



UNIVERSIDAD NACIONAL DE CÓRDOBA
Facultad de Ciencias Químicas
Departamento de Bioquímica Clínica
Centro de Investigaciones en Bioquímica Clínica e Inmunología
CIBICI-CONICET

Tesis de Doctorado en Ciencias Químicas

**UTILIZACIÓN DE AGONISTAS DE RECEPTORES TIPO
TOLL 3 EN ESCENARIOS TERAPÉUTICOS
ANTITUMORALES**

Lic. en Biología Molecular David Andrés Nocera

Director de Tesis: Prof. Dra. Mariana Maccioni

Córdoba, Argentina 2015

Comisión asesora:

Prof. Dra. Alicia Degano

Prof. Dra. Belkys Maletto

Prof. Dra. Susana Rubiales

Evaluador externo:

Dra. Roxana Schilacci

El presente trabajo de tesis fue realizado gracias al apoyo económico obtenido a través de becas y subsidios otorgados por: Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), Secretaría de Ciencia y Tecnología de la Universidad Nacional de Córdoba (Secyt-UNC), Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica (ANPCyT-FONCyT), Instituto Nacional de Cáncer, Fundación Fiorini y Premio L'Oréal-UNESCO "Por la mujer en la ciencia".

ÍNDICE

RESUMEN	VII
ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS	IX
CAPÍTULO I: INTRODUCCIÓN	13
LA INMUNOLOGÍA DEL CÁNCER	14
INMUNIDAD INNATA Y ADQUIRIDA FRENTE AL CÁNCER	16
RECEPTORES DE RECONOCIMIENTO DE PATRONES MOLECULARES (PRR)	18
TLR INTRACELULARES	21
TLR3	24
POLIMORFISMOS EN TLR3	25
EXPRESIÓN DE TLR3	26
TRÁFICO Y PROCESAMIENTO DE LOS TLR INTRACELULARES	30
SEÑALIZACIÓN DE TLR INTRACELULARES	32
AGONISTAS DE TLR3 E INMUNOTERAPIA	35
INTERFERONES TIPO I	40
INTRODUCCIÓN AL MODELO EXPERIMENTAL	43
CAPÍTULO II: OBJETIVOS	46
OBJETIVO GENERAL Y CONSTRUCCIÓN DE LA HIPÓTESIS DE TRABAJO	47
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	47
CAPÍTULO III: RESULTADOS	49
PARTE I: DESARROLLO DE MODELOS PRECLÍNICOS DE ADMINISTRACIÓN TERAPÉUTICA ANTITUMORAL UTILIZANDO AGONISTAS DE RECEPTORES TIPO TOLL 3	50
GENERACIÓN DEL MODELO PRECLÍNICO	51
EFFECTO DEL TRATAMIENTO CON POLI A:U EN OTROS MODELOS TUMORALES SINGÉNICOS EN LA CEPA C57BL/6	54
EFFECTO DEL TRATAMIENTO CON POLI A:U EN MODELOS TUMORALES EN LA CEPA BALB/C	56
CONCLUSIONES PARTE I	59
PARTE II: CARACTERIZACIÓN DEL ROL QUE CUMPLEN LAS CÉLULAS DEL SISTEMA INMUNE EN EL MODELO PRECLÍNICO ESTABLECIDO	60
ESTUDIO DEL EFECTO DEL TRATAMIENTO CON POLI A:U EN RATONES ATÍMICOS <i>NUDE</i>	61
ESTUDIO DEL EFECTO DEL TRATAMIENTO CON POLI A:U EN RATONES DEFICIENTES EN IL-12P40	62
EFFECTO DEL TRATAMIENTO I.T. CON POLI A:U EN CÉLULAS DEL SISTEMA INMUNE	64
ESTUDIO DEL EFECTO DE POLI A:U SOBRE LA PRODUCCIÓN DE QUIMIOCINAS <i>EX VIVO</i>	67
ANÁLISIS DEL IMPACTO DEL TRATAMIENTO CON POLI A:U SOBRE LAS CÉLULAS DENDRÍTICAS	68
ESTUDIO DE LOS LINFOCITOS T INFILTRANTES DE TUMOR	70
EFFECTO DEL TRATAMIENTO CON POLI A:U SOBRE CÉLULAS T REGULADORAS	71
David Andrés Nocera	iv

ESTUDIO DEL EFECTO DEL TRATAMIENTO CON POLI A:U SOBRE LA RESPUESTA ANTITUMORAL ANTÍGENO ESPECÍFICA	74
CONCLUSIONES PARTE II	79
PARTE III: CARACTERIZACIÓN DEL ROL QUE CUMPLEN LOS IFNS TIPO I EN EL MODELO PRECLÍNICO DE ADMINISTRACIÓN TERAPÉUTICA DE POLI A:U	80
ESTUDIO DE LA PRODUCCIÓN DE IFN-B POR PARTE DE CÉLULAS TUMORALES	81
ESTUDIO DE LA INDUCCIÓN ENDÓGENA DE IFN-B POR PARTE DE CÉLULAS DEL HUÉSPED	83
ESTUDIO DE LA PRODUCCIÓN DE IFN-B EN DISTINTOS LINAJES CELULARES DEL SISTEMA INMUNE	88
ESTUDIO <i>IN VIVO</i> DE LAS VÍAS SEÑALIZACIÓN INVOLUCRADAS EN LA INDUCCIÓN DE IFN-B	92
ESTUDIO DE LA PARTICIPACIÓN DEL RECEPTOR DE INTERFERONES TIPO I EN EL DESARROLLO TUMORAL Y LA SOBREVIVENCIA EN NUESTRO MODELO EXPERIMENTAL	95
ANÁLISIS DEL EFECTO DEL TRATAMIENTO CON POLI A:U SOBRE EL INFILTRADO LEUCOCITARIO EN RATONES IFNAR1 ^{-/-}	98
ESTUDIO DE LA PARTICIPACIÓN DE LAS CD EN RATONES IFNAR1 ^{-/-} PORTADORES DE TUMOR	99
ESTUDIO DEL EFECTO DE POLI A:U SOBRE EL INFILTRADO LINFOCITARIO EN RATONES IFNAR1 ^{-/-}	100
ANÁLISIS DEL TRATAMIENTO I.T. CON POLI A:U EN CÉLULAS T REGULADORAS IFNAR1 ^{-/-}	102
ANÁLISIS DE LA CAPACIDAD DE POLI A:U DE POTENCIAR LA RESPUESTA INMUNE ESPECÍFICA CONTRA ANTÍGENOS TUMORALES EN RATONES IFNAR1 ^{-/-}	104
CONCLUSIONES PARTE III	106
PARTE IV: DESARROLLO DE TERAPIA COMBINADA ANTITUMORAL EN MODELOS PRECLÍNICOS UTILIZANDO QUIMIOTERAPÉUTICOS CONVENCIONALES Y AGONISTAS DE RECEPTORES TIPO TOLL 3	107
ESTUDIO DE EFICACIA DE LA ADMINISTRACIÓN CONJUNTA DE POLI A:U Y DOXORUBICINA EN MODELOS PRECLÍNICOS DE TERAPIA COMBINADA	108
ESTUDIO DEL EFECTO DE LA TERAPIA COMBINADA SOBRE PARÁMETROS BIOQUÍMICOS DE LOS RATONES TRATADOS	112
CONCLUSIONES PARTE IV	115
<u>CAPÍTULO IV: DISCUSIÓN</u>	116
GENERALIDADES SOBRE EL MODELO PRECLÍNICO	117
IL-12 LA “VEDETTE” DEL PERFIL DE RESPUESTA TH1	120
TLR3, INTERFERONES TIPO I Y LA RESPUESTA INMUNE ANTITUMORAL	122
EL ROL DE LAS TREG EN EL MICROAMBIENTE TUMORAL	128
LAS QUIMIOCINAS EN EL MICROAMBIENTE TUMORAL	130
TERAPIAS COMBINADAS ANTITUMORALES: NUEVAS PERSPECTIVAS	133
<u>CAPÍTULO V: MATERIALES Y MÉTODOS</u>	136
ANÁLISIS ESTADÍSTICO	137
ANIMALES	137
CITOMETRÍA DE FLUJO	137
CITOMETRÍA DE FLUJO INTRACELULAR	138

DETECCIÓN DE LUCIFERASA	138
ENSAYO DE PROLIFERACIÓN <i>IN VIVO</i> POR DILUCIÓN DE CFSE.	139
ENSAYO PRE-CLÍNICO DE QUIMIO-IMMUNOTERAPIA COMBINADA	139
EXPERIMENTOS DE TRANSFERENCIA ADOPTIVA	139
INDUCCIÓN DE TUMORES <i>IN VIVO</i> : MODELO TERAPÉUTICO CON POLI A:U	140
INMUNOFLUORESCENCIA	140
OBTENCIÓN DE CÉLULAS INFILTRANTES DE TUMOR	141
LÍNEAS CELULARES	141
PREPARACIÓN / EMPLEO DE POLI A:U	141
PURIFICACIÓN DE LINFOCITOS T A PARTIR DE BAZO DE RATÓN OT-I U OT-II POR <i>CELL-SORTING</i>	142
WESTERN BLOT	142
MICROARREGLO DE PROTEÍNAS (<i>PROTEIN ARRAY</i>)	142
<u>CAPÍTULO VI: BIBLIOGRAFÍA</u>	144

RESUMEN

Durante la realización de la presente tesis doctoral se estableció un modelo terapéutico preclínico de administración intratumoral (i.t.) de *polyadenylic-polyuridylic acid* (poli A:U) desnudo, un análogo sintético de ARN doble cadena viral que es reconocido sólo por TLR3 y no por otros receptores citosólicos. Se demostró que el tratamiento terapéutico con poli A:U inhibe el crecimiento tumoral y aumenta la sobrevida en los ratones portadores de tumores de melanoma murino B16 tratados. Asimismo, se demostró que dicho tratamiento puede ser empleado con éxito en similares esquemas terapéuticos en distintos modelos murinos, tanto en el background genético C57BL/6 como en el BALB/c, aportando bases para una terapia alternativa antitumoral.

También se estudió la contribución particular que las células del sistema inmune ejercen en nuestro modelo preclínico. Empleando ratones *nude* e IL-12 p40^{-/-}, se demostró que tanto las células T (y/o NKT) así como la subunidad IL-12p40 (compartida por IL-12 e IL-23) participan en el control del crecimiento tumoral y la sobrevida en los ratones portadores de tumores B16 tratados. Cuando se caracterizó *ex vivo* el infiltrado inmunológico en tumores de ratones tratados con poli A:U, se encontró un mayor infiltrado de células CD45+, de células dendríticas maduras CD11c+ (CD40+CD86+) productoras de IL-12 y de LiT CD8+, modificándose la relación CD4/CD8 en tumor. Empleando ratones reporteros Foxp3-GFP, se encontró que el tratamiento con poli A:U disminuye el número de células T reguladoras (Treg) en tumor y el porcentaje de células que expresan el marcador LAP, asociado a la producción de TGF- β . Además, se estudió la respuesta antitumoral antígeno específica empleando el modelo preclínico en ratones portadores de tumores B16 que expresan de forma estable ovalbúmina (OVA), mediante la transferencia adoptiva de células T CD4+ y CD8+ provenientes de ratones transgénicos OTI y OTII (que expresan TCR específicos para péptidos de OVA expresados en el contexto del CMH clase I y II respectivamente). Se evidenció que el tratamiento i.t. con poli A:U promueve el reclutamiento y la proliferación de LiT CD8+ antígeno específicos en ganglio drenante y favorece un perfil de respuesta Th1 antígeno específica en tumor.

Por otra parte, mediante el empleo de nuestro modelo preclínico en ratones deficientes en el receptor de IFN-I (IFNAR1^{-/-}) se demostró que se requiere la señalización de IFN-I sobre las células huésped para observar la inhibición del crecimiento tumoral y el aumento de la sobrevida generada por el tratamiento con poli

A:U. Además, cuando se caracterizó *ex vivo* el infiltrado leucocitario en tumor en ratones IFNAR1^{-/-}, todas esas diferencias halladas entre los tratamientos en ratones wt se pierden.

Para demostrar que el tratamiento con poli A:U induce la producción endógena de IFN- β , se emplearon ratones reporteros que expresan el gen de luciferasa en lugar de la secuencia codificante de IFN- β . El estudio de la cinética de la inducción de IFN- β *in vivo* demostró que el tratamiento i.t. con poli A:U desnudo es capaz de inducir un pico de dicha citocina luego de 6 h y que este se produce a lo largo de sucesivas dosis. Empleando cepas de ratones reporteros de IFN- β específicos para distintos linajes como células mieloides, dendríticas, LiT y B (LysM^{+/lox β Luc}, CD11c^{+/lox β Luc}, CD4^{+/lox β Luc} y CD19^{+/lox β Luc} respectivamente), se demostró que luego del tratamiento con poli A:U las células de origen mieloides son responsables de producir la totalidad de IFN- β en el microambiente tumoral y que las células CD11c⁺ también contribuyen en gran parte con dicha inducción. Además, se reprodujo el modelo preclínico en ratones reporteros de IFN- β deficientes en UNC93B1 (molécula involucrada en el tráfico de TLR endosomales) y en IRF3, 5 o 7 (factores de transcripción clave en las vías de señalización de TLR). De esta manera, se demostró que la producción de IFN- β en nuestro modelo preclínico, es dependiente de IRF3 y UNC93B1 pero no de IRF7 e IRF5, confirmando que poli A:U es ligando TLR3 y contribuyendo también con algunos aspectos importantes de su señalización *in vivo*.

Por último, se evaluó el empleo de poli A:U en combinación con un quimioterapéutico convencional como doxorubicina, con el fin de disminuir su dosis, manteniendo la eficacia del tratamiento y disminuyendo sus efectos adversos. Para ello, se empleó doxorubicina en altas y bajas dosis i.v. en ratones portadores de tumores B16 y se mantuvieron las condiciones y el esquema experimental de administración de poli A:U. La terapia combinada poli A:U y doxorubicina bajas dosis demostró tener un efecto sinérgico favorable, respecto a los demás tratamientos empleados, para el control del crecimiento tumoral y el aumento de la sobrevida de los ratones tratados, reduciendo además los efectos tóxicos secundarios de doxorubicina evaluados mediante niveles enzimáticos y parámetros bioquímicos.

La presente tesis revela el rol crucial de la inducción endógena de IFN- β , luego de la administración i.t. de poli A:U, en la modificación del tipo de infiltrado, funcionalidad de células del sistema inmune y en la respuesta inmune antitumoral que promueve el control del crecimiento tumoral y el aumento de la sobrevida de los ratones tratados.

Palabras clave: Inmunología tumoral poli A:U TLR3 IFN- β Terapia antitumoral

ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS

ADN	ácido desoxiribonucleico
ALR	<i>AIM2-like receptors</i>
AN	ácidos nucleicos
ARN	ácido ribonucleico
ARNdc	ARN doble cadena
ARNi	ARN interferente
ARNr	ARN ribosomal
ARNsc	ARN simple cadena
ARNm	ARN mensajero
BCG	Bacillus de Calmette y Guerin
bFGF	<i>basic fibroblast growth factor</i>
CD	células dendríticas
CDc	células dendríticas convencionales
CDDM	CD derivadas de monocitos humanos
CDp	células dendríticas plasmacitoideas
CD4	<i>T cell co-receptor</i>
CD8	<i>T cell co-receptor</i>
CD11c	<i>integrin alpha X chain protein</i>
CD19	<i>B-lymphocyte antigen CD19</i>
CLR	<i>C-type lectin receptors</i>
CMH	complejo mayor de histocompatibilidad
CPA	células presentadoras de antígenos
CpG	desoxiribo citidina-fostato-guanosina
DAMP	<i>damage-associated molecular patterns</i>
ELISA	Enzimoimmunoensayo
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
GD	ganglio drenante
GND	gânglio no drenante
HIF-1 α	<i>hypoxia-inducible factor1</i>
HMGB1	<i>high-mobility group box1</i>

HSE	síndrome de encefalitis por virus del herpes
Hsp	<i>Heat shock protein</i>
HSV-1	virus del herpes simple tipo 1
IFN-I	Interferones tipo I
IL	interleucina
i.t.	intratumoral
i.v.	intravenosa
IRAK	<i>Interleukin-1 receptor-associated kinase 1 isoform 1</i>
IRF	<i>interferon regulatory factor</i>
LBS	<i>LPS-binding protein</i>
Li	Linfocitos
LPS	lipopolisacárido
LRR	regiones repetidas ricas en leucinas
LysM	<i>lysozime M locus gene (myeloid cells)</i>
M ϕ	macrófagos
MAMP	<i>microorganism associated molecular patterns</i>
MAPK	<i>mitogen activated protein kinase</i>
MDSC	células mieloides supresoras
MLS	macrólidos, lincosamida y estreptogramina B
MMP	metaloproteinasa
MyD88	<i>Myeloid differentiation primary response gene 88</i>
MPLA	monofosforil lípido A
NF- κ B	<i>nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cell)</i>
NK	<i>natural killer</i>
NLR	<i>nucleotid-binding oligomerization domain (NOD)- like receptor</i>
OVA	ovalbúmina
p.i.	post inyección
p.t.	post transferencia
PAMP	patrones moleculares asociados a patógenos
PBS	solución de buffer fosfato
PCR	reacción en cadena de la polimerasa
poli A:U	<i>polyadenylic-polyuridylic acid</i>

poli I:C	<i>polyinosine-polycytidylic acid</i>
PRR	receptores de reconocimiento de patrones
RAGE	<i>Receptor for <u>A</u>dvanced <u>G</u>lycation <u>E</u>nd products</i>
RE	retículo endoplásmico
RLR	<i>Retinoic acid-inducible gene-1 (RIG-I)-like receptor</i>
RNS	especies reactivas del nitrógeno
ROS	especies reactivas del oxígeno
s.c.	subcutáneo / subcutáneamente
SDS-PAGE	electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio
SFB	suero fetal bovino
SNP	<i>single nucleotide polymorphism</i>
Src	<i>sarcoma non-receptor tyrosine kinase</i>
STAT	<i>signal transducer and activator of transcription</i>
T.A.	temperatura ambiente
TAM	Mφ asociados a tumor
TAK1	<i>TGF-beta activated kinase 1</i>
TBK1	<i>TANK-binding kinase 1</i>
Th	T helper o T colaborador
TILs	leucocitos infiltrantes de tumor
TIR	dominio Toll/receptor de IL-1
TIRAP	<i>TIR domain containing adaptor protein</i>
TLR	Toll like receptor
TNF-α	factor de necrosis tumoral alfa
TRAF3	<i>TNF receptor-associated factor 3</i>
TRAF6	<i>TNF receptor-associated factor 6</i>
TRAM	<i>Toll-like receptor adaptor molecule 2</i>
Treg	células T reguladoras
TRIF	<i>Toll like receptor adaptor molecule 1</i>
UNC93b1	<i>Unc-93 homolog B 1</i>
VEGF	<i>vascular endothelial growth factor</i>
wt	<i>wild type</i>

Utilización de agonistas de receptores Tipo Toll 3 en escenarios terapéuticos antitumorales.

CAPÍTULO I: INTRODUCCIÓN

LA INMUNOLOGÍA DEL CÁNCER

La inmunología del cáncer ha hecho muchos descubrimientos importantes y ha establecido una sólida base en el último siglo, a pesar de aquellos que ven el campo como nada más que una ilusión. Desde sus orígenes, esta área de estudio ha estado plagado de dificultades ya que, por un lado, la inmunología del cáncer es una disciplina híbrida (integra varias disciplinas) y por otro, el estudio del cáncer fue conducido por mucho tiempo por los genetistas, oncólogos, patólogos y otros especialistas médicos. Sin embargo, ya en la década de 1890, William B. Coley observó que algunos pacientes con cáncer experimentaban remisión espontánea de sus tumores cuando contraían infecciones agudas (Rammensee, 2014). Coley desarrolló una mezcla relativamente segura y eficaz de toxinas provenientes de bacterias muertas Gram-positivas (*Streptococcus pyogenes*) y Gram-negativas (*Serratia marcescens*) para el tratamiento de pacientes con cáncer (conocida como toxina de Coley). Este trabajo fue “marginado” por la llegada de tratamientos con rayos X y la radioterapia, y posteriormente, la quimioterapia. Luego de estos primeros años visionarios, el campo de la inmunología permaneció descuidado.

Durante la primera mitad del siglo 20, Richmond Prehn y Joan Main demostraron el rechazo inmunológico de tumores inducidos químicamente y trasplantados a ratones singénicos (Prehn & Main, 1957; Parmiani, y col., 2015). Años más tarde, basados en el aumento de las observaciones en modelos de ratón, McFarlane Burnet y Lewis Thomas propusieron la teoría de “la vigilancia inmunológica del cáncer”, especulando que el Sistema Inmune podría ser capaz de destruir tumores malignos (Burnet, 1971; Thomas, 1982). El concepto de inmunovigilancia del cáncer parecía desvanecerse tras el hallazgo de que los ratones atímicos *nude* no mostraban mayor susceptibilidad a desarrollar tumores inducidos por metilcolantreno (Stutman, 1974). Sin embargo, en ese momento aún no se conocía que los ratones *nude* tienen altos niveles de células *natural killer* (NK) y otras células de la inmunidad innata (Dunn, y col., 2004). Independientemente de estos grandes descubrimientos, el campo de la inmunología del cáncer se volvió cada vez más controvertido, y la validez científica del diagnóstico de Coley fue cuestionada (Galon y col., 2013).

Este punto de vista “pesimista” sobre la inmunidad del cáncer fue refutada gradualmente por muchas observaciones experimentales novedosas, tales como el descubrimiento del factor de necrosis tumoral α (TNF- α) (Carswell y col., 1975) y la demostración de que la inmunización con tumores mutagenizados provocaba el rechazo

de tumores espontáneos poco inmunogénicos (Van Pel y col.,1983). En 1991, comenzó la era de la Inmunología Molecular con la identificación de las estructuras de antígenos y las secuencias de genes que codifican antígenos tumorales que son reconocidos por las células T (van der Bruggen y col., 1991). Este descubrimiento generó una ola de optimismo y esperanza para un enfoque inmunomodulador contra el cáncer y la vacunación. En 1995 y 1998, dos citocinas inflamatorias, el interferón (IFN)- α y la interleucina (IL)-2, fueron aprobadas para el tratamiento de melanoma (empleadas como adyuvante y en terapias antimetastásicas, respectivamente). Sin embargo, las inmunoterapias desarrolladas en estos años tuvieron un beneficio de supervivencia limitado, restringido a un grupo minoritario de los pacientes, comprometiendo nuevamente el campo en cuestión (Jeught, y col., 2014).

El renacimiento de la inmunología tumoral comenzó realmente hace una década, impulsado por tres grandes logros. En primer lugar, fue la demostración de la inmunovigilancia (integrada en la Teoría de la Inmunoedición) empleando modelos de ratones *knock out* (KO) (Shankaran y col., 2001) y la demostración de la fase de equilibrio del cáncer (Koebel y col., 2007) (cuadro 1).

En segundo lugar, fue la demostración de la importancia de la respuesta inmune antitumoral para la supervivencia de los pacientes. Se demostró que el infiltrado de células de la inmunidad adaptativa tiene un valor pronóstico superior a los criterios clásicos de extensión y grado de invasión del tumor (Galon y col., 2006). Por otra parte, se había demostrado que un microambiente tumoral activo conducente al reconocimiento por parte del sistema inmune, tiene un valor predictivo en la respuesta a la inmunoterapia (E. Wang y col., 2002).

En tercer lugar, los éxitos notables de varias inmunoterapias generaron un enorme entusiasmo entre los oncólogos y los inmunólogos. De hecho, en los últimos cinco años, se ha demostrado que varios tipos de inmunoterapias tienen un gran impacto clínico. Estos avances incluyen: la terapia de transferencia adoptiva de células T (Kalos & June, 2013; Restifo, y col., 2012); el desarrollo de nuevas vacunas, como la primera vacuna celular aprobada por la FDA (*Food and Drug Administration*) de Estados Unidos, Sipuleucel-T, para el tratamiento de distintos tipos de cáncer de próstata (Cheever & Higano, 2011; Quinn y col., 2014), y la vacuna gp100 en combinación con IL-2 para el tratamiento de melanoma (Schwartzentruber y col., 2011; Hailemichael & Overwijk, 2014). Además, los inhibidores por bloqueo, tales como el anticuerpo monoclonal aprobado por la FDA anti-CTLA4 (ipilimumab), y los anticuerpos monoclonales anti-PD-1/PD-1 ligando, entre

otros, han revolucionado el campo (Vacchelli, y col., 2014; Drake, y col., 2014). Por lo tanto, el área de la inmunología del cáncer sigue siendo un campo multidisciplinario siempre creciente y próspero, que trabaja en conjunto con otras disciplinas para salvar y mejorar la vida de pacientes con cáncer (D. S. Chen & Mellman, 2013; Galon, y col., 2013; Jeught, y col., 2014).

Cuadro 1. La Teoría de la Inmunoedición.

El sistema inmune puede reconocer y eliminar de manera natural las células tumorales, ejerciendo cierta presión selectiva que los tumores deben evadir para poder crecer. La teoría de la inmunoedición (o también conocida como Teoría de las “3 E”, Dunn y col., 2004) propone un proceso de 3 fases: **eliminación**, mediante la cual el sistema inmune puede reconocer y deshacerse de las células tumorales recientemente originadas (inmunovigilancia); **equilibrio**, se establece un balance entre el tumor y el sistema inmune y ambos ejercen presión sobre el otro, donde el sistema inmune puede seleccionar y/o promover variantes de células tumorales resistentes al control inmunológico; y **escape**, en la cual el tumor, a través del desarrollo de mecanismos de resistencia, puede evadir la respuesta inmune.

Koebel y col., 2007

INMUNIDAD INNATA Y ADQUIRIDA FRENTE AL CÁNCER

La primera rama del sistema inmune en activarse frente a la entrada de un agente extraño o agresor son las células y mediadores del sistema inmune innato. Algunas poblaciones celulares consideradas como parte de la inmunidad innata son los macrófagos (Mφ), monocitos, neutrófilos, otras células polimorfonucleares, células *natural killer* (NK), células mieloides supresoras (MDSC), etc. Dentro del sinnúmero de mediadores solubles más característicos que participan en esta etapa, se encuentran algunas de las citocinas proinflamatorias más conocidas: IL-1, IL-6, TNF-α, etc (Hagerling y col., 2014). Las células de la inmunidad innata poseen receptores cuya distribución no es clonal (todas las células de un mismo linaje expresan los mismos receptores).

La activación de las células de la inmunidad innata frente a una situación de daño (infecciosa o estéril) es inmediata y crucial en el desencadenamiento de un fenómeno inflamatorio. La inmunidad adquirida, en contraste genera una respuesta específica contra antígenos en particular, algo más demorada y conduce a la memoria inmunológica (Gajewski y col., 2013). La activación de la inmunidad innata es fundamental para que se inicie la activación de la adquirida y ésta última, si se desregula, contribuye a la perpetuación de un estado inflamatorio crónico (Coussens y col., 2013; Goldszmid y col., 2014).

Tanto la inmunidad innata como adaptativa pueden contribuir en la eliminación del tumor. Las células NK y los LiT CD8+, o células citotóxicas, son algunos de los principales protagonistas en la eliminación de células tumorales. Citocinas tales como IFN- γ e IL-12, identificadas generalmente con células T cooperadoras tipo I (Th1), raramente matan directamente a las células cancerosas, pero son requeridas para la activación de estas poblaciones (Goc y col., 2014; Jeught y col., 2014).

El análisis exhaustivo del infiltrado leucocitario en tumores sólidos o en sangre en pacientes (como así también en modelos experimentales de cáncer) ha demostrado que la funcionalidad de las células presentes no siempre corresponde a la esperada para combatir un tumor. Así, las poblaciones celulares predominantes son M ϕ asociados a tumor (TAM), MDSC, neutrófilos y células Treg, todas ellas compatibles con una respuesta antitumoral inhibida e ineficiente (Condamine y col., 2015; Kitamura y col., 2015; Mantovani, 2014).

Por el contrario, trabajos muy interesantes realizados en pacientes con cáncer colorectal establecieron una correlación significativa entre la presencia intratumoral de células T CD8+ y moléculas asociadas a su actividad (tales como IFN- γ y granzima B) y el tiempo libre de enfermedad y supervivencia de esos pacientes (Galon y col., 2006), indicando que cuando se potencia la rama del sistema inmune adecuado, éste puede contribuir en el control del proceso neoplásico (Fridman y col., 2012; Galon y col., 2013).

Las células de la inmunidad innata como los LiT y B a su vez, se pueden diferenciar fenotípica y funcionalmente en una miríada de subpoblaciones con distintos roles, incluso muchas veces antagónicos, tanto para la defensa contra agentes extraños así como en la inmunidad antitumoral. Un ejemplo paradigmático de la dualidad de funciones que puede ejercer una determinada subpoblación celular son los TAM (Biswas & Mantovani, 2010). Si bien está demostrado que los tumores están infiltrados por diversas poblaciones celulares del sistema inmune tales como células NK, Treg, Li B, LiTh1 y Th2, LiT senescentes, LiT exhaustos etc, los TAM representan una de las poblaciones más abundantes en el microambiente tumoral (Mantovani, 2014). Los M ϕ pueden presentar diferentes estados de activación y se los ha clasificado como M ϕ activados en forma clásica o M1 y M ϕ activados en forma alternativa o M2. En cada uno de estos estados de polarización, los M ϕ adquieren un fenotipo característico y sintetizan citocinas, quimiocinas y factores que complementan su identificación. En general, los TAM humanos o murinos generalmente presentan un perfil tipo M2 y secretan un número de factores de crecimiento y citocinas proangiogénicas como VEGF (*vascular endothelial*

growth factor), TNF- α , IL-8 y bFGF (*basic fibroblast growth factor*) y enzimas que promueven los procesos metastásicos como metaloproteínasas (MMP)-2, MMP-7, MMP-9 y MMP-12 (Murray y col., 2014). Por lo tanto, los TAM presentan distintos perfiles de activación y que de acuerdo a ello adquirirán funciones pro- o anti-inflamatorias, modulando fuertemente la inmunidad antitumoral y/o la progresión del tumor (Chanmee y col., 2014).

Una situación de dualidad similar se observa para muchas otras poblaciones celulares y se conoce que la funcionalidad adoptada por las células en el microambiente tumoral está comandada por las interacciones de las distintas células de sistema inmune con factores secretados por las propias células tumorales y otras células que conviven en el complejo microambiente tumoral (Caronni y col., 2015; Kitamura y col., 2015).

RECEPTORES DE RECONOCIMIENTO DE PATRONES MOLECULARES (PRR)

Las células de la inmunidad innata poseen receptores codificados en línea germinal o “*pattern recognition receptors*” (PRR), cuya distribución no es clonal y que no reconocen antígenos específicos en particular, sino estructuras químicas conservadas entre distintos tipos de microorganismos y que en general son esenciales para su sobrevivencia. Estas estructuras químicas se denominan “MAMP” (*microorganism associated molecular patterns*), y un ejemplo clásico de MAMP es el lipopolisacárido (LPS) presente en la pared celular de las bacterias Gram-negativas. La activación de las células de la inmunidad innata frente a una infección es inmediata y sus componentes se encuentran evolutivamente conservados tanto en animales superiores como en invertebrados (Kawai & Akira, 2010). Además de los MAMP, los PRR pueden reconocer “DAMP” (*damage-associated molecular patterns*), mediadores endógenos de la inflamación liberados como consecuencia del estrés celular, la pérdida de la homeostasis o la integridad del organismo, tal es el caso de HMGB1 (*high mobility group protein B1*), una proteína nuclear no histónica de unión a la cromatina, que cuando se libera al exterior celular es reconocida como “señal de peligro” (Krysko y col., 2012; Goldszmid, y col., 2014).

El reconocimiento de MAMP o DAMP es esencial para la iniciación de una respuesta inflamatoria. Tras el reconocimiento de los mismos, los PRR inician un programa que ejecuta la primera línea de defensa, necesaria para controlar la noxa. Además, la señalización a través de PRR simultáneamente induce la maduración de las células dendríticas (CD), proceso en el cual se produce un aumento de citocinas proinflamatorias y la expresión de moléculas coestimuladoras en su superficie (como

CD80, CD86 y CD40). De esta forma, las CD activadas o maduras son capaces de presentar eficientemente antígenos a la inmunidad adaptativa (Steinman, 2012).

La mayoría de los PRR se pueden clasificar en una de las cinco familias, basadas en la homología estructural de sus dominios: la familia de los TLR (*Toll like receptors*), CLR (*C-type lectin receptors*), receptores RLR (*retinoic acid-inducible gene-1 (RIG-I)-like receptor*), receptores NLR (*nucleotid-binding oligomerization domain (NOD)-like receptor*) y receptores ALR (*AIM2-like receptors*). A su vez, estas familias se pueden dividir en dos grandes grupos según su localización celular: los receptores de membrana y los receptores intracelulares libres (o citosólicos). Al primer grupo lo forman los TLR y CLR, que se encuentran anclados en la membrana plasmática o en la membrana de compartimentos endocíticos, y detectan la presencia de ligandos microbianos en el espacio extracelular. Mientras que el segundo grupo lo forman los RLR, NLR y ALR, que se encuentran en el citoplasma, donde censan la presencia de patógenos intracelulares (Brubaker y col., 2015).

La familia de RLR está compuesta por tres miembros RIG-I, MDA5 (*melanoma differentiation associated gene 5*) y LGP2 (*laboratory of genetics and physiology 2*) los cuales reconocen ARN viral en el citoplasma. Los RLR pertenecen a una familia de ARN helicasa que específicamente detecta especies de ARN derivadas de virus en el citoplasma y coordinan un programa anti-viral a través de la producción de Interferones tipo I (IFN-I) (Chattopadhyay & Sen, 2014).

Los NLR constituyen una gran familia de PRR intracelulares tales como NOD1, NOD2, NLRP3 entre otros, que se activan tras el reconocimiento de MAMP. Algunos de los NLR forman una estructura supramolecular conocida como inflamasoma, esencial en la activación de caspasa 1 y por ende, en la conversión de la molécula inactiva pro-IL-1 β a IL-1 β . La estimulación de NOD1 y NOD2 además resulta en la translocación nuclear de NF- κ B y la activación de MAPK (*mitogen activated protein kinase*) (Leemans y col., 2014).

Los ALR participan en la detección de ADNdc citosólico. Cada uno de estos receptores cuenta con un dominio PYHIN que permite interacciones proteína-proteína y un dominio HIN-200 de unión al ADNdc (Kawai & Akira, 2011). El miembro fundador de esta familia, AIM2 (*absent in melanoma-2*), interactúa con el adaptador ASC (*apoptosis-associated speck-like protein*) y promueve la formación del inflamasoma y media la producción de IL-1 β tras la detección de ADNdc citosólico. Un conjunto más diverso de funciones se ha atribuido a un segundo miembro, IFI16 (*interferon γ -inducible-*

16), que incluyen la activación de STING (*stimulator of IFN genes*) y consecuente producción de IFN-I, además de la formación del inflamasoma (Pandey, y col., 2015).

Cientos de CLR forman una familia heterogénea que reconoce una amplia gama de microorganismos. Todos los CLR comparten un dominio característico lectina tipo C (CTLD) capaz de unirse a calcio y carbohidratos. La mayoría de los CLR actúan como opsoninas sin activar directamente una cascada de señalización vía NF- κ B. Sin embargo, un subgrupo de estos receptores inicia cascadas de señalización que convergen en la translocación nuclear de NF- κ B y desencadenan una respuesta proinflamatoria crucial para la defensa contra hongos. Dentro de los subgrupos de CLR más estudiados, se encuentran las subfamilias de receptores Dectin-1 y Dectin-2/3, que reconocen β -glicanos y α -mananos, respectivamente (Brubaker y col., 2015).

Los TLR son glicoproteínas integrales de membrana formadas por un dominio extracelular, un dominio de transmembrana y un dominio de señalización intracelular; y en base a la alta homología que presenta el dominio intracelular o citoplasmático, forman parte de una gran familia de receptores de transmembrana que incluye al receptor de IL-1 (IL-1R) (Kawai & Akira, 2010). Éstos receptores comparten el dominio intracelular pero difieren en la estructura del dominio extracelular, ya que en el IL-1R la región extracelular está constituida por tres dominios similares a inmunoglobulinas (Ig), mientras que en los TLR el dominio extracelular contiene regiones repetidas ricas en leucinas (LRR). El dominio extracelular de los TLR se asocia a través de una única cadena de transmembrana al dominio citoplasmático, el cual, como se dijo anteriormente, comparte una alta homología con el dominio citoplasmático de IL-1R, lo que le confiere el nombre de dominio Toll/IL-1R (TIR) (Slack y col., 2000). Dentro de los dominios TIR, hay regiones conservadas que son cruciales para la interacción con moléculas involucradas en la señalización intracelular que desencadenan la inmunidad de plantas (Zipfel, 2014) y animales (Clemmons, y col., 2015; Rauta y col., 2014; Lewis & Obbard, 2014) (Figura I.1).

Cabe destacar que la molécula Toll fue originalmente descrita en la mosca de la fruta *Drosophila melanogaster*, como una proteína importante en el desarrollo en la embriogénesis (Hashimoto y col., 1988). En 1996 el grupo de Hoffman, demostró que Toll posee un rol clave en la respuesta inmune contra hongos en *Drosophila* (Lemaitre y col., 1996). Un año después, un homólogo de Toll en *Drosophila* fue descrito en humanos, subsecuentemente llamado receptor tipo Toll (*Toll-like receptor*, TLR) (Medzhitov y col., 1997). En 1998 el grupo de Beutler BA describió el primer TLR,

TLR4, una proteína expresada en Mφ que induce la expresión de genes involucrados en la respuesta inflamatoria (Poltorak y col., 1998). Estos descubrimientos sobresalientes por los grupos de Hoffman y Beutler los hicieron acreedores del premio Nobel en Fisiología y Medicina en el año 2011.

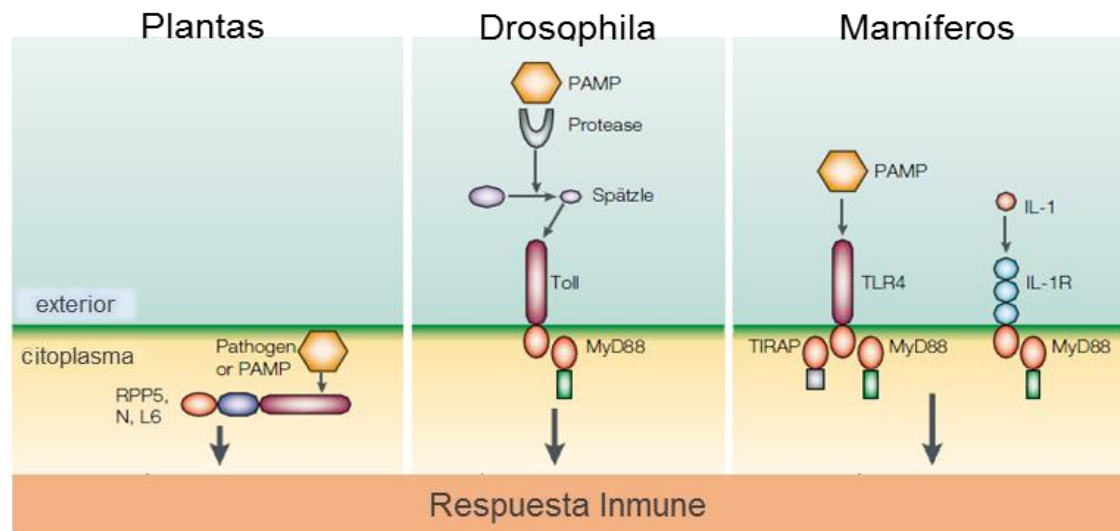


Figura I.1. TLR: una familia muy conservada a lo largo de la evolución. Los TLR son glicoproteínas integrales de membrana tipo I, que consisten en un dominio extracelular, una región transmembrana y un dominio citoplasmático. EL dominio citoplasmático de los TLR muestra una alta homología entre distintas especies, compartiendo el dominio de señalización intracelular TIR. RPP5, N y L6 son ejemplos prototípicos de las proteínas vegetales de resistencia a enfermedades intracelulares que contienen un dominio TIR amino terminal, así como un dominio de unión a nucleótidos (ATP o GTP) y dominios LRR. Drosophila tiene dos tipos de proteínas con dominios TIR: Toll y MyD88. Los mamíferos tienen al menos cuatro tipos de proteínas con dominios TIR: los receptores TLR e IL-1R, MyD88 (*myeloid differentiation primary response 88*) y TIRAP (*TIR domain-containing adaptor protein*). Imagen adaptada de Medzhitov, 2001.

TLR INTRACELULARES

Los TLR han sido divididos en dos subgrupos, dependiendo de la localización celular. Uno de los grupos está compuesto por TLR1, TLR2, TLR4, TLR5, TLR6 y TLR11, los cuales se encuentran expresados en la superficie celular, y reconocen principalmente componentes microbianos, tales como lípidos, lipoproteínas, proteínas y DAMP. El otro grupo está compuesto por TLR3, TLR7, TLR8 (este último funcional sólo en humanos), TLR9 y TLR13 (este último únicamente en ratón) y se encuentran exclusivamente expresados en la membrana de vesículas tales como endosomas, lisosomas y endolisosomas, donde reconocen ácidos nucleicos (AN) microbianos (Kawai & Akira, 2010). Los TLR intracelulares, son intrínsecamente capaces de detectar AN. Si

bien los AN de los vertebrados poseen varias modificaciones que los diferencian de los ARN y ADN de microorganismos, conservan cierta capacidad para activar la respuesta inmune impulsada por la activación de TLR intracelulares (Gosu, y col., 2012). Por lo tanto, éstos receptores actúan en compartimientos endosomales, en donde usualmente los AN del huésped son excluidos, y por ende pueden distinguir entre los AN propios y foráneos, en un estadio de acidificación y maduración particular del endosoma (He y col., 2015). Los TLR1 a TLR9 se conservan tanto en ratones como en humanos, mientras que el TLR10 de ratón pareciera ser no funcional y TLR11, TLR12 y TLR13 se han eliminado del genoma humano (Kawai & Akira, 2010).

Existe un fuerte consenso respecto a que la función primaria de los TLR intracelulares es la detección de virus, aunque ha sido demostrado que también son capaces de detectar otros microorganismos. Muchos virus son sólo percibidos por los TLR endosomales, y son éstos particularmente importantes para su contención. La incorporación de microbios intactos por la vía endocítica puede ocurrir de distintas formas: endocitosis mediada por receptor, fagocitosis, o macropinocitosis (endocitosis no específica de derivados celulares solubles) (Blum, y col., 2013). Alternativamente, los virus pueden fusionarse con la membrana plasmática y posteriormente ser conducidos a endosomas tanto antes o durante el proceso de replicación como resultado de la autofagia. Asimismo, virus replicados totalmente pueden gemar a través del sistema endosomal y transitar a través de la vía de tráfico celular en endosomas para ser liberados al exterior celular (Jensen & Thomsen, 2012).

TLR7, fue originalmente identificado por el reconocimiento de derivados de imidazoloquina tal como imiquimod (R-837) y resiquimod (R-848) y reconoce además, análogos de guanina, tal como loxoribine (el cual tiene propiedades antivirales y antitumorales). TLR7 reconoce ARN simple cadena (ARNsc) derivados de virus de ARN tal como el virus de la estomatitis vesicular, virus de la influenza A y virus de inmunodeficiencia humana, pero también ARNsc de algunas bacterias como Streptococo del grupo B (Pandey y col., 2015). TLR7 reconoce además el ARN sintético poliU y determinados ARN interferentes (ARNi). Existe una alta expresión de TLR7 en una población de CD denominadas plasmocitoideas (CDp) lo cual le permite a esta población producir gran cantidad de IFN-I después de una infección viral (Pulendran, 2015).

Aunque se sabe poco acerca de los ligandos reconocidos por TLR8 (filogenéticamente similar a TLR7), el TLR8 humano media el reconocimiento de R-848 y ARNsc viral. Por otra parte, varios estudios han demostrado que TLR8 humano

responde a ARN total bacteriano, así como a las infecciones con varios patógenos bacterianos, mediando la inducción de la expresión de citocinas proinflamatorias e IFN-I (P. Broz & Monack, 2013). Mediante el uso de subpoblaciones de CD con distintos perfiles de expresión de TLR, se demostró que la detección de la bacteria inactivada por calor *S. aureus* es independiente de TLR2 y sólo requiere la presencia de TLR13. Los ARN ribosomales (ARNr) bacterianos, específicamente el motivo conservado CGGAGACC del ARNr 23S, fueron identificados como ligandos de TLR13. Cabe destacar que este motivo está altamente conservado entre las bacterias Gram-negativas y Gram-positivas: ARNr 23S de *E. coli* y *S. pyogenes* fueron capaces de inducir una respuesta transcripcional dependiente de TLR13, resultando en la inducción de pro-IL-1 β . Además, esta secuencia inmunoestimulante es blanco terapéutico del grupo de antibióticos “macrólidos, lincosamida y estreptogramina B” (MLS). También se demostró que la modificación de 23S ARNr en ciertos aislados clínicos de *S. aureus* resistentes a MLS, abolió su actividad inmunoestimulante (Hidmark, y col., 2012). Dada la importancia de TLR13 en la detección de bacterias, es sorprendente que este TLR no está presente en los seres humanos. Es posible que un PRR relacionado haya evolucionado en los seres humanos para reconocer especies de bacterias que han modificado su 23S ARNr (P. Broz & Monack, 2013).

TLR9 reconoce motivos de ADN CpG (citosina-guanina) no metilados, los cuales se encuentran presentes en bacterias y virus, y raramente en mamíferos. Oligonucleótidos sintéticos de CpG funcionan como ligandos de TLR9 y directamente activan células tales como CD, M ϕ y LiB, promoviendo una respuesta Th1 (Kaisho, 2012). Existe una alta expresión de este receptor en CDp y sirve como sensor de virus de ADN (Pulendran, 2015).

TLR3 fue originalmente identificado como responsable de reconocer análogos sintéticos de ARN doble cadena (ARNdc), tales como poli I:C o más específicamente poli A:U, los cuales simulan infecciones virales e inducen una respuesta inmune antiviral mediante la inducción de IFN-I y citocinas proinflamatorias. TLR3 además reconoce ARN genómico de reovirus, ARNdc producido durante la replicación de ARNsc, partículas virales tales como el virus respiratorio sincicial, el virus de la encefalomiocarditis, el virus del Nilo y ciertos ARNi (Pothlichet y col., 2013; Blasius & Beutler, 2010). La activación de TLR3 desencadena una respuesta inmune antiviral a través de la producción de IFN-I y citocinas proinflamatorias, lo que sugiere que TLR3 tiene un rol esencial en prevenir las infecciones virales. Consistente con esta idea, ratones

deficientes en TLR3 son susceptibles a infecciones letales con citomegalovirus murino (Tabeta y col., 2004) y la deficiencia de TLR3 en humanos, está asociada a una mayor susceptibilidad al virus del herpes simple tipo 1 (HSV-1) (Kropp, y col., 2014; Zhang y col., 2007).

Resumiendo, durante el curso de una infección viral, el virus de ARNsc puede emplear la replicación positiva de la cadena sentido a través de un intermediario ARNdc y también puede producirse ARNdc a partir de la transcripción bidireccional del genoma de virus de ADNdc. Como consecuencia en ambos casos, estos intermediarios de ARNdc podrán ser detectados por TLR3 (Son, y col., 2015), dando como resultado una redundancia en el sensado de virus de ARN a través de TLR7 y TLR3, y de virus de ADN vía TLR9 y TLR3. Aunque es importante destacar que la diversificación en las vías de señalización que activan TLR3 vs. TLR7 y 9 también permiten cierto grado de selectividad en la respuesta que se va a desencadenar luego de la infección por diferentes tipos de virus (Chattopadhyay & Sen, 2014).

TLR3

TLR3 es un receptor transmembrana tipo I con un dominio extracelular N-terminal, una simple hélice transmembrana, y un dominio de señalización citoplasmático C-terminal de la familia TIR. El ectodominio de TLR3 se localiza en el interior del endosoma y se une a ARNdc y produce así transducción de señales que desencadenan una respuesta inflamatoria y adaptativa antiviral (Matsumoto y col. 2015).

Estudios cristalográficos demostraron que TLR3 reconoce ARNdc viral a nivel molecular (Y. Wang, 2010). El ectodominio de TLR3 se describe como motivo α hélice compuesto por 23 LRR en tándem, formando una herradura, cuya porción N-terminal se encuentra enriquecida con 15 glicanos y posee también una superficie libre de éstos capaz de interactuar principalmente con las cadenas de azúcares más que con las bases púricas/pirimidínicas de la secuencia de ARNdc (Liu y col., 2008; Pirher y col., 2008) (Figura I.2). El correcto plegado del receptor y una buena interacción con su ligando requieren de condiciones medianamente ácidas, tales como los valores de pH encontrados en endosomas tempranos y tardíos (pH alrededor de 6,6 a 5,5 respectivamente) (Qi y col., 2012). Dichas condiciones favorecen también la dimerización del receptor para formar un complejo estable, lo cual requiere que interaccionen ambos sitios de unión con un único oligonucleótido de entre 46 a 50 pares de bases de longitud (Pirher, y col., 2008). Es interesante el hecho de que la interacción ARNdc/TLR3 no produzca cambios

conformacionales en el receptor, sino que facilita y estabiliza la homodimerización, permitiendo que los dominios intracelulares de los monómeros de TLR3 se aproximen entre sí (Y. Wang y col., 2010). Por lo tanto, segmentos cortos de ARNdc, tales como aquellos presentes en ARN transferencia propios, micro ARN, y ribosomas, no podrían activar TLR3 debido a que el ARNdc sólo pueden formar complejos estables con TLR3 interaccionando con ambos sitios de unión presentes en ambas moléculas del dímero, lo cual requiere una longitud mínima de 45 pares de bases (Chattopadhyay & Sen, 2014).

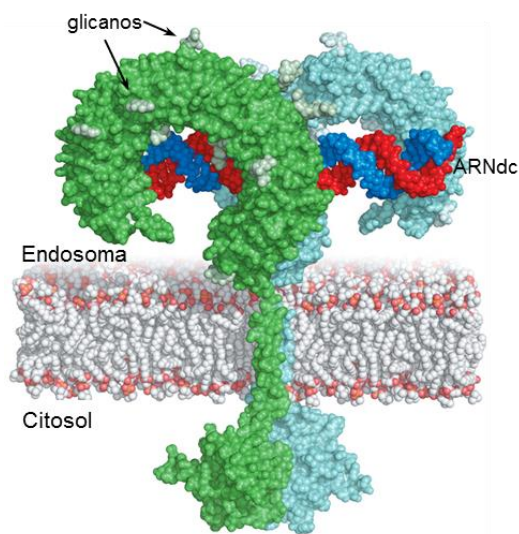


Figura I.2. Estructura de TLR3. Típicamente, tras la unión del ARNdc, dominios extracelulares de dos TLR3 se aproximan y dimerizan formando una estructura tipo "m", intercalando al ligando entre ellos. De esta manera, tanto los ectodominios transmembrana como los dominios citoplásmicos quedan en estrecha proximidad y permiten la interacción con las moléculas adaptadoras, desencadenando la cascada de señalización. Adaptado de Liu y col., 2008.

POLIMORFISMOS EN TLR3

Se han reportado hasta el momento 3 mutaciones naturales sin sentido autosómicas dominantes o recesivas en TLR3 (P554S, L360P, G743D+R811I), en pacientes que presentan un síndrome clínico caracterizado por encefalitis recurrentes (HSE) por el HSV-1 (Lim y col., 2014). Esta enfermedad se presenta principalmente en la primera etapa de la infancia, en niños de 3 meses a 6 años de edad, durante la infección primaria con HSV-1 (virus de ADNdc con intermediarios de ARNdc). Curiosamente, este síndrome de inmunodeficiencia conduce a una mayor susceptibilidad sólo para HSE y no a enfermedades causadas por otros patógenos (Zhang y col., 2007). El defecto funcional en pacientes con deficiencia en UNC93B1 (que codifica una molécula en la vía de procesamiento de TLR3) o en algún componente de la vía de señalización de TLR3 (TLR3-TRIF-TRAF3) es el resultado de una menor capacidad de liberar IFN-I por parte de células residentes del sistema nervioso central y nervios periféricos. Asimismo, pacientes con mutaciones autosómicas dominantes en TRAF3 (*TNF receptor-associated factor 3*), mutaciones autosómicas recesivas en UNC93B1, y mutaciones autosómicas

dominantes o recesivas en TRIF (*Toll like receptor adaptor molecule 1*), también son susceptibles a desarrollar HSE (Sancho-Shimizu y col., 2011). Ensayos *in vitro* con fibroblastos derivados de pacientes con HSE han demostrado que dicha inducción es dependiente de TLR3 (Netea y col., 2012; Lim y col., 2014).

Recientemente se han reportado al menos dos polimorfismos de un solo nucleótido (SNP, *single nucleotide polymorphism*) en TLR3 (L412F y rs13126816) que están asociados con un mayor riesgo a desarrollar diabetes mellitus tipo 1. Ambos polimorfismos afectan la actividad de TLR3 en células hematopoyéticas de los pacientes y conllevan a una secreción deficiente de IFN-I en respuesta a infecciones virales con tropismo específico por el páncreas (como coxsackievirus B y enterovirus) (Assmann y col., 2014).

En relación al cáncer, un estudio poblacional había demostrado previamente que pacientes con cáncer colorectal con estadio II, portadores del SNP en el gen TLR3 (L412F, rs3775291), tenían una tasa de supervivencia disminuida en comparación con los pacientes portadores del genotipo wt (Castro y col., 2011). A su vez, nuevos reportes sugieren que la variación genética en moléculas involucradas en la vía de señalización de IFN-I desempeña un papel importante en la etiología, susceptibilidad y la supervivencia de pacientes con cáncer colorectal (Lu y col., 2014).

Un reciente estudio poblacional de meta análisis sobre cuatro SNP en TLR3, indicó que el genotipo variante de TLR3 rs5743312 (C9948T, intrón 3) se asoció significativamente con un aumento del riesgo a contraer cáncer (carcinoma nasofaríngeo, melanoma, cáncer oral) en comparación con el alelo wt en la población asiática (B.-G. Wang y col., 2015). Aunque todavía se desconoce cómo y a qué nivel influenciaría negativamente dicho SNP sobre la funcionalidad de TLR3.

