natocor, Argentina), suero con bajo contenido de IgG (Ultra low IgG serum, Gibco BRL, Life Technologies, MD), fluorocromo carboxifluorescein-diacetato-succinimidil-ester (CFSE; Molecular Probes), solución de albúmina bovina 30% (BSA, Sigma-Aldrich), FITC-Anexina V/PI (BD Pharmingen), Colagenasa D (400 U/ml; Roche), EDTA (0,1M; Gibco BRL, Life Technologies, MD), Brefeldina A (Sigma-Aldrich) y poly IC (Amersham Biosciences). LPS de *Salmonella typhimurium* fue donado generosamente por el Dr. Rodolfo Pastelín (Facultad de química, UNAM).

3. CÉLULAS

3.1 LÍNEAS CELULARES

Las siguientes líneas celulares fueron mantenidas en cultivo continuo en atmósfera con humedad y temperatura controlada (5% CO₂; 37° C). Todas las células fueron mantenidas libres de micoplasma y la ausencia del mismo fue periódicamente analizado utilizando la coloración de Hoechst y / o amplificación por PCR (sección 3.3)

La línea celular TC-1 fue generada por transducción retroviral de un fibroblastoma pulmonar de origen C57BL/6 con HPV-16 E6/E7 y los oncogenes c-H-ras¹⁹⁷. La línea TC-1 (The American Type Culture Collection, ATCC) de crecimiento en forma de monocapa adherente, fue mantenida en cultivo en medio RPMI 1640 suplementado con 10 % de suero fetal bovino (FBS), 100 U/ml penicilina, 100 µg/ml estreptomina (Gibco BRL) y 2mM L-glutamina.

La línea celular J558 es un plasmocytoma de origen en Balb/c¹⁹⁸. La línea J558 (ATCC) de crecimiento en suspensión, fue mantenida en cultivo en medio RPMI 1640 suplementado con 10 % de FBS, 100 U/ml penicilina, 100 µg/ml estreptomina (Gibco BRL) y 2mM L-glutamina.

El melanoma murino B16 (H-2^b)¹⁹⁹ es un tumor no inmunogénico de origen espontáneo. Expresa niveles bajos o no detectables de moléculas MHCII y es altamente tumorigénico. La línea B16-F1 (ATCC) de crecimiento en forma de monocapa adherente, fue mantenida en cultivo en medio RPMI 1640 suplementado con 10 % de FBS, 100 U/ml penicilina, 100 µg/ml estreptomina (Gibco BRL) y 2 mM L-glutamina.

3.2 HIBRIDOMAS

Los hibridomas productores de IgG de rata anti- MHCII (Tib 120, M5/114.15.2), B220 (Tib 146, RA 3-3A1), F4 / 80 (Hb198), CD4 (GK1.5) y CD8 (Tib 105, 53-6.72) se obtuvieron a partir de la ATCC. Los hibridomas fueron mantenidos en cultivos continuos en atmósfera controlada (5 % CO₂; 37° C). Los hibridomas fueron cultivados en el medio RPMI 1640 suplementado con 10 % FBS, 100 U / ml penicilina, 100 µg / ml estreptomina y 2 mM L-glutamina.

3.3 DETECCIÓN DE MICOPLASMA

Para la detección de micoplasma mediante la coloración de Hoechst, las células fueron sembradas sobre un cubreobjetos previamente flameado en alcohol, en una placa de petri de 35 mm de diámetro en 2 ml del medio fresco correspondiente durante 24-48 hs. Sin descartar el medio, se agregó 1 ml de fijador Carnoy (metanol: ácido acético glacial; 3: 1) durante 2 minutos. Luego de la incubación, se descartó el medio y se agregó 1 ml de Carnoy fresco durante 5 minutos. Este último paso fue repetido, luego de lo cual, los cubreobjetos conteniendo las células, fueron secados al aire. Las células adheridas al vidrio fueron teñidas con el colorante de Hoechst (0,5 µg / ml; Sigma) por media hora a temperatura ambiente protegiendo de la luz. Los cubreobjetos fueron lavados dos veces con agua destilada. Luego de que los vidrios se encontraran secos, los mismos fueron montados sobre un portaobjetos con polivinil alcohol-vinilacetato (Polysciences, Inc.) con la cara conteniendo las células adheridas hacia abajo. El resultado fue observado en el microscopio de fluorescencia utilizando filtros Dapi, donde la contaminación con micoplasma se evidenció por la presencia de un puntillado fluorescente intra- y /o inter- citoplasmático.

La tinción de Hoechst fue realizada periódicamente. Esporádicamente, la detección de micoplasma fue realizada por un método más sensible que el Hoechst como es la amplificación por PCR. Esto se realizó según instrucciones del fabricante (Mycoplasma Detection Kit, Version 2.0, ATCC).

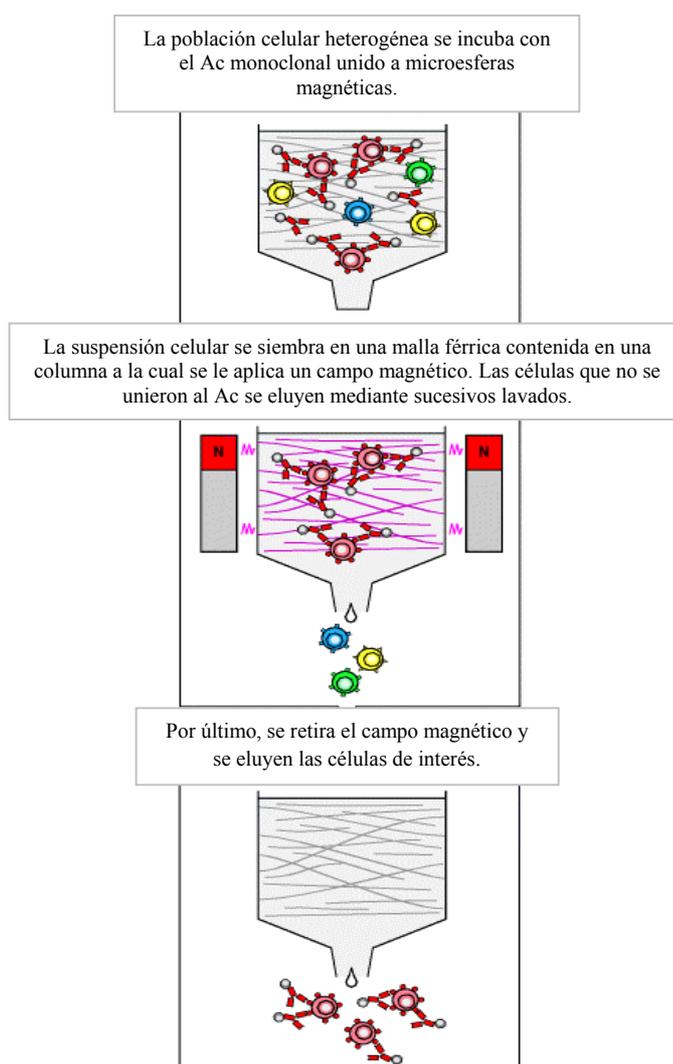
3.4 MARCAJE DE CÉLULAS CON CFSE

Para el marcaje de las células, estas fueron lavadas en PBS y resuspendidas a una concentración de 10^7 cél / ml. Las células fueron incubadas con CFSE a una concentración de 5 µM por 10 minutos a 37° C. La reacción fue frenada lavando tres veces con PBS, luego de lo cual las células fueron contadas con cámara de Neubauer.

3.5 SELECCIÓN POSITIVA DE CÉLULAS

Las suspensiones celulares lavadas con PBS fueron resuspendidas en MACS Buffer (PBS / 0,5% BSA / 2mM EDTA) a una concentración de 1×10^7 células cada 80 μl . Luego se agregaron 20 μl de microesferas magnéticas cubiertas con anticuerpo específico cada 1×10^7 células y la suspensión celular fue incubada 30 minutos a 4°C . Las células fueron luego lavadas con MACS buffer y resuspendidas en 0,5 ml del mismo buffer. Las células positivas se obtuvieron por aplicación de un campo magnético utilizando las columnas miniMACS (Miltenyi Biotec) según las instrucciones del fabricante.

Purificación de células por selección positiva



4. ANTICUERPOS MONOCLONALES Y SU PRODUCCIÓN

4.1 PRODUCCIÓN DE ANTICUERPOS MONOCLONALES A PARTIR DE SOBRENADANTES DE CULTIVO

La obtención de Acs monoclonales fue realizada mediante la recolección del sobrenadante de cultivo. Para esto, los hibridomas fueron mantenidos en cultivo en medio RPMI 1640 suplementado con 5 % de suero con bajo contenido de IgG (Gibco), 100 U/ml penicilina, 100 µg/ml estreptomina y 2mM L-glutamina. Los sobrenadantes de cultivo fueron utilizados principalmente para la depleción de poblaciones linfocitarias *in vitro* (sección 8.2) o para la purificación de anticuerpos monoclonales y su posterior marcaje con Biotina o Alexa (Sección 4.2). La purificación de los Acs monoclonales fue realizada utilizando proteína G (Amersham Pharmacia Biotech) siguiendo las instrucciones del fabricante.

4.2 MARCAJE DE ANTICUERPOS MONOCLONALES

Los Acs monoclonales obtenidos fueron dializados en PBS para eliminar pequeñas trazas del buffer de elución. Para el marcado de los Acs con Alexa 488 o con Alexa 647 (Invitrogen), se siguieron las instrucciones del fabricante con algunas pequeñas modificaciones. En el caso del marcaje con Alexa 647, 2 mg de proteína fue incubada con el reactivo por 30 min.

Para el marcaje de los Acs con Biotina (Pierce), los mismos fueron incubados con Biotina disuelta en DMSO a una concentración de 10 mg/ml por 2 hs a temperatura ambiente. Luego, los Acs fueron dializados para eliminar trazas de Biotina (0.1M Tris.HCL, 0.2M NaCl, pH 7.4).

4.3 PRODUCCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE ANTICUERPOS RECOMBIANANTES

Los Acs de fusión fueron obtenidos por expresión transiente (precipitación de DNA con la técnica de calcio-fosfato) en células 293T en medio DMEM libre de

suero suplementado con Nutridoma SP (Roche, Hutchison 2002). La purificación de Acs fue realizada mediante columnas con proteína G (Amersham Pharmacia Biotech) siguiendo las instrucciones del fabricante. La caracterización de los Acs recombinantes fue realizada por SDS-PAGE o Western Blotting (Acs conjugados con HRP anti- ratón IgG1, Amersham, o anti-OVA, RDI).

5. INDUCCIÓN Y DETECCIÓN DE LA APOPTOSIS

Las células tumorales fueron tratadas con radiación de tipo γ para acelerar la apoptosis. Brevemente, cuando las células alcanzaban una confluencia del 70-80 %, estas fueron cosechadas, lavadas dos veces con PBS y resuspendidas a una concentración de 10×10^6 cél / ml en PBS e irradiadas a 7500 rads (75 Gy, Banco de Sangre, Centro Medico Nacional “La Raza”, Instituto Mexicano del Seguro Social, México DF, México). Luego de la radiación, diferentes condiciones de cultivo fueron estudiadas: las células fueron cosechadas luego de 24 hs, 48 hs y 72 hs de cultivo en medio RPMI. La detección de la apoptosis fue realizada utilizando un kit de Anexina V-FITC (PharMingen, San Diego, CA), luego de lo cual se realizó un análisis de citometría de flujo (FACS Vantage SE, Becton Dickinson). El porcentaje de apoptosis fue determinado como Anexina V⁺ / IP⁻ para la apoptosis temprana y Anexina V⁺ / IP⁺ para la necrosis secundaria.

6. CÉLULAS DENDRÍTICAS

6.1 OBTENCIÓN DE CD A PARTIR DE PRECURSORES DE MÉDULA ÓSEA

Las CD fueron obtenidas a partir de precursores de médula ósea de ratones C57BL/6 o Balb/c utilizando una leve modificación del método descrito por Lutz y col²⁰⁰. Se extirparon cuidadosamente los fémures y tibias y los restos de tejido muscular fueron eliminados con una gasa estéril. Los huesos intactos fueron sumergidos en ETOH 70 % por 2-4 min. y luego lavados con RPMI a 4°C. A continuación se cortaron las epífisis de ambos extremos y se extrajo la médula ósea por inyecciones sucesivas de RPMI utilizando una jeringa de 1 ml con aguja 25G 5/8. Por otra parte, se desmenuzaron las epífisis sobre una malla de nylon y

se colocó la suspensión celular junto a la anterior en un tubo cónico de 50 ml. Las células se lavaron 2 veces llevando a 50 ml con RPMI y se contaron (excluyendo los glóbulos rojos) obteniéndose $4-5 \times 10^7$ leucocitos por ratón. Para la obtención de CD los leucocitos de médula ósea fueron cultivados en presencia de GM-CSF. El día 0 se sembraron 5×10^6 precursores por placa de Petri de bacteriología de 100 mm de diámetro en 8 ml de RPMI suplementado con 10 % FBS, 2 mM L-glutamina, 100 U/ml penicilina, 100 μ /ml estreptomicina y 10 % de sobrenadante de cultivo de células productoras de GM-CSF. El día 3 se agregó 7 ml del mismo medio por placa. Las CD inmaduras fueron cosechadas el día 5 y utilizadas para los distintos experimentos *in vitro*.

6.2 OBTENCIÓN DE UNA SUSPENSIÓN RICA EN CD DE BAZO O DE GANGLIOS LINFOIDES

Para obtener una suspensión rica en CD aprovechamos la característica que ellas poseen de ser células de baja densidad.

Los bazos y los ganglios linfoides fueron extirpados de los animales y colocados en cajas de petri de 60 mm con 4,5 ml de medio HANKS y 500 μ l de Colagenasa D (400 unidades/ml). La Colagenasa es esencial para la obtención de CD ya que estas son células que se encuentran muy adheridas al tejido y la disgregación mecánica no es suficiente para poder obtener una suspensión rica en estas células. Los órganos fueron disgregados mecánicamente y las suspensiones fueron incubadas a 37° C. Luego de 30 minutos la reacción fue frenada con 100 μ l de EDTA (concentración final 10mM) incubando 5 minutos. La suspensión celular fue colectada en un tubo cónico de 15 ml lavando vigorosamente la placa con PBS. Las células fueron centrifugadas 5 minutos a 1500 rpm. El pellet fue resuspendido en 3 ml de BSA 30 %. Cuidadosamente se agregó por encima del BSA, 1 ml de PBS y se centrifugó el tubo media hora a 2200 rpm sin freno. Luego de la centrifugación, la fase de baja densidad se encontraba enriquecida en CD.

6.3 OBTENCIÓN DE LAS CÉLULAS CD11c⁺ POR MEDIO DE SELECCIÓN POSITIVA

La purificación de las células CD11c⁺ se realizó utilizando microesferas magnéticas cubiertas con anticuerpos monoclonales como se describe en la sección 3.5

7. CARACTERIZACIÓN DE LAS CD IN VIVO E IN VITRO

7.1 CO-CULTIVO DE LAS CD CON CÉLULAS TUMORALES

5 x 10⁶ CD inmaduras de día 5 de cultivo fueron cultivadas con células tumorales irradiadas o viables en una relación 1:1 o 1:10 (CD:CT) en presencia o ausencia de LPS (0.1, 1 o 10 µg/ml) o poly IC (25, 50 o 100 µg/ml) por 24, 48 o 96 hs. La incubación fue realizada con 10 ml de medio RPMI en presencia de 10 % de FBS.

Cuando las CD fueron diferenciadas en presencia de las células tumorales, luego de 96 hs de cultivo, las células fueron cosechadas y seleccionadas positivamente con CD11c MACS (sección 6.3). Luego las CD fueron plaqueadas en ausencia de células tumorales y re-estimuladas con LPS (0.1 µg/ml) o poly IC (25 µg/ml) por 24 hs. Transcurrido este tiempo, se realizó un análisis de citometría de flujo para el análisis de los marcadores de superficie o la producción de citocinas intracelulares.

En algunos experimentos, las CD derivadas de médula ósea fueron estimuladas con esplenocitos de ratones vírgenes en una relación 1:1. Los esplenocitos fueron obtenidos por disgregación mecánica de bazos. Esta suspensión celular fue depletada de células CD11c⁺ utilizando microesferas magnéticas MACS (sección 6.3) y cultivadas por tres días en medio RPMI conteniendo 10 % de FBS.

7.2 CAPTACIÓN DE CÉLULAS TUMORALES POR CD *IN VIVO*

7.2.1. Evaluación por medio de citometría de flujo

Para evaluar la fagocitosis de células apoptóticas por CD *in vivo*, las células tumorales fueron marcadas con CFSE (sección 3.4) previa irradiación (sección 5). 20×10^6 células J558 irradiadas fueron inyectadas i.v. en ratones Balb/c. Dos horas luego de la inoculación, se realizó un enriquecimiento de CD a partir de células de bazo (sección 6.2). Las células de baja densidad fueron incubadas por media hora a 4° C con el Ac anti-CD16/32 diluido en PBS / 2 % FBS (FACS buffer). Este Ac cumple la función de evitar la unión inespecífica ya que bloquea los receptores Fc. Luego de dicha incubación, la suspensión fue tratada por media hora con Acs anti- CD11c conjugado con APC y Ac anti- CD8 α , los cuales fueron también diluidos en buffer FACS. Las células fueron lavadas exhaustivamente y resuspendidas en FACS buffer para su análisis por citometría de flujo. Los resultados fueron evaluados como porcentaje de células positivas utilizando el software adecuado (FlowJo Tree Star Software; CellQuest o WinMDI).

7.2.2. Evaluación por medio de microscopía confocal

45 min posteriores a la inoculación endovenosa de 2×10^7 células J558 irradiadas (sección 5) CFSE⁺ (sección 3.4), los bazos fueron extirpados y los esplenocitos de baja densidad de un colchón de BSA fueron seleccionados negativamente con bolitas magnéticas cubiertas con Acs anti-CD19 y anti-CD5 (sección 3.5), luego de lo cual se realizó una selección positiva (sección 3.5) para enriquecer en la población de CD CD8⁺. Las CD purificadas fueron adheridas (1 h incubación en estufa de CO₂) a un cubreobjetos previamente tratado con poli-L-lisina (Sigma-Aldrich). Las células adheridas fueron fijadas con 4 % paraformaldehído (PFA, Electron Microscopy, Sciences) y teñidas con Acs anti-CD11c conjugado con PE, previo bloqueo con Acs anti-CD16/32. Los cubreobjetos fueron luego montados con polivinilalcohol-vinilacetato.

7.3 DETERMINACIÓN DE MARCADORES DE SUPERFICIE

La expresión de los marcadores de superficie fue evidenciada por inmunofluorescencia y analizada por citometría de flujo utilizando Acs marcados con PE anti-CD40, 80, 86, B7-H1, B7-DC, MHC clase II y CD69. Además todas las células fueron marcadas con el Ac anti-CD11c conjugado con APC y Ac anti-CD11b conjugado con FITC. Para ello, 1×10^6 células se incubaron 15 min a 4° C con el anticuerpo anti- CD16/32 previamente a la incubación con los Acs correspondientes a fin de bloquear los receptores Fc y evitar la unión inespecífica. Sin lavar, las células fueron incubadas con las diluciones correspondientes de los anticuerpos, realizadas en FACS buffer, e incubadas a 4°C durante 15 min. Finalmente las células fueron lavadas exhaustivamente y resuspendidas en FACS buffer para su análisis por citometría de flujo.

7.4 DETERMINACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE CITOCINAS

Para la evaluación de la producción de citocinas intracelulares, 2.5 µg/ml de Brefeldina A (BFA, Sigma-Aldrich) se agregó en las últimas 12 hs de cultivo de las CD. Las CD fueron luego cosechadas y teñidas superficialmente para CD11c y CD11b con Ac conjugados con APC y FITC, respectivamente. Luego de la tinción extracelular, las células fueron lavadas, fijadas y permeabilizadas utilizando el kit de tinción intracelular de BD (BD Biosciences). La detección de las citocinas fue realizada con Acs conjugados con PE anti IL-12, TNF- α y IL-6.

8. CÉLULAS T

8.1 PREPARACIÓN DE ESPLENOCITOS

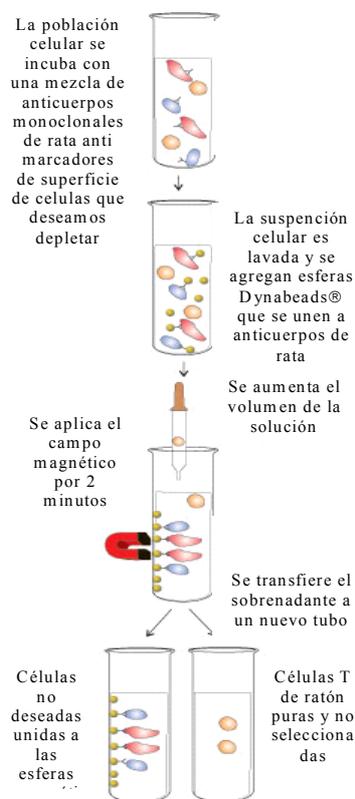
La preparación de suspensiones celulares ricas en células T fue realizada a partir de bazo o a partir de ganglios linfoides según correspondiera. Para ello, se obtuvo el bazo y / o los ganglios linfáticos de los animales, los cuales fueron colocados en placas de petri de 60 mm con 7 ml de R5 (RPMI suplementado con 5 % de FBS, L-glutamina y penicilina / estreptomycin). Los órganos fueron

disgregados mecánicamente y la suspensión celular obtenida fue trasvasada a un tubo cónico de 15 ml lavando vigorosamente la placa con R5. La suspensión celular fue centrifugada a 1500 rpm por 5 minutos. A continuación los glóbulos rojos fueron lisados incubando por 2 minutos con buffer de lisis de glóbulos rojos de ratón y neutralizando el buffer de lisis con R5. La suspensión celular obtenida es rica en linfocitos principalmente, tanto T como B, pero también hay un contenido de macrófagos y células NK.

8.2 PREPARACIÓN DE CÉLULAS OT-I, OT-II Y DO11.10

Células T CD8⁺ o CD4⁺ específicas para el Ag OVA (células OT-I, OT-II o DO11.10) fueron preparadas a partir de una suspensión celular de bazo y de ganglios linfáticos por selección negativa depletando células que expresaban B220, CD4, F4 / 80, MHC clase II y CD4 y/o CD8 (según correspondiera) con Dynabeads[®] de oveja anti-IgG de rata. Los órganos fueron tratados como se explicó en la sección 8.1. La suspensión celular obtenida fue lavada con R5, luego de lo cual las células fueron incubadas por media hora a 4° C en una concentración de 2×10^7 cél. / ml con sobrenadantes de cultivo conteniendo Acs monoclonales de rata anti- moléculas B220, CD4, F4 / 80 y MHC clase II. Luego de la incubación, la suspensión celular fue lavada exhaustivamente con R5 y las células fueron incubadas con esferas magnéticas cubiertas con Acs anti- IgG de rata (Dynabeads[®]) por media hora a 4° C. Las esferas magnéticas se prepararon lavándolas exhaustivamente con R5. La concentración de esferas magnéticas utilizada fue 1 / 10 del volumen de la suspensión total. Luego de la incubación con las esferas, las células CD8⁺ o CD4⁺ fueron obtenidas del sobrenadante por la aplicación de un campo magnético utilizando columnas magnéticas según las instrucciones del fabricante.

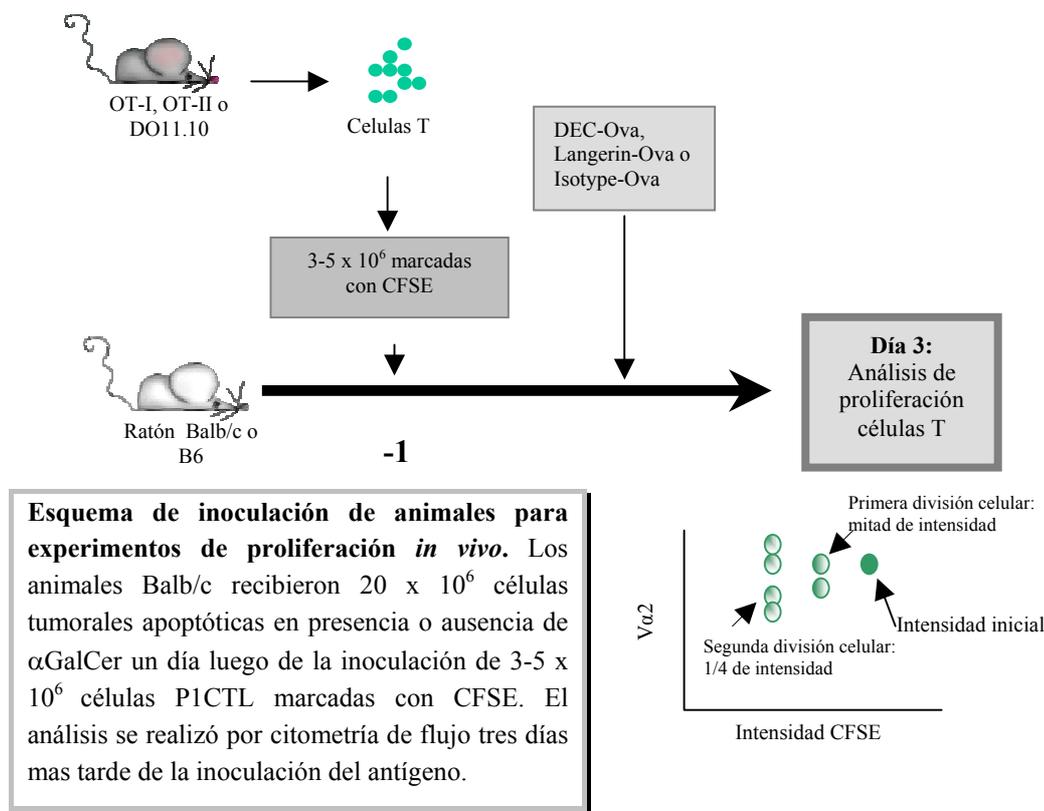
Purificación de células por selección negativa



8.3 PROLIFERACIÓN DE CÉLULAS T *IN VIVO*

Para poder observar la proliferación de las células T *in vivo* el protocolo seguido fue el que se describe en el esquema siguiente. Los animales Balb/c recibieron $3-5 \times 10^6$ células OT-I, OT-II o DO11.10 (sección 8.2) marcadas con CFSE (sección 3.4) en forma endovenosa en 0,1 ml de PBS. Un día después de la transferencia adoptiva los animales recibieron distintas dosis de Acs recombinantes (sección 4.3). La proliferación celular fue analizada por citometría de flujo 3 días después de la administración del antígeno. Para ello se obtuvieron suspensiones celulares de bazo o ganglios linfáticos (sección 8.1), las cuales fueron incubadas por 15 minutos a 4° C con Acs anti CD16/32 para bloquear la unión inespecífica. Luego de esto, las células fueron incubadas con Acs anti-CD8 α o anti-CD4 (según correspondiera) marcado con APC y Acs anti-V α 2 o KJ1-26 (Acs específicos contra el receptor TCR que reconoce el Ag OVA)

marcado con PE. Todos los Acs fueron diluidos en FACS buffer como se explicó con anterioridad. El análisis se realizó por citometría de flujo.



Para poder analizar estos gráficos lo que se tiene que tener en cuenta es que las células OT-I, OT-II y DO11.10 están marcadas con una cantidad específica de CFSE. Luego de una división celular, cada célula hija recibe la mitad de dosis del colorante y así el colorante se va diluyendo en cada división celular, permitiendo, de esta forma, observar el número de divisiones celulares que ocurrieron *in vivo* (Figura B).

9. MICROSCOPIA

9.1 TINCIÓN DE LC DE LA PIEL

Los animales fueron sacrificados y las orejas de los mismos fueron extirpadas. Las orejas fueron cortadas a la mitad e incubadas con una solución precalentada de EDTA 0.5 M (Gibco) por 2 hs. Los segmentos fueron luego lavados con PBS por 30 min a 4° C. La epidermis fue separada de la dermis

utilizando un juego de pinzas. La epidermis fue extendida y fijada por 20 min con acetona fría (-20° C), lavada con BSA 0,2 %, bloqueada con BSA 1 % por 1h y teñida. La tinción fue realizada con L31 + anti- Rat Alexa 488 (Invitrogen) y MHCII Biot + estreptoavidina Alexa 555 (Invitrogen). Los segmentos fueron luego lavados y montados con líquido de montaje (Aqua-Poly/Mount, Polysciences, Inc). Las muestras fueron analizadas con el microscopio de fluorescencia (Sistema Zeiss LSM 510).

6.2 TINCIÓN DE BAZO Y PLN PARA MICROSCOPIA

El bazo y pLN de animales Balb/c fueron removidos, embebidos en el compuesto de temperatura óptima (OCT) y congelados a -80° C. Las secciones congeladas fueron cortadas a 5-10 µm en un crióstato y luego fijadas con acetona fría (-20° C) por 20 min. Todas las incubaciones fueron realizadas en cámara húmeda. Las secciones fueron primero bloqueadas con suero de ratón al 5 % en buffer FACS. Los Acs primarios fueron B220 Alexa 647, L31 purificado y CD11c purificado. Los Acs secundarios fueron anti- rata Alexa 555 (para L31) y anti-hamster FITC + anti FITC Alexa 488 (para CD11c). Las secciones fueron montadas con Aqua-Poly / Mount y preservadas a 4° C hasta ser examinadas en el microscopio.

10. MIGRACIÓN DE LAS LC A LOS PLN

Las orejas de los animales fueron pintadas de los dos lados con 25 µl de FITC (5 mg / ml) diluido en dibutilftalato (Sigma-Aldrich): Acetona 1:1. Luego de cuatro días los animales fueron sacrificados y se removieron los ganglios de drenaje (cérvico-auricular). Los LN fueron luego tratados como se describe en la sección 6.2.

11. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Se realizó el test de Student para revelar diferencias significativas en la inducción de moléculas coestimuladoras y inhibitoras por CD derivadas de médula ósea. Los resultados se expresan como la media +/- SE. En todos los casos las diferencias se consideraron significativas cuando $p < 0,05$.

CAPÍTULO I

DIFERENCIACIÓN DE LAS CD EN PRESENCIA DE CÉLULAS TUMORALES *IN VIVO* E *IN VITRO*

Las CD son las principales células presentadoras de antígenos capaces de inducir inmunidad contra antígenos foráneos²⁰¹. Sin embargo, las CD tienen que sufrir dos procesos separados para convertirse en grandes inductoras de la respuesta inmune. Un grupo de eventos involucra la captura, procesamiento de los Ags y el ensamblado de los mismos en moléculas MHC que puedan ser reconocidos por las células T. Con respecto a esto, en los tejidos tumorales, los antígenos pueden derivar de células tumorales muertas. Las CD pueden fagocitar células tumorales apoptóticas o necróticas: se ha sugerido que CD36, $\alpha\beta 5$, y asialoglucoproteínas que se expresan en la membrana de CD inmaduras humanas están involucradas en la fagocitosis y la presentación de células apoptóticas^{92, 202}. El segundo grupo de eventos son aquellos que inducen la diferenciación a CD funcionalmente maduras. Estos eventos son los que permiten que las CD pueda llegar a los órganos linfoides secundarios donde la inmunidad adaptativa comienza, así como también poseer alta capacidad de unión a las células T y capacidad de estimular a las mismas²⁰³. Experimentalmente, una gran variedad de estímulos se han utilizado para inducir la activación de las CD, incluyendo medio condicionado de monocitos²⁰⁴, mezclas de diferentes citocinas, ej. TNF- α , IL-6, IL-1 β y PGE2²⁰⁵ y ligandos de TLR^{206, 207}. Sin embargo, últimamente se ha observado que la maduración y función de las CD están íntimamente influenciada por el microambiente¹¹⁹.