Por otro lado, se ha reportado que la herencia homocigota del alelo G en el gen TLR3 que contiene el SNP rs10025405, se asocia con una marcada disminución del riesgo a contraer cáncer de mama en mujeres afroamericanas. Aún no está del todo claro si dicho SNP presente en la región flanqueante 3' del gen TLR3 podría modificar positivamente la expresión del ARNm o su procesamiento, resultando en efectos beneficiosos aguas abajo sobre el reconocimiento de AN microbianos, la señalización intracelular, y/o el procesamiento y la degradación endosomal/lisosomal de TLR3 (Yeyeodu y col., 2013).

EXPRESIÓN DE TLR3

TLR3 endosomal es principalmente expresado por una amplia gama de células del

sistema inmune tales como células mieloides, CD, células de origen linfoide (B, T y NK) y mastocitos, cuya activación tiene en su gran mayoría efectos pleiotrópicos inmunoestimulantes (Salem y col., 2014).

El análisis de expresión de ARNm para TLR3 en distintas subpoblaciones de CD humanas demostró que este transcrito se expresa selectivamente en CD de linaje mieloides, incluyendo CD derivadas de monocitos humanos (CDDM) y CD BDCA1+ de sangre periférica, pero no en CDp (Gauzzi y col., 2010). En ratón, TLR3 se expresa fundamentalmente en subpoblaciones de CD convencionales (CDc) CD8 α + y CD migratorias CD103+ pero no en CDp (Kaisho, 2012). Tanto las CDc CD8 α + como CD103+ están altamente especializadas para producir IFN- β vía TLR3 y realizar eficientemente la presentación cruzada de antígenos (péptidos derivados de antígenos exógenos son presentados en el contexto de moléculas de complejo mayor de histocompatibilidad “CMH” clase I) (Jelinek y col., 2011; Szeles y col., 2015). Se ha reportado que la activación de TLR3 en CD CD8 α +, aumenta su supervivencia y promueve la presentación cruzada de antígenos tumorales a LiT CD8 citotóxicos (Joffre y col., 2012). Recientemente, Broz y colaboradores reportaron tanto en modelos murinos como en 12 tipos diferentes de cáncer humanos, que la función de CD CD103+ es crucial para desarrollar una efectiva respuesta citotóxica antitumoral y además su presencia en tumor se correlacionó con un considerable aumento en la supervivencia de los pacientes (M. L. Broz y col., 2014).

Otras poblaciones de origen mieloides como M ϕ , también pueden expresar niveles considerables de TLR3. En un modelo de carcinoma de pulmón de Lewis, los ratones tratados con poli I:C tuvieron regresión tumoral mediada por la conversión de los M ϕ M2 (F4/80+Gr1-) en M ϕ supresores de tumor M1, secretando grandes cantidades de citocinas proinflamatorias como TNF- α , promoviendo la necrosis hemorrágica del tumor y la consecuente supresión del crecimiento (Shime y col., 2012).

Las células del linaje linfoide también han sido reportadas para expresar TLR3. En ratón, se ha descrito que luego de la estimulación del TCR, LiT CD4+ disminuyen la expresión de TLR2 y TLR4 mientras que aumentan la expresión de TLR3 y TLR9. TLR3 en LiT CD4+ humanos induce indirectamente la expresión de CD38 y CD69. Además la estimulación del TLR3 en las células T CD4+, es capaz de inducir NF- κ B y MAPK, promoviendo su supervivencia, mejorando la producción de IFN- γ y quimiocinas como CXCL10, CCL3, CCL4 y CCL5 tras su activación vía TCR (Reynolds & Dong, 2013). Del mismo modo, Tabiasco y colaboradores reportaron que LiT CD8 humanos

efectores pero no naïve o de memoria central, expresan constitutivamente TLR3 y que luego de la estimulación dependiente e independiente del TCR, aumenta directamente la producción de IFN- γ sin afectar su proliferación o actividad citotóxica (Tabiasco y col., 2006). Por lo tanto los ligandos TLR3 no sólo pueden influir indirectamente en la respuesta inmune adaptativa a través de la modulación de la activación de las CD, sino también aumentar directamente la producción de IFN- γ por LiT CD8 antígeno específicos. También se ha detectado la expresión de TLR3 en LiT $\gamma\delta$ humanos y sirve de señal coestimuladora para la producción de IFN- γ (Reynolds & Dong, 2013). Además, células CD56+ NKT aisladas a partir de sangre periférica humana exhiben una expresión inducible de TLR3, importante para mediar su activación y favorecer la producción de citocinas proinflamatorias.

Los mastocitos son células que derivan de células madre CD34+ capaces de migrar a sitios inflamación y regular la respuesta inmune innata a través de la producción de citocinas, leucotrienos y otros mediadores de la inflamación (Nelissen y col., 2013). Se ha demostrado que los mastocitos son capaces de producir IFN-I a través de TLR3 luego de la exposición a virus sincicial respiratorio, virus de la influenza, reovirus tipo 1 y también a poli I:C, favoreciendo el reclutamiento y la respuesta de LiT citotóxicos (Beghdadi y col., 2011).

TLR3 también se encuentra expresado en queratinocitos de la capa basal de la piel humana normal y la estimulación *in vitro* con TNF- α e IFN- γ , aumenta su expresión (Begon y col., 2007; J.-Q. Chen y col., 2015). Además, se ha demostrado que la activación de TLR3 en queratinocitos estimula la expresión de varios genes clave en la reparación de la permeabilidad dérmica en pacientes con dermatitis atópica y psoriasis (Feingold, 2015). Por el contrario, se ha reportado que los niveles de TLR3 son elevados en muestras de biopsias de músculo de pacientes con miopatías inflamatorias asociadas a virus de inmunodeficiencia humano, sugiriendo un papel deletéreo de TLR3 en enfermedades inflamatorias musculares (Amarante & Watanabe, 2010).

Está claro que la expresión de TLR3 no está restringida únicamente a las células del sistema inmune. Otros tipos celulares tales como fibroblastos, células endoteliales y epiteliales, incluyendo las células transformadas derivadas de éstas, también pueden expresar diferentes niveles de TLR3. Actualmente, existen muy variados y controversiales datos funcionales acerca de la participación y el rol biológico que cumple TLR3 expresado en las propias células tumorales.

En 2010, Bergé y colaboradores demostraron que el tratamiento *in vivo* con ARNi

en modelos murinos de adenocarcinoma hepatocelular, activa el TLR3 presente en las células endoteliales hepáticas, inhibiendo su función y limitando la remodelación de la vasculatura tumoral (Bergé y col., 2010). Además, el tratamiento con poli I:C redujo el flujo sanguíneo de las arterias hepáticas, indicando que TLR3 puede mediar propiedades antiangiogénicas directamente en las células endoteliales (Grote y col., 2013). Por el contrario, se ha reportado que la activación de TLR3 en células de cáncer de próstata PC3 aumenta la expresión de la isoforma I.3 del factor de transcripción HIF-1 α (*hypoxia-inducible factor1*), promoviendo su acumulación nuclear en condiciones de normoxia, y consecuente secreción de la citocina proangiogénica VEGF (Paone y col., 2010).

En pacientes con carcinoma oral de células escamosas una alta expresión TLR3 se correlaciona significativamente con una pobre diferenciación y la invasión perineural. La estimulación con poli I:C de células cancerosas orales TLR3+ causa la fosforilación de I κ B e IRF3 y secuencialmente induce la secreción de IL-6 y CCL5, promoviendo la metástasis (Yu y col., 2013). Zhang y colaboradores examinaron el efecto de la activación de TLR3 en la metástasis de carcinoma nasofaríngeo y concluyeron que la activación de TLR3 disminuye la expresión del receptor de quimiocinas CXCR4 de una manera dosis dependiente, inhibiendo la migración celular en respuesta al ligando SDF-1 α (*stromal cell-derived factor-1 α*) en ensayos de quimiotaxis (Basith y col., 2012). Además, la activación de TLR3 redujo significativamente la capacidad de las células de carcinoma nasofaríngeo para formar metástasis en nódulos linfáticos drenantes cuando se inyectan en ratones atímicos nude (Amarante & Watanabe, 2010). En otro estudio, se ha reportado que pacientes con carcinoma hepatocelular cuyo tumor expresa altos niveles de TLR3 tienen una media de sobrevida 17 veces mayor que los pacientes que presentan bajos niveles de expresión TLR3 intratumoral (Chew & Abastado, 2013). Así, dicha expresión de TLR3 se correlacionó no sólo con la sobrevida del paciente, sino también con la producción de quimiocinas y con la densidad intratumoral de LiT y NK (Chew & Abastado, 2013).

El análisis retrospectivo de un ensayo llevado a cabo entre 1982 y 1986 en 517 pacientes con cáncer de mama mostró que las pacientes cuyo tumor expresaban TLR3, manifiestan una disminución del riesgo de recidiva metastásica (2 veces) en el tratamiento combinado de radiación locorregional y poli (A:U) como adyuvante, en comparación con los pacientes tratados con quimioterapia (ciclofosfamida, metotrexato y fluorouracilo) (Salaun y col., 2011). Asimismo, se propuso que la expresión de TLR3 en cáncer de mama mediaría un efecto directo citostático/citotóxico en el propio tumor (Ridnour y col., 2013).

Recientemente se ha demostrado que el tratamiento *in vivo* con poli I:C de tumores inducidos con células de cáncer de próstata sensibles a andrógenos inhibe el crecimiento a través de un efecto apoptótico directo e independiente del sistema inmune (Gambara y col., 2015). La inducción de IRF3 vía TLR3 en la propia célula tumoral, activa tanto la vía apoptótica intrínseca (mediante la interacción directa de IRF3 con Bax) como la extrínseca (promoviendo la transcripción de la proteína pro apoptótica Noxa).

Es por esto que TLR3 tienen gran valor potencial en la terapia y prevención de distintas enfermedades, tomando fuerza en los últimos años la necesidad de identificar las propiedades de compuestos agonistas para favorecer la actividad de TLR3 sobre distintas poblaciones celulares que lo expresan y promover sus variados mecanismos efectores.

TRÁFICO Y PROCESAMIENTO DE LOS TLR INTRACELULARES

Los TLR intracelulares en ratón son expresados dentro del retículo endoplásmico (RE), endosomas, cuerpos multivesiculares o en lisosomas. No obstante, la activación sólo ocurre dentro de compartimentos endolisosomales acidificados, ya que la respuesta de TLR3, TLR7, TLR8 y TLR9 son anuladas por bafilomicina A1, cloroquina, o cloruro de amonio, que previenen la acidificación (Häcker y col., 1998; Kuznik y col., 2011). Basado en estudios de microscopía y en el hallazgo de que los carbohidratos en TLR9 maduro carecen de modificaciones postranscripcionales típicamente adquiridas en el Golgi, fue propuesto en un comienzo que los TLR intracelulares eran residentes del RE y que eran translocados rápidamente a endolisosoma luego de su activación (Blasius & Beutler, 2010). Sin embargo, este modelo planteaba dudas respecto a la naturaleza de la ruta de tráfico atípica empleada por dichos TLR y de cómo las células censan ácidos nucleicos antes que los TLR intracelulares sean movilizados a compartimentos endosomales acidificados. El análisis de los carbohidratos de TLR en endosomas demostró que los receptores debían atravesar el aparato de Golgi, revelando que el tráfico intracelular desde el RE era mediado por la vía secretoria clásica para finalmente residir en endolisosoma previo a la estimulación (Toscano y col., 2012).

Se han asociado muchas proteínas chaperonas con los TLR intracelulares a nivel de RE y que son requeridas para una eficiente translocación. Tal es el caso de GP96 (también conocida como GrP94), la homóloga en RE de la familia Hsp90, que actúa en el RE como chaperona para inmunoglobulinas IgG, algunas integrinas y TLR, ya que Mφ deficientes en GP96 son incapaces de responder a ligandos de TLR1, 2,4, 5,7 o 9

(Kawasaki & Kawai, 2014). Asimismo, PRAT4A (también conocida como Cnpy3) es responsable del tráfico de TLR1, 2, y 4 desde RE a la membrana plasmática, y de TLR7 y 9 de RE a endolisosoma, aunque pareciera no ser necesaria para el tráfico de TLR3 (Sasai & Yamamoto, 2013) (Figura I.3).

Desde un enfoque genético, se demostró que individuos portadores homocigotas de la mutación 3d (del inglés "triple defect"), eran incapaces de responder a ligandos de TLR3, 7, y 9 (es decir, triplemente defectuosa en el sensado de ácidos nucleicos) (Kim y col., 2013). El fenotipo 3d fue atribuido a una mutación en el gen UNC93B1, que codifica una proteína con 12 dominios transmembrana que reside fundamentalmente en el RE (Tabeta y col., 2006; Manoury, 2013). UNC93B1 se asocia a TLR3, TLR7, TLR9, y TLR13 (en ratón) como resultado de una interacción directa con sus dominios transmembrana y media la translocación de estos TLR intracelulares desde el RE a endolisosomas (Gay, y col., 2014). En el caso de TLR3, es capaz de translocar al compartimento endosomal con igual eficiencia en presencia o ausencia del dominio N terminal, dominio que media preferentemente la translocación de TLR9 vs. TLR7. Se ha demostrado que la interacción entre la porción N- terminal de UNC93B1 y el dominio citoplasmático de TLR intracelulares es crucial para el tráfico desde RE a endolisosoma, regulando además la afinidad de la asociación e interacción de TLR con sus respectivos ligandos (Pohar y col., 2014).

Si bien se sabe que la incorporación de ARNdc puede ser mediado por mecanismos de endocitosis dependientes de Clatrina, no está del todo claro si pequeñas cantidades de TLR3 presentes en membrana plasmática podrían facilitar dicha internalización dado que TLR3 se une débilmente a ARNdc en condiciones de pH fisiológico, a diferencia de lo que ocurre con TLR4, el cual es rápidamente endocitado luego de que se une a sus agonistas (Brubaker y col., 2015). Se sabe que poli I:C puede ser internalizado con la ayuda de Raftlin, que interacciona con ácidos nucleicos en la membrana plasmática (Watanabe y col., 2011) o también en complejos con el péptido antimicrobiano LL-37 a través del receptor FPRL-1 (Singh y col., 2014). Se ha descrito que la sobreexpresión de UNC93B1 incrementa las cantidades de TLR3 en membrana plasmática, pero no de TLR7, 8 o 9 (Qi, y col., 2012; Pohar y col., 2014). Asimismo se encontró que si bien el ectodominio de TLR3 puede localizarse a nivel de membrana plasmática, se requiere una localización endosomal para inducir una potente activación (Manoury, 2013; Pohar y col., 2014).

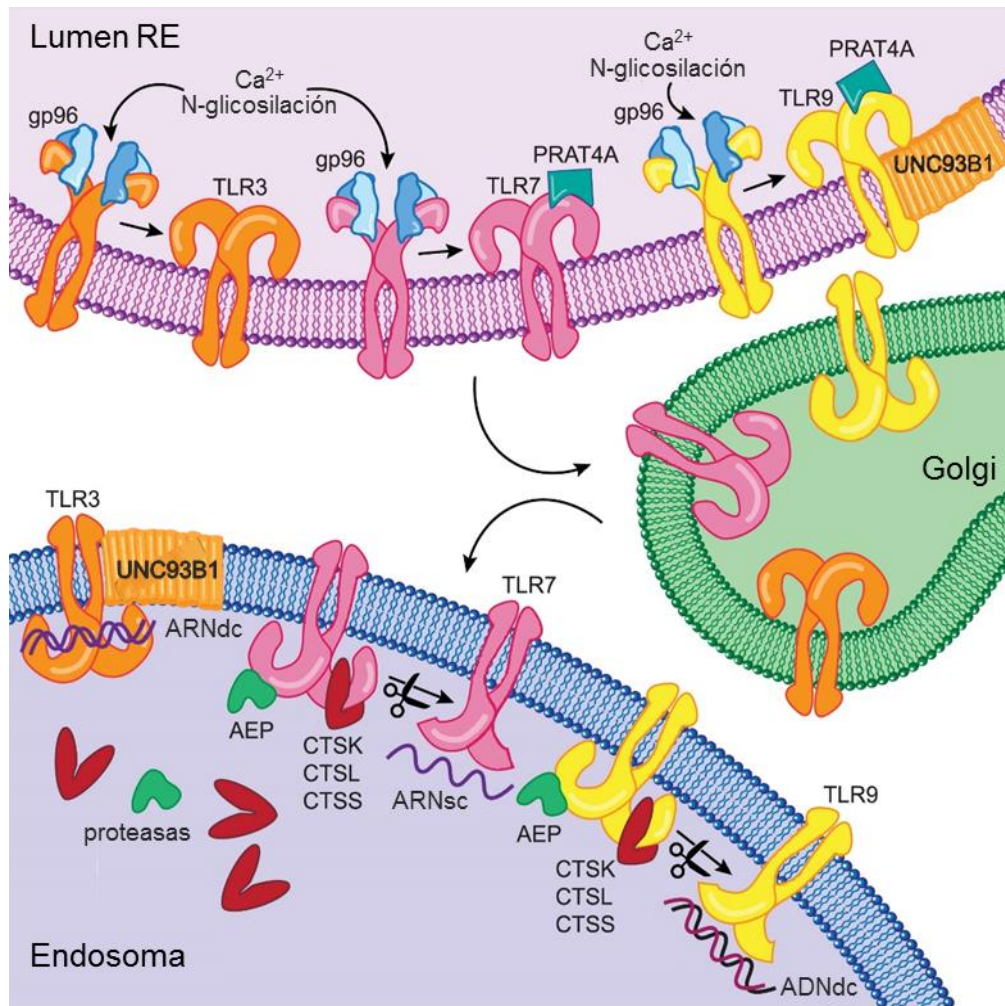


Figura I.3. Tráfico y procesamiento de TLR intracelulares. En el lumen del RE, gp96 promueve el plegamiento apropiado de TLR3, TLR7 y TLR9. Gp96, una chaperona similar a Hsp90, funciona como un dímero en forma de “V” que requiere Ca^{2+} y su N-glicosilación para interactuar con TLR. La hidrólisis de ATP (no representado) es prescindible para la unión a TLR, pero puede ser necesaria para su liberación. Tanto PRAT4A como UNC93B1 son necesarias para exportar desde el ER a TLR3, TLR7 y TLR9. TLR7 y TLR9 compiten por la unión a UNC93B1, que normalmente se une preferentemente a través de una región N-terminal a TLR9. Los TLR transitan a través del Golgi por la vía secretora convencional y se encaminan a endosomas donde pueden encontrar sus ligandos. TLR7 y TLR9 se escinden dentro de sus ectodominios por cisteín proteasas lisosomales, incluyendo las catepsinas relacionadas a papaína (CTSK, CTSL, CTSS) y asparagina endopeptidasa (AEP), una proteasa relacionada a la familia de caspasas y la gingipaina endopeptidasa bacteriana. Mientras que la escisión de TLR7 y TLR9 no es estrictamente necesaria para la interacción con su ligando, pero es esencial para la interacción con MyD88 y la señalización posterior, no se ha observado la escisión de TLR3. Adaptado de (Blasius & Beutler, 2010)

SEÑALIZACIÓN DE TLR INTRACELULARES

Mediante la comparación de las vías de señalización utilizadas por TLR de la superficie celular con las de TLR intracelulares, así como otros receptores intracelulares,

resulta evidente que según la ubicación del receptor dependerá la señal desencadenada (Tomasello col., 2014). Los IFN-I se producen únicamente por el reconocimiento de ligandos presentes en el citosol o en el lumen de los compartimentos intracelulares. En parte, esto refleja la compartimentalización de adaptadores y proteínas involucradas en la señalización (Pandey y col., 2015). Las moléculas adaptadoras de la familia TIR son: TIRAP (o Mal) (*TIR domain containing adaptor protein*), MyD88 (*Myeloid differentiation primary response gene 88*), TRAM (*Toll-like receptor adaptor molecule 2*) y TRIF. Cabe destacar que TIRAP recluta a MyD88, mientras que TRAM funciona como adaptador que recluta a TRIF, activando diferentes vías de señalización (Kawai & Akira, 2010). Por lo tanto, la vía de señalización de TLR puede ser clasificada como MyD88-dependiente o TRIF-dependiente (también denominada MyD88 independiente). MyD88, es universalmente usado por todos los TLR excepto TLR3, mientras que la molécula adaptadora TRIF es utilizada únicamente por TLR3 y TLR4 (Brown y col., 2011).

La unión del ligando a las regiones LRR de los TLR inducen cambios conformacionales que permiten la unión homofílica entre dominios TIR citoplasmáticos de los TLR y de las moléculas adaptadoras MyD88 o TRIF.

MyD88 recluta a IRAK-4 (*IL-1R-associated kinase -4*) a través de la interacción de los dominios de muerte en su porción N terminal. IRAK4 fosforila a IRAK1 e IRAK2, que a su vez activan a la ubiquitina ligasa E3 TRAF-6 (*TNF receptor-associated factor -6*), que en conjunto con UBC13 y UEV1A, se poliubiquitinan a sí mismas y a NEMO (o IKK γ) (*NF- κ B essential modulator*). TRAF6 también activa a TAK1 (*TGF- β activated kinase 1*), que fosforila a IKK β llevando a la degradación del inhibidor I κ B y consiguiente liberación del factor de transcripción nuclear NF- κ B. A su vez, TAK1 también activa la cascada de las MAPK que tras una serie de intermediarios (Erk1, Erk2, p38 y Jnk) culmina con la activación de AP-1. MyD88 también recluta y activa a IRF1 e IRF5. En última instancia, la activación de los factores de transcripción IRF5, NF- κ B y AP-1 induce la transcripción de genes de citocinas proinflamatorias. Los eventos de señalización descritos anteriormente se producen vía activación de TLR7, 8 y 9 en los M ϕ , CDc, células B, y CDp y conducen a la producción de TNF- α , IL-6 e IL-12, pero no de IFN-I (Figura I.4).

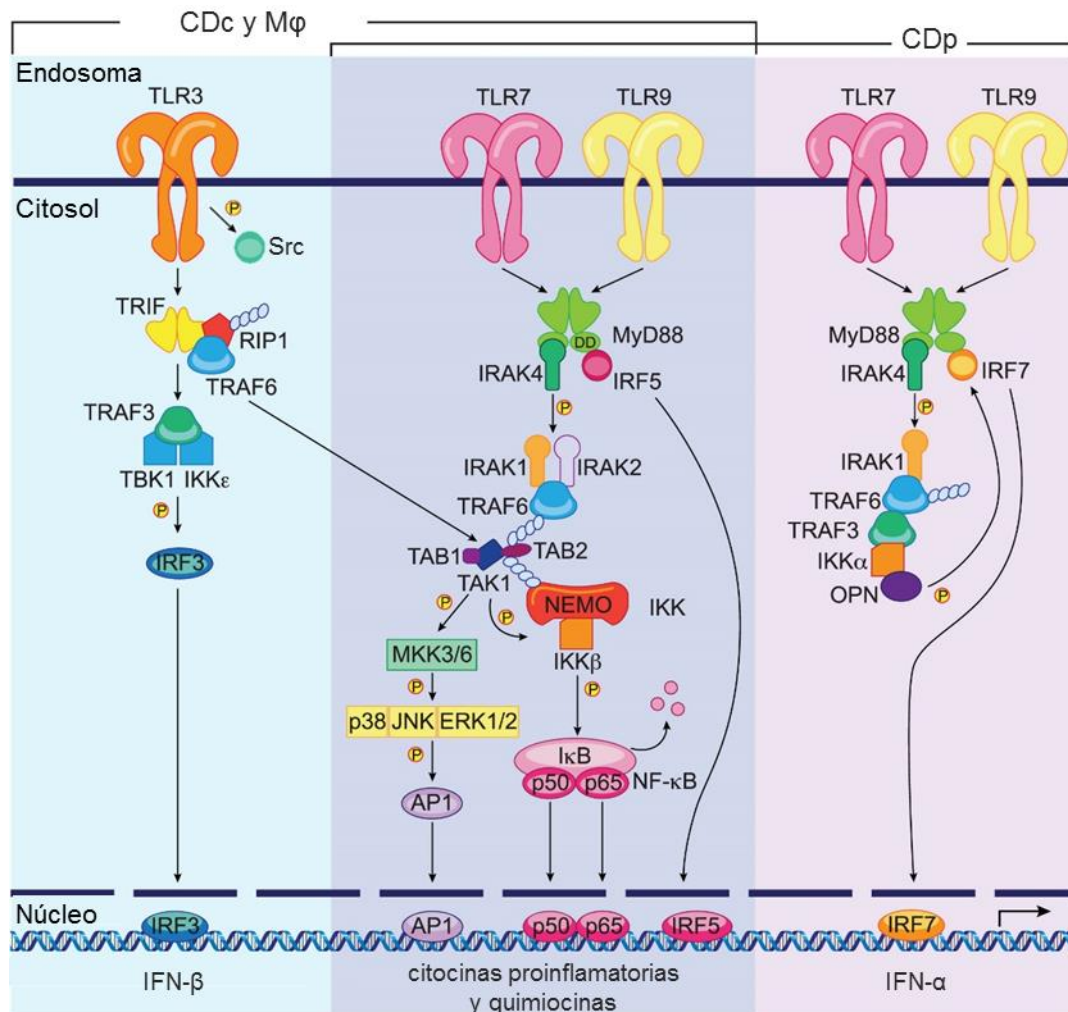


Figura I.4. Vías de señalización de TLR intracelulares. La activación de TLR3, TLR7 o TLR9 por los ácidos nucleicos dentro de endolisosomas inicia cascadas de señalización diferentes y superpuestas en las CDc, los Mφ y CDp. La cascada de señalización de TLR3 induce IFN-β a través de TRIF (izquierda), y también puede activar la vía de NF-κB y MAPK para inducir citocinas proinflamatorias (centro). La activación de TLR7 y TLR9 puede desencadenar la inducción de citocinas proinflamatorias vía MyD88 (centro). Las CDp utilizan una vía distinta para inducir grandes cantidades de IFN-I (derecha). Figura adaptada de Blasius y Beutler (2010).

En cambio, en CDc y Mφ la cascada de señalización de TLR3 se inicia a través de TRIF. La interacción de TRIF con TRAF6 y RIP1 (*receptor-interacting proteins*), permite a su vez la formación de un complejo con TRAF3 para activar a TBK1 e IKKε, quienes fosforilan a IRF3. IRF3 fosforilado dimeriza y transloca al núcleo para iniciar la transcripción de IFN-β [y también de IL-27, en CDc (Gauzzi y col., 2010)]. Luego de la activación de TLR3, TRAF6 y RIP1 también pueden activar NF-κB y la vía de las MAPK para inducir citocinas proinflamatorias y quimiocinas. A su vez, la activación de TLR3 promueve la fosforilación y activación de Src (*sarcoma non-receptor tyrosine kinases*),

enzima íntimamente implicada en la regulación de la diferenciación, adhesión y migración celular (Chattopadhyay & Sen, 2014) (Figura I.4). Un estudio demostró la importancia del residuo 759 en la señalización de TLR3, ya que la mutación puntual en el motivo $\beta\beta$ -loop de TLR3 (A795P), impide la unión de TRIF (y por ende la señalización vía IRF3) y favorece la unión de MyD88, promoviendo la activación de NF- κ B vía TRAF6 (Verstak y col., 2013).

Las CDp utilizan una vía distinta para inducir grandes cantidades de IFN-I: la activación de TLR7 y TLR9 en CDp recluta a MyD88 e IRAK4, que luego interaccionan con TRAF6, TRAF3, IRAK1, IKK α , OPN (*osteopontin*) e IRF7. IRAK1 e IKK α fosforilan y activan IRF7, conduciendo a la transcripción de genes inducibles de IFN y a la producción fundamentalmente de IFN- α (Figura I.4).

Resumiendo, todas las vías que conducen a la inducción de IFN-I convergen en la activación de IRF3 o IRF7, que son los factores de transcripción maestros que inducen genes de IFN-I. La mayoría de los tipos celulares expresan constitutivamente IRF3 pero no IRF7, salvo CDp que lo expresan en bajos niveles. Por lo tanto, la expresión de IRF7 requiere la estimulación de IFN-I (Tomasello y col., 2014). Es notable el hecho que TRAF3 sea el único componente de señalización compartido por todas las vías de señalización que inducen IFN-I (Blasius & Beutler, 2010).

AGONISTAS DE TLR3 E INMUNOTERAPIA

Un amplio rango de distintos agentes han sido referidos como inductores de IFN-I, en muchos casos, sin el entendimiento del mecanismo por medio del cual dichos compuestos ejercen su efecto inmunoestimulador. Se conoce que los ARNdc de distintas fuentes, tales como aquellos de origen viral así como oligonucleótidos homopoliméricos de origen sintético, son los principales compuestos reportados para inducir IFN-I (Gosu y col., 2012). No obstante, el empleo de ARNdc para el tratamiento del cáncer ha tenido los más variados resultados. Por ejemplo, el uso de poli I:C induce altos niveles de IFN-I pero también ha demostrado altos niveles de toxicidad en humanos y por lo tanto fue discontinuado su desarrollo para terapia. Generalmente, ha sido asociado que cuanto mayor es la inducción de IFN-I, mayor es la toxicidad, siendo estas propiedades por lo tanto inseparables (Stewart y col., 1972; Zitvogel y col., 2015)

Estudios previos de polinucleótidos han intentado establecer la biodisponibilidad de estos inductores de IFN-I sugiriendo que muchos ARNdc deberían poseer una estructura secundaria de doble hélice en gran parte de su longitud, para ser menos

sensibles al ataque de nucleasas (He y col., 2015). Han sido identificados polinucleótidos de doble cadena que no son complementarios o perfectamente complementarios, que poseen estructuras con "mismatched" o "loop-out", y que existen naturalmente en numerosos ARNdc. Generalmente, es deseable que los polinucleótidos sean resistentes a la actividad de nucleasas de manera tal de preservarse como macromolécula por suficiente periodo de tiempo, para ejercer su función (Allison & Milner, 2014). Como resultado, se han desarrollado derivados menos potentes de poli I:C, como Ampligen® (Hemispherx Biopharma) e Hiltonol® (Oncovir Inc) (Aranda y col., 2014).

Ampligen® (también conocido como rintatolimod® o poli I:C12U), es una cadena sintética de ARNdc de ácido poliriboinosínico-poliribocitidílico, en donde algunas bases citosina en la secuencia poliI-poliC son reemplazadas por uracilo (generando zonas de mismatched), que lo hacen menos susceptible al ataque de nucleasas. *In vitro*, Ampligen® no sólo activa CD (ya sean provenientes de un paciente sano o con cáncer) para promover respuesta Th1, sino que también tiene un efecto directo citostático/citotóxico contra un gran espectro de células tumorales. *In vivo*, Ampligen® ha sido capaz de inhibir el crecimiento de un gran panel de neoplasias (al menos parcialmente), tanto en modelos animales inmunodeficientes como inmunocompetentes (Vacchelli y col., 2013). En éstos últimos, pareciera ser la forma multimodal la que promovería la activación de células NK, la conversión de Mφ pro-tumorales en su contraparte anti-tumorales, ejerciendo además un efecto directo citostático/citotóxico en las células cancerosas. Es de notar, que todas estas respuestas se han mostrado suprimidas en ratones deficientes en Ticam^{-/-} pero no en Myd88^{-/-} (Akazawa y col., 2007; Shime y col., 2012).

La administración i.v. conjunta de una variante de Ampligen® con un vector de homing para el receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR), seguida de la transferencia i.p. de células mononucleares humanas, promueve la erradicación de tumores preestablecidos diseminados que sobreexpresan EGFR, sin evidenciar efectos tóxicos adversos (Shir y col., 2011). Esto sugiere que direccionando específicamente ligandos de TLR3 a las células tumorales blanco podría aumentar su potencial terapéutico. En ensayos clínicos oncológicos en fase temprana de desarrollo, se ha demostrado que Ampligen® es bien tolerado, incluso durante largos periodos de administración (mayores a un año), y que los pacientes normalmente no desarrollan anticuerpos neutralizantes (Gosu y col., 2012). Hoy en día, Ampligen® está siendo probado en combinación con una vacuna peptídica en pacientes con cáncer de mama HER2 positivos (NCT01355393), con lisados de células tumorales autólogas en pacientes afectados por neoplasias del tracto

reproductivo (NCT01312389), o con Celecoxib®, IFN- α e Hiltonol® en pacientes con cáncer colorectal resecable (NCT01545141) (fuente www.clinicaltrials.gov).

Hiltonol®, también conocido como poli IC:LC, es una formulación particular de poli I:C que incluye carboximetilcelulosa y poli-L-lisina como agentes estabilizantes (Matsumoto y col., 2015). Hiltonol®, ha demostrado ser entre 5 a 10 veces más resistente a la degradación por hidrolasas séricas que Ampligen®, exhibiendo una temperatura de desnaturalización cercana a 40 °C o mayor. En línea con estas nociones, Hiltonol® ha demostrado elevar significativamente los niveles de IFN- γ circulante en primates, en condiciones en las que una dosis equivalente de Ampligen® falló en hacerlo, y ejerciendo además un potente efecto inmunoestimulador en múltiples modelos preclínicos, incluyendo ratones, ratas, conejos, monos y chimpancés (Gosu y col., 2012).

Numerosos ensayos clínicos fase I/II probaron la seguridad y eficacia de Hiltonol® (a menudo en protocolos de vacunación como único agente o combinado a otros) en múltiples y variadas indicaciones oncológicas: incluyendo enfermedades hematológicas malignas, tumores cerebrales, melanoma, carcinoma de ovario, cáncer renal y otras neoplasias avanzadas (Aranda y col., 2014). Con la excepción de un único estudio, reportando una toxicidad sustancial y ausencia de beneficios clínicos en pacientes con carcinoma de ovario, éstos ensayos clínicos concluyeron que Hiltonol® es seguro y moderadamente eficiente en despertar/impulsar la respuesta inmune antitumoral (Galluzzi y col., 2012). Más recientemente, Hiltonol® ha sido investigado como monoterapia o en combinación con radioterapia para el tratamiento de pacientes con linfoma de células T y B (NCT00880867), en combinación con una vacuna quimérica. Asimismo, Resiquimod (ligando de TLR8) (NCT 01094496), ha sido testado en combinación con una vacuna peptídica en pacientes portadores de neoplasias del tracto reproductivo. Los dos primeros estudios fueron suspendidos sin reportarse mayores detalles, mientras que el último ha sido completado, sin haberse divulgado aún los resultados. Actualmente, la seguridad y eficacia de Hiltonol® está siendo evaluada en alrededor de 20 ensayos clínicos en fase I/II. En todos, a excepción de dos casos, uno en el que Hiltonol® es empleado como agente único en pacientes con glioma (NCT 1188096), y otro en el que se emplea combinado con Celecoxib, IFN- α y Ampligen® en pacientes con cáncer colorectal resecable (NCT 01545141), Hiltonol® es empleado como adyuvante de una vacuna anti cancerígena basada en un péptido celular (www.clinicaltrials.gov). La gran mayoría de las indicaciones oncológicas en que Hiltonol® ha sido testado incluyen neoplasias cerebrales (6), melanoma (4), carcinoma

de mama (2) y cáncer colorrectal (2) (Aranda y col., 2014; Galluzzi y col., 2012; Vacchelli y col., 2013).

Se sabe que poli I:C puede ser reconocido también por los receptores citosólicos RIG-I y MDA-5 lo cual podría explicar en parte su potente inducción de IFN-I y de apoptosis, así como sus efectos tóxicos (Matsumoto y col., 2015). Por el contrario, se ha reportado que dentro de las agonistas específicos de TLR3, poli A:U es el gran candidato ya que puede ser administrado en regímenes de tratamiento que involucren altas dosis (en un corto periodo de tiempo) respecto a otros compuestos de ARNdc. Incluso se propone que poli A:U puede ser empleado a dosis que exceden los 60 mg por paciente por semana, o excediendo 1 o 2 mg/kilogramo por paciente por semana, ajustando el régimen para maximizar los beneficios para el paciente, evitando los efectos tóxicos (Salaun y col., 2011).

Durante las últimas décadas, poli A:U demostró ser seguro pero de eficacia variable como adyuvante en la terapia de cáncer de mama resecable (tanto como formulación única o en combinación con radioterapia), (Lacour y col., 1984; Laplanche y col., 2000) cáncer gástrico localmente avanzado (combinado con 5-fluorouracilo y doxorubicina) (Jeung y col., 2008), carcinoma colorectal resecable (como única formulación) (Figueredo y col., 2008), y otras neoplasias malignas sólidas (Jeught y col., 2014; Kidd y col., 2013). Es importante notar que, los beneficios terapéuticos de poli A:U en combinación con radioterapia locoregional empleado como adyuvante en pacientes con cáncer de mama, (Laplanche y col., 2000) han sido demostrados en pacientes portadores de tumores que expresan TLR3 (Salaun y col., 2011). Esto indica que los niveles de expresión de TLR3 podrían constituir un marcador predictivo de la eficacia de poli A:U, al menos en algunos tratamientos/esquemas oncológicos.

En 2009, Aubin y colaboradores patentaron un análogo sintético de ARNdc viral de alto peso molecular enriquecido en secuencias poli A-poli U, conocido comercialmente como IPH-3102® (Innate Pharma) (Aubin y col., 2009; Basith y col., 2011). IPH-3102® demostró ser capaz de promover la activación y de sostener la respuesta de IFN-I *in vitro*, por lo tanto ejerciendo efectos citotóxicos contra células de melanoma y cáncer de mama. Además, media consistentes efectos inmunoestimuladores *in vivo* en ratón. Extrañamente, y pese a estos alentadores resultados, IPH-3102® aún no ha sido incluido en ensayos clínicos (www.clinicaltrials.gov).

Otros ARNdc testeados incluyen compuestos de poli A:U conocido comercialmente como Polyadenur® (Ipsen Beaufour, Francia), propuesto como

candidato a medicamento en los '80. Polyadenur fue reportado ser altamente polidisperso con un promedio de peso molecular aproximadamente de 500 kDa (Andre, y col., 2008). Otro producto, Poludan® (Lens Pharina) está descrito conteniendo secuencias poli A:poli:U, empleado como inductor de IFN-I para el tratamiento de enfermedades virales oftálmicas (Krasnov y col., 1996). Existen dos patentes de Astral Inc. que describen pruebas sobre la composición de poli A:U y afirman que fracciones de bajo peso molecular (entre 10 a 50 kDa) son responsables del efecto inmunomodulador observado, y de la actividad inductora de apoptosis (L. Wang y col., 2002). Poli A:U ha sido comercializado por distintas firmas como sal de sodio (Innate Pharma, Invivogen), o también como complejo divalente a platino, con el fin de estabilizarlo y potenciar su actividad inductora de IFN-I (Basith y col., 2011). Sin embargo, se sabe que las sales de platino por si mismas poseen una fuerte inducción de IFN-I y otras citocinas (Boscolo y col., 2004).

Resumiendo, al día de hoy, el desarrollo de poli A:U como adyuvante antineoplásico pareciera haber llegado a un punto muerto, ya que no hay ensayos clínicos que estén evaluando su eficacia para el tratamiento del cáncer u otras indicaciones (Aranda y col., 2014; Galluzzi y col., 2012; Vacchelli y col., 2013; www.fda.gov).

En los últimos años, existe un creciente interés por el desarrollo de ARNdc que combinan propiedades inmunoestimulantes (mediante la inducción de IFN-I) con la actividad de silenciamiento génico dirigido a factores inmunosupresores o genes relacionados con el cáncer, conocidos como ARNi bifuncionales (Gomes-Da-Silva y col., 2014). La transfección liposomal de células mononucleares de sangre periférica (PBMCs) con ARNdc contra IL-10, resultó en la inhibición de la expresión de IL-10, y a su vez promovió la maduración de las CD, aumentando la expresión de citocinas proinflamatorias (TNF- α , IL-6, IL-12, IFN- α) y potenciando la proliferación de LiT en cultivos alogénicos (Furset & Sioud, 2007). Asimismo, en un modelo murino de leucemia mieloide aguda, el empleo de ARNdc contra IL-10 en CD pulsadas con antígenos tumorales incrementó la función de LiT citotóxicos específicos que se correlacionó con una disminución en la formación de metástasis y un aumento en la supervivencia (Iversen y col., 2009). Recientemente, en modelos de ratón de cáncer de cuello uterino TC-1, la administración sistémica de un ARNdc contra el oncogén E6/E7 del virus del papiloma humano tipo 16 inhibió el crecimiento tumoral (Khairuddin y col., 2012). Estas observaciones indican claramente que la combinación del silenciamiento de un gen relacionado al cáncer junto con la estimulación vía TLR en células del sistema inmune,

mediada por la misma secuencia de ARNi, puede traer un beneficio terapéutico adicional para el tratamiento del cáncer.

INTERFERONES TIPO I

Los IFN se descubrieron por primera vez hace más de medio siglo como factores de interferencia viral subyacente, es decir que, luego de una infección viral primaria las células se volvían resistentes a una segunda infección con un virus distinto (Mcnab y col., 2015).

Existen tres familias distintas de IFN:

- la familia de los IFN-I comprende una familia de citocinas codificada por múltiples genes (13 subtipos de IFN- α parcialmente homólogos en humano, 14 en ratón), IFN- β (que está codificado por un único gen en humano y ratón) y varios productos de genes individuales menos definidos (IFN- ϵ , IFN- τ , IFN- κ , IFN- ω , IFN- δ y IFN- ζ). Los IFN-I pueden ser producidos por cualquier célula nucleada, y todos son capaces de señalizar a través del receptor heterodimérico IFNAR2/IFNAR1;
- la familia de IFN tipo II consiste en un solo producto génico, IFN- γ , producido predominantemente por LiT y NK, y que puede actuar sobre una amplia gama de células que expresan el receptor (IFNGR);
- la familia de IFN tipo III comprende IFN- λ 1, IFN- λ 2 y IFN- λ 3 (también conocidos como IL-29, IL-28A e IL-28B, respectivamente) y el recientemente identificado IFN- λ 4, que tienen funciones similares a la familia de IFN-I pero con actividad restringida en gran medida a células epiteliales.

Cuando los productos microbianos son detectados por diversos receptores celulares, los IFN-I pueden ser inducidos y reconocidos por IFNAR presente en la propia célula, lo que resulta en un circuito autócrino de retroalimentación positiva (Gautier y col., 2005). Tras la unión de IFN-I a su receptor, múltiples vías de señalización pueden ser inducidas, dando lugar a una amplia gama de efectos biológicos (Mcnab y col., 2015).

La interacción de IFN-I con el heterodímero IFNAR1/IFNAR2 activa TYK2 (*tyrosine kinase 2*) y JAK1 (*Janus kinase 1*), lo que resulta en la activación canónica mediante el reclutamiento y formación de heterodímeros STAT (*signal transducer and activator of transcription*) 1 y STAT2; que pueden migrar al núcleo y asociarse con

IRF9 (*IFN-regulatory factor 9*) para formar el complejo transcripcional heterotrimérico ISGF3 (*interferon-stimulated gene factor 3*), que finalmente se une a secuencias ISRE para activar genes antivirales clásicos (Schreiber & Piehler, 2015). Los IFN-I también pueden señalizar a través de homodímeros STAT1, comúnmente asociados con la vía de señalización mediada por IFN- γ , que se unen a secuencias GAS (γ -activated sequence) y estabilizan la transcripción de genes de citocinas proinflamatorias. A su vez, los IFN-I pueden promover la homodimerización de STAT3, cuya activación transitoria mediada por su corepresor SIN3A (*SIN3 transcription regulator homologue A*) favorece la transcripción de numerosos genes involucrados en la proliferación, supervivencia y genes proinflamatorios; mientras que mediante una activación sostenida suprimen indirectamente la expresión de genes inflamatorios, mediante la inducción de represores transcripcionales aún desconocidos (Ivashkiv & Donlin, 2014) (Figura I.5).

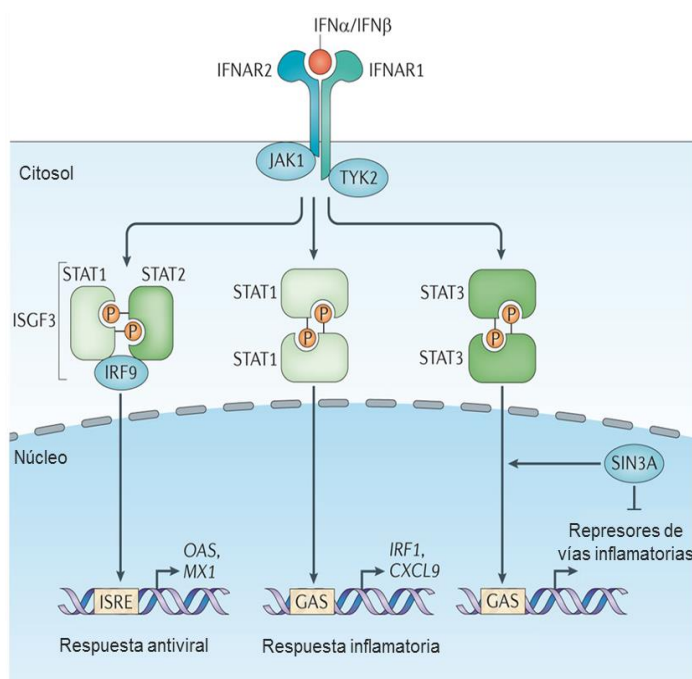


Figura I.5. Vías de señalización de IFN-I. La interacción de IFN-I con el heterodímero IFNAR1/2 activa TYK2 y JAK1, desencadenando principalmente 3 vías de activación: STAT1/2 forman el complejo ISGF3 con IRF9 y activan genes involucrados en la respuesta antiviral como OAS (*2'-5'-oligoadenylate synthase*) y MX1 (*IFN-induced GTP-binding protein Mx1*); homodímeros STAT1, activan genes inflamatorios como IRF1 y CXCL9 (*CXC-chemokine ligand 9*); homodímeros STAT3 activan genes de represores de vías inflamatorias, a menos que se encuentren anclados a su corepresor SIN3A. Adaptado de Ivashkiv & Donlin, 2014.

Además de las tres vías anteriormente mencionadas, los IFN-I son capaces de inducir la formación de homo/heterodímeros STAT4, STAT5 y STAT6, heterodímeros CRKL (*CRK-like protein*) y STAT5, así como la activación de NF- κ B, con múltiples y variadas consecuencias, dependiendo del tipo celular y el contexto (Zitvogel y col., 2015). Por otra parte, IFN-I también pueden desencadenar la cascada de señalización de mTOR (*mammalian target of rapamycin*) vía PI3K

(*phosphoinositide 3-kinase*), participando también en la regulación de procesos metabólicos (Mcnab y col., 2015) y la autofagia (Schmeisser y col., 2014).

Curiosamente, IFN- β (pero no IFN- α) también puede unirse con alta afinidad a homodímeros IFNAR1, y por lo tanto puede inducir un conjunto distinto de señales independientes de IFNAR2, vía JAK1/STAT1. Esto podría ser una explicación de las diferencias biológicas entre IFN- β y IFN- α que aún no han sido estudiadas extensivamente *in vivo* (Fish & Platanias, 2014).

Debido a la amplia gama de efectos mediados por IFN-I, existen múltiples mecanismos encargados de mantener la homeostasis y que regulan su respuesta (tanto en intensidad como en duración) a distintos niveles: de tráfico celular, transcripcional, traduccional, postraduccional y epigenético (Hertzog & Williams, 2013). Dentro de las más caracterizadas se incluyen la disminución de la expresión en la superficie celular de IFNAR, la inducción de reguladores negativos y la inducción de micro ARN que modulan distintos componentes de las vías de señalización (Porritt & Hertzog, 2015). Varios reportes recientes han ampliado nuestra comprensión de cómo se regula la producción de IFN-I (cuadro 2) (Ivashkiv & Donlin, 2014).

Cuadro 2. Nuevas conceptos clave sobre la producción de IFN-I.

- Los niveles basales de IFN-I en condiciones fisiológicas son mantenidos/calibrados por la microbiota comensal.
- La expresión basal de IFN- β mantiene la “tonicidad” de la señalización en IFNAR favoreciendo una rápida respuesta antimicrobiana de las células del sistema inmune.
- IFN-I puede ser inducido por factores y citocinas del huésped tales como el TNF- α (vía IRF1 en lugar de IRF3 o IRF7), M-CSF (*macrophage colony stimulating factor*) y RANKL (*receptor activator of NF- κ B ligand*).
- IFN- ϵ es expresado constitutivamente por el epitelio del tracto reproductivo femenino, y su expresión está regulada por las hormonas sexuales.
- GSK3 (*Glycogen synthase kinase 3*) regula negativamente la producción IFN- β .
- HDAC3 (*Histone deacetylase 3*) es importante para la expresión IFN- β , soportando el rol de la remodelación de la cromatina y los mecanismos epigenéticos en la producción de IFN-I.
- PTPN22 (*Tyrosine-protein phosphatase non-receptor type 22*) que está vinculada a la autoinmunidad, se asocia con TRAF3 para aumentar la producción de IFN-I inducida por TLR.
- mecanismos post-transcripcionales regulan la producción de IFN-I. Los transcriptos *ifna* y *ifnb* contienen varios elementos reguladores de ARN, que confieren estabilidad o inestabilidad dependiendo de los factores de unión a ARN que se asocian.

Adaptado de Ivashkiv & Donlin (2014).

Los IFN tipo I han sido utilizados en terapias antitumorales con un éxito relativo durante más de 30 años debido a la gran cantidad de efectos adversos (B. X. Wang, y col., 2011). Sin embargo, el rol preciso de los IFN-I en la respuesta inmune natural contra el cáncer sólo ha empezado a ser comprendido en la última década (Zitvogel y col., 2015). Hoy en día se conoce que las funciones de los IFN tipo I dependen mucho de su concentración. Así, altos niveles de IFN-I utilizados en terapias antitumorales pueden inducir distintas poblaciones celulares con funciones inmunoreguladoras (Mcnab y col., 2015; Trinchieri, 2010). Por el contrario, niveles fisiológicos de IFN- β endógeno, tienen un importante rol en la inmunovigilancia y en el control del desarrollo tumoral: los ratones deficientes en la señalización por IFN-I presentan una mayor susceptibilidad al desarrollo tumoral, favoreciendo la generación de TAM proangiogénicos (U'Ren y col., 2009). Además, se ha demostrado que el IFN- β endógeno inhibe la expresión de CXCR2/4, limitando el reclutamiento de neutrófilos al sitio del tumor (TAN), reduciendo la secreción de metaloproteinasas y VEGF, neutralizando así el efecto proangiogénico de los TAN y la formación de un nicho premetastásico (Jablonska y col., 2014; Jablonska y col., 2010).

Los IFN-I contribuyen tanto a la maduración como a la diferenciación de las CD (Trinchieri G, 2010). La inducción de bajos niveles de IFN-I durante la estimulación de CD a través de PRR es esencial para una óptima producción del heterodímero de IL-12p70, clave en la inducción de una respuesta Th1 con capacidades antitumorales (Gautier y col., 2005). Además, en 2011 dos trabajos claves demostraron el rol crucial de los IFN-I en inducir el “priming” de LiT CD8 específicos contra antígenos tumorales (Diamond y col., 2011; Fuertes y col., 2011).

Aunque se sabe que los bajos niveles de IFN-I endógeno tienen claros efectos antitumorales, sólo recientemente se comenzó a vislumbrar cómo se estimula la producción de IFN, qué células lo producen, cuáles son sus células blanco y cuál es la importancia relativa en el complejo *milieu* de citocinas antitumorales.

INTRODUCCIÓN AL MODELO EXPERIMENTAL

Los ligandos de TLR3 han sido usados empíricamente en distintos ensayos preclínicos y clínicos de inmunoterapia por varias décadas (Nicodemus & Berek, 2010). Poli A:U demostró ejercer efectos inmunoestimuladores *in vivo* tan temprano como en 1967; aunque no fue reconocido como agonista de TLR3 sino hasta el 2007, cuando poli

A:U fue reportado capaz de estimular CD mieloides para producir IL-12 (T. Sugiyama y col., 2007). Sin embargo, los mecanismos celulares y moleculares que operan en estos escenarios terapéuticos sólo recientemente han comenzado a entenderse.

Resultados previos de nuestro grupo demostraron que la estimulación *in vitro* de líneas tumorales murinas con LPS o poli A:U por 24 hs, y posterior inoculación en cepas de ratones singénicas, disminuye el crecimiento tumoral *in vivo* en ratones wt, TLR4^{-/-} y TLR3^{-/-} pero no en ratones IFNAR1^{-/-} (Gatti y col., 2013; Núñez y col., 2012). Estos resultados indicaron que LPS y poli A:U son adyuvantes efectivos capaces de actuar directamente sobre el TLR presente en la propia célula tumoral e inducir la producción de IFN-I, y que éste actuaría sobre el receptor IFNAR en células del huésped para producir una respuesta adaptativa antitumoral.

También se demostró que líneas tumorales humanas responden a la estimulación con ARNdc, produciendo niveles detectables de IFN-β, capaces de activar STAT1, mejorando la expresión de CXCL10, CD40, y CD86 en CD derivadas de monocitos humanos, y por consiguiente promover la producción de IFN-γ en cultivos alogénicos de LiT (Gatti y col., 2013).

Además, cuando se realizó el tratamiento i.t. de poli A:U acompañado a polietilenimina (PEI, un compuesto policatiónico que favorece la internalización de AN sin presentar toxicidad) en ratones TLR3^{-/-} portadores de tumores B16 (en un contexto donde poli A:U sólo puede ser reconocido por el TLR3 presente en las células tumorales), hubo un moderado y transitorio control del crecimiento tumoral (Gatti y col., 2013) (Figura I.6). Estos resultados pusieron en evidencia que en este modelo terapéutico, la activación de TLR3 presente en las células del huésped también estaría implicada en la inhibición del crecimiento, posiblemente contribuyendo en la producción endógena de IFN-I.

Si bien la mayoría de los esquemas experimentales detallados previamente fueron diseñados con la idea de activar los TLR presentes sobre las células tumorales, sólo recientemente se ha comenzado a investigar sobre la contribución particular que células del sistema inmune y las propias células tumorales, pudieran estar efectuando separadamente.

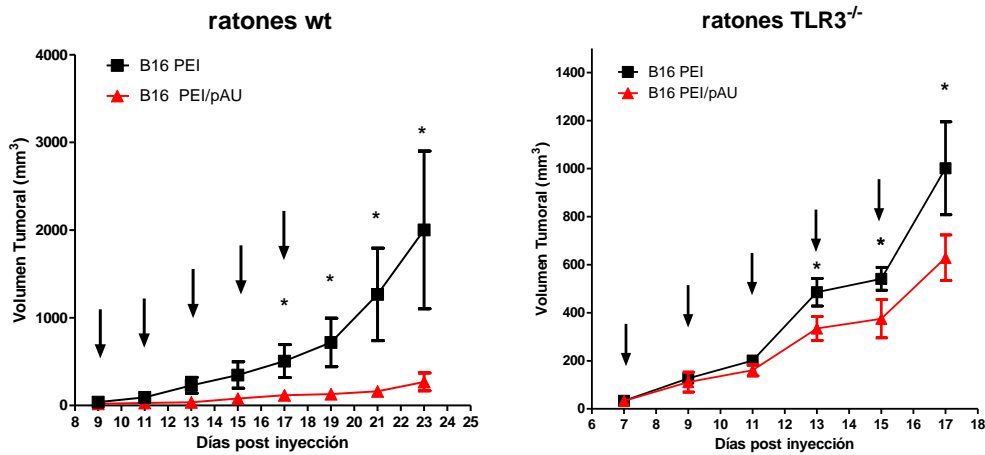


Figura I.6. La estimulación local de TLR3 presente en la célula tumoral produce una inhibición del crecimiento tumoral. PEI o PEI/PAU fue inyectado en el sitio del tumor 5 veces cada 2 días (flechas) en ratones C57BL/6 wt y TLR3^{-/-} portadores de tumores B16. Los resultados son representativos de dos experimentos independientes (media ± SEM) *p<0,05. Imagen extraída de la tesis doctoral de Nicolás G. Núñez.

En la presente tesis, quisimos extender nuestros datos referidos a la capacidad de análogos de ARNdc de generar IFN-β endógeno *in vivo*, focalizándonos en lo que sucede con el compartimiento de células del Sistema Inmune en un escenario terapéutico, en el cual se administra localmente poli A:U desnudo una vez que los tumores están establecidos.

CAPÍTULO II: OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL Y CONSTRUCCIÓN DE LA HIPÓTESIS DE TRABAJO

Nuestro grupo de trabajo tiene como objetivo general estudiar el rol que cumplen los TLR en el microambiente tumoral, con la idea de generar conocimiento relacionado al rol dual que estos receptores pudieran estar cumpliendo según sean activados de forma crónica por ligandos endógenos o en forma aguda como blancos terapéuticos.

Resultados previos del grupo (Andreani y col., 2007; Núñez y col., 2012; Gatti y col., 2013) indican que la célula tumoral frente a la estimulación *in vitro* con agonistas sintéticos, tales como LPS (agonista de TLR4), poli I:C y poli A:U (ambos agonistas de TLR3), puede contribuir positivamente en momentos iniciales de implantación del tumor, modificando el perfil de citocinas producidas, alterando el estado de maduración de las CD presentes en el sitio y mejorando la respuesta inmune antitumoral.

En dichos trabajos previos se demostró que el IFN- β endógeno, presente en niveles fisiológicos, tiene un rol importante en la inmunovigilancia y en el control del desarrollo tumoral. Nuestra hipótesis es que **el tratamiento intratumoral con análogos de ARNdc podría generar mayores niveles de IFN- β endógeno *in vivo*.**

En la presente tesis, quisimos extender los conocimientos referidos a la capacidad de estos análogos de ARNdc de generar IFN- β endógeno, focalizándonos en lo que sucede en un escenario terapéutico, en el cual se administra poli A:U una vez que los tumores están establecidos. Por lo tanto, el objetivo general de la presente tesis fue: **“Generar modelos preclínicos de terapia antitumoral administrando agonistas de receptores tipo Toll 3”**.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

En la primera parte de este trabajo de tesis hemos estudiado cómo responden distintos modelos tumorales murinos al tratamiento intratumoral con poli A:U desnudo. Esto fue llevado a cabo mediante la realización del siguiente objetivo específico:

Objetivo Específico I: Evaluar el efecto de administrar intratumoralmente poli A:U desnudo sobre el crecimiento y la supervivencia en modelos experimentales de cáncer.

Asimismo en una segunda parte, hemos estudiado la contribución particular que las células del sistema inmune ejercen en nuestro modelo experimental. Para ello, desarrollamos el siguiente objetivo específico:

Objetivo Específico II: Analizar el rol de las células del sistema inmune en el modelo terapéutico de administración intratumoral de poli A:U.

En nuestro modelo, quisimos indagar más profundamente si la señalización de los IFN tipo I era crucial para el efecto observado. En este sentido, también quisimos conocer las fuentes de IFN tipo I en el huésped y mediante qué vía se producían. Por ello, nos propusimos los siguientes objetivos específicos:

Objetivo Específico III: Investigar las poblaciones celulares responsables de la generación de IFN- β endógeno necesario para inducir una respuesta inmune antitumoral.

Objetivo Específico III.I: Explorar los mecanismos moleculares que conducen a la inducción de IFN- β en respuesta al tratamiento con poli A:U.

Objetivo Específico III.II: Analizar el rol de la señalización de IFN tipo I sobre las células del huésped en el control del desarrollo tumoral en modelos preclínicos de administración intratumoral de poli A:U.

Por último, quisimos analizar si la terapia combinada de Poli A:U y quimioterapéuticos convencionales permitía disminuir la dosis de estos últimos, manteniendo la eficacia del tratamiento y disminuyendo sus efectos adversos. Para ello nos propusimos el siguiente objetivo específico:

Objetivo Específico IV: Evaluar el efecto de administrar poli A:U desnudo intratumoral en terapia combinada con antineoplásicos tradicionales como modelo terapéutico alternativo.

CAPÍTULO III: RESULTADOS

PARTE I: DESARROLLO DE MODELOS PRECLÍNICOS DE ADMINISTRACIÓN TERAPÉUTICA ANTITUMORAL UTILIZANDO AGONISTAS DE RECEPTORES TIPO TOLL 3

OBJETIVO ESPECÍFICO I: EVALUAR EL EFECTO DE ADMINISTRAR INTRATUMORALMENTE POLI A:U DESNUDO SOBRE EL CRECIMIENTO Y LA SOBREVIVENCIA EN MODELOS EXPERIMENTALES DE CÁNCER.

GENERACIÓN DEL MODELO PRECLÍNICO

Durante el desarrollo de la presente tesis, establecimos un modelo experimental terapéutico de administración intratumoral (i.t.) de poli A:U desnudo (es decir, sin ser acompañado a ninguna otra sustancia tales como liposomas, *carrier*, o nanopartículas), de manera tal de evitar otras variables que pudieran influenciar/complejizar el efecto del tratamiento. Asimismo, nos motivó la premisa de poder direccionar la captación del ARNdc a células que tengan mayor capacidad endocítica (como células del Sistema Inmune, en particular de linaje mieloide) respecto a las células tumorales. Por otro lado, optamos por la administración local del ligando de TLR3, con la idea de poder focalizar nuestro estudio al sitio del tumor, reduciendo la posibilidad de tener efectos sistémicos colaterales

Con el objetivo de establecer el modelo experimental, inicialmente empleamos células de melanoma murino B16 y se inocularon 1×10^6 células subcutáneamente (s.c.) en el flanco derecho trasero de ratones singénicos de la cepa C57BL/6 de entre 8 y 14 semanas de edad. Cuando los tumores alcanzaron un tamaño palpable, alrededor del día 10 post inoculación (p.i.), éstos fueron medidos y los ratones se dividieron en dos grupos de manera tal que los promedios del volumen tumoral en ambos grupos fueran equivalentes antes de iniciar el tratamiento. Los ratones del grupo control, el cual se lo denominó “PBS”, recibieron 4 inyecciones i.t. del vehículo, espaciadas cada dos días (200 μ l de PBS c/dosis), mientras que el otro grupo de ratones fueron tratados con 4 dosis espaciadas cada dos días de 50 μ g de poli A:U en 200 μ l del vehículo (grupo pAU).

El crecimiento tumoral fue monitoreado día de por medio, junto con la sobrevivencia de los ratones en ambos grupos experimentales (tal cual lo detalla la Figura III.1).

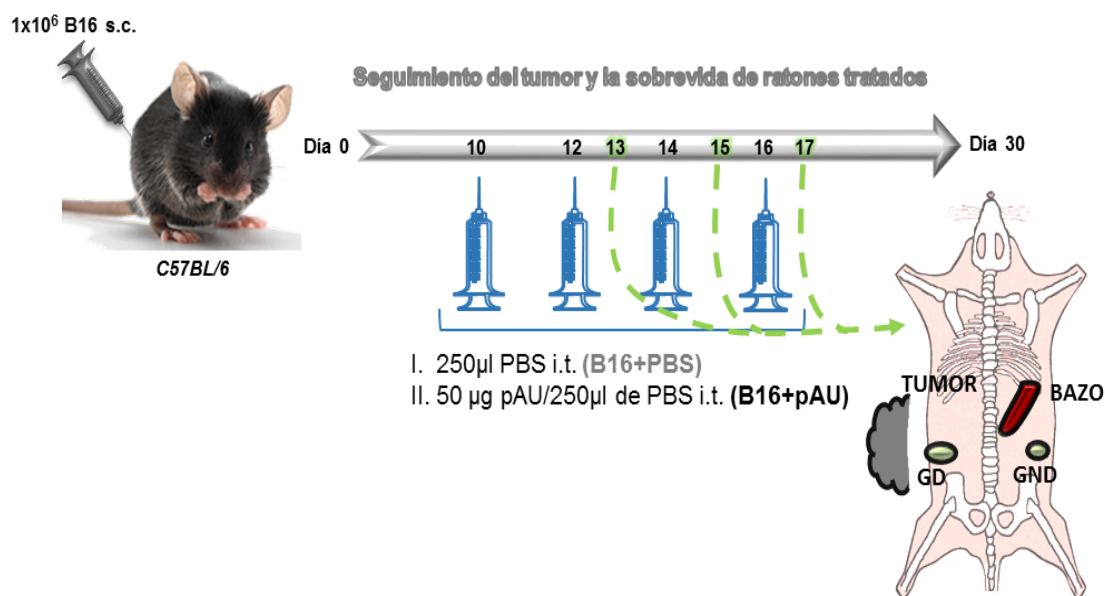


Figura III.1. Diseño experimental. Ratones C57BL/6 inyectados con 1×10^6 células B16 en 250 µl de PBS, fueron tratados i.t. con 4 dosis (cada dos días) de 50 µg de poli A:U en 200 µl de PBS (grupo pAU) o 200 µl de PBS (grupo PBS) ($n= 10$ /grupo) tras la aparición del tumor (día 10 p.i., volumen tumoral $\geq 18 \text{ mm}^3$). El crecimiento y volumen tumoral fue monitoreado día de por medio. Para estudios posteriores, los ratones fueron sacrificados a distintos tiempos habiendo recibido 2, 3 o 4 dosis de tratamiento (días 13, 15 y 17 p.i., respectivamente) y se recuperaron distintos órganos de interés como bazo, ganglio linfáticos inguinales (GD y GND) y tumor.

A medida que fueron administradas las sucesivas dosis de poli A:U, observamos una disminución del volumen tumoral respecto al grupo control, que fue estadísticamente significativa a partir del día 16 p.i. (luego de completado el esquema de 4 dosis) y se hizo más marcada en los días posteriores (Figura III.2-A).

Estas diferencias también pudieron corroborarse a simple vista o incluso al medir el peso de los tumores al día 20 p.i. (Figura III.3). Cabe destacar que si bien en algún caso aislado observamos regresión del tumor (o remisión), en términos generales siempre observamos un retardo o disminución en la cinética de crecimiento tumoral (Figura III.3).

Asimismo, al realizar el seguimiento en el tiempo de ambos grupos observamos que el tratamiento con poli A:U prolongó significativamente la supervivencia de los ratones tratados respecto al grupo PBS; la mediana de supervivencia indicó que mientras el 50 % de los ratones del grupo PBS sobrevivieron hasta el día 23 p.i., aquellos del grupo pAU sobrevivieron hasta el día 34 p.i. (Figura III.2-B). Incluso, mientras que la totalidad de los ratones del grupo PBS murieron al día 28 p.i., el 100 % de los ratones del grupo pAU murieron al día 53 p.i. Dicho de otra forma, el tratamiento i.t. con poli A:U desnudo aumenta significativamente la mediana de vida de los ratones en un 47,8 %.

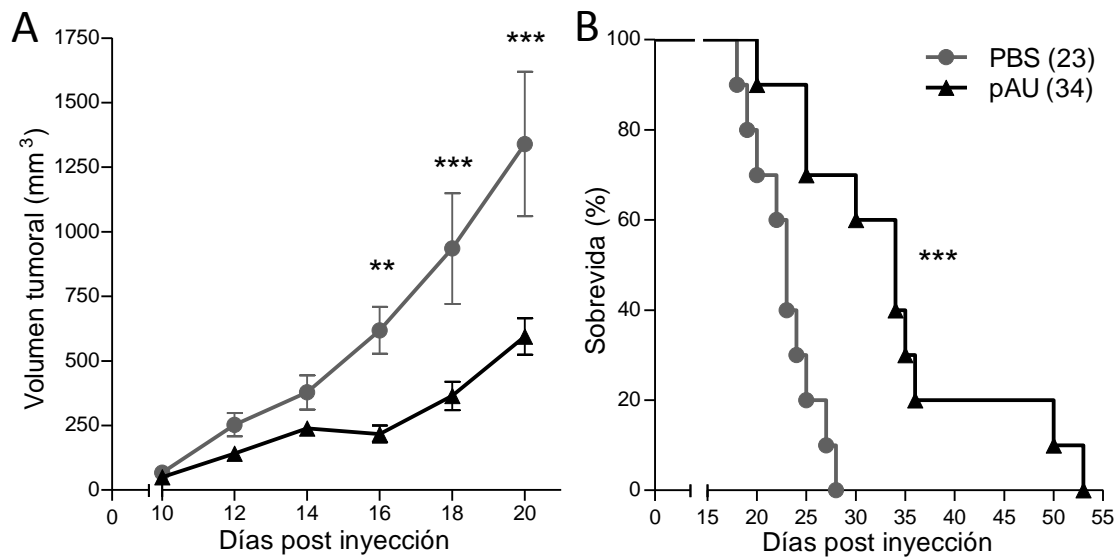


Figura III.2. El tratamiento i.t. de melanoma murino B16 con poli A:U retarda el crecimiento tumoral y aumenta la sobrevida de los animales tratados. A) El crecimiento y volumen tumoral fue monitoreado día de por medio (n= 10 /grupo). ** p< 0,01; *** p< 0,001, mediante ANOVA de dos vías. B) Curva de sobrevida de ratones C57BL/6 tratados según se describe anteriormente, entre paréntesis se indica la mediana de sobrevida para ambos grupos PBS y pAU, días 23 y 34 p.i., respectivamente (n= 10/grupo), las curvas difieren significativamente entre sí: p< 0,001, mediante Test Log-rank (Mantel-Cox).

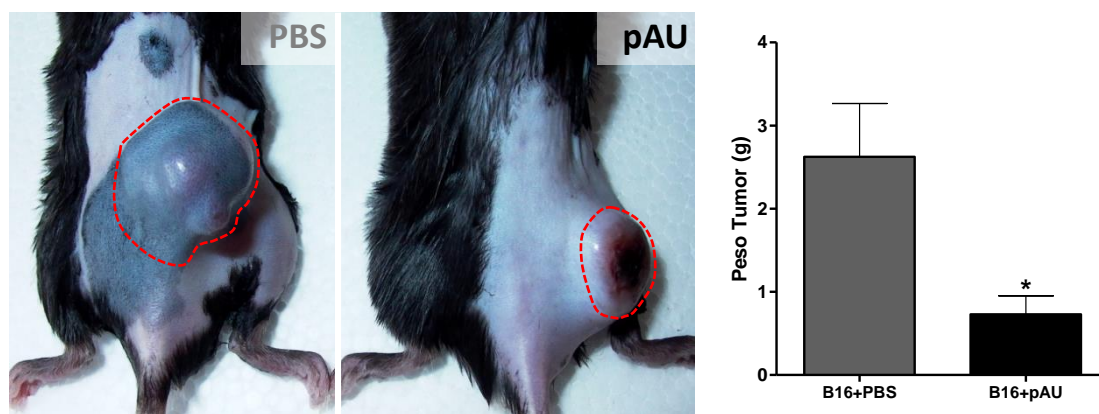


Figura III.3. Poli A:U retarda el crecimiento tumoral en ratones tratados. El panel izquierdo muestra fotografías de 2 ratones C57BL/6 representativos de ambos grupos al día 20 p.i. (de izquierda a derecha, PBS y pAU respectivamente). La línea punteada roja delimita el área correspondiente al tumor. El gráfico de barras muestra una disminución significativa del peso de tumores (media±SD) del grupo pAU respecto al grupo control, al día 20 p.i. * p<0,05; mediante test T (n=10/grupo).

Todos los efectos observados anteriormente nos permitieron pensar que nuestro diseño experimental podría resultar ser una posible estrategia terapéutica para el tratamiento del cáncer. Ahora bien, podría tratarse de un efecto particular sobre esta línea celular, o para el tipo de cáncer evaluado y que no fuera generalizable a otros tipos de tumores.

EFEECTO DEL TRATAMIENTO CON POLI A:U EN OTROS MODELOS TUMORALES SINGÉNICOS EN LA CEPA C57BL/6

Con el objetivo de evaluar si el tratamiento i.t. con poli A:U desnudo era efectivo en otros modelos murinos de cáncer, inoculamos s.c. 5×10^5 células de la línea de carcinoma de vejiga MB49. Debido a que ésta línea posee una cinética de crecimiento más lenta (comparada a la de melanoma B16), el tratamiento consistió en 6 dosis de poli A:U o PBS administradas cada dos días (a partir del día 11 p.i.).

Tal como se observa en la Figura III.4-A, el tratamiento i.t. con poli A:U desnudo retardó significativamente el crecimiento tumoral comparado al tratamiento control luego de 5 dosis, manteniéndose estas diferencias aún al día 29 p.i. Dicho efecto, también se vio acompañado por un incremento significativo en la sobrevida de los animales del grupo pAU respecto al grupo PBS, reflejado en la mediana de sobrevida (58,5 vs 49 días, respectivamente). Más aún, mientras que sólo el 11% de los animales del grupo PBS sobrevivió al día 61 p.i., el 43% de los ratones del grupo pAU seguía con vida (Figura III.4-B). En consecuencia, el tratamiento i.t. con poli A:U de tumores MB49 aumentó en casi un 20% la mediana de vida de los ratones tratados.

Para confirmar nuestra hipótesis de que la disminución tumoral observada fuese generalizable a otros modelos de tumores sólidos, inoculamos s.c. 1×10^6 células de la línea murina de linfoma E.G7ova.

El análisis de las curvas de volumen tumoral indicó un retardo en el crecimiento en el grupo pAU vs PBS, que fue gradualmente significativo a partir del día 20 p.i. (una vez completado el esquema de las 4 dosis) hasta el día 28 p.i. inclusive (Figura III.4-C).

Además, estos cambios también se vieron reflejados en un aumento estadísticamente significativo en la sobrevida de los animales que recibieron poli A:U respecto al grupo PBS, ya que el 50% de los animales sobrevivieron al día 52 y 35 p.i. respectivamente (Figura III.4-D). Por lo tanto, en las condiciones anteriormente ensayadas, poli A:U fue capaz de extender la mediana de vida de los ratones portadores de tumores E.G7ova en un 48,5 % (de forma similar a lo que ocurrió en el modelo B16).

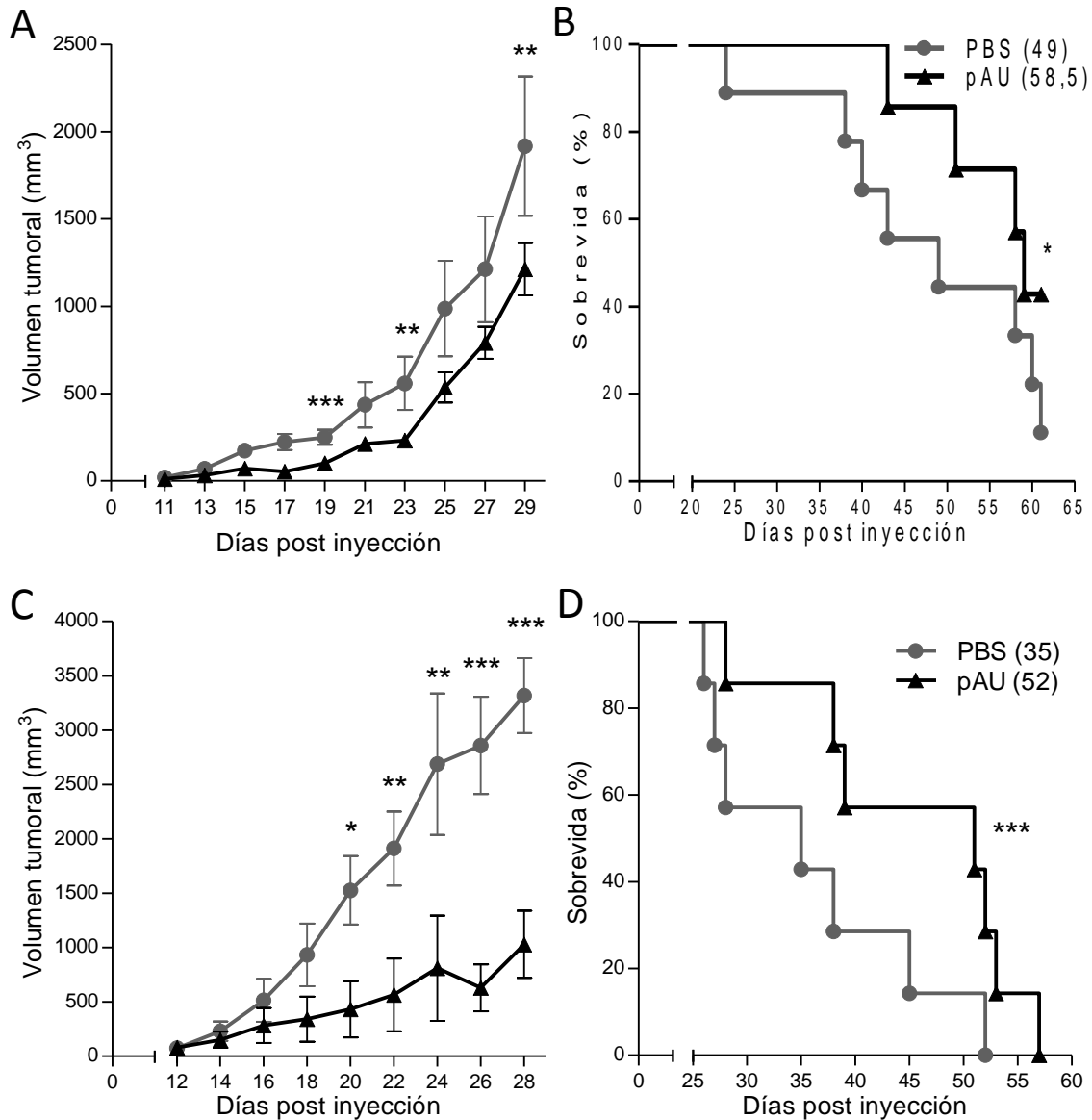


Figura III.4. El tratamiento i.t. con poli A:U de tumores MB49 y E.G7ova retarda el crecimiento tumoral y aumenta la sobrevida de los animales tratados. MB49: **A)** El crecimiento y volumen tumoral fue monitoreado día de por medio (n= 9/grupo). ** p< 0,01; *** p< 0,001, mediante ANOVA de dos vías. **B)** Curva de sobrevida de ratones C57BL/6 tratados según se describe anteriormente, entre paréntesis se indica la mediana de sobrevida de los grupos PBS y pAU, días 49 y 58,5 p.i., respectivamente (n= 9/grupo). Las curvas difieren significativamente entre sí: p< 0,05, mediante Test Log-rank (Mantel-Cox). **E.G7ova:** **C)** El crecimiento y volumen tumoral fue monitoreado día de por medio (n= 9/grupo). * p< 0,05; ** p< 0,01; *** p< 0,001, mediante ANOVA de dos vías. **D)** Curva de sobrevida de ratones C57BL/6 tratados según se describe anteriormente, entre paréntesis se indica la mediana de sobrevida de los grupos PBS y pAU, días 35 y 52 p.i., respectivamente (n= 9/grupo), las curvas difieren significativamente entre sí: p< 0,001, mediante Test Log-rank (Mantel-Cox).

EFFECTO DEL TRATAMIENTO CON POLI A:U EN MODELOS TUMORALES EN LA CEPA BALB/c

Teniendo en cuenta que, los 3 modelos anteriormente descriptos son desarrollados en la cepa C57BL/6 (asociado prototípicamente hacia un perfil de respuesta Th1) (Jones y col., 2013), podría suceder que el efecto de poli A:U estuviese favorecido por dicha cepa y que dichas conclusiones no fuesen trasladables a modelos tumorales en otro background genético como el BALB/c (asociado más hacia un perfil de respuesta Th2) (Oliveira y col., 2014). Para responder a este interrogante, decidimos evaluar nuestro diseño experimental en dos modelos murinos que utilizan las líneas celulares de carcinoma de mama 4T1 (s.c. 1×10^6 células) y la de adenocarcinoma de colon CT26 (s.c. 1×10^6 células), ambas singénicas al background genético BALB/c.

El análisis de las curvas de crecimiento tumoral en el modelo 4T1 mostró que el grupo pAU presentaba un marcado retardo en el volumen tumoral luego de una única dosis (día 26 p.i.), y dicha significancia se mantuvo (e incluso se exacerbó) completado el tratamiento (Figura III.5-A).

Por otro lado, los resultados obtenidos al monitorear la sobrevida mostraron que si bien las curvas no difirieron significativamente entre sí, se pudo observar una tendencia favorable en los ratones tratados con poli A:U, ya que el 50% sobrevivió al día 53 p.i. mientras que ningún ratón del grupo PBS sobrevivió al mismo día. En este sentido, el tratamiento con pAU incrementó en un 11,9% la mediana de vida de los ratones tratados (Figura III.5-B).

Cuando evaluamos el volumen tumoral en el modelo CT26, si bien el efecto de disminución o retardo del crecimiento del tumor en el grupo pAU fue mucho menos evidente (comparado al modelo 4T1), pudimos observar una disminución significativa a los 16 días (una vez completado el esquema de las 4 dosis) y 24 días p.i. (Figura III.6-A). Por el contrario, el análisis de las curvas de sobrevida no arrojó diferencias significativas entre ambos grupos, con una mediana de sobrevida para el grupo PBS y pAU de 34 y 42 p.i. respectivamente. Aunque cabe destacar que el tratamiento con poli A:U incrementó la mediana de vida en un 23,5% (Figura III.6-B).

Estos resultados sugieren que el tratamiento i.t. con poli A:U desnudo es capaz de promover una disminución significativa en el volumen tumoral en al menos dos modelos de cáncer en el background genético BALB/c, aunque con distinta efectividad. También demostramos que si bien no hubo cambios estadísticamente significativos en la sobrevida

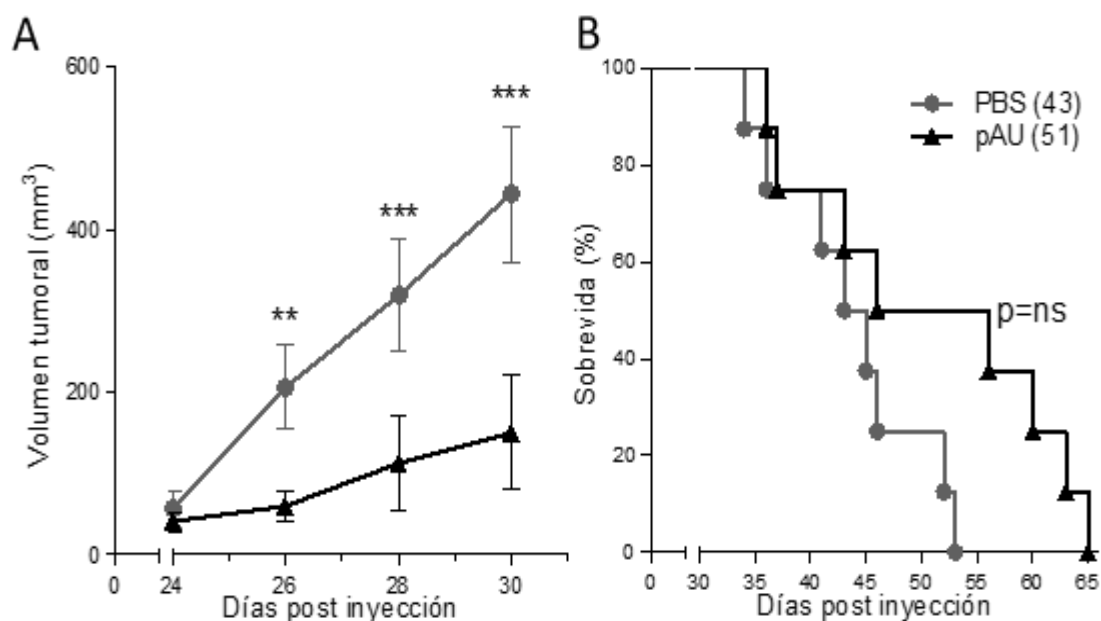


Figura III.5. El tratamiento i.t. con poli A:U de tumores 4T1 retarda el crecimiento tumoral pero no afecta la supervivencia de los animales tratados. **A)** El crecimiento y volumen tumoral fue monitoreado día de por medio (n= 8/grupo). ** p< 0,01; *** p< 0,001, mediante ANOVA de dos vías. **B)** Curva de supervivencia de ratones BALB/c tratados según se describe anteriormente, entre paréntesis se indica la mediana de supervivencia de los grupos PBS y pAU, días 43 y 51 p.i., respectivamente (n= 8/grupo), p=ns, mediante Test Log-rank (Mantel-Cox).

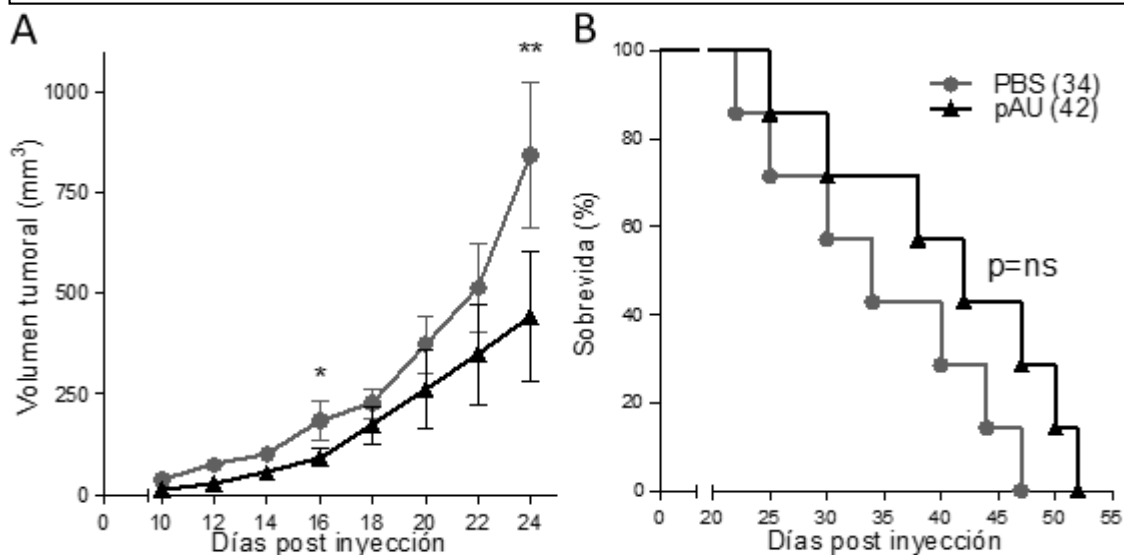


Figura III.6. El tratamiento i.t. con poli A:U de tumores CT26 retarda el crecimiento tumoral pero no afecta la supervivencia de los animales tratados. **A)** El crecimiento y volumen tumoral fue monitoreado día de por medio (n= 8/grupo). * p< 0,05; ** p< 0,01; mediante ANOVA de dos vías. **B)** Curva de supervivencia de ratones BALB/c tratados según se describe anteriormente, entre paréntesis se indica la mediana de supervivencia de los grupos PBS y pAU, días 34 y 42 p.i., respectivamente (n= 8/grupo), p=ns, mediante Test Log-rank (Mantel-Cox).

de los ratones tratados, la tendencia al aumento de éste parámetro se mantuvo en ambos modelos (la mediana de sobrevida se incrementó en 8 días comparando los grupos pAU vs PBS).

Resumiendo los resultados de esta primera parte, estamos en condiciones de afirmar que pudimos establecer un modelo preclínico de tratamiento intratumoral con un ligando de TLR3, y que éste fue efectivo tanto para reducir el crecimiento tumoral como para prolongar la sobrevida de los ratones tratados.

Por lo tanto podemos concluir que en las condiciones ensayadas, el efecto observado luego del tratamiento con poli A:U, fue reproducible en distintos modelos murinos de cáncer, lo que podría constituir las bases para una terapia alternativa antitumoral.

CONCLUSIONES PARTE I

1. El tratamiento intratumoral con poli A:U desnudo retarda el crecimiento tumoral y aumenta la sobrevida de los ratones tratados en los modelos de cáncer murinos B16, MB49 y EG7ova en la cepa C57BL/6.
2. El tratamiento intratumoral con poli A:U desnudo retarda el crecimiento tumoral pero no aumenta la sobrevida de los ratones tratados en los modelos de cáncer murinos CT26 y 4T1 en la cepa BALB/c.
3. El tratamiento intratumoral con poli A:U desnudo constituye una terapia efectiva y reproducible en distintos modelos de cáncer murinos.

PARTE II: CARACTERIZACIÓN DEL ROL QUE CUMPLEN LAS CÉLULAS DEL SISTEMA INMUNE EN EL MODELO PRECLÍNICO ESTABLECIDO

OBJETIVO ESPECÍFICO II: ANALIZAR EL ROL DE LAS CÉLULAS DEL SISTEMA INMUNE EN EL MODELO TERAPÉUTICO DE ADMINISTRACIÓN INTRATUMORAL DE POLI A:U.

ESTUDIO DEL EFECTO DEL TRATAMIENTO CON POLI A:U EN RATONES ATÍMICOS NUDE

Se ha reportado en distintos modelos que la estimulación vía TLR3 puede inducir la apoptosis de células tumorales a través de la vía caspasa 8 (Gambara y col., 2015; X. Zhao y col., 2012; Estornes y col., 2012). Por lo tanto, el efecto de disminución en el crecimiento tumoral observado en nuestro modelo podría deberse a una menor proliferación o a una mayor inducción de la apoptosis de las células tumorales inducida por poli A:U (Salaun y col., 2006). Por otro lado, resultados previos del grupo indicaban que la estimulación *in vitro* con poli A:U acompañado a PEI, no afectó el balance apoptosis/proliferación de las células tratadas respecto a las control (Gatti y col., 2013).

Para poder corroborar si el tratamiento *in vivo* podría estar alterando dicho balance, evaluamos nuestro modelo en ratones atímicos *nude*, los cuales poseen una mutación espontánea en el gen *foxn1* que se asocia a una distrofia tímica, por lo tanto carecen de Linfocitos T y NKT (Anderson y col., 2015; Nehls y col., 1994). Estos ratones han sido ampliamente empleados para el estudio de las características de distintos modelos tumorales en diferentes especies, incluyendo modelos xenográficos con líneas tumorales humanas, ya que no poseen rechazo espontáneo (Qin y col., 1998; De Cesare y col., 2008; Vincent y col., 2010).

Empleando nuestro modelo preclínico establecido, inyectamos células B16 en estos ratones y procedimos a realizar el tratamiento tal cual se describió en la primera parte del presente capítulo. De esta manera, si no hubiese participación alguna de los linfocitos T y/o NKT, y poli A:U afectara el balance apoptosis/proliferación de las células tumorales, entonces se deberían observar diferencias significativas en el crecimiento tumoral de aquellos ratones del grupo pAU respecto a los del grupo PBS. Por el contrario, si el compartimiento de linfocitos T o NKT estuvieran involucrados en la disminución del crecimiento tumoral observada, no se deberían obtener diferencias significativas en el volumen tumoral de los ratones *nude* entre ambos grupos.

Como se muestra en la Figura III.7, no se observaron diferencias significativas tanto en el volumen tumoral como en la supervivencia entre ambos grupos. Esto nos permitió descartar por un lado, que el tratamiento con pAU generase alteraciones en el balance proliferación/apoptosis de las células B16 (efecto directo sobre la propia célula tumoral), y por otro lado, nos permitió asumir que las poblaciones de células T/NKT se encontraban de alguna manera participando en la disminución del volumen tumoral observada en nuestro modelo experimental.

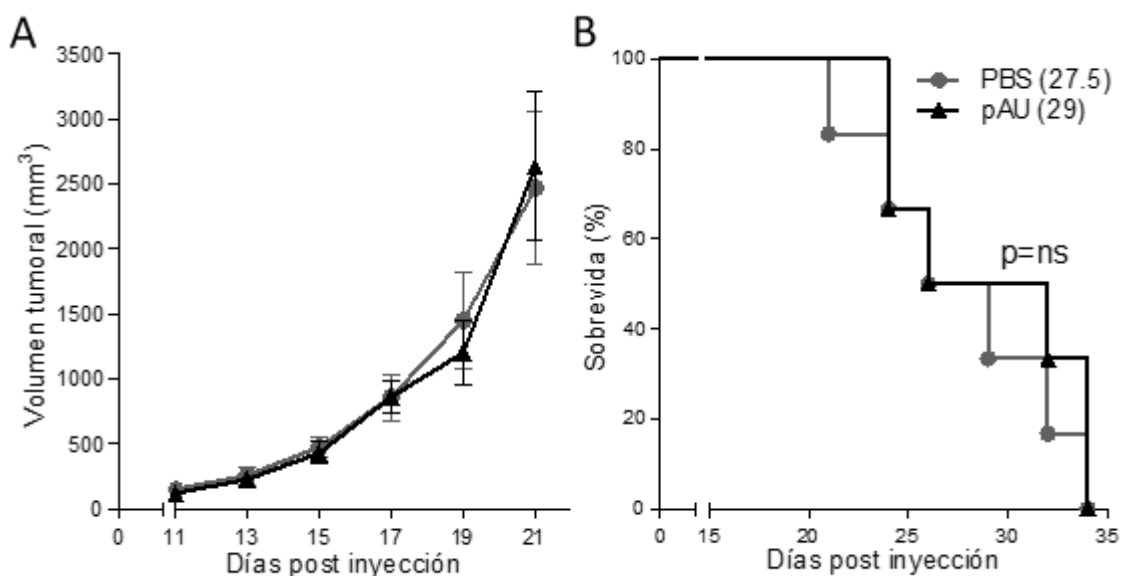


Figura III.7. El tratamiento i.t. con pAU es dependiente del compartimiento de Linfocitos T/NKT. A) Ratones *nude* inyectados con 1×10^6 células B16, a partir del día 11 p.i., fueron tratados i.t. con 4 dosis (cada dos días) de $50 \mu\text{g}$ de pAU en $200 \mu\text{l}$ de PBS (grupo pAU) o $200 \mu\text{l}$ de PBS (grupo PBS). El crecimiento y volumen tumoral fue monitoreado día de por medio ($n=6$ /grupo). Se grafica promedio \pm SEM, $p=ns$; mediante ANOVA de dos vías. **B)** Curva de supervivencia de ratones *nude* tratados según se describe anteriormente, entre paréntesis se indica la mediana de supervivencia de los grupos PBS y pAU, días 27,5 y 29 p.i., respectivamente ($n=6$ /grupo), $p=ns$, mediante Test Log-rank (Mantel-Cox).

ESTUDIO DEL EFECTO DEL TRATAMIENTO CON POLI A:U EN RATONES DEFICIENTES EN IL-12P40

La IL-12 es una de las principales citocinas secretadas por las CD una vez que se activan y presentan antígenos a células T *naïve* (no activadas), siendo crucial para la inducción de IFN- γ (Tel y col., 2014; Starbeck-Miller y col., 2014). Como ya se mencionó anteriormente en este trabajo, esta citocina está conformada por dos subunidades, conocidas como p35 y p40. A su vez, p40 es capaz de asociarse con otra subunidad, la p19, para formar así la citocina IL-23. Tanto p19 como p35 tienen homología con IL-6 y G-CSF, siendo secretadas únicamente cuando se encuentran asociadas con la subunidad p40 (Schroder y col., 2015; Langowski y col., 2006).

La participación de IL-12 en orquestar la respuesta inmune contra los tumores ha sido ampliamente reportada, y se le atribuye una función antitumoral, basada principalmente en la inducción de una respuesta citotóxica mediada por células T CD8+,

NK o NKT, células que expresan los receptores para esta citocina (Starbeck-Miller y col., 2014; Perrot y col., 2010; Biswas & Mantovani, 2010).

Considerando este efecto, y teniendo como hipótesis que IL-12 estaría involucrada en la disminución del volumen tumoral, decidimos evaluar el rol de esta citocina en nuestro modelo *in vivo*, empleando ratones deficientes en IL12p40 (IL12p40^{-/-}). Para ello, inyectamos células de melanoma B16 en estos ratones y procedimos de igual manera que en los ensayos anteriores.

Como se puede observar en la Figura III.8-A, los resultados obtenidos mostraron que ambos grupos experimentales tuvieron curvas similares de crecimiento tumoral, sin diferencias significativas en el volumen tumoral, en contraposición a lo que mostramos previamente en ratones wt. En línea con estos resultados, el análisis de la supervivencia no arrojó cambios significativos entre los tratamientos, teniendo medianas de supervivencia muy similares: 29 y 31 días p.i. para PBS y pAU respectivamente (Figura III.8-B).

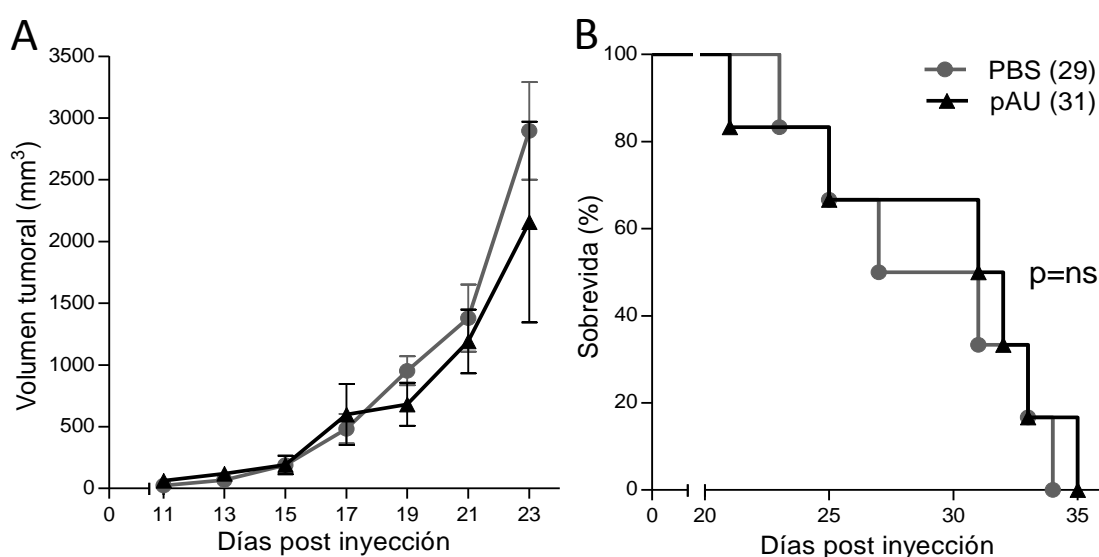


Figura III.8. El tratamiento i.t. con poli A:U es dependiente de la subunidad IL12p40. **A)** Ratones IL12p40^{-/-} inyectados con 1×10^6 células B16, a partir del día 11 p.i. fueron tratados i.t. con 4 dosis (cada dos días) de 50 μ g de pAU en 200 μ l de PBS (grupo pAU) o 200 μ l de PBS (grupo PBS). El crecimiento y volumen tumoral fue monitoreado día de por medio ($n=6$ /grupo). $p=ns$; mediante ANOVA de dos vías. **B)** Curva de supervivencia de ratones IL12p40^{-/-} tratados según se describe anteriormente, entre paréntesis se indica la mediana de supervivencia de los grupos PBS y pAU, días 29 y 31 p.i., respectivamente ($n=6$ /grupo), $p=ns$, mediante Test Log-rank (Mantel-Cox).

Por lo tanto, estos resultados indican que la subunidad IL12p40 es crucial para la disminución del volumen tumoral y el aumento de la supervivencia de los ratones luego del

tratamiento i.t. con poli A:U desnudo. Además, indirectamente, estos resultados nos permitieron sugerir que tanto las CD, así como otras poblaciones celulares productoras de IL12 tales como los M ϕ , estarían involucradas en este fenómeno, ya que constituyen la principal fuente de IL-12 (Tugues y col., 2014; Biswas & Mantovani, 2010; Turley y col., 2010). Sin embargo, estos experimentos no permiten descartar la posible participación de IL-23, en base a lo reportado en la literatura donde se le atribuye un rol protumoral, y a los resultados obtenidos previamente en nuestro grupo, nos inclinamos hacia un rol preponderante de IL-12 (Andreani y col., 2007; Mantovani, 2014).

En base al conjunto de resultados obtenidos tanto en ratones atímicos *nude* como en los IL12p40^{-/-} nos hizo plantear la hipótesis de que el sistema inmune en el microambiente tumoral sería el responsable del retardo en el crecimiento del tumor observado luego del tratamiento con poli A:U.

EFFECTO DEL TRATAMIENTO I.T. CON POLI A:U EN CÉLULAS DEL SISTEMA INMUNE

En una primera instancia quisimos conocer si el tratamiento i.t. con poli A:U era capaz de producir cambios en el infiltrado de las células del sistema inmune al sitio del tumor. Para estudiar esto, empleamos el modelo B16 en ratones C57BL/6 y analizamos el infiltrado leucocitario al día 17 p.i., una vez completado el tratamiento.

Durante la ablación de los tumores, se pudo observar a simple vista una marcada diferencia en el tamaño de los ganglios inguinales de los ratones tratados con poli A:U; ya que el ganglio que se encontraba adyacente al sitio de inoculación del tumor (ganglio drenante, GD) duplicaba en volumen al ganglio inguinal contralateral (ganglio no drenante, GND). Por el contrario, este hallazgo, no fue observado en los ratones del grupo PBS (Figura III.9-A y -B). Asimismo, estas observaciones pudieron ser confirmadas cuantitativamente mediante la medición del peso de dichos órganos (Figura III.9-C).

Dicho aumento podría deberse a que el tratamiento con poli A:U induciría una inflamación local, asociada a un incremento en el reclutamiento de leucocitos al GD. Para responder este interrogante, procedimos a cuantificar el número de células en ganglio, tumor y bazo mediante el recuento en cámara de Neubauer (Figura III.10).

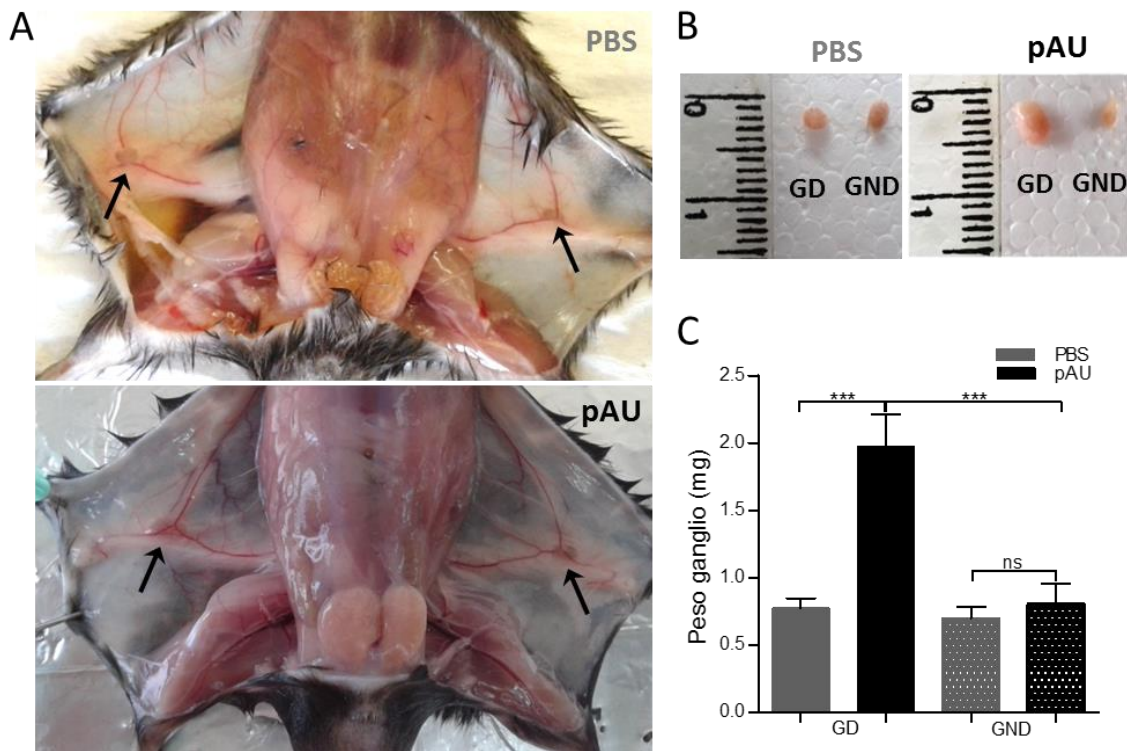
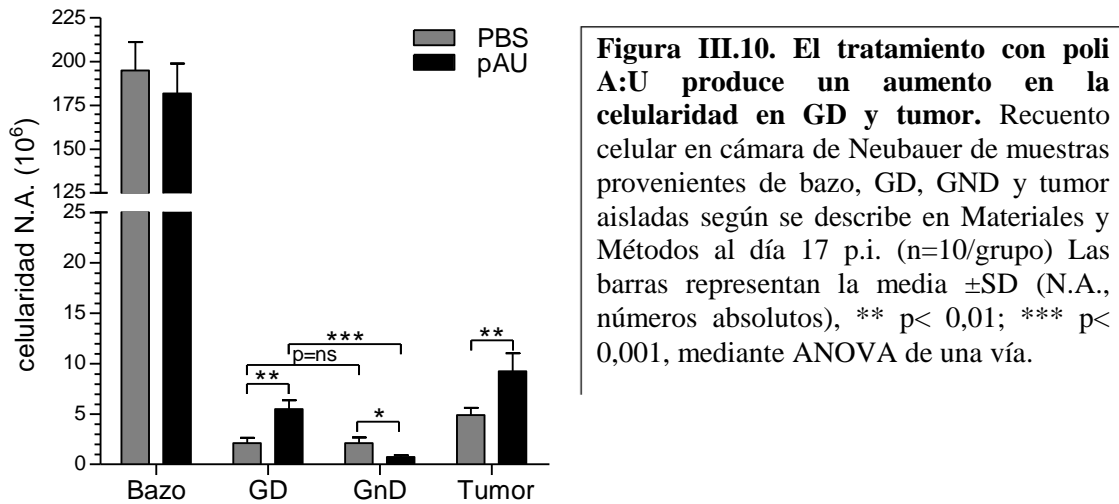


Figura III.9. El tratamiento i.t. con poli A:U produce un aumento en volumen y peso del GD. **A)** Fotografía representativa de ratones que recibieron 4 dosis del tratamiento al día 17 p.i. de ambos grupos experimentales (PBS y pAU, panel superior e inferior respectivamente). Las flechas indican la ubicación anatómica de los ganglios GD (izquierda) y GND (derecha). **B)** Los ganglios inguinales de ratones de ambos grupos fueron cuidadosamente obtenidos libres de tejido adiposo y posteriormente pesados en balanza granataria. **C)** El gráfico de barras muestra el peso en mg tanto de los ganglios GD y GND de ambos grupos (n=10/grupo). p=ns, *** p< 0,001; mediante ANOVA de una vía.

Mientras que en bazo, no hallamos diferencias significativas en el recuento celular entre los grupos, tanto en GD como en leucocitos infiltrantes de tumor (TILs) observamos un marcado incremento en la celularidad en el grupo pAU respecto al PBS (aproximadamente el doble). Del mismo modo, los números absolutos en el recuento celular indicaron diferencias significativas entre el GD y GND del grupo pAU, aunque no varió entre el GD y GND del grupo PBS (Figura III.10). Estos resultados sugerirían que el tratamiento con poli A:U estaría aumentando de forma local la presencia de leucocitos en GD, lo que se tradujo en un aumento tanto del volumen como del peso de este tejido.



El análisis por microscopía confocal de células CD45+ en cortes de tumores de ambos grupos al día 17 p.i. mostró que, los ratones que recibieron el tratamiento con poli A:U, presentaron mayor infiltrado de células CD45+ (Figura III.11-A). Asimismo, el análisis por citometría de flujo de TILs confirmó estos resultados, ya que el grupo pAU presentó un incremento significativo en el número de células CD45+ por gramo de tumor comparado al grupo PBS (8,2 vs 4,0 x 10⁶ TILs/g de tumor) (Figura III.11-B). Por lo tanto, el tratamiento i.t. con poli A:U aumentó el infiltrado leucocitario en tumor.

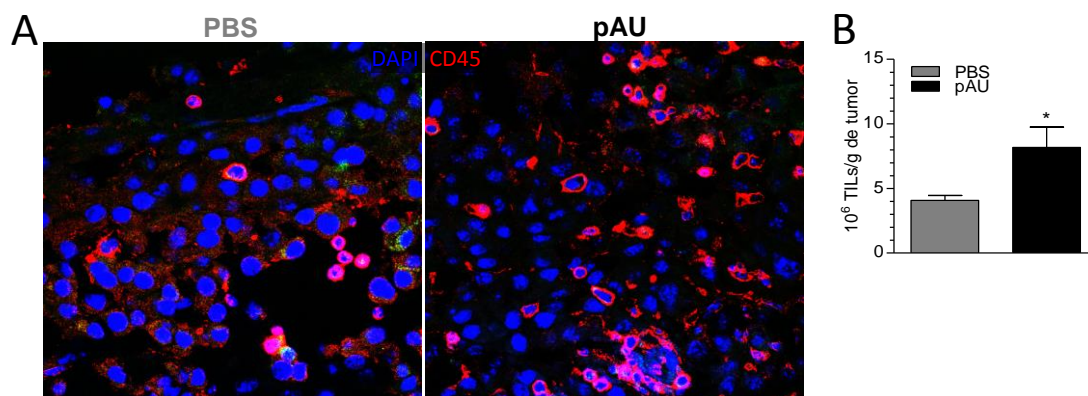


Figura III.11. El tratamiento con poli A:U produce un incremento en el número de células CD45+ infiltrantes de tumor. A) Fotografías representativas de secciones de tumores provenientes de ratones de ambos grupos, fueron marcadas con DAPI y anti-CD45-Alexa546. B) Las suspensiones celulares provenientes de tumor fueron marcadas con anti-CD45-APCcy7 y cuantificadas por citometría de flujo. Las barras representan la media ±SD, * p< 0,05; mediante test T.