En particular, en el microambiente tumoral, la funcionalidad de las CD puede ser moldeada por las células tumorales. Muchos estudios han demostrado una acumulación de las CD inmaduras en ratones con tumores^{208, 209} y en pacientes con cáncer^{210, 211}. Las consecuencias de la presencia de CD no diferenciadas, inmaduras o en reposo son evidentes: la generación de linfocitos T incapaces de responder^{74, 212} o células Treg^{134, 205}.

El aumento en el número de CD inmaduras en el microambiente tumoral puede ser consecuencia de factores intrínsecos: ausencia de señales de activación de las CD en el ambiente tumoral. Sin embargo, algunos trabajos recientes sugieren que el aumento de las CD inmaduras no se debe a un proceso pasivo,

sino más bien activo, en el cual las células tumorales impiden la maduración de las CD^{171, 208}. Debido a que el cáncer es un proceso lento, como una infección crónica, el cual ocurre durante varios años, es difícil evaluar cambios en las CD ocurridos tempranamente luego de la interacción con las células tumorales. Fue por ello que el primer objetivo de esta tesis doctoral fue **evaluar el estado de activación de las CD luego de la interacción inicial con las células tumorales *in vitro* e *in vivo***.

I.I INDUCCIÓN Y DETECCIÓN DE APOPTOSIS DE CÉLULAS TUMORALES

La muerte celular programada o apoptosis es un proceso fisiológico utilizado por organismos multicelulares para el desarrollo y la homeostasis tisular, así como también para la eliminación de células infectadas, mutadas o dañadas. Las células apoptóticas presentan características morfológicas distintivas²¹³ que incluyen la redistribución de fosfolípidos de la membrana plasmática como la fosfatidilserina que pasa de la cara interna de la membrana a la cara externa, condensación del citoplasma y de la cromatina. Además se produce el clivaje internucleosomal del DNA por activación de endonucleasas que degradan la cromatina en fragmentos de 300 kb y subsecuentemente en fragmentos más pequeños de 50 kb dando un patrón característico. Durante todo el proceso, una de las características más importantes es que se mantiene la integridad de la membrana plasmática, por lo tanto no hay liberación del contenido citoplasmático. Finalmente la célula puede fragmentarse y se liberan cuerpos apoptóticos rodeados de membrana.

La apoptosis puede ser inducida *in vitro* por infección viral (influenza, EBV, HIV 1), radiación (rayos X, γ , luz UV), ausencia de suero, tratamiento con drogas, etc. En este trabajo la apoptosis de las células tumorales (TC-1, B16 y J558) fue inducida por radiación de tipo γ . La apoptosis fue evidenciada por citometría de flujo utilizando el reactivo Anexina V-FITC que se une con gran afinidad a la fosfatidilserina, la cual, como se explicó en el párrafo anterior, cambia de ubicación como consecuencia de la muerte apoptótica. Además, se utilizó Ioduro de Propidio para identificar las células muertas. Las células que permanecieron sin irradiar mostraron un nivel basal de apoptosis de 3-5 %

caracterizado por la tinción Anexina V⁺ y IP⁻ (Figura 1). Además, en el cultivo se pudo visualizar también que el 12-15 % de las células presentaron tinción Anexina V⁺ / IP⁺ indicando necrosis secundaria. Dada nuestra experiencia previa con las células de melanoma murino B16² y las células de plasmocitoma murino J558¹⁹⁵, se decidió irradiar las células TC-1 con 75 Gy (7500 rads). Inmediatamente luego de la irradiación se observó un aumento de las células apoptóticas: 35-36 % de la población presentaba fosfatidilserina en su membrana externa (Figura 1, Anexina V⁺ / IP⁻). Estas células fueron cultivadas con el objetivo de observar como variaba el porcentaje de células apoptóticas en el tiempo. 24 hs luego de la irradiación se observó que el 25 % de las células podían ser consideradas apoptóticas, mientras que el número de células que se encontraban en necrosis secundaria había aumentado un 10-15 %. A medida que el tiempo de cultivo transcurría (48 hs, 72 hs), se pudo observar un aumento de células necróticas y disminución de células apoptóticas, siendo a las 72 hs la mayoría del cultivo Anexina V⁻ / IP⁺ (Figura 1).

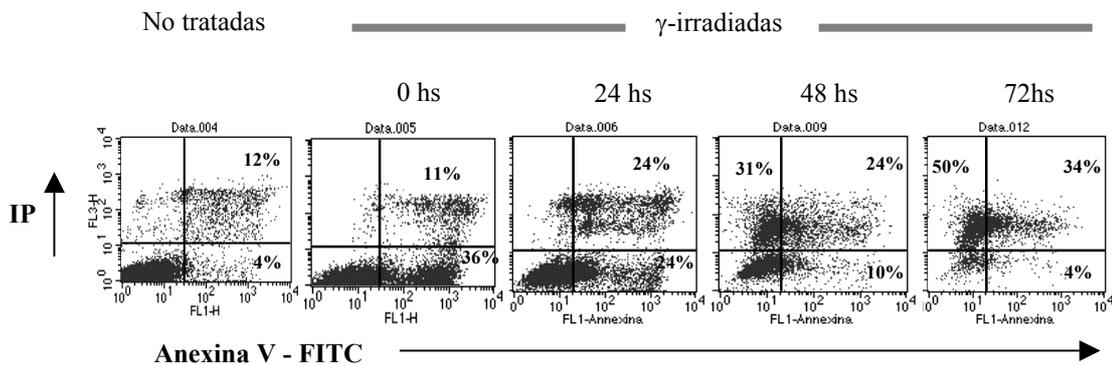


FIGURA 1. Detección de apoptosis en células TC-1. Células TC-1 viables o irradiadas (75 Gy) fueron cultivadas durante 24, 48 o 72 hs. La apoptosis fue evidenciada tiñendo con Anexina V-FITC y Ioduro de Propidio (Davis Science 1993) luego de lo cual se realizó un análisis por citometría de flujo. La apoptosis temprana fue caracterizada por la tinción Anexina V⁺ / IP⁻ y la necrosis secundaria por la tinción doble positiva.

Resultados similares fueron reproducidos con la línea tumoral J558 y la línea tumoral de melanoma murino B16 (resultados no mostrados,^{2, 195}). En este trabajo, estas células tumorales son definidas como células tumorales irradiadas. De las diferentes condiciones de cultivo ensayadas, la ausencia de cultivo luego de la irradiación resultó ser óptima, obteniéndose un mayor porcentaje de células en

apoptosis temprana. Esta fue la condición utilizada a lo largo de este trabajo de tesis doctoral.

I.II LAS CD SE DIFERENCIAN FENOTÍPICAMENTE EN PRESENCIA DE LAS CÉLULAS TUMORALES

Para la inducción de una respuesta inmune, las CD tienen que sufrir un proceso de maduración que depende, en parte, de la inducción y/o aumento de la expresión de moléculas coestimuladoras, así como también un aumento en la expresión de MHC y otras moléculas inmunológicamente relevantes como CD40. En pacientes con cáncer y en modelos tumorales murinos, se ha observado una disminución en el número de CD fenotípicamente maduras^{208, 209}. Sin embargo, como se mencionó anteriormente, es importante tener en cuenta que el cáncer es un proceso lento, parecido a una infección crónica, el cual puede ocurrir durante varios años, con lo cual es complicado determinar exactamente cambios ocurridos en las CD en estadios tempranos del contacto con las células tumorales. Los estudios *in vitro* con CD, a pesar de sus limitaciones funcionales, permiten determinar el efecto directo de las células tumorales sobre las CD en distintos estadios del proceso tumoral.

En este trabajo, se utilizaron CD derivadas de progenitores de médula ósea de ratones C57Bl/6 o de ratones Balb/c. Los progenitores fueron incubados por 5 días en presencia de GM-CSF, como fue descrito previamente²⁰⁰. Esta incubación permite la diferenciación de precursores de médula ósea a CD inmaduras, las cuales se caracterizan por la doble expresión de los marcadores CD11c y CD11b (Figura 2). En este cultivo también se encontró una población mínima de células negativas para el marcador CD11c, pero positivas para CD11b, las cuales correspondían a precursores de CD o a macrófagos (Figura 2,²⁰⁰). El porcentaje de células CD11c⁺ CD11b⁺ en el cultivo primario no se vio afectado por la estimulación con LPS (Figura 2, panel izquierdo).

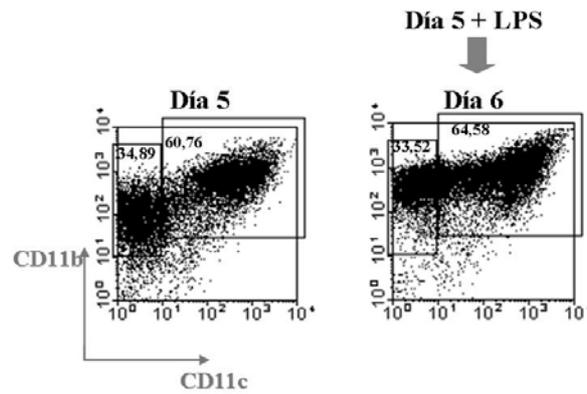


FIGURA 2. Diferenciación de CD a partir de precursores de médula ósea. Precursores de médula ósea fueron cultivados en presencia de GM-CSF por 5 días. Transcurrido este tiempo, las células en suspensión fueron cosechadas. Las células fueron marcadas con CD11c-APC y con Acs anti-CD11b marcados con FITC. Se puede observar que el 60 % de la población co-expresa CD11c y CD11b. La proporción de CD en el cultivo no se ve afectada por la estimulación de las mismas por 24 hs con 0.1 μ g/ml de LPS (panel izquierdo).

Las CD doble positivas son CD con un fenotipo superficial inmaduro, caracterizado por la baja expresión de moléculas coestimuladoras, MHCII y CD40, así como también moléculas inhibitoras B7-DC y B7-H1 (Figura 3 A y B). Sin embargo, cuando estas células son cultivadas por 24 hs en presencia de los ligandos de TLR, LPS y poly IC, tienen la capacidad de aumentar la expresión de los marcadores de superficie (Figura 3 A y B).

Con el objetivo de observar el efecto de las células tumorales en la activación de las CD inmaduras en los primeros momentos de contacto, progenitores de médula ósea fueron cultivados por 5 días en presencia de GM-CSF. Las células no adherentes fueron cosechadas, lavadas, contadas y cultivadas con células tumorales TC-1 irradiadas en una relación 1:1. Las células fueron analizadas 24 hs más tarde por citometría de flujo para el estudio de los marcadores de superficie. Las CD fueron identificadas por la doble tinción CD11c y CD11b, además de los siguientes marcadores de superficie: CD40, CD80, CD86, CD69 y MHCII.

En la figura 3A se puede observar que las células tumorales irradiadas inducen cambios fenotípicos en las CD: aumento en la expresión de CD69, CD40, MHCII y un aumento marginal pero reproducible en CD86. Estos cambios, sin embargo, fueron más marcados cuando las CD fueron estimuladas con LPS o poly IC. Las células tumorales viables, por otra parte, también indujeron cambios

fenotípicos en las CD, aunque estos cambios fueron menores, con un incremento mínimo en las moléculas coestimuladoras (Figura 3A). Dado que las células tumorales irradiadas inducen cambios fenotípicos más profundos que las células tumorales viables, se pensó que una pequeña cantidad de células tumorales apoptóticas en los cultivos inducían la activación de las CD. Para excluir esta hipótesis se disminuyó la cantidad de CD en el cultivo (1:10, CT:CD, Figure 3A). Esta disminución resultó en la pérdida del efecto estimulador.

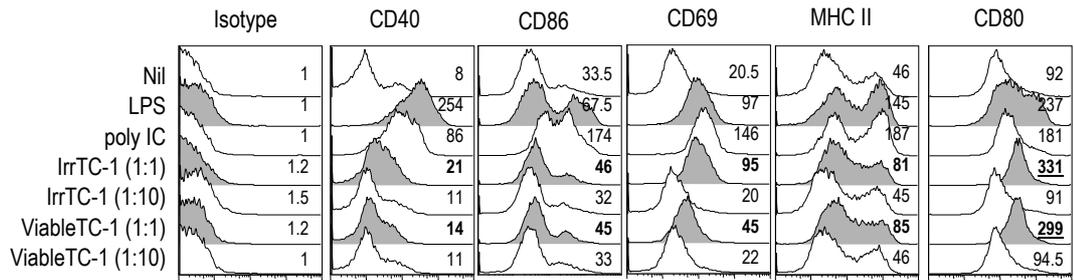
Sorprendentemente, las CD cultivadas con células tumorales viables o irradiadas incrementaron la expresión de las moléculas inhibitorias B7-DC, B7-H1 y CD80 (Figura 3A y B). Con el objetivo de observar si este cambio en los marcadores de superficie era causado específicamente por las células tumorales, las CD fueron cultivadas con esplenocitos singénicos en una relación 1:1. Como era esperado, los esplenocitos singénicos no indujeron cambios fenotípicos en las CD (Figura 3B).

A diferencia de los cambios inducidos por los ligandos de TLR, los cambios inducidos por las células tumorales fueron transitorios, retornando a niveles basales a las 48 hs post-estimulación (Figura 3C).

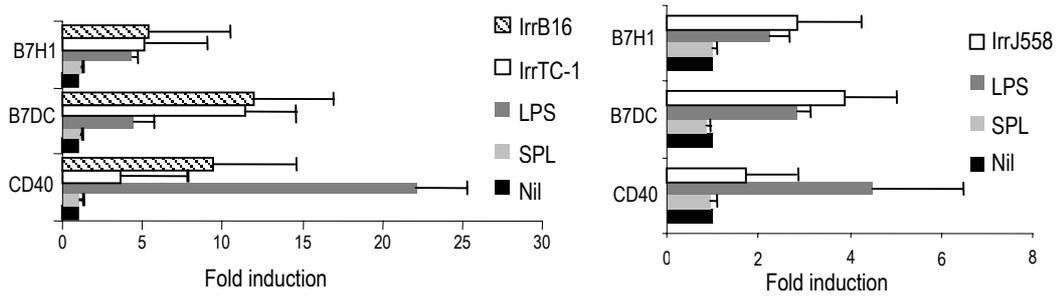
Resultados similares fueron obtenidos cuando otras líneas tumorales, como la línea tumoral de melanoma murino B16 y la línea tumoral de plasmocitoma murino J558 (Balb/c), fueron utilizadas en los co-cultivos (Figura 3D).

Estos resultados demuestran que tanto células tumorales viables como células tumorales apoptóticas inducen la diferenciación de las CD derivadas de médula ósea, caracterizada por un aumento en los marcadores de superficie, especialmente marcadores relacionados con la inhibición de la respuesta inmune (CD80, B7-DC y B7-H1). Además, el efecto observado es dependiente del número de células tumorales agregadas al cultivo, ya que una disminución del número de células tumorales está relacionada con una disminución del efecto sobre las CD.

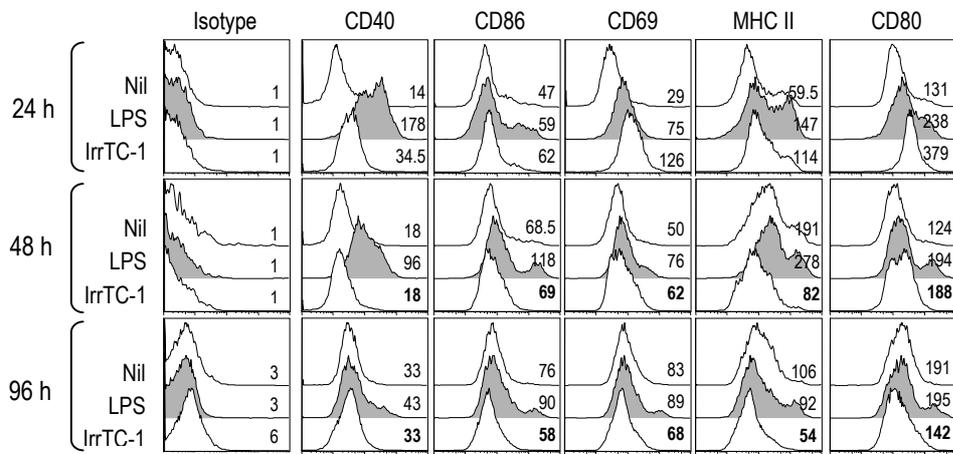
A



B



C



D

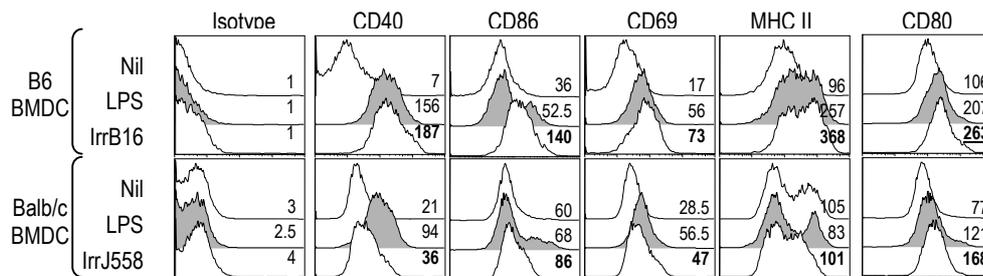


FIGURA 3. Las células tumorales inducen cambios fenotípicos en las CD. Progenitores de médula ósea de ratones C57Bl/6 fueron cultivados en presencia de GM-CSF por 5 días, luego de lo cual las CD inmaduras fueron cosechadas e incubadas con células tumorales irradiadas en una relación 1:1 o 1:10, con esplenocitos singénicos, o LPS (0.1 µg/ml) o poly IC (25 µg/ml). Las BMCD fueron teñidas con CD11c-PE, CD11b-APC y anticuerpos conjugados con FITC anti-CD40, CD86, CD80, CD69, MHCII, B7-DC, B7-H1 o Rat IgG_{2a}. **A.** CD derivadas de médula ósea cultivadas por 24 hs en ausencia de estímulos (Nil) o con los estímulos indicados. **B.** Como en la figura A, pero la inducción de las moléculas inhibitoras y coestimuladoras se muestran como el aumento sobre niveles basales expresados en las CD inmaduras derivadas de precursores de ratones C57Bl/6 (panel izquierdo, media de cinco experimentos independientes) o de ratones Balb/c (panel derecho, media de tres experimentos independientes). Los resultados se muestran como la media ± SE. **C.** Igual que en A, pero el análisis fue realizado 24, 48 o 96 h post-estimulación. **D.** CD derivadas de médula ósea fueron estimuladas por 12 h con células tumorales B16 irradiadas (médula ósea de C57Bl/6) o células tumorales irradiadas J558 (médula ósea derivada de Balb/c). Se muestra un experimento representativo de tres con resultados similares. En todos los casos, los números representan la intensidad media de fluorescencia (MFI)

I.III LAS CD FAGOCITAN CÉLULAS TUMORALES APOPTÓTICAS *IN VIVO* CUANDO LAS MISMAS SON ADMINISTRADAS EN FORMA ENDOVENOSA

En esta parte del trabajo se investigó si los cambios fenotípicos observados en las CD *in vitro* ocurrían también *in vivo*. Para ello se necesitaba un modelo *in vivo* que permitiera observar el efecto de las células tumorales sobre las CD luego de la interacción inicial. Se decidió utilizar un modelo previo, en el cual las células tumorales apoptóticas son administradas en forma endovenosa en ratones Balb/c¹⁹⁵. Cuando 20×10^6 células tumorales de mieloma, J558, son inoculadas i.v., una pequeña población de CD de bazo (el subgrupo CD11c⁺ CD8⁺⁷⁰) es responsable de la fagocitosis de estas células. Estos resultados se pueden observar en la figura 4A. Células J558 fueron marcadas con CFSE previa irradiación y fueron inyectadas i.v. en ratones Balb/c. Dos horas luego de la inoculación, los animales fueron sacrificados y se extirpó el bazo. La fagocitosis fue documentada por citometría de flujo para lo cual se realizó un enriquecimiento de células dendríticas por medio de un colchón de albúmina bovina (BSA). Estas células fueron teñidas con Acs anti-CD11c y Acs anti-CD8 y se observaron las células fagocíticas CD11c⁺ CD8⁺ y CFSE⁺.

Como se puede observar en la figura 4A, las células tumorales apoptóticas inoculadas i.v. son eficientemente endocitadas por CD de bazo tan rápido como 2

12 hs luego de su inyección. Por otra parte, al igual que los resultados previamente publicados (Iyoda J exp Med 2002), el material tumoral marcado con CFSE sólo se encontró en las CD CD11c⁺ CD8⁺ y no en las CD11c⁻ (Figura 3B). Además del análisis por citometría de flujo, decidimos realizar un análisis por microscopía confocal. Para esto marcamos las células tumorales con CFSE previa irradiación de las mismas. 20 x 10⁶ células tumorales apoptóticas CFSE⁺ fueron inyectadas en forma endovenosa y 45 minutos más tarde el bazo fue extirpado. La suspensión celular de bazo fue tratada como se explica en los materiales y métodos y luego se realizó una tinción con anticuerpo anti-CD11c. En la figura 4 se puede visualizar claramente una célula tumoral apoptótica marcada con CFSE (verde) que fue endocitada por una CD marcada con CD11c (rojo).

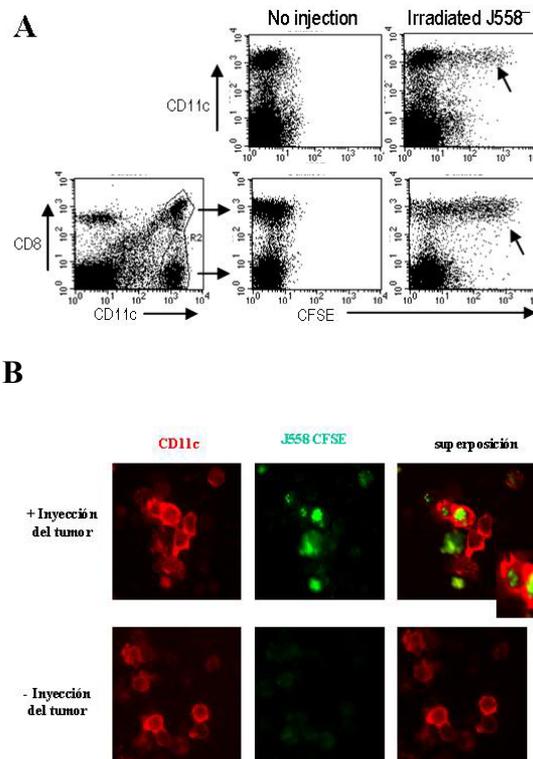


FIGURA 4. Endocitosis de células irradiadas por CD CD11c⁺ CD8⁺ de bazo. A. Endocitosis de 20 x 10⁶ células tumorales irradiadas CFSE⁺ inyectadas i.v. 12 hs luego de la inoculación, la suspensión celular de bazo fue teñida para CD11c y CD8 y analizada por citometría de flujo. **B.** Los ratones fueron inyectados i.v. con 20 x 10⁶ células tumorales apoptóticas marcadas con CFSE. 45 minutos luego de la inoculación, las CD fueron obtenidas como se explica en materiales y métodos y teñidas con anticuerpos anti-CD11c. En esta figura se muestra una microscopía confocal, en la cual las CD se observan en rojo (PE) y las células tumorales en verde (CFSE). Aumento 1000X.

I.IV LA ENDOCITOSIS DE CÉLULAS TUMORALES APOPTÓTICAS PRODUCE CAMBIOS RÁPIDOS EN LOS MARCADORES DE SUPERFICIE DE LAS CD *IN VIVO*

Para evaluar el estado de maduración de las CD luego de la fagocitosis de células tumorales apoptóticas se inyectaron células tumorales irradiadas que previamente habían sido teñidas con CFSE. A distintos tiempos luego de la inoculación de las células tumorales, se realizaron suspensiones de bazo y las mismas fueron teñidas con Acs anti-CD11c en presencia de Acs anti- CD40, 80, 86, B7-H1, B7-DC y MHCII. Como se muestra en la figura 5, la población total de CD (CD11c⁺) en el bazo de los ratones inoculados con células tumorales no mostró cambios significativos (Figura 5, línea media). Sin embargo, cuando se analizaron las CD que habían fagocitado las células tumorales (CD11c⁺ / CFSE⁺) se observaron cambios fenotípicos en CD40, CD86 y MHCII tan rápido como 2 hs luego de la inoculación de J558. Otras moléculas de superficie como CD80, así como también las moléculas inhibitoras B7-DC y B7-H1, mostraron una cinética de inducción más lenta, comenzando a las 12 hs luego de la inoculación de las células tumorales (Figura 5). El efecto por las células tumorales fue muy distinto al observado cuando se inoculó LPS i.v., el cual indujo un aumento en todos los marcadores examinados y en todas las CD (Figura 5).

En conclusión, la administración de células tumorales *in vivo* induce la expresión de moléculas coestimuladoras e inhibitoras pero sólo en aquellas CD que fagocitaron células tumorales, lo cual indica la necesidad de contacto entre las CD y las células tumorales para que ocurra este efecto. Además, es importante recalcar que las células tumorales indujeron *in vivo* cambios tempranos pero transitorios en CD86, CD40 y MHCII en las CD fagocíticas, pero cambios más tardíos y persistentes en las moléculas inhibitoras CD80, B7-DC y B7-H1.

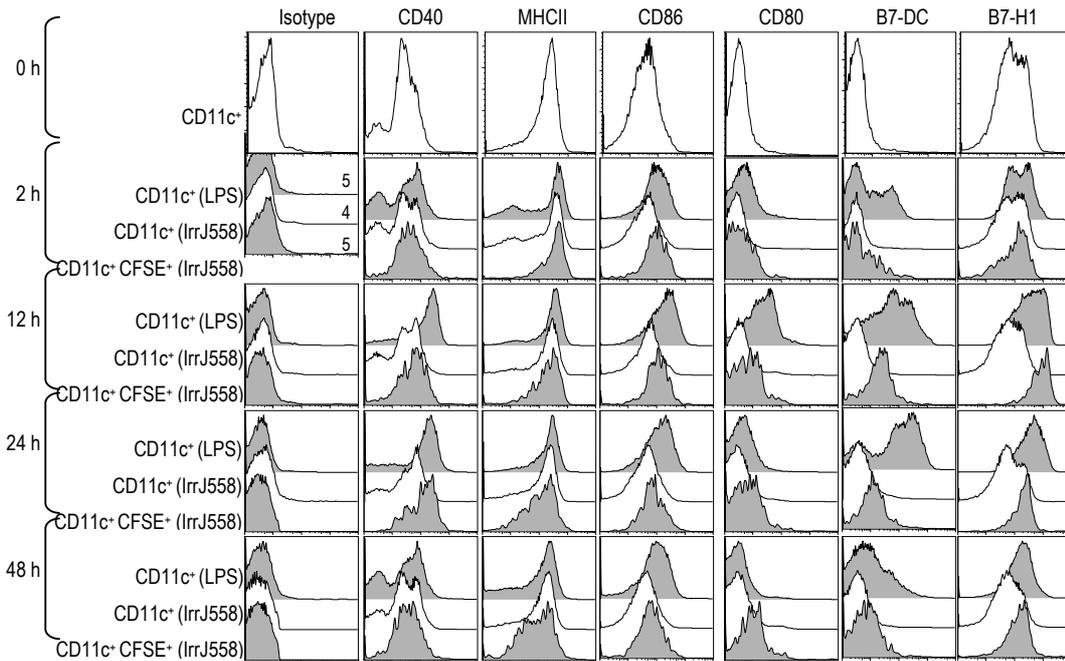


FIGURA 5. Las células tumorales alteran el fenotipo de las CD endocíticas *in vivo*. Ratones Balb/c fueron inoculados i.v. con PBS, LPS (1 μ g) o con 2×10^7 células tumorales marcadas con CFSE previa irradiación. Las CD de bazo fueron obtenidas 2, 12, 24 y 48 hs luego de la inoculación y se realizó un análisis por citometría de flujo. Las células fueron teñidas con CD11c-APC, y anticuerpos conjugados con PE anti- CD40, CD80, CD86, MHCII, B7-DC y B7-H1. Se muestran los marcadores de superficie de la población total de CD CD11c⁺ de los animales inoculados con LPS (primera hilera) o los animales inoculados con células J558 irradiadas (hilera media), así como también la expresión de los marcadores de superficie en las CD fagocíticas (doble positivas, CD11c⁺ CFSE⁺, última hilera). Se muestra un experimento representativo de tres y los números indican MFI.

I.V LA DIFERENCIACIÓN DE LAS CD EN PRESENCIA DE LAS CÉLULAS TUMORALES NO INDUCE LA PRODUCCIÓN DE CITOCINAS

Últimamente el concepto de maduración de las CD se malinterpreta como cambios en los marcadores de superficie (expresión alta en superficie de moléculas coestimuladoras, CD40 y MHCII) más que un cambio funcional (capacidad de iniciar una respuesta inmune). Sin embargo, algunas observaciones recientes demostraron que CD maduras definidas sólo por cambios en el fenotipo, no siempre inducen inmunidad, sino que también pueden inducir tolerancia¹³⁶. Por lo tanto, otros parámetros, además de los cambios fenotípicos superficiales, tienen que ser medidos para observar el estado funcional de las CD. Además de

los cambios fenotípicos, los estímulos de maduración inducen la secreción de grandes cantidades de citocinas, las cuales juegan un papel importante en la activación y la diferenciación de las células T^{214, 215}. En la figura 6 se puede observar que cuando las CD derivadas de médula ósea fueron cultivadas en presencia del ligando de TLR4, LPS, estas producen una gran cantidad de citocinas, incluyendo IL-12, TNF- α y IL-6. Por el contrario, a pesar de los cambios fenotípicos observados en presencia de las células tumorales, las CD derivadas de médula ósea fueron incapaces de producir estas citocinas en presencia de las células tumorales (Figura 6). Estos resultados demuestran que la diferenciación de las CD ocasionada por las células tumorales no induce la producción de citocinas, lo cual podría sugerir un defecto en el proceso de diferenciación de las CD en presencia de las células tumorales.

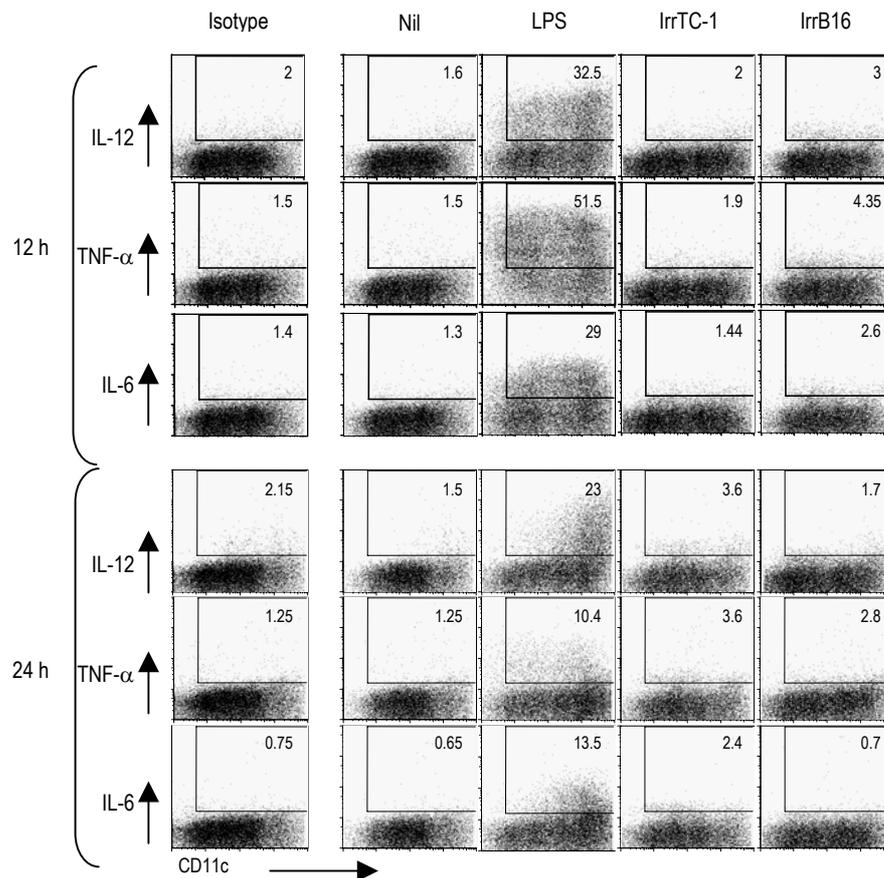


FIGURA 6. Ausencia en la expresión de citocinas en CD cultivadas con células tumorales. Progenitores de médula ósea de 5 días de cultivo fueron estimuladas por 12 o 24 hs con LPS (0.1 μ g/ml) o con células tumorales irradiadas (B16 o TC-1) y luego examinadas para la producción de IL-12, IL-6 o TNF- α . BFA (2.5 μ g/ml) fue agregada en las últimas 12 hs de cultivo. Los gráficos son de células positivas para CD11b y son representativos de tres experimentos con resultados similares.

DISCUSIÓN

Las respuestas inmunes adaptativas son inducidas, coordinadas y reguladas por las CD ²⁰³. Las CD tienen la doble función de inducir o suprimir la respuesta inmune. Mientras CD maduras inducen potentes respuestas inmunes mediadas por linfocitos Th1 y son consideradas inductoras de respuestas inmunes anti-tumorales ¹⁷⁰, las CD inmaduras pueden inducir linfocitos T incapaces de responder ^{74, 212, 216} o células Treg ^{134, 205}.

La presencia de CD funcionalmente maduras son raras en pacientes con cáncer ^{210, 211} y en animales con tumores ^{208, 209}. Inicialmente, se pensó que la ausencia de CD maduras en el microambiente tumoral se debía a la ausencia de señales de activación. Sin embargo, recientemente, se ha observado que las células tumorales tienen la capacidad de bloquear la maduración de las CD mediante varios mecanismos, los cuales incluyen la producción o expresión de varios factores como VEGF ²⁰⁸, IL-6 ²¹⁷, M-CSF ²¹⁷, TGF- β ²¹⁸, IL-10 ¹⁷², COX2 ¹⁶⁹, PGE2 ^{170, 219} y gangliósidos ¹⁷³. En esta parte del trabajo, a diferencia del fenotipo inmaduro reportado anteriormente, se encontró que las CD expuestas a varias líneas tumorales murinas adquieren un fenotipo superficial caracterizado por la expresión predominante de moléculas inhibitorias, como B7-DC, B7-H1 y CD80, y la ausencia de producción de citocinas necesarias para la activación y diferenciación de linfocitos T. Estos resultados sugieren fuertemente que las células tumorales modifican activamente la diferenciación de las CD.

Un obstáculo considerable en el uso de las CD para las vacunas contra el cáncer puede ser la presencia de células T con funciones reguladoras. A pesar que estas células T tienen un papel muy importante en la prevención de las enfermedades autoinmunes, poseen también la capacidad de inhibir la inmunidad anti-tumoral y promover el crecimiento del tumor. Existen muchos trabajos en este momento que apoyan este papel inhibitorio de las células Treg. Un aumento de células T CD4⁺ CD25⁺ se ha observado en sangre periférica y en tejidos de pacientes con cáncer ^{191, 220}. En particular, en ratón, las células T CD4⁺ CD25⁺ expresan constitutivamente CTLA4 ²²¹ y la administración de anticuerpos bloqueantes anti- CTLA4 ¹⁹⁴ o CD25 ¹⁹² en ratones con tumores disminuye el tamaño tumoral y mejora la terapia inmune. Además, en ratones con melanoma inducido por la línea tumoral B16, fue demostrado formalmente que las células

Treg juegan un papel primordial²²². En este estudio, el cultivo de CD derivadas de médula ósea con alto número de células tumorales (1:1, CD:CT) indujo la expresión de CD80 en las CD. Se ha demostrado que CD80 tiene alta afinidad por CTLA4¹⁴³. Por lo tanto, *in vivo*, estas CD diferenciadas en presencia de células tumorales podrían estimular células Treg a través de la interacción CTLA4-CD80. Además, CTLA4 en ratones (así como también PGE2,²²³) aumenta la expresión de la enzima indoleamina 2,3 dioxigenasa (IDO) en las CD²²⁴. La actividad de IDO resulta en la eliminación del aminoácido esencial triptófano²²⁵ y en la acumulación de metabolitos tóxicos, lo cual inhibe la activación de los linfocitos T e induce la apoptosis de los mismos²²⁶⁻²²⁸.

Otra molécula que se expresa en las células T reguladoras es PD-1²²⁹, el receptor de B7-H1 y B7-DC. En este trabajo se demostró que las CD co-cultivadas con células tumorales expresan niveles altos de estas dos moléculas. *In vivo*, la interacción B7-PD1 puede reducir la producción de IL-12 por las CD¹⁷⁹ disminuyendo así su inmunogenicidad.

En conclusión, en este capítulo se demostró que las células tumorales inducen la diferenciación de las CD. Este estado de diferenciación está caracterizado por altos niveles de moléculas inhibitoras, bajos niveles de moléculas coestimuladoras y la no producción de citocinas. Las CD con estas características podrían estar incapacitadas para iniciar potentes respuestas inmunes. Por el contrario, estas características podrían estar asociadas con la inducción de tolerancia inmune.

CAPÍTULO II

LAS CÉLULAS TUMORALES INHIBEN LA MADURACIÓN DE LAS CD INDUCIDA POR LOS LIGANDOS DE TLR

El microambiente tumoral está caracterizado por la falta de moléculas que promueven la diferenciación y función de las CD (GM-CSF, IL-4 y citocinas que inducen respuestas de tipo Th1), pero es abundante en moléculas que suprimen la diferenciación y función de las CD: VEGF, IL-6, IL-10, TGF- β , M-CSF, PGE2, COX2)^{230, 231}. Este patrón molecular aberrante afecta profundamente y activamente la inmunidad anti-tumoral.

En este trabajo se observó el efecto directo de las células tumorales sobre las CD (Capítulo I). Las CD en contacto con las células tumorales *in vivo* e *in vitro* mostraron un desequilibrio en la expresión de moléculas coestimuladoras e inhibitoras. Las CD que interactuaron con las células tumorales expresaron niveles bajos de moléculas coestimuladoras (CD86), así como también baja expresión de CD40 y MHCII. Sin embargo, estas CD expresaron altos niveles de moléculas inhibitoras (B7-DC, B7-H1 y CD80). Las CD con este patrón de expresión tienen la capacidad, *in vivo*, de inducir células Treg y favorecer la inducción de tolerancia inmune^{134, 216}.

Es por ello que para la inmunoterapia del cáncer es necesario utilizar potentes señales de activación de las CD que reviertan este fenotipo inhibitor a un fenotipo estimulador (aumento de moléculas coestimuladoras, disminución de moléculas inhibitoras y secreción de citocinas necesarias para la activación de linfocitos Th). Una de las señales de activación que se podrían utilizar son los ligandos de TLR. Los TLR son una familia de receptores que consisten en más de 10 miembros proteicos tanto en ratón como en humanos, los cuales han emergido recientemente como componentes cruciales para la activación de programas de maduración en CD¹⁵⁰. Varias características de las CD estimuladas con TLR hacen que estos ligandos sean atractivos para su uso en la inmunoterapia del cáncer. Primero, la unión de los TLR a sus receptores estimula la maduración de las CD, generando CD completamente funcionales¹⁵⁰. Segundo, los ligandos de TLR3 y TLR4 tienen una función importante en la presentación cruzada y la inducción de linfocitos CTL²³². Tercero, las células NK y NKT pueden ser activadas por CD maduras pre-tratadas con un agonista del TLR3²³³. Cuarto, la

estimulación con el ligando de TLR4 en las CD bloquea la actividad inhibitoria de las células Treg CD4⁺ CD25⁺ ²³³. Por lo tanto, los ligandos de los receptores TLR3 y TLR4 pueden ofrecer una oportunidad para activar las CD y revertir el fenotipo inducido por las células tumorales.

Fue objetivo de este capítulo, **observar la capacidad de las CD co-cultivadas con células tumorales de responder a los ligandos de TLR.**

III.I LAS CD NO RESPONDEN A LIGANDOS DE TLR EN PRESENCIA DE LAS CÉLULAS TUMORALES

Si las células tumorales poseen un mecanismo para evadir la respuesta inmune inhibiendo la maduración de las CD, era necesario observar si esto ocurría también en presencia de estímulos inflamatorios que, en condiciones normales, poseen la capacidad de activar las CD. Este punto fue importante no sólo porque los ligandos de TLR han sido sugeridos para la inmunoterapia del cáncer ^{234, 235}, sino también porque era necesario observar si la ausencia de expresión de moléculas coestimuladoras en presencia de las células tumorales se debía a la ausencia de señales de activación en el microambiente tumoral (efecto pasivo) o a un defecto en la diferenciación / maduración de las CD en presencia de las células tumorales (efecto activo).

Progenitores de médula ósea de ratones C57Bl/6 fueron cultivados con GM-CSF por 5 días y luego por 24 hs con los ligandos de TLR, LPS o poly IC, en presencia o ausencia de células tumorales. Como se muestra en la figura 7, LPS y poly IC indujeron cambios fenotípicos característicos de CD maduras. Sin embargo, la presencia de las células TC-1 irradiadas en el cultivo inhibió parcialmente la expresión de varios marcadores de superficie necesarios para la inducción de la respuesta inmune, incluyendo las moléculas coestimuladoras CD40 y CD86, así como también MHCII y CD69 (Figura 7A y B). Estos efectos inhibitorios fueron también confirmados con otras líneas tumorales, como la línea B16 de melanoma murino (Figura 7A y B). A pesar que las células tumorales B16 no alteraron significativamente la expresión de CD86 y CD69 en CD activadas con LPS, el aumento en la expresión de CD40 y MHCII inducido por LPS fue impedido en presencia de las mismas. Además, cuando las CD fueron incubadas con poly IC en presencia de células B16, se observó un impedimento de la

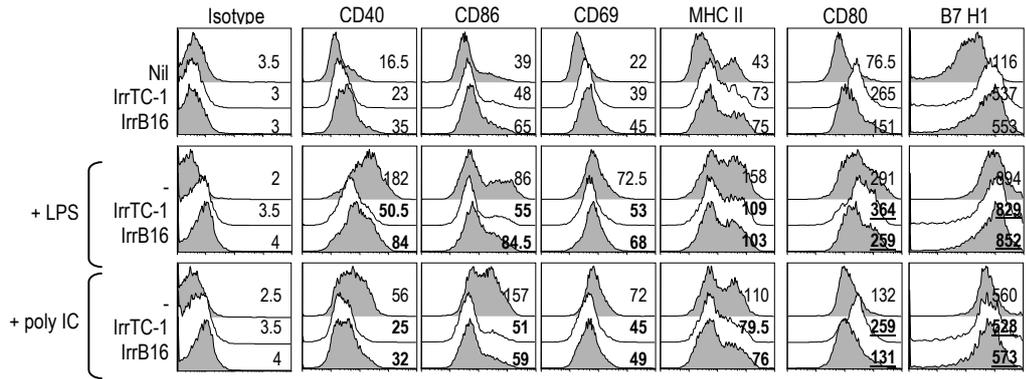
inducción de todos los marcadores analizados (CD40, CD86, CD80 y MHCII). Por el contrario, las células tumorales irradiadas (B16 o TC-1) no inhibieron la inducción de la expresión de moléculas como B7-H1 y CD80 en presencia de ligandos de TLR (Figura 7A).

Con el objetivo de estudiar en profundidad el impacto de las células tumorales sobre la maduración de las CD en presencia de ligandos de TLR, se analizó la producción de citocinas. Como se muestra en la figura 7C, las células tumorales impidieron la producción de citocinas inducidas por LPS. Este impedimento fue observado inclusive cuando la concentración de LPS en el cultivo se aumentó 10 veces de la concentración original (Figura 7D). Sin embargo, los efectos inhibitorios fueron observados solamente con alto número de células tumorales (1:1 CT:CD, resultados no mostrados). Por otra parte, células no tumorales (esplenocitos singénicos) no interfirieron con la maduración de las CD inducida por los ligandos de TLR (Figura 7D). Cabe destacar que el efecto observado no fue consecuencia de apoptosis de las CD inducida por las células tumorales, lo cual fue corroborado por citometría de flujo luego de tinciones con Ioduro de Propidio (resultados no mostrados).

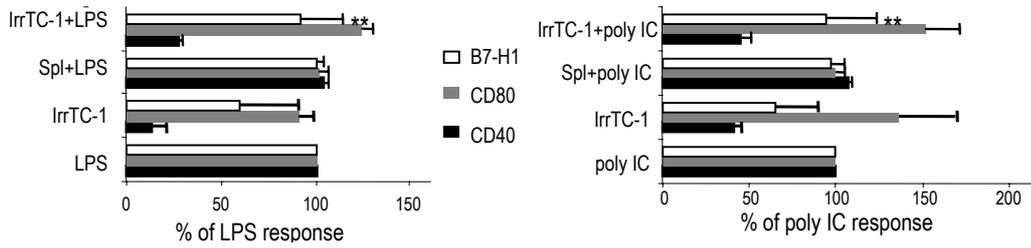
Las células tumorales tienen la capacidad de secretar una gran cantidad de factores que pueden ser los potenciales causantes del efecto inhibitorio. En esta tesis se investigó la influencia del sobrenadante de cultivo de células tumorales sobre las CD (resultados no mostrados). Sorprendentemente, se encontró que las células tumorales usan factores solubles y contacto célula-célula ya que el sobrenadante de cultivo de las células tumorales tuvo un efecto inhibitorio parcial sobre la maduración inducida por LPS o poly IC (resultados no mostrados). Las moléculas tumorales solubles o de superficie que participan en la inhibición de la maduración de las CD inducida por TLR en este sistema permanecen desconocidas y requieren de más investigación.

Estos resultados indican que las células tumorales inducen la inhibición de la diferenciación / maduración de las CD derivadas de médula ósea en presencia de ligandos de TLR. Este efecto no se observa con células normales.

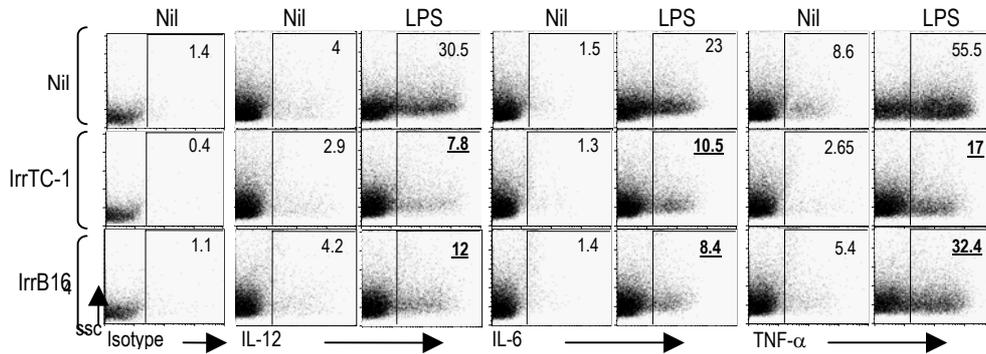
A



B



C



D

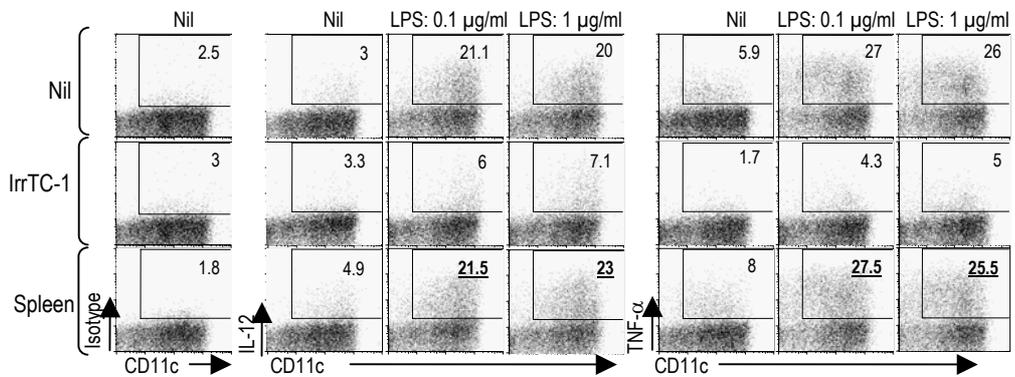


FIGURA 7. Inhibición de la maduración de las CD inducida por ligandos de TLR en presencia de células tumorales. **A.** CD derivadas de médula ósea (5 días) fueron estimuladas con 0.1 µg/ml de LPS o 25 µg /ml de poly IC en presencia o ausencia de células tumorales irradiadas (B16 o TC-1) o esplenocitos singénicos. Luego de 24 hs, las células fueron cosechadas y teñidas con CD11c-APC, CD11b FITC y Acs conjugados con PE anti- CD40, CD86, CD69, MHCII o B7-DC. Los histogramas son representativos de 4 experimentos con resultados similares y los números representan MFI. **B.** Como en A, pero la inducción de CD40, CD80 y B7-H1 fue medida por citometría de flujo y los valores medios de las MFI de tres experimentos independientes fueron calculados como porcentaje de la inducción de estos marcadores por el ligando LPS (panel izquierdo) o poly IC (panel derecho). Los resultados se presentan como la media ± SE. ** No significativo. **C.** Como en A, pero las CD fueron estimuladas por 12 hs en presencia de BFA (2.5 µg/ml), luego de lo cual se realizó una tinción intracelular para IL-12, IL-6 y TNF-α. **D.** Como C, pero el estímulo fue por 24 hs con 0.1 µg/ml o 1 µg/ml según se indica. Los resultados son representativos de tres experimentos independientes.

II.II LA DIFERENCIACIÓN DE LAS CD INDUCIDA POR LAS CÉLULAS TUMORALES NO ES REVERTIBLE

A continuación fue importante examinar si el efecto inhibitorio de las células tumorales sobre las CD podía ser revertido eliminando las células tumorales del cultivo. Con este objetivo, se estudió si la exposición previa de las CD a las células tumorales afectaba la habilidad de las mismas de activarse posteriormente con ligandos de TLR. Las CD fueron cultivadas en presencia de células tumorales irradiadas, TC-1 o B16, o en presencia de ligandos de TLR (LPS o poly IC). 96 hs más tarde, las células CD11c⁺ fueron seleccionadas positivamente con perlas magnéticas MACS y cultivadas en ausencia de células tumorales con LPS o poly IC. Como se puede observar en la figura 8 A y B, las CD pre-cultivadas con células tumorales no respondieron posteriormente a la estimulación con ligandos de TLR. Además, como se esperaba, las CD pre-cultivadas con LPS no respondieron a estímulos posteriores con LPS o poly IC²³⁶. Por el contrario, CD cultivadas con poly IC respondieron a estímulos posteriores con poly IC o LPS (Figura 8A y B). Es importante recalcar que las CD derivadas de médula ósea estaban viables en el momento de la segunda estimulación, lo cual fue evaluado por exclusión del colorante azul tripano y por citometría de flujo luego de la tinción con Ioduro de Propidio (resultados no demostrados).

Con el objetivo de observar si este efecto inhibitorio era dependiente del número de células tumorales en el cultivo celular, las CD fueron pre-cultivadas

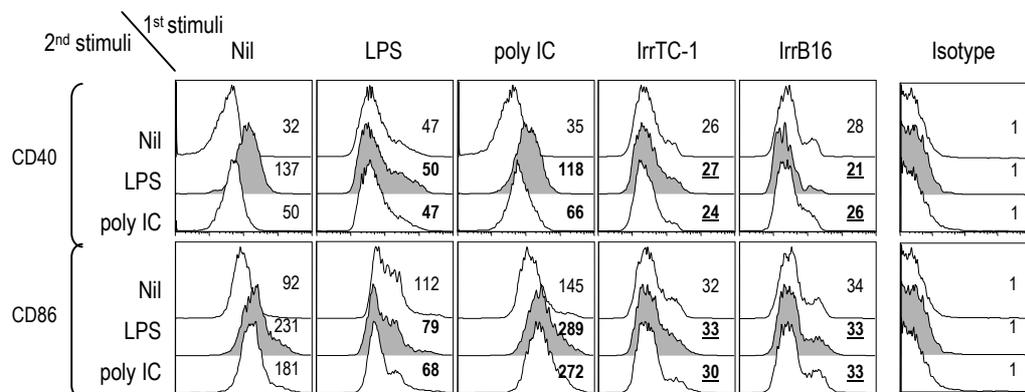
con células tumorales en una relación 1:1 o 1:10 (CT:CD). Sorprendentemente, se observó que las células tumorales inhiben la expresión de moléculas coestimuladoras inducidas por LPS solamente cuando el pre-cultivo fue realizado con alto numero de células tumorales (relación 1:1 CD:CT). El pre-tratamiento de CD con un alto numero de células tumorales (relación 1:1) inhibió completamente la expresión de CD40 inducida por LPS (Figura 8B), mientras que un número bajo de células tumorales (Figura 8B) no interfirió significativamente con la expresión de CD40 inducida por LPS (Figura 8B). Estos resultados concuerdan con los resultados anteriores demostrando que un número bajo de células tumorales tampoco es eficiente en la inducción de moléculas coestimuladoras y inhibitoras (Capitulo I, Figura 3).

Finalmente, se evaluó la secreción de citocinas. Como se puede observar en la figura 8C, el pre-cultivo de CD con células tumorales (relación 1:1) inhibió la producción de IL-12 (Figura 8C), TNF- α y IL-6 (resultados no mostrados) inducida por LPS.

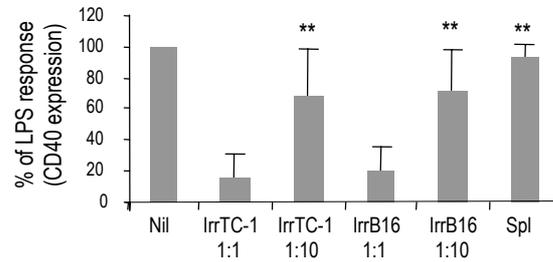
Es importante recalcar que este efecto inhibitor irreversibile fue causado solamente por células transformadas (células tumorales), ya que los esplenocitos singénicos no interfirieron con la expresión de CD40 (Figura 8B) ni con la producción de IL-12 (Figura 8C) inducida por LPS.

En conclusión, en este capítulo se observó que las células tumorales inducen un estado de diferenciación de las CD caracterizado por la incapacidad de responder a los ligandos de TLRs, LPS y poly IC.

A



B



C

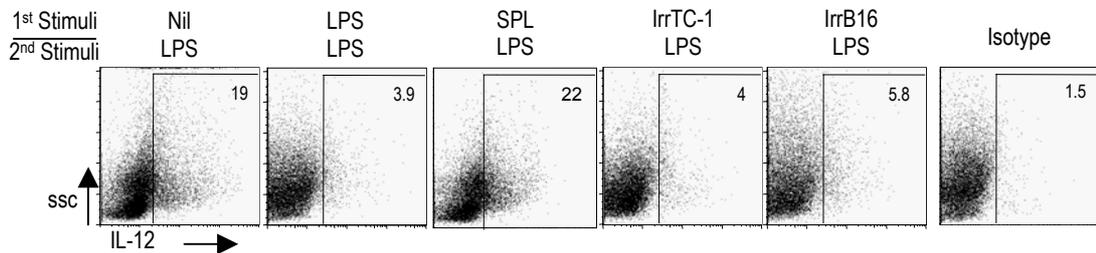


FIGURA 8. Las CD pre-cultivadas con células tumorales pierden la capacidad de responder a estímulos posteriores con LPS y poly IC. A. CD derivadas de médula ósea (5 días) fueron cultivadas con células tumorales irradiadas (B16 o TC-1) en una relación 1:1 (primer estímulo indicado en la primera línea). 96 hs luego de la estimulación, células CD11c⁺ fueron seleccionadas positivamente con MACS y cultivadas por 24 hs en presencia de 0.1 µg/ml de LPS o 25 µg/ml de poly IC (segundo estímulo, indicado en la columna izquierda). Transcurrido el tiempo, las células fueron lavadas y teñidas con CD11c-PE, CD11b-APC y Acs conjugados con FITC anti CD40 y CD86. **B.** Las células CD11c⁺ cultivadas con los estímulos indicados fueron seleccionadas como se explica en A y estimuladas con LPS (0.1 µg/ml). La inducción de CD40 fue medida por citometría de flujo y los valores medios de la MFI de tres experimentos independientes fue calculado como porcentaje de la respuesta control del LPS. Los resultados se presentan como la media ± SE. ** No significativo. **C.** Las células CD11c⁺ fueron incubadas en presencia de BFA para la evaluación de citocinas intracelulares 24 hs luego de agregado el estímulo. Los resultados son representativos de tres experimentos.

DISCUSIÓN

La presencia de CD funcionalmente maduras es rara en pacientes y animales con cáncer. Sin embargo, como se explicó anteriormente, el cáncer es una enfermedad crónica, y en el momento que se identifica clínicamente, las células tumorales han interactuado y modificado el sistema inmune para asegurar su supervivencia. Los resultados de este capítulo y del capítulo I demuestran que las células tumorales inducen primordialmente moléculas inhibitoras en las CD derivadas de médula ósea. Sin embargo, la expresión de estos marcadores es transitoria, retornando a niveles basales tan pronto como 96 hs posterior a la estimulación. Este resultado puede ser malinterpretado como una falta de señales de activación o ignorancia de las CD en el microambiente tumoral. Por el contrario, si estas CD expuestas al tumor por 96 hs son re-estimuladas con ligandos de TLR, se puede observar una incapacidad de inducción de moléculas coestimuladoras y producción de citocinas. Este es el resultado relevante que sugiere fuertemente que las células tumorales inducen la diferenciación de las CD a un estado de no-respuesta.

Tanto la presencia de CD inmaduras, inducida por factores tumorales, como la ausencia de citocinas inflamatorias, han sido consideradas las causas primordiales de la baja inmunogenicidad tumoral^{237, 238}. Dado que la activación de las CD puede ser inducida por estímulos pro-inflamatorios, se ha sugerido a los ligandos de TLR en la terapia del cáncer. Sin embargo, en el presente estudio se demostró que las células tumorales son fuertes reguladores negativos de la maduración inducida por TLR.

Las células tumorales inhibieron la inducción de moléculas coestimuladoras CD86 y CD40 inducidas por el LPS (Figura 7). Estas dos moléculas son esenciales para iniciar la respuesta T²⁰³. Además, la expresión de MHCII inducida por LPS también fue reducida significativamente por la presencia de las células tumorales. Las células tumorales inhiben la producción de citocinas inducida por el LPS. Además, tanto la producción de citocinas como la expresión de marcadores de superficie no pudo ser inducida en presencia de células tumorales cuando se aumento la dosis de LPS en el cultivo (1 µg, Figura 7, o 10 µg, resultados no mostrados). Por otra parte, cuando el número de células tumorales en el cultivo fue reducido (relación 1:10, CT:CD), estas perdieron la

capacidad de inhibir la señal de activación inducida por el LPS (Figura 8). Resultados similares fueron obtenidos cuando se utilizó poly IC, ligando del receptor TLR3. A diferencia de TLR4 (receptor de LPS) el cual señala vía MyD88, TLR3 señala vía TICAM-1 y por un camino mediado por el factor 3 regulado por IFN¹⁵⁰. Estos resultados sugieren fuertemente que alto números de células tumorales inhiben la maduración / activación de las CD inducida por LPS y / o poly IC.

Por el contrario, esplenocitos singénicos no inhibieron la expresión de moléculas coestimuladoras o la producción de citocinas inducidas por los ligandos de TLR. Estos resultados identifican a las células tumorales como reguladores negativos de la maduración inducida por los ligandos de TLR.

Estudios recientes demostraron que los ligandos de TLR pueden ser utilizados en la inducción de inmunidad anti-tumoral, pero estos son efectivos solamente para la prevención²³⁴. Inclusive, en algunos modelos experimentales, el uso de poly IC no previno el crecimiento tumoral¹⁹⁵. Por otra parte, se demostró previamente que la presencia de células B16 tumorales no inhibió la habilidad de las CD de expresar moléculas coestimuladoras luego de la estimulación con un cocktail de ligandos de TLR²³⁹. Sin embargo, esos estudios fueron realizados con bajos números de células tumorales²³⁹. Los resultados mostrados en estos dos capítulos demuestran que el efecto inhibitorio se observa solamente con altos números de células tumorales. Bajos números de células tumorales no poseen habilidad de inducir la expresión de moléculas inhibitorias o de bloquear la activación inducida por los ligandos de TLR.

En conclusión, los dos primeros capítulos de esta tesis doctoral muestran que las células tumorales tienen la capacidad de inducir la diferenciación de las CD. Estas CD diferenciadas expresan transitoriamente moléculas inhibitorias. Importante, estas CD no poseen la capacidad de responder a ligandos de TLR. Esto explica parcialmente la ineficacia de vacunas que utilizan a las células tumorales como fuente de antígeno. Es importante, por lo tanto, diseñar estrategias que eviten la utilización de células tumorales completas como fuente de antígenos.

CAPÍTULO III

DIRECCIÓN DE ANTÍGENOS TUMORALES A LAS CD VÍA EL RECEPTOR DEC205

Las células tumorales irradiadas como fuente de antígeno tienen una capacidad limitada de inducir respuesta inmune protectora. Para lograr inmunidad profiláctica cuando estas células son la fuente de Ags, es necesaria la inoculación de grandes cantidades de células tumorales (20×10^6 , ¹⁹⁵) o inclusive varias dosis de la vacuna administrada en forma consecutiva (cuatro dosis, ²). Además, estas vacunas tienen que ser administradas en presencia de potentes adyuvantes como la α GalCer que activan a las CD vía el sistema inmune innato (NKT, ¹⁹⁵), o ser manipuladas *ex vivo* para inducir la maduración de las CD ². Cabe mencionar que no cualquier estímulo de maduración de las CD puede ser utilizado en estas vacunas: estímulos como el ligando de TLR4, poly IC, administrado en presencia de células tumorales no permiten la expresión de moléculas coestimuladoras (Capítulo II), ni tampoco la inducción de respuesta inmune protectora ¹⁹⁵. Esto sugiere la necesidad de elegir adyuvantes potentes que tengan la capacidad de revertir el efecto inhibitorio de las células tumorales sobre las CD (Capítulo II).