Resumiendo, estos resultados sugieren que la estimulación local con poli A:U, generaría cambios en las señales del microambiente tumoral, que llevaría a un mayor

reclutamiento de células del sistema inmune y el orquestado de la respuesta antitumoral que en último término llevaría a la reducción del volumen tumoral.

ESTUDIO DEL EFECTO DE POLI A:U SOBRE LA PRODUCCIÓN DE QUIMIOCINAS *EX VIVO*

Se sabe que las quimiocinas están implicadas en la circulación, el *homing*, la retención y activación de las células inmunocompetentes. Aunque algunas de ellas son conocidas por contribuir al crecimiento tumoral y la metástasis, otras son responsables de los cambios en el microambiente del tumor que conducen a la extensa infiltración de leucocitos, dando como resultado la erradicación del tumor (Chow & Luster, 2014; Caronni y col., 2015; Kitamura y col., 2015). Teniendo en cuenta sus propiedades quimioatrayentes y activadoras, se ha sugerido un rol crucial para las quimiocinas en el desarrollo de la fase efectora de la respuesta inmune antitumoral. Si bien existen numerosas fuentes de quimiocinas en el seno del tumor, entre las cuales se encuentran las propias células tumorales y el estroma, muchas de las quimiocinas son producidas por el infiltrado leucocitario, principalmente por células de origen mieloide como M ϕ , neutrófilos y CD.

A continuación, quisimos evaluar si poli A:U estaría produciendo cambios en el perfil de quimiocinas producidas por células mieloides en el microambiente tumoral. Para ello, se aislaron células CD45+CD11b+ por *cell-sorting* de un pool de 5 tumores PBS y pAU al día 17 p.i. Luego de la obtención de los lisados, estos fueron empleados en un *Proteome Profiler Mouse Chemokine Array Kit* que permite semicuantificar simultáneamente hasta 25 quimiocinas (Figura III.12).

En primer lugar, cuando se midió en las células mieloides sin estimulación *ex vivo*, sólo pudimos detectar 5 quimiocinas: CCL2 y CXCL1 que se encontraban ligeramente disminuidas en el grupo pAU (0,84 y 0,8 veces, respectivamente); por el contrario CCL6, CCL12 e IL-16 que se encontraban aumentadas con el tratamiento (1,5; 1,7 y 2,3 veces, respectivamente).

Por otro lado, cuando se midió en células estimuladas *ex vivo* con LPS, detectamos que 16 quimiocinas, aumentaban sus niveles en el grupo pAU respecto al grupo PBS. Además de las 5 quimiocinas ya mencionadas anteriormente, podemos destacar: CCL11, CCL22, CCL27, CXCL9, CXCL12 (que aumentaron más de 10 veces) y CXCL11 (6,5 veces).

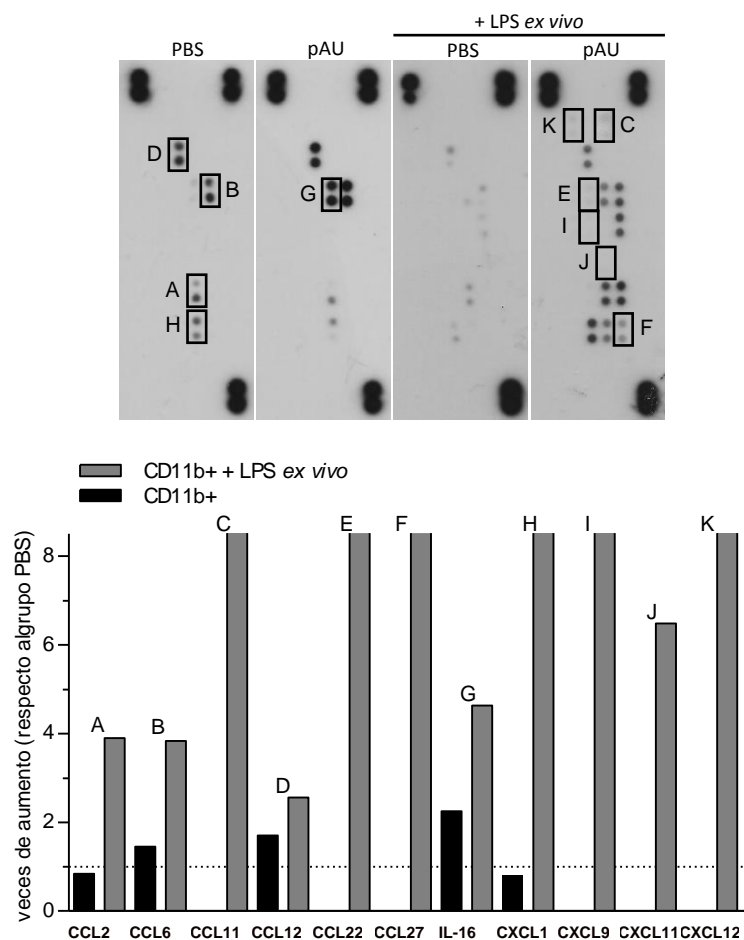


Figura III.12. Análisis del perfil de quimiocinas luego del tratamiento con poli A:U. Panel superior: Fotografías de las membranas donde se aprecia el microarreglo de quimiocinas detectadas en las 4 condiciones ensayadas: células CD45+ CD11b+ aisladas por *cell-sorting* provenientes de un pool de 5 tumores PBS y pAU al día 17 p.i. sin estímulo, o 24 hs de LPS 0,1 µg/ml *ex vivo*. **Panel inferior:** gráfico de barras con la correspondiente cuantificación de los datos obtenidos previamente, representados como veces de aumento respecto al grupo PBS (línea punteada).

Todos estos resultados en conjunto nos permitieron concluir que el tratamiento terapéutico con poli A:U, promueve la secreción de un *milieu* de quimiocinas que en el balance proporcionan un microambiente proinflamatorio, lo que podría promover el reclutamiento de células efectoras, que por último llevarían a los efectos antitumorales observados.

ANÁLISIS DEL IMPACTO DEL TRATAMIENTO CON POLI A:U SOBRE LAS CÉLULAS DENDRÍTICAS

Como consecuencia de lo observado en el crecimiento tumoral y la sobrevida en ratones IL12p40^{-/-}, resultó indispensable continuar analizando si poli A:U afecta a las CD en nuestro modelo, ya que constituyen una fuente importante de IL-12.

Se ha demostrado que las CD presentes en ganglios linfáticos de animales portadores de tumor, presentan menor densidad e incluso tienen reducidos los niveles de moléculas CMH-II en su membrana y de otras moléculas coestimuladoras como CD40, CD80 y CD86 (Engelhardt y col., 2012). Además, se ha reportado la presencia de CD infiltrando tumor en distintos modelos que, en general, poseen una reducida capacidad para presentar antígenos (Boissonnas, 2013; Ataera y col., 2011; Stoitzner y col., 2008).

Teniendo estas bases y considerando la posibilidad de que en nuestro modelo luego del tratamiento i.t. con poli A:U se produzcan cambios en las CD, estudiamos esta población en ganglio y tumor de ratones que habían recibido 3 dosis del tratamiento de ambos grupos experimentales. Al día de sacrificio (15 p.i.), se procedió a obtener células mononucleares de las muestras de ganglio y tumor para analizar por citometría de flujo la población CD11c+.

Como se puede observar en la Figura III.13-A, durante el tratamiento con poli A:U observamos un marcado aumento en el porcentaje de células CD11c+ infiltrantes de tumor que expresaban las moléculas CD40 y CD86 respecto al grupo PBS. Además, observamos un aumento estadísticamente significativo de la intensidad de fluorescencia media (IFM) de CD40 y CD86 expresadas en células CD11c+ infiltrantes de tumor (pero no en GD) del grupo pAU (Figura III.13-B). Estos resultados nos permitieron concluir que las CD infiltrantes de tumor en los animales del grupo pAU, se encuentran más activadas o en un mayor estado de maduración que las CD halladas en tumores del grupo PBS.

Más aún, cuando evaluamos las células CD45+CD11c+ productoras de IL-12 infiltrando tumor, observamos que hubo un aumento estadísticamente significativo tanto en porcentajes como en IFM de CD IL12+ (Figura III.13). Este hallazgo, nos permitió concluir que efectivamente, el tratamiento con poli A:U indujo un incremento en la expresión de IL-12 por parte de las CD infiltrantes de tumor, pero no de aquellas residentes en GD.

Además, estos resultados sugerirían que poli A:U estaría direccionando la respuesta inmune en el seno del tumor hacia un perfil Th1, tipo de respuesta requerida para un eficiente control del crecimiento tumoral.

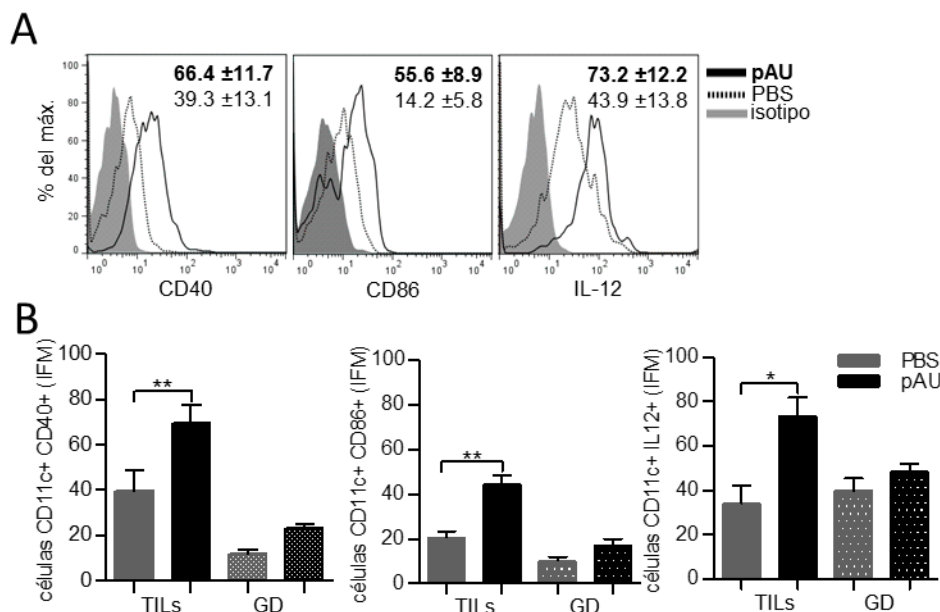


Figura III.13. Poli A:U aumenta la expresión de moléculas coestimuladoras e IL12 en células CD45+ CD11c+ infiltrantes de tumor. **A)** Histogramas representativos del % de células CD45+CD11c+ que expresan CD40, CD86 e IL12 en tumores del grupo PBS y pAU, las células fueron estimuladas con PMA/iono (según se detalla en Materiales y Métodos). Los números indican media ±SD, en negrita pAU **B)** Las barras representan la media ±SD de la intensidad de fluorescencia media (IFM), de células CD45+CD11c+ infiltrantes de tumor (TILs) y en GD. * p<0,05; ** p<0,01; mediante test T (n=6/grupo; día 15 p.i.).

ESTUDIO DE LOS LINFOCITOS T INFILTRANTES DE TUMOR

Debido a la importancia de los linfocitos T en la respuesta inmune antitumoral (Pentcheva-Hoang y col., 2014; Tosolini y col., 2011), junto con el hecho de que una mayor proporción de células T se asocia con un mejor pronóstico en pacientes con cáncer (Goc y col., 2014; Bald y col., 2014), quisimos estudiar qué ocurría con esta población en nuestro modelo.

Retomando nuestros resultados obtenidos en ratones atímicos *nude*, que indicaban la participación del compartimento T en la disminución del volumen tumoral, evaluamos los porcentajes de células T CD4+ y CD8+ infiltrantes de tumor al día 15 p.i., en ratones de ambos grupos.

Como se puede observar en la Figura III.14-A, el tratamiento con poli A:U modificó sustancialmente la relación de TILs CD45+CD11c- CD4+ vs CD8+ (aproximadamente 1:3), con respecto a lo que ocurrió en el grupo PBS (cercana a 1:1) (p<0,05).

Se ha descrito que la molécula Ly6C aumenta en linfocitos T CD8 tras la activación vía TCR mediada por IL-2 y con la producción de IFN-γ. También se ha reportado como molécula de adhesión clave para que el LiT CD8 ejerza la respuesta

citotóxica mediada por LiT (CTL) sobre la célula blanco (Kaiser y col., 2013; Hänninen, y col., 2011; Jaakkola, y col., 2003). Teniendo en cuenta estos datos aportados por la literatura, quisimos analizar la expresión de la molécula Ly6C en células T CD8+ infiltrantes de tumor y en GD. Los resultados graficados en la Figura III.14-B mostraron un aumento significativo en la población CD8+ Ly6C+ en TILs de tumores que recibieron poli A:U (80 %) respecto al grupo PBS (57 %). Por otro lado, el análisis de esta población en GD no arrojó diferencias entre los tratamientos PBS y pAU (54,4 vs 57,5%, respectivamente).

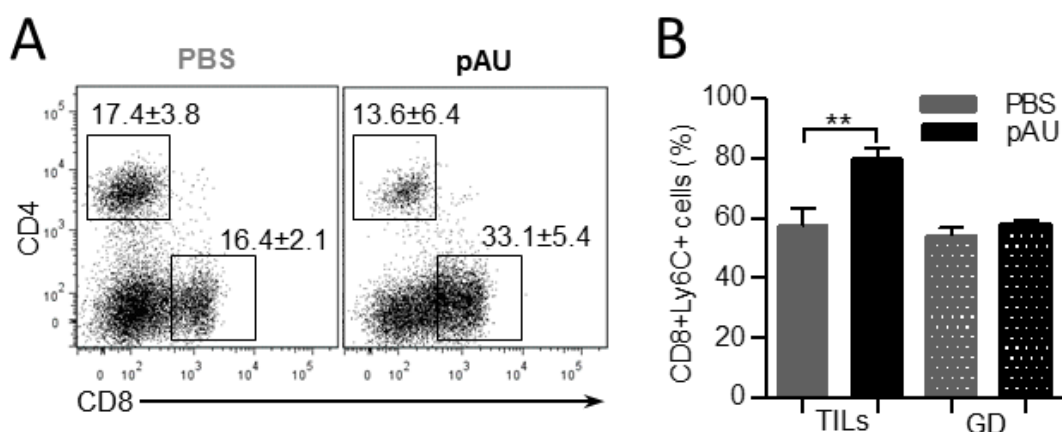


Figura III.14. Poli A:U modifica el infiltrado de LiT en tumor. A) Gráficos *dot plot* representativos del % de células CD4 y CD8 dentro del *gate* CD45+CD11c- en tumores del grupo PBS y pAU. Los números indican media \pm SD. **B)** Las barras representan la media \pm SD de los porcentajes de células CD8+ Ly6C+ infiltrantes de tumor (TILs) y en GD. ** $p < 0,01$; mediante test T ($n=6$ /grupo; día 15 p.i.).

En conclusión, el tratamiento i.t. con poli A:U desnudo fue capaz de aumentar el infiltrado de LiT a tumor, modificando a su vez la relación CD4/CD8 debido a un aumento de células T CD8+ y promoviendo por último un aumento en la expresión de Ly6C por parte de las células T citotóxicas, lo que favorecería su acción citotóxica.

EFEECTO DEL TRATAMIENTO CON POLI A:U SOBRE CÉLULAS T REGULADORAS

Dentro de las poblaciones celulares que participan en los mecanismos de escape tumoral, favoreciendo la evasión del sistema inmune del huésped, se encuentran las células Treg, típicamente definidas como CD4+CD25+ (Jenabian y col., 2013; Mougiakakos, y col., 2010; Nishikawa & Sakaguchi, 2010). Se ha reportado que las Treg se acumulan en los tejidos tumorales y aumentan en circulación sanguínea de pacientes con cáncer (Whiteside, 2014; Nishikawa & Sakaguchi, 2010; Strauss y col., 2007). A su vez, se ha demostrado que el factor de transcripción *forkhead box P3* (Foxp3) resulta

fundamental para su diferenciación y mantenimiento de la función supresora a través de mecanismos de regulación epigenética (Morikawa y col., 2014; Miyao y col., 2012). Las Treg pueden suprimir la respuesta inmune antitumoral mediante la liberación de moléculas inmunosupresoras solubles como TGF- β , granzimas, galectina-1, adenosina, prostaglandina (PGE2) o la enzima IDO (Indolamina Dioxigenasa). Además, también emplean mecanismos de supresión dependiente del contacto célula-célula que incluyen la expresión de CTLA-4 (*Cytotoxic T-Lymphocyte-Associated Protein 4*), PD-L1 (*Programmed Death-Ligand 1*), LAG-3 (*Lymphocyte-Activation Gene 3*), NRP1 (*Neuropilin 1*), TIGIT (*T cell immunoreceptor with Ig and ITIM domains*) y CD39 / 73 (Halvorsen y col., 2014; Kurtulus y col., 2014; Sawant & Vignali, 2014).

Para analizar lo que ocurría con las células Treg en nuestro modelo, generamos tumores B16 en ratones reporteros Foxp3^{EGFP} que coexpresan la proteína fluorescente verde (EGFP) y el factor de transcripción Foxp3 bajo el mismo promotor. El desarrollo tumoral en estos ratones fue normal, comparado a la cinética de crecimiento tumoral en ratones C57BL/6, y el tratamiento i.t. con poli A:U también redujo significativamente el peso del tumor, tal como se observa en la Figura III.15-B.

Hallamos una disminución estadísticamente significativa en el número de células T CD4⁺ Foxp3⁺ por millón de TILs presentes en tumores tratados con 4 dosis de poli A:U en comparación con los no tratados (5 veces menos) (día 17 p.i.). Por el contrario, el análisis de dicha población en GD de ambos grupos mostró niveles similares de células Treg (Figura III.15-A).

Del mismo modo, cuando evaluamos las células que expresaban FoxP3⁺ dentro de la población de linfocitos T CD4⁺CD25⁺, observamos una disminución significativa tanto en porcentaje como en IFM en TILs aislados de tumores pAU respecto a PBS (Figura III.16-A y B). Es decir que poli A:U no solo disminuyó el número de células Treg infiltrantes de tumor sino que también disminuyó los niveles de expresión de Foxp3 (Figura III.16-B).

En contraste, cuando analizamos estos parámetros en GD de ratones de ambos grupos no encontramos diferencias significativas entre sí; aunque cabe destacar que tanto los porcentajes como las IFM de células Foxp3 dentro de los LiT CD4⁺CD25⁺ se encontró disminuida en GD respecto a tumor en ambos grupos (Figura III.16-B).

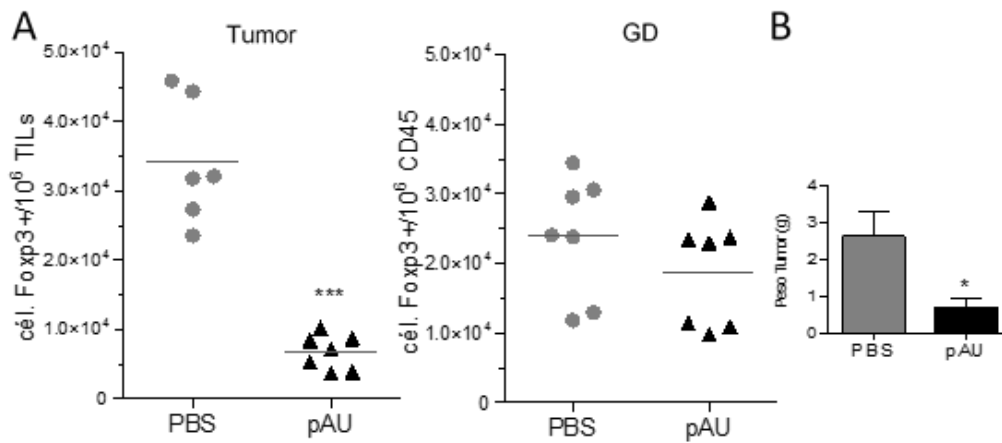


Figura III.15. El tratamiento i.t. con poli A:U disminuye el número de células Treg en tumor. **A)** Gráficos de dispersión de puntos del número de células Foxp3GFP+ (gate en CD45+CD4+) en tumores y GD del grupo PBS y pAU. **B)** Las barras representan la media \pm SEM del peso del tumor al día del sacrificio. * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$; mediante test T ($n=7$ /grupo; día 17 p.i.).

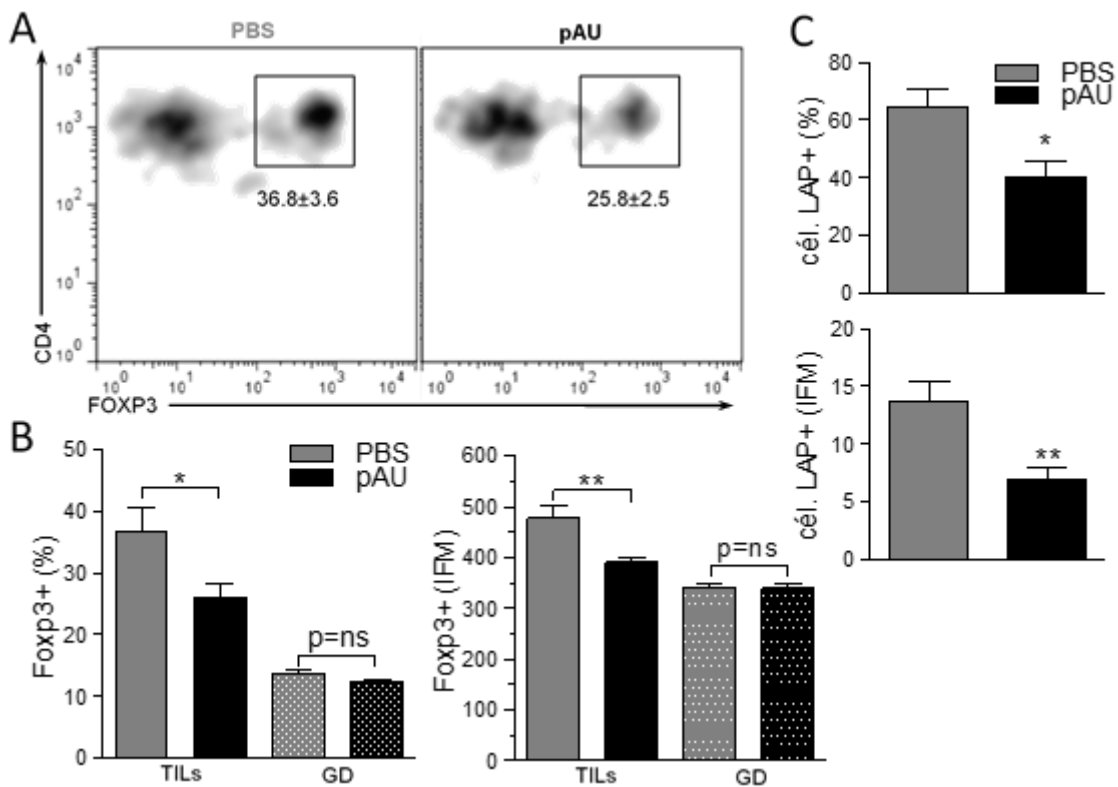


Figura III.16. El tratamiento i.t. con poli A:U disminuye el número de células Treg LAP+ en tumor. **A)** Gráficos *density plot* representativos de TILs aislados de ambos grupos (gate en CD45+). Los valores indicados representan la media \pm SEM. **B)** Los gráficos de barra representan la media \pm SEM del % (izquierda) e IFM (derecha) de células FOXP3+ (gate en CD45+CD4+CD25+) en TILs y GD. **C)** Las barras representan la media \pm SEM del % (arriba) e IFM (abajo) de células LAP+ (gate en CD45+CD4+CD25+FOXP3+) en TILs aislados de tumores de ambos grupos. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; mediante test T ($n=6$ /grupo; día 17 p.i.).

Por último, quisimos analizar la proporción de células Treg que expresaban la molécula LAP (del inglés, *Latency-Associated Peptide*), componente del pro péptido biológicamente inactivo LAP/TGF- β 1. Este heterodímero es expresado transitoriamente en la membrana plasmática de células productoras de TGF- β , previo a la liberación del homodímero biológicamente activo TGF- β , citocina ampliamente descrita como inmunomoduladora negativa de la respuesta antitumoral (Zhu y col., 2015; Mittal y col., 2014; Pickup y col., 2013; Oida & Weiner, 2010).

Como se puede observar en la Figura III.16-C, las células CD45+CD4+CD25+Foxp3+ recuperadas de tumores tratados con poli A:U, expresaron niveles significativamente disminuidos tanto en porcentaje como en IFM del marcador LAP, respecto al grupo PBS.

Por lo tanto, estos resultados nos permitieron concluir que, el tratamiento i.t. con poli A:U, disminuye la presencia de células Treg en tumor y a su vez, estas células expresan menores niveles de Foxp3 y secretan menos TGF- β , que en conjunto propiciarían un balance en el microambiente tumoral menos supresor, que favorecería a la rama efectora de la respuesta inmune antitumoral.

ESTUDIO DEL EFECTO DEL TRATAMIENTO CON POLI A:U SOBRE LA RESPUESTA ANTI TUMORAL ANTÍGENO ESPECÍFICA

Los resultados previamente descritos en la presente tesis, mostraban que el tratamiento con poli A:U favorece fundamentalmente el infiltrado de células T CD8+ al tumor, aunque en las condiciones ensayadas no nos permitieron determinar si esos LiT eran capaces de reconocer antígenos tumorales, es decir, si eran específicos contra el tumor.

En nuestro laboratorio contamos con una línea de melanoma murino B16, que permite el estudio de la respuesta antitumoral antígeno específica, ya que expresa ovoalbúmina (OVA) como antígeno tumoral (B16ova). Asimismo, disponemos de ratones transgénicos OTI y OTII, que expresan TCRs específicos para péptidos de OVA expresados en el contexto del CMH clase I y II respectivamente. Por lo tanto, empleando estas herramientas quisimos analizar si la administración terapéutica de poli A:U, podría mejorar la respuesta inmune específica contra OVA (Figura III.17).

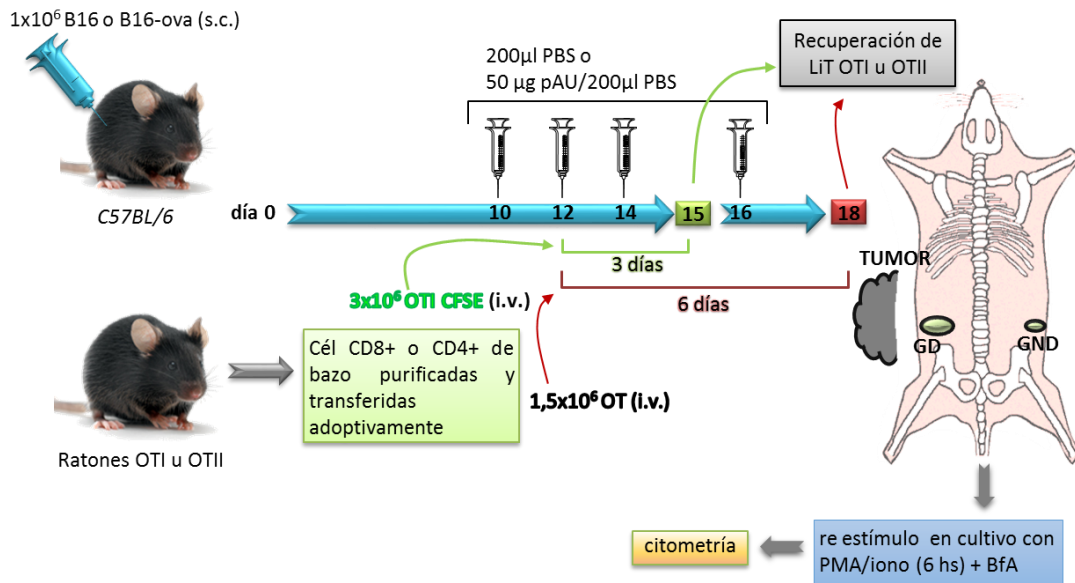


Figura III.17. Esquema experimental empleado para estudiar el efecto del tratamiento i.t. con poli A:U sobre la respuesta antigénica específica. Tumores inducidos B16 o B16ova fueron tratados con PBS o poli A:U, y luego de la segunda dosis (12 p.i.): los ratones recibieron via i.v. células OTI marcadas con CFSE, las cuales fueron recuperadas 3 días después a partir de ganglios y tumor (ensayo de proliferación *in vivo*). En otro set de experimentos los animales recibieron células OTI u OTII via i.v, las cuales fueron recuperadas 6 días después de GD y tumor, y se re estimularon con PMA/iono (ensayo de funcionalidad *ex vivo*), para luego ser marcadas y analizadas por citometría de flujo.

Dado que habíamos observado que el tratamiento i.t. con poli A:U mejora el estado de maduración de CD y su capacidad de producir IL-12, en una primera instancia quisimos conocer si esto redundaba en una mejor activación de células T específicas contra OVA. Para ello, decidimos evaluar *in vivo* la proliferación antigénica específica de células OTI.

Con este fin, se indujeron tumores B16ova, y B16 (como control de proliferación basal), en ratones singénicos y una vez que los tumores se hicieron palpables, empezamos con el tratamiento. Al cabo de la segunda dosis (día 12 p.i.), se transfirieron adoptivamente por vía endovenosa células T CD8+ esplénicas obtenidas por *cell-sorting*, de ratones OTI que fueron marcadas con CFSE. Luego de tres días (día 15 p.i.), procedimos a la recuperación de las células transferidas en ganglio y tumor.

Como se muestra en la Figura III.18-A, las células OTI+CFSE+ recuperadas de los ratones portadores de tumores B16 presentaron dos ciclos de proliferación tanto en GD como en GND (recuadro rojo, panel izquierdo). Este dato fue un importante control que sirvió para poder descontar la proliferación basal u homeostática, producto de la

manipulación de las células durante el proceso de purificación previa y de la transferencia a un nuevo “nicho” o huésped (Kaiser y col., 2013).

Por el contrario, aquellas células OTI+CFSE+ recuperadas de ratones portadores de tumores B16ova, evidenciaron hasta 6 ciclos de división, siendo más notable en GD que en GND (Figura III.18-A panel central y derecho). Esta asimetría en la distribución de las células en ganglio, se hizo evidente al calcular los porcentajes de células OTI+CFSE+ dentro de la subpoblación de LiT CD8+, habiendo un aumento mucho más marcado en la proporción de éstas células en el grupo pAU (8 veces) que en el grupo PBS (2,5 veces).

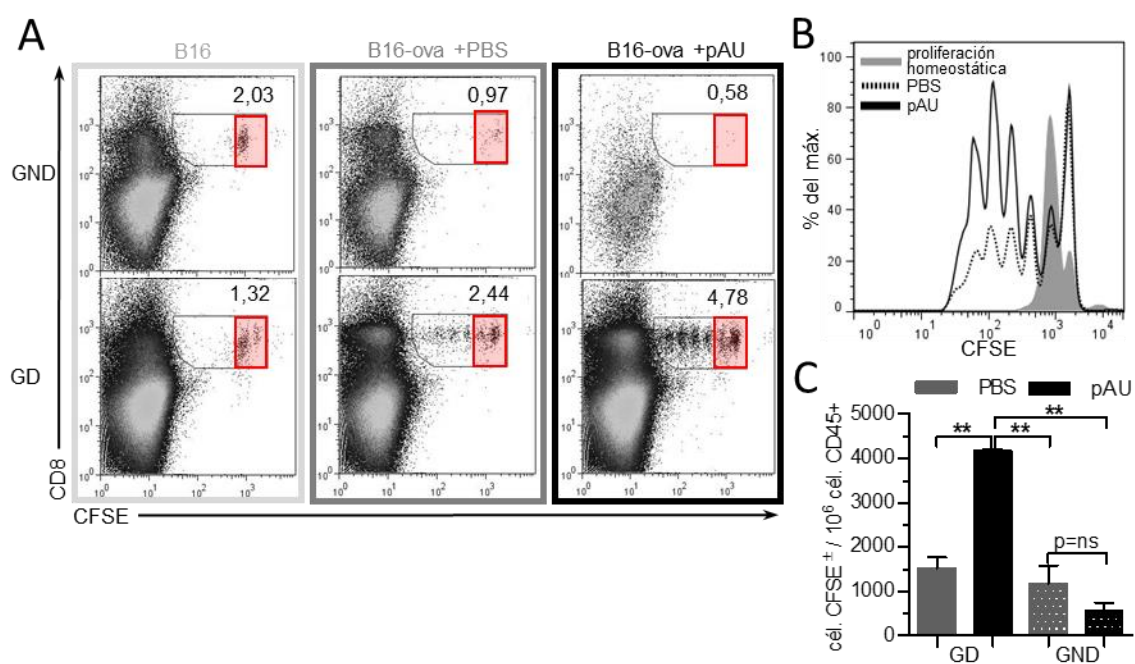


Figura III.18. Ensayo de proliferación *in vivo* con CFSE en células OTI demuestra que poli A:U favorece la respuesta antígeno específica A) Gráficos de puntos representativos de dilución con CFSE+ en células OTI CD8+ transferidas y recuperadas en GND y GD de ratones portadores B16, B16ova tratados con PBS o poli A:U. Los números indican los % de células OTI+ CFSE+ sobre el total de CD8+ en ganglio. La región en rojo delimita la proliferación homeostática B) Histogramas representativos de “A” en GD, muestran los patrones de proliferación en las distintas condiciones ensayadas. C) Cuantificación del número de células OTI con CFSE+ diluido recuperadas por millón de células CD45+ (\pm SEM) en GD y GND del huésped. ** $p < 0,01$; mediante ANOVA de 1 vía ($n=3$ /grupo; día 15 p.i.)

En cuanto al número de ciclos de proliferación, si bien no hallamos diferencias entre los tratamientos, cuando analizamos mediante histogramas la distribución de las células en división, observamos que con poli A:U hubo un mayor número de células que se encontraban en los ciclos 4, 5 y 6 (CFSE mas diluido) respecto a PBS (Figura III.18-B). Asimismo, al cuantificar el número de células CFSE diluido por millón de células CD45+

en ganglio, notamos un aumento significativo en GD de ratones del grupo pAU respecto al grupo PBS (4169 ± 122 vs 1530 ± 69 , respectivamente) (Figura III.18-C). Estas diferencias en el patrón de división estaría indicando, que poli A:U fue capaz de incrementar el *priming* o bien la llegada de LiT CD8+ antígeno específicos en GD. Aunque, cabe destacar que no pudimos recuperar eventos significativos de células transferidas OTI infiltrando tumor a los 3 días post transferencia (datos no mostrados).

Teniendo en cuenta estos resultados, para poder evaluar la funcionalidad de linfocitos T CD4+ y CD8+ específicos contra OVA en tumor, transferimos células esplénicas purificadas por *cell-sorting* provenientes de ratones transgénicos OTI y OTII a ratones portadores de tumor después de dos administraciones de poli A:U (día 12 p.i.). Seis días más tarde, y utilizando un anticuerpo específico contra los TCR transgénicos (V β 5) estudiamos la presencia de las células transferidas en GD y tumor. Además, analizamos la capacidad de estas células de producir IFN- γ y la expresión en superficie del marcador CD107a en ambos grupos experimentales (Figura III.19). CD107a o LAMP-1 (del inglés, *Lysosome-Associated Membrane Protein 1*), es una de las dos principales glicoproteínas que componen la membrana de los lisosomas y gránulos de perforinas y granzimas; se ha reportado que su expresión transitoria en la membrana plasmática es indicativo de la desgranulación de linfocitos citotóxicos CD8+ y NK activados (Cohnen y col., 2014; Krzewski y col., 2013; Aktas y col., 2009).

El análisis funcional de la respuesta antígeno específica contra el tumor mediante la evaluación de los niveles intracelulares de IFN- γ en las células transferidas, demostró que hubo un aumento muy significativo en la frecuencia de células OTI IFN- γ + y OTII IFN- γ + en TILs de ratones tratados con poli A:U (Figura III.19-A). Los mismos resultados se obtuvieron al analizar la IFM de células productoras de IFN- γ OTI y OTII del grupo pAU vs PBS infiltrando tumor. Además, se observó un aumento muy significativo de la expresión del marcador CD107a tanto en porcentaje (3 veces aprox.) como en IFM (2 veces), en las células OTI infiltrando tumores tratados con poli A:U (Figura III.19-B).

Asimismo, sólo pudimos observar un aumento significativo en la IFM de células OTII productoras de IFN- γ aisladas de GD del grupo pAU. Por otro lado, no se hallaron diferencias significativas en el porcentaje ni en la IFM de células OTI productoras de IFN- γ o que expresaban CD107a en GD de ambos grupos (Figura III.19-B).

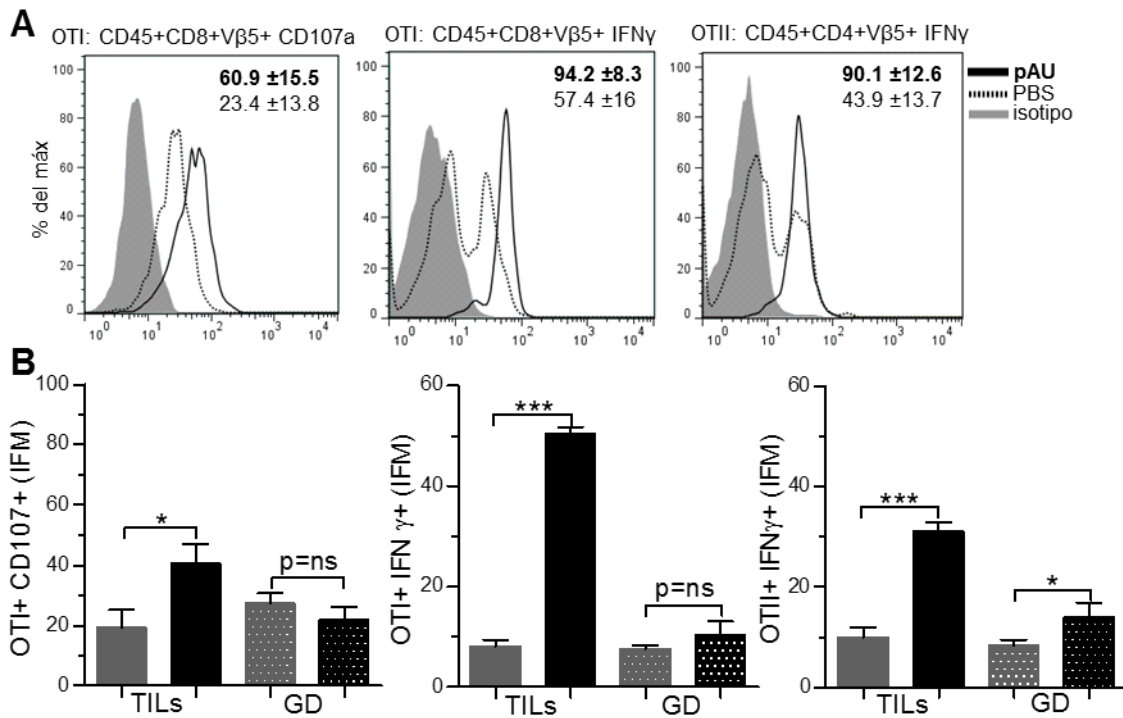


Figura III.19. Poli A:U favorece la respuesta inmune antígeno específica en tumor. A) Histogramas representativos del porcentaje de células OTI (CD8+Vβ5+) que expresan CD107a (panel izquierdo), IFN-γ (panel central) y porcentaje de células OTII (CD4+Vβ5+) que expresan IFN-γ (panel derecho) recuperadas en tumor post estímulo con PMA/Iono (según Materiales y Métodos). Los números representan la media ±SD, en negrita pAU. **B)** Los gráficos de barras muestran la media ±SD intensidad de fluorescencia media para células OTI+CD107a+ (izquierda), OTI+IFNγ+ (centro) e IFM de células OTII+IFNγ+ (derecha). * p< 0,05; *** p< 0,001; mediante ANOVA de 1 vía.

Este conjunto de resultados nos permitieron concluir que, el tratamiento con pAU fue capaz de inducir un incremento en la respuesta antígeno específica de células T CD4+ y CD8+ productoras de IFN-γ, así como un aumento en la actividad de LiT citotóxicos específicos contra el tumor. Por lo tanto, nuestro diseño experimental, fue efectivo para estimular la rama efectora Th1 y la CTL específica antitumoral.

CONCLUSIONES PARTE II

1. El compartimiento de LiT y o NKT están involucrados en el control del crecimiento tumoral y el aumento de la sobrevida en nuestro modelo preclínico de terapia intratumoral con poli A:U.
2. La subunidad IL12p40 está involucrada en el control del crecimiento tumoral y el aumento de la sobrevida observado en nuestro modelo preclínico con poli A:U.

El tratamiento i.t. con poli A:U:

3. incrementa el número de células mononucleares en ganglios drenantes y por ende también aumenta su peso y volumen.
4. aumenta el infiltrado de células CD45+ en tumor.
5. favorece la producción de quimiocinas por parte de células CD45+ CD11b+ infiltrantes de tumor.
6. aumenta el porcentaje de células CD11c+ maduras (CD40+ CD86+) productoras de IL-12 que infiltran tumor.
7. favorece el infiltrado de LiT CD8+ en tumor, modificando la relación CD4/CD8, y aumenta el porcentaje de células CD8+Ly6C+ en tumor.
8. disminuye el número de células CD4+Foxp3+ y también el porcentaje de células CD4+CD25+Foxp3+LAP+ en tumor.
9. promueve el reclutamiento y la proliferación de LiT CD8+ antígeno específicas en ganglio drenante.
10. favorece un perfil de respuesta Th1 antígeno específica en tumor.

PARTE III: CARACTERIZACIÓN DEL ROL QUE CUMPLEN LOS IFNs TIPO I EN EL MODELO PRECLÍNICO DE ADMINISTRACIÓN TERAPÉUTICA DE POLI A:U

OBJETIVO ESPECÍFICO III: INVESTIGAR LAS POBLACIONES CELULARES RESPONSABLES DE LA GENERACIÓN DE IFN-B ENDÓGENO NECESARIO PARA INDUCIR UNA RESPUESTA INMUNE ANTITUMORAL.

OBJETIVO ESPECÍFICO III.I: EXPLORAR LOS MECANISMOS MOLECULARES QUE CONDUCEN A LA INDUCCIÓN DE IFN-B EN RESPUESTA AL TRATAMIENTO CON POLI A:U.

OBJETIVO ESPECÍFICO III.II: ANALIZAR EL ROL DE LA SEÑALIZACIÓN DE IFN TIPO I SOBRE LAS CÉLULAS DEL HUÉSPED EN EL CONTROL DEL DESARROLLO TUMORAL EN MODELOS PRECLÍNICOS DE ADMINISTRACIÓN INTRATUMORAL DE POLI A:U.

OBJETIVO III: INVESTIGAR LAS POBLACIONES CELULARES RESPONSABLES DE LA GENERACIÓN DE IFN- β ENDÓGENO NECESARIO PARA INDUCIR UNA RESPUESTA INMUNE ANTITUMORAL.

Resultados previos de nuestro grupo demostraron que poli A:U y poli IC son adyuvantes efectivos no sólo porque activan a las CD y promueven una fuerte respuesta adaptativa contra el tumor, sino que ellos pueden actuar directamente sobre el TLR3 presente en células tumorales e inducir la producción de IFN tipo I endógeno, principalmente IFN- β (Gatti y col., 2013; Núñez y col., 2012).

Ahora bien, ¿qué poblaciones celulares son las responsables de la generación de IFN- β endógeno en nuestro modelo? ¿Cuál es la contribución relativa en la producción de IFN- β endógeno de las células tumorales vs células de la inmunidad innata? Estos interrogantes serán abordados en la presente sección de la tesis.

ESTUDIO DE LA PRODUCCIÓN DE IFN- β POR PARTE DE CÉLULAS TUMORALES

Teniendo en cuenta que tras la activación de TLR3, se produce un aumento en la expresión del receptor (Agarwal y col., 2011), en una primera instancia, quisimos evaluar si las células tumorales estarían respondiendo al tratamiento terapéutico con poli A:U *in vivo*, midiendo los niveles de expresión TLR3. Para ello, se indujeron tumores en ratones wt e IFNAR1^{-/-} con la línea de melanoma murino B16, transformada establemente en nuestro laboratorio para que exprese la proteína fluorescente verde (B16-GFP). Una vez que los tumores alcanzaron un tamaño medible (día 12 p.i.), se procedió a realizarle el tratamiento i.t. cada dos días con PBS o poli A:U. Al día 15 p.i., luego de 2 dosis se procedió al aislamiento de las células tumorales de ambos grupos y cepas de ratones mediante *cell-sorting* de eventos CD45-GFP⁺. Luego de aislar la fracción proteica del lisado celular, se realizó análisis de la expresión de TLR3 por *western blot*.

Como se observa en la Figura III.20, el tratamiento i.t. con poli A:U no produjo un aumento significativo en la expresión de TLR3 en comparación a PBS en la cepa wt. En este sentido, tampoco se hallaron diferencias en los niveles de expresión de TLR3 en células B16-GFP aisladas de tumores de ratones IFNAR1^{-/-} entre ambos tratamientos. Estos resultados indicaron que tras el tratamiento i.t. con poli A:U desnudo no se modifica la expresión de TLR3 en la célula tumoral, en las condiciones ensayadas.

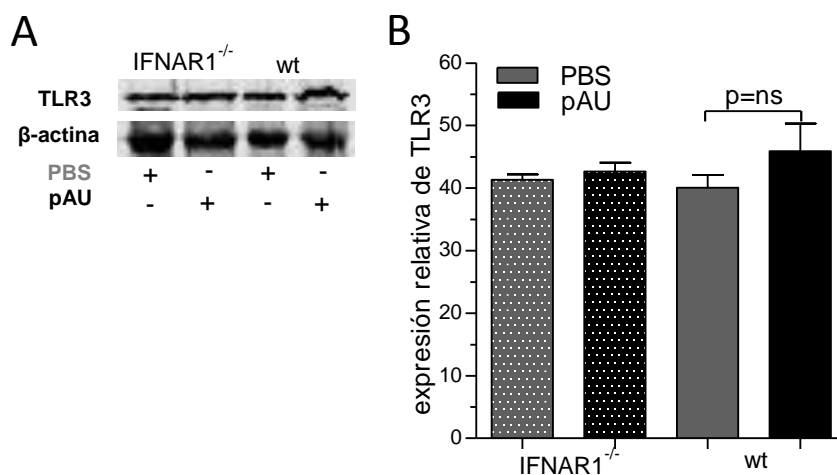


Figura III.20. El tratamiento i.t. con poli A:U no modifica la expresión de TLR3 en melanoma murino B16. **A)** Células B16-GFP fueron recuperadas por *cell sorting* de tumores PBS y pAU en ratones wt e IFNAR1^{-/-}, luego de recibir 2 dosis de tratamiento (día 15 p.i.; n=5/grupo). Sus lisados fueron corridos en condiciones desnaturalizantes para luego analizar la expresión de TLR3 por western blot usando anticuerpo anti-TLR3 y en la misma membrana como control de carga se usó anti-β-actina. **B)** Los gráficos de barras muestran la cuantificación de las bandas en “A” (media ±SD) de la expresión de TLR3 relativizada al control de carga por carril (cada muestra se corrió por duplicado). p> 0,05, mediante ANOVA de 1 vía.

Además evaluamos la producción de IFN-β mediante ELISA en células B16 estimuladas *in vitro* con poli A:U a distintas concentraciones y condiciones. Debido a que TLR3 se encuentra dentro de endosomas, utilizamos PEI ya que este le confiere a los ácidos nucleicos una carga positiva, favoreciendo la unión a la membrana plasmática aniónica y por endocitosis, el transporte a endosomas (Sirois y col., 2013; Akinc y col., 2005).

En la Figura III.21, se observan los niveles de IFN-β medidos en sobrenadantes de cultivo de 24 hs por ELISA. En las condiciones sin estímulo (B16+medio) o B16+PEI, se observaron niveles de IFN-β muy cercanos al límite de detección de la técnica (22,8±0,6 y 21,5±0,5 pg/ml respectivamente). Cuando se estimuló con el complejo PEI/poli A:U (B16+PEI:pAU) se generaron niveles mucho más altos de IFN-β (80±1 pg/ml), mientras que en la condición “B16+pAU 50μg” se alcanzaron niveles similares a las condiciones sin estímulo (23,1±0,7 pg/ml). Solo cuando se estimularon las células con concentraciones de poli A:U desnudo 10 veces más altas a las empleadas *in vivo* (B16+pAU 500μg), se pudo observar una ligera producción de IFN-β (30,5±2 pg/ml) comparado a la condición de estímulo “B16+pAU 50μg” (p<0,05).

Por lo tanto, en las condiciones ensayadas, no pudimos observar un aumento significativo en la producción de IFN- β por parte de la célula tumoral luego del estímulo *in vitro* con 50 μ g de poli A:U desnudo.

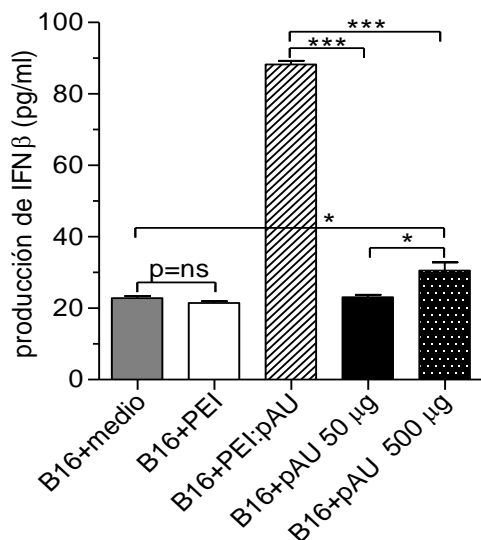


Figura III.21. Estudio *in vitro* de la secreción de IFN- β en melanoma murino B16. Los niveles de IFN- β fueron evaluados por ELISA en sobrenadantes de cultivo después de 24 hs de estímulo (según Materiales y Métodos). Los resultados indican la media \pm SD (de pocillos triplicados) de la producción de IFN- β (pg/ml) en las distintas condiciones. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; mediante ANOVA de 1 vía.

ESTUDIO DE LA INDUCCIÓN ENDÓGENA DE IFN- β POR PARTE DE CÉLULAS DEL HUÉSPED

A continuación, quisimos evaluar la contribución que podrían tener distintas poblaciones del sistema inmune en la generación de IFN- β endógeno, necesario para inducir una respuesta inmune específica contra antígenos tumorales y para el control del desarrollo tumoral en nuestro modelo preclínico.

En una primera instancia, intentamos medir si había producción de IFN- β *in vivo*, mediante el análisis de pool de sueros provenientes de ratones portadores de tumor tratados con 1 dosis de PBS o poli A:U. Pero mediante la técnica ELISA, en las condiciones ensayadas, fue imposible hallar niveles detectables de IFN- β en suero 24, 48 o 72 hs post tratamiento con poli A:U (datos no mostrados).

Por lo tanto, resultaba esencial para sustentar nuestra hipótesis, contar con alguna herramienta que nos permitiese demostrar fehacientemente que tras el tratamiento con poli A:U, se estaba produciendo IFN- β . Para ello, establecimos una colaboración con el Dr. Stefan Lienenklaus, del Helmholtz Centre for Infection Research, Braunschweig-Alemania que había desarrollado una cepa de ratón reportera para IFN- β que nos permitiría evaluar la producción de IFN- β endógeno en nuestro sistema (Lienenklaus y col, 2009).

Brevemente, estos ratones fueron modificados genéticamente de manera tal que expresaran el gen de la luciferasa en el lugar de la secuencia codificante de IFN- β (IFN- $\beta^{+/\Delta\beta\text{Luc}}$). Estos ratones, tienen el *background* genético C57BL/6, aunque carecen de melanina (que interfiere con la señal de luminiscencia), lo cual favorece la detección de la actividad de luciferasa. Al emplear ratones heterocigotos, permitió evaluar la expresión de IFN- β de un alelo y por lo tanto mantener el efecto ya observado. De tal manera que, luego de la inyección i.v. de D-luciferina se pudo realizar un seguimiento cinético de la inducción de luciferasa mediante un sistema de captura de imágenes IVIS 200 (Xenogen). Asimismo, el flujo de fotones pudo ser cuantificado mediante un software (Living Image), siguiendo protocolos ya establecidos por el grupo de los Dres. Stefan Lienenklaus y Jadwiga Jablonska (Kallfass y col., 2013; Lienenklaus y col., 2009; Solodova y col., 2011).

Para poder visualizar la producción endógena de IFN- β por parte del huésped *in vivo*, tumores B16 fueron inducidos en los ratones albino reporteros IFN- $\beta^{+/\Delta\beta\text{Luc}}$. Dado que la mayoría de nuestros resultados previos se han obtenido en el día 15 y 17 post inoculación tumoral (después de 3 o 4 inyecciones de poli A:U), realizamos una cinética de estudio de la inducción de IFN- β para ver si el tratamiento con poli A:U era capaz de inducir un incremento gradual de IFN- β (Figura III.22).

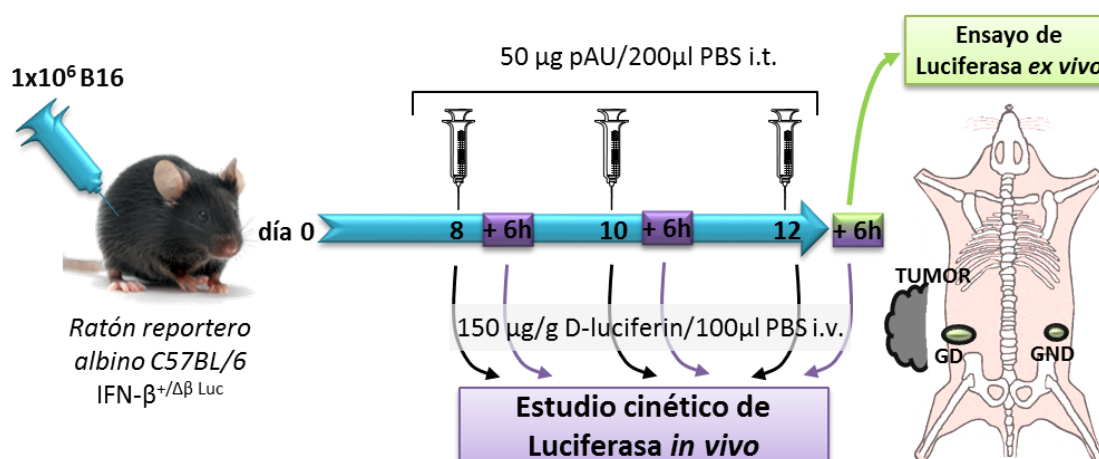


Figura III.22. Esquema experimental empleado para el estudio cinético de la producción de IFN- β endógeno *in vivo* y el análisis *ex vivo*.