La limitación más importante de estas dos estrategias ^{2,195} es, sin embargo, la ausencia de respuesta inmune terapéutica (rechazo de tumores establecidos). A pesar que la vacunación con células tumorales irradiadas en presencia de α GalCer o la vacunación con CD derivadas de médula ósea cargadas *ex vivo* con células tumorales apoptóticas, inducen considerable protección a desafíos posteriores con células tumorales viables (80-100 % de protección), estas vacunas son totalmente ineficientes para la eliminación de tumores establecidos. Existe otra estrategia, sin embargo, que permite la eliminación de tumores establecidos ¹⁹⁶. Esta estrategia es la dirección de Ags tumorales directamente a las CD *in vivo*. La diferencia entre esta estrategia y las anteriores es el número de CD “cargadas” con los Ags tumorales con capacidad de presentar los mismos a células CD4⁺ y CD8⁺.

En este capítulo se examinó esta estrategia, la cual consiste en la dirección de Ags tumorales a las CD maduras vía Acs anti el receptor endocítico DEC205. Esta estrategia tiene como ventaja que se evita la utilización de células tumorales irradiadas o apoptóticas como fuente de Ags, evitando de esta forma las señales inhibitorias producidas por estas. Además, luego de la inoculación de los Acs anti

DEC205, todas las CD CD11c⁺ CD8⁺ del bazo y de LN son cargadas con el Ag. Las desventajas de esta estrategia son la necesidad de elegir Ags proteicos tumorales que permitan la regresión de los tumores y la necesidad de elegir el correcto receptor endocítico en las CD para dirigir dichos Ags.

En particular, para la elección del Ag, hay que tener en cuenta que las células citotóxicas juegan un papel incuestionable en la inmunología tumoral ²⁴⁰. Por otra parte, se ha acumulado evidencia que sugiere que la respuesta CD4⁺ también tiene un papel muy importante en la inmunología tumoral ²⁴¹⁻²⁴³. Las células CD4⁺ parecerían no jugar un papel en la inducción, pero si en la persistencia de la respuesta CD8⁺ ²⁴⁴⁻²⁴⁶. Es por ello que existe un consenso del requerimiento de la activación de linfocitos CD4⁺ y CD8⁺ para la inducción de una respuesta inmune antitumoral ²⁴⁷. En este trabajo, considerando el papel importante de las células CD8⁺, se decidió utilizar un péptido citotóxico de la proteína del papiloma humano (HPV16). Se ha encontrado tumorigenicidad de las proteínas tempranas del HPV16 (E), entre ellas la proteína E7, la cual es un candidato para vacunas contra el HPV. La proteína E7 ha sido ampliamente estudiada y se han descrito varios epitopes que podrían mediar la regresión tumoral, entre ellos el péptido CTL de unión a D^b que involucra 8 aa (E7⁴⁹⁻⁵⁷, RAHYNIVTF, ²⁴⁸). Este pequeño péptido solapa parcialmente con una secuencia putativa Th (E7⁴⁸⁻⁵⁴, DRAHYNI²⁴⁹). Con el objetivo de incorporar completamente la secuencia peptídica capaz de activar linfocitos CD4⁺, el péptido que se utilizó en este trabajo fue un péptido de 35 aminoácidos de largo previamente utilizado en ensayos clínicos: E7⁴³⁻⁷⁷. Este péptido no solo incluye la secuencia CTL descrita por Feltkamp y col ²⁴⁸, sino que también incorpora una secuencia putativa Th ²⁴⁹ y una secuencia peptídica de activación de linfocitos B (E7⁴⁴⁻⁴⁸, QAEPD²⁴⁹).

Con respecto al receptor endocítico, las CD poseen un gran número de receptores para la captura de Ags. Algunos de estos receptores están presentes también en otras células, como el receptor Fcγ ^{250, 251} y el receptor de manosa ⁸⁶. Otros receptores, sin embargo, están restringidos a las CD, como por ejemplo Langerina ¹⁰¹, DC-SIGN ^{252, 253}, el receptor de la asialoproteína ²⁰² y BDCA-2 ²⁵⁴. Sin embargo, hasta el momento no se ha demostrado presentación antigénica en complejos MHCI y MHCII luego de la captura del Ag vía alguno de estos receptores. Por el contrario, se ha demostrado que DEC205, un receptor endocítico tipo C-lectina ^{99, 255}, media eficientemente el procesamiento y la

presentación de Ag en complejos MHCII y MHCI^{74, 196, 212}. La expresión de DEC205 es alta en CD localizadas en las zonas T de los órganos linfoides²⁵⁶ y existe un Ac monoclonal anti-DEC205 que luego de ser inoculado en ratones es dirigido a las CD^{74, 196, 212}.

En este capítulo, **se conjugó genéticamente el péptido E7⁴³⁻⁷⁷ en el Ac anti- DEC205**. Este péptido tumoral fue colocado en el extremo C-terminal del Ac anti- DEC205 **con el objetivo de dirigirlo a las CD y así aumentar la eficiencia de las vacunas anti- tumores**.

III.I CONSTRUCCIÓN GENÉTICA DEL PÉPTIDO CTL DE LA PROTEÍNA E7 EN LA CADENA PESADA DEL ANTICUERPO ANTI DEC205

La cadena pesada del Ac anti-DEC205 fue conjugada genéticamente con el péptido E7⁴³⁻⁷⁷ del HPV16. Para ello la secuencia del péptido E7⁴³⁻⁷⁷ fue clonada en el extremo C- terminal de la cadena pesada del Ac anti- DEC205 y III-10⁷⁴. III-10, también llamado GL117, es el control de isotipo (ISO) del anticuerpo anti- DEC205 (Rat IgG_{2a}), pero no reacciona con CD u otras células. La región E7⁴³⁻⁷⁷ fue obtenida por transcripción reversa de un extracto de ARN (1 µg) obtenido de las células TC-1 tumorales. Una pequeña secuencia peptídica (20 aminoácidos) fue utilizada como “linker” entre la cadena pesada del anticuerpo y el Ag. Este “linker” contienen un sitio proteolítico lo cual facilita el procesamiento y la presentación del Ag (Figura 9A). Para minimizar la unión de los anticuerpos recombinantes a los receptores Fc de las CD y minimizar reacciones inmunes contra el mAc (originalmente rata IgG_{2a},⁷⁴), la cadena pesada original de los anticuerpos (anti-DEC205 o III-10) fue reemplazada por regiones constantes ratón IgG1, las cuales contienen mutaciones que interfieren con la unión a receptores Fc (Hawiger 2001).

Los anticuerpos recombinantes fueron producidos por células 293T transfectadas transientemente (precipitación con calcio) y analizados en un gel de poliacrilamida al 10 % en condiciones reductivas (Figura 9B). Como se puede observar en la figura 9B, la cadena pesada del anticuerpo de fusión migro con un peso molecular aparente de ~55 kD, confirmando que el péptido E7⁴³⁻⁷⁷ (~5 kD) se encontraba exitosamente conjugado con la cadena pesada del anti- DEC205

(50kD). La banda pequeña de 25 kD muestra la cadena liviana de los anticuerpos recombinantes.

Para asegurar que los anticuerpos recombinantes mantenían la habilidad de unión al receptor DEC205, se midió la capacidad de unión de los mismos a células CHO transfectadas en forma estable con el receptor DEC205, o células transfectadas con el plásmido vacío, CHO-NEO. Distintas dosis de anti DEC205-E7⁴³⁻⁷⁷ (2, 0.2 y 0.02 µg / ml) o ISO-E7⁴³⁻⁷⁷ fueron incubadas con las células CHO. Luego de 30 minutos de incubación a 4° C, las células fueron lavadas, teñidas con anticuerpos PE anti- ratón-IgG y examinadas por citometría de flujo. Como se observa en la figura 9C, anti- DEC-E7⁴³⁻⁷⁷ se unió a su receptor de manera dosis dependiente, con dosis tan bajas como 0.02 µg/ml, a diferencia del anticuerpo control ISO-E7⁴³⁻⁷⁷ (Figura 9C). Además, no se observó unión del anticuerpo anti-DEC205-E7⁴³⁻⁷⁷ o ISO-E7⁴³⁻⁷⁷ a células CHO-NEO (Figura 9C). En conclusión, el Ac recombinante anti- DEC205-E7⁴³⁻⁷⁷ es capaz de unirse específicamente a su receptor.

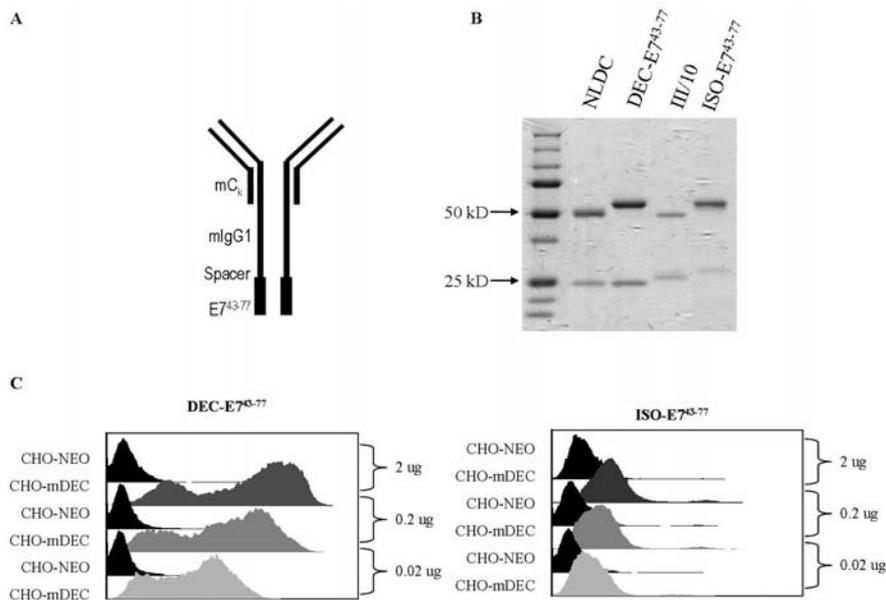


FIGURA 9. Construcción genética del péptido E7⁴³⁻⁷⁷ en la cadena pesada del Ac anti-DEC205. A. Diagrama representativo de los Acs recombinantes. B. Anti- DEC205 (NLDC) conjugado genéticamente con el péptido E7⁴³⁻⁷⁷ y el control de isotipo (III-10, ISO) fueron analizados en un gel de poliacrilmida al 10 % en condiciones reductoras (los pesos moleculares en kilo daltones, kD, están indicados). C. Capacidad de unión de los anticuerpos recombinantes al receptor DEC205 expresado en células CHO-DEC utilizando distintas dosis (0.02, 0.2 y 2 µg/ml). Se muestra un análisis de citometría de flujo luego de una tinción con Acs conjugados con PE anti- ratón IgG1.

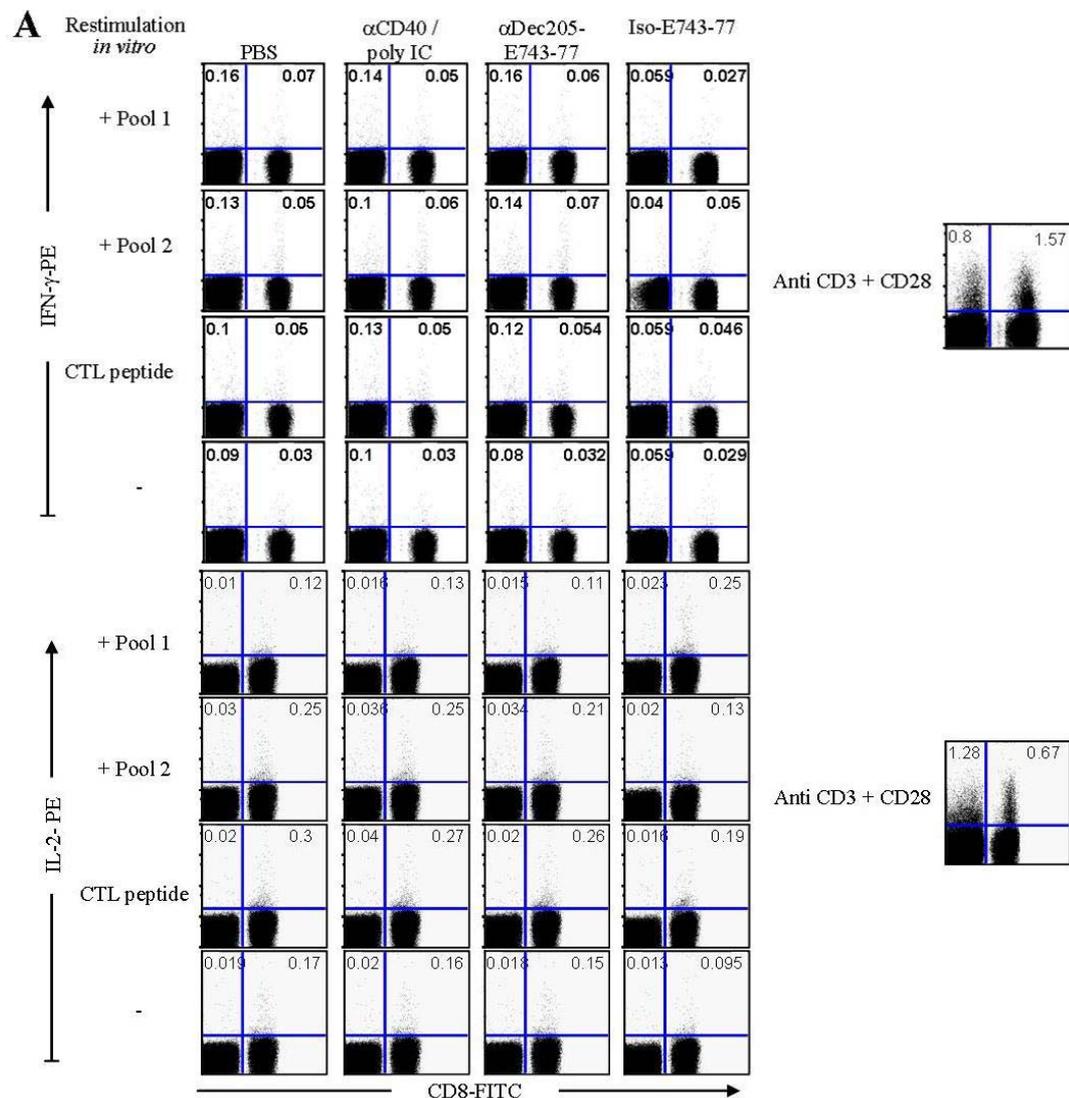
III.II FALTA DE INMUNOGENICIDAD DEL PÉPTIDO E7⁴³⁻⁷⁷ CUANDO EL MISMO ES DIRIGIDO A LAS CD VÍA EL RECEPTOR DEC205

Con el objetivo de evaluar la capacidad de las CD de los órganos linfoides de iniciar una respuesta inmune en contra del péptido citotóxico E7⁴³⁻⁷⁷, ratones C57Bl/6 fueron inoculados con anti-DEC205-E7⁴³⁻⁷⁷ o el control de isotipo. Para la utilización de estos Acs recombinantes como vacunas, es necesario superar la inducción de tolerancia mediada por CD inmaduras^{74, 212, 257}. Para esto, los Acs recombinantes fueron inoculados en presencia de un estímulo de maduración. El estímulo de maduración utilizado fue una combinación del ligando de TLR3, poly IC, y el agonista anti-CD40. Esta elección fue basada en datos preliminares que demostraron que la combinación de anti-CD40 y poly IC permiten la inducción de inmunidad^{195, 258}.

Para detectar la respuesta inmune de linfocitos T, 21 días luego de la inoculación los ratones fueron sacrificados y se realizó una suspensión celular de bazo. Estos esplenocitos fueron re-estimulados con mezclas de 5 péptidos de la biblioteca proteica E7 a una concentración de 2 μ M. La primera mezcla de péptidos abarco la secuencia E7³⁹⁻⁶⁵ (pool 1) y estaba compuesta por 5 péptidos solapados, de \sim 15 aminoácidos cada uno, con una diferencia de 3 aminoácidos por péptido. La segunda mezcla abarco la secuencia E7⁵⁵⁻⁸³ (pool 2), nuevamente compuesta por 5 péptidos solapados, de \sim 15 aminoácidos cada uno, con 3 aminoácidos de diferencia por péptido. También se utilizó para la re-estimulación un solo péptido que contiene la secuencia CTL (E7⁴⁷⁻⁶⁰). La respuesta inmune fue monitoreada con una tinción de citocinas intracelulares (ICS) para IFN- γ e IL-2. En total se inocularon 6 grupos de ratones: a. PBS, b. anti-CD40 + poly IC, c. anti-DEC205-E7⁴³⁻⁷⁷ (1 μ g) + anti-CD40 + poly IC, d. Anti-DEC205-E7⁴³⁻⁷⁷ (10 μ g) + anti-CD40 + poly IC, e. Iso-E7⁴³⁻⁷⁷ (1 μ g) + anti-CD40 + poly IC, f. Iso-E7⁴³⁻⁷⁷ (10 μ g) + anti-CD40 + poly IC.

Como se puede observar en la figura 10A, no pudimos observar producción de citocinas por las células CD8⁺ (Figura 10A). Sin embargo, la producción de citocinas se observó cuando las mismas células se estimularon con Acs anti-CD3 y CD28 (Figura 10 A), indicando que estas células se encontraban viables y tenían la capacidad de responder. Además, esta falta de respuesta fue

independiente de la cantidad de Ac recombinante inoculado, ya que no se pudo observar producción de citocinas por células T en animales inoculados con 1 μg o 10 μg de Acs recombinantes (Figura 10B). Resultados similares fueron observados con células CD4^+ (resultados no mostrados). En conclusión, estos resultados sugieren que luego de la dirección de Ags vía Acs anti el receptor DEC205, no es posible activar una respuesta inmune primaria en contra el péptido E7^{43-77} de HPV.



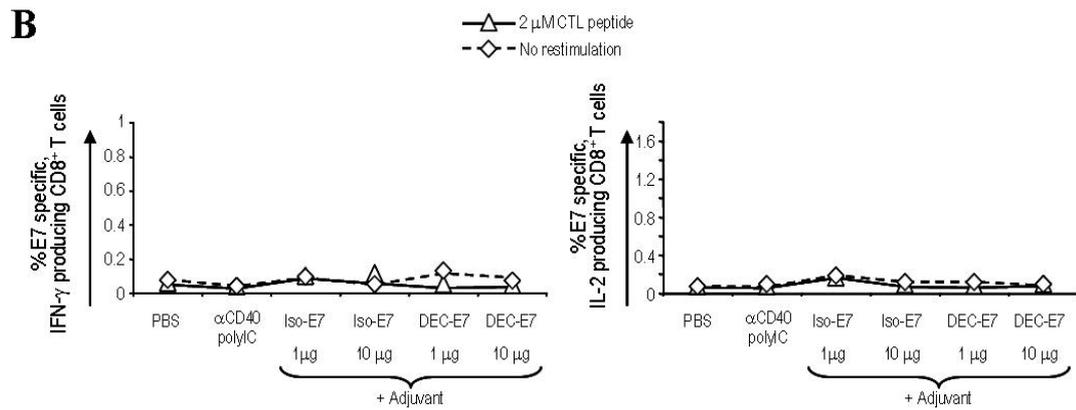


FIGURA 10. Ausencia de activación de la respuesta CD8⁺ con Acs anti-DEC205-E7⁴³⁻⁷⁷, en presencia de anti-CD40 y poly IC. A. Ratones C57Bl/6 fueron inculados i.p. con PBS, el estímulo de maduración (25 μ g anti-CD40 + 50 μ g poly IC), 10 μ g de Acs anti-DEC205-E7⁴³⁻⁷⁷ o isotipo en presencia del estímulo de maduración. 21 días mas tarde, se observó el porcentaje de células CD8⁺ productoras de IFN- γ o IL-2 luego de una corta re-estimulación *in vitro* en presencia de BFA con dos distintas mezclas de péptidos (pool 1 y 2) o con el péptido CTL. Las células que se observan son CD3⁺ y se muestra un experimento de tres con resultados similares. **B.** Igual que en A, pero los ratones fueron inoculados con dos dosis distintas de los Acs recombinantes (10 o 1 μ g) y se observó la inmunidad 21 días más tarde luego de una corta re-estimulación con el péptido CTL en presencia de BFA. Se muestra células CD3⁺ CD8⁺ positivas para IFN- γ o IL-2.

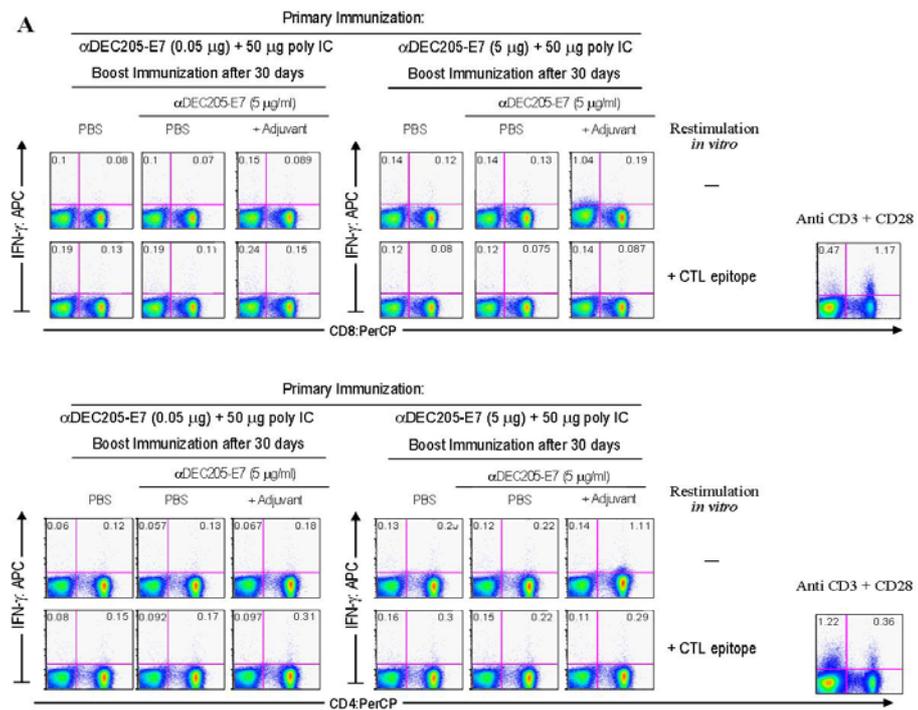
III.III AUSENCIA DE RESPUESTA INMUNE DE MEMORIA LUEGO DE LA INMUNIZACIÓN CON ANTI-DEC205-E7⁴³⁻⁷⁷ EN PRESENCIA DE ADYUVANTE

Las respuestas de memoria son generalmente más potentes que las respuestas primarias. La incapacidad de detectar la respuesta inmune primaria luego de la inoculación del anticuerpo anti- DEC205-E7⁴³⁻⁷⁷ podría ser consecuencia de la baja frecuencia en el número de células específicas para el péptido E7⁴³⁻⁷⁷. Con el objetivo de amplificar la respuesta inmune, el protocolo experimental que se utilizó estuvo basado en datos recientes obtenidos en el laboratorio del Dr. Ralph Steinman. Estos resultados muestran que la respuesta inmune a Acs foráneos (gag p24 de HIV) puede ser incrementada significativamente si los ratones son inmunizados inicialmente con bajas dosis de Ac anti- DEC205-p24 en presencia de poly IC y luego re-inmunizados pero con alta dosis del Ac anti- DEC205 en presencia de poly IC y el agonista anti-CD40 (resultados no publicados).

Ratones C57Bl/6 fueron inmunizados con dos dosis distintas del anticuerpo anti- DEC205-E7⁴³⁻⁷⁷ (0.05 o 5 µg) en presencia de 50 µg de poly IC. 30 días mas tarde los animales fueron re-inoculados con 5 µg del anticuerpo anti-DEC205-E7⁴³⁻⁷⁷ en presencia o ausencia de adyuvante (25 µg de anti-CD40 + 50 µg de poly IC). 10 días mas tarde los esplenocitos fueron obtenidos y se realizó una serie de experimentos: 1. ICS para la producción de IFN-γ y IL-12 en células CD8⁺ luego de una re-estimulación con el péptido CTL (Figura 11A), 2. Disminución de CD62L en las células T Ags específicas y evaluación de la proliferación celular por dilución de CFSE por citometría de flujo (Figura 11B).

Como se puede observar en la figura 11, en ninguno de los grupos estudiados se encontraron células CD8⁺ (panel superior) o CD4⁺ (panel inferior) productoras de IFN-γ (Figura 11A). Además, cuando se evaluó la existencia de células T específicas para el péptido CTL por la dilución de CFSE, se observó la ausencia de expansión clonal, inclusive luego de la segunda inoculación (Figura 11B, panel superior células CD8⁺ y panel inferior células CD4⁺).

En conclusión, luego de una segunda inmunización, no se observó la inducción de linfocitos de memoria, ni se logró potenciar la respuesta inmune CD4⁺ o CD8⁺ contra el péptido E7⁴³⁻⁷⁷.



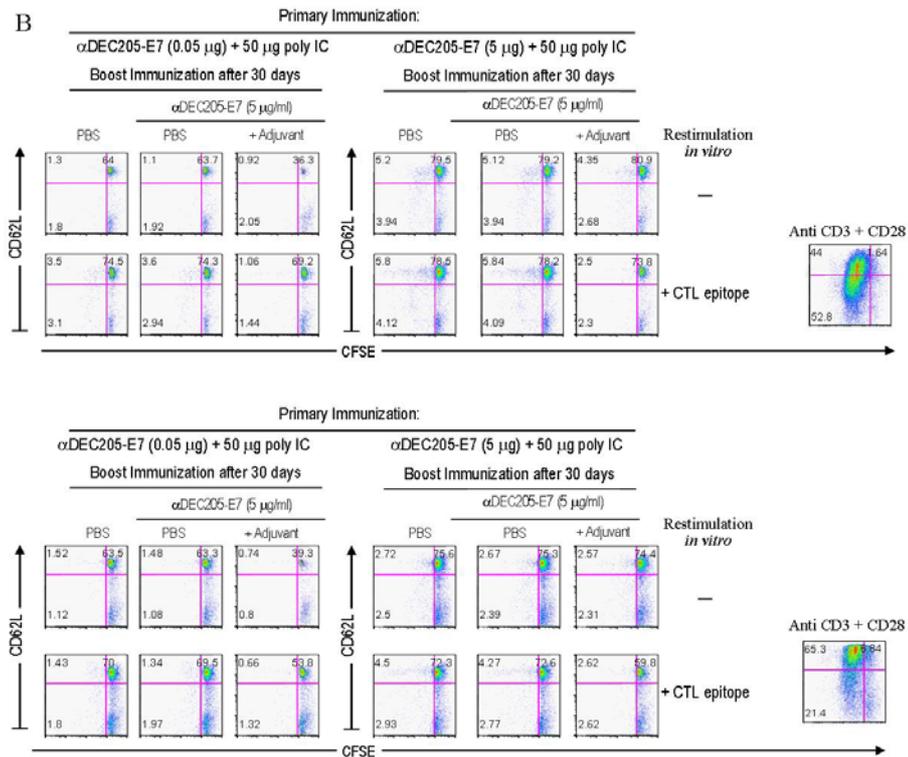


FIGURA 11. Ausencia de linfocitos de memoria luego de la inoculación de los anticuerpos recombinantes. A. Ratones C57Bl/6 fueron inoculados i.p. con 0.05 μ g o 5 μ g de Acs anti-DEC205-E7⁴³⁻⁷⁷ en presencia de 50 μ g de poly IC. 30 días mas tarde, los animales fueron nuevamente inoculados i.p. con 5 μ g de Acs anti-DEC205-E7⁴³⁻⁷⁷ en presencia de 50 μ g de poly IC + 25 μ g de anti-CD40. 10 días mas tardes, los esplenocitos totales fueron obtenidos y se realizaron ensayos de ICS para detectar células CD8⁺ (panel superior) o CD4⁺ (panel inferior) productoras de IFN- γ luego de una corta re-estimulación *in vitro* con el péptido CTL en presencia de BFA. B. Igual que en A, pero los esplenocitos fueron marcados con CFSE y cultivados por 4 días en presencia del péptido CTL. Transcurrido el tiempo de cultivo, los esplenocitos fueron analizados por citometría de flujo para determinar la proliferación celular y la disminución del marcador CD62L. El panel superior representa las células CD3⁺ CD8⁺, mientras que el panel inferior se refiere a las células CD3⁺ CD4⁺. Se muestra un experimento representativo de tres con similares resultados.

DISCUSIÓN

En este capítulo, se dirigieron Ags a las CD vía Acs anti el receptor DEC205, el cual se expresa en el subgrupo de CD CD11c⁺ CD8⁺ en el bazo y en LN. Este subgrupo tiene la capacidad de producir IL-12^{259, 260} y cuando estas células se cargan con Ags y se inoculan en animales nuevamente, tienen la capacidad de inducir la diferenciación a células T productoras de IFN- γ ⁷⁶. Sin embargo, la correcta dirección de Ags a las CD y la maduración de las mismas son todavía áreas muy intrincadas en la inmunología.

Se ha demostrado, en este capítulo, que la dirección del péptido E7⁴³⁻⁷⁷ a las CD vía Acs anti el receptor DEC205 fue incapaz de inducir la activación de linfocitos CD8⁺. Esto presenta un problema fundamental en el caso de la inmunoterapia del cáncer, ya que para inducción de respuesta inmune protectora y terapéutica es requerimiento absoluto la activación de células citotóxicas con capacidad de matar a las células tumorales²⁶¹. Estos resultados, sin embargo, son consistentes con resultados previamente obtenidos en el laboratorio del Dr. Ralph Steinman⁴, donde se demostró la inducción de respuesta CD4⁺, pero la ausencia de respuesta inmune CD8⁺ cuando el Ag tumoral “survivin” es dirigido a las CD vía Acs anti el receptor DEC205. Los resultados que aquí se muestran contrastan con resultados previamente obtenidos con Acs anti- DEC205 conjugados químicamente con OVA, lo cual induce una potente y específica respuesta anti-OVA mediada por linfocitos T CD8⁺. Además, cuando estos Acs conjugados químicamente se administraron en presencia de anti- CD40, se indujo el rechazo de tumores que expresan OVA¹⁹⁶. La diferencia obvia entre estas dos estrategias es el Ag. Es posible que el epítipo CTL de la proteína OVA (SIINFEKL) sea fácilmente y eficientemente procesado y presentado en forma estable en moléculas MHCI, induciendo así la activación de células CD8⁺. Sin embargo, como se mencionó en la introducción de este capítulo, E7⁴³⁻⁷⁷ es un reconocido epítipo CTL que induce respuestas CD8⁺ y el rechazo de tumores que expresan la proteína E7 del HPV (células TC-1,^{262, 263}). Dado este resultado, una posibilidad es que la falta de respuesta CD8⁺ cuando se utilizó el Ag E7⁴³⁻⁷⁷ dirigido al receptor DEC205, sea consecuencia de la incapacidad de exportar los Ags al citosol, proceso necesario para la presentación cruzada.

Con respecto a la ausencia de respuesta $CD4^+$, en teoría el péptido conjugado genéticamente al Ac anti- DEC205 contiene un epítoto Th ²⁴⁹ y un epítoto B ²⁴⁹. Sin embargo, la caracterización del epítoto Th por Tindle y col es cuestionable. Para su descripción, el grupo midió la proliferación celular de esplenocitos totales utilizando péptidos sintéticos solapados. Sin embargo, para asegurar la presencia de péptidos Th, otros ensayos además de la proliferación de linfocitos Th son necesarios, como por ejemplo la secreción de citocinas o proliferación de células $CD4^+$ altamente purificadas. Además, en 1993 otro grupo ²⁴⁸ reportó la ausencia de proliferación de esplenocitos totales cuando este pequeño péptido ($E7^{48-54}$) es utilizado en la estimulación. De acuerdo con los resultados de este último grupo, en este capítulo se demostró la ausencia de respuesta $CD4^+$ cuando el Ag $E7^{43-77}$ fue dirigido a las CD vía Acs anti el receptor DEC205. Este resultado sugiere fuertemente la ausencia de un epítoto Th en dicha secuencia, ya que esta estrategia ha demostrado la activación eficiente de respuestas $CD4^+$ en ratones ^{4, 264}.

Debido a la ausencia de respuestas $CD4^+$ cuando el Ag $E7^{43-77}$ fue dirigido al receptor DEC205, posteriormente en este estudio se clonó toda la proteína E7 del HPV en la cadena pesada del Ac anti-DEC205. La hipótesis fue que la proteína entera aseguraría la presencia de epítopos Th y CTL necesarios para la activación de respuestas inmunes protectoras. A pesar que esta estrategia era prometedora, se encontraron dificultades técnicas con la producción de los Ac recombinantes. La proteína E7 es una proteína nuclear, por lo cual posee secuencias de transporte al núcleo. Debido a esto, las células 293T no fueron capaces de secretar la proteína recombinante al sobrenadante, impidiendo de esta forma la purificación de la misma. Además, las secuencias de transporte al núcleo de la proteína E7 no pudieron ser mutadas dado que, hasta el momento, son desconocidas.

Por lo pronto, se demostró en este trabajo (como en otros, ⁴) la incapacidad del receptor DEC205 para la inducción de respuestas inmunes $CD8^+$. A pesar que la dirección de Ags a las CD parecería ser una potente estrategia, aún se tiene que aprender como dirigir dichos Ags para inducir respuestas de tipo $CD8^+$. Es posible que la dirección de Ags a diferentes subgrupos de CD o a diferentes receptores en las CD promueva la inducción primordial de respuestas $CD8^+$.

Resumen IV

CAPÍTULO IV

EXPRESIÓN DE UN NUEVO RECEPTOR ENDOCÍTICO, LANGERINA, EN CD

En el Capítulo III se demostró la ineficiencia de inducir respuestas inmunes contra el péptido E7⁴³⁻⁷⁷ del HPV cuando el mismo es dirigido a las CD vía Acs anti el receptor DEC205. La ineficiencia de inducir respuestas de tipo CD8⁺ de esta estrategia ha sido repetidamente comprobada en varios modelos experimentales ^{4, 264}. Sin embargo, para inducir respuestas anti-tumorales efectivas, la activación de linfocitos T CD8⁺ es esencial ²⁴⁰. Es posible que otros receptores expresados específicamente en las CD induzcan respuestas primordialmente CD8⁺.

Langerina (CD207) es una lectina dependiente de Ca²⁺ de tipo II . La porción extracelular de este receptor posee un dominio de reconocimiento de carbohidratos (CRD) con especificidad a manosa, fucosa y GlcNAc ¹⁰¹ y se ha reportado recientemente el reconocimiento de secuencias relacionadas con x-Lewis .

Langerina, la cual se expresa en un subgrupo especializado de CD de la piel y de los epitelios estratificados (células de Langerhans, LC, ^{101, 102}), se internaliza de manera espontánea a 37° C y se localiza en gránulos de Birbeck (BG). Sin embargo, Langerina en los BG no se asocia a moléculas MHCII o a la proteína de la membrana lisosomal específica de CD (DC-LAMP. ²⁶⁵), sugiriendo que la función de Langerina no está relacionada con el tráfico de Ags al camino de presentación en moléculas MHCII. Por el contrario, Langerina podría estar involucrada en la presentación cruzada de Ags, es decir, la presentación de Ags extracelulares en complejos MHCI, lo cual induce la activación de linfocitos CD8⁺ ²⁶⁶.

Las LC capturan Ags en la piel o en las mucosas y transportan los mismos a los ganglios linfoides de drenaje, por lo tanto se esperaría la expresión de Langerina en estos ganglios linfoides. Además, la expresión de Langerina se ha reportado en otros tejidos además de la epidermis, las mucosas y sus ganglios de drenaje respectivos ²⁶⁷. Recientemente, utilizando un Ac monoclonal anti-Langerina ⁵⁹ o ratones transgénicos que expresan la proteína EGFP bajo el promotor de la Langerina ⁶⁰, se ha descrito la expresión de esta en dos subgrupos de CD en los ganglios linfoides. Solamente uno de esos subgrupos representa LC

derivadas de la piel. Además, la expresión de Langerina se ha observado en el bazo y en el timo^{59, 60, 102}. El bazo, a diferencia de los ganglios linfáticos, no posee circulación linfoide, lo cual sugiere que esta población de células Langerina⁺ no está relacionada con la población emigrante de la piel o de las mucosas.

Varios mAbs anti- Langerina han sido descritos hasta el momento. Sin embargo, la mayoría de los Abs disponibles son anti- el dominio intracelular de la Langerina. Recientemente se ha descrito un Ac monoclonal que reconoce la parte extracelular de la Langerina⁵⁹, pero el isotipo del mismo es IgM. Estas características (Ac anti- el dominio intracelular o Ac de isotipo IgM) no son deseables cuando el objetivo es clonar el Ac para dirigir antígenos a las CD. En el laboratorio del Dr. Ralph Steinman recientemente se desarrolló un nuevo Ac anti el dominio extracelular de la Langerina (L31, rata IgG_{2a}).

Fue objetivo de esta parte del trabajo **utilizar el Ac anti- Langerina para caracterizar en forma detallada las poblaciones de CD que expresan Langerina y comparar con la expresión de DEC205**. Esta caracterización es esencial para luego proceder con la clonación del nuevo Ac para la dirección de antígenos a las CD.

IV.I EL ANTICUERPO MONOCLONAL L31 RECONOCE LC Y DOS POBLACIONES DE CÉLULAS LANGERINA⁺ EN LOS GANGLIOS LINFOIDES PERIFÉRICOS DE ANIMALES BALB/C

El nuevo anticuerpo monoclonal anti- Langerina nos permitió estudiar la expresión de Langerina *in vivo*. Dos poblaciones que expresan Langerina en los ganglios periféricos han sido detectadas previamente utilizando mAb anti- Langerina⁵⁹ y animales transgénicos que expresan el gen EGFP bajo el promotor de la Langerina⁶⁰. Aquí se aprovechó la capacidad del nuevo anticuerpo de reconocer la expresión de Langerina, *in situ* y por citometría de flujo.

Como se observa en la figura 12A, todas las LC en la piel, identificadas por la expresión de MHCII, muestra alta reactividad al mAb L31. Así también, cuando los ganglios linfáticos periféricos (una mezcla de ganglio inguinal, poplíteo, branquial y cervical, pLN) fueron teñidos con marcadores para la zona B (B220), las células positivas para Langerina solo se encontraron en la zona T y

fueron excluidas de las zona B (Figura 12B). En los pLN, encontramos dos poblaciones distintas de células con expresión de Langerina, una población con alta expresión de CD11c y otra población con baja o inclusive negativa en la expresión de CD11c. Por el contrario, en el bazo, solamente encontramos una población con alta expresión de CD11c en la zona rica en linfocitos T, pero excluída de la zona B (Figura 12B).

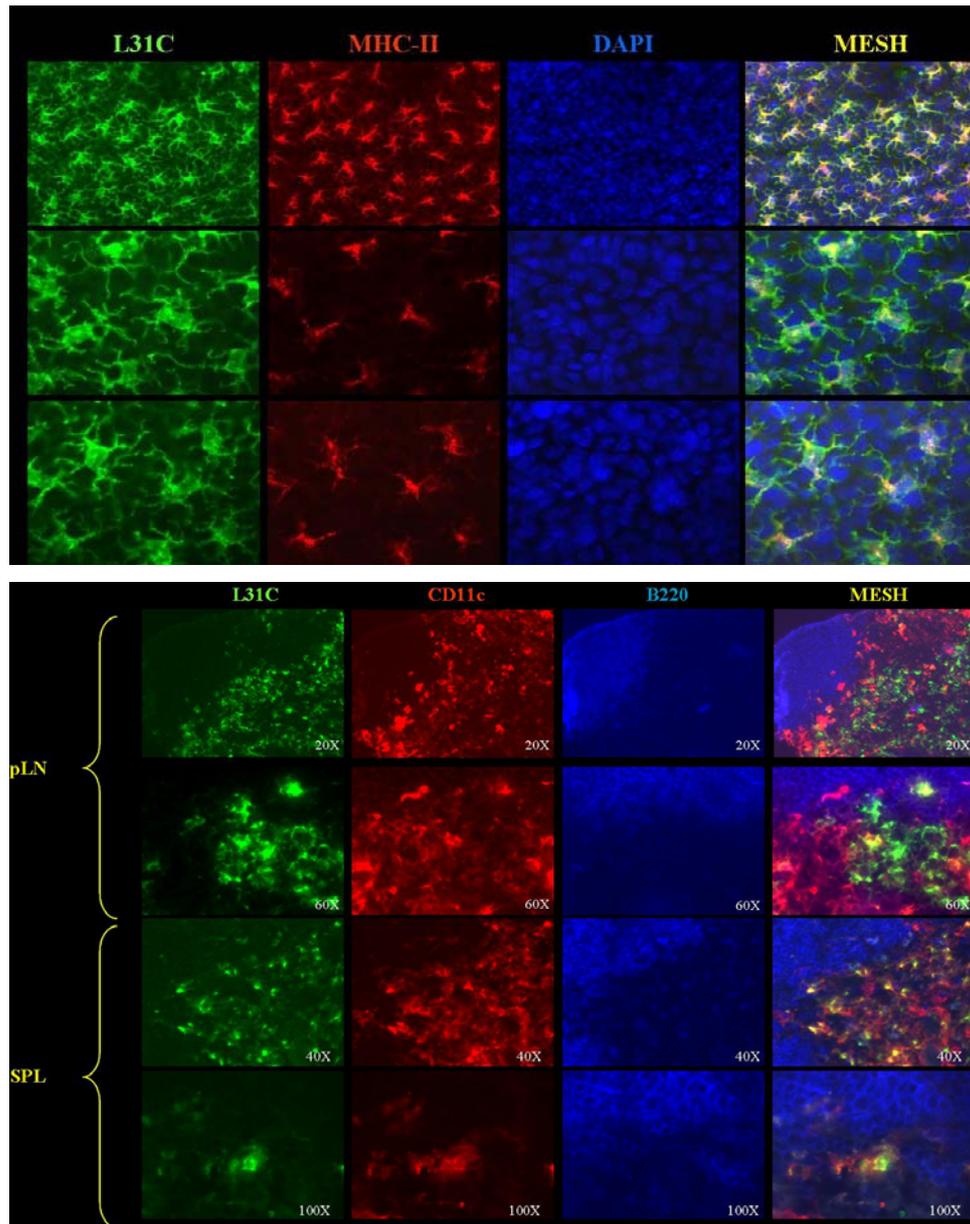


FIGURA 12. L31 reconoce la expresión de Langerina en CD residentes o migratorias de ratones Balb/c. A. LC en láminas epidermicas. Las LC fueron teñidas con L31 + anti-rata Alexa 488, MHCII Biot + Sva Alexa 555 y DAPI para la identificación del núcleo. B. Secciones de ganglios linfáticos periféricos (primeras dos hileras) o bazo (segunda dos hileras) de ratones Balb/c fueron marcados con L31 + Anti rata Alexa 488, CD11c-PE y B220-Biot + SVA AMCA. Los cortes fueron observados en microscopio de fluorescencia.

También se caracterizó en forma detallada la expresión de Langerina en las CD de estos pLN, en el bazo, timo y ganglios linfoides mesentéricos (mLN) por citometría de flujo (Figura 13). Se observó que en el caso de los pLN las células Langerina⁺ pueden ser divididas en dos subgrupos dependiendo de la expresión de CD11c, una población con alta expresión de CD11c (1) y la otra población con baja expresión o inclusive negativas para el marcador CD11c (2, Figura 13A). El primer subgrupo representó un 70 % +/- 5 % de la población total Langerina⁺, mientras que el segundo grupo representó 25 % +/- 7 % de la población total Langerina⁺. Solamente la población CD11c alta es la que se observa en bazo, mLN y timo (1, Figura 13A).

Las dos poblaciones de CD Langerina⁺ en los pLN también fueron caracterizadas por la expresión de MHCII, CD8 y DEC205: la población CD11c alta expresa bajo contenido de MHCII, alta expresión de CD8 y baja expresión de DEC205 (Figura 13C). Por el contrario, la población CD11c baja expresó alto contenido de MHCII, baja expresión de CD8 y alta expresión de DEC205. Además se detectó alta expresión de Langerina en la población CD11c baja (Figura 13B). En el caso del bazo, mLN y timo, solamente se encontró una población de células Langerina⁺ por citometría de flujo. Esta población correspondió a la población que expresa alto contenido de CD11c y posee un fenotipo MHCII bajo, CD8 alto, DEC205⁺ (Figura 13C) y baja expresión de Langerina (Figura 13B).

Se ha demostrado previamente que las células Langerina⁺ de los pLN son derivadas de LC provenientes de la piel^{59, 60}. Con el objetivo de confirmar estos resultados, las orejas de ratones Balb/c fueron pintadas con isotiocianato de fluoresceína (FITC) y los ganglios que drenan las orejas (ganglios retroauriculares) fueron cosechados 4 días más tarde⁶⁰. Solamente las células con baja expresión de CD11c contenían señal FITC, comprobando que estas células corresponden a LC migratorias de la piel (Figura 13D).

Todos estos resultados demuestran que el anticuerpo anti- Langerina L31 reconoce de forma eficiente dos subgrupos de CD que expresan Langerina en ganglios periféricos, mientras que en el bazo, ganglios mesentéricos y timo solamente una población de CD que expresan Langerina fue reconocida por L31. Solamente el subgrupo con baja expresión de CD11c en ganglios de drenaje de la piel corresponde a las LC. Además, las CD CD11c⁺ CD8⁺ DEC205⁺ de bazo, pLN, mLN y timo expresan el receptor endocítico Langerina. Por lo tanto, Langerina no puede ser utilizado como un marcador de LC, ya que varias poblaciones de CD también lo expresan.

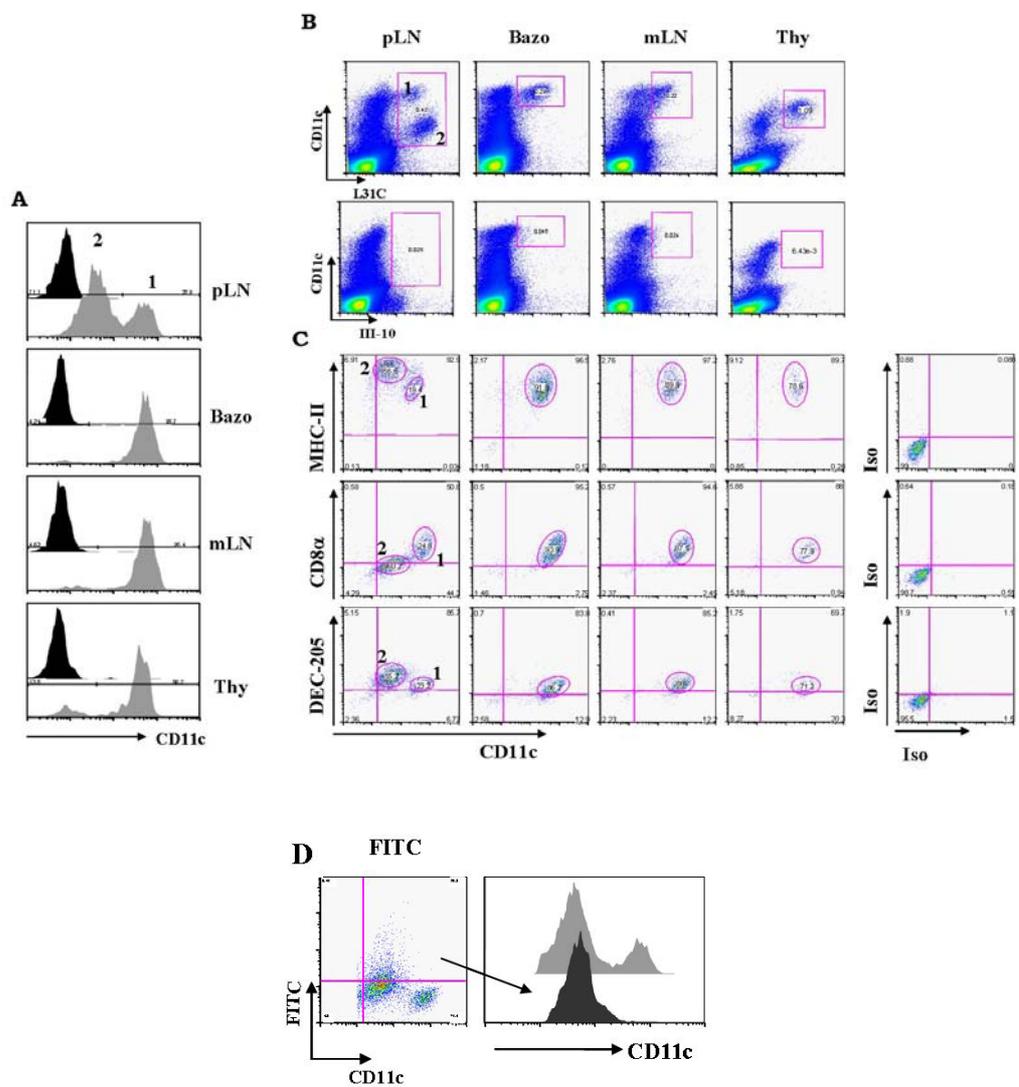


FIGURA 13. Expresión de Langerina en los órganos linfoides. pLN, timo, bazo o mLN fueron tratados con Colagenasa D y las células de baja densidad fueron obtenidas luego de un colchón de albúmina al 30 %. Las células grandes no autofluorescentes fueron analizadas para la expresión de CD11c y Langerina. **A.** Los histogramas muestran la expresión de CD11c en los distintos órganos linfoides. Dos poblaciones se pueden distinguir en pLN: una población con alta expresión de CD11c y otra población con baja expresión o negativa para CD11c. El histograma negro muestra el control de isotipo. **B.** Las células Langerina positivas encontradas en pLN, bazo, timo y mLN fueron analizadas para la expresión de CD11c. En pLN se pueden observar dos poblaciones de células Langerina positiva basado en la expresión de CD11c. La población con baja expresión de CD11c expresa alta cantidad de Langerina. **C.** Las células Langerina⁺ fueron analizadas para varios marcadores de superficie como CD8, DEC205 y MHCII. Los resultados se muestran como diagramas de puntos y son representativos de tres experimentos. **D.** Las orejas de animales Balb/c fueron pintadas con FITC y cuatro días más tarde los ganglios linfoides de drenaje (LN auriculares) fueron cosechados y se estudió la expresión de FITC en células Langerina positivas. Se muestran las células Langerina⁺ y se puede observar que solamente las células con baja expresión de CD11c poseen considerable cantidad de FITC, indicando que son LC.

IV.II LAS LC ES UNA POBLACIÓN DE CD PRESENTE EN pLN, CUYO FENOTIPO SUPERFICIAL ES MADURO

El nuevo anticuerpo anti- Langerina permitió analizar la expresión de los marcadores de superficie en las células que Langerina⁺. La expresión de moléculas coestimuladoras, por ejemplo CD40 y CD86, como así también la expresión de MHCII y la expresión de moléculas inhibitoras como CD80, B7-DC y B7-H1 fue analizada por citometría de flujo. En estado de reposo, las dos poblaciones encontradas en los pLN poseen un fenotipo superficial muy distinto (Figura 14). Mientras la población con baja expresión de CD11c en los pLN expresan alta cantidad de CD40, CD86 y MHCII (Figura 14), la población Langerina⁺ con CD11c elevado en el pLN, así como también las poblaciones en el bazo, timo y en los ganglios linfoides mesentéricos mostraron baja expresión de estas moléculas, lo cual corresponde a un fenotipo inmaduro (Figura 14). Pocas de las células Langerina⁺ en los pLN expresan las moléculas inhibitoras B7-H1 y B7-DC y corresponden solamente a la población con baja expresión de CD11c (Figura 14).

Muchas líneas de evidencia han demostrado que las LC cambian la expresión de los receptores de quimocinas durante el proceso de maduración²⁶⁸. Se sabe que las LC migran a los ganglios linfoides periféricos cuando han sido activadas o inclusive en ausencia de inflamación como consecuencia de un

recambio constante en reposo ²⁶⁹⁻²⁷¹. Resultados anteriores ²⁶⁸ sugieren que el receptor de quimocinas, CCR7, está involucrado tanto en la migración inducida por inflamación como en el recambio de las células en estado de reposo. Debido a esto, se evaluó la expresión de CCR7 en las dos poblaciones de células que expresan Langerina en los pLN. En estos ganglios observamos que la población con baja expresión de CD11c (la cual corresponde a LC) expresa CCR7, mientras que la población con alta expresión de CD11c no expresan CCR7 (Figura 14). Como se esperaba, en el bazo, los ganglios mesentéricos y el timo, el subgrupo de células Langerina⁺ no expresan el receptor de quimocinas CCR7 (Figura 14).

Por lo tanto, nuestros resultados demuestran que las LC derivadas de la piel, ubicadas en los pLN, poseen un fenotipo superficial de CD maduras caracterizado por la alta expresión de CD40, CD86 y MHCII. Además, como se había observado anteriormente ²⁶⁸, CCR7 se expresa en las LC derivadas de la piel en ausencia de señales inflamatorias. Por el contrario, las células Langerina⁺ con alta expresión de CD11c no presentan un fenotipo maduro y no expresan CCR7. Estas últimas son CD residentes de los órganos linfoides secundarios, las cuales expresan el receptor endocítico Langerina.

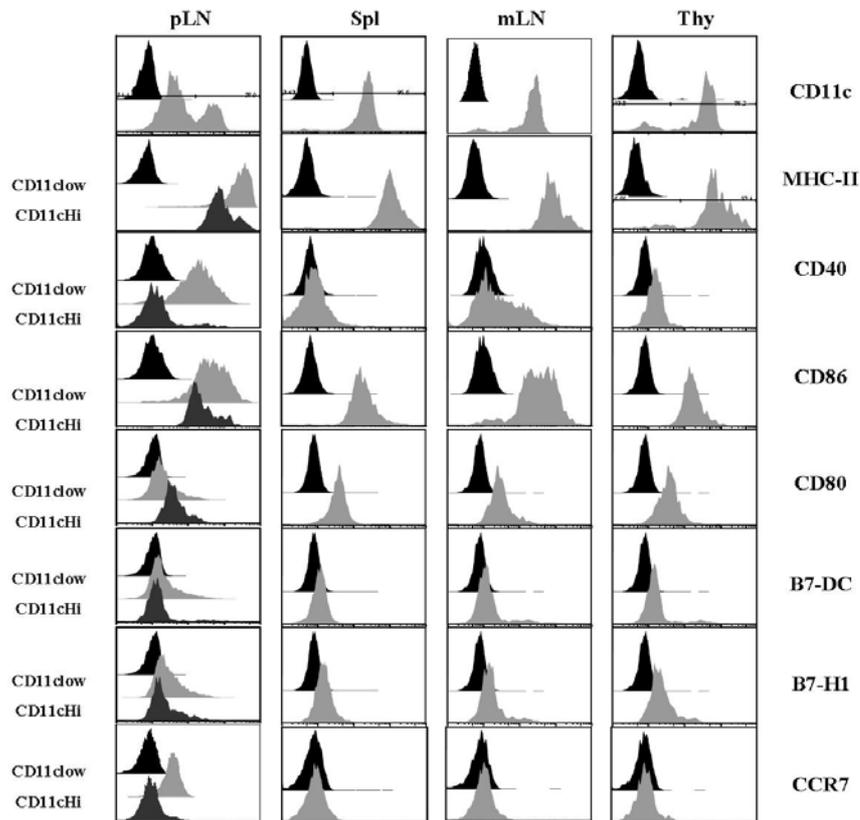


FIGURA 14. Fenotipo de las células Langerina⁺ en ratones Balb/c en estado de reposo. El fenotipo de las células Langerina⁺ encontradas en los pLN, el bazo, timo y mLN fue estudiado en ratones en estado de reposo. Los niveles de MHCII, CD40, CD86, CD80, B7-DC, B7-H1 y CCR7 en las CD con alta expresión de CD11c (histograma oscuro) se compara con la expresión en el subgrupo con baja expresión de CD11c (histograma claro) en los ganglios periféricos. El histograma negro muestra los controles de isotipos respectivos. Se muestra un experimentos representativo de tres.

IV.III LA MISMA POBLACIÓN CD8⁺ CD11c⁺ DE CD EXPRESA LANGERINA Y DEC205 EN RATONES BALB/C

En las secciones anteriores se demostró que la expresión de Langerina no está restringida a LC, sino que Langerina se expresa en CD CD11c^{alto} CD8⁺ del bazo y pLN en ratones Balb/c. Se ha demostrado que estas células también expresan el receptor endocítico DEC205²⁷². En esta parte del trabajo decidimos realizar un análisis detallado comparando la expresión de Langerina y DEC205 en los pLN y en el bazo. Para ello, estos tejidos fueron tratados con Colagenasa D y las células de baja densidad de un colchón de albúmina al 30 % fueron teñidas simultáneamente con Acs anti- CD11c, anti- Langerina (L31) y anti- DEC205

(NLDC). Las células fueron luego analizadas por citometría de flujo. Como se observa en la figura 15, en ratones Balb/c, las células CD11c⁺ CD8⁺ son positivas tanto para DEC como para Langerina, tanto en el bazo como en los ganglios linfáticos periféricos. Por otra parte, las LC también poseen doble expresión de Langerina y DEC205, siendo la expresión de ambos marcadores alta (Figura 15 y Figura 13C). Sin embargo, hay una población de células que expresa DEC205 en pLN, pero que no expresa Langerina. Esta población corresponde a la población de CD dermales. En conclusión, en ratones Balb/c, Langerina y DEC205 se expresan en las mismas poblaciones de CD en bazo y pLN, ha excepción de la expresión de DEC205 y la ausencia de Langerina en las CD dermales. La expresión de estos dos marcadores en las CD CD11c^{alto} CD8⁺ de bazo de ratones Balb/c permite estudiar las consecuencias de la dirección de Ags a la misma población pero utilizando diferentes receptores endocíticos.

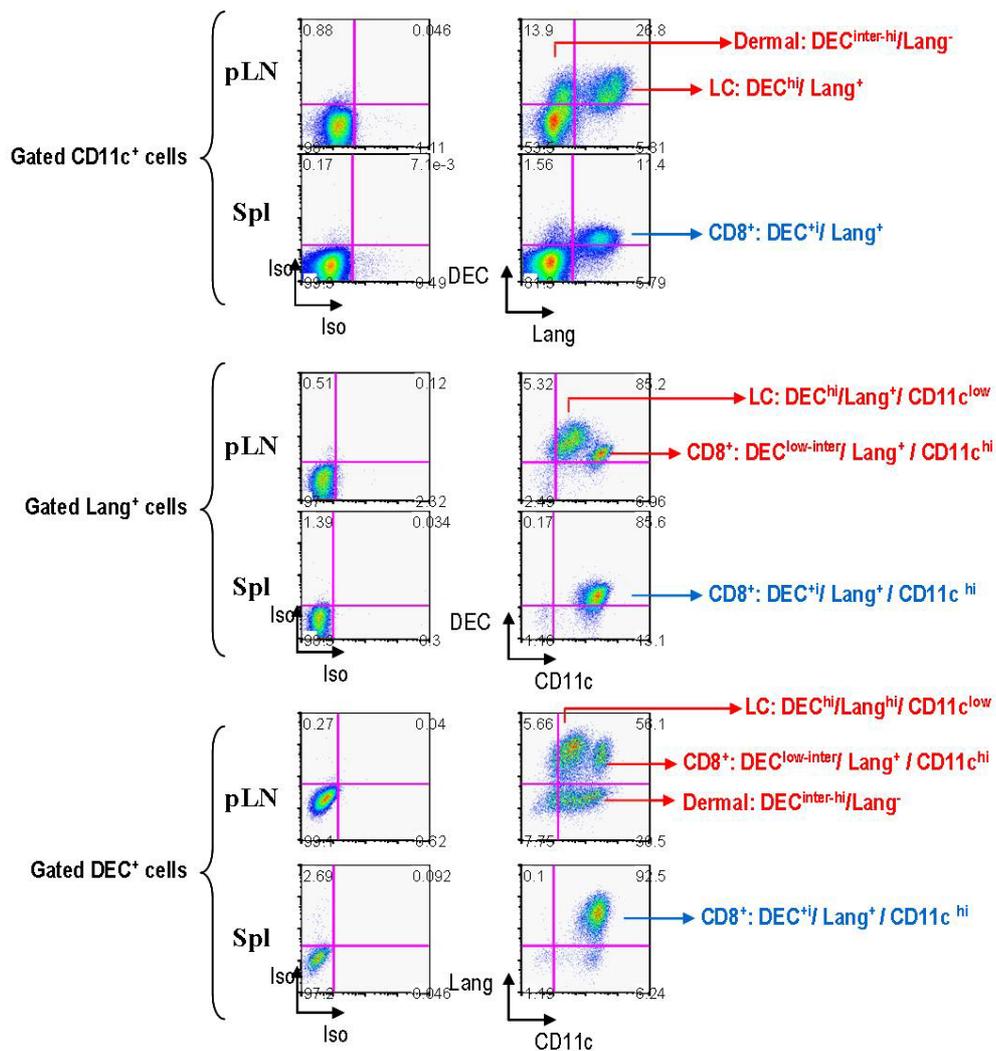


FIGURA 15. CD de bazo y pLN de animales Balb/c co-expresan Langerina y DEC205. Suspensiones celulares de bazo y pLN de animales Balb/c fueron analizadas para la expresión de Langerina y DEC205. Las células fueron teñidas con CD11c, DEC205, Langerina y CD8, y luego fueron analizadas por citometría de flujo. En la columna izquierda se muestra la ventana realizada para el análisis de FACS. En la columna derecha se detalla la expresión de todos los marcadores analizados y el nombre de la población.