Previo a esto, para descartar que la inyección i.t. no estuviese induciendo IFN- β como consecuencia de la injuria que se provoca en la misma zona de administración, se inyectaron i.t. ratones con 200 μl de PBS. La inyección del vehículo no produjo un

aumento en la señal de actividad luciferasa detectada, por lo que los sucesivos experimentos se realizaron únicamente con ratones tratados con poli A:U.

Cuando los tumores alcanzaron un tamaño medible (día 8 p.i.), un grupo de ratones se trató por vía intratumoral con 3 inyecciones, día de por medio con poli A:U como se describió anteriormente. Los diferentes grupos de ratones se inyectaron con luciferina previo al tratamiento y 6 hs después de cada dosis de poli A:U, y a estos tiempos se registraron las imágenes correspondientes (Figura III.22).

En la Figura III.23, se muestran los resultados obtenidos en el estudio cinético de ratones que recibieron 3 dosis de poli A:U. Al día 8, se capturó la lectura basal de actividad de luciferasa previa a realizarle el tratamiento. Luego de 6 hs de administrado poli A:U (día 8,25), observamos una fuerte inducción de IFN- β en la zona periférica al sitio de inoculación (Figura III.23-A).

Dicha señal fue decayendo en intensidad al cabo de 24 hs y 48 hs (día 9 y 10 p.i., respectivamente), a menos que se administrase una segunda dosis de poli A:U, generando un nuevo pico de inducción aunque de menor intensidad comparado con la primer dosis (día 10,25 vs 8,25 p.i.). Este fenómeno se repitió en la dosis siguiente (3^{ra}), donde con la nueva administración se inducía un pico de señal, de menor intensidad que el precedente, aunque cabe destacar que siempre de mayor magnitud que la lectura basal (día 8 p.i.) (Figura III.23-B).

Además, realizamos un estudio cinético de la inducción de IFN- β luego de una única dosis de poli A:U al día 8 p.i., y pudimos corroborar que a medida que transcurren los días hay una disminución gradual en la intensidad, que luego de 5 días se sigue manteniendo elevada (2 veces) respecto a la condición basal (Figura III.23-B).

Paralelamente, en este estudio cinético de inducción de IFN- β , capturamos las imágenes y lecturas de fluorescencia de la parte ventral de los ratones tratados a distintos tiempos. Observamos el mismo efecto localizado de inducción, que correspondía a la zona yuxtapuesta donde se administró poli A:U, y que abarcaba también la región inguinal del ratón. Asimismo, observamos que a medida que se administraron las sucesivas dosis, la señal disminuyó en intensidad, se hizo más localizada y luego de la 3^{ra} dosis, se correspondía con la ubicación del ganglio inguinal derecho del ratón, el GD del tumor (Figura III.24-A).

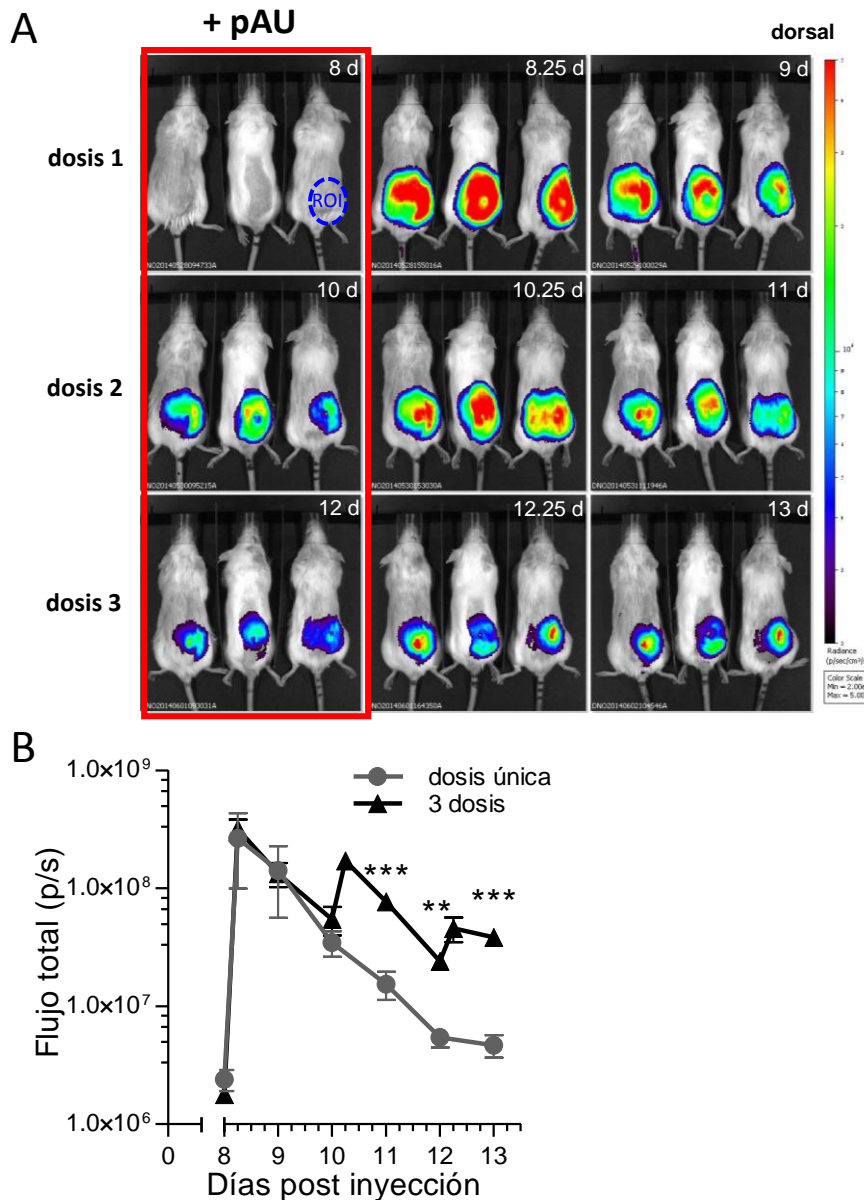


Figura III.23. Poli A:U induce un pico de IFN-β a las 6 hs post tratamiento. A) Ratones albino IFN-β^{+/-}Δβ-luc portadores de tumores B16 fueron tratados con poli A:U en los días indicados por el recuadro rojo (días 8, 10 y 12). Para capturar cada imagen dorsal, los ratones fueron inyectados (i.v.) con D-luciferina y anestesiados vía nasal/oral con sistema continuo de isoflurano. La actividad de luciferasa se visualizó en el equipo IVIS 200. **B)** Cuantificación de las imágenes capturadas en "A" mediante la medición de intensidad de luminiscencia dentro de las regiones seleccionadas de interés (ROI) en los días representados. Los datos se muestran como media ± SEM (n = 10 ratones / grupo). ** p < 0,01; *** p < 0,001; mediante Bonferroni post test de ANOVA de 2 vías.

En línea con estos resultados, no observamos prácticamente inducción de IFN-β en la región del ratón que correspondería al hígado, lo que confirmó que en nuestro modelo preclínico, había un efecto localizado y no a nivel sistémico, y por otro lado, que poli A:U induciría baja actividad hepática lo que podría relacionarse con su baja toxicidad *in vivo* comparado a otros ligandos de TLR3 (Figura III.24-A y B).

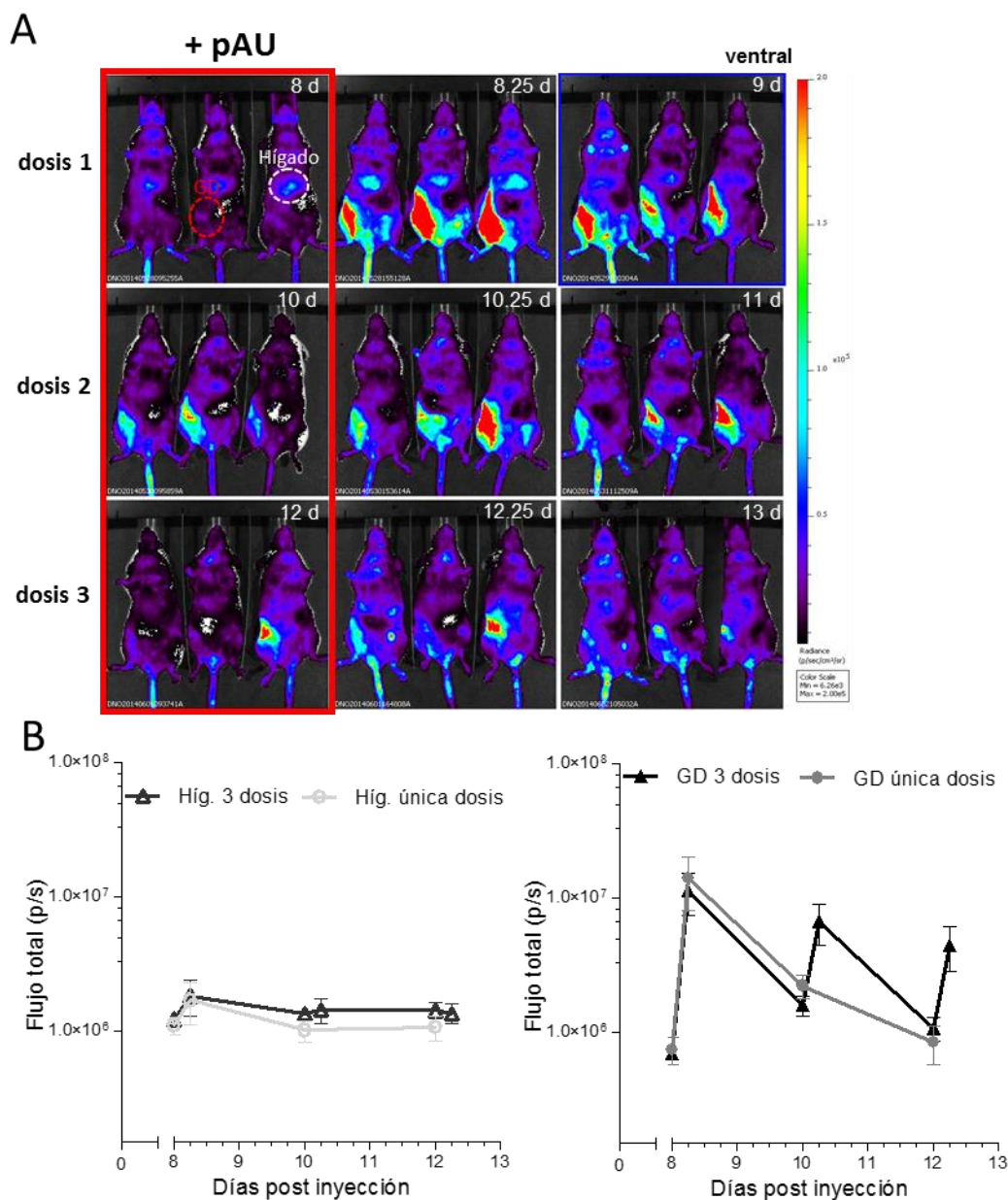


Figura III.24. Cinética de la inducción de IFN- β en el modelo de administración terapéutico de poli A:U. A) Ratones albino IFN- $\beta^{+/\Delta\beta-luc}$ portadores de tumores B16 fueron tratados con poli A:U en los días indicados por el recuadro rojo (días 8, 10 y 12). Para capturar cada imagen ventral, los ratones fueron inyectados (i.v.) con D-luciferina y anestesiados vía oral con sistema continuo de isofluorano. La actividad de luciferasa se visualizó en el equipo IVIS 200. B) Cuantificación de las imágenes capturadas en "A" mediante la medición de intensidad de luminiscencia dentro de las regiones seleccionadas de interés (ROI) para GD (en rojo) e hígado (en blanco) en los días representados. Los datos se muestran como media \pm SEM (n = 10 ratones/grupo).

Nuestros resultados indicaron que el tratamiento i.t. con poli A:U desnudo fue capaz de inducir una fuerte producción local de IFN- β por parte de las células del huésped. Asimismo, se pudo corroborar que luego de cada tratamiento con el ligando, hubo una

fuerte inducción de IFN- β respecto a la condición basal, pero de menor intensidad que la dosis inicial.

ESTUDIO DE LA PRODUCCIÓN DE IFN-B EN DISTINTOS LINAJES CELULARES DEL SISTEMA INMUNE

En una segunda instancia, nos propusimos investigar la contribución diferencial de distintos linajes celulares dentro del SI que, estando presentes en el microambiente del tumor, podrían ser responsables de la producción de IFN- β en nuestro modelo.

Para ello, empleamos una variante de la cepa de ratones reporteros anteriormente usados: ratones reporteros que poseen bajo el promotor de IFN- β la secuencia de la luciferasa flanqueada por sitios loxp (IFN- $\beta^{+/lox\beta}Luc$), susceptible a la acción de la enzima Cre recombinasa. A su vez, estos ratones fueron cruzados con ratones que expresan la enzima Cre recombinasa bajo el promotor de determinadas moléculas características de distintos tipos celulares: $LysM^{+/Cre}$, $CD11c^{+/Cre}$, $CD19^{+/Cre}$ o $CD4^{+/Cre}$ para generar ratones que expresan el gen reportero únicamente en M ϕ /monocitos y granulocitos ($LysM^{+}$), o en CD (células $CD11c^{+}$), células B ($CD19^{+}$) o células $CD4^{+}$ (LiT en su mayoría) respectivamente. Por lo tanto, los ratones resultantes expresan luciferasa en determinados tipos celulares, que en la presente tesis los denominamos ratones reporteros específicos de linaje, mientras que los ratones $IFN-\beta^{+/lox\beta}Luc$ se los consideró reporteros globales.

Los tumores B16 se indujeron en estas distintas cepas de ratones y se llevó a cabo el tratamiento de poli A:U, empleando la misma cinética, tal cual se describió anteriormente. Como se puede observar en la Figura III.25-A y -B, luego de 6 hs de la primera dosis de poli A:U, hubo una fuerte inducción de luciferasa en ratones reporteros globales, $LysM^{+}/IFN-\beta^{+/lox\beta}Luc$ y $CD11c^{+}/IFN-\beta^{+/lox\beta}Luc$. Por otro lado, hubo una leve inducción en ratones $CD4^{+}/IFN-\beta^{+/lox\beta}Luc$ mientras que no se observó inducción de luciferasa en ratones $CD19^{+}/IFN-\beta^{+/lox\beta}Luc$. Esta tendencia se repitió al aplicar las dosis restantes, aunque la intensidad de luminiscencia disminuyó progresivamente tal cual describimos en la sección anterior. Por lo tanto estos resultados indicaron que la población mieloide (M ϕ /monocitos y granulocitos) y CD son la principal fuente de IFN- β en nuestro modelo. Sorpresivamente, las células $CD4^{+}$ también contribuyeron aunque minoritariamente en la producción de dicha citocina. Por otro lado, los Li B no son capaces de producir IFN- β tras la estimulación con poli A:U. Cabe destacar que el mismo efecto se vió al analizar las imágenes ventrales de los ratones reporteros, donde

nuevamente la señal colocalizaba con la región correspondiente al GD (datos no mostrados).

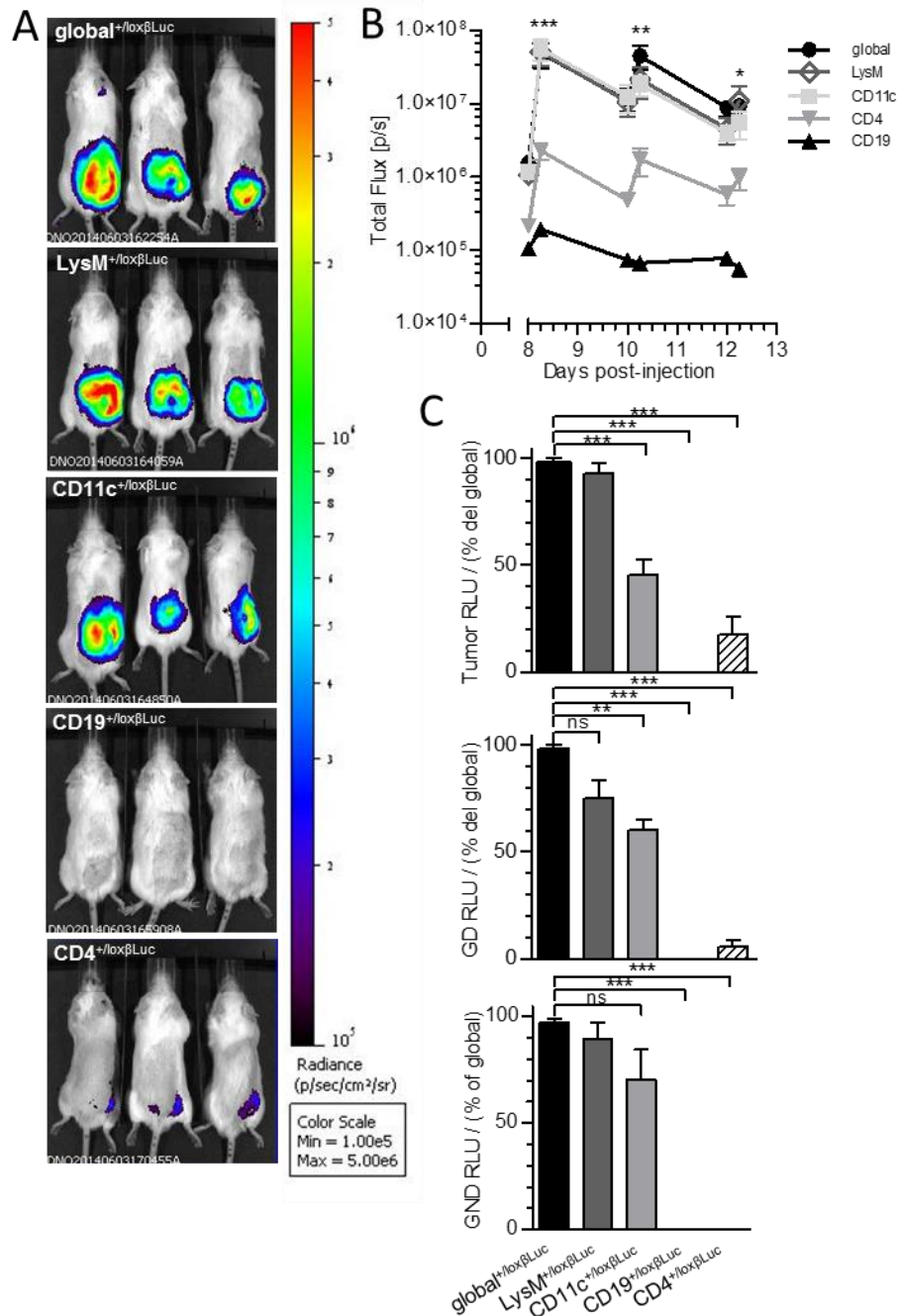


Figura III.25. Las células LysM⁺ y CD11c⁺ son los principales responsables de la producción de IFN-β luego del tratamiento con poli A:U. **A)** Imágenes representativas 6 hs post tratamiento de ratones reporteros linaje-específicos portadores de tumores B16 con poli A:U (día 8,25). **B)** Cuantificación de las imágenes dorsales capturadas en los distintos días indicados mediante la medición de intensidad de luminiscencia dentro de las regiones seleccionadas de interés (ROI). Los datos se muestran como media ± SEM. **C)** Análisis *ex vivo* de la actividad de Luciferasa de muestras representativas extraídas de tumor, GD y GND al día 12,25 p.i. Se muestra la media ± SD de los % de unidades relativas de luciferasa (RLU) respecto al global (n = 10 ratones / grupo). *p <0,05; **p <0,01; ***p <0,001; mediante análisis de pos test Bonferroni a partir de ANOVA de 2 vías.

Una limitación de la técnica empleada en el “imaging” *in vivo* es que la intensidad de la señal obtenida en la toma dorsal, puede solaparse con la obtenida en la toma ventral debido a que el sitio donde se implanta el tumor es delgado y los detectores del equipo poseen alta sensibilidad. Es decir, que podría haber una sobrevaloración por la sumatoria de luminiscencias (dorsal y ventral) de los valores obtenidos en tumor respecto a aquellos obtenidos en GD, o viceversa.

Para poder dilucidar con mas detalle si los distintos linajes contribuían de igual forma en tumor y GD, se aislaron muestras representativas de dichos tejidos y se midieron los niveles de Luciferasa *ex vivo* en luminómetro luego de 3 dosis de poli A:U (día 13,25 p.i.). Además se empleó como tejido control, el GND. Los valores de actividad de luciferasa en los ratones reporteros linaje-específicos, tratados con poli A:U se relativizaron a los valores medidos en ratones reporteros "globales": en tumor $3,69 \times 10^6 \pm 4 \times 10^4$, GD $4,68 \times 10^6 \pm 2,9 \times 10^4$ y GND $6,45 \times 10^5 \pm 3,8 \times 10^4$ RLU/[g de tejido x seg de integración] (considerados como el 100 %) (Figura III.25-C).

Al analizar las mediciones de luciferasa *ex vivo* en tumor, observamos sorpresivamente que mientras las células LysM+ producen el $93 \pm 3,5$ % del IFN- β , las células CD11c+ sólo producen el $45,8 \pm 4,3$ %, indicando que aproximadamente la mitad del IFN- β es producido por una población de células LysM+CD11c- (mieloides pero no dendríticas). Por otro lado, el análisis de GD mostró un aumento en la contribución de las CD ($60,3 \pm 4,8$ %) y una disminución en las células LysM+ ($75 \pm 4,6$ %) comparado con tumor. Además resultó llamativo el hecho de que haya un $25 \pm 4,4$ % del IFN- β producido en GD que proviene de células LysM-CD11c-, lo que sugiere que en este tejido existiría otro linaje no mieloide que estaría aportando dicha citocina. Asimismo cuando analizamos GND, observamos que a diferencia de lo que ocurrió en GD, el linaje LysM+CD11c+ fue responsable de casi la totalidad del IFN- β . Por lo tanto, este resultado también pone en evidencia la capacidad de poli A:U para inducir cambios funcionales en las poblaciones analizadas en el ganglio centinela del tumor (GD).

A continuación, analizamos si el tratamiento con poli A:U modifica la expresión de TLR3 en diferentes poblaciones de células mieloides que infiltran los tumores en ratones wt e IFNAR1^{-/-} que fueron tratados con 3 dosis de poli A:U (día 15 p.i.).

Como se muestra en la Figura III.26, llamativamente encontramos un porcentaje muy bajo de células CD45+TLR3+ infiltrantes de tumor en ratones IFNAR1^{-/-} dentro de todas las subpoblaciones analizadas (panel inferior, de izquierda a derecha: células

CD11c+, CD11b+F4/80+ y CD11b+Gr1+). Además, estos porcentajes no se modificaron luego del tratamiento con poli A:U. En contraste, cuando analizamos los ratones wt del grupo PBS, el mayor porcentaje de células TLR3 + se encontró dentro de la subpoblación CD11b+F4/80+ y el tratamiento no afectó claramente este porcentaje (aumentó 1,2 veces). Las otras dos poblaciones analizadas mostraron una respuesta más definida al tratamiento con poli A:U, ya que observamos un aumento de casi 2 veces en la frecuencia de células CD11c+TLR3+ ($p < 0,05$) y para nuestra sorpresa, un aumento de alrededor de 3 veces en la frecuencia de células CD11b+Gr1+TLR3+ ($p < 0,01$). Estos hallazgos estarían indicando que si bien las tres subpoblaciones mieloides respondieron al tratamiento con poli A:U en el microambiente tumoral sobreexpresando TLR3, tanto las CD como las células CD11b+Gr1+ lo hicieron con mayor intensidad (Figura III.26).

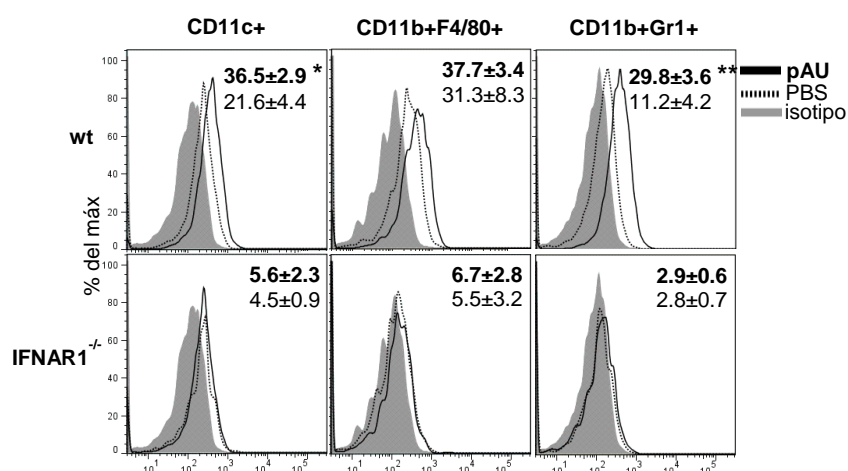


Figura III.26. Expresión de TLR3 en TILs de linaje mieloides en ratones portadores de tumores B16 wt e IFNAR1^{-/-}. Histogramas representativos de la expresión de TLR3 en diferentes poblaciones CD45 + infiltrantes de tumor: células CD11c + (panel izquierdo), CD11b +F4/80 + (panel central) y CD11b + GR1 + (panel derecho), respectivamente. Los números indican los porcentajes medios ± SEM, el grupo pAU se muestra en negrita (n = 5 ratones / grupo). * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; mediante análisis de pos test Bonferroni a partir de ANOVA de 1 vía.

Estos resultados nos permitieron definir con más detalle los obtenidos previamente en ratones reporteros linaje-específicos. Por lo tanto, luego del tratamiento con poli A:U mientras que las CD producirían alrededor del 50 % del IFN- β en tumor, el otro 50 % sería aportado por células LysM+ y probablemente células CD11b+Gr1+, un hallazgo muy interesante y que no se había reportado previamente.

OBJETIVO ESPECÍFICO III.I: EXPLORAR LOS MECANISMOS MOLECULARES QUE CONDUCEN A LA INDUCCIÓN DE IFN- β EN RESPUESTA AL TRATAMIENTO CON POLI A:U.

ESTUDIO *IN VIVO* DE LAS VÍAS SEÑALIZACIÓN INVOLUCRADAS EN LA INDUCCIÓN DE IFN- β

Se sabe que los niveles de producción del IFN- β dependen de su regulación transcripcional. El paradigma actual indica que para la inducción de IFNs tipo I se reclutan factores de transcripción o IRFs (factores reguladores de interferón) que se activan por fosforilación en respuesta a cascadas de señalización activadas por una infección viral o estimulación de algún TLR. El promotor de IFN- β contiene cuatro dominios reguladores positivos que están ocupadas por diferentes factores de transcripción. IRF3 se une tempranamente debido a su expresión constitutiva mientras que IRF7 se une más tarde, con una cinética retrasada, debido a su expresión inducible a través de un ciclo de retroalimentación positiva dependiente de IFN-I ((Lazear y col., 2013; Honda y Taniguchi, 2006; Perry y col., 2005; Gautier y col., 2005).

A diferencia de IRF3, que se expresa constitutivamente en todos los tipos celulares, la expresión de IRF5 y IRF7 está restringido a células B y CD, aunque su expresión es inducible por IFN tipo I en otros tipos celulares. A diferencia de TLR3, TLR7 y TLR8 activan IRF5 e IRF7 pero no IRF3. Tanto IRF5 como IRF7 transducen señales de manera dependiente de MyD88, en contraste con IRF3, que transduce señales de activación de TLR3 a través de TRIF (Kawasaki & Kawai, 2014).

Asimismo, para que toda esta vía de señalización sea inducida, es necesario que TLR3 resida en endosomas. UNC93B1 (Unc-93 homólogo B1) es un factor regulador importante que controla el tráfico de los TLR intracelulares (TLR 3, 7 y 9), pero no de TLR localizados en la superficie celular. Se ha demostrado que UNC93B1 es una proteína accesoria indispensable para la activación de los TLR endosomales ya que su delección afecta la translocación de TLR de RE a endosomas (Blasius & Beutler, 2010; Garcia-Cattaneo y col., 2012; Kawai & Akira, 2011).

Con el fin de explorar los mecanismos que conducen a la inducción de IFN- β en respuesta al tratamiento con poli A:U, se reprodujo el modelo experimental en ratones reporteros IFN $\beta^{+/\Delta\beta}$ Luc, IFN $\beta^{+/\Delta\beta}$ Luc IRF3 $^{-/-}$, IFN $\beta^{+/\Delta\beta}$ Luc IRF5 $^{-/-}$, IFN $\beta^{+/\Delta\beta}$ Luc IRF7 $^{-/-}$

y $\text{IFN}\beta^{+/\Delta\beta}$ Luc UNC93B1^{-/-} disponible en el laboratorio de los Dres Jablonska y Lienenklaus . Los tumores se generaron como se describió anteriormente y se evaluó la cinética en estas distintas cepas de ratones reporteros deficientes en distintas moléculas de la vía de señalización de IFN tipo I (Figura III.27).

Mediante el estudio cinético de inducción de IFN- β en estos ratones, observamos que 6 hs luego del tratamiento con poli A:U hubo una disminución marcada en la señal de luminiscencia detectada en tumor de ratones deficientes para IRF3 y UNC93B1, pero no así en ratones deficientes para IRF5 e IRF7 (Figura III.27-A y B). Asimismo, observamos la misma tendencia luego de sucesivas dosis de poli A:U (días 10,25 y 12,25 p.i.).

Para poder dilucidar con mas detalle la inducción de IFN- β en tumor y ganglio, se aislaron muestras representativas de dichos tejidos y se midieron los niveles de Luciferasa en luminómetro. Los valores de actividad de luciferasa en los ratones reporteros deficientes en IRF y UNC93B1 se relativizaron a los valores medidos en ratones reporteros wt: en tumor $3,69 \times 10^6 \pm 4 \times 10^4$, GD $4,68 \times 10^6 \pm 2,9 \times 10^4$ y GND $6,45 \times 10^5 \pm 3,8 \times 10^4$ RLU/[g de tejido x seg de integración] (considerados como el 100 %) (Figura III.27-C).

La medición *ex vivo* de la actividad de luciferasa en tumor de ratones sacrificados después de 3 dosis de poli A:U confirmó que la inducción de IFN- β era dependiente de exclusivamente de IRF3 y UNC93b1; aunque para nuestra sorpresa, no ocurrió lo mismo en GD, ya que notamos además un decaimiento a casi el 60 % en la señal de luminiscencia tanto en ratones IRF5^{-/-} como IRF7^{-/-} (Figura III.27-C). En contraste, en GND observamos una dependencia de las moléculas IRF3 y UNC93b1, tal cual ocurrió en tumor, aunque con un porcentaje de inhibición menor en la luminiscencia ($36,4 \pm 4,5$ y $44,3 \pm 3,9$ % respectivamente).

Estos hallazgos ponen en evidencia las diferencias que existen en las vías de señalización que emplean las poblaciones celulares presentes en tumor, de aquellas responsables de producir IFN- β en GD. Probablemente, esto sea reflejo también de las diferencias que existen en el microambiente de citocinas, así como en el tipo y proporción de poblaciones entre ambos tejidos, descriptas a lo largo de esta tesis.

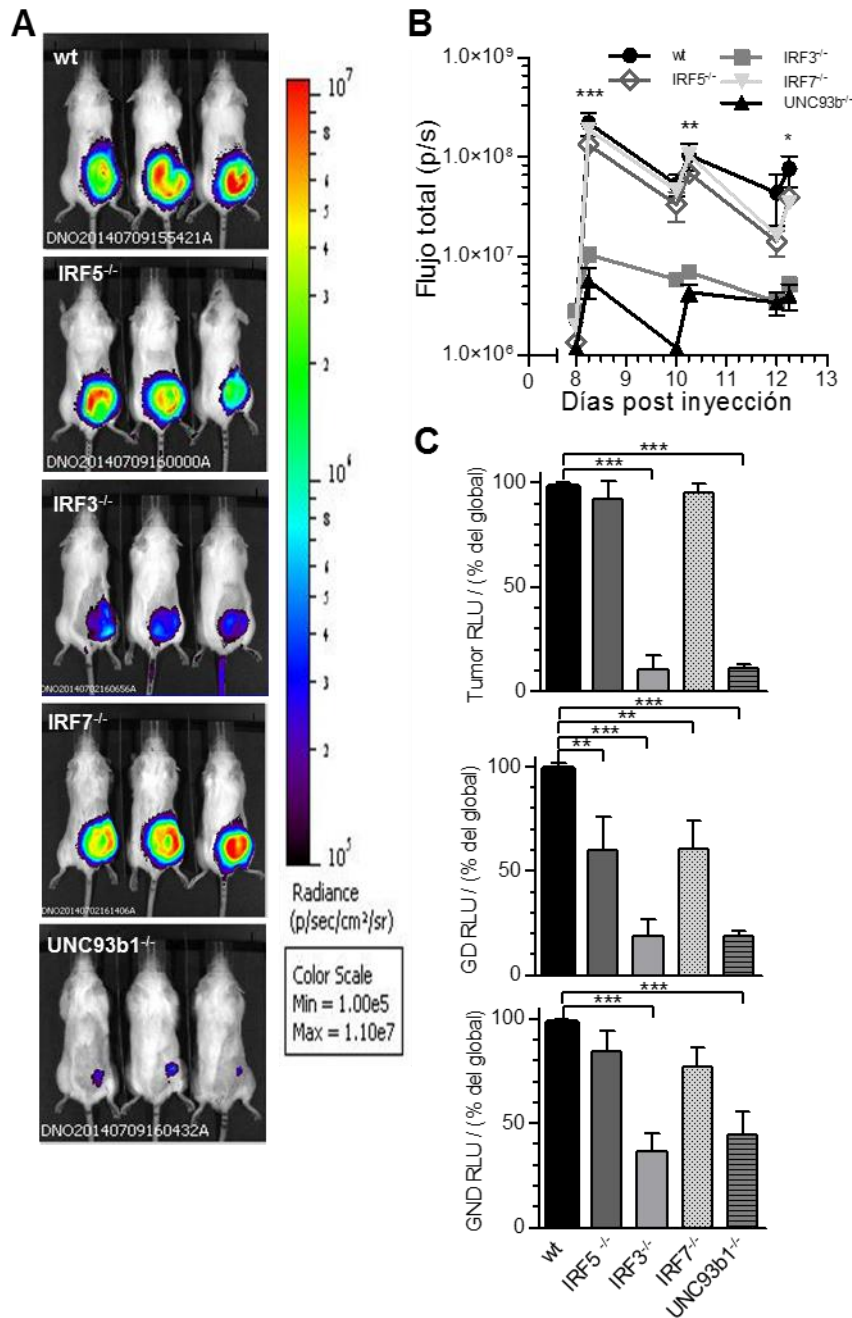


Figura III.27. IRF3 y UNC93B1 son necesarios para la producción de IFN-β luego del tratamiento con poli A:U. **A)** Imágenes representativas de ratones reporteros deficientes en moléculas de señalización portadores de tumores B16 6 hs post tratamiento con poli A:U (día 8,25). **B)** Cuantificación de las imágenes dorsales capturadas en los distintos días indicados mediante la medición de intensidad de luminiscencia dentro de las regiones seleccionadas de interés (ROI). Los datos se muestran como media ± SEM. **C)** Análisis *ex vivo* de la actividad de Luciferasa de muestras representativas extraídas de tumor, GD y GND al día 12,25 p.i. Se muestra la media ± SD de los % de unidades relativas de luciferasa (RLU) respecto al global (n = 10 ratones / grupo). *p <0,05; **p <0,01; ***p <0,001; mediante análisis de pos test Bonferroni a partir de ANOVA de 2 vías.

Por lo tanto, podemos concluir que luego del tratamiento i.t. con poli A:U, se produce la activación de TLR3 en células mieloides, proceso dependiente de la proteína

chaperona UNC93B1 y por ende de su localización en endosomas, que conlleva a la transducción de señal dependiente de IRF3, pero no de IRF5 e IRF7, que finalmente induce entre otros eventos la producción de IFN- β , citocina clave para poder montar una respuesta inmune antitumoral efectiva.

OBJETIVO ESPECÍFICO III.II: ANALIZAR EL ROL DE LA SEÑALIZACIÓN DE IFN TIPO I SOBRE LAS CÉLULAS DEL HUÉSPED EN EL CONTROL DEL DESARROLLO TUMORAL EN MODELOS PRECLÍNICOS DE ADMINISTRACIÓN INTRATUMORAL DE POLI A:U.

ESTUDIO DE LA PARTICIPACIÓN DEL RECEPTOR DE INTERFERONES TIPO I EN EL DESARROLLO TUMORAL Y LA SOBREVIVENCIA EN NUESTRO MODELO EXPERIMENTAL

Dado que poli A:U es un análogo sintético de ARNdc capaz de ser reconocido por TLR3, la activación de la vía TRIF conduciría a una fuerte inducción de IFN tipo I. Los IFN tipo I inhiben directamente la proliferación de tumor y las células infectadas por virus y aumentan la expresión de CMH clase I, mejorando así el reconocimiento de antígenos (McNab y col., 2015; González-Navajas y col., 2012). Por otra parte, los IFN tipo I reprimen la expresión de oncogenes e inducen la expresión de genes supresores de tumores, que pueden contribuir a los efectos inhibitorios de IFN-I en las células malignas en conjunción con los efectos anti angiogénicos (Spaapen y col., 2014; Wang y col., 2011).

En el contexto tumoral, el IFN- β endógeno presente en niveles fisiológicos, tiene un importante rol en la inmunovigilancia y en el control del desarrollo tumoral (Jablonska y col., 2010). Los IFN tipo I también han demostrado estar involucrados en la regulación del sistema inmunológico, ejerciendo sus efectos sobre las células inmunes, ya sea directamente, a través de la activación de IFNAR, o indirectamente (i) por la inducción de quimiocinas, que permiten el reclutamiento de células inmunes en el sitio de la infección; (ii) por la secreción de una segunda oleada de citocinas, lo que podría regular aún más el número de células y funciones (como por ejemplo, IL-15, que desempeña un papel crítico en la proliferación y mantenimiento de las células NK y células T CD8 de memoria); o (iii) por la estimulación de otros tipos celulares críticos para la activación de ciertas células inmunes, tales como las CD que resultan clave para la activación de células T vírgenes (Fuertes y col., 2013; Hervas-Stubbs y col., 2011).

Trabajos previos del grupo demostraron que el tratamiento con poli A:U acompañado a PEI fue capaz de reducir significativamente el crecimiento tumoral en ratones deficientes en TLR3, aunque de manera transitoria y con menor eficiencia que en ratones wt. Estos resultados ponían en evidencia que, si bien la propia célula tumoral puede contribuir positivamente a la disminución del volumen tumoral, las células del huésped también podían estar contribuyendo en el control del crecimiento tumoral (Figura I.6).

En nuestro modelo, manejamos como hipótesis que, luego de la estimulación local con poli A:U, se induciría un microambiente proinflamatorio con la presencia de IFN- β , el cual actuaría a nivel de las células del sistema inmune a través de su receptor IFNAR, favoreciendo el orquestado de una respuesta antitumoral efectiva, descrita anteriormente en la Parte II de la presente tesis. Es por esto que quisimos evaluar los efectos del tratamiento con poli A:U en un contexto donde las células del huésped carecen de la señalización inducida por IFN tipo I.

Por lo tanto, se indujeron tumores de melanoma murino B16 en ratones deficientes en la cadena de baja afinidad del receptor para interferones tipo I (IFNAR1^{-/-}) y procedimos a realizar el tratamiento tal cual se describió en la Parte I de este capítulo. De esta manera, si el receptor IFNAR presente en las células del huésped estuviera involucrado en la disminución del crecimiento tumoral observada, no se deberían obtener diferencias significativas en el volumen tumoral de los ratones IFNAR1^{-/-} entre ambos grupos. Por el contrario, si no hubiese participación alguna de IFNAR en el huésped o fuese un fenómeno causado principalmente por la señalización vía IFNAR presente en la propia célula tumoral, entonces se deberían observar diferencias significativas en el volumen tumoral de aquellos ratones tratados con poli A:U.

A partir del día 9 p.i. se comenzó con el tratamiento y a medida que fueron administradas las sucesivas dosis de pAU, no observamos una disminución estadísticamente significativa del volumen tumoral, aún luego de completado el esquema de 4 dosis respecto al grupo control (Figura III.28-A).

Conforme a lo publicado en la literatura, los ratones deficientes en IFNAR tuvieron una mayor susceptibilidad al desarrollo tumoral que los ratones wt (Spaapen y col., 2014) (Figura III.29). Comparando las medias del volumen tumoral al día 20 p.i., pudimos corroborar que ratones del grupo PBS y pAU en ratones IFNAR1^{-/-} presentaban tumores significativamente mayores comparado al grupo de ratones PBS en la cepa wt (2,5 veces más).

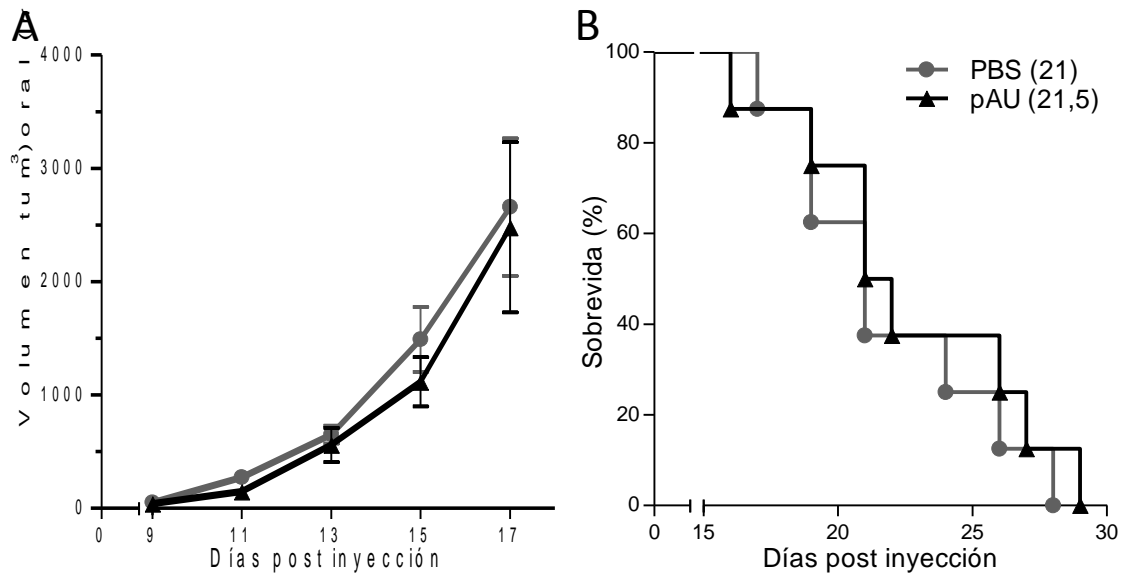


Figura III.28. El tratamiento i.t. de melanoma murino B16 con poli A:U no modifica el crecimiento tumoral y la supervivencia de los animales tratados $IFNAR1^{-/-}$. **A)** El crecimiento y volumen tumoral fue monitoreado día a día por medio ($n=8$ /grupo). $p=ns$, mediante ANOVA de dos vías. **B)** Curva de supervivencia de ratones $IFNAR1^{-/-}$ tratados según se describe anteriormente, mediana de supervivencia grupos PBS y pAU, 21 y 21,5 p.i., respectivamente ($n=8$ /grupo), las curvas no difieren significativamente entre sí, mediante Test Log-rank (Mantel-Cox).

Además, al realizar el seguimiento en el tiempo de ambos grupos de ratones $IFNAR1^{-/-}$ portadores de tumor, observamos que el tratamiento con poli A:U no prolongó la supervivencia de los ratones tratados respecto al grupo PBS (Figura III.28-B).

Por lo tanto, las señales intracelulares que los IFN-I generan vía su receptor son requeridas para el control del crecimiento tumoral y el aumento de la supervivencia de ratones tratados i.t. con poli A:U desnudo. Por el contrario, no podemos descartar la participación directa del receptor IFNAR presente en las células de melanoma B16.

Si bien estos resultados no permitieron discernir la posible fuente de IFN-I, resultó evidente la participación crucial y directa del receptor IFNAR en células del huésped. Además, estos resultados indirectamente estarían indicando que tras la estimulación con poli A:U, hay una producción de IFN-I, al menos local, ya que la disminución tumoral observada en ratones wt del grupo pAU depende de la activación del receptor IFNAR.

Estos resultados nos permitieron hipotetizar que tras la estimulación local con el ligando de TLR3, se produciría IFN-I, el cual sería reconocido por su receptor IFNAR presente en las células del huésped, posiblemente células del sistema inmune, que

generarían cambios fenotípicos y funcionales en éstas células, resultando fundamental para el control del volumen tumoral y el aumento de la supervivencia de los animales tratados.

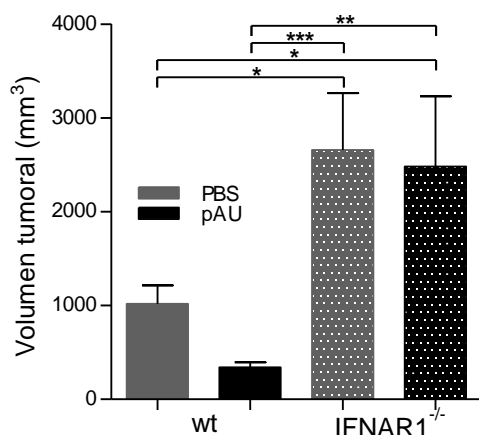


Figura III.29. Los tumores B16 en ratones wt son significativamente menores que en ratones IFNAR1^{-/-}. Las barras indican la media \pm SEM del volumen tumoral al día 20 p.i. en ratones de ambas cepas del grupo PBS y pAU (n=8/grupo). * p < 0,05; **p < 0,01; *** p < 0,001: mediante ANOVA de 1 vía.

ANÁLISIS DEL EFECTO DEL TRATAMIENTO CON POLI A:U SOBRE EL INFILTRADO LEUCOCITARIO EN RATONES IFNAR1^{-/-}

A continuación, quisimos evaluar si la carencia de la señal dada por los IFN-I que se producía en el microambiente tumoral, podría estar afectando la llegada de leucocitos al tumor. Con este fin, se realizaron cortes de tumores de ambos grupos experimentales al día 17 p.i. y se procedió a la marcación con DAPI y anti CD45, tal cual lo hicimos previamente en ratones wt y se muestra en la Figura III.11-A (parte I). El análisis por microscopía confocal determinó que tras el tratamiento con poli A:U, no se incrementó la presencia de células CD45+ en tumor, comparado al grupo PBS en ratones deficientes en el receptor IFNAR (Figura III.30-A). De hecho, resultó muy difícil poder obtener fotografías con presencia de células CD45+ por encontrarse en baja densidad en tumor; en algunos campos se pudo observar que su distribución en la arquitectura del tumor fue fundamentalmente a nivel de la vasculatura y mucho menos frecuente en parénquima.

Estos resultados fueron confirmados mediante el análisis por citometría de flujo de TILs, ya que el grupo pAU presentó similar número de células CD45+ por gramo de tumor comparado al grupo PBS ($2,08 \pm 0,38$ vs $2,22 \pm 0,51$ TILs/g de tumor) (Figura III.30-B). Por lo tanto, el tratamiento i.t. con poli A:U en ratones IFNAR1^{-/-} no produjo cambios en el infiltrado leucocitario en tumor, revelando que las señales vía IFNAR son un proceso necesario para la migración y reclutamiento de células del sistema inmune a tumor.

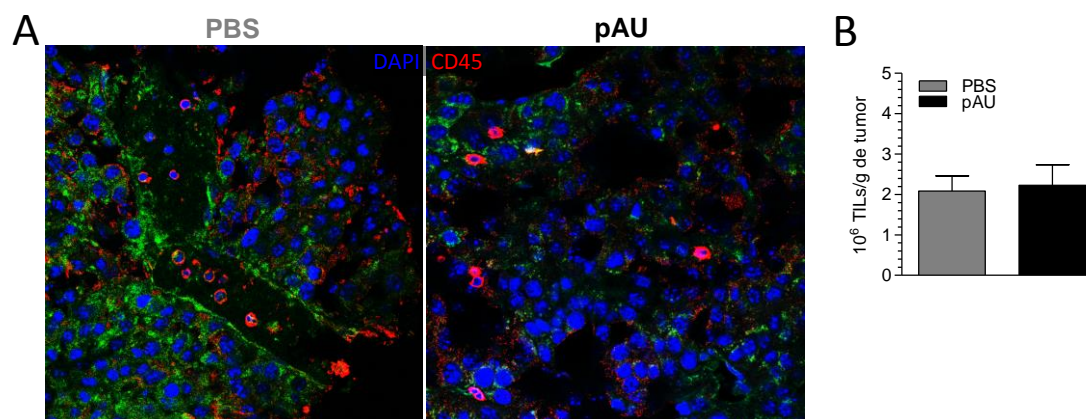


Figura III.30. El tratamiento con poli A:U no modifica el número de células CD45+ infiltrantes de tumor en ratones IFNAR1^{-/-}. **A)** Fotografías representativas de secciones de tumores provenientes de ratones de ambos grupos, fueron marcadas con DAPI y anti-CD45-Alexa546. **B)** Las suspensiones celulares provenientes de tumor fueron marcadas con anti-CD45-APCcy7 y cuantificadas por citometría de flujo. Las barras representan la media \pm SD, * $p < 0,05$; mediante test T.

ESTUDIO DE LA PARTICIPACIÓN DE LAS CD EN RATONES IFNAR1^{-/-} PORTADORES DE TUMOR

La función principal de las CD es la captación y el procesamiento de antígenos para la presentación a células T. Los IFN tipo I tienen múltiples efectos en las CD, afectando su diferenciación, maduración y migración (Hervas-Stubbs y col., 2011). Por consiguiente, quisimos estudiar si la reducción de infiltrado leucocitario en ausencia de IFNRA1, podría verse acompañada por una disminución en la funcionalidad de las CD. Teniendo en cuenta que en nuestro modelo en ratones wt, el tratamiento i.t. con poli A:U modificó el estado de activación de las células CD11c+, analizamos esta población en ganglio y tumor de ratones IFNAR1^{-/-} al día 15 p.i. (luego de administradas 3 dosis).

El análisis por citometría de flujo de la población CD11c+ indicó que el tratamiento con poli A:U no modificó el porcentaje de células CD45+ CD11c+ infiltrantes de tumor que expresaban las moléculas CD40 y CD86 (Figura III.31-A). Además, no observamos diferencias en la IFM de CD40 y CD86 en células CD45+ CD11c+ que infiltran tumor (Figura III.31-B). Cuando comparamos estas moléculas coestimuladoras en células CD11c+ residentes de GD, no observamos cambios luego del tratamiento.

Cuando evaluamos las células CD45+CD11c+ productoras de IL-12 infiltrando tumor, no observamos diferencias ni en porcentajes ni en IFM entre los tratamientos. Este hallazgo se correlacionó con los resultados obtenidos de CD IL-12+ en GD (Figura III.31-B).

Cabe destacar que sorpresivamente, los valores basales (grupo PBS) de CD86 evaluados en GD de ratones IFNAR1^{-/-} (Figura III.31) se encontraban aumentados respecto a los valores basales obtenidos en GD de ratones wt (Figura III.13).

En conjunto, estos resultados estarían indicando que la presencia y señalización de IFN-I favorecería el estado de maduración de las CD tras la estimulación con poli A:U, y a su vez incrementaría la frecuencia de células productoras de IL-12, clave para montar una respuesta Th1 antitumoral.

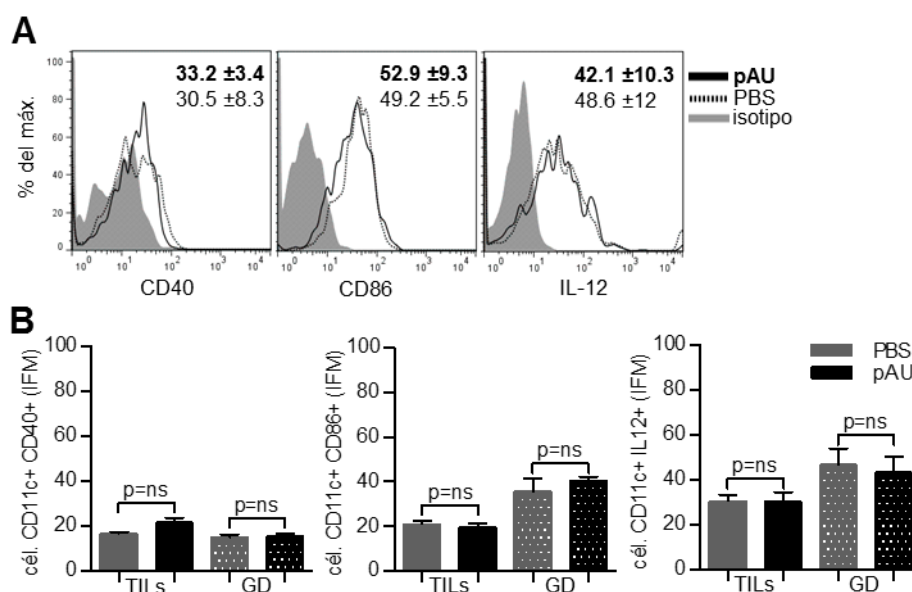


Figura III.31. Poli A:U no modifica la expresión de moléculas coestimuladoras e IL-12 en células CD45+CD11c+ infiltrantes de tumor en ratones IFNAR1^{-/-}. A) Histogramas representativos del % de células CD45+CD11c+ que expresan CD40, CD86 e IL12 en tumores del grupo PBS y pAU. Los números indican media ±SD, en negrita pAU. B) Las barras representan la media ±SD de la intensidad de fluorescencia media (IFM), de células CD45+CD11c+ infiltrantes de tumor (TILs) y en GD. p > 0,05; mediante ANOVA de 1 vía (n=6/grupo; día 15 p.i.).