IV.IV EXPRESIÓN DIFERENCIAL DE CÉLULAS LANGERINA POSITIVAS EN LAS CEPAS C57BL/6 Y BALB/C

El mAc L31 mostró ser muy eficiente en el reconocimiento de Langerina en ratones Balb/c. Nuestro próximo objetivo fue observar la expresión de Langerina en ratones C57Bl/6. En ratones C57Bl/6 se observó alta expresión de Langerina en células con baja expresión de CD11c (LC). Por el contrario, las células con alta expresión de CD11c en esta cepa de ratones, es decir las células CD11c⁺/CD8⁺, fueron bajas o negativas en la expresión de Langerina (Figura 16). Esta diferencia en la expresión solo se observó en C57Bl/6, ya que cuando se analizaron los ratones F1 (primera generación de la cruce entre ratones Balb/c y C57Bl/6) se observó la recuperación en la expresión de Langerina en las células CD11c⁺/CD8⁺ (Figura 16). En conclusión, en el bazo de ratones C57Bl/6, las células DEC205⁺, son bajas/negativas para Langerina. Mientras que en los pLN solo las LC expresan alta cantidad de Langerina. La población CD11c⁺ CD8⁺ de los pLN y el bazo expresan baja cantidad (casi indetectable) de Langerina. Estos resultados sugieren expresión diferencial de Langerina en estas dos cepas de ratones.

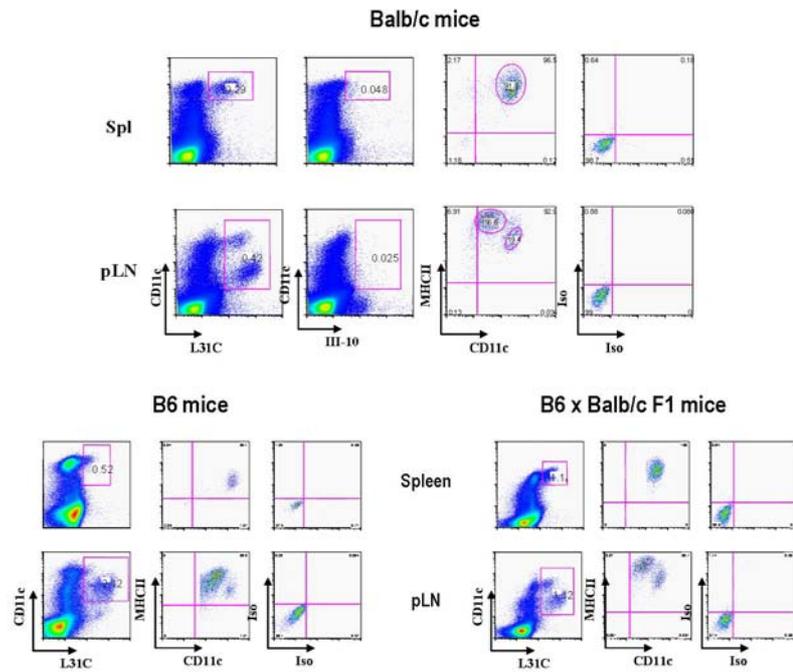


FIGURA 16. CD CD11c⁺ CD8⁺ en ratones C57Bl/6 no expresan Langerina. Suspensiones celulares de bazo y pLN de animales C57Bl/6 fueron analizadas para la expresión de Langerina. Las células fueron teñidas con CD11c, Langerina y CD8 y fueron analizadas por citometría de flujo. Se compara la expresión de Langerina en ratones Balb/c, C57Bl/6 y ratones F1 (primera generación luego de la cruce de ratones C57Bl/6 x Balb/c). Se puede observar baja expresión de Langerina en CD CD11c⁺ en ratones C57Bl/6, lo cual corresponde a las células CD8⁺ CD11c⁺.

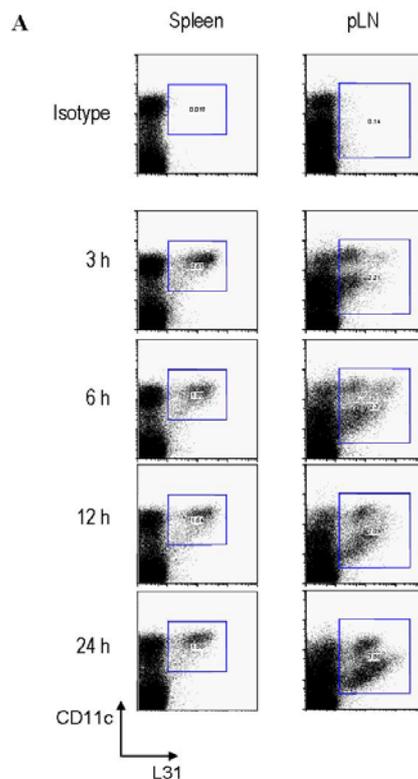
IV.V EL AC L31 PUEDE SER CAPTADO POR CD LUEGO DE SU INOCULACIÓN *IN VIVO*

Con el objetivo de determinar si el Ac L31 es capturado específicamente por las CD Langerina⁺ luego de su inoculación *in vivo*, ratones Balb/c fueron inoculados subcutáneamente con el Ac L31 marcado con Alexa 647, o con III-10-Alexa 647, control de isotipo el cual no reacciona con las CD o con otras células. Los ratones inoculados fueron sacrificados a distintos tiempos y el bazo o pLN fueron analizados por citometría de flujo. Como se observa en la figura 17, el anticuerpo L31 fue detectado en las CD de bazo y pLN tan rápido como 3 hs luego de su inoculación (Figura 17 A). Sin embargo, el número de células positivas para L31 aumentó con el tiempo en los pLN. Además, el Ac L31 fue detectado en las células Langerina⁺ con alta expresión de CD11c y en las células Langerina⁺ con baja expresión de CD11c (Figura 17 A). El control de isotipo, III-

10-Alexa 647, no pudo ser detectado en CD de bazo o pLN u otras células del sistema inmune.

La expresión diferencial de Langerina y DEC205 en ratones C57Bl/6 sugiere que la captación de los Acs en esta cepa ocurre en distintas poblaciones. Para corroborar esto, ratones C57Bl/6 o Balb/c fueron inoculados simultáneamente con L31-Alexa 647 y DEC205-Biot o con los controles de isotipos correspondientes (III-10-Alexa 647 o NLDC-Biot). 16 hs más tarde, los animales fueron sacrificados y se analizó la captación de Acs en pLN o bazo luego de un enriquecimiento de CD con un colchón de albúmina al 30 %. Como se observa en la figura 17B, en el bazo de ratones Balb/c, la misma población de CD capta L31 y NLDC. Sin embargo, en ratones C57Bl/6, la población de CD que captura DEC205, captura muy poca cantidad de Langerina. Esta población corresponde a la población $CD11c^+ CD8^+$ del bazo. Por otra parte, en pLN de Balb/c y C57Bl/6 una población de CD solamente captura DEC205, pero no Langerina. Esta población corresponde a CD dermales.

Con este resultado concluimos que L31 se une efectivamente a su receptor en las CD y el mismo puede ser utilizado como herramienta para la dirección de Acs a las CD Langerina⁺.



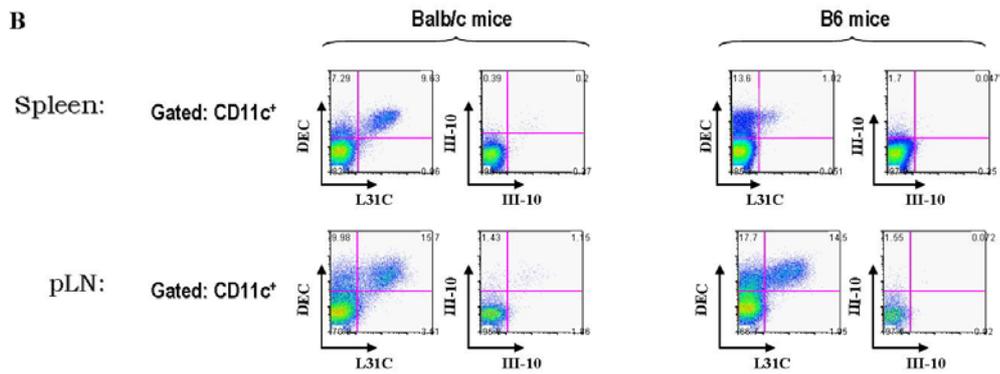


FIGURA 17. L31 es captado por CD en el bazo y pLN. **A.** Animales Balb/c fueron inoculados con 10 μ g de L31 conjugado con Alexa 647 o el control de isotipo III-10-Alexa 647 en forma subcutánea. A los tiempos indicados, las CD fueron enriquecidas con un colchón de albúmina al 30 % y se evaluó por citometría de flujo las CD que capturaron el Ac anti-Langerina. Las frecuencias de células que capturaron el Ac se muestran en bazo y en pLN. Se muestra un experimento representativo de tres con resultados similares. **B.** Animales Balb/c o C57Bl/6 fueron inoculados con 10 μ g de L31-Alexa 647 + NLDC-Biot o los control de isotipo III-10-Alexa 647 + III-10 Bioti en forma subcutánea. 16 hs más tarde, las CD fueron enriquecidas con un colchón de albúmina al 30 % y se evaluó por citometría de flujo las CD que capturaron los Ac anti-Langerina y Ac anti-DEC205. Se muestra un experimento representativo de tres con resultados similares.

DISCUSIÓN

A pesar que la expresión de Langerina disminuye luego de la maduración, las LC retienen niveles detectables cuando llegan a los pLN²⁷³. Esta baja expresión de Langerina ha sido detectada de manera ineficiente por los Ac anti-Langerina descritos hasta el momento²⁷³. El nuevo Ac anti dominio extracelular de la Langerina, L31, permitió resolver este problema de sensibilidad debido a la alta afinidad por su ligando. Teniendo en cuenta estudios anteriores, la expresión de Langerina se esperaba en dos subgrupos de CD en pLN^{59, 60}. El nuevo anticuerpo L31 permitió distinguir estas dos poblaciones a pesar que en promedio la expresión de Langerina en una de ellas es bastante menor.

Estudios previos demostraron la expresión de transcritos de Langerina en LN mesentéricos y en el bazo^{102, 267}. Debido a que el bazo no tiene circulación linfoide, es probable que esta población no derive de la población emigrante de la piel o mucosas. El análisis de esta población mostró que estas células Langerina⁺ tienen un fenotipo CD11c⁺ CD8⁺ y expresión de DEC205. Este resultado sugiere fuertemente que la expresión de Langerina no está limitada a las LC en la piel o las LC que migraron a los pLN. La mayoría de las CD CD11c⁺ CD8⁺ en ratones Balb/c expresan Langerina. A diferencia de esto, la expresión de Langerina en la cepa C57Bl/6 casi está restringida a la población de LC. La población de CD11c⁺ CD8⁺ de pLN y de bazo tiene baja expresión de Langerina.

El estudio de las poblaciones de CD en bazo y pLN permitió demostrar la expresión de DEC205 y Langerina en la población CD11c⁺ CD8⁺, además, de la expresión de Langerina en las CD derivadas de LC de la piel. Por el contrario, las CD dermales se caracterizan por la expresión de DEC205 y la ausencia de Langerina. En ratones C57Bl/6 la expresión de Langerina está casi restringida a la población de LC.

Las LC en estado de reposo en la piel muestran un fenotipo maduro, con expresión de MHCII intracelular (Figura 12 y resultados no mostrados). Estas células en estado de reposo migran constantemente a los pLN. En pLN las CD derivadas de LC expresan altos niveles superficiales de moléculas coestimuladoras y MHCII, así como también CCR7. Este fenotipo en estado de reposo es muy similar al fenotipo de las LC que llegan a los pLN en condiciones de inflamación⁶⁰. Las CD en estado de reposo migran a los pLN y presentan Ags

propios para la inducción de tolerancia periférica. Este rol de las CD es inconsistente con el fenotipo superficial maduro de las LC en pLN. Sin embargo, algunos datos recientes ayudan a explicar la paradoja: el fenotipo maduro de las CD definido por alta expresión de MHCII y moléculas coestimuladoras no equivale a un estado maduro funcional, definido como la habilidad de inducir linfocitos T efectores. Este fenotipo maduro de las LC que llegan a los pLN en estado de reposo está asociado con la producción de niveles bajos de IL-12²⁷⁴. Esto puede explicar la falta de activación de los linfocitos T cuando LC fenotípicamente maduras presentan Ags.

Langerina es un receptor endocítico que participa de manera importante en la captura y el procesamiento de Ags por las CD. Sin embargo, muy poco se sabe de los organismos patogénicos que se unen a este receptor²⁷⁵. Aquí, se demostró que L31 es captado específicamente por las CD que expresan Langerina cuando es administrado en forma s.c. L31 es, por lo tanto, una herramienta potente para la dirección de Ags a las CD de varios órganos linfoides *in vivo*, como pLN, bazo, timo y LN mesentéricos.

CAPÍTULO V

LANGERINA ES UN RECEPTOR ENDOCÍTICO QUE PERMITE LA PRESENTACIÓN DE ANTÍGENOS EN MHCI Y MHCII

En el capítulo IV se observó la expresión de Langerina en dos poblaciones de CD: LC y células CD11c^{alto} CD8⁺ en pLN y bazo de ratones Balb/c. También se observó que el nuevo Ac anti-Langerina es capturado eficientemente por las poblaciones luego de su inoculación *in vivo*. Estos resultados sugieren que el nuevo Ac anti-Langerina puede ser utilizado para dirigir Ags a las CD.

Langerina es un receptor endocítico poco estudiado hasta el momento. Resultados preliminares sugieren que este es rápidamente endocitado y localizado en BG en las LC, pero no se encontró relación con el procesamiento de Ags en la vía MHCII. Algunos resultados, sugieren que este receptor podría estar involucrado en la presentación cruzada a moléculas MHCI, pero nuevamente, estos estudios son preliminares. Por otra parte, en los pLN, las CD derivadas de LC en la piel tienen alta expresión de Langerina, pero estas células poseen un fenotipo superficial maduro. Uno de los eventos que ocurre en el proceso de maduración es la disminución de la capacidad de captar Ags y procesar los mismos. Por lo tanto, es cuestionable la capacidad de estas células derivadas de LC de la piel de captar los Ags y presentarlos en complejos MHC. El objetivo de esta parte de la tesis doctoral fue **observar si Langerina podía ser utilizada como un receptor endocítico para la presentación de Ags en complejos MHCI y/o MHCII**. Debido a la dificultad que representa la elección del “correcto” Ag tumoral, ya que muchos de ellos son Ags propios levemente modificados que sufren tolerancia central, se decidió utilizar un Ag modelo: ovalbúmina (OVA).

OVA es un modelo útil para estudiar la capacidad del receptor Langerina de captar Ags y presentar los mismos en MHCI y MHCII ya que existen ratones transgénicos que poseen un TCR específico para péptidos de OVA. Por lo tanto, en esta parte de la tesis doctoral se conjugó genéticamente OVA al extremo C-terminal de la cadena pesada del Ac anti- Langerina, con el objetivo de estudiar la capacidad de este receptor de mediar la presentación en MHCI y MHCII.

V.I CONSTRUCCIÓN GENÉTICA DE OVA EN LA CADENA PESADA DEL ANTICUERPO ANTI- LANGERINA

Con el objetivo de examinar el papel potencial de Langerina como un receptor endocítico para el procesamiento de Ags y su presentación en MHCI y MHCII, el Ag modelo ovalbúmina (OVA) fue clonado en el extremo C-terminal de la cadena pesada del anticuerpo anti- Langerina. Se sabe que OVA es presentado en complejos MHCI H-2K^b a células CD8⁺, incluyendo las células T transgénicas OT-I²⁷⁶, como así también a células CD4⁺ incluyendo las células T con un TCR transgénico OT-II.

Además de clonar OVA en el Ac anti- Langerina, como control positivo se clonó OVA en la cadena pesada del anticuerpo anti- DEC205, cuya inoculación induce la proliferación de linfocitos transgénicos CD4⁺ y CD8⁺^{74, 212}. También se construyó la cadena pesada del Ac control de isotipo, III-10, el cual no reacciona con las CD. Los anticuerpos de fusión fueron producidos por células 293T transfectadas transientemente. Con el objetivo de observar la integridad de los anticuerpos recombinantes, los mismos fueron analizados en un gel de poliacrilamida al 10 % en condiciones reductoras (Figura 18). Como se puede observar en la figura 18, la cadena pesada del anticuerpo recombinante migró con un peso molecular aparente de ~100 kD, confirmando que OVA (~54 kD) se encontraba exitosamente conjugada con la cadena pesada del Ac anti- Langerina, anti- DEC205 o el control de isotipo, ISO-OVA (50kD). Por otra parte, Langerina- OVA fue analizada también por Western Blotting usando Ac específicos anti- OVA o anti- ratón IgG1 (isotipo de la cadena pesada de los anticuerpos recombinantes, Figura 18C).

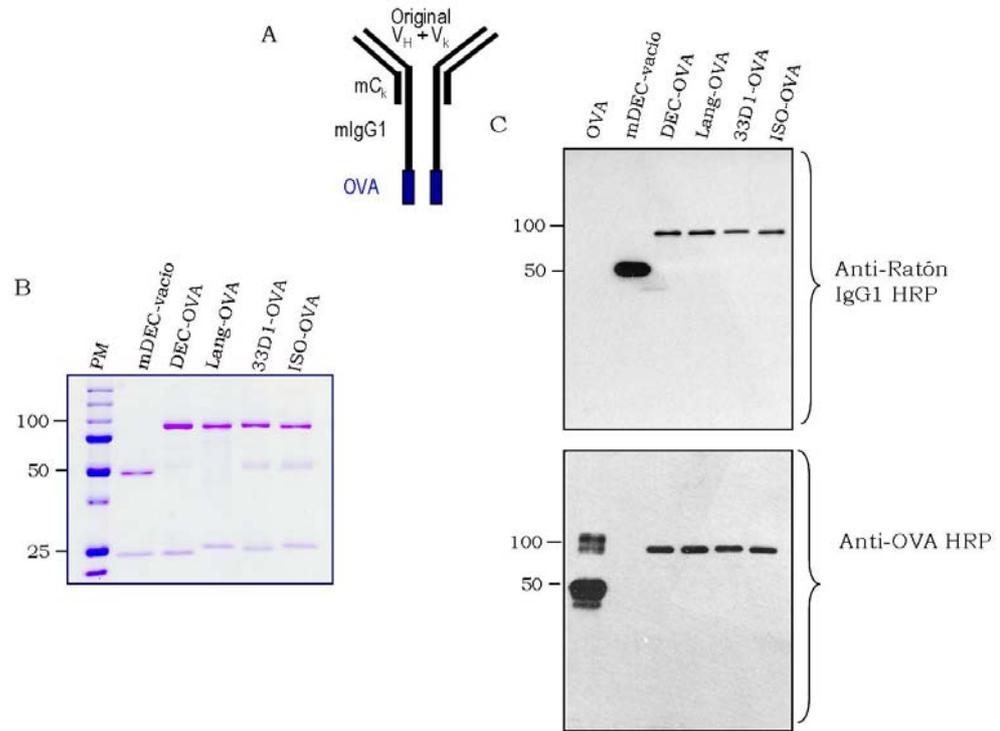


FIGURA 18. Conjugación genética de OVA en la cadena pesada del Ac anti- Langerina o DEC205. A. Diagrama representativo de los Ac recombinantes. B. Los anticuerpos recombinantes fueron resueltos en un gel de poliacrilamida al 10 % en condiciones reductoras y revelado con el colorante Coomassie Blue. C. Western Blotting con Ac anti- IgG1 de ratón (gel superior) o Ac anti- OVA (gel inferior). Se puede observar que los Ac recombinantes son isotipo IgG1 y que poseen OVA conjugada genéticamente.

Para asegurar que los anticuerpos recombinantes retenían la habilidad de unión al receptor Langerina o DEC205, células CHO transfectadas en forma estable con los receptores, así como también las células CHO transfectadas con el plásmido vacío (CHO-NEO), fueron incubadas con distintas concentraciones de los anticuerpos recombinantes (0.02, 0.2 o 2 $\mu\text{g/ml}$). Luego de 30 min en hielo, las células fueron lavadas y teñidas con anticuerpos anti- ratón IgG marcado con PE. Como se muestra en la figura 19A, ninguna de las dos proteínas recombinantes perdieron la afinidad por su ligando. Por otra parte, ninguno de los dos anticuerpos recombinante se unieron a las células CHO-NEO (Figura 19A). Además, se analizó la capacidad de unión del Ac anti- Langerina-OVA a la Langerina soluble. Para ello, Langerina-FLAG murina o humana en forma soluble o SIGNR1-FLAG soluble (otro receptor tipo C-lectina) fueron corridos en un gel

de poliacrilamida al 10 %. Luego de la transferencia, se incubó la membrana de nitrocelulosa con Acs anti Langerina-OVA o con Acs anti-FLAG. Para revelar la membrana se utilizó Acs anti- IgG1 de ratón (membrana incubada con anti- Langerina-OVA) o anti- IgG de rata (membrana incubada con anti- FLAG). Como se puede observar en la figura 19B, el anticuerpo anti- Langerina-OVA tiene la capacidad de unión a Langerina soluble murina, pero no a SIGNR1 (Figura 19B). También se puede observar que el Ac anti-Langerina reconoce levemente Langerina humana soluble.

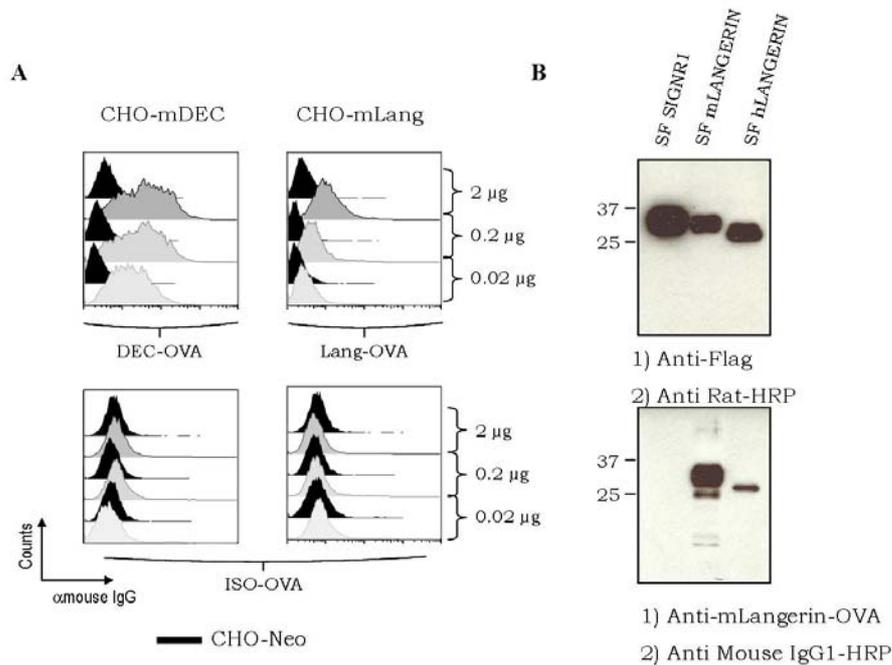


FIGURA 19. Ac anti- Langerina-OVA reconoce eficientemente su receptor. **A.** Ensayos de unión a células CHO-mDEC, CHO-mLang o células control NEO, utilizando dosis graduales (2, 0.2 y 0.02 µg/ml) de Acs recombinantes. **B.** Western Blotting donde se muestra que el Ac anti-Langerina-OVA se une eficientemente a su receptor soluble. La membrana de nitrocelulosa se reveló con Ac anti-FLAG y se puede observar la señal en todas las calles ya que las formas solubles de estas proteínas están conjugadas genéticamente con FLAG. El segunda membrana fue revelada con Ac anti- Langerina-OVA y se observa señal solo en la forma soluble de Langerina murina.

V.II PRESENTACIÓN DE OVA LUEGO DE LA INOCULACIÓN DE LANGERINA-OVA *IN VIVO*

Con el objetivo de determinar si las CD pueden presentar OVA *in vivo* luego de la dirección del mismo a CD vía el Ac anti- Langerina, se aprovecharon los ratones transgénicos OT-I, OT-II y DO11.10. Para poder observar la proliferación de células T *in vivo*, los animales B6 (OT-I y OT-II) o Balb/c (DO11.10) recibieron $3-5 \times 10^6$ células transgénicas marcadas con CFSE. Un día después de la transferencia adoptiva, los animales recibieron 10 μ g anti- DEC-OVA, Langerina-OVA o ISO-OVA. La proliferación celular fue analizada por citometría de flujo 3 días después de la administración del Ag, para lo cual los animales fueron sacrificados y la suspensión celular de bazo fue teñida con Acs anti- CD8 (OT-I) o CD4 (OT-II y DO11.10) conjugados con APC y Acs anti- V α 2 (OT-I y OT-II) o Acs anti- KJ1-26 (DO11.10) marcados con PE. Como se muestra en la figura 20, a pesar que un número significativo de células transgénicas fueron recuperadas de los bazos de los animales transferidos, 96 hs luego de la transferencia adoptiva no se observó división de las células T en ausencia de los anticuerpos recombinantes DEC o Langerina. Por el contrario, cuando los Ags fueron dirigidos a las CD vía Acs anti estos receptores tipo C-lectina, la división celular de las células transgénicas fue inducida (Figura 20). Esto demuestra fehacientemente que la expansión de las células T se induce cuando el Ag es dirigido eficientemente a las CD vía Acs anti el receptor Langerina.

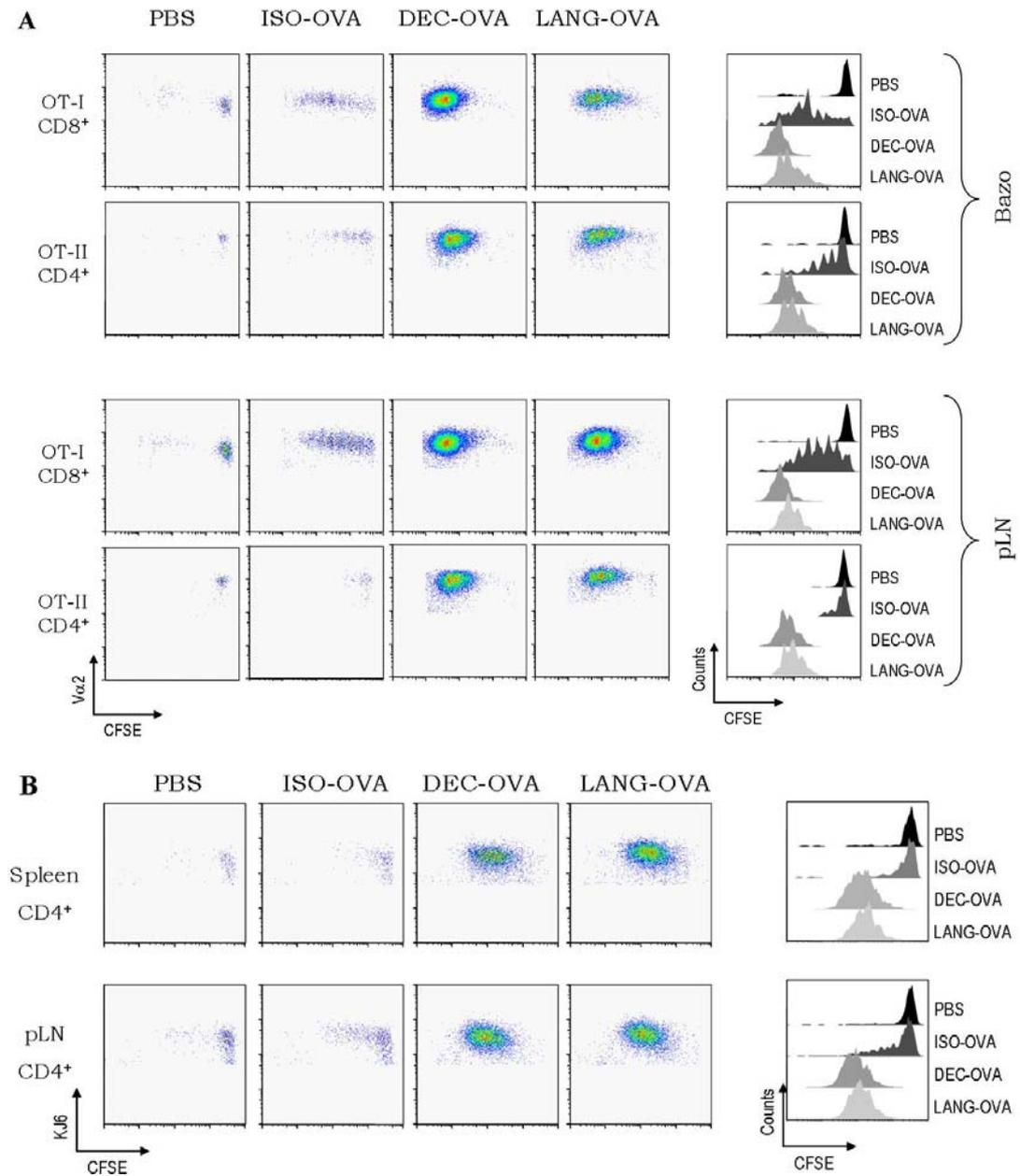


FIGURA 20. Presentación de OVA en complejos MHC I y MHC II luego de la dirección al receptor Langerina. Ratones C57Bl/6 (A) o Balb/c (B) fueron inyectados i.v. con $3-5 \times 10^6$ células OT-I, OT-II (A) o DO11.10 (B) marcadas con CFSE. 24 hs más tarde, los animales recibieron $10 \mu\text{g}$ de Ac recombinante anti- Langerina-OVA, DEC205-OVA o ISO-OVA. 3 días más tarde, se evaluó la proliferación celular en pLN y en bazo por citometría de flujo. Se muestra un experimento representativo de tres con resultados similares.

DISCUSIÓN

La dirección de Ags a las CD vía Acs anti el receptor endocítico Langerina tiene varias ventajas las cuales fueron evaluadas a lo largo de esta tesis doctoral. Primero, Langerina en ratones Balb/c se expresa abundantemente en CD y en LC. Segundo, el Ac L31 anti- Langerina tiene alta afinidad y especificidad por su ligando. Último, *in vivo*, el Ac anti-Langerina es dirigido eficientemente a las CD y la conjugación de éste a OVA induce el procesamiento y la presentación a linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺.

La presentación de antígenos a las células CD8⁺ es un requerimiento absoluto para iniciar respuestas citotóxicas anti- tumorales. El receptor Langerina mostró ser capaz de presentar el Ag OVA a células CD8⁺. Estos resultados sugieren el potencial de este receptor para dirigir Ags a las CD e inducir respuestas anti-tumorales efectivas.