ESTUDIO DEL EFECTO DE POLI A:U SOBRE EL INFILTRADO LINFOCITARIO EN RATONES IFNAR1^{-/-}

Varios estudios sugieren que los IFN-I pueden ejercer un efecto directo sobre las células T y particularmente sobre los linfocitos T CD8. Se ha reportado que los IFN-I promueven la producción de IFN-γ por parte de LiT CD8 en una manera dependiente de STAT4 (Srivastava y col., 2014) y son capaces de promover la supervivencia de las LiT CD8 en ratones wt, pero no en ratones deficientes en IFNAR (Starbeck-Miller y col., 2014). Kolumam y col. (2005) aportaron datos contundentes de que las células T CD8

son blanco directo de la estimulación mediada por IFN-I *in vivo*. Mediante la transferencia adoptiva de LiT CD8 específicos del virus de la coriomeningitis linfocítica provenientes de ratones IFNAR^{-/-} o wt a ratones huéspedes wt, demostraron que los IFN-I son capaces de actuar directamente sobre las células T CD8, permitiendo su expansión clonal y diferenciación a célula de memoria (Tough, 2012).

Teniendo en cuenta los datos aportados por la literatura, quisimos evaluar si la señalización en respuesta a IFN-I producidos tras la estimulación con poli A:U, afecta al compartimiento de LiT. Para ello, evaluamos los porcentajes de células T CD4⁺ y CD8⁺ infiltrantes de tumor al día 15 p.i., en ratones IFNAR1^{-/-} de ambos grupos.

Como se puede observar en la Figura III.32-A, el tratamiento con poli A:U no modificó significativamente la presencia de LiT infiltrantes de tumor comparado a PBS (16,2±2,1 vs 14,7±5,9 % respectivamente). En línea con este resultado, tampoco se vio alterada la relación de TILs CD45⁺ CD4⁺ y CD8⁺ en el grupo pAU, con respecto a lo que ocurrió en el grupo PBS (aproximadamente 2:1 para ambos grupos). Estos resultados fueron muy llamativos teniendo presente aquellos obtenidos en ratones wt (relación CD4/CD8 para el grupo PBS de 1:1, y para el grupo pAU 1:3) (Figura III.14).

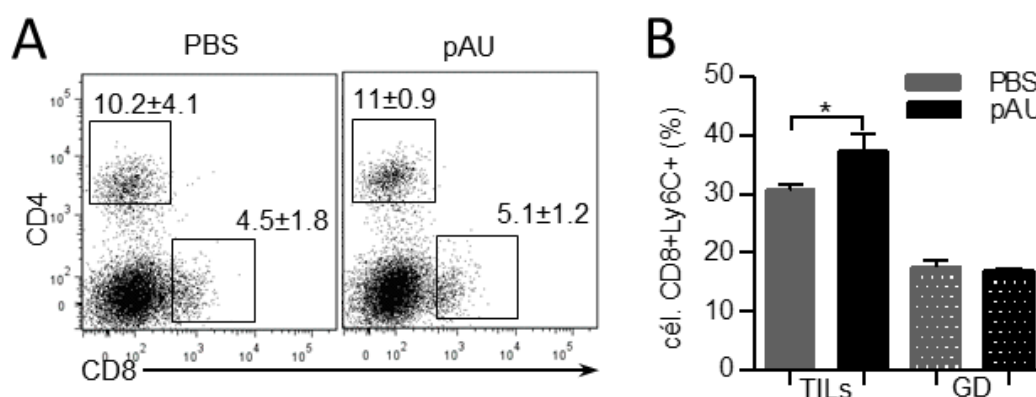


Figura III.32. Poli A:U no modifica el infiltrado de LiT hacia tumor. **A)** Gráficos de puntos representativos del % de células CD4 y CD8 dentro del gate CD45⁺CD11c⁻ en tumores del grupo PBS y pAU. Los números indican media ±SD. **B)** Las barras representan la media ±SD de los porcentajes de células CD8⁺ Ly6C⁺ infiltrantes de tumor (TILs) y en GD. * p < 0,05; mediante test T (n=6/grupo; día 15 p.i.).

Teniendo en cuenta estos datos, quisimos analizar si la falta de señalización vía receptor IFNAR podría estar afectando el fenotipo de estas células. Para ello, analizamos la expresión de la molécula Ly6C en LiT CD8⁺ infiltrantes de tumor y en GD. Los resultados mostraron un aumento significativo en la población CD8⁺ Ly6C⁺ en TILs de tumores que recibieron poli A:U (37,5±5,5 %) respecto al grupo PBS (30,8±1,9 %). Por

otro lado, el análisis de esta población en GD no arrojó diferencias entre los tratamientos PBS y pAU ($17,6 \pm 2,4$ vs $17 \pm 1,3$ % respectivamente) (Figura III.32-B).

En conclusión, el tratamiento i.t. con poli A:U desnudo en ratones IFNAR1^{-/-} no alteró el infiltrado de LiT al tumor, ni modificó la relación CD4/CD8.

ANÁLISIS DEL TRATAMIENTO I.T. CON POLI A:U EN CÉLULAS T REGULADORAS IFNAR1^{-/-}

Para analizar lo que ocurría con las células Treg en ausencia de señalización vía IFN-I en nuestro modelo, generamos tumores B16 en ratones IFNAR1^{-/-}. En la Figura III.33-A se observa el desarrollo tumoral al día del sacrificio (17 p.i.) luego de completado el esquema del tratamiento en ambos grupos. Para poder identificar la población de Treg se empleó marcación intracelular mediante un anticuerpo dirigido al factor de transcripción Foxp3, en combinación con otras marcas de superficie.

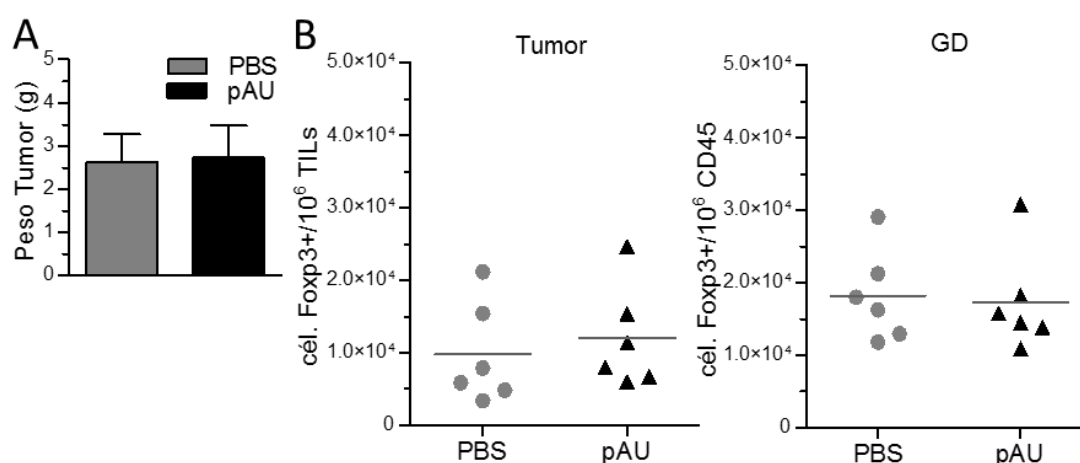


Figura III.33. El tratamiento i.t. con poli A:U no modifica el número de células Treg en ratones IFNAR1^{-/-}. **A)** Las barras representan la media \pm SEM del peso del tumor al día del sacrificio ($n=7$ /grupo; día 17 p.i.). **B)** Gráficos de dispersión de puntos del número de células Foxp3+ (gate en CD45+CD4+) en tumores y GD del grupo PBS y pAU. $p > 0,05$; mediante test T.

No observamos diferencias significativas en el número de células T CD4⁺ Foxp3⁺ por millón de células CD45⁺ infiltrantes de tumor entre ambos grupos de ratones IFNAR1^{-/-} (Figura III.33-A). Además, el análisis de dicha población en GD de ambos grupos mostró similares niveles de células Treg (Figura III.33-B).

A continuación, evaluamos los niveles de expresión de Foxp3 dentro de la población de LiT CD4⁺CD25⁺, y no observamos diferencias tanto en porcentaje como

en IFM en TILs aislados de tumores de ambos grupos (Figura III.34-A y B). A su vez, cuando analizamos el porcentaje e IFM en GD de ratones de ambos grupos no encontramos diferencias significativas entre los mismos (Figura III.34-B).

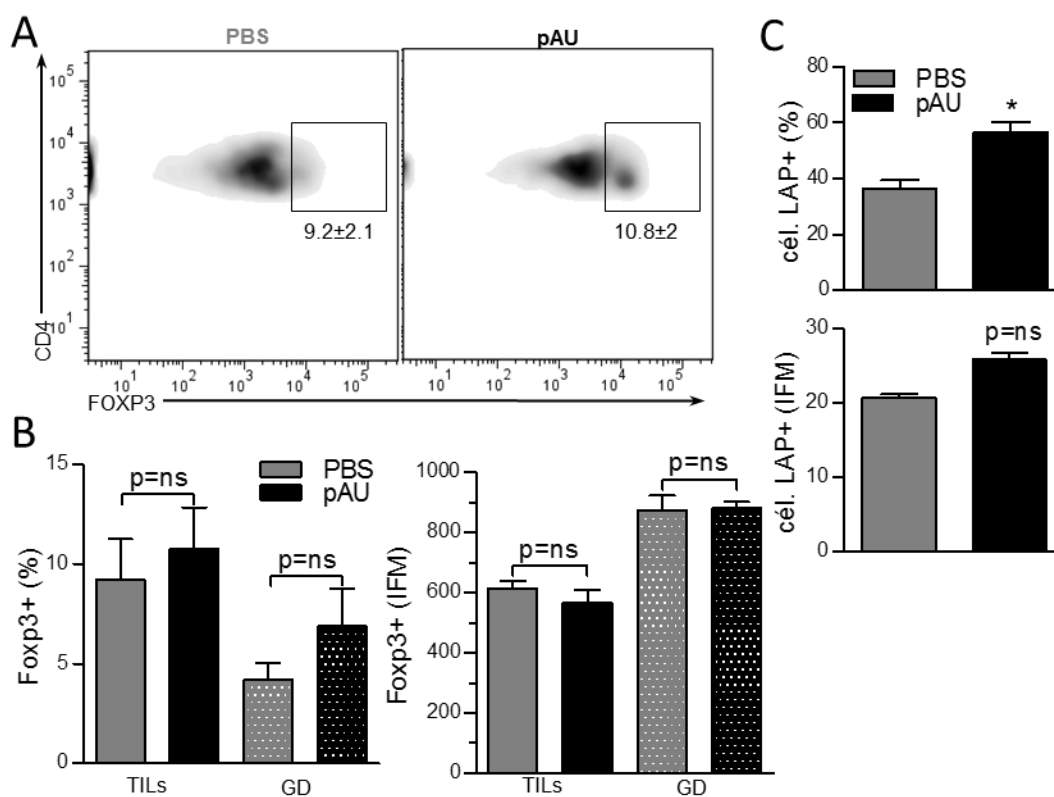


Figura III.34. El tratamiento i.t. con poli A:U no altera el número de células Treg LAP+ en tumor. A) Gráficos representativos de densidad de puntos de CD4 vs FOXP3 en TILs de ambos grupos (gate en CD45+). Los valores indicados representan la media ±SEM. B) Los gráficos de barra representan la media ±SEM del % (izquierda) e IFM (derecha) de células FOXP3+ (gate en CD45+CD4+CD25+) en TILs y GD. C) Las barras representan la media ±SEM del % (arriba) e IFM (abajo) de células LAP+ (gate en CD45+CD4+CD25+FOXP3+) en TILs aislados de tumores de ambos grupos. * p < 0,05; mediante test T (n=6/grupo; día 17 p.i.).

Por último, quisimos analizar la proporción de células Treg LAP+. Como se puede observar en la Figura III.34-C, las células CD45+CD4+CD25+Foxp3+ recuperadas de tumores tratados con poli A:U, expresaron porcentajes significativamente aumentados del marcador LAP. Este aumento no se vio reflejado cuando analizamos la IFM de dicha población.

Por lo tanto, a partir de estos resultados pudimos concluir que luego del tratamiento con poli A:U, la ausencia de señales producidas por IFN-I no modifica la presencia de células Treg, que a su vez expresan similares niveles de Foxp3 en el microambiente tumoral.

ANÁLISIS DE LA CAPACIDAD DE POLI A:U DE POTENCIAR LA RESPUESTA INMUNE ESPECÍFICA CONTRA ANTÍGENOS TUMORALES EN RATONES IFNAR1^{-/-}

Por último, para poder evaluar la función efectora de LiT CD4⁺ y CD8⁺ antígeno-específico de tumor, transferimos células esplénicas obtenidas por *cell sorting* provenientes de ratones transgénicos OTI y OTII a ratones portadores de tumores B16ova que habían recibido dos dosis de poli A:U (día 12 p.i.). Seis días más tarde, analizamos la capacidad de estas células de producir IFN- γ , y la expresión en superficie del marcador CD107a, en ambos grupos experimentales (Figura III.35).

El análisis funcional de la respuesta antígeno específica contra el tumor mediante la medición de IFN- γ , demostró que no hubo diferencias en la frecuencia y en la IFM de células OTI+IFN- γ ⁺ y OTII+IFN- γ ⁺ en tumores de ratones transferidos IFNAR1^{-/-} de ambos grupos (Figura III.35-A). Resultados similares se obtuvieron al analizar la IFM de células productoras de IFN- γ OTI y OTII del grupo pAU vs PBS en tumor. Además, en las células OTI infiltrando tumores tratados con pAU, no se observaron diferencias en la expresión del marcador de CD107a tanto en porcentaje como en IFM (Figura III.35-B).

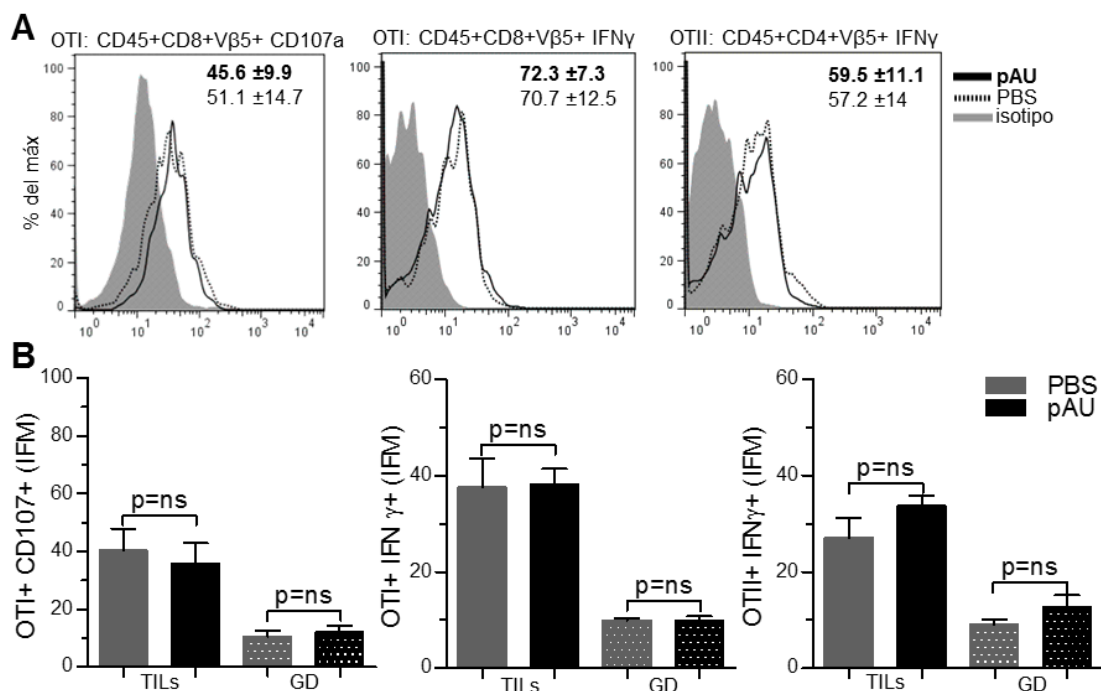


Figura III.35. Poli A:U no modifica la respuesta inmune antígeno específica en GD ni en tumor. **A**) Histogramas representativos del porcentaje de células OTI que expresan CD107a (panel izquierdo), IFN- γ (panel central) y porcentaje de células OTII que expresan IFN- γ (panel derecho) recuperadas en tumor. Los números representan la media \pm SD, en negrita pAU. **B**) Los gráficos de barras muestran la media \pm SD intensidad de fluorescencia media para células OTI+CD107a+ (izquierda), OTI+IFN- γ ⁺ (centro) e IFM de células OTII+IFN- γ ⁺ (derecha). $p > 0,05$, mediante ANOVA de 1 vía.

Asimismo, no se hallaron diferencias significativas en el porcentaje ni en la IFM de células OTI y OTII productoras de IFN- γ u OTI CD107a+ recuperadas de GD entre ambos grupos (Figura III.35-B).

Por lo tanto, la ausencia de señalización vía IFNAR en células del sistema inmune del huésped (pero no en Li OTI y OTII), impidió el efecto de poli A:U sobre la producción de IFN- γ y la expresión de CD107a en LiT CD4 y CD8 antígeno-específicos, a diferencia de su contraparte wt (Figura III.19).

CONCLUSIONES PARTE III

1. El tratamiento i.t. con poli A:U desnudo no modifica la expresión de TLR3 presente en las células B16 tanto en ratones wt como en IFNAR1^{-/-}.
2. La estimulación *in vitro* de células B16 con poli A:U desnudo no promueve la producción de IFN- β por parte de la célula tumoral.
3. El tratamiento i.t. con poli A:U desnudo produce un fuerte inducción local de IFN- β a las 6 hs post tratamiento, que decae en intensidad con el correr de los días, a menos que se administre una segunda dosis de poli A:U.
4. Las células LysM⁺ y CD11c⁺ son las principales responsables de la producción de IFN- β en tumor y ganglio, luego del tratamiento i.t. con poli A:U desnudo.
5. El tratamiento i.t. con poli A:U desnudo, aumenta la expresión de TLR3 en células CD11b⁺ Gr1⁺, CD11c⁺ y CD11b⁺ F4/80⁺ infiltrantes de tumor en ratones wt pero no en ratones IFNAR1^{-/-}.
6. Las moléculas IRF3 y UNC93B1 son cruciales y participan directamente en la inducción de IFN- β en tumor y ganglio, luego del tratamiento i.t. con poli A:U desnudo.
7. La señalización vía el receptor de IFNAR presente en células de huésped está involucrada en el control del crecimiento tumoral y el aumento de la sobrevida observado en nuestro modelo preclínico de terapia intratumoral con poli A:U.
8. Los tumores B16 en ratones wt son significativamente menores que en ratones IFNAR1^{-/-}.

El tratamiento i.t. con poli A:U desnudo en ratones IFNAR1^{-/-}:

9. no modifica el número de células CD45⁺ infiltrando tumor.
10. no afecta el porcentaje de células CD11c⁺ maduras (CD40⁺ CD86⁺) productoras de IL-12 que infiltran tumor.
11. no modifica el porcentaje de LiT CD8⁺ infiltrantes de tumor ni la relación CD4/CD8, pero aumenta el porcentaje de células CD8⁺ Ly6C⁺ en tumor.
12. no afecta el número de células CD4⁺ Foxp3⁺ en GD ni en tumor, ni tampoco el porcentaje de células CD4⁺ CD25⁺ Foxp3⁺ LAP⁺ en tumor.
13. no favorece un perfil de respuesta Th1 antígeno específica en tumor.

**PARTE IV: DESARROLLO DE TERAPIA COMBINADA
ANTITUMORAL EN MODELOS PRECLÍNICOS
UTILIZANDO QUIMIOTERAPÉUTICOS
CONVENCIONALES Y AGONISTAS DE RECEPTORES
TIPO TOLL 3**

OBJETIVO ESPECÍFICO IV: EVALUAR LA EFICACIA DE LA ADMINISTRACIÓN CONJUNTA DE POLI A:U Y ANTINEOPLÁSICOS CONVENCIONALES EN MODELOS PRECLÍNICOS DE TERAPIA COMBINADA.

ESTUDIO DE EFICACIA DE LA ADMINISTRACIÓN CONJUNTA DE POLI A:U Y DOXORUBICINA EN MODELOS PRECLÍNICOS DE TERAPIA COMBINADA

Doxorubicina, es un antibiótico (antraciclina) de primera línea que se ha utilizado para el tratamiento del cáncer durante más de 30 años. Mientras que puede proporcionar la cura en muchos casos, doxorubicina tiene la contraparte negativa de causar toxicidad en la mayoría de los órganos principales, especialmente ha sido asociada a cardiotoxicidad, lo que obliga a que el tratamiento sea dosis-limitante (Tamargo y col., 2015; Kalam & Marwick, 2013).

Dentro de los principales mecanismos de acción de doxorubicina se pueden mencionar: i) capacidad de unión a enzimas asociadas al ADN como topoisomerasa I y II, afectando el desenrollamiento de las hebras y por ende la transcripción; ii) intercalante de bases en el ADN; iii) activación de varias señales moleculares de AMPK (proteína quinasa inductora de la apoptosis activada por AMP) alterando el balance Bcl-2/Bax y conduciendo a la apoptosis (Tacar y col., 2013). Además, recientemente se ha demostrado que las antraciclinas estimulan la producción de IFN-I por parte de células malignas, lo cual sería crucial para una respuesta óptima a la quimioterapia (Sistigu y col., 2014).

Teniendo en cuenta los “éxitos y desventuras” del uso de antraciclinas para el tratamiento del cáncer, sumado a los resultados obtenidos en nuestro modelo preclínico de administración terapéutica de poli A:U, quisimos evaluar la eficacia de la terapia combinada administrando simultáneamente poli A:U y doxorubicina en ratones portadores de tumores B16. Para ello, utilizamos dos dosis distintas de doxorubicina (12,5 y 2,5 mg/kg) y mantuvimos las condiciones y el esquema experimental de administración de poli A:U (Figura III.36). La elección de las concentraciones de doxorubicina se realizó en base a los reportes en bibliografía de las dosis empleadas actualmente en humanos, en ensayos clínicos y preclínicos (Al-Jamal y col., 2013; Formelli y col., 1988; Jeung y col., 2008; Nakasone y col., 2012; Shurin y col., 2009; Sturgeon y col., 2014; Tacar y col., 2013; J.-Y. Zhao y col., 2014).

Brevemente, inoculamos 1×10^6 células B16 en ratones C57BL/6 y once días después, los dividimos al azar en seis grupos experimentales: **PBS** (inyectados con 200 μ l del vehículo), **pAU** (50 μ g/dosis), **DOXO** (en altas dosis de 0,25 mg/ratón), **DOXO/pAU** (altas dosis de 0,25 mg/ratón en combinación con poli A:U 50 μ g/dosis), **Doxo** (en bajas dosis de 0,05 mg /ratón) y **Doxo/pAU** (bajas dosis de 0,05 mg/ratón en

combinación con poli A:U 50 µg/dosis). Tanto el tratamiento con PBS como con poli A:U, en los distintos grupos experimentales, consistió en la inyección i.t. de 4 dosis administradas día de por medio, mientras que doxorubicina fue administrada vía i.v. y consistió en 2 dosis espaciadas por 7 días una de otra (Figura III.36).

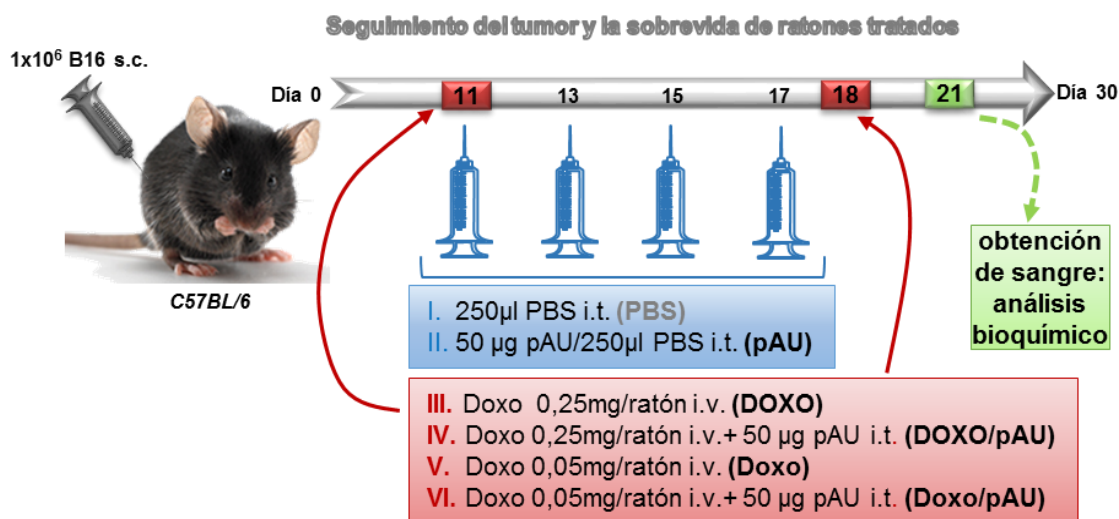


Figura III.36. Esquema del modelo preclínico empleado para el estudio de la terapia combinada doxorubicina-poli A:U.

El análisis de las curvas de crecimiento tumoral indicó que hubo una disminución significativa en el volumen tumoral en ratones de todos los grupos tratados (pAU, Doxo, Doxo/pAU, DOXO y DOXO/pAU) respecto al grupo PBS (Figura III.37-A). Estas diferencias se pudieron percibir notablemente a partir del día 17 p.i., una vez completado el esquema de 4 dosis de poli A:U y luego de 6 días de haber recibido la primer dosis de doxorubicina ($p < 0,05$).

Asimismo, se observó diferencias significativas en las curvas de crecimiento del grupo que recibió la terapia combinada Doxo/pAU vs el grupo que recibió la monoterapia con Doxo ($p < 0,05$). Contrariamente, el grupo DOXO/pAU no manifestó un crecimiento tumoral diferente al observado en el grupo DOXO. Además, no hallamos diferencias estadísticamente significativas al comparar ambos grupos de terapias combinadas (Doxo/pAU y DOXO/pAU) con el tratamiento monoterápico de poli A:U (pAU).

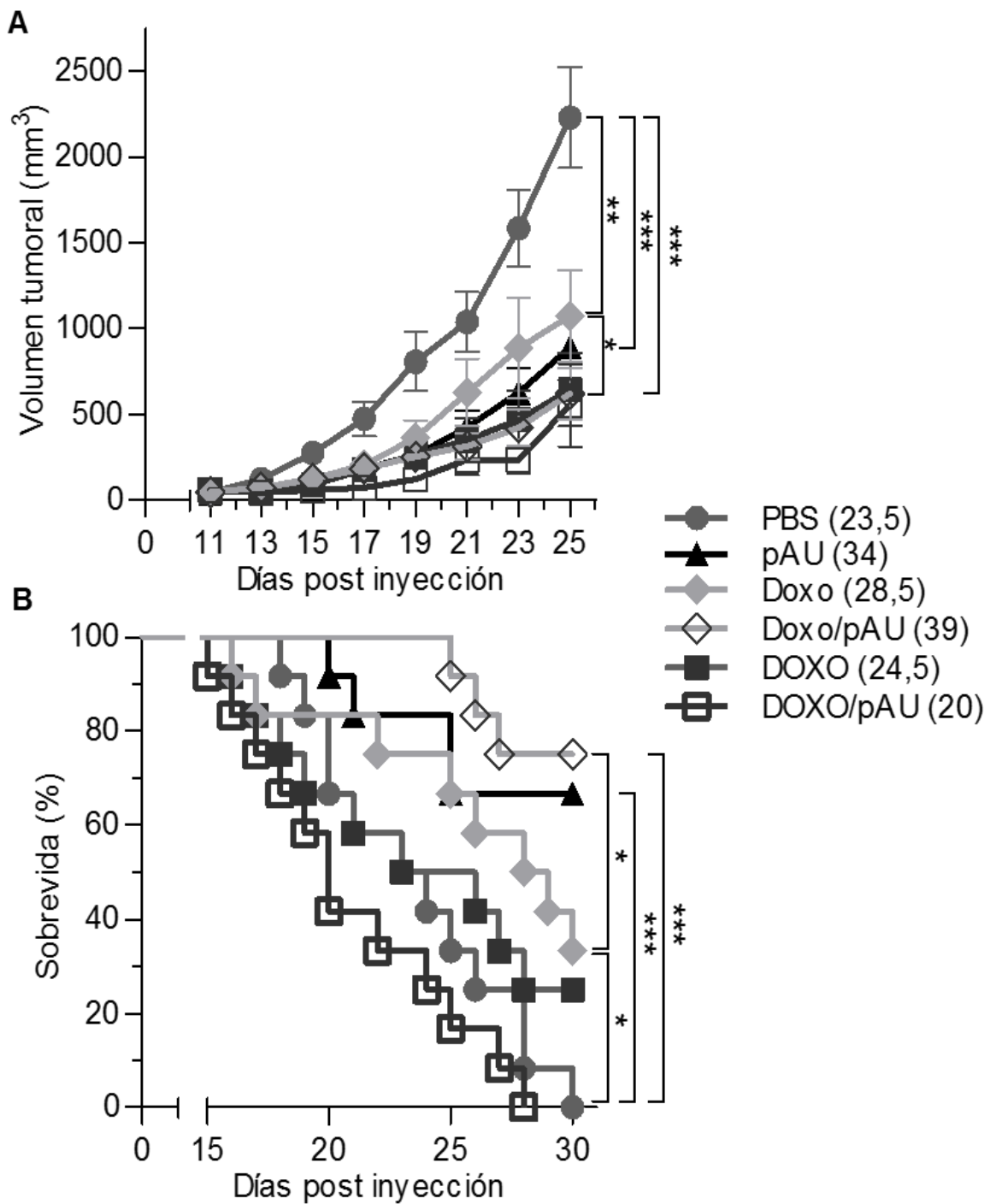


Figura III.37. Efecto de la terapia combinada doxorubicina/poli A:U en modelo preclínico sobre el crecimiento y la sobrevida de ratones portadores de tumores B16. A) Curvas de crecimiento tumoral en ratones tratados con PBS, pAU, Doxo (monoterapia en bajas dosis, 0,05 mg/ratón), Doxo/pAU, DOXO (monoterapia en altas dosis, 0,25 mg/ratón) y DOXO/pAU. Los datos se muestran como media \pm SEM de 2 experimentos independientes (n= 15 ratones /grupo). *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001; Bonferroni pos test en ANOVA de 2 vías. **B)** Curvas de sobrevida de los grupos de ratones en “A”. Las medianas de sobrevida se indican entre paréntesis. *p<0,05; ***p<0,001; mediante Test Log-rank (Mantel-Cox).

A continuación, evaluamos el impacto del tratamiento en la sobrevida de los ratones portadores de tumor. Si bien la curva de crecimiento tumoral del grupo DOXO/pAU mostró una tendencia a una mayor disminución, la sobrevida de estos ratones fue similar a la del grupo PBS (medianas de sobrevida, días 20 y 23,5 p.i. respectivamente). En línea con estos resultados, la monoterapia con DOXO tampoco fue beneficiosa para la sobrevida de los ratones tratados, ya que el 50 % de los ratones murieron al día 24 p.i (mediana de sobrevida: 24,5) (Figura III.37-B).

Por lo tanto la administración de doxorubicina en altas dosis para ambos tratamientos (DOXO y DOXO/pAU) resultó perjudicial para la sobrevida de los ratones portadores de tumor B16 tratados. Esto también fue evidente a simple vista, ya que al menos un 40-60 % de los ratones en estos grupos presentaban una sintomatología relacionadas a anomalías en el movimiento, hematoma en la zona del tumor y caquexia (datos empíricos no mostrados).

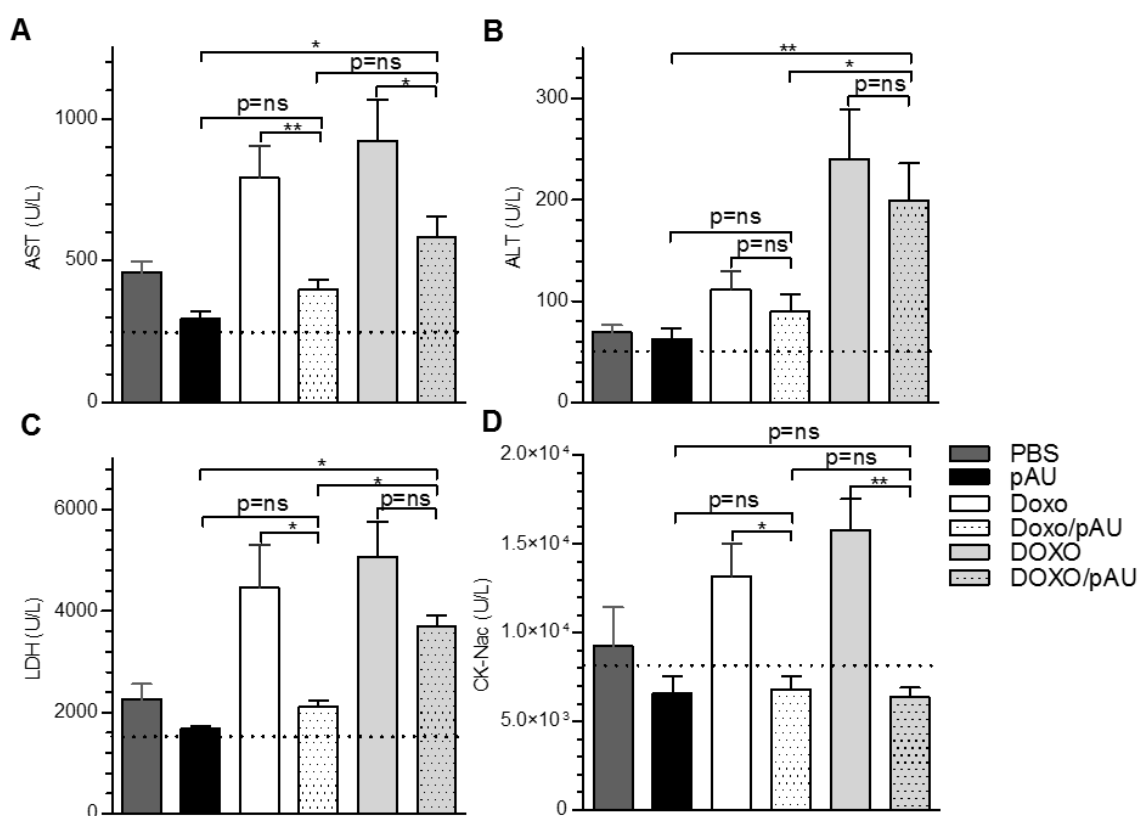
Por otro lado, el tratamiento con doxorubicina en bajas dosis mejoró significativamente la sobrevida de los ratones tratados respecto al grupo PBS, mientras que en los grupos pAU y Doxo/pAU la sobrevida se incrementó aún más. Si bien la mediana de sobrevida para el grupo Doxo fue el día 28,5 p.i., el 50 % de los ratones de los grupos pAU y Doxo/pAU sobrevivieron hasta los días 34 y 39 p.i. respectivamente ($p < 0,05$).

Dicho de otra forma, comparando las medianas de sobrevida, el tratamiento i.v. con Doxo en baja dosis aumentó significativamente un 19 % la mediana de sobrevida de los ratones, el tratamiento i.t. con poli A:U lo hizo en un 44,7 %, y el tratamiento combinado Doxo/pAU aumentó la mediana de sobrevida de los ratones en un 65,9 %. Además, cabe destacar que, la terapia combinada aumentó la sobrevida respecto a la monoterapia con Doxo. Si bien no hubo diferencias significativas entre ambos tratamientos que emplean poli A:U, los ratones del grupo Doxo/pAU tuvieron un 15% más de sobrevida respecto al grupo pAU.

Por lo tanto, podemos decir que la terapia combinada Doxo/pAU demostró tener la mayor eficacia y un efecto sinérgico favorable teniendo en cuenta la efectividad dosis/respuesta en la reducción del volumen del tumor y la sobrevida de los animales tratados.

ESTUDIO DEL EFECTO DE LA TERAPIA COMBINADA SOBRE PARÁMETROS BIOQUÍMICOS DE LOS RATONES TRATADOS

Dentro de los efectos adversos en terapias que emplean antraciclinas, se pueden describir la inducción de la apoptosis y necrosis en el tejido sano del paciente, pudiendo causar toxicidad en cerebro, hígado, riñón y corazón (Tacar y col., 2013). Por lo tanto, resultó esencial evaluar los efectos que pudiera provocar la utilización de doxorubicina en nuestro modelo preclínico. Para ello, evaluamos los niveles sanguíneos de enzimas clave: ALT (alanina aminotransferasa) y AST (aspartato aminotransferasa), ambas implicadas en la función hepática, CK (creatinin quinasa), una enzima indicadora de insuficiencia cardíaca, y LDH (lactato deshidrogenasa), una enzima que indica daño tisular. Para ello, se obtuvo sangre al día 21 p.i. de ratones representativos de cada tratamiento (n=5/grupo), y se procedió al análisis de estas enzimas, seteando los niveles normales con plasma proveniente de ratones libres de tumor (control) (Figura III.38).



Los ratones tratados del grupo pAU mostraron niveles enzimáticos similares a los encontrados en ratones del grupo control (Figura III.38). Por el contrario, y acorde a la literatura, observamos un aumento severo en todos los niveles enzimáticos en los animales tratados con doxorubicina monoterapia tanto en bajas como en altas dosis (Zhu y col., 2014; Tacar y col., 2013; Carvalho y col., 2009). Sorprendentemente, la terapia combinada Doxo/pAU disminuyó los valores de ALT, AST, LDH y CK en comparación con los niveles de Doxo-monoterapia, hasta incluso reducirlos a valores muy cercanos a los encontrados en ratones control (Figura III.38). Sin embargo, la terapia combinada DOXO/pAU tuvo efectos menos claros sobre los parámetros evaluados: ya que por un lado mejoró los niveles de AST y principalmente de CK, aunque no modificó los niveles de ALT y LDH respecto a la monoterapia DOXO.

Para concluir la tabla III.1 resume otros parámetros bioquímicos y hematológicos analizados que también resultaron interesantes para contextualizar los efectos de los distintos tratamientos ensayados en la presente tesis.

En cuanto a los niveles de ácido úrico, no variaron significativamente entre los grupos pAU, Doxo, Doxo/pAU y DOXO; aunque si observamos un aumento en 1,8 veces en aquellos ratones del grupo DOXO/pAU respecto al grupo control ($p < 0,05$).

Por último, analizamos parámetros hematológicos como el recuento de leucocitos (WBC) y glóbulos rojos en sangre así como los niveles de hemoglobina (HGB) y el hematocrito (HCT), los cuales pueden verse afectados como consecuencia de la quimioterapia (Uhm y col., 2009). Si bien el tratamiento con poli A:U o doxorubicina disminuyó significativamente el recuento de glóbulos blancos, la combinación de doxorubicina en altas dosis con poli A:U (DOXO/pAU) disminuyó marcadamente los valores hallados de WBC respecto al grupo control. Asimismo, el recuento de glóbulos rojos y el HCT sólo se vieron disminuídos en el grupo DOXO/pAU ($p < 0,05$), mientras que los niveles de HGB no se modificaron significativamente en ninguno de los tratamientos respecto al valor control.

grupo / parámetro	control	PBS	pAU	Doxo	Doxo/pAU	DOXO	DOXO/pAU
Creatinina (mg/dL)	0,14 ±0,03	0,11 ±0,01	0,097 ±0,03	0,07 ±0,03	0,083 ±0,03	0,10 ±0,04	0,05 ±0,03 *
Ác. Úrico (mg/dL)	3,6 ±0,85	3,9 ±1,4	4,3 ±0,85	5,2 ±2,09	4,2 ±0,26	5,7 ±1,9	7,1 ±0,97 *
ALP (U/L)	124,3 ±4,1	135,3 ±4,8	79 ±3,1 *	105,7 ±11,9	83,7 ±17,6 *	118 ±17,4	48 ±5,7 ***
WBC (10 ³ /μl)	6,68 ±1,5	4,79 ±1,1	3,37 ±1 *	3,75 ±1,3 *	4,14 ±0,9	2,79 ±0,4 *	1,98 ±0,7 **
RBC (10 ⁶ /μl)	8,05 ±0,9	6,66 ±0,9	6,9 ±0,9	6,03 ±1,3	6,62 ±0,8	6,85 ±0,5	4,99 ±1,2 *
HGB (g/dL)	13,2 ±0,4	12,2 ±0,9	12,2 ±1,5	9,5 ±2,6	9,8 ±1,2	9,1 ±2,1	8,3 ±2
HCT (%)	44 ±3,1	35 ±4,8	41,7 ±3,7	31,2 ±8,2	35,1 ±4,2	39 ±6	26 ±6,4 *

Tabla III.1. Parámetros bioquímicos y hematológicos medidos en ratones tratados con las distintas terapias. ALP= fosfatasa alcalina; WBC= glóbulos blancos; RBC= glóbulos rojos; HGB= hemoglobina; HCT= hematocrito. Los valores indican la media ± SD. * p <0,05, ** p <0,01, *** p <0,001, muestran las diferencias significativas respecto al control, Bonferroni post test en ANOVA de 1 vía.

Por lo tanto, estos resultados sumados a los valores enzimáticos anteriormente descritos, fueron reveladores ya que sugieren que la terapia combinada doxorubicina en bajas dosis y poli A:U no sólo mejora el control de crecimiento del tumor sino que también reduce los efectos secundarios tóxicos en comparación con la monoterapia doxorubicina en baja y alta dosis, y la terapia combinada DOXO/pAU.

CONCLUSIONES PARTE IV

1. La terapia combinada Doxo/pAU demuestra un efecto sinérgico favorable, respecto a los demás tratamientos empleados, para el control del crecimiento tumoral y el aumento de la supervivencia de los ratones tratados.
2. La terapia combinada Doxo/pAU muestra menos toxicidad, ya que disminuye los niveles enzimáticos de ALT, AST, LDH y CK en comparación con los niveles encontrados en ratones tratados con Doxo-monoterapia.
3. Los ratones que recibieron las terapias DOXO y DOXO/pAU presentan aumentada toxicidad, respecto a los ratones de los demás tratamientos empleados.
4. La terapia combinada Doxo/pAU demuestra tener mayor eficacia, con efecto beneficioso sobre el control del crecimiento tumoral/supervivencia de los ratones tratados, reduciendo los efectos tóxicos secundarios de doxorubicina.

CAPÍTULO IV: DISCUSIÓN

GENERALIDADES SOBRE EL MODELO PRECLÍNICO

En la actualidad se encuentran en evaluación preclínica y clínica múltiples estrategias de inmunoterapia contra el cáncer. Algunas de ellas implican la administración de agentes inmunoestimuladores como las citocinas que tienen el objetivo de inducir inmunidad contra las células tumorales (Aranda y col., 2014; Hussein, y col., 2014; Vacchelli, y col., 2013; Bolhassani, y col., 2011). Desafortunadamente, la administración sistémica de citocinas recombinantes como IFN- β e IL-12, tiene importantes limitaciones debido principalmente a su corta vida media, a la administración en cantidades farmacológicas que pueden tener efectos contrarios a los buscados y a la posibilidad de generar toxicidad sistémica (Antonelli y col., 2015; Wang y col., 2011; Lee & Margolin, 2011). Es por esto que la administración local, podría ayudar a mejorar su efecto terapéutico al mismo tiempo que se pueden emplear dosis mucho más bajas, limitando a su vez efectos sistémicos y por ende potencial toxicidad (Jeught, y col., 2014; Mahvi y col., 2007; Qian y col., 2006).

La inyección intratumoral directa de agentes contra el cáncer se ha evaluado extensamente en las últimas décadas. Sin embargo, hasta ahora no ha logrado establecerse como una vía alternativa de administración en la práctica clínica habitual (Marabelle y col., 2014; Kar y col., 2011; Sterman y col., 2006).

Durante el desarrollo de la presente tesis, establecimos un modelo experimental terapéutico de inyección intratumoral del ligando de TLR3, poli A:U. Optamos por la administración local, con la idea de poder focalizar nuestro estudio al sitio del tumor, reduciendo la posibilidad de tener efectos sistémicos no deseados.

Decidimos emplear poli A:U desnudo, por varias razones:

i) si bien los AN “libres” son más sensibles a la actividad de endonucleasas plasmáticas, estudios farmacocinéticos indican que la administración local en el tejido puede aumentar su biodisponibilidad (Juliano y col., 2009);

ii) además, se ha reportado que la endocitosis y pinocitosis son los principales mecanismos que operan en la internalización de AN (Y. Wang y col., 2015; Loke y col., 1989); por lo tanto los oligonucleótidos desnudos tienden a localizarse en endosomas/lisosomas, hecho que resulta favorable para el reconocimiento de poli A:U por TLR3 (Dias & Stein, 2002);

iii) con el fin de poder direccionar la captación del ARNdc a células de linaje mieloide (como M ϕ y CD), que tienen mayor capacidad endocítica respecto a las células tumorales en particular (Lorenzi y col., 2011; Peiser y col., 2002; Loke y col., 1989);

iv) por otro lado, la utilización de poli A:U desnudo, es decir, sin ser acompañado a ninguna otra sustancia tales como liposomas, carrier, o nanopartículas, nos permitió un claro abordaje de los efectos del tratamiento en sí mismo, evitando otras variables que pudieran influenciar/complejizar nuestro estudio.

La mayoría de los esquemas terapéuticos que emplean ligandos de TLR3 hasta ahora han utilizado otras vías de administración o han acompañado el mimético de ARNdc viral a un agente de transfección que facilite su entrada en la célula para poder desarrollar una respuesta antitumoral efectiva (Conforti y col., 2010; Matsumoto y col., 2015). Nuestros resultados obtenidos en el esquema experimental empleado en la presente tesis, soportan ampliamente el uso de poli A:U desnudo para inmunoterapia contra el cáncer, promoviendo una importante inducción de IFN- β , una buena respuesta de los ratones al tratamiento asociada con una fuerte inmunidad antitumoral, traducándose en una marcada disminución en el crecimiento del tumor y en un considerable aumento de la sobrevida.

La línea de melanoma B16 ha sido ampliamente usada como modelo clásico de estudio del cáncer en ratón desde su immortalización por el grupo de Fidler en 1973 (Fidler y col., 1973). Partiendo de la base que trabajamos con modelos sólidos de tumores sumamente agresivos, a partir de líneas celulares que han sufrido procesos de selección por inmunoección *in vivo* y selección *in vitro* (Fidler y col., 1976; Mittal y col., 2014), resulta lógico pensar que no hayamos visualizado fenómenos de regresión completa del tumor.

Además, demostramos que la estrategia terapéutica con poli A:U desnudo fue reproducible en otros modelos de cáncer murino en el background genético C57BL/6 como en adenocarcinoma de vejiga MB49 y en linfoma E.G7ova logrando visualizar disminución del crecimiento tumoral y aumento de la sobrevida de los ratones tratados.

Teniendo en cuenta que la cepa C57BL/6 es más refractaria a desarrollar tumores comparado con la cepa BALB/c (<http://jaxmice.jax.org/strain/000664.html>), debido a diferencias en el background genético, quisimos validar nuestro esquema terapéutico en tumores singénicos BALB/c como carcinoma de mama 4T1 y adenocarcinoma de colon CT26. Si bien hubo diferencias en la eficacia entre ambos modelos, en ratones BALB/c observamos un retardo del crecimiento tumoral entre los tratamientos aunque esto no fue acompañado de un aumento significativo en la sobrevida.

Estos resultados están en línea con la literatura ya que se ha reportado ampliamente que las cepas de ratones C57BL/6 y BALB/c están prototípicamente asociadas a perfiles

Th1 y Th2 respectivamente. Por ejemplo, en un estudio comparativo, Shibuya y colaboradores (1998) demostraron que CPA esplénicas requieren cofactores adicionales, incluyendo IL-1 α y TNF- α , para el óptimo desarrollo de una respuesta Th1 inducida por IL-12 en ratones BALB/c, pero no en ratones C57BL/6. Por otro lado, en un modelo de fibrosis hepática inducido por toxina, donde la citocina IFN- γ resulta clave para la resolución de la patología, ratones C57BL/6 desarrollaron menos fibrogénesis que los ratones BALB/c (Shi y col., 1997). A su vez, se ha demostrado que los ratones de la cepa BALB/c son más susceptibles al desarrollo de rinitis alérgica que ratones de la cepa C57BL/6 debido a un incremento de eosinófilos, IgE e IL-5 en las vías respiratorias (Okano y col., 1999).

Mills y colaboradores (2000) demostraron que los M ϕ provenientes de cepas asociadas a un perfil Th1 son más fácilmente activados para producir óxido nítrico (ON) en respuesta a IFN- γ o LPS que los M ϕ de cepas asociadas a perfil Th2 (Murray y col., 2014). En 2014, Oliveira y colaboradores identificaron que M ϕ de ratones BALB/c son innatamente menos productores de ON debido a una defectuosa producción de IFN- β mediada por la vía de activación de TLR4/STAT-1. En modelos de infección con virus del herpes simple (C57BL/6 resistente, BALB/c susceptible), se ha reportado que las diferencias que existen entre ambas cepas se debe fundamentalmente a la cinética y cantidad de producción de IFN-I (Halford y col., 2004).

Por lo tanto, todos estos datos pueden justificar las diferencias en cuanto a la eficacia del tratamiento i.t. con poli A:U desnudo, encontradas en los modelos empleados en las distintas cepas de ratones. Asimismo, también hay que contemplar las diferencias inherentes a cada modelo de cáncer empleado.

Nuestros resultados indican que tanto la vía de administración, como los μ g de poli A:U empleados por dosis y el esquema del tratamiento fueron acertados para poder observar dichos efectos entre los grupos. Asimismo, el tratamiento i.t. con poli A:U fue empleado con éxito en similares esquemas terapéuticos en distintos modelos murinos con diferentes cinéticas de crecimiento, tanto en el background genético C57BL/6 como en el BALB/c. Por lo tanto, podemos afirmar que en las condiciones ensayadas, el efecto observado luego del tratamiento con poli A:U, fue reproducible en distintos modelos murinos de cáncer, lo que podría constituir las bases para una terapia alternativa antitumoral.

IL-12 LA “VEDETTE” DEL PERFIL DE RESPUESTA TH1

En otro grupo de experimentos, evaluamos la participación de la citocina IL-12 mediante la inducción de tumores B16 y posterior tratamiento con poli A:U en ratones deficientes en IL12p40. La IL-12 es producida principalmente por CD, CPA que son capaces de captar antígenos tumorales y luego migrar a ganglio linfático, y una vez allí realizar la presentación antigénica a células T no activadas (M. L. Broz y col., 2014; Asselin-Paturel & Trinchieri, 2005). IL-12 es secretada como una citocina proinflamatoria temprana en respuesta a infecciones, y sirve como nexo entre la respuesta inmune innata y adaptativa. Señales adicionales de amplificación tales como el IFN- γ , IL-15 o interacciones CD40L-CD40 son necesarias para una óptima producción de IL-12 biológicamente activa. Por el contrario, IL-12 es regulada negativamente a través de citocinas tales como IL-10 y TGF- β 1 (Tugues y col., 2014).

Nuestros resultados mostraron la ausencia de diferencias significativas tanto en las curvas de crecimiento tumoral como en las de supervivencia entre ambos grupos experimentales, reportando el rol protagónico de la subunidad IL12p40 en nuestro modelo preclínico. Si bien la deficiencia en la subunidad IL12p40 en estos ratones también se corresponde con una ausencia de IL-23, no abordamos el estudio de esta citocina y su posible participación en nuestro modelo. Diferentes estudios referidos a IL-23 demuestran que actúa como citocina proinflamatoria que antagoniza los efectos de IL-12 e IFN- γ , promoviendo la incidencia y el crecimiento tumoral (Grivennikov y col., 2010; Langowski y col., 2006). Además, IL-23 induce células productoras de IL-17, estimulando a su vez el infiltrado de neutrófilos y M ϕ que promueven la angiogénesis y mediadores de la inflamación en el microambiente tumoral (Qian y col., 2013; Langowski y col., 2007).

Es por esto que, la participación de IL12p40 en el orquestado de la respuesta inmune antitumoral por parte de las CD fue de vital importancia evaluarla en nuestro modelo experimental. Como hemos comentado previamente, la secreción de IL-12p70 activa (compuesta por las subunidades IL-12p35 e IL12p40) es uno de los eventos fundamentales y decisivos en la presentación antigénica y en el desarrollo de un perfil de respuesta Th1 (Hervas-Stubbs y col., 2011; Gautier y col., 2005). Además, la inducción de bajos niveles de IFN-I durante la estimulación de CD a través de PRR es esencial para una óptima producción del heterodímero de IL-12p70 (Trinchieri, 2010). Del mismo modo, IFN-I son necesarios para una óptima secreción de IL-12p70 por parte de CD diferenciadas de médula ósea, tal como lo demuestran estudios que utilizan ratones

deficientes en el receptor IFNAR (Gauzzi y col., 2010). Se sabe que las CDc inmaduras transducen señales vía STAT1 en respuesta a IFN- α/β , mientras que las CD maduras lo hacen a través de STAT4 (Longman y col., 2007). Además, previamente hemos demostrado que los niveles de IFN- β producidos por las células tumorales estimuladas con ligandos de TLR3 (poli I:C y poli A:U) son suficientes para mejorar el estado de maduración de CD y revertir el efecto supresor de factores derivados de células tumorales en la maduración de CD (Gatti y col., 2013; Núñez y col., 2012; Perrot y col., 2010).

Teniendo presente todas estas consideraciones, analizamos el estado de maduración de las CD tanto en GD como en células CD11c+ infiltrantes de tumor, a través de la medición de moléculas coestimuladoras CD40 y CD86 y midiendo además la frecuencia de células CD11c+ productoras de IL-12. Luego del tratamiento con poli A:U, observamos un marcado aumento de células CD11c+ infiltrantes de tumor que expresaban las moléculas CD40 y CD86 y que además eran mejores productoras de IL-12, respecto al grupo PBS. Todos estos parámetros se vieron afectados al evaluar esta misma población en ratones deficientes en el receptor de IFN-I. Nuestros resultados, coinciden con reportes previos en la literatura que indican que la participación de IFN-I puede promover la maduración de CD e incrementar su capacidad para producir IL-12 (Manh y col., 2013; Frick, y col., 2010).

Además, estos datos concuerdan con los reportados por nuestro grupo previamente en donde la activación de TLR3 presente en líneas tumorales humanas y murinas genera niveles de IFN- β suficientes para revertir la supresión que ejercen factores tumorales solubles sobre la maduración de CD y su capacidad aloestimuladora (Gatti y col., 2013).