DISCUSIÓN GENERAL Y CONCLUSIONES

Uno de los desafíos más grandes de la inmunoterapia es la eliminación de tumores establecidos. Para esto, el campo de la inmunología tumoral se ha enfocado en dos estrategias: el uso de células tumorales o el uso de antígenos tumorales definidos ³². Estas dos estrategias dependen, sin embargo, en el encuentro de las vacunas con las CD del huésped. La falta de encuentro resulta en la ausencia de respuesta inmune, mientras que el encuentro inapropiado, por ejemplo con CD inactivadas o con algunos subgrupos de CD, puede silenciar o tolerizar la respuesta inmune ³⁶. CD maduras funcionalmente son potentes adyuvantes que permiten la estimulación de linfocitos T ^{150, 277}. Por lo tanto, en esta tesis se han examinado estos dos principios a) la forma en la cual se dirigen Ags (células tumorales o Ags tumorales definidos) a las CD, y b) el estado de activación / maduración de las CD.

El uso de células tumorales irradiadas como fuente de Ags tiene varias ventajas comparado con el uso de Ags tumorales definidos. Primero, las células tumorales poseen un amplio espectro de Ags para inducir la activación de varias clonas de linfocitos T. Además, la captura de células tumorales por las CD permite la presentación de Ags en MHCII ²⁷⁸, MHCI ²⁷⁹ y CD1 ²⁸⁰. Sin embargo, hay limitaciones esenciales en el uso de células tumorales como fuente de Ags. Aquí se demostró que las células tumorales inducen la expresión de moléculas inhibitorias en las CD (Capítulo I), las cuales tienen la capacidad de inducir tolerancia de los linfocitos T o inclusive expandir los linfocitos Treg. Además, estas CD están incapacitadas para producir citocinas necesarias para la activación de respuestas tipo Th1 (Capítulo I). Para la inducción de respuestas inmunes anti-tumorales es necesario, sin embargo, la activación funcional de las CD. Varios adyuvantes han sido considerados en la inmunoterapia del cáncer, entre ellos los ligandos de TLR. En esta tesis, las CD fueron estimuladas con los ligandos de TLR, LPS y poly IC, en presencia de las células tumorales irradiadas. Sorprendentemente, los resultados presentados aquí demuestran la incapacidad de las CD de responder a estos estímulos en presencia de las células tumorales. Este resultado tiene implicaciones severas en el uso de células tumorales como fuente de antígenos y sugiere la imposibilidad de lograr CD funcionalmente activas en

presencia de células tumorales inclusive en presencia de los ligandos de TLR (Capítulo II).

Estos resultados son los que persuadieron la necesidad de buscar otras formas de dirigir Ags a las CD. Para esto, Ags definidos fueron elegidos y dirigidos a receptores endocíticos en las CD. Las limitaciones de esta estrategia son la correcta elección de Ags que induzcan la regresión tumoral y la correcta elección del receptor endocítico que permita la presentación del Ag en MHCI y MHCII para la activación de linfocitos T CD8⁺ y CD4⁺. Con respecto a esta última estrategia, en este trabajo se observó que el receptor DEC205 posee una incapacidad de presentar Ags en moléculas MHCI. Este resultado fue previamente reportado por otros trabajos en el laboratorio del Dr. Ralph Steinman^{4, 264}. Esto sugiere que DEC205 no es un buen receptor para la dirección de Ags y su presentación a células CD8⁺. Es por ello que aquí empezamos la búsqueda y descripción de nuevos receptores endocíticos en las CD, que potencialmente permitan la presentación de Ags en MHCI. Entre ellos Langerina es un receptor endocítico altamente expresado en LC y CD del bazo y LN de animales Balb/c (Capítulo IV). La dirección de Ags vía anticuerpos anti- Langerina mostró eficientemente presentación a células CD8⁺, sugiriendo la posibilidad de utilizar este receptor para la dirección de Ags tumorales (Capítulo V).

En conclusión, de esta tesis doctoral, quisiera sugerir la necesidad de evitar la utilización de células tumorales irradiadas como fuente de antígeno en las vacunas anti- tumorales. Al contrario, la dirección de Ags a las CD vía Acs anti- el receptor Langerina tiene el potencial de mejorar la inmunoterapia tumoral. Los Ags dirigidos a las CD utilizando esta estrategia, en presencia del estímulo de maduración adecuado, provee una herramienta alternativa que potencialmente puede ser utilizada para la eliminación de tumores establecidos.

ABREVIATURAS

Ac / Acs	Anticuerpo / Anticuerpos
Ag / Ags	Antígeno / Antígenos
APC	Célula Presentadora de Antígenos
BMCD	Célula Dendrítica derivada de médula ósea
CD	Células Dendríticas
CFSE	Carboxifluoresceína-diacetato-succinimidil-ester
CRD	Dominio de reconocimiento de carbohidratos
CTL	Linfocitos T citotóxicos
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
EDTA	Ácido etileno diamino tetra acético
FBS	Suero Fetal Bovino
FITC	Isotiocianato de Fluoresceína
GM-CSF	Factor Estimulador de Colonias de Granulocitos y Macrófagos
IFN- γ	Interferón gamma
IL	Interleucina
LC	Células de Langerhans
LN	Ganlio linfático
LPS	Lipopolisacáridos Bacterianos
MHC	Complejo Mayor de Histocompatibilidad
NK	Células Natural Killer
NKT	Célula T Natural Killer
PE	Ficoeritrina
PBS	Buffer fosfato
pCD	Célula dendrítica plasmocitoide
pLN	Ganglio linfático periférico
Th1	Linfocito T de ayuda de tipo 1
Th2	Linfocito T de ayuda de tipo 2
TCR	Receptor de Célula T
TLR	Receptor de tipo Toll
Treg	Célula T reguladora
TNF- α	Factor de Necrosis Tumoral
VEGF	Factor de crecimiento vascular

BIBLIOGRAFÍA

1. Rakhmilevich, A.L., North, R.J. & Dye, E.S. Presence of CD4⁺ T suppressor cells in mice rendered unresponsive to tumor antigens by intravenous injection of irradiated tumor cells. *Int. J. Cancer* **55**, 338-343 (1993).
2. Goldszmid, R.S. *et al.* Dendritic cells charged with apoptotic tumor cells induce long-lived protective CD4⁺ and CD8⁺ T cell immunity against B16 melanoma. *J. Immunol.* **171**, 5940-5947 (2003).
3. Dranoff, G. *et al.* Vaccination with irradiated tumor cells engineered to secrete murine granulocyte-macrophage colony-stimulating factor stimulates potent, specific, and long-lasting anti-tumor immunity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**, 3539-3543 (1993).
4. Charalambous, A., Oks, M., Nchinda, G., Yamazaki, S. & Steinman, R.M. Dendritic cell targeting of survivin protein in a xenogeneic form elicits strong CD4⁺ T cell immunity to mouse survivin. *J. Immunol.* **177**, 8410-8421 (2006).
5. Burnet, F.M. The concept of immunological surveillance. *Prog. Exp. Tumor Res.* **13**, 1-27 (1970).
6. Dunn, G.P., Bruce, A.T., Ikeda, H., Old, L.J. & Schreiber, R.D. Cancer immunoediting: from immunosurveillance to tumor escape. *Nat. Immunol.* **3**, 991-998 (2002).
7. Smyth, M.J., Godfrey, D.I. & Trapani, J.A. A fresh look at tumor immunosurveillance and immunotherapy. *Nat. Immunol.* **2**, 293-299 (2001).
8. Shankaran, V. *et al.* IFN γ and lymphocytes prevent primary tumour development and shape tumour immunogenicity. *Nature* **410**, 1107-1111 (2001).
9. Bach, E.A., Aguet, M. & Schreiber, R.D. The IFN gamma receptor: a paradigm for cytokine receptor signaling. *Annual review of immunology* **15**, 563-591 (1997).
10. Street, S.E., Cretney, E. & Smyth, M.J. Perforin and interferon-gamma activities independently control tumor initiation, growth, and metastasis. *Blood* **97**, 192-197 (2001).
11. Kaplan, D.H. *et al.* Demonstration of an interferon γ -dependent tumor surveillance system in immunocompetent mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**, 7556-7561 (1998).
12. Street, S.E., Trapani, J.A., MacGregor, D. & Smyth, M.J. Suppression of lymphoma and epithelial malignancies effected by interferon gamma. *J. Exp. Med.* **196**, 129-134 (2002).
13. Smyth, M.J. *et al.* Sequential activation of NKT cells and NK cells provides effective innate immunotherapy of cancer. *J. Exp. Med.* **201**, 1973-1985 (2005).
14. Van Den Broek, M.F. *et al.* Decreased tumor surveillance in perforin-deficient mice. *J. Exp. Med.* **184**, 1781-1790 (1996).
15. Smyth, M.J. *et al.* Perforin-mediated Cytotoxicity Is Critical for Surveillance of Spontaneous Lymphoma. *J. Exp. Med.* **192**, 755-760 (2000).
16. Dunn, G.P., Old, L.J. & Schreiber, R.D. The immunobiology of cancer immunosurveillance and immunoediting. *Immunity* **21**, 137-148 (2004).
17. Loeb, L.A. A mutator phenotype in cancer. *Cancer Res.* **61**, 3230-3239 (2001).
18. Loeb, L.A., Loeb, K.R. & Anderson, J.P. Multiple mutations and cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **100**, 776-781 (2003).
19. Lengauer, C., Kinzler, K.W. & Vogelstein, B. Genetic instabilities in human cancers. *Nature* **396**, 643-649 (1998).

20. Steinman, R.M. & Mellman, I. Immunotherapy: bewitched, bothered, and bewildered no more. *Science* **305**, 197-200 (2004).
21. Ray, P.K., Poduval, T.B. & Sundaram, K. Antitumor immunity, V.BCG-induced growth inhibition of murine tumors. Effect of hydrocortisone, antiserum against theta antigen, and gamma-irradiated BCG. *J. Natl. Cancer Inst.* **58**, 763-767 (1977).
22. Woodruff, M.F. & Boak, J.L. Inhibitory effect of injection of *Corynebacterium parvum* on the growth of tumour transplants in isogenic hosts. *Br. J. Cancer* **20**, 345-355 (1966).
23. Vermorken, J.B. *et al.* Phase I study of high-dose epirubicin in platinum-pretreated patients with ovarian carcinoma. *Oncology* **57**, 10-16 (1999).
24. Sinniah, D., White, J.C., Omar, A. & Chua, C.P. Acute leukemia in Malaysian children. *Cancer* **42**, 1970-1975 (1978).
25. Gillissen, S. *et al.* CD1d-restricted T cells regulate dendritic cell function and antitumor immunity in a granulocyte-macrophage colony-stimulating factor-dependent fashion. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **100**, 8874-8879 (2003).
26. Cui, J. *et al.* Requirement for Valpha14 NKT cells in IL-12-mediated rejection of tumors. *Science* **278**, 1623-1626 (1997).
27. Townsend, A.R.M., Gotch, F.M. & Davey, J. Cytotoxic T cells recognize fragments of the influenza nucleoprotein. *Cell* **42**, 457-467 (1985).
28. Boon, T., Cerottini, J.-C., Van Der Bruggen, P. & Van Pel, A. Tumor antigens recognized by T lymphocytes. *Annual review of immunology* **12**, 337-365 (1994).
29. Rosenberg, S.A. Cancer vaccines based on the identification of genes encoding cancer regression antigens. *Immunol. Today* **18**, 175-182 (1997).
30. Pardoll, D.M. Cancer vaccines. *Nat. Med.* **4**, 525-531 (1998).
31. Gilboa, E. The makings of a tumor rejection antigen. *Immunity* **11**, 263-270 (1999).
32. Finn, O.J. Cancer vaccines: between the idea and the reality. *Nat. Rev. Immunol.* **3**, 630-641 (2003).
33. Davis, I.D., Jefford, M., Parente, P. & Cebon, J. Rational approaches to human cancer immunotherapy. *J. Leukoc. Biol.* **73**, 3-29 (2003).
34. Antonia, S., Mule, J.J. & Weber, J.S. Current developments of immunotherapy in the clinic. *Curr. Opin. Immunol.* **16**, 130-136 (2004).
35. Hsueh, E.C. & Morton, D.L. Antigen-based immunotherapy of melanoma: Canvaxin therapeutic polyvalent cancer vaccine. *Semin. Cancer Biol.* **13**, 401-407 (2003).
36. Steinman, R.M., Hawiger, D. & Nussenzweig, M.C. Tolerogenic dendritic cells. *Annual review of immunology* **21**, 685-711 (2003).
37. Steinman, R.M. & Dhodapkar, M. Active immunization against cancer with dendritic cells: the near future. *Int. J. Cancer* **94**, 459-473 (2001).
38. Banchereau, J. *et al.* Immunobiology of dendritic cells. *Annual review of immunology* **18**, 767-811 (2000).
39. Caux, C. *et al.* CD34⁺ hematopoietic progenitors from human cord blood differentiate along two independent dendritic cell pathways in response to granulocyte-macrophage colony-stimulating factor plus tumor necrosis factor α . *Blood* **90**, 1458-1470 (1997).
40. Jego, G. *et al.* Plasmacytoid dendritic cells induce plasma cell differentiation through type I interferon and interleukin 6. *Immunity* **19**, 225-234 (2003).

41. Fernandez, N.C. *et al.* Dendritic cells directly trigger NK cell functions: cross-talk relevant in innate anti-tumor immune responses in vivo. *Nat. Med.* **5**, 405-411 (1999).
42. Kadowaki, N. *et al.* Distinct cytokine profiles of neonatal natural killer T cells after expansion with subsets of dendritic cells. *J. Exp. Med.* **193**, 1221-1226 (2001).
43. Steinman, R.M. & Cohn, Z.A. Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. II. Functional properties in vitro. *J. Exp. Med.* **139**, 380-397 (1974).
44. Kondo, M., Weissman, I.L. & Akashi, K. Identification of clonogenic common lymphoid progenitors in mouse bone marrow. *Cell* **91**, 661-672 (1997).
45. Akashi, K., Traver, D., Miyamoto, T. & Weissman, I.L. A clonogenic common myeloid progenitor that gives rise to all myeloid lineages. *Nature* **404**, 193-197 (2000).
46. Traver, D. *et al.* Development of CD8 α -positive dendritic cells from a common myeloid progenitor. *Science* **290**, 2152-2154 (2000).
47. Manz, M.G., Traver, D., Miyamoto, T., Weissman, I.L. & Akashi, K. Dendritic cell potentials of early lymphoid and myeloid progenitors. *Blood* **97**, 3333-3341 (2001).
48. Inaba, K. *et al.* Generation of large numbers of dendritic cells from mouse bone marrow cultures supplemented with granulocyte/macrophage colony-stimulating factor. *J. Exp. Med.* **176**, 1693-1702 (1992).
49. Inaba, K., Schuler, G. & Steinman, R.M. GM-CSF: A granulocyte/macrophage/dendritic cell stimulating factor., in *Hemopoietic growth factors and mononuclear phagocytes*. (ed. R. van Furth) 187-196 (S.Karger, Basel; 1993).
50. Asselin-Paturel, C., Brizard, G., Pin, J.J., Briere, F. & Trinchieri, G. Mouse strain differences in plasmacytoid dendritic cell frequency and function revealed by a novel monoclonal antibody. *J. Immunol.* **171**, 6466-6477 (2003).
51. Dakic, A. *et al.* Development of the dendritic cell system during mouse ontogeny. *J. Immunol.* **172**, 1018-1027 (2004).
52. Henri, S. *et al.* The dendritic cell populations of mouse lymph nodes. *J. Immunol.* **167**, 741-748 (2001).
53. Ruedl, C., Koebel, P., Bachmann, M., Hess, M. & Karjalainen, K. Anatomical origin of dendritic cells determines their life span in peripheral lymph nodes. *J. Immunol.* **165**, 4910-4916 (2000).
54. Wilson, N.S. *et al.* Most lymphoid organ dendritic cell types are phenotypically and functionally immature. *Blood* **102**, 2187-2194 (2003).
55. Itano, A.A. *et al.* Distinct dendritic cell populations sequentially present antigen to CD4 T cells and stimulate different aspects of cell-mediated immunity. *Immunity* **19**, 47-57 (2003).
56. Shortman, K. & Liu, Y.-J. Mouse and human dendritic cell subtypes. *Nat. Rev. Immunol.* **2**, 151-161 (2002).
57. Metlay, J.P. *et al.* The distinct leukocyte integrins of mouse spleen dendritic cells as identified with new hamster monoclonal antibodies. *J. Exp. Med.* **171**, 1753-1771 (1990).
58. Vremec, D., Pooley, J., Hochrein, H., Wu, L. & Shortman, K. CD4 and CD8 expression by dendritic cell subtypes in mouse thymus and spleen. *J. Immunol.* **164**, 2978-2986 (2000).

59. Douillard, P. *et al.* Mouse lymphoid tissue contains distinct subsets of langerin/CD207 dendritic cells, only one of which represents epidermal-derived Langerhans cells. *J. Invest. Dermatol.* **125**, 983-994 (2005).
60. Kissenpfennig, A. *et al.* Dynamics and function of Langerhans cells in vivo dermal dendritic cells colonize lymph node areas distinct from slower migrating Langerhans cells. *Immunity* **22**, 643-654 (2005).
61. Pulendran, B. *et al.* Developmental pathways of dendritic cells in vivo: distinct function, phenotype, and localization of dendritic cell subsets in FLT3 ligand-treated mice. *J. Immunol.* **159**, 2222-2231 (1997).
62. Nakano, H., Yanagita, M. & Gunn, M.D. Cd11c(+)b220(+)gr-1(+) cells in mouse lymph nodes and spleen display characteristics of plasmacytoid dendritic cells. *J. Exp. Med.* **194**, 1171-1178 (2001).
63. Asselin-Paturel, C. *et al.* Mouse type I IFN-producing cells are immature APCs with plasmacytoid morphology. *Nat. Immunol.* **2**, 1144-1150 (2001).
64. Bjorck, P. Isolation and characterization of plasmacytoid dendritic cells from Flt3 ligand and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor- treated mice. *Blood* **98**, 3520-3526 (2001).
65. O'Keeffe, M. *et al.* Mouse plasmacytoid cells: long-lived cells, heterogeneous in surface phenotype and function, that differentiate into CD8⁺ dendritic cells only after microbial stimulus. *J. Exp. Med.* **196**, 1307-1319 (2002).
66. Cella, M. *et al.* Plasmacytoid monocytes migrate to inflamed lymph nodes and produce large amounts of type I interferon. *Nat. Med.* **5**, 919-923 (1999).
67. Siegal, F.P. *et al.* The nature of the principal type 1 interferon-producing cells in human blood. *Science* **284**, 1835-1837 (1999).
68. Chan, C.W. *et al.* Interferon-producing killer dendritic cells provide a link between innate and adaptive immunity. *Nat. Med.* **12**, 207-213 (2006).
69. Taieb, J. *et al.* A novel dendritic cell subset involved in tumor immunosurveillance. *Nat. Med.* **12**, 214-219 (2006).
70. Iyoda, T. *et al.* The CD8⁺ dendritic cell subset selectively endocytoses dying cells in culture and in vivo. *J. Exp. Med.* **195**, 1289-1302 (2002).
71. Suss, G. & Shortman, K. A subclass of dendritic cells kills CD4 T cells via Fas/Fas-ligand induced apoptosis. *J. Exp. Med.* **183**, 1789-1796 (1996).
72. Grohmann, U. *et al.* CD40 ligation ablates the tolerogenic potential of lymphoid dendritic cells. *J. Immunol.* **166**, 277-283 (2001).
73. Kronin, V. *et al.* A subclass of dendritic cells regulates the response of naive CD8 T cells by limiting their IL-2 production. *J. Immunol.* **157**, 3819-3827 (1996).
74. Hawiger, D. *et al.* Dendritic cells induce peripheral T cell unresponsiveness under steady state conditions in vivo. *J. Exp. Med.* **194**, 769-780 (2001).
75. Pulendran, B. *et al.* Distinct dendritic cell subsets differentially regulate the class of immune responses in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**, 1036-1041 (1999).
76. Maldonado-Lopez, R. *et al.* Role of CD8 α ⁺ and CD8 α ⁻ dendritic cells in the induction of primary immune responses *in vivo*. *J. Leukoc. Biol.* **66**, 242-246 (1999).
77. Stumbles, P.A. *et al.* Resting respiratory tract dendritic cells preferentially stimulate T helper cell type 2 (Th2) responses and require obligatory cytokine signals for induction of Th1 immunity. *J. Exp. Med.* **188**, 2019-2031 (1998).
78. Iwasaki, A. & Kelsall, B.L. Freshly isolated Peyer's Patch, but not spleen, dendritic cells produce interleukin 10 and induce the differentiation of T helper type 2 cells. *J. Exp. Med.* **190**, 229-240 (1999).

79. Colonna, M., Krug, A. & Cella, M. Interferon-producing cells: on the front line in immune responses against pathogens. *Current opinion in immunology* **14**, 373-379. (2002).
80. Akira, S., Takeda, K. & Kaisho, T. Toll-like receptors: critical proteins linking innate and acquired immunity. *Nat. Immunol.* **2**, 675-680 (2001).
81. Fanger, N.A., Wardwell, K., Shen, L., Tedder, T.F. & Guyre, P.M. Type 1 [CD64] and type 11 [CD32] Fc gamma receptor-mediated phagocytosis by human blood dendritic cells. *J. Immunol.* **157**, 541-548 (1996).
82. Reis e Sousa, C., Stahl, P.D. & Austyn, J.M. Phagocytosis of antigens by Langerhans cells in vitro. *J. Exp. Med.* **178**, 509-519 (1993).
83. Basu, S., Binder, R.J., Ramalingam, T. & Srivastava, P.K. CD91 is a common receptor for heat shock proteins gp96, hsp90, hsp70, and calreticulin. *Immunity* **14**, 303-313 (2001).
84. Platt, N., Suzuki, H., Kurihara, Y., Kodama, T. & Gordon, S. Role for the class A macrophage scavenger receptor in the phagocytosis of apoptotic thymocytes in vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**, 12456-12460 (1996).
85. Platt, E.J., Wehrly, K., Kuhmann, S.E., Chesebro, B. & Kabat, D. Effects of CCR5 and CD4 cell surface concentrations on infections by macrophagetropic isolates of human immunodeficiency virus type 1. *J. Virol.* **72**, 2855-2864 (1998).
86. Sallusto, F., Cella, M., Danieli, C. & Lanzavecchia, A. Dendritic cells use macropinocytosis and the mannose receptor to concentrate antigen in the major histocompatibility class II compartment. Downregulation by cytokines and bacterial products. *J. Exp. Med.* **182**, 389-400 (1995).
87. Albert, M.L. *et al.* Immature dendritic cells phagocytose apoptotic cells via $\alpha_v\beta_5$ and CD36, and cross-present antigens to cytotoxic T lymphocytes. *J. Exp. Med.* **188**, 1359-1368 (1998).
88. Shaif-Muthana, M., McIntyre, C., Sisley, K., Rennie, I. & Murray, A. Dead or alive: immunogenicity of human melanoma cells when presented by dendritic cells. *Cancer Res.* **60**, 6441-6447 (2000).
89. Russo, V. *et al.* Dendritic cells acquire the MAGE-3 human tumor antigen from apoptotic cells and induce a class I-restricted T cell response. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**, 2185-2190 (2000).
90. Berard, F. *et al.* Cross-priming of naive CD8 T cells against melanoma antigens using dendritic cells loaded with killed allogeneic melanoma cells. *J. Exp. Med.* **192**, 1535-1544 (2000).
91. Sauter, B. *et al.* Consequences of cell death. Exposure to necrotic tumor cells, but not primary tissue cells or apoptotic cells, induces the maturation of immunostimulatory dendritic cells. *J. Exp. Med.* **191**, 423-434 (2000).
92. Albert, M.L., Kim, J.I. & Birge, R.B. $\alpha_v\beta_5$ integrin recruits the CrkII-Dock180-rac1 complex for phagocytosis of apoptotic cells. *Nat. Cell Biol.* **2**, 899-905 (2000).
93. Scott, R.S. *et al.* Phagocytosis and clearance of apoptotic cells is mediated by MER. *Nature* **411**, 207-211 (2001).
94. Fadok, V.A., Bratton, D.L. & Henson, P.M. Phagocyte receptors for apoptotic cells: recognition, uptake, and consequences. *J. Clin. Invest.* **108**, 957-962 (2001).
95. Steinman, R.M., Turley, S., Mellman, I. & Inaba, K. The induction of tolerance by dendritic cells that have captured apoptotic cells. *J. Exp. Med.* **191**, 411-416 (2000).

96. Wilson, N.S., El-Sukkari, D. & Villadangos, J.A. Dendritic cells constitutively present self antigens in their immature state in vivo and regulate antigen presentation by controlling the rates of MHC class II synthesis and endocytosis. *Blood* **103**, 2187-2195 (2004).
97. Jonuleit, H. *et al.* Induction of tumor peptide-specific cytotoxic T cells under serum-free conditions by mature human dendritic cells. *Arch. Dermatol. Res.* **292**, 325-332 (2000).
98. Wintergerst, E., Manz-Keinke, H., Plattner, H. & Schlepper-Schafer, J. The interaction of a lung surfactant protein (SP-A) with macrophages is mannose dependent. *European journal of cell biology* **50**, 291-298 (1989).
99. Mahnke, K. *et al.* The dendritic cell receptor for endocytosis, DEC-205, can recycle and enhance antigen presentation via major histocompatibility complex class II-positive lysosomal compartments. *J. Cell Biol.* **151**, 673-683 (2000).
100. Bonifacino, J.S. & Dell'Angelica, E.C. Molecular bases for the recognition of tyrosine-based sorting signals. *J. Cell Biol.* **145**, 923-926 (1999).
101. Valladeau, J. *et al.* Langerin, a novel C-type lectin specific to Langerhans cells, is an endocytic receptor that induces the formation of Birbeck granules. *Immunity* **12**, 71-81 (2000).
102. Valladeau, J. *et al.* Identification of mouse langerin/CD207 in Langerhans cells and some dendritic cells of lymphoid tissues. *J. Immunol.* **168**, 782-792 (2002).
103. Albert, M.L. & Bhardwaj, N. Resurrecting the dead: DCs cross-present antigen derived from apoptotic cells on MHC I. *The Immunologist* **6**, 194-198 (1998).
104. Cella, M., Engering, A., Pinet, V., Pieters, J. & Lanzavecchia, A. Inflammatory stimuli induce accumulation of MHC class II complexes on dendritic cells. *Nature* **388**, 782-787 (1997).
105. Sharpe, A.H. & Freeman, G.J. The B7-CD28 superfamily. *Nat. Rev. Immunol.* **2**, 116-126 (2002).
106. Sallusto, F. *et al.* Distinct patterns and kinetics of chemokine production regulate dendritic cell function. *Eur. J. Immunol.* **29**, 1617-1625 (1999).
107. Sallusto, F. *et al.* Rapid and coordinated switch in chemokine receptor expression during dendritic cell maturation. *Eur. J. Immunol.* **28**, 2760-2769 (1998).
108. Rescigno, M. *et al.* Bacteria-induced neo-biosynthesis, stabilization, and surface expression of functional class I molecules in mouse dendritic cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**, 5229-5234 (1998).
109. Yewdell, J. *et al.* Generating MHC class I ligands from viral gene products. *Immunol. Rev.* **172**, 97-108 (1999).
110. Watts, C. Capture and processing of exogenous antigens for presentation on molecules. *Annu Rev Immunol* **15**, 821-850 (1997).
111. Carbone, F.R., Kurts, C., Bennett, S.R., Miller, J.F. & Heath, W.R. Cross-presentation: a general mechanism for CTL immunity and tolerance. *Immunology today* **19**, 368-373 (1998).
112. Sieling, P.A. *et al.* CD1-restricted T cell recognition of microbial lipoglycan antigens. *Science* **269**, 227-230 (1995).
113. Zeng, Z.-H. *et al.* Crystal structure of mouse CD1: an MHC-like fold with a large hydrophobic binding groove. *Science* **277**, 339-345 (1997).
114. Kawano, T. *et al.* CD1d-restricted and TCR-mediated activation of V α 14 NKT cells by glycosylceramides. *Science* **278**, 1626-1629 (1997).

115. Brossay, L. *et al.* CD1d-mediated recognition of an α -galactosylceramide by natural killer T Cells is highly conserved through mammalian evolution. *J. Exp. Med.* **188**, 1521-1528 (1998).
116. Spada, F.M., Koezuka, Y. & Porcelli, S.A. CD1d-restricted recognition of synthetic glycolipid antigens by human natural killer T cells. *J. Exp. Med.* **188**, 1529-1534 (1998).
117. Kawano, T. *et al.* Antitumor cytotoxicity mediated by ligand-activated human V α 24 NKT cells. *Canc. Res.* **59**, 5102-5105 (1999).
118. Curtsinger, J.M., Lins, D.C. & Mescher, M.F. Signal 3 determines tolerance versus full activation of naive CD8 T cells: dissociating proliferation and development of effector function. *J. Exp. Med.* **197**, 1141-1151 (2003).
119. Kapsenberg, M.L. Dendritic-cell control of pathogen-driven T-cell polarization. *Nat. Rev. Immunol.* **3**, 984-993 (2003).
120. Pulendran, B. Variegation of the immune response with dendritic cells and pathogen recognition receptors. *J. Immunol.* **174**, 2457-2465 (2005).
121. Sporri, R. & Reis, E.S.C. Newly activated T cells promote maturation of bystander dendritic cells but not IL-12 production. *J. Immunol.* **171**, 6406-6413 (2003).
122. Schulz, O. *et al.* CD40 triggering of heterodimeric IL-12 p70 production by dendritic cells in vivo requires a microbial priming signal. *Immunity* **13**, 453-462 (2000).
123. Martin-Fontecha, A. *et al.* Induced recruitment of NK cells to lymph nodes provides IFN- γ for T_H1 priming. *Nat. Immunol.* **5**, 1260-1265 (2004).
124. Whelan, M. *et al.* A filarial nematode-secreted product signals dendritic cells to acquire a phenotype that drives development of Th2 cells. *J. Immunol.* **164**, 6453-6460 (2000).
125. MacDonald, A.S., Straw, A.D., Bauman, B. & Pearce, E.J. CD8⁻ dendritic cell activation status plays an integral role in influencing Th2 response development. *J. Immunol.* **167**, 1982-1988 (2001).
126. Amsen, D. *et al.* Instruction of distinct CD4 T helper cell fates by different notch ligands on antigen-presenting cells. *Cell* **117**, 515-526 (2004).
127. Mahnke, K. *et al.* Targeting of antigens to activated dendritic cells in vivo cures metastatic melanoma in mice. *Cancer Res.* **65**, 7007-7012 (2005).
128. Veldhoen, M., Hocking, R.J., Atkins, C.J., Locksley, R.M. & Stockinger, B. TGF β in the context of an inflammatory cytokine milieu supports de novo differentiation of IL-17-producing T cells. *Immunity* **24**, 179-189 (2006).
129. Steinman, R.M. & Nussenzweig, M.C. Avoiding horror autotoxicus: the importance of dendritic cells in peripheral T cell tolerance. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **99**, 351-358 (2002).
130. Anderson, M.S. *et al.* Projection of an immunological self shadow within the thymus by the aire protein. *Science* **298**, 1395-1401 (2002).
131. Anderson, M.S. *et al.* The cellular mechanism of aire control of T cell tolerance. *Immunity* **23**, 227-239 (2005).
132. Piccirillo, C.A. & Shevach, E.M. Naturally-occurring CD4⁺CD25⁺ immunoregulatory T cells: central players in the arena of peripheral tolerance. *Seminars in immunology* **16**, 81-88 (2004).
133. Jonuleit, H., Schmitt, E., Schuler, G., Knop, J. & Enk, A.H. Induction of interleukin 10-producing, nonproliferating CD4⁺ T cells with regulatory properties by repetitive stimulation with allogeneic immature human dendritic cells. *J. Exp. Med.* **192**, 1213-1222 (2000).

134. Dhodapkar, M.V., Steinman, R.M., Krasovsky, J., Munz, C. & Bhardwaj, N. Antigen specific inhibition of effector T cell function in humans after injection of immature dendritic cells. *J. Exp. Med.* **193**, 233-238 (2001).
135. Albert, M.L., Jegathesan, M. & Darnell, R.B. Dendritic cell maturation is required for the cross-tolerization of CD8⁺ T cells. *Nat. Immunol.* **2**, 1010-1017 (2001).
136. Menges, M. *et al.* Repetitive injections of dendritic cells matured with tumor necrosis factor α induce antigen-specific protection of mice from autoimmunity. *J. Exp. Med.* **195**, 15-22 (2002).
137. Perez, V.L. *et al.* Induction of peripheral T cell tolerance in vivo requires CTLA-4 engagement. *Immunity* **6**, 411-417 (1997).
138. Probst, H.C., McCoy, K., Okazaki, T., Honjo, T. & van den Broek, M. Resting dendritic cells induce peripheral CD8⁺ T cell tolerance through PD-1 and CTLA-4. *Nat. Immunol.* **6**, 280-286 (2005).
139. Fujii, S., Liu, K., Smith, C., Bonito, A.J. & Steinman, R.M. The linkage of innate to adaptive immunity via maturing dendritic cells in vivo requires CD40 ligation in addition to antigen presentation and CD80/86 costimulation. *J. Exp. Med.* **199**, 1607-1618 (2004).
140. Sporri, R. & Reis e Sousa, C. Inflammatory mediators are insufficient for full dendritic cell activation and promote expansion of CD4⁺ T cell populations lacking helper function. *Nat. Immunol.* **6**, 163-170 (2005).
141. Mayerova, D., Parke, E.A., Bursch, L.S., Odumade, O.A. & Hogquist, K.A. Langerhans cells activate naive self-antigen-specific CD8 T cells in the steady state. *Immunity* **21**, 391-400 (2004).
142. Keir, M.E. & Sharpe, A.H. The B7/CD28 costimulatory family in autoimmunity. *Immunological reviews* **204**, 128-143 (2005).
143. Pentcheva-Hoang, T., Egen, J.G., Wojnoonski, K. & Allison, J.P. B7-1 and B7-2 selectively recruit CTLA-4 and CD28 to the immunological synapse. *Immunity* **21**, 401-413 (2004).
144. Watts, T.H. TNF/TNFR family members in costimulation of T cell responses. *Annual review of immunology* **23**, 23-68 (2005).
145. Janeway, C.A., Jr. & Medzhitov, R. Introduction: the role of innate immunity in the adaptive immune response. *Seminars in immunology* **10**, 349-350 (1998).
146. Takeda, K., Kaisho, T. & Akira, S. Toll-like receptors. *Annual review of immunology* **21**, 335-376 (2003).
147. Heil, F. *et al.* Species-specific recognition of single-stranded RNA via toll-like receptor 7 and 8. *Science* **303**, 1526-1529 (2004).
148. Diebold, S.S., Kaisho, T., Hemmi, H., Akira, S. & Reis, E.S.C. Innate antiviral responses by means of TLR7-mediated recognition of single-stranded RNA. *Science* **303**, 1529-1531 (2004).
149. Lund, J.M. *et al.* Recognition of single-stranded RNA viruses by Toll-like receptor 7. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **101**, 5598-5603 (2004).
150. Iwasaki, A. & Medzhitov, R. Toll-like receptor control of the adaptive immune responses. *Nat. Immunol.* **5**, 987-995 (2004).
151. Lee, J. *et al.* Molecular basis for the immunostimulatory activity of guanine nucleoside analogs: Activation of Toll-like receptor 7. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **100**, 6646-6651 (2003).
152. Matsumoto, M. *et al.* Subcellular localization of toll-like receptor 3 in human dendritic cells. *J. Immunol.* **171**, 3154-3162 (2003).

153. Lund, J., Sato, A., Akira, S., Medzhitov, R. & Iwasaki, A. Toll-like receptor 9-mediated recognition of herpes simplex virus-2 by plasmacytoid dendritic cells. *J. Exp. Med.* **198**, 513-520 (2003).
154. Akira, S. & Takeda, K. Toll-like receptor signalling. *Nat. Rev. Immunol.* **4**, 499-511 (2004).
155. Jonuleit, H. *et al.* A comparison of two types of dendritic cells as adjuvants for the induction of melanoma-specific T cell responses in humans following intranodal injection. *Int. J. Canc.* **93**, 243-251 (2001).
156. Jonuleit, H. *et al.* Pro-inflammatory cytokines and prostaglandins induce maturation of potent immunostimulatory dendritic cells under fetal calf serum-free conditions. *Eur. J. Immunol.* **27**, 3135-3142 (1997).
157. Schnare, M. *et al.* Toll-like receptors control activation of adaptive immune responses. *Nat. Immunol.* **2**, 947-950 (2001).
158. Degli-Esposti, M.A. & Smyth, M.J. Close encounters of different kinds: dendritic cells and NK cells take centre stage. *Nat. Rev. Immunol.* **5**, 112-124 (2005).
159. Seya, T., Akazawa, T., Tsujita, T. & Matsumoto, M. Role of Toll-like receptors in adjuvant-augmented immune therapies. *Evid Based Complement Alternat Med* **3**, 31-38; discussion 133-137 (2006).
160. Ardavin, C., Amigorena, S. & Reis e Sousa, C. Dendritic cells: immunobiology and cancer immunotherapy. *Immunity* **20**, 17-23 (2004).
161. Zou, W. *et al.* Stromal-derived factor-1 in human tumors recruits and alters the function of plasmacytoid precursor dendritic cells. *Nat. Med.* **7**, 1339-1346 (2001).
162. Iwamoto, M. *et al.* Prognostic value of tumor-infiltrating dendritic cells expressing CD83 in human breast carcinomas. *International journal of cancer* **104**, 92-97 (2003).
163. Troy, A., Davidson, P., Atkinson, C. & Hart, D. Phenotypic characterisation of the dendritic cell infiltrate in prostate cancer. *J Urol* **160**, 214-219 (1998).
164. Troy, A.J., Summers, K.L., Davidson, P.J.T., Atkinson, C.H. & Derek, N.J. Minimal recruitment and activation of dendritic cells within renal cell carcinoma. *Clin. Cancer Res.* **4**, 585-593 (1998).
165. Kryczek, I. *et al.* CXCL12 and vascular endothelial growth factor synergistically induce neoangiogenesis in human ovarian cancers. *Cancer research* **65**, 465-472 (2005).
166. Gabrilovich, D.I. *et al.* Production of vascular endothelial growth factor by human tumors inhibits the functional maturation of dendritic cells. *Nat. Med.* **2**, 1096-1103 (1996).
167. Menetrier-Caux, G. *et al.* Inhibition of the differentiation of dendritic cells from CD34+ progenitors by tumor cells: role of interleukin-6 and macrophage colony-stimulating factor. *Blood* **92**, 4778-4791 (1998).
168. Wolff, H. *et al.* Expression of cyclooxygenase-2 in human lung carcinoma. *Cancer research* **58**, 4997-5001 (1998).
169. Joki, T. *et al.* Expression of cyclooxygenase 2 (COX-2) in human glioma and in vitro inhibition by a specific COX-2 inhibitor, NS-398. *Cancer research* **60**, 4926-4931 (2000).
170. Kalinski, P., Schuitemaker, J.H., Hilkens, C.M. & Kapsenberg, M.L. Prostaglandin E2 induces the final maturation of IL-12-deficient CD1a+CD83+ dendritic cells: the levels of IL-12 are determined during the final dendritic cell

- maturation and are resistant to further modulation. *J. Immunol.* **161**, 2804-2809 (1998).
171. Sombroek, C.C. *et al.* Prostanoids play a major role in the primary tumor-induced inhibition of dendritic cell differentiation. *J. Immunol.* **168**, 4333-4343 (2002).
 172. Beissert, S., Hosoi, J., Grabbe, S., Asahina, A. & Granstein, R.D. IL-10 inhibits tumor antigen presentation by epidermal antigen-presenting cells. *J. Immunol.* **154**, 1280-1286 (1995).
 173. Shurin, G.V. *et al.* Neuroblastoma-derived gangliosides inhibit dendritic cell generation and function. *Cancer research* **61**, 363-369 (2001).
 174. Peguet-Navarro, J. *et al.* Gangliosides from human melanoma tumors impair dendritic cell differentiation from monocytes and induce their apoptosis. *J. Immunol.* **170**, 3488-3494 (2003).
 175. Dhodapkar, M. *et al.* Rapid generation of broad T-cell immunity in humans after single injection of mature dendritic cells. *J. Clin. Invest.* **104**, 173-180 (1999).
 176. Curiel, T.J. *et al.* Peptides identified through phage display direct immunogenic antigen to dendritic cells. *J. Immunol.* **172**, 7425-7431 (2004).
 177. Choi, I.H. *et al.* Genomic organization and expression analysis of B7-H4, an immune inhibitory molecule of the B7 family. *J Immunol* **171**, 4650-4654 (2003).
 178. Curiel, T.J. *et al.* Specific recruitment of regulatory T cells in ovarian carcinoma fosters immune privilege and predicts reduced survival. *Nat. Med.* **10**, 942-949 (2004).
 179. Curiel, T.J. *et al.* Blockade of B7-H1 improves myeloid dendritic cell-mediated antitumor immunity. *Nat. Med.* **9**, 562-567 (2003).
 180. Iwai, Y. *et al.* Involvement of PD-L1 on tumor cells in the escape from host immune system and tumor immunotherapy by PD-L1 blockade. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **99**, 12293-12297 (2002).
 181. Read, S., Malmstrom, V. & Powrie, F. Cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 plays an essential role in the function of CD25⁺ CD4⁺ regulatory cells that control intestinal inflammation. *J. Exp. Med.* **192**, 295-302 (2000).
 182. Takahashi, T. *et al.* Immunologic self-tolerance maintained by CD25⁺ CD4⁺ regulatory T cells constitutively expressing cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4. *J. Exp. Med.* **192**, 303-310 (2000).
 183. Chambers, C.A., Kuhns, M.S., Egen, J.G. & Allison, J.P. CTLA-4-mediated inhibition in regulation of T cell responses: mechanisms and manipulation in tumor immunotherapy. *Annual review of immunology* **19**, 565-594 (2001).
 184. Munn, D.H. *et al.* Potential regulatory function of human dendritic cells expressing indoleamine 2,3-dioxygenase. *Science* **297**, 1867-1870 (2002).
 185. Uyttenhove, C. *et al.* Evidence for a tumoral immune resistance mechanism based on tryptophan degradation by indoleamine 2,3-dioxygenase. *Nat. Med.* **9**, 1269-1274 (2003).
 186. Shevach, E.M. Regulatory/suppressor T cells in health and disease. *Arthritis and rheumatism* **50**, 2721-2724 (2004).
 187. Shevach, E.M. CD4⁺CD25⁺ suppressor T cells: more questions than answers. *Nat. Rev. Immunol.* **2**, 389-400 (2002).
 188. Barrat, F.J. *et al.* In vitro generation of interleukin 10--producing regulatory CD4(+) T cells is induced by immunosuppressive drugs and inhibited by T helper type 1 (Th1)-- and Th2-inducing cytokines. *J. Exp. Med.* **195**, 603-616 (2002).

189. Groux, H. *et al.* A CD4⁺ T-cell subset inhibits antigen-specific T-cell responses and prevents colitis. *Nature* **389**, 737-742 (1997).
190. Woo, E.Y. *et al.* Regulatory CD4(+)CD25(+) T cells in tumors from patients with early- stage non-small cell lung cancer and late-stage ovarian cancer. *Cancer Res.* **61**, 4766-4772 (2001).
191. Woo, E.Y. *et al.* Cutting edge: Regulatory T cells from lung cancer patients directly inhibit autologous T cell proliferation. *J Immunol* **168**, 4272-4276 (2002).
192. Onizuka, S. *et al.* Tumor rejection by in vivo administration of anti-CD25 (interleukin-2 receptor α) monoclonal antibody. *Canc. Res.* **59**, 3128-3133 (1999).
193. Shimizu, J., Yamazaki, S. & Sakaguchi, S. Induction of tumor immunity by removing CD25⁺CD4⁺ T cells: A common basis between tumor immunity and autoimmunity. *J. Immunol.* **163**, 5211-5218 (1999).
194. Suttmuller, R.P. *et al.* Synergism of cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 blockade and depletion of CD25⁺ regulatory T cells in antitumor therapy reveals alternative pathways for suppression of autoreactive cytotoxic T lymphocyte responses. *J. Exp. Med.* **194**, 823-832 (2001).
195. Liu, K. *et al.* Innate NKT lymphocytes confer superior adaptive immunity via tumor-capturing dendritic cells. *J. Exp. Med.* **202**, 1507-1516 (2005).
196. Bonifaz, L.C. *et al.* In vivo targeting of antigens to maturing dendritic cells via the DEC-205 receptor improves T cell vaccination. *J. Exp. Med.* **199**, 815-824 (2004).
197. Lin, K.Y. *et al.* Treatment of established tumors with a novel vaccine that enhances major histocompatibility class II presentation of tumor antigen. *Cancer Res.* **56**, 21-26 (1996).
198. Guilloux, Y., Bai, X.F., Liu, X., Zheng, P. & Liu, Y. Optimal induction of effector but not memory antitumor cytotoxic T lymphocytes involves direct antigen presentation by the tumor cells. *Cancer Res.* **61**, 1107-1112 (2001).
199. Fidler, I.J. & Nicolson, G.L. Tumor cell and host properties affecting the implantation and survival of blood-borne metastatic variants of B16 melanoma. *Isr J Med Sci* **14**, 38-50 (1978).
200. Lutz, M.B. *et al.* An advanced culture method for generating large quantities of highly pure dendritic cells from mouse bone marrow. *J. Immunol. Meth.* **223**, 77-92 (1999).
201. Banchereau, J. & Palucka, A.K. Dendritic cells as therapeutic vaccines against cancer. *Nat. Rev. Immunol.* **5**, 296-306 (2005).
202. Valladeau, J. *et al.* Immature human dendritic cells express asialoglycoprotein receptor isoforms for efficient receptor-mediated endocytosis. *J. Immunol.* **167**, 5767-5774 (2001).
203. Banchereau, J. & Steinman, R.M. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature* **392**, 245-252 (1998).
204. Reddy, A., Sapp, M., Feldman, M., Subklewe, M. & Bhardwaj, N. A monocyte conditioned medium is more effective than defined cytokines in mediating the terminal maturation of human dendritic cells. *Blood* **90**, 3640-3646 (1997).
205. Jonuleit, H. *et al.* Infectious tolerance: human CD25⁺ regulatory T cells convey suppressor activity to conventional CD4⁺ T helper cells. *J. Exp. Med.* **196**, 255-260 (2002).

206. Alexopoulou, L., Holt, A.C., Medzhitov, R. & Flavell, R.A. Recognition of double-stranded RNA and activation of NF- κ B by Toll-like receptor 3. *Nature* **413**, 732-738 (2001).
207. Ardehna, K.M., Pizzey, A.R., Devereux, S. & Khwaja, A. The PI3 kinase, p38 SAP kinase, and NF-kappaB signal transduction pathways are involved in the survival and maturation of lipopolysaccharide-stimulated human monocyte-derived dendritic cells. *Blood* **96**, 1039-1046 (2000).
208. Gabrilovich, D.I., Nadaf, S., Corak, J., Berzofsky, J.A. & Carbone, D.P. Dendritic cells in antitumor immune responses. II. Dendritic cells grown from bone marrow precursors, but not mature DC from tumor-bearing mice, are effective antigen carriers in the therapy of established tumors. *Cell.Immunol.* **170**, 111-119 (1996).
209. Ishida, T., Oyama, T., Carbone, D.P. & Gabrilovich, D.I. Defective function of langerhans cells in tumor-bearing animals is the result of defective maturation from hemopoietic progenitors. *J. Immunol.* **161**, 4842-4851 (1998).
210. Enk, A.H., Jonuleit, H., Saloga, J. & Knop, J. Dendritic cells as mediators of tumor-induced tolerance in metastatic melanoma. *International journal of cancer* **73**, 309-316 (1997).
211. Nestle, F.O., Burg, G., Fah, J., Wrone-Smith, T. & Nickoloff, B.J. Human sunlight-induced basal-cell-carcinoma-associated dendritic cells are deficient in T cell co-stimulatory molecules and are impaired as antigen-presenting cells. *Am.J.Pathol.* **150**, 641-651 (1997).
212. Bonifaz, L. *et al.* Efficient targeting of protein antigen to the dendritic cell receptor DEC-205 in the steady state leads to antigen presentation on major histocompatibility complex class I products and peripheral CD8⁺ T cell tolerance. *J. Exp. Med.* **196**, 1627-1638 (2002).
213. Kerr, J.F.R., Wyllie, A.H. & Currie, A.R. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *British journal of cancer* **26**, 239 (1972).
214. Macatonia, S.E. *et al.* Dendritic cells produce IL-12 and direct the development of Th1 cells from naive CD4⁺ T cells. *J. Immunol.* **154**, 5071-5079 (1995).
215. Trinchieri, G. Interleukin-12 and the regulation of innate resistance and adaptive immunity. *Nat. Rev. Immunol.* **3**, 133-146 (2003).
216. Steinman, R.M. *et al.* Dendritic cell function in vivo during the steady state: a role in peripheral tolerance. *Ann. NY Acad. Sci.* **987**, 15-25 (2003).
217. Menetrier-Caux, C. *et al.* Inhibition of the differentiation of dendritic cells from CD34(+) progenitors by tumor cells: role of interleukin-6 and macrophage colony-stimulating factor. *Blood* **92**, 4778-4791 (1998).
218. Terabe, M. *et al.* Transforming growth factor- β production and myeloid cells are an effector mechanism through which CD1d-restricted T cells block cytotoxic T lymphocyte-mediated tumor immunosurveillance: abrogation prevents tumor recurrence. *J. Exp. Med.* **198**, 1741-1752 (2003).
219. Luft, T. *et al.* Functionally distinct dendritic cell (DC) populations induced by physiologic stimuli: prostaglandin E(2) regulates the migratory capacity of specific DC subsets. *Blood* **100**, 1362-1372 (2002).
220. Liyanage, U.K. *et al.* Prevalence of regulatory T cells is increased in peripheral blood and tumor microenvironment of patients with pancreas or breast adenocarcinoma. *J Immunol* **169**, 2756-2761 (2002).
221. Feuerer, M. *et al.* Bone marrow as a priming site for T-cell responses to blood-borne antigen. *Nat. Med.* **9**, 1151-1157 (2003).

-
222. Turk, M.J., Guevara-Patino, J.A., Rizzuto, G.A., Engelhorn, M.E. & Houghten, A.N. Concomitant tumor immunity to a poorly immunogenic melanoma is prevented by regulatory T cells. *J. Exp. Med.* **200**, 771-782 (2004).
223. Braun, D., Longman, R.S. & Albert, M.L. A two-step induction of indoleamine 2,3 dioxygenase (IDO) activity during dendritic-cell maturation. *Blood* **106**, 2375-2381 (2005).
224. Grohmann, U. *et al.* CTLA-4-Ig regulates tryptophan catabolism in vivo. *Nat. Immunol.* **3**, 1097-1101 (2002).
225. Taylor, M.W. & Feng, G.S. Relationship between interferon-gamma, indoleamine 2,3-dioxygenase, and tryptophan catabolism. *Faseb J* **5**, 2516-2522 (1991).
226. Frumento, G. *et al.* Tryptophan-derived catabolites are responsible for inhibition of T and natural killer cell proliferation induced by indoleamine 2,3-dioxygenase. *J. Exp. Med.* **196**, 459-468 (2002).
227. Mellor, A.L. & Munn, D.H. Tryptophan catabolism and regulation of adaptive immunity. *J. Immunol.* **170**, 5809-5813 (2003).
228. Terness, P. *et al.* Inhibition of allogeneic T cell proliferation by indoleamine 2,3-dioxygenase-expressing dendritic cells: mediation of suppression by tryptophan metabolites. *J. Exp. Med.* **196**, 447-457 (2002).
229. Chen, T.C., Cobbold, S.P., Fairchild, P.J. & Waldmann, H. Generation of anergic and regulatory T cells following prolonged exposure to a harmless antigen. *J. Immunol.* **172**, 5900-5907 (2004).
230. Freedman, R.S., Deavers, M., Liu, J. & Wang, E. Peritoneal inflammation - A microenvironment for Epithelial Ovarian Cancer (EOC). *J Transl Med* **2**, 23 (2004).
231. Kryczek, I., Grybos, M., Karabon, L., Klimczak, A. & Lange, A. IL-6 production in ovarian carcinoma is associated with histiotype and biological characteristics of the tumour and influences local immunity. *British journal of cancer* **82**, 621-628 (2000).
232. Oshiumi, H., Matsumoto, M., Funami, K., Akazawa, T. & Seya, T. TICAM-1, an adaptor molecule that participates in Toll-like receptor 3-mediated interferon- β induction. *Nat. Immunol.* **4**, 161-167 (2003).
233. Pasare, C. & Medzhitov, R. Toll pathway-dependent blockade of CD4⁺CD25⁺ T cell-mediated suppression by dendritic cells. *Science* **299**, 1033-1036 (2003).
234. Tsan, M.F. Toll-like receptors, inflammation and cancer. *Semin Cancer Biol* **16**, 32-37 (2006).
235. Wang, S. *et al.* Tumor evasion of the immune system: inhibiting p38 MAPK signaling restores the function of dendritic cells in multiple myeloma. *Blood* **107**, 2432-2439 (2006).
236. Greisman, S.E., Young, E.J. & Woodward, W.E. Mechanisms of endotoxin tolerance. IV. Specificity of the pyrogenic refractory state during continuous intravenous infusions of endotoxin. *The Journal of experimental medicine* **124**, 983-1000 (1966).
237. Matzinger, P. The danger model: a renewed sense of self. *Science* **296**, 301-305 (2002).
238. Smith, C. & Cerundolo, V. Immunotherapy of melanoma. *Immunology* **104**, 1-7 (2001).
239. Hokey, D.A., Larregina, A.T., Erdos, G., Watkins, S.C. & Falo, L.D., Jr. Tumor cell loaded type-1 polarized dendritic cells induce Th1-mediated tumor immunity. *Cancer research* **65**, 10059-10067 (2005).

-
240. Wang, Z., Marincola, F.M., Rivoltini, L., Parmiani, G. & Ferrone, S. Selective Histocompatibility Leukocyte Antigen (HLA)-A2 Loss Caused by Aberrant Pre-mRNA Splicing in 624MEL28 Melanoma Cells. *J. Exp. Med.* **190**, 205-216 (1999).
241. Pardoll, D.M. & Topalian, S.L. The role of CD4⁺ T cell responses in antitumor immunity. *Curr. Opin. Immunol.* **10**, 588-594 (1998).
242. Toes, R.E., Ossendorp, F., Offringa, R. & Melief, C.J. CD4 T cells and their role in antitumor immune responses. *J. Exp. Med.* **189**, 753-756 (1999).
243. Wang, R.F. The role of MHC class II-restricted tumor antigens and CD4⁺ T cells in antitumor immunity. *Trends Immunol.* **22**, 269-276 (2001).
244. Janssen, E.M. *et al.* CD4⁺ T cells are required for secondary expansion and memory in CD8⁺ T lymphocytes. *Nature* **421**, 852-856 (2003).
245. Sun, J.C. & Bevan, M.J. Defective CD8 T cell memory following acute infection without CD4 T cell help. *Science* **300**, 339-342 (2003).
246. Shedlock, D.J. & Shen, H. Requirement for CD4 T cell help in generating functional CD8 T cell memory. *Science* **300**, 337-339 (2003).
247. Gilboa, E. The promise of cancer vaccines. *Nat. Rev. Cancer* **4**, 401-411 (2004).
248. Feltkamp, M.C. *et al.* Vaccination with cytotoxic T lymphocyte epitope-containing peptide protects against a tumor induced by human papillomavirus type 16-transformed cells. *European journal of immunology* **23**, 2242-2249 (1993).
249. Tindle, R.W., Zhou, W.D., Saul, A. & Frazer, I.H. The molecular specificity of linear B-epitopes in the E7 open reading frame protein of human papillomavirus 16 defined by monoclonal antibodies. *Peptide research* **3**, 162-166 (1990).
250. Regnault, A. *et al.* Fcγ receptor-mediated induction of dendritic cell maturation and major histocompatibility complex class I-restricted antigen presentation after immune complex internalization. *J. Exp. Med.* **189**, 371-380 (1999).
251. Rodriguez, A., Regnault, A., Kleijmeer, M., Ricciardi-Castagnoli, P. & Amigorena, S. Selective transport of internalized antigens to the cytosol for MHC class I presentation in dendritic cells. *Nat. Cell Biol.* **1**, 362-368 (1999).
252. Kwon, D.S., Gregario, G., Bitton, N., Hendrickson, W.A. & Littman, D.R. DC-SIGN mediated internalization of HIV is required for *trans*-enhancement of T cell infection. *Immunity* **16**, 135-144 (2002).
253. Engering, A., Van Vliet, S.J., Geijtenbeek, T.B. & Van Kooyk, Y. Subset of DC-SIGN(+) dendritic cells in human blood transmits HIV-1 to T lymphocytes. *Blood* **100**, 1780-1786 (2002).
254. Dzionek, A. *et al.* BDCA-2, a novel plasmacytoid dendritic cell-specific type II C-type lectin, mediates antigen-capture and is a potent inhibitor of interferon-α/β induction. *J. Exp. Med.* **194**, 1823-1834 (2001).
255. Jiang, W. *et al.* The receptor DEC-205 expressed by dendritic cells and thymic epithelial cells is involved in antigen processing. *Nature* **375**, 151-155 (1995).
256. Kraal, G. & Janse, M. Marginal metallophilic cells of the mouse spleen identified by a monoclonal antibody. *Immunology* **58**, 665-669 (1986).
257. Hawiger, D., Masilamani, R.F., Bettelli, E., Kuchroo, V.K. & Nussenzweig, M.C. Immunological unresponsiveness characterized by increased expression of CD5 on peripheral T cells induced by dendritic cells *in vivo*. *Immunity* **20**, 695-705 (2004).
258. Ahonen, C.L. *et al.* Combined TLR and CD40 triggering induces potent CD8⁺ T cell expansion with variable dependence on type I IFN. *J. Exp. Med.* **199**, 775-784 (2004).

-
259. Pulendran, B. Modulating vaccine responses with dendritic cells and toll-like receptors. *Immunol. Rev.* **199**, 227-250 (2004).
260. Moser, M. & Murphy, K.M. Dendritic cell regulation of TH1-TH2 development. *Nat. Immunol.* **1**, 199-205 (2000).
261. Overwijk, W.W. *et al.* Tumor regression and autoimmunity after reversal of a functionally tolerant state of self-reactive CD8⁺ T cells. *J. Exp. Med.* **198**, 569-580 (2003).
262. Cui, Z. & Huang, L. Liposome-polycation-DNA (LPD) particle as a carrier and adjuvant for protein-based vaccines: therapeutic effect against cervical cancer. *Cancer Immunol Immunother* **54**, 1180-1190 (2005).
263. Zwaveling, S. *et al.* Established human papillomavirus type 16-expressing tumors are effectively eradicated following vaccination with long peptides. *J Immunol* **169**, 350-358 (2002).
264. Trumpheller, C. *et al.* Intensified and protective CD4⁺ T cell immunity at a mucosal surface after a single dose of anti-dendritic cell HIV gag fusion antibody vaccine. *J. Exp. Med.* **203**, 607-617 (2006).
265. de Saint-Vis, B. *et al.* A novel lysosome-associated membrane glycoprotein, DC-LAMP, induced upon DC maturation, is transiently expressed in MHC class II compartment. *Immunity* **9**, 325-336 (1998).
266. Valladeau, J. *et al.* The monoclonal antibody DCGM4 recognizes Langerin, a protein specific of Langerhans cells, and is rapidly internalized from the cell surface. *Eur. J. Immunol.* **29**, 2695-2704 (1999).
267. Takahara, K. *et al.* Identification and expression of mouse Langerin (CD207) in dendritic cells. *Int. Immunol.* **14**, 433-444 (2002).
268. Ohl, L. *et al.* CCR7 governs skin dendritic cell migration under inflammatory and steady-state conditions. *Immunity* **21**, 279-288 (2004).
269. Hemmi, H. *et al.* Skin antigens in the steady state are trafficked to regional lymph nodes by transforming growth factor- β 1-dependent cells. *Int. Immunol.* **13**, 695-704 (2001).
270. Merad, M. *et al.* Langerhans cells renew in the skin throughout life under steady-state conditions. *Nat. Immunol.* **3**, 1135-1141 (2002).
271. Yoshino, M. *et al.* Distinct antigen trafficking from skin in the steady and active states. *Int. Immunol.* **15**, 773-779 (2003).
272. Fang, W. *et al.* Self-Reactive B lymphocytes overexpressing Bcl-x_L escape negative selection and are tolerized by clonal anergy and receptor editing. *Immunity* **9**, 35-45 (1998).
273. Stoitzner, P. *et al.* Visualization and characterization of migratory Langerhans cells in murine skin and lymph nodes by antibodies against Langerin/CD207. *The Journal of investigative dermatology* **120**, 266-274 (2003).
274. Stoitzner, P., Tripp, C.H., Douillard, P., Saeland, S. & Romani, N. Migratory Langerhans cells in mouse lymph nodes in steady state and inflammation. *The Journal of investigative dermatology* **125**, 116-125 (2005).
275. Turville, S.G. *et al.* Diversity of receptors binding HIV on dendritic cell subsets. *Nature immunology* **3**, 975-983 (2002).
276. Hogquist, K.A. *et al.* T cell receptor antagonist peptides induce positive selection. *Cell* **76**, 17-27 (1994).
277. Munz, C., Steinman, R.M. & Fujii, S. Dendritic cell maturation by innate lymphocytes: coordinated stimulation of innate and adaptive immunity. *J. Exp. Med.* **202**, 203-207 (2005).

-
278. Inaba, K. *et al.* High levels of a major histocompatibility complex II - self peptide complex on dendritic cells from lymph node. *J. Exp. Med.* **186**, 665-672 (1997).
279. Liu, Y., Hamrah, P., Zhang, Q., Taylor, A.W. & Dana, M.R. Draining lymph nodes of corneal transplant hosts exhibit evidence for donor major histocompatibility complex (MHC) class II-positive dendritic cells derived from MHC class II-negative grafts. *J. Exp. Med.* **195**, 259-268 (2002).
280. Wu, D.Y., Segal, N.H., Sidobre, S., Kronenberg, M. & Chapman, P.B. Cross-presentation of disialoganglioside GD3 to natural killer T cells. *J. Exp. Med.* **198**, 173-181 (2003).