Con respecto a las CD derivadas de ganglio no encontramos diferencias significativas en cuanto a la expresión de las moléculas analizadas. Este resultado puede resultar llamativo, considerando que en GD se lleva a cabo el proceso de presentación antigénica, comparando los resultados obtenidos en tumor de estos ratones. No obstante, es posible que el efecto de poli A:U en ganglio se viera enmascarado, debido a que realizamos el estudio luego de 5 días de iniciado el tratamiento (día 15 p.i.). También existe la posibilidad de que la activación y maduración de las CD sea más marcado en el mismo tumor, donde se realiza el tratamiento.

Investigaciones previas realizadas en nuestro laboratorio, pudieron determinar que las células B16 activadas vía TLR4 *in vitro* son capaces de generar tumores de tamaño reducido, con una curva de crecimiento disminuida, comparados con los tumores

generados por células no estimuladas. Este efecto es mediado por la estimulación del TLR4 presente en la célula tumoral. Esta disminución del tamaño tumoral está asociada a una mayor respuesta Th1 (mayor infiltrado de LiT productoras de IFN- γ , de células CD11c+IL12+) y este efecto desaparece en ratones nude e IL12p40^{-/-} (Andreani y col., 2007; Núñez y col., 2012).

Aunque la respuesta inmune específica contra tumor es fundamental para el control del cáncer, cambios en el estado vascular también son relevantes para el desarrollo de tumores. En este sentido, la sobreexpresión de IL-12 en tumores de melanoma B16 demostró ser capaz de regular la vasculatura tumoral, ya sea a través de la regulación de moléculas de adhesión que pueden facilitar el reclutamiento de leucocitos o mediante la inhibición de la angiogénesis en una manera dependiente de IFN- γ (Eisenring y col., 2010). Los efectos inhibidores de IL-12 en los vasos del tumor se han asociado con un aumento de los niveles de las quimiocinas CXCL9 y CXCL10, y una disminución en la producción del factor VEGF y metaloproteínasa-9 (Tugues y col., 2014).

TLR3, INTERFERONES TIPO I Y LA RESPUESTA INMUNE ANTITUMORAL

Los interferones tipo I fueron las primeras citocinas descubiertas, hace más de 50 años, en función de un papel crucial y no redundante en la defensa antiviral. Los IFN-I también median efectos protectivos en contextos fisiopatológicos antagónicos, como el cáncer y la esclerosis múltiple (Liu y col., 2014). Por el contrario, la respuesta de IFN-I puede ser perjudicial en una serie de circunstancias, incluyendo las infecciones bacterianas o fúngicas, enfermedades autoinmunes como lupus, y, paradójicamente, ciertas infecciones virales crónicas como Hepatitis C (Reder & Feng, 2014). Sólo recientemente se ha comenzado a tener una imagen integrada de los mecanismos celulares y moleculares que regulan la producción de IFN-I y sus funciones subyacentes (Tomasello y col., 2014). La exposición crónica a IFN-I, y cambios en las señales en el microambiente durante la evolución de las enfermedades, pueden contribuir a describir un escenario tan complejo, en el que los efectos a corto y a largo plazo de la exposición IFN-I puede dar lugar a conclusiones aparentemente opuestas (Piconese y col., 2014).

La administración farmacológica de IFN-I utilizada en la terapia antitumoral no ha tenido el éxito esperado debido a la gran cantidad de efectos adversos (Wang y col., 2011; Antonelli y col., 2014). Además de la cinética de su producción, se ha demostrado que los efectos de los IFN-I son extremadamente dependientes de su concentración. Se ha sugerido que el mecanismo de control del tumor con dosis altas y sostenidas de IFN- β

intratumoral difiere de la mediada por dosis transitorias bajas (Spaapen y col., 2014). Además, altos niveles de IFN-I disminuyen la expresión de IFNGR1 e inhiben la activación inducida por IFN- γ de la expresión de CMH de clase II, el estallido oxidativo y la actividad bactericida de los M ϕ . Sin embargo, bajos niveles de IFN-I sobre éstas células pueden potenciar la respuesta secundaria de IFN-I y -II e IL-6, al favorecer la expresión y activación de STAT1 (Trinchieri, 2010). A pesar de que se sabe que niveles bajos de IFN-I tienen claros efectos antitumorales, sólo recientemente se ha comenzado a demostrar la manera de estimular su producción endógena, así como las células que lo producen, las células diana y la importancia relativa de esta citocina en el complejo entorno presente en el microambiente tumoral.

De esta manera, los agonistas de TLR3 adquieren un protagonismo único, ya que podrían promover la inducción de IFN de tipo I a niveles que son capaces de potenciar la respuesta inmune sin poner en juego sus circuitos inhibitorios.

En el presente trabajo de tesis, se muestra que en un entorno de administración terapéutica de poli A:U, se produce un pico de IFN- β que pudo ser fácilmente visualizado al cabo de seis horas post tratamiento. Asimismo, dicha señal fue decayendo a lo largo de los días, a menos que se administrase una segunda dosis de poli A:U. Nuestros datos son consistentes y coinciden con los reportados por otros autores (Reder & Feng, 2014). Los datos obtenidos por medición *ex vivo* de la actividad luciferasa en los ratones reporteros "globales" indican que la mayor parte del IFN- β se produce dentro del tumor y en GD. Curiosamente, el estudio cinético de la actividad luciferasa después de la segunda y tercera dosis revelaron que los niveles de IFN- β disminuyen en comparación con los niveles observados después de la primera dosis de poli A:U.

Recientemente Porritt y Hertzog (2015), han resumido los reportes de numerosas moléculas que estarían involucradas en mecanismos de regulación de la producción de IFN- β : RNF125 (IFN-inducible ring finger protein 125) es inducida por IFN- β y promueve la degradación proteasomal mediada por ubiquitina de receptores PRR (Arimoto y col., 2007); A20, es una enzima con función ubiquitin ligasa/desubiquitinasa que suprime la activación mediada por TLR3 y la inducción de IFN- β mediante la interacción e inhibición de TRIF (Wang y col., 2004); TRIP, es una ubiquitina ligasa E3 que dirige la degradación de TBK1, afectando la activación IRF3 y la expresión de IFN- β inducido a través de las vías TLR3/4 y RIG-I (Zhang y col., 2012); SMAD2 y SMAD3, capaces de interactuar directamente e inhibir IRF3 y STAT1, lo que resulta en una

reducción de la producción y consecuente señalización de IFN- β , respectivamente (Y. Sugiyama y col., 2012).

Además, se conoce que la respuesta de IFN-I está estrictamente controlada, y poco después de su exposición, las células atraviesan un estado de desensibilización a IFN-I, que en algunos casos puede durar hasta varios días (Schneider y col., 2014). Existen al menos dos mecanismos descritos de desensibilización mediada por ISG (Interferon-stimulated genes): -USP18 (ubiquitin-specific peptidase 18) también conocida como Ubp43 en ratón, interfiere con el reclutamiento de la subunidad IFNAR1 al complejo ternario del receptor IFNAR, lo que resulta en una desensibilización a señales mediadas por IFN- β . Si bien se ha sugerido que IFN- β puede ser menos sensible que IFN- α 2 a la desensibilización mediada USP18, su capacidad de señalizar a través de la vía JAK-STAT se ve afectada (Wilmes y col., 2015). Asimismo, frente a una segunda ronda de estimulación con IFN- β , la respuesta desencadenada es menos robusta que la primera (François-Newton y col., 2011). SOCS (suppressor of cytokine signaling) inhibe la señalización JAK-STAT mediante su unión a residuos de tirosina fosforilados, ya sea en el receptor IFNAR o en las proteínas JAK, resultando en la inhibición de la unión a STAT así como la actividad JAK (Schneider y col., 2014). Cualquiera de estos mecanismos mencionados anteriormente podrían explicar el decaimiento en la señal de luciferasa luego de sucesivas dosis (2^a y 3^a) respecto al pico inicial luego de 6 hs de administrada la 1^a dosis del tratamiento i.t. con poli A:U desnudo. Sin embargo, la señal de luminiscencia observada después de dosis sucesivas apareció más localizada en GD, lo que sugiere que las células del sistema inmune serían las únicas células que producen IFN- β en las etapas posteriores del tratamiento.

Anteriormente, habíamos demostrado un control del crecimiento tumoral transitorio cuando el modelo terapéutico se realizó en ratones deficientes en TLR3, en un contexto donde poli A:U sólo puede ser reconocido por el TLR3 presente en las células tumorales. De hecho, la inhibición del crecimiento del tumor se mantuvo únicamente mientras duró el tratamiento con poli A:U (Gatti y col., 2013). Sin embargo, en condiciones terapéuticas más fisiológicas en las que poli A:U se administra i.t. a ratones wt, el control de crecimiento del tumor fue mucho más robusto y el efecto duró más tiempo. Esto indica que, en nuestro modelo preclínico, las células del huésped son blanco del tratamiento i.t. con poli A:U desnudo. De hecho, hemos identificado que las células CD11c⁺ son una importante fuente de IFN- β producido in vivo, lo que confirma los datos publicados por otros autores (Fuertes y col., 2011; Diamond y col., 2011). Curiosamente,

las células CD11c⁺ representaron sólo el 50% de la producción de IFN- β en tumor, mientras que las células LysM⁺ contribuyen casi el 100%. Este hallazgo sugiere la existencia de una población mielóide CD11c⁻, que reside en tumor y es capaz de secretar IFN- β . Sorprendentemente, cuando evaluamos las poblaciones CD45⁺ infiltrantes de tumor que podrían estar reconociendo poli A:U mediante la expresión TLR3, tanto células CD11c⁺ como CD11b+F4/80⁺ e, inesperadamente, células CD11b+Gr1⁺ sobreexpresaron los niveles de TLR3 luego del tratamiento con poli A:U. Además, la falta de señalización de IFN-I genera una severa caída en los niveles de expresión de TLR3 en células CD45⁺ infiltrantes de tumor, que el tratamiento con poli A:U no es capaz de revertir. En tal sentido, existen evidencias que implicarían que los niveles de TLR3 están regulados por los niveles de IFN-I: se ha demostrado que la administración exógena de IFN α 2 aumenta la expresión de TLR3 en cultivos *in vitro* en fibroblastos humanos (Agarwal y col., 2011).

En ratones, el IFN- β es producido por células CD11c⁺ muy temprano luego de la implantación del tumor, y el *priming* de LiT antitumorales es defectuoso en ratones que carecen del receptor IFNAR o del factor STAT1 (Diamond y col., 2011; Fuertes y col., 2011). Del mismo modo, los genes implicados en la vía de IFN-I, incluyendo el factor de transcripción IRF7 y sus genes blanco, así como STAT1, se ven regulados negativamente en metástasis en hueso comparado con el tumor de mama primario 4T1.2. Por lo tanto, actualmente se le atribuye a IFN- β un nuevo mecanismo de supresión de la metástasis dependiente de la señalización vía IFNAR en el huésped (Bidwell y col., 2012; Wu y col., 2015).

Está claro que la activación de TLR3, promueve una fuerte inducción de IFN-I y es por esto que desde hace años existe un interés en el desarrollo de agonistas TLR3. Nuestro trabajo ha confirmado que poli A:U es ligando TLR3 y ha aclarado algunos aspectos importantes de su señalización *in vivo*. El hecho de que la molécula UNC93B1 sea absolutamente necesaria para la producción de IFN- β en nuestro modelo, implica que el reconocimiento de poli A:U es mediado por un receptor endosomal. Además, el hecho que sólo el factor de transcripción IRF3 (y no IRF7 ni IRF5) está directamente involucrado, confirma que se requiere la vía dependiente de TRIF para la producción de IFN- β en nuestro modelo; por el contrario, la vía dependiente de MyD88 asociado con TLR7, otro receptor endosomal que se ha implicado en la respuesta a poli A:U, no estaría participando en nuestro modelo (T. Sugiyama y col., 2007; G. N. Zhao y col., 2014).

Un enfoque para evaluar el rol del sistema inmune en el control del desarrollo del tumor luego del tratamiento con poli A:U, es simplemente eliminar componentes específicos del sistema inmune murino y supervisar el desarrollo de tumores en los ratones tratados. El empleo de ratones atímicos *nude* en nuestro modelo experimental, nos permitió descartar por un lado, que el tratamiento con poli A:U tuviese un efecto directo sobre la propia célula tumoral alterando el balance proliferación/apoptosis de las células B16; y por otro lado, nos permitió asumir que la población de células T se encontraba de alguna manera participando en la disminución del volumen tumoral observada en nuestro modelo experimental. Si bien mediante este experimento no podemos descartar la participación de células NKT, asociadas con un mejor pronóstico en diferentes tipos de tumores (Vivier y col., 2012; Conforti y col., 2010), pacientes con melanoma con altos niveles de infiltración de células T CD4+ y CD8+ sobreviven más tiempo que aquellos cuyos tumores contienen un bajo número de LiT (Goc y col., 2014; Bald y col., 2014; Rao y col., 2010; Harlin y col., 2009; Håkansson y col., 2001). Teniendo en cuenta estos datos aportados por la literatura, decidimos focalizarnos en el estudio de las consecuencias del tratamiento con poli A:U sobre la respuesta inmune adaptativa.

La erradicación de células neoplásicas mediada por el sistema Inmune requiere la inducción de una respuesta antitumoral fuerte y de larga duración por parte de células T (Mittal y col., 2014). Sin embargo, la generación de células T efectoras específicas de tumor no necesariamente resulta en la eliminación del tumor. El LiT citotóxico debe primero poder migrar hacia el sitio del tumor, infiltrar el tejido tumoral, e interactuar con su diana para finalmente poder gatillar sus funciones efectoras indispensables para la destrucción del tumor (Franciszkiwicz y col., 2012). Por tal motivo, analizamos el infiltrado de LiT en tumores de ambos grupos experimentales, y resultó muy interesante el hecho que poli A:U no sólo incrementa el infiltrado de LiT a tumor, sino que también disminuye considerablemente la proporción CD4/CD8. Además, estos resultados indicaron que el tratamiento con poli A:U tuvo una gran repercusión fundamentalmente sobre las células CD8. Se ha reportado que los IFN-I promueven la expresión del receptor de quimiocinas CXCR3 en células T CD8+ y su reclutamiento, así como la supervivencia de células T de memoria (Smyth, 2005; Lim y col., 2014). Esto justificaría el aumento en proporción de los LiT CD8 recuperados en tumor.

Asimismo observamos un incremento en LiT CD8+ que expresaban la molécula Ly6C, clave para que el LiT CD8 ejerza la CTL sobre la célula blanco (Jaakkola, y col.,

2003), lo que indicó que poli A:U es capaz de potenciar la CTL en tumor. A su vez, Hänninen y colaboradores (2011) demostraron que Ly6C desempeña un importante rol en la adhesión de Li a endotelio, participando en el *homing* y *clustering* de las células T CD8 debido al aumento en la expresión de LFA-1. Esto podría explicar los altos niveles de expresión de Ly6C encontrados en LiT CD8 tanto en GD como en TILs. Recientemente se ha reportado en un modelo de infección con virus del herpes 68, que la expresión de Ly6C por parte de LiT CD4+ efectores se correlacionó positivamente con la expresión de T-bet y KLRG1, con la producción de IFN- γ y TNF- α , así como con la capacidad de éstas células de colaborar en la proliferación y función de células citotóxicas (Hu y col., 2015).

Cuando estudiamos la población de LiT CD8+Ly6C+ en ratones IFNAR1^{-/-}, resultó llamativo que hubo una disminución drástica en los porcentajes de células CD8+Ly6C+ tanto en tumor (~2 veces) como en GD (~3 veces) en ratones IFNAR1^{-/-} vs wt. Este hallazgo fue consistente con los reportes de otros laboratorios y remarca la importancia del rol que cumplen los IFN-I en el *priming* de LiT CD8, y que si bien podría haber un efecto directo de los IFN-I sobre esta población celular, no se pueden descartar otros mecanismos compensatorios que directa o indirectamente puedan influir sobre los LiT CD8.

Recientemente se ha publicado un trabajo donde los autores sintetizaron un nuevo compuesto, cM362-140 capaz de inducir específicamente la vía TLR3/TICAM-1, favoreciendo una efectiva respuesta citotóxica específica antitumoral mediada por LT CD8 y NK en ratones portadores de tumor E.G7ova, reduciendo además los efectos tóxicos de la producción sistémica de citocinas como IL-6 y TNF- α (comparado con poli I:C) (Matsumoto y col., 2015). Aunque cabe destacar que para poder evidenciar esta respuesta antitumoral, emplearon el ligando acomplejado a Jet-PEI y lo administraron i.t. conjuntamente con Ovalbúmina. En contraste, en nuestro modelo preclínico pudimos evidenciar la respuesta inmune específica transfiriendo células OTI y OTII naïve (sin previa activación *in vitro*), a ratones portadores de tumores B16 tratados i.t. con dos dosis de poli A:U desnudo. Asimismo, el tratamiento terapéutico aquí presentado tiene la ventaja que para su aplicación no sería necesario conocer un antígeno inmunogénico tumoral determinado.

Se ha demostrado que la exposición transitoria de LiT CD8 a IL-12 e IFN-I no promueve la supervivencia ni confiere una temprana ventaja proliferativa *in vivo*, sino que sostiene la expresión en superficie de CD25, lo cual prolonga la división de las células

T CD8 en respuesta a niveles basales de IL-2, a través de la activación de la vía PI3K y la expresión de FoxM1, un regulador positivo de genes del ciclo celular (Starbeck-Miller y col., 2014). Estos datos aportados por la bibliografía, sustentarían los resultados obtenidos en el ensayo de proliferación in vivo, donde el tratamiento i.t. con poli A:U potenció la proliferación de LiT OTI antígeno específicos.

El grupo del Dr. Stephen Rosenberg, fue el primero en cosechar LiT infiltrantes de tumor de los propios pacientes con melanoma metastásico, amplificarlos en cultivo con IL-2, y reinfundirlos para aprovechar y potenciar su capacidad de lisis específica. Aunque algunos pacientes experimentaron una mejora clínica, la gran mayoría no lo hicieron. Esto puso en evidencia que la inducción de una respuesta antitumoral específica no se correlaciona necesariamente con un mejor respuesta a nivel clínico; ya que hay que contemplar la resistencia de células tumorales por mecanismos de evasión de la respuesta inmune como la capacidad inmunosupresora del microambiente tumoral y el *immunoediting* que produce la CTL (las células tumorales menos susceptibles a la lisis específica vivirán y se dividirán más que aquellas fácilmente eliminadas por TILs) (Wilke y col., 2013). Además, la producción endógena de IFN-I por las células de la inmunidad innata es un evento clave para inducir el priming de los LiT CD8 específicas de antígenos tumorales (Diamond y col., 2011; Fuertes y col., 2011).

Nosotros creemos que la base del éxito de nuestra terapia con poli A:U, radicaría en su capacidad de mejorar la funcionalidad de CD en tumor, favoreciendo además un microambiente caracterizado por la presencia de citocinas como IFN- β , IL-12 e IFN- γ y un *milieu* de quimiocinas, disminuyendo a su vez la fase regulatoria de la respuesta que, en su conjunto propiciarían un microambiente tumoral inflamatorio altamente favorable para una eficiente respuesta inmune antígeno específica. De hecho, la ausencia de la señales vía el receptor IFNAR comprometió el reclutamiento de TILs y la funcionalidad de los mismos.

EL ROL DE LAS TREG EN EL MICROAMBIENTE TUMORAL

Las funciones normales de las células Treg son mantener la homeostasis inmune, prevenir la autoinmunidad y limitar la inmunopatología. Sin embargo, ha sido ampliamente reportado que, tanto en modelos de ratón como en pacientes con cáncer, el desarrollo tumoral se asocia a menudo con un enriquecimiento de células Treg en sangre periférica, ganglios linfáticos drenantes y tumor (Whiteside, 2014; Smyth y col., 2014;

Hindley y col., 2011). Es por esto que resultó indispensable, avocarnos al estudio de los efectos del tratamiento terapéutico con poli A:U sobre esta población.

En una primera instancia, observamos que el tratamiento con poli A:U disminuyó drásticamente el número de células Treg dentro de la población CD45+ infiltrantes de tumor en ratones Foxp3-GFP portadores de tumores B16. Similares resultados obtuvimos cuando analizamos la frecuencia de células Treg dentro de las CD4+ infiltrantes de tumor. En línea con estos hallazgos, en un modelo de terapia génica de tumores CT26 con un vector que codifica para IFN- α , los autores encontraron que existe una correlación entre los niveles de expresión de IFN- α en los tumores con la concentración de IL-6 producida por células CD11c+ infiltrantes de tumor en respuesta a IFN tipo I, y una disminución significativa en la frecuencia de células Treg (Hashimoto y col., 2014).

Además, la disminución en la expresión de Foxp3 en tumor, podría asociarse por un lado, a una disminución en la capacidad supresora de esta población (teniendo en cuenta el porcentaje), ya que se modifica la relación de células T efectoras/Treg (Lemos y col., 2014); y por otro lado, podría asociarse a una disminución en la capacidad supresora individual de estas células (teniendo en cuenta la IFM), ya que los niveles de Foxp3 determinan la funcionalidad de la célula Treg (Sakaguchi y col., 2013; Rudensky, 2012).

En los últimos años, ha habido un número creciente de trabajos que cuestionan el “compromiso de linaje” de células Treg sugiriendo que conservan plasticidad, capacidad de cambiar su identidad y convertirse a células Th en respuesta a cambios en su entorno (Whiteside, 2014; Sawant & Vignali, 2014; Hori, 2010). Se ha demostrado en un modelo terapéutico de tumores B16 tratados con CPG-OVA, que una gran fracción de las células Treg periféricas se reprogramaron para ejercer actividad colaboradora, mediante el aumento en la expresión de CD40L y producción de citocinas proinflamatorias IL-2, IL-17 y TNF α , promoviendo la presentación cruzada de antígenos inicial por parte de CD4⁺ LiT CD8⁺ (Sharma y col. 2010). Por otro lado, Bacher y colaboradores (2013) demostraron que el IFN- α inhibe la producción de AMPcíclico vía ERK/MEK en células Treg humanas, sin afectar su programa de diferenciación pero limitando su actividad supresora en tumor.

En nuestro modelo preclínico, luego del tratamiento i.t. con poli A:U, disminuyó drásticamente el número de células Foxp3/millón de TILs, disminuyendo además la frecuencia e IFM de Foxp3 dentro de las células CD4 y su fenotipo supresor evaluado

mediante la expresión de LAP. En este sentido, los resultados obtenidos en ratones IFNAR1^{-/-} mostraron que en ausencia de señales de IFN-I, el tratamiento con poli A:U no modifica dichos parámetros respecto a PBS, aunque cabe destacar que se duplicó el número de células Foxp3/millón de TILs respecto a lo que ocurrió en ratones wt del grupo pAU.

Por lo tanto, los datos aportados por la bibliografía sustentarían los resultados obtenidos en nuestro modelo preclínico de administración i.t. de poli A:U, en donde la presencia y transducción de señales dadas por IFN-I, podría tener un efecto en la disminución del reclutamiento de células Treg a tumor, en la interconversión de Treg a T efectora, en la capacidad supresora de las Treg, o una combinación de estos eventos, entre otros. Actualmente, nuestro grupo se encuentra estudiando con más detalle los posibles mecanismos que estarían operando en nuestro modelo, tratando de dar luz a la intrincada relación Treg/IFN-I.

LAS QUIMIOCINAS EN EL MICROAMBIENTE TUMORAL

Para determinar si poli AU estaba produciendo cambios en el perfil de quimiocinas producidas por células mieloides en el microambiente tumoral, aislamos células CD45⁺CD11b⁺ infiltrantes de tumores tratados y analizamos el perfil de 25 quimiocinas mediante microarreglo de proteínas. Sin estimulación *ex vivo*, pudimos detectar una leve disminución en la producción de CCL2 y CXCL1 en el grupo pAU, mientras que por el contrario, CCL6, CCL12 e IL-16 se encontraban aumentadas con el tratamiento.

Se ha reportado que las células CD11b + Ly6C⁺ son la principal fuente de CCL2 y CCL7 en el microambiente del tumor, por lo tanto, se establece un *loop* de retroalimentación positiva para el reclutamiento de dichas células a las lesiones neoplásicas (Ma y col., 2013). Se ha asociado a CCL2 principalmente con la promoción del crecimiento del tumor a través de reclutamiento de las células mieloides, en particular los monocitos/Mφ con funciones prometastásicas (Qian y col., 2012). También, el bloqueo de CCL2 en un modelo de mesotelioma disminuye el reclutamiento de células Treg, aumentando los efectos de la inmunoterapia (Fridlender y col., 2010). Sin embargo, otro estudio demuestra que las células Tγδ utilizan la vía CCR2/CCL2 para migrar hacia tumor, donde ejercen una clave función antitumoral (Lança y col., 2013). Por lo tanto, la actividad biológica del eje de señalización CCR2/CCL2 exhibe un grado significativo de dependencia según el contexto en el que se active. Del mismo modo, la transducción de

señal vía CCL2/CCR2 mejora la inmunovigilancia mediante la activación de una respuesta Th1 y el reclutamiento de células T efectoras CD8+ hacia lesiones neoplásicas, pero también puede estimular la progresión de neoplasias malignas ya establecidas (Ma y col., 2013).

Acharyya y colaboradores (2012) demostraron en cáncer de mama que CXCL1/2 atrae a células mieloides CD11b+Gr1+ a tumor, que a su vez producen quimiocinas incluyendo S100A8/9 que aumentan la supervivencia y la resistencia a la quimioterapia. A su vez, otros autores también han demostrado que CXCL1 induce la proliferación de células epiteliales de cáncer de ovario a través de la activación de CXCR2 y consecuente inducción de factor de crecimiento epidérmico EGF (Bolitho y col., 2010). Asimismo CXCL1 tiene un potente efecto proangiogénico y es secretado por células tumorales difusas de pacientes con carcinoma gástrico (Eck y col., 2003). Recientemente, Jablonska y col. (2014) demostraron que la migración de neutrófilos a tumor está influenciada por IFN- β endógeno a través de la regulación de gradientes de CXCL1 y CXCL2, ya que el tratamiento de neutrófilos infiltrantes de tumor en ratones IFNB1^{-/-} con IFN- β recombinante revierte la sobreexpresión de CXCL1 y CXCL2 a niveles hallados en ratones wt. Teniendo en cuenta nuestros resultados, el tratamiento con poli A:U disminuye en un 20% la expresión de CXCL1 por parte de células CD11b+ infiltrantes de tumor, aunque luego de la reestimulación *ex vivo*, aumentó más de 8 veces la expresión de CXCL1 en ésta población.

Curiosamente, tanto CCL2 y CXCL1 fueron reportadas previamente ser producidas de forma espontánea por CD CD11b+ aisladas de pulmón de ratones normales, mientras que estas quimiocinas no fueron producidas por CD esplénicas en ausencia de estímulo (Stock y col., 2014). Se ha demostrado que CCL2 es una quimiocina importante para el reclutamiento de células CD8+ citotóxicas al sitio del tumor (Melero y col., 2014). Además, LiT específicos para mesotelina expandidos *ex vivo* y que sobreexpresan el receptor de *homing* CCR2b (cuyos ligandos son CCL2/12), mejoraron significativamente el éxito de la transferencia celular adoptiva y la eficacia de la terapia antitumoral en modelo murino de mesotelioma pleural maligno (Moon y col., 2011). También, se ha demostrado que dentro del compartimiento mielóide que infiltra tumor, los M ϕ de fenotipo M1 son las principales células productoras de CCL12 en un modelo murino de cáncer de mama espontáneo PyMTChOVA (M. L. Broz y col., 2014).

En cuanto a la quimiocina CCL6, existen reportes que le atribuyen una función dual: si bien puede promover la apoptosis del tejido tumoral y adyacente mediante la

cambios en la interacción con la oncoproteína Myc, la sobreexpresión de CCL6 también puede alterar el comportamiento del tumor disminuyendo su dependencia de factores de crecimiento y promoviendo la invasividad como resultado de la apoptosis del tejido local (Atsumi y col., 2014; Yi y col., 2003). En un modelo murino de sepsis peritoneal, Coelho y colaboradores (2007) demostraron que CCL6 suprime la mortalidad a través del reclutamiento de células de la inmunidad innata efectoras con mayor capacidad microbicida y de generar IFN- γ . Además, se ha demostrado que los IFN tipo I regulan la expresión de la proteína ICSBP (IFN consensus sequence-binding protein), induciendo un efecto inmunoprotector mediado por las quimiocinas CCL6 y CCL9 en un modelo murino y muestras de pacientes con leucemia mielogénica crónica (Nardi y col., 2009), datos que estarían en línea con nuestros resultados.

En cuanto a IL-16, es una citocina pleiotrópica con un papel fundamental en la fisiopatología de las enfermedades inflamatorias. Puede ser producida tanto por células inmunes como no inmunes, incluyendo LiT CD8+ activados, mastocitos, CD, fibroblastos y células epiteliales, y sirve como quimioatrayente para los monocitos/ M ϕ y eosinófilos (Fridman y col., 2012). Además, IL-16 puede inducir la activación del LiT CD4+, a través del entrecruzamiento de CD4 (que conlleva a la fosforilación de la proteína tirosina quinasa p56lck) y también reclutar a LiT CD4+ al sitio de inflamación (Mahindra & Anderson, 2012). En este sentido, se ha demostrado que IL-16 participa en el reclutamiento de LiT CD4+ CD62L+ a estructuras ganglionares terciarias, lo que se asocia con un mejor pronóstico de supervivencia a largo plazo de pacientes con cáncer de pulmón (de Chaisemartin y col., 2011). Por otro lado, IL-16 ha sido implicada en el desarrollo y progresión del tumor, ya que se encontró sobreexpresada en diferentes tipos de cáncer: como gástrico, colorectal y mieloma múltiple (Milke y col., 2013; Atanackovic y col., 2012). Nuestros resultados soportarían una función antitumoral de IL-16, ya que hallamos niveles aumentados de dicha citocina, tanto en células CD11b+ infiltrantes de tumor sin estímulo como estimuladas *ex vivo*, aisladas de ratones del grupo pAU.

Se ha propuesto que el IFN- γ derivado de un perfil de respuesta Th1 en el microambiente tumoral actúa a nivel de M ϕ , estimulando su función citotóxica sobre las células tumorales e induciendo además la producción de quimiocinas con funciones angiostáticas CXCL9/MIG y CXCL10/IP-10 *in vivo* (Wilke y col., 2013; Haabeth y col., 2011). Además de los M ϕ , las CD constituyen una fuente adicional de estas quimiocinas inflamatorias (Eberlein y col., 2010).

La estimulación con ligandos de TLR3 induce la expresión de los ligandos de CXCR3 (CXCL9, CXCL10 y CXCL11), que promueven el infiltrado de Lin⁺ CD4⁺ Th1, CD8⁺ y células NK a tumor. La expresión intratumoral de estas quimiocinas también se ha asociado con un pronóstico favorable en la supervivencia de pacientes con cáncer colorrectal, renal, sarcoma de Ewing, melanoma y carcinoma hepatocelular (Chew & Abastado, 2013; Wilke y col., 2013).

TERAPIAS COMBINADAS ANTITUMORALES: NUEVAS PERSPECTIVAS

Durante décadas, el desarrollo de fármacos antineoplásicos se ha basado en la convicción de que el cáncer constituiría una enfermedad genética y epigenética de células autónomas (Hanahan & Weinberg, 2011). Por lo tanto, durante mucho tiempo los agentes quimioterapéuticos han sido vistos como una especie de antibióticos para las células malignas, es decir, productos químicos dirigidos preferentemente a las células cancerosas limitando su proliferación o mejor aún, causando su muerte (Zitvogel y col., 2013).

En este sentido, las antraciclinas (y en particular doxorubicina) han sido empleadas con éxito en terapias antitumorales de pacientes con leucemia, linfoma de Hodgkin, cáncer de vejiga, mama, estómago, pulmón, ovarios, tiroides, sarcoma de tejidos blandos, mieloma múltiple (Bracci y col., 2014). Inicialmente se pensó que su principal mecanismo de acción era mediante el intercalado en las bases de los AN, frenando la maquinaria replicativa y de reparación del ADN, impidiendo la transcripción y por lo tanto induciendo la apoptosis o necrosis celular. Durante la última década, ha habido una revolución conceptual, teniendo en cuenta a los tumores como entidades que pueden ser detectadas y destruidas por el sistema inmunológico (Bezu y col., 2015). De hecho, en respuesta a la quimioterapia, las células malignas pueden enviar una serie de señales de alerta del peligro incipiente no sólo a las células vecinas, sino también a nivel sistémico (Zitvogel y col., 2013). Así, las células cancerosas sensibles a agentes antineoplásicos emiten un amplio espectro de moléculas asociadas a la muerte celular (CDAM, *cell death-associated molecules*), en donde algunas pueden ejercer potentes efectos adyuvantes, proceso definido como “muerte inmunogénica” (ICD, *immunogenic cell death*) (Pol y col., 2015).

Se ha descrito que las antraciclinas y oxaliplatino, pueden inducir la exposición de calreticulina en la superficie de las células tumorales apoptóticas. La expresión de calreticulina podría contribuir a la captura de cuerpos apoptóticos por CD y por lo tanto promover la respuesta inmune mediada por células citotóxicas específicas de tumor

(Palucka & Banchereau, 2012). Además, se ha reportado que la quimioterapia con antraciclinas produce la liberación de ATP por células tumorales muertas, reclutando células mieloides al tumor y estimulando su diferenciación local a células CD11b+Ly6C+CD11c+, con capacidad de fagocitar y presentar eficientemente antígenos tumorales a LiT *in situ* (Ma y col., 2013). A su vez, existen reportes que implican a la proteína de unión a la cromatina no histona HMGB1 (*high-mobility group box 1*) como intermediario de la muerte inmunogénica: por ejemplo, el knockdown de HMGB1 mediante ARNi y su neutralización con anticuerpos suprime la respuesta inmune antitumoral protectora inducida tras el tratamiento de células tumorales con antraciclinas. La liberación al citoplasma de HMGB1 puede desencadenar la autofagia, mientras que su liberación extracelular puede ser agonista de PRR presentes en CD y M ϕ , como TLR4 y RAGE (*receptor for advanced glycation endproducts*), activando mecanismos proinflamatorios (Kroemer y col., 2013). Recientemente, se ha sugerido que las antraciclinas pueden provocar la liberación de ARN propio de las células cancerosas estresadas o que mueren, el cual podría actuar como un ligando endógeno para TLR3 y por lo tanto inducir la producción de IFN- β , mediando efectos antitumorales adicionales (Sistigu y col., 2014).

Si bien todos los mecanismos de acción de doxorubicina suenan alentadores para erradicar un tumor, cabe destacar que la principal limitante de la quimioterapia es la falta de especificidad/selectividad. Por lo tanto, luego de su administración, antraciclinas libres pueden difundirse tanto en el tejido tumoral así como en los tejidos normales, donde pueden inducir efectos secundarios graves, limitando su dosis efectiva y su aplicación clínica (Thorn y col., 2012; Zhu y col., 2014). El efecto adverso más grave de doxorubicina es su cardiotoxicidad: su acumulación puede causar la pérdida lenta de miofibrillas y vacuolización de las células del miocardio y, eventualmente, insuficiencia cardíaca, incluso hasta 20 años después de finalizada la quimioterapia (Kalam & Marwick, 2013; Zhu y col., 2014).

Con el fin de poder emplear doxorubicina intentando conservar su eficacia como antineoplásico pero a su vez reducir los efectos adversos, diseñamos un esquema de tratamiento de terapia combinada antitumoral de doxorubicina en dos dosis diferentes con poli A:U.

El análisis de las curvas de crecimiento tumoral indicó que la terapia combinada doxorubicina en baja dosis administrada en combinación con poli A:U tuvo un efecto

mejorado comparado con ambas monoterapias. Se ha reportado que agentes quimioterapéuticos (entre ellos doxorubicina) en concentraciones no tóxicas aumentan la presentación antigénica en CD a través de un mecanismo dependiente de IL-12 (Shurin y col., 2009).

El efecto más marcado de la terapia combinada se observó en la supervivencia de los ratones, en donde la terapia combinada Doxo/pAU aumentó la mediana de supervivencia de los ratones en un 65,9 % respecto al grupo PBS. Esto podría ser debido a una disminución de los efectos secundarios tóxicos, evaluados mediante la medición de los niveles de enzimas clave asociadas con el daño tisular, los cuales se reducen significativamente en comparación con los niveles de Doxo-monoterapia (tanto en dosis bajas como altas). Estos resultados sugieren un efecto protector de poli A:U frente al daño tisular, que podría estar mediado por IFN- β . De hecho, se ha demostrado que la señalización de IFN-I es requerida para la protección contra daño hepático mediado por células del sistema inmune, mediante la inducción de IL-1ra en hepatocitos y en células mononucleares de hígado, disminuyendo la inflamación (Conrad y col., 2014; Petrasek y col., 2011).

Por otro lado, el análisis de WBC demostró que a excepción del grupo Doxo-pAU los distintos tratamientos inducen una leucopenia, al menos al día 25 p.i. Estos resultados fueron consistentes con datos reportados en la literatura para doxorubicina (Bracci y col., 2014). El metaanálisis de múltiples estudios clínicos indican que una linfopenia severa (<1000 Li/ μ l) afecta negativamente la respuesta a la quimioterapia de distintos tipos de cánceres sólidos (Ray-Coquard y col., 2009). En concordancia, modelos murinos de neoplasias (incluyendo cánceres trasplantables, así como tumores primarios inducidos químicamente) responden mucho más eficiente a antraciclinas cuando se inducen en ratones inmunocompetentes que cuando se desarrollan en huéspedes inmunodeficientes (Kroemer y col., 2013).

Por lo tanto, nuestros hallazgos aportan nuevos conocimientos para el desarrollo de terapias combinadas que involucren la utilización de antineoplásicos convencionales en combinación con ligandos de TLR3 con capacidad de inducir IFN-I en la terapia antitumoral. A su vez, nuestros resultados reflejan el efecto mejorado que puede resultar de la combinación de fármacos con diferentes mecanismos de acción, que pueden servir como antecedente en el diseño de futuros ensayos que involucren la quimio-inmunoterapia.

Capítulo V: Materiales y Métodos

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

El manejo de datos, análisis y representación gráfica se realizó con Prism 5.0 (GraphPad Software). La significancia estadística se calculó con análisis 2 colas utilizando el post test de Bonferroni para 1 o 2 vías ANOVA y Test T de Student, mientras que para estudios de supervivencia se empleó el análisis de Kaplan-Meier, y un valor de p menor de 0,05 fue considerado estadísticamente significativo (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $P < 0.001$).

ANIMALES

Los ratones C57BL/6 y los ratones atímicos nude fueron adquiridos de la Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional de la Plata, Argentina. Los animales de la cepa C57BL/6 y derivados genéticamente modificados IFNAR1^{-/-}, Foxp3-GFP, OTI, OTII, así como animales de la cepa BALB/c fueron adquiridos en los Laboratorios Jackson. La cepa de ratón deficiente en IL-12p40 (IL-12p40^{-/-}) fueron adquiridos de la Facultad de Química, Bioquímica y Farmacia, de la Universidad Nacional de San Luis, Argentina (gentilmente cedidos por la Dra. Silvia Di Genaro). Estos animales son portadores de una mutación nula para el gen de IL-12p40, por lo que no son capaces de secretar la subunidad p40 como tampoco el heterodímero IL-12p70 biológicamente activo (Magram y col., 1996). Los animales fueron mantenidos en el Bioterio del CIBICI-CONICET (Centro de Investigaciones en Bioquímica Clínica e Inmunología, CONICET) de acuerdo con los requisitos experimentales del comité ético.

Los ratones transgénicos reporteros IFN- β -luciferasa ($\Delta\beta$ -LUC) fueron empleados durante mi estancia en el laboratorio de los Dres. Jablonska y Lienenklaus. Éstos fueron generados mediante la sustitución del gen que codifica IFN- β con el gen reportero de la luciferasa de luciérnaga usando el protocolo estándar de recombinación homóloga (Lienenklaus y col., 2009). Los ratones $\Delta\beta$ -luc fueron entonces recombinados con ratones IRF3^{-/-}, IRF5^{-/-}, IRF7^{-/-} o UNC93b1^{-/-} para generar ratones IRF3^{-/-} IFN- $\beta^{+/\Delta}$ -luc, IRF5^{-/-} IFN- $\beta^{+/\Delta}$ -luc, IRF7^{-/-} IFN- $\beta^{+/\Delta}$ -luc y UNC93b1^{-/-} IFN- $\beta^{+/\Delta}$ -luc, respectivamente. Para recibir la expresión del linaje específico de reportero, IFN- $\beta^{+/\Delta}$ -luc se cruzaron con ratones CD19cre, CD4cre, LysMcre (proporcionados por la Dra. Angela Schippers, HZI) y ratones CD11ccre (aportados por el Prof. Dr. Ulrich Kalinke, Twincore) para generar ratones que expresan el gen reportero exclusivamente en células CD19+ (LiB), CD4+ (LiT), LysM+ (células mieloides), o CD11c+ (CD), respectivamente. Adicionalmente ratones IFN- $\beta^{+/\Delta}$ -luc se cruzaron con ratones albino C57BL/6 (C57BL/6-Tyr c-2J., cedidos por Thomas Blankenstein (MDC, Berlín) para mejorar la visualización de luciferasa *in vivo*. Todos los ratones fueron endocriados en el bioterio del Helmholtz-Zentrum für Infektionsforschung (HZI)- Braunschweig-Alemania bajo estrictas normas éticas de la Unión Europea (FELASA) y mantenidos bajo condiciones de higiene SPF.

CITOMETRÍA DE FLUJO

La tinción superficial de las suspensiones celulares de bazo, ganglios linfáticos y tumor; se realizó usando protocolos estándar indicados por el fabricante.

Los siguientes anticuerpos fueron de BD Biosciences: anti-CD45-APC-Cy7 (30-F11), anti-V β 5.1/2-PE (MR9-4), anti-CD8b-PE (H35-17.2), anti-CD8b-FITC (53-6.7), anti-CD4-APC (RM4-5), anti-Gr1-PE (RB6-8C5), anti-CD107a-APC (1D4B), anti-IFN γ -FITC (and APC, XMG1.2) y anti-IL-12p70-PE (C15.6). Los siguientes anticuerpos de BioLegend: anti-CD4-PECy7 (RMA4-5), anti-B220-APC (RA3-6B2), anti-Ly6C-APC (HK1.4), anti-CD11b-FITC (M1/70), anti-F4/80-Alexa647 (BM8), anti-CD86-FITC (GL1), anti-CD40-PE (3/23), anti-F4/80-APC (BM8), anti-CD11c-APC (and PCP, N418). Mientras que los anticuerpos anti-TLR3 (40C1285) y anti-IgG de ratón-Alexa488, fueron adquiridos en Abcam.

Para el estudio de la expresión de antígenos en CD, se utilizaron anticuerpos monoclonales anti-CMH II conjugado a FITC, anti-CD80 conjugado a PE, anti-CD86 conjugado a FITC (BD-Pharmingen) y anti-CD40 conjugado a PE (e-Biosciences) dentro de la población de CD CD11c+ marcada con anti-CD11c conjugado a APC (BD-Pharmingen). Se realizó localizando dentro del gate para linfocitos, excluyendo autofluorescencia, aquella población de células CD8+CD11c- (representan alrededor de 7 a 12 % de esplenocitos totales). Simultáneamente se sortean las células CD11c+. Para la purificación de células por Cell-sorting, las células fueron marcadas con los respectivos anticuerpos, durante 1 hora a 4°C en buffer de citometría. Posteriormente las células fueron lavadas y resuspendidas en *FacsFlow* para citometría. Las muestras fueron adquiridas en un FacsCanto II BD y los análisis se realizaron utilizando el programa FlowJo (Tree Star, Inc.).

CITOMETRÍA DE FLUJO INTRACELULAR

Para la tinción de citocinas, las células fueron estimuladas con PMA (100 ng / ml) e ionomicina (250 ng / ml) por un total de 4 horas a una concentración de 1×10^6 células / ml. En las últimas 3 horas, se añadió brefeldina (3 M), las células se fijaron y se permeabilizaron con Cytotfix/Cytoperm (catálogo 554722, BD Biosciences), y se tiñeron con anti-IFN-FITC (y APC, XMG1.2), anti- IL-12p70-PE (C15.6) (ambos de BD Biosciences). Para la tinción de anti-TLR3, las muestras se tiñeron primero con el anticuerpo contra los marcadores de superficie pertinentes, a continuación, se permeabilizaron con Fixation/Permeabilization Kit (catalog 00-5521-00, eBioscience) de acuerdo con las instrucciones del fabricante, seguido de otra ronda de permeabilización con paraformaldehído al 1% más 0,5% de Tween-20 en PBS a temperatura ambiente (T.A.) durante 30 minutos, después se tiñeron con anticuerpo anti-TLR3 (40C1285 clon, Abcam) a 4°C durante 45 minutos. Después de una segunda etapa de tinción a 4°C durante 45 minutos con anti-ratón-Alexa488 anticuerpo policlonal (Abcam), las células se lavaron dos veces y se analizaron según se detalla anteriormente.

DETECCIÓN DE LUCIFERASA

Para la determinación de la actividad enzimática de la luciferasa, se obtuvieron fragmentos de tejido (50 μ g), y se colocaron inmediatamente en hielo seco, siendo almacenados a -80°C hasta su uso. Las muestras se homogeneizaron en volúmenes proporcionales de Reporter Lysis Buffer usando Lysing Matrix A en homogeneizador FastPrep-24 (MP Biomedicals). Los lisados se mezclaron con LARII (Promega) y se

midio en un luminómetro (Berthold). Para la toma de imágenes y detección de luciferasa *in vivo*, los ratones fueron inyectados i.v. con 150 mg/kg de D-luciferina (Synchem) en PBS, anestesiados utilizando sistema continuo de administración de Isoflurano (Baxter) y registrado mediante un sistema de formación de imágenes IVIS 200 (CaliperLS). El flujo de fotones se cuantificó usando el programa Living Image 3.2 (CaliperLS) y se expresa en fotones/s/cm²/estereorradián.

ENSAYO DE PROLIFERACIÓN *IN VIVO* POR DILUCIÓN DE CFSE.

Carboxifluorescein-succinimidil éster (CFSE) es un fluorocromo capaz de marcar a las células por la formación uniones covalentes con proteínas citoplasmáticas, siendo retenido dentro de la célula y conservando su viabilidad. Por lo tanto, si una célula marcada con CFSE se encontrase en proceso de división, el colorante al encontrarse anclado a las proteínas, se repartirá en cantidades iguales entre las células hijas, decayendo su intensidad de fluorescencia a la mitad. Esto permite identificar ciclos discretos de división celular, hasta que la fluorescencia sea demasiado baja para ser distinguida de la auto fluorescencia propia de la célula (Wells y col., 1997).

Se preparó una solución de CFSE a 10 μ M en PBS 5% SFB (solución 2X) -stock CFSE 5mM, concentración final en suspensión celular 5 μ M. Se tomó 1 ml de la solución CFSE 2X y luego de mezclar con 1 ml de la suspensión celular de linfocitos en PBS, se incubó 30 minutos a T.A. en oscuridad (tubo de 15 ml recubierto con papel aluminio en posición horizontal). A continuación se procedió a lavar con PBS 2% SFB y centrifugar. Una vez contadas las células se resuspendieron 15 x 10⁶ cél/ml con solución fisiológica estéril, se alicuotaron en jeringas para insulina (sin volumen muerto 27G) 200 μ l de la suspensión celular (CFSE+) y transfirieron i.v. a ratones C57BL/6. Además se emplearon ratones sin transferir (como control negativo) y ratones portadores de tumores B16 (para control de proliferación homeostática) que no recibieron ningún tratamiento. Luego de 3 o 6 días, se extrajeron los GD, GND y tumores de los ratones transferidos y se analizaron las poblaciones de interés por citometría de flujo.

ENSAYO PRE-CLÍNICO DE QUIMIO-IMMUNOTERAPIA COMBINADA

Once días después de la inoculación de células tumorales, los ratones se dividieron al azar en 6 grupos: PBS, pAU (50 μ g/ratón), Doxo (monoterapia en bajas dosis, 0,05 mg/ratón), Doxo/pAU (bajas dosis de doxorubicina 0,05 mg/ratón en combinación con pAU 50 μ g/ratón), DOXO (monoterapia en altas dosis, 0,25 mg/ratón) y DOXO/pAU (altas dosis de doxorubicina 0,25 mg/ratón en combinación con pAU 50 μ g/ratón), (n = 15 ratones/grupo combinando 2 experimentos independientes). PBS y pAU se administró i.t. cada dos días, mientras que doxorubicina i.v. cada 7 días. 3 días después de la segunda dosis de doxorubicina (día 21 después de la inoculación del tumor), se obtuvo la sangre de 5 ratones/grupo y se procedió a la detección de los distintos parámetros bioquímicos y enzimáticos (en suero) en un autoanalizador Advia 1200 (Siemens).

EXPERIMENTOS DE TRANSFERENCIA ADOPTIVA

Ensayo de proliferación *in vivo*. Células OT-I CD8+ u OT-II CD4+ fueron obtenidas de bazo de respectivos ratones por FacsAriaII (BD Biosciences) y marcadas

con CFSE. Después del lavado, 3×10^6 células CD8+CFSE+ se transfirieron via inyección retro-orbital a ratones receptores C57BL/6 portadores de tumor (de los grupos pAU o PBS como se indicó). 3 o 6 días después, se cosecharon las células de bazo, GD, GND y tumores y a continuación se marcaron con V β 5.1/2 (mAb específico para analizar OT-I CD8 + o OT-II CD4 +) y se analizó proliferación celular por citometría de flujo. Para medir los marcadores de función y la producción de citocinas intracelulares, las células OT-II T OT-I se incubaron con anticuerpos específicos.

INDUCCIÓN DE TUMORES *IN VIVO*: MODELO TERAPÉUTICO CON POLI A:U

Los tumores se indujeron en huéspedes singénicos [ratones C57BL/6, IFNAR1^{-/-}, Foxp3-GFP (C.Cg-Foxp3tm2Tch/J), IFN β ^{+/ Δ β Luc}, IFN β ^{+/ $\text{lox}\beta$ Luc} LysM, IFN β ^{+/ $\text{lox}\beta$ Luc} CD11c, IFN β ^{+/ $\text{lox}\beta$ Luc} CD19 o IFN β ^{+/ $\text{lox}\beta$ Luc} CD4, IFN β ^{+/ Δ β Luc} IRF3^{-/-}, IFN β ^{+/ Δ β Luc} IRF5^{-/-}, IFN β ^{+/ Δ β Luc} IRF7^{-/-} y IFN β ^{+/ Δ β Luc} UNC93b^{-/-}] y ratones “nude”, mediante la inyección s.c. de 1×10^6 de células B16, o cuando se indica con 1×10^6 EG7ova, 0.5×10^6 células MB49; y en ratones singénicos (BALB/c) mediante la inyección s.c. de 1×10^6 células CT26 y 1×10^6 células 4T1. Las líneas celulares fueron resuspendidas en 250 μ l de PBS estéril, en el flanco derecho de cada animal. El desarrollo tumoral fue monitoreado día de por medio, midiendo los diámetros perpendiculares del tumor con un calibre métrico. El volumen del tumor fue estimado como $(d^2 \times D)/2$, donde d y D corresponden a los diámetros menor y mayor respectivamente. Tras la aparición del tumor (día 10 p.i., volumen tumoral $\geq 18 \text{ mm}^3$), fueron tratados i.t. con 4 dosis (cada dos días) de 50 μ g de poli A:U (Invivogen) en 200 μ l de PBS (grupo pAU) o 200 μ l de PBS (grupo PBS). Los animales que fueron mantenidos para análisis de sobrevida, por razones éticas, se sacrificaron cuando los tumores alcanzaron un volumen mayor a 2500 mm^3 . La mediana de vida se calculó según la siguiente fórmula:

$$M_v = \frac{|M_{pAU} - M_{PBS}| \cdot 100}{M_{PBS}}$$

M_v (mediana de vida); M_{pAU} (mediana de sobrevida grupo pAU); M_{PBS} (mediana de sobrevida grupo PBS)

INMUNOFLUORESCENCIA

Escaneo Confocal. Los animales se sacrificaron después de 4 dosis de pAU por dislocación. Los tumores fueron extirpados y fijados en 10% de buffered paraformaldehído en PBS durante 24 horas. Luego se deshidrataron con un 30% de sacarosa en PBS durante al menos 72 h. Los tumores deshidratados fueron incorporados en OCT, y almacenados a -80°C. Los tumores congelados se dividieron en secciones de 12 micras de espesor mediante criostato (Leica). Las secciones fueron bloqueadas con TBS conteniendo 3% de albúmina de suero bovino (BSA) y 0,1% de Triton X-100 (Sigma-Aldrich) 4 °C durante la noche, y después se incubaron con anticuerpo de conejo anti-ratón CD45 (Biolegend) en TBS 3% de BSA durante 2 horas. Después de 2 rondas de lavado, las secciones se incubaron con anticuerpo de cabra anti-conejo AlexaFluor 546 (Invitrogen) en TBS 3% de BSA durante 1 hora. Las láminas fueron teñidas 5 minutos a T.A. con DAPI y luego fueron montadas en en Fluorsave (Calbiochem). Las láminas se

analizaron bajo microscopio confocal de fluorescencia (Olympus FV1000). Las imágenes fueron procesadas con el software Adobe Photoshop 7.0.

OBTENCIÓN DE CÉLULAS INFILTRANTES DE TUMOR

Las células infiltrantes de tumor se obtuvieron como se describió previamente (Andreani y col., 2007).

LÍNEAS CELULARES

Las líneas celulares murinas B16-F0 (melanoma), B16ova (melanoma que secreta establemente Ovalbúmina), E.G7ova (linfoma que secreta establemente Ovalbúmina), CT26 (adenocarcinoma de colon) y 4T1 (adenocarcinoma de mama hormona independiente) fueron adquiridas en la Colección Americana de Cultivo Tipo (ATCC). La línea celular murina de cáncer de vejiga MB49 fue proporcionada gentilmente por el Dr. IC Summerhayes (Lahey Clinic, Burlington, MA). Todas líneas celulares se cultivaron en placas de cultivo de 100 mm con medio DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium High glucose*) o en flask de cultivo de 75 mm con medio RPMI 1640 (*Roswell Park Memorial Institute*), para el caso de la línea E.G7ova (Gibco, Life Technologies) suplementado con L-glutamina 2mM, 40µg/ml de gentamicina y 10% de Suero Bovino Fetal (SBF). Para el mantenimiento de la expresión constitutiva de Ovalbúmina, tanto las líneas B16ova como E.G7ova fueron cultivadas por al menos 4 días en presencia del antibiótico de selección G418 (geneticina, Invivogen). Las células se cultivaron a 37°C en atmósfera húmeda con tensión de CO₂ al 5%.

PREPARACIÓN / EMPLEO DE POLI A:U

La resuspensión, almacenamiento y utilización de “poli A:U” *polyadenylic-polyuridylic acid* (Invivogen) se hizo siguiendo estrictamente las recomendaciones del fabricante. Brevemente, para la resuspensión se añadieron (con jeringa estéril apirógena en cabina de flujo laminar) 10 ml de agua libre de endotoxina estéril (suministrados en el kit) al vial que contenía 10 mg de poli A:U liofilizado (concentración final 1mg/ml). Se procedió a agitar la solución vigorosamente mediante Vortex hasta lograr su completa solubilización (3 ciclos de 30 segundos). A continuación, para aumentar la solubilidad, se calentó la solución durante 10 minutos a 50°C, y se dejó enfriar a T.A. para asegurar la hibridación apropiada. Luego, se procedió al alicuotado en tubos de 1 ml tipo eppendorf calidad “RNAase/DNAse free” 3 veces autoclavados y se llevaron inmediatamente a freezer -20°C para su almacenamiento hasta el momento de su uso. Cada vez que se empleó poli A:U para el tratamiento *in vivo*, se procedió a descongelar adicionando al tubo PBS (Gibco) en cantidad suficiente para obtener una concentración final de 50 µg de poli A:U en 200 µl de PBS/ratón. Para la estimulación *in vitro* de células de melanoma murino B16, se incubó por 30 minutos 60 µg de PEI con o sin 8 µg de poli A:U (PEI:pAU) para favorecer la formación de complejos. Luego, 1x10⁶ células B16 se estimularon por 4 hs en estufa a 37°C con PEI o PEI:pAU en 200 µl de medio sin SFB, se lavaron 3 veces con PBS y se incubaron con medio completo por 20 hs adicionales (B16+PEI y B16+PEI:pAU respectivamente). Además, 1x10⁶ células B16 se estimularon por 24 hs

con 50 o 500 µg de poli A:U desnudo cada 200 µl de medio completo en un volumen final de 1 ml (B16+pAU 50 µg y B16+500 µg respectivamente).

PURIFICACIÓN DE LINFOCITOS T A PARTIR DE BAZO DE RATÓN OT-I U OT-II POR CELL-SORTING

Se extrajo el bazo de ratones jóvenes (8 a 10 semanas de edad) en placa con RPMI 2% SFB, en condiciones asépticas. Se obtuvo la suspensión celular por disgregación mecánica en malla metálica (100µm), se pasó a tubo nuevo estéril y se procedió a centrifugar a 2000 rpm, descartando el sobrenadante. A continuación, se agregó 4 ml de buffer de lisis (Sigma-Aldrich), incubando a T.A. de 3 a 5 minutos. Se procedió a 2 rondas de lavado con RPMI 2% SFB y centrifugado a 1500 rpm. Luego de resuspender las células en 2 ml de buffer MACS y filtrar con malla 80 µm, se contó dilución 1/200 de la suspensión celular en Turk, llevándose a una concentración de 80×10^6 cél/ml. Una vez marcados con respectivos anticuerpos anti-CD4, anti-CD8, anti-CD11c, se procedió a la recuperación de células por *cell sorting* FacsAriaII (BD Biosciences) que cumplieran los requerimientos (tamaño, granularidad, singuletes, CD4+CD8-CD11c- o CD8+CD4-CD11c-) con una pureza mayor al 90%.

WESTERN BLOT

Para el análisis de la expresión proteica de TLR3, células B16-GFP fueron recuperadas por *cell sorting* de tumores PBS y pAU en ratones wt e IFNAR1^{-/-}, luego de recibir 2 dosis de tratamiento (día 15 p.i.; n=5/grupo). A continuación, se lavaron y lisaron sobre hielo por 20 min en solución de lisis (Tris-HCl 62.5 mM (pH 6.8), SDS 2% p/v, glycerol 10%, DTT 50 mM, y Azul de bromofenol 0.01% p/v). Estas suspensiones fueron calentadas a 100°C por 5 min. Las proteínas en el lisado celular se separaron por SDS-PAGE al 10% y luego fueron transferidas a membranas de nitrocelulosa (Bio-Rad). Las membranas se bloquearon durante 2 hs a 37°C en buffer bloqueante (TBS conteniendo 5% de leche descremada más 0,1% de Tween 20) y luego se incubaron toda la noche a 4°C con anticuerpos primarios anti-TLR3 de ratón (clon 40C1285, Abcam). Las membranas se lavaron con TBS-0,1% Tween 20 y se incubaron con los anticuerpos secundarios correspondientes conjugados a la peroxidasa del rábano (cell signaling). La inmunodetección se realizó con un kit de Western Blot Chemiluminescence (Amersham Bioscience, Piscataway, NJ) de acuerdo a las especificaciones del fabricante.

Para determinar la igualdad en la carga proteica, las mismas membranas fueron utilizadas midiendo la expresión de β-actina (Cell signaling). Las membranas posteriormente, se incubaron con anticuerpo secundario anti-ratón conjugado a la enzima peroxidasa del rábano (Cell Signaling). La inmunodetección se realizó como se describió anteriormente.

MICROARREGLO DE PROTEÍNAS (PROTEIN ARRAY)

Para el estudio de la producción de citocinas/quimiocinas, se obtuvieron y purificaron mediante *cell sorting* células CD45+ CD11b+ infiltrantes de tumores PBS o pAU (pool de 5 ratones por grupo). Sin posterior estímulo o con 24hs de estimulación 0,1 µg/ml de LPS, las células se homogeneizaron en el buffer de lisis celular 1X que contiene

inhibidores de la proteasa (Promega) y se emplearon 200 μg de proteína. La expresión de 25 quimiocinas de ratón se determinó utilizando el Proteome Profiler Mouse Chemokine Array Kit (R&D Systems, Inc.) según las instrucciones del fabricante. Las imágenes digitales fueron capturados y cuantificadas usando el programa Image Studio 3.1 (LI-COR Biosciences) y la abundancia relativa de proteína se normalizó a las controles de carga internos.

CAPÍTULO VI: BIBLIOGRAFÍA

- Acharyya, S., Oskarsson, T., Vanharanta, S., Malladi, S., Seshan, V. E., Norton, L., ... Massagué, J. (2012). A CXCL1 paracrine network links cancer chemoresistance and metastasis. *Cell*, *150*(1), 165–178. doi:10.1016/j.cell.2012.04.042.A
- Agarwal, S. K., Wu, M., Livingston, C. K., Parks, D. H., Mayes, M. D., Arnett, F. C., & Tan, F. K. (2011). Toll-like receptor 3 upregulation by type I interferon in healthy and scleroderma dermal fibroblasts. *Arthritis Research & Therapy*, *13*(1), R3. doi:10.1186/ar3221
- Akazawa, T., Ebihara, T., Okuno, M., Okuda, Y., Shingai, M., Tsujimura, K., ... Seya, T. (2007). Antitumor NK activation induced by the Toll-like receptor 3-TICAM-1 (TRIF) pathway in myeloid dendritic cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *104*(1), 252–257. doi:10.1073/pnas.0605978104
- Akinc, A., Thomas, M., Klibanov, A. M., & Langer, R. (2005). Exploring polyethylenimine-mediated DNA transfection and the proton sponge hypothesis. *Journal of Gene Medicine*, *7*(September 2004), 657–663. doi:10.1002/jgm.696
- Aktas, E., Kucuksezer, U. C., Bilgic, S., Erten, G., & Deniz, G. (2009). Relationship between CD107a expression and cytotoxic activity. *Cellular Immunology*, *254*(2), 149–154. doi:10.1016/j.cellimm.2008.08.007
- Al-Jamal, K. T., Al-Jamal, W. T., Wang, J. T.-W., Rubio, N., Buddle, J., Gathercole, D., ... Kostarelos, K. (2013). Cationic Poly-L-lysine Dendrimer Complexes Doxorubicin and Delays Tumor Growth in Vitro and in Vivo. *ACS Nano*, *7*(3), 1905–1917. doi:10.1021/nn305860k
- Allison, S. J., & Milner, J. (2014). RNA Interference by Single- and Double-stranded siRNA With a DNA Extension Containing a 3' Nuclease-resistant Mini-hairpin Structure. *Molecular Therapy-Nucleic Acids*, (November 2013), 1–12. doi:10.1038/mtna.2013.68
- Amarante, M. K., & Watanabe, M. A. E. (2010). Toll-Like Receptor 3: Involvement with Exogenous and Endogenous RNA. *International Reviews of Immunology*, *29*(6), 557–573. doi:10.3109/08830185.2010.525723
- Anderson, M. S., Venanzi, E. S., Chen, Z., Berzins, S. P., Benoist, C., & Mathis, D. (2015). The Cellular Mechanism of Aire Control of T Cell Tolerance. *Immunity*, *23*(2), 227–239. doi:10.1016/j.immuni.2005.07.005
- Andre, F., Zitvogel, L., & Sabourin, J.-C. (2008, May 27). Treatment of cancer using TLR3 agonists. Google Patents.
- Andreani, V., Gatti, G., Simonella, L., Rivero, V., & Maccioni, M. (2007). Activation of Toll-like receptor 4 on tumor cells in vitro inhibits subsequent tumor growth in vivo. *Cancer Research*, *67*(21), 10519–10527. doi:10.1158/0008-5472.CAN-07-0079
- Antonelli, G., Scagnolari, C., Moschella, F., & Proietti, E. (2015). Twenty-five years of type I interferon-based treatment: A critical analysis of its therapeutic use. *Cytokine and Growth Factor Reviews*. doi:10.1016/j.cytogfr.2014.12.006
- Aranda, F., Vacchelli, E., Obrist, F., Eggermont, A., Galon, J., Sautès-Fridman, C., ... Galluzzi, L. (2014). Trial Watch: Toll-like receptor agonists in oncological indications. *Oncoimmunology*, *3*(May), e29179. doi:10.4161/onci.29179
- Arimoto, K., Takahashi, H., Hishiki, T., Konishi, H., Fujita, T., & Shimotohno, K. (2007). Negative regulation of the RIG-I signaling by the ubiquitin ligase RNF125. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *104*, 7500–7505. doi:10.1073/pnas.0611551104
- Asselin-Paturel, C., & Trinchieri, G. (2005). Production of type I interferons: plasmacytoid dendritic cells and beyond. *The Journal of Experimental Medicine*, *202*(4), 461–5. doi:10.1084/jem.20051395
- Assmann, T. S., Brondani, L. d. A., Bauer, A. C., Canani, L. H., & Crispim, D. (2014). Polymorphisms in the TLR3 gene are associated with risk for type 1 diabetes mellitus. *European Journal of Endocrinology*, *170*(4), 519–527. doi:10.1530/EJE-13-0963
- Ataera, H., Hyde, E., Price, K. M., Stoitzner, P., & Ronchese, F. (2011). Murine melanoma-infiltrating dendritic cells are defective in antigen presenting function regardless of the presence of CD4+ CD25+ regulatory t cells. *PLoS ONE*, *6*(3), e17515. doi:10.1371/journal.pone.0017515

- Atanackovic, D., Hildebrandt, Y., Templin, J., Cao, Y., Keller, C., Panse, J., ... Kröger, N. (2012). Role of interleukin 16 in multiple myeloma. *Journal of the National Cancer Institute*, *104*(13), 1005–20. doi:10.1093/jnci/djs257
- Atsumi, T., Singh, R., Sabharwal, L., Bando, H., Meng, J., Arima, Y., ... Murakami, M. (2014). Inflammation amplifier, a new paradigm in cancer biology. *Cancer Research*, *74*, 8–14. doi:10.1158/0008-5472.CAN-13-2322
- Aubin, E., Belmant, C., Gauthier, L., Morel, Y., Paturel, C., & Bregeon, D. (2009, April 22). TLR3 agonist compositions. Google Patents.
- Bacher, N., Raker, V., Hofmann, C., Graulich, E., Schwenk, M., Baumgrass, R., ... Steinbrink, K. (2013). Interferon- α suppresses cAMP to disarm human regulatory T cells. *Cancer Research*, *73*, 5647–56. doi:10.1158/0008-5472.CAN-12-3788
- Bald, T., Landsberg, J., Lopez-Ramos, D., Renn, M., Glodde, N., Jansen, P., ... Tüting, T. (2014). Immune cell-poor melanomas benefit from PD-1 blockade after targeted type I IFN activation. *Cancer Discovery*, *4*(6), 674–687.
- Basith, S., Manavalan, B., Lee, G., Kim, S. G., & Choi, S. (2011). Toll-like receptor modulators: a patent review (2006-2010). *Expert Opinion on Therapeutic Patents*, *21*(6), 927–44. doi:10.1517/13543776.2011.569494
- Basith, S., Manavalan, B., Yoo, T. H., Kim, S. G., & Choi, S. (2012). Roles of toll-like receptors in cancer: a double-edged sword for defense and offense. *Archives of Pharmacal Research*, *35*(8), 1297–1316.
- Beghdadi, W., Madjene, L. C., Benhamou, M., Charles, N., Gautier, G., Launay, P., & Blank, U. (2011). Mast cells as cellular sensors in inflammation and immunity. *Frontiers in Immunology*, *2*(SEP), 1–15. doi:10.3389/fimmu.2011.00037
- Begon, É., Michel, L., Flageul, B., Beaudoin, I., Jean-Louis, F., Bachelez, H., ... Musette, P. (2007). Expression, subcellular localization and cytokinic modulation of Toll-like receptors (TLRs) in normal human keratinocytes: TLR2 up-regulation in psoriatic skin. *European Journal of Dermatology*, *17*(6), 497–506. doi:10.1684/ejd.2007.0264
- Bergé, M., Bonnin, P., Sulpice, E., Vilar, J., Allanic, D., Silvestre, J.-S., ... Merkulova-Rainon, T. (2010). Small interfering RNAs induce target-independent inhibition of tumor growth and vasculature remodeling in a mouse model of hepatocellular carcinoma. *The American Journal of Pathology*, *177*(6), 3192–3201. doi:10.2353/ajpath.2010.100157
- Bezu, L., Gomes-de-Silva, L. C., Dewitte, H., Breckpot, K., Fucikova, J., Spisek, R., ... Kroemer, G. (2015). Combinatorial Strategies for the Induction of Immunogenic Cell Death. *Frontiers in Immunology*, *6*(April), 1–11. doi:10.3389/fimmu.2015.00187
- Bidwell, B. N., Slaney, C. Y., Withana, N. P., Forster, S., Cao, Y., Loi, S., ... Parker, B. S. (2012). Silencing of Irf7 pathways in breast cancer cells promotes bone metastasis through immune escape. *Nature Medicine*, *18*(8), 1224–1231. doi:10.1038/nm.2830
- Biswas, S. K., & Mantovani, A. (2010). Macrophage plasticity and interaction with lymphocyte subsets: cancer as a paradigm. *Nature Immunology*, *11*(10), 889–896. doi:10.1038/ni.1937
- Blasius, A. L., & Beutler, B. (2010). Intracellular toll-like receptors. *Immunity*, *32*(3), 305–15. doi:10.1016/j.immuni.2010.03.012
- Blum, J. S., Wearsch, P. a., & Cresswell, P. (2013). *Pathways of antigen processing. Annual review of immunology* (Vol. 31). doi:10.1146/annurev-immunol-032712-095910
- Boissonnas, A., Licata, F., Poupel, L., Jacquelin, S., Fetler, L., Krumeich, S., ... Combadière, C. (2013). CD8+ Tumor-Infiltrating T Cells Are Trapped in the Tumor-Dendritic Cell Network. *Neoplasia*, *15*(1), 85–IN26. doi:10.1593/neo.121572
- Bolhassani, A., Safaiyan, S., & Rafati, S. (2011). Improvement of different vaccine delivery systems for cancer therapy. *Molecular Cancer*, *10*(1), 3. doi:10.1186/1476-4598-10-3
- Bolitho, C., Hahn, M. a., Baxter, R. C., & Marsh, D. J. (2010). The chemokine CXCL1 induces proliferation in epithelial ovarian cancer cells by transactivation of the epidermal growth factor receptor. *Endocrine-Related Cancer*, *17*, 929–940. doi:10.1677/ERC-10-0107

- Boscolo, P., Di Giampaolo, L., Reale, M., Castellani, M. L., Volpe, A. R., Carmignani, M., ... Di Gioacchino, M. (2004). In vitro effects of platinum compounds on lymphocyte proliferation and cytokine release. *Annals of Clinical Laboratory Science*, *34*(2), 195–202. doi:0091-7370/04/0300-0299
- Bracci, L., Schiavoni, G., Sistigu, a., & Belardelli, F. (2014). Immune-based mechanisms of cytotoxic chemotherapy: implications for the design of novel and rationale-based combined treatments against cancer. *Cell Death and Differentiation*, *21*(1), 15–25. doi:10.1038/cdd.2013.67
- Brown, J., Wang, H., Hajishengallis, G. N., & Martin, M. (2011). TLR-signaling networks: an integration of adaptor molecules, kinases, and cross-talk. *Journal of Dental Research*, *90*, 417–427. doi:10.1177/0022034510381264
- Broz, M. L., Binnewies, M., Boldajipour, B., Nelson, A. E., Pollack, J. L., Erle, D. J., ... Krummel, M. F. (2014). Dissecting the Tumor Myeloid Compartment Reveals Rare Activating Antigen-Presenting Cells Critical for T Cell Immunity. *Cancer Cell*, 1–15. doi:10.1016/j.ccell.2014.09.007
- Broz, P., & Monack, D. M. (2013). Newly described pattern recognition receptors team up against intracellular pathogens. *Nature Reviews. Immunology*, *13*(8), 551–65. doi:10.1038/nri3479
- Brubaker, S. W., Bonham, K. S., Zanoni, I., & Kagan, J. C. (2015). Innate Immune Pattern Recognition: A Cell Biological Perspective. *Annual Review of Immunology*, *33*(1), 257–290. doi:10.1146/annurev-immunol-032414-112240
- Burnet, F. M. (1971). Immunological surveillance in neoplasia. *Transplantation Reviews*, *7*, 3–25.
- Caronni, N., Savino, B., & Bonecchi, R. (2015). Myeloid cells in cancer-related inflammation. *Immunobiology*, *220*(2), 249–253. doi:10.1016/j.imbio.2014.10.001
- Carswell, E. a., Old, L. J., Kassel, R. L., Green, S., Fiore, N., & Williamson, B. (1975). An endotoxin-induced serum factor that causes necrosis of tumors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *72*(9), 3666–3670. doi:10.1073/pnas.72.9.3666
- Castro, F. a., Försti, a., Buch, S., Kalthoff, H., Krauss, C., Bauer, M., ... Schafmayer, C. (2011). TLR-3 polymorphism is an independent prognostic marker for stage II colorectal cancer. *European Journal of Cancer*, *47*(8), 1203–1210. doi:10.1016/j.ejca.2010.12.011
- Chanmee, T., Ontong, P., Konno, K., & Itano, N. (2014). Tumor-associated macrophages as major players in the tumor microenvironment. *Cancers*, *6*(3), 1670–90. doi:10.3390/cancers6031670
- Chattopadhyay, S., & Sen, G. C. (2014). dsRNA-Activation of TLR3 and RLR Signaling: Gene Induction-Dependent and Independent Effects. *Journal of Interferon & Cytokine Research*, *34*(6), 427–436. doi:10.1089/jir.2014.0034
- Cheever, M. a., & Higano, C. S. (2011). PROVENGE (sipuleucel-T) in prostate cancer: The first FDA-approved therapeutic cancer vaccine. *Clinical Cancer Research*, *17*(11), 3520–3526. doi:10.1158/1078-0432.CCR-10-3126
- Chen, D. S., & Mellman, I. (2013). Oncology meets immunology: The cancer-immunity cycle. *Immunity*, *39*(step 3), 1–10. doi:10.1016/j.immuni.2013.07.012
- Chen, J.-Q., Szodoray, P., & Zeher, M. (2015). Toll-Like Receptor Pathways in Autoimmune Diseases. *Clinical Reviews in Allergy & Immunology*. doi:10.1007/s12016-015-8473-z
- Chew, V., & Abastado, J. (2013). Immunomodulation of the tumor microenvironment by Toll-like receptor-3 (TLR3) ligands, *3*(April), 10–12.
- Chow, M. T., & Luster, a. D. (2014). Chemokines in Cancer. *Cancer Immunology Research*, *2*, 1125–1131. doi:10.1158/2326-6066.CIR-14-0160
- Clemmons, A. W., Lindsay, S. a., & Wasserman, S. a. (2015). An Effector Peptide Family Required for Drosophila Toll-Mediated Immunity. *PLOS Pathogens*, *11*(4), e1004876. doi:10.1371/journal.ppat.1004876
- Coelho, A. L., Schaller, M. A., Benjamim, C. F., Orlofsky, A. Z., Hogaboam, C. M., Steven, L., & Kunkel, S. L. (2007). The chemokine CCL6 promotes innate immunity via immune cell activation and recruitment. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, *179*, 5474–5482. doi:179/8/5474 [pii]

- Cohnen, A., Chiang, S. C., Stojanovic, A., Schmidt, H., Claus, M., Saftig, P., ... Watzl, C. (2014). degranulation-associated damage Surface CD107a / LAMP-1 protects natural killer cells from degranulation-associated damage, *122*(8), 1411–1418. doi:10.1182/blood-2012-07-441832
- Condamine, T., Ramachandran, I., Youn, J.-I., & Gabrilovich, D. I. (2015). Regulation of Tumor Metastasis by Myeloid-Derived Suppressor Cells. *Annual Review of Medicine*, *66*(August 2014), 97–110. doi:10.1146/annurev-med-051013-052304
- Conforti, R., Ma, Y., Morel, Y., Patrel, C., Terme, M., Viaud, S., ... Zitvogel, L. (2010). Opposing effects of toll-like receptor (TLR3) signaling in tumors can be therapeutically uncoupled to optimize the anticancer efficacy of TLR3 ligands. *Cancer Research*, *70*(2), 490–500. doi:10.1158/0008-5472.CAN-09-1890
- Conrad, E., Resch, T. K., Gogesch, P., Kalinke, U., Bechmann, I., Bogdan, C., & Waibler, Z. (2014). Protection against RNA-induced liver damage by myeloid cells requires type I interferon and IL-1 receptor antagonist in mice. *Hepatology*, *59*(4), 1555–1563. doi:10.1002/hep.26915
- Coussens, L. M., Zitvogel, L., & Palucka, A. K. (2013). Neutralizing Tumor-Promoting Chronic Inflammation: A Magic Bullet? *Science*, *339*(6117), 286–291. doi:10.1126/science.1232227
- De Cesare, M., Calcaterra, C., Pratesi, G., Gatti, L., Zunino, F., Mènard, S., & Balsari, A. (2008). Eradication of ovarian tumor xenografts by locoregional administration of targeted immunotherapy. *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, *14*(17), 5512–8. doi:10.1158/1078-0432.CCR-08-0445
- de Chaisemartin, L., Goc, J., Damotte, D., Validire, P., Magdeleinat, P., Alifano, M., ... Dieu-Nosjean, M.-C. (2011). Characterization of chemokines and adhesion molecules associated with T cell presence in tertiary lymphoid structures in human lung cancer. *Cancer Research*, *71*(20), 6391–9. doi:10.1158/0008-5472.CAN-11-0952
- Diamond, M. S., Kinder, M., Matsushita, H., Mashayekhi, M., Dunn, G. P., Archambault, J. M., ... Schreiber, R. D. (2011). Type I interferon is selectively required by dendritic cells for immune rejection of tumors. *The Journal of Experimental Medicine*, *208*(10), 1989–2003. doi:10.1084/jem.20101158
- Dias, N., & Stein, C. a. (2002). Antisense Oligonucleotides : Basic Concepts and Mechanisms. *Molecular Cancer Therapeutics*, *1*(March), 347–355. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12489851>
- Drake, C. G., Lipson, E. J., & Brahmer, J. R. (2014). Breathing new life into immunotherapy: review of melanoma, lung and kidney cancer. *Nature Reviews. Clinical Oncology*, *11*, 24–37. doi:10.1038/nrclinonc.2013.208
- Dunn, G. P., Old, L. J., & Schreiber, R. D. (2004). The three Es of cancer immunoediting. *Annual Review of Immunology*, *22*(4), 329–360. doi:10.1146/annurev.immunol.22.012703.104803
- Eberlein, J., Nguyen, T. T., Victorino, F., Golden-mason, L., Rosen, H. R., & Homann, D. (2010). Technical advance Comprehensive assessment of chemokine expression profiles by flow cytometry. *The Journal of Clinical Investigation*, *120*(3). doi:10.1172/JCI40645.the
- Eck, M., Schmaußer, B., Scheller, K., Brändlein, S., & Müller-Hermelink, H. K. (2003). Pleiotropic effects of CXC chemokines in gastric carcinoma: Differences in CXCL8 and CXCL1 expression between diffuse and intestinal types of gastric carcinoma. *Clinical and Experimental Immunology*, *134*, 508–515. doi:10.1111/j.1365-2249.2003.02305.x
- Eisenring, M., vom Berg, J., Kristiansen, G., Saller, E., & Becher, B. (2010). IL-12 initiates tumor rejection via lymphoid tissue-inducer cells bearing the natural cytotoxicity receptor NKp46. *Nature Immunology*, *11*(11), 1030–1038. doi:10.1038/ni.1947
- Engelhardt, J. J., Boldajipour, B., Beemiller, P., Pandurangi, P., Sorensen, C., Werb, Z., ... Krummel, M. F. (2012). Marginating dendritic cells of the tumor microenvironment cross-present tumor antigens and stably engage tumor-specific T cells. *Cancer Cell*, *21*(3), 402–17. doi:10.1016/j.ccr.2012.01.008
- Estornes, Y., Toscano, F., Virard, F., Jacquemin, G., Pierrot, a, Vanbervliet, B., ... Lebecque, S. (2012). dsRNA induces apoptosis through an atypical death complex associating TLR3 to caspase-8. *Cell Death and Differentiation*, *19*, 1482–1494. doi:10.1038/cdd.2012.22

- Feingold, K. R. (2015). TLR3: A Receptor that Recognizes Cell Injury Is Essential for Permeability Barrier Homeostasis Following UV Irradiation. *Journal of Investigative Dermatology*, *135*(2), 339–340. doi:10.1038/jid.2014.424
- Fidler, I. J. (1973). Selection of successive tumour lines for metastasis. *Nature: New Biology*, *242*(118), 148–149.
- Fidler, I. J., Gersten, D. M., & Budmen, M. B. (1976). Characterization in vivo and in vitro of tumor cells selected for resistance to syngeneic lymphocyte-mediated cytotoxicity. *Cancer Research*, *36*(September), 3160–3165.
- Figueredo, A., Coombes, M. E., & Mukherjee, S. (2008). Adjuvant therapy for completely resected stage II colon cancer. *Cochrane Database of Systematic Reviews (Online)*, (3), CD005390. doi:10.1002/14651858.CD005390.pub2
- Fish, E. N., & Plataniias, L. C. (2014). Interferon Receptor Signaling in Malignancy: A Network of Cellular Pathways Defining Biological Outcomes. *Molecular Cancer Research*, *12*, 1691–1703. doi:10.1158/1541-7786.MCR-14-0450
- Formelli, F., Supino, R., Cleris, L., & Mariani, M. (1988). Verapamil potentiation of doxorubicin resistance development in B16 melanoma cells both in vitro and in vivo. *British Journal of Cancer*, *57*(September 1987), 343–347.
- Franciszkiwicz, K., Boissonnas, A., Boutet, M., Combadière, C., & Mami-Chouaib, F. (2012). Role of chemokines and chemokine receptors in shaping the effector phase of the antitumor immune response. *Cancer Research*, *72*(24), 6325–32. doi:10.1158/0008-5472.CAN-12-2027
- François-Newton, V., de Freitas Almeida, G. M., Payelle-Brogard, B., Monneron, D., Pichard-Garcia, L., Piehler, J., ... Uzé, G. (2011). USP18-based negative feedback control is induced by type I and type III interferons and specifically inactivates interferon α response. *PLoS ONE*, *6*(7). doi:10.1371/journal.pone.0022200
- Frick, J.-S., Grünebach, F., & Autenrieth, I. B. (2010). Immunomodulation by semi-mature dendritic cells: a novel role of Toll-like receptors and interleukin-6. *International Journal of Medical Microbiology : IJMM*, *300*(1), 19–24. doi:10.1016/j.ijmm.2009.08.010
- Fridlender, Z. G., Buchlis, G., Kapoor, V., Cheng, G., Sun, J., Singhal, S., ... Albelda, S. M. (2010). CCL2 blockade augments cancer immunotherapy. *Cancer Research*, *70*(1), 109–18. doi:10.1158/0008-5472.CAN-09-2326
- Fridman, W. H., Pagès, F., Sautès-Fridman, C., & Galon, J. (2012). The immune contexture in human tumours: impact on clinical outcome. *Nature Reviews. Cancer*, *12*(4), 298–306. doi:10.1038/nrc3245
- Fuertes, M. B., Kacha, A. K., Kline, J., Woo, S.-R., Kranz, D. M., Murphy, K. M., & Gajewski, T. F. (2011). Host type I IFN signals are required for antitumor CD8⁺ T cell responses through CD8 α ⁺ dendritic cells. *The Journal of Experimental Medicine*, *208*(10), 2005–16. doi:10.1084/jem.20101159
- Fuertes, M. B., Woo, S. R., Burnett, B., Fu, Y. X., & Gajewski, T. F. (2013). Type I interferon response and innate immune sensing of cancer. *Trends in Immunology*, *34*(2), 67–73. doi:10.1016/j.it.2012.10.004
- Furset, G., & Sioud, M. (2007). Design of bifunctional siRNAs: Combining immunostimulation and gene silencing in one single siRNA molecule. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *352*(3), 642–649. doi:10.1016/j.bbrc.2006.11.059
- Gajewski, T. F., Schreiber, H., & Fu, Y.-X. (2013). Innate and adaptive immune cells in the tumor microenvironment. *Nature Immunology*, *14*(10), 1014–22. doi:10.1038/ni.2703
- Galluzzi, L., Vacchelli, E., Eggermont, A., Fridman, W. H., Galon, J., Sautès-fridman, C., ... Kroemer, G. (2012). Trial Watch Experimental Toll-like receptor agonists for cancer therapy. (August), 699–716.
- Galon, J., Angell, H., Bedognetti, D., & Marincola, F. (2013). The Continuum of Cancer Immunosurveillance: Prognostic, Predictive, and Mechanistic Signatures. *Immunity*, *39*, 11–26. doi:10.1016/j.immuni.2013.07.008
- Galon, J., Costes, A., Sanchez-Cabo, F., Kirilovsky, A., Mlecnik, B., Lagorce-Pagès, C., ... Pagès, F.

- (2006). Type, Density, and Location of Immune Cells Within Human Colorectal Tumors Predict Clinical Outcome. *Science*, *313* (5795), 1960–1964. doi:10.1126/science.1129139
- Gambara, G., Desideri, M., Stoppacciaro, A., Padula, F., De Cesaris, P., Starace, D., ... Riccioli, A. (2015). TLR3 engagement induces IRF-3-dependent apoptosis in androgen-sensitive prostate cancer cells and inhibits tumour growth in vivo. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, *19*(2), 327–339. doi:10.1111/jcmm.12379
- Garcia-Cattaneo, A., Gobert, F.-X., Müller, M., Toscano, F., Flores, M., Lescure, A., ... Benaroch, P. (2012). Cleavage of Toll-like receptor 3 by cathepsins B and H is essential for signaling. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *109*(23), 9053–8. doi:10.1073/pnas.1115091109
- Gatti, G., Nuñez, N. G., Nocera, D. A., Dejager, L., Libert, C., Giraudo, C., & Maccioni, M. (2013). Direct effect of dsRNA mimetics on cancer cells induces endogenous IFN- β production capable of improving dendritic cell function. *European Journal of Immunology*, *43*(7), 1849–61. doi:10.1002/eji.201242902
- Gautier, G., Humbert, M., Deauvieu, F., Scuiller, M., Hiscott, J., Bates, E. E. M., ... Garrone, P. (2005). A type I interferon autocrine-paracrine loop is involved in Toll-like receptor-induced interleukin-12p70 secretion by dendritic cells. *The Journal of Experimental Medicine*, *201*(9), 1435–46. doi:10.1084/jem.20041964
- Gauzzi, M. C., Del Cornò, M., & Gessani, S. (2010). Dissecting TLR3 signalling in dendritic cells. *Immunobiology*, *215*(9-10), 713–23. doi:10.1016/j.imbio.2010.05.008
- Gay, N. J., Symmons, M. F., Gangloff, M., & Bryant, C. E. (2014). Assembly and localization of Toll-like receptor signalling complexes. *Nature Reviews Immunology*, *14*(8), 546–558. doi:10.1038/nri3713
- Goc, J., Germain, C., Vo-Bourgais, T. K. D., Lupo, A., Klein, C., Knockaert, S., ... Dieu-Nosjean, M. C. (2014). Dendritic cells in tumor-associated tertiary lymphoid structures signal a th1 cytotoxic immune contexture and license the positive prognostic value of infiltrating CD8+ t cells. *Cancer Research*, *74*(18), 705–715. doi:10.1158/0008-5472.CAN-13-1342
- Goldszmid, R. S., Dzutsev, A., & Trinchieri, G. (2014). Host immune response to infection and cancer: Unexpected commonalities. *Cell Host and Microbe*, *15*(3), 295–305. doi:10.1016/j.chom.2014.02.003
- Gomes-Da-Silva, L. C., Simões, S., & Moreira, J. N. (2014). Challenging the future of siRNA therapeutics against cancer: The crucial role of nanotechnology. *Cellular and Molecular Life Sciences*, *71*(8), 1417–1438. doi:10.1007/s00018-013-1502-2
- González-Navajas, J. M., Lee, J., David, M., & Raz, E. (2012). Immunomodulatory functions of type I interferons. *Nature Reviews Immunology*, *12*(2), 125–135. doi:10.1038/nri3133
- Gosu, V., Basith, S., Kwon, O.-P., & Choi, S. (2012). Therapeutic applications of nucleic acids and their analogues in Toll-like receptor signaling. *Molecules (Basel, Switzerland)*, *17*, 13503–29. doi:10.3390/molecules171113503
- Grivennikov, S. I., Greten, F. R., & Karin, M. (2010, March 19). Immunity, Inflammation, and Cancer. *Cell*. Elsevier Inc. doi:10.1016/j.cell.2010.01.025
- Grote, K., Schütt, H., & Schieffer, B. (2013). Chapter 9 Toll-Like Receptor-Linked Signal Transduction in Angiogenesis. In D. S. Kehler, N. S. Dhalla, & T. a Duhamel (Eds.), *Biochemical Basis and Therapeutic Implications of Angiogenesis* (pp. 181–206). doi:10.1007/978-1-4614-5857-9
- Haabeth, O. A. W., Lorvik, K. B., Hammarström, C., Donaldson, I. M., Haraldsen, G., Bogen, B., & Corthay, A. (2011). Inflammation driven by tumour-specific Th1 cells protects against B-cell cancer. *Nature Communications*, *2*, 240. doi:10.1038/ncomms1239
- Häcker, H., Mischak, H., Miethke, T., Liptay, S., Schmid, R., Sparwasser, T., ... Wagner, H. (1998). CpG-DNA-specific activation of antigen-presenting cells requires stress kinase activity and is preceded by non-specific endocytosis and endosomal maturation. *EMBO Journal*, *17*(21), 6230–6240. doi:10.1093/emboj/17.21.6230
- Hagerling, C., Casbon, A., & Werb, Z. (2014). Balancing the innate immune system in tumor development. *Trends in Cell Biology*, 1–7. doi:10.1016/j.tcb.2014.11.001

- Hailemichael, Y., & Overwijk, W. W. (2014). Cancer vaccines: Trafficking of tumor-specific T cells to tumor after therapeutic vaccination. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, *53*, 46–50. doi:10.1016/j.biocel.2014.04.019
- Håkansson, a, Gustafsson, B., Krysanter, L., Hjelmqvist, B., Rettrup, B., & Håkansson, L. (2001). Biochemotherapy of metastatic malignant melanoma. Predictive value of tumour-infiltrating lymphocytes. *British Journal of Cancer*, *85*, 1871–1877. doi:10.1054/bjoc.2001.2169
- Halford, W. P., Balliet, J. W., & Gebhardt, B. M. (2004). Re-Evaluating Natural Resistance to Herpes Simplex Virus Type 1. *Journal of Virology*, *78*(18), 10086–10095. doi:10.1128/JVI.78.18.10086
- Halvorsen, E. C., Mahmoud, S. M., & Bennewith, K. L. (2014). Emerging roles of regulatory T cells in tumour progression and metastasis. *Cancer and Metastasis Reviews*, *33*, 1025–1041. doi:10.1007/s10555-014-9529-x
- Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*, *144*(5), 646–74. doi:10.1016/j.cell.2011.02.013
- Hänninen, A., Maksimow, M., Alam, C., Morgan, D. J., & Jalkanen, S. (2011). Ly6C supports preferential homing of central memory CD8+ T cells into lymph nodes. *European Journal of Immunology*, *41*, 634–644. doi:10.1002/eji.201040760
- Harlin, H., Meng, Y., Peterson, A. C., Zha, Y., Tretiakova, M., Slingluff, C., ... Gajewski, T. F. (2009). Chemokine expression in melanoma metastases associated with CD8+ T-cell recruitment. *Cancer Research*, *69*(7), 3077–85. doi:10.1158/0008-5472.CAN-08-2281
- Hashimoto, C., Hudson, K. L., & Anderson, K. V. (1988). The Toll gene of drosophila, required for dorsal-ventral embryonic polarity, appears to encode a transmembrane protein. *Cell*, *52*(2), 269–279. doi:http://dx.doi.org/10.1016/0092-8674(88)90516-8
- Hashimoto, H., Ueda, R., Narumi, K., Heike, Y., Yoshida, T., & Aoki, K. (2014). Type I IFN gene delivery suppresses regulatory T cells within tumors. *Cancer Gene Therapy*, *21*(August), 532–541. doi:10.1038/cgt.2014.60
- He, S., Mao, X., Sun, H., Shirakawa, T., Zhang, H., & Wang, X. (2015). Potential therapeutic targets in the process of nucleic acid recognition: opportunities and challenges. *Trends in Pharmacological Sciences*, *36*(1), 51–64. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.tips.2014.10.013
- Hertzog, P. J., & Williams, B. R. G. (2013). Fine tuning type I interferon responses. *Cytokine and Growth Factor Reviews*, *24*(3), 217–225. doi:10.1016/j.cytogfr.2013.04.002
- Hervas-Stubbs, S., Perez-Gracia, J. L., Rouzaut, A., Sanmamed, M. F., Le Bon, A., & Melero, I. (2011). Direct effects of type I interferons on cells of the immune system. *Clinical Cancer Research*, *17*(9), 2619–2627. doi:10.1158/1078-0432.CCR-10-1114
- Hidmark, A., von Saint Paul, A., & Dalpke, A. H. (2012). Cutting edge: TLR13 is a receptor for bacterial RNA. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, *189*(6), 2717–21. doi:10.4049/jimmunol.1200898
- Hindley, J. P., Ferreira, C., Jones, E., Lauder, S. N., Ladell, K., Wynn, K. K., ... Gallimore, A. (2011). Analysis of the T-cell receptor repertoires of tumor-infiltrating conventional and regulatory T cells reveals no evidence for conversion in carcinogen-induced tumors. *Cancer Research*, *71*(3), 736–746. doi:10.1158/0008-5472.CAN-10-1797
- Honda, K., & Taniguchi, T. (2006). IRFs: master regulators of signalling by Toll-like receptors and cytosolic pattern-recognition receptors. *Nature Reviews. Immunology*, *6*(September), 644–658. doi:10.1038/nri1900
- Hori, S. (2010). Developmental plasticity of Foxp3+ regulatory T cells. *Current Opinion in Immunology*, *22*(5), 575–82. doi:10.1016/j.coi.2010.08.004
- Hu, Z., Blackman, M. a., Kaye, K. M., & Usherwood, E. J. (2015). Functional Heterogeneity in the CD4+ T Cell Response to Murine -Herpesvirus 68. *The Journal of Immunology*. doi:10.4049/jimmunol.1401928
- Hussein, W. M., Liu, T.-Y., Skwarczynski, M., & Toth, I. (2014). Toll-like receptor agonists: a patent review (2011 - 2013). *Expert Opinion on Therapeutic Patents*, *24*(4), 453–70.

doi:10.1517/13543776.2014.880691

- Ivashkiv, L. B., & Donlin, L. T. (2014). Regulation of type I interferon responses. *Nature Reviews Immunology*, *14*(1), 36–49. doi:10.1038/nri3581
- Iversen, P. O., Semaeva, E., Sorensen, D. R., Wiig, H., & Sioud, M. (2009). Dendritic Cells Loaded with Tumor Antigens and a Dual Immunostimulatory and Anti-Interleukin 10-Specific Small Interference RNA Prime T Lymphocytes against Leukemic Cells. *Translational Oncology*, *2*(4), 242–246. doi:10.1593/tlo.09154
- Jaakkola, I., Merinen, M., Jalkanen, S., & Hänninen, A. (2003). Ly6C induces clustering of LFA-1 (CD11a/CD18) and is involved in subtype-specific adhesion of CD8 T cells. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, *170*(3), 1283–1290. doi:10.4049/jimmunol.170.3.1283
- Jablonska, J., Leschner, S., Westphal, K., Lienenklaus, S., & Weiss, S. (2010). Neutrophils responsive to endogenous IFN- β regulate tumor angiogenesis and growth in a mouse tumor model. *Journal of Clinical Investigation*, *120*(4), 1151–1164. doi:10.1172/JCI37223
- Jablonska, J., Wu, C. F., Andzinski, L., Leschner, S., & Weiss, S. (2014). CXCR2-mediated tumor-associated neutrophil recruitment is regulated by IFN- β . *International Journal of Cancer*, *134*, 1346–1358. doi:10.1002/ijc.28551
- Jelinek, I., Leonard, J. N., Price, G. E., Brown, K. N., Meyer-Manlapat, A., Goldsmith, P. K., ... Segal, D. M. (2011). TLR3-specific double-stranded RNA oligonucleotide adjuvants induce dendritic cell cross-presentation, CTL responses, and antiviral protection. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, *186*, 2422–2429. doi:10.4049/jimmunol.1002845
- Jenabian, M.-A., Seddiki, N., Yatim, A., Carriere, M., Hulin, A., Younas, M., ... Levy, Y. (2013). Regulatory T cells negatively affect IL-2 production of effector T cells through CD39/adenosine pathway in HIV infection. *PLoS Pathogens*, *9*(4), e1003319. doi:10.1371/journal.ppat.1003319
- Jensen, S., & Thomsen, a. R. (2012). Sensing of RNA Viruses: a Review of Innate Immune Receptors Involved in Recognizing RNA Virus Invasion. *Journal of Virology*, *86*, 2900–2910. doi:10.1128/JVI.05738-11
- Jeught, K. Van Der, Bialkowski, L., Daszkiewicz, L., & Broos, K. (2014). Targeting the tumor microenvironment to enhance antitumor immune responses. *Oncotarget*.
- Jeung, H.-C., Moon, Y. W., Rha, S. Y., Yoo, N. C., Roh, J. K., Noh, S. H., ... Chung, H. C. (2008). Phase III trial of adjuvant 5-fluorouracil and adriamycin versus 5-fluorouracil, adriamycin, and polyadenylic-polyuridylic acid (poly A:U) for locally advanced gastric cancer after curative surgery: final results of 15-year follow-up. *Annals of Oncology : Official Journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO*, *19*(3), 520–6. doi:10.1093/annonc/mdm536
- Joffre, O. P., Segura, E., Savina, A., & Amigorena, S. (2012). Cross-presentation by dendritic cells. *Nature Reviews Immunology*, *12*(8), 557–569. doi:10.1038/nri3254
- Jones, S. W., Roberts, R. a., Robbins, G. R., Perry, J. L., Kai, M. P., Chen, K., ... Bear, J. E. (2013). Nanoparticle clearance is governed by Th1/Th2 immunity and strain background. *Journal of Clinical Investigation*, *123*(7), 3061–3073. doi:10.1172/JCI66895
- Juliano, R., Bauman, J., Kang, H., & Ming, X. (2009). Biological Barriers to Therapy with Antisense and siRNA Oligonucleotides. *Molecular Pharmaceutics*, *6*(3), 686–695. doi:10.1021/mp900093r.Biological
- Kaiser, A. D., Gadiot, J., Guislain, A., & Blank, C. U. (2013). Mimicking homeostatic proliferation in vitro generates T cells with high anti-tumor function in non-lymphopenic hosts. *Cancer Immunology, Immunotherapy*, *62*, 503–515. doi:10.1007/s00262-012-1350-1
- Kaisho, T. (2012). Pathogen sensors and chemokine receptors in dendritic cell subsets. *Vaccine*, *30*(52), 7652–7657. doi:10.1016/j.vaccine.2012.10.043
- Kalam, K., & Marwick, T. H. (2013). Role of cardioprotective therapy for prevention of cardiotoxicity with chemotherapy: A systematic review and meta-analysis. *European Journal of Cancer*, *49*, 2900–2909. doi:10.1016/j.ejca.2013.04.030
- Kallfass, C., Lienenklaus, S., Weiss, S., & Staeheli, P. (2013). Visualizing the beta interferon response in

- mice during infection with influenza A viruses expressing or lacking nonstructural protein 1. *Journal of Virology*, 87(12), 6925–30. doi:10.1128/JVI.00283-13
- Kalos, M., & June, C. (2013). Adoptive T Cell Transfer for Cancer Immunotherapy in the Era of Synthetic Biology. *Immunity*, 39(1), 49–60. doi:10.1016/j.immuni.2013.07.002
- Kar, U. K., Srivastava, M. K., Andersson, Å., Baratelli, F., Huang, M., Kickhoefer, V. a., ... Sharma, S. (2011). Novel ccl21-vault nanocapsule intratumoral delivery inhibits lung cancer growth. *PLoS ONE*, 6(5), e18758. doi:10.1371/journal.pone.0018758
- Kawai, T., & Akira, S. (2010). The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors. *Nature Immunology*, 11(5), 373–84. doi:10.1038/ni.1863
- Kawai, T., & Akira, S. (2011). Regulation of innate immune signalling pathways by the tripartite motif (TRIM) family proteins. *EMBO Molecular Medicine*, 3(9), 513–527. doi:10.1002/emmm.201100160
- Kawasaki, T., & Kawai, T. (2014). Toll-Like Receptor Signaling Pathways. *Frontiers in Immunology*, 5(September), 1–8. doi:10.3389/fimmu.2014.00461
- Khairuddin, N., Gantier, M. P., Blake, S. J., Wu, S. Y., Behlke, M. A., Williams, B. R., & McMillan, N. A. (2012). siRNA-induced immunostimulation through TLR7 promotes antitumoral activity against HPV-driven tumors in vivo. *Immunology and Cell Biology*, 90(2), 187–196. doi:10.1038/icb.2011.19
- Kidd, L. R., Rogers, E. N., Yeyeodu, S. T., Dominique Jones, D., & Kimbro, K. S. (2013). Contribution of toll-like receptor signaling pathways to breast tumorigenesis and treatment. *Breast Cancer: Targets and Therapy*, 5, 43. doi:10.2147/BCTT.S29172
- Kim, J., Huh, J., Hwang, M., Kwon, E.-H., Jung, D.-J., Brinkmann, M. M., ... Kim, Y.-M. (2013). Acidic amino acid residues in the juxtamembrane region of the nucleotide-sensing TLRs are important for UNC93B1 binding and signaling. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 190, 5287–95. doi:10.4049/jimmunol.1202767
- Kitamura, T., Qian, B.-Z., & Pollard, J. W. (2015). Immune cell promotion of metastasis. *Nature Reviews Immunology*, 15(2), 73–86. doi:10.1038/nri3789
- Koebel, C. M., Vermi, W., Swann, J. B., Zerafa, N., Rodig, S. J., Old, L. J., ... Schreiber, R. D. (2007). Adaptive immunity maintains occult cancer in an equilibrium state. *Nature*, 450(7171), 903–907. Retrieved from <http://dx.doi.org/10.1038/nature06309>
- Kolumam, G. a, Thomas, S., Thompson, L. J., Sprent, J., & Murali-Krishna, K. (2005). Type I interferons act directly on CD8 T cells to allow clonal expansion and memory formation in response to viral infection. *The Journal of Experimental Medicine*, 202(5), 637–650. doi:10.1084/jem.20050821
- Krasnov, M. M., Kasparov, A. A., Vorob'eva, O. K., Ul'ianova, T. I., Gorbovitskaia, G. E., Malozhen, S. A., ... Koval'chuk, K. V. (1996). Poludan therapy of eye viral diseases. *Vestnik Oftalmologii*, 113(5), 35–39.
- Kroemer, G., Galluzzi, L., Kepp, O., & Zitvogel, L. (2013). Immunogenic cell death in cancer therapy. *Annual Review of Immunology*, 31, 51–72. doi:10.1146/annurev-immunol-032712-100008
- Kropp, K. a., Angulo, A., & Ghazal, P. (2014). Viral Enhancer Mimicry of Host Innate-Immune Promoters. *PLoS Pathogens*, 10(2), e1003804. doi:10.1371/journal.ppat.1003804
- Krysko, D. V., Garg, A. D., Kaczmarek, A., Krysko, O., Agostinis, P., & Vandenabeele, P. (2012). Immunogenic cell death and DAMPs in cancer therapy. *Nature Reviews. Cancer*, 12(12), 860–75. doi:10.1038/nrc3380
- Krzewski, K., Gil-Krzewska, A., Nguyen, V., Peruzzi, G., & Coligan, J. E. (2013). LAMP1/CD107a is required for efficient perforin delivery to lytic granules and NK-cell cytotoxicity. *Blood*, 121(23), 4672–4683. doi:10.1182/blood-2012-08-453738
- Kurtulus, S., Sakuishi, K., Zhang, H., Joller, N., Tan, D., Smyth, M., ... Anderson, A. (2014). Mechanisms of TIGIT-driven immune suppression in cancer. *Journal for ImmunoTherapy of Cancer*, 2(Suppl 3), O13. doi:10.1186/2051-1426-2-S3-O13
- Kuznik, A., Bencina, M., Svajger, U., Jeras, M., Rozman, B., & Jerala, R. (2011). Mechanism of Endosomal TLR Inhibition by Antimalarial Drugs and Imidazoquinolines. *The Journal of Immunology*, 186(8),

- 4794–4804. doi:10.4049/jimmunol.1000702
- Lacour, J., Lacour, F., Spira, a, Michelson, M., Petit, J. Y., Delage, G., ... Viguier, J. (1984). Adjuvant treatment with polyadenylic-polyuridylic acid in operable breast cancer: updated results of a randomised trial. *British Medical Journal (Clinical Research Ed.)*, 288(February), 589–592.
- Lança, T., Costa, M. F., Gonçalves-Sousa, N., Rei, M., Grosso, A. R., Penido, C., & Silva-Santos, B. (2013). Protective role of the inflammatory CCR2/CCL2 chemokine pathway through recruitment of type 1 cytotoxic $\gamma\delta$ T lymphocytes to tumor beds. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 190(12), 6673–80. doi:10.4049/jimmunol.1300434
- Langowski, J. L., Kastelein, R. A., & Oft, M. (2007). Swords into plowshares: IL-23 repurposes tumor immune surveillance. *Trends in Immunology*, 28(5), 207–212. doi:10.1016/j.it.2007.03.006
- Langowski, J. L., Zhang, X., Wu, L., Mattson, J. D., Chen, T., Smith, K., ... Oft, M. (2006). IL-23 promotes tumour incidence and growth. *Nature*, 442(July), 461–465. doi:10.1038/nature04808
- Laplanche, A., Alzieu, L., Delozier, T., Berlie, J., Veyret, C., Fargeot, P., ... Lacour, J. (2000). Polyadenylic – polyuridylic acid plus locoregional radiotherapy versus chemotherapy with CMF in operable breast cancer : a 14 year follow-up analysis of a randomized trial of the F´eration Nationale des Centres de Lutte Contre le Cancer (FNCLCC), 87(Table 1), 189–191.
- Lazear, H. M., Lancaster, A., Wilkins, C., Suthar, M. S., Huang, A., Vick, S. C., ... Diamond, M. S. (2013). IRF-3, IRF-5, and IRF-7 Coordinately Regulate the Type I IFN Response in Myeloid Dendritic Cells Downstream of MAVS Signaling. *PLoS Pathogens*, 9(1). doi:10.1371/journal.ppat.1003118
- Lee, S., & Margolin, K. (2011). Cytokines in cancer immunotherapy. *Cancers*, 3, 3856–3893. doi:10.3390/cancers3043856
- Leemans, J. C., Kors, L., Anders, H.-J., & Florquin, S. (2014). Pattern recognition receptors and the inflammasome in kidney disease. *Nat Rev Nephrol*, 10(7), 398–414. Retrieved from <http://dx.doi.org/10.1038/nrneph.2014.91>
- Lemaitre, B., Nicolas, E., Michaut, L., Reichhart, J.-M., & Hoffmann, J. A. (1996). The Dorsventral Regulatory Gene Cassette *spätzle/Toll/cactus* Controls the Potent Antifungal Response in *Drosophila* Adults. *Cell*, 86(6), 973–983. doi:[http://dx.doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)80172-5](http://dx.doi.org/10.1016/S0092-8674(00)80172-5)
- Lemos, H., Huang, L., McGaha, T. L., & Mellor, A. L. (2014). Cytosolic DNA sensing via the stimulator of interferon genes adaptor: Yin and Yang of immune responses to DNA. *European Journal of Immunology*, 44(10), 2847–53. doi:10.1002/eji.201344407
- Lewis, S. H., & Obbard, D. J. (2014). Recent insights into the evolution of innate viral sensing in animals. *Current Opinion in Microbiology*, 20(0), 170–175. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.mib.2014.05.010>
- Lienenklaus, S., Cornitescu, M., Zietara, N., Łyszkiewicz, M., Gekara, N., Jabłńska, J., ... Weiss, S. (2009). Novel reporter mouse reveals constitutive and inflammatory expression of IFN-beta in vivo. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 183(5), 3229–36. doi:10.4049/jimmunol.0804277
- Lim, H. K., Seppanen, M., Hautala, T., Ciancanelli, M. J., Itan, Y., Lafaille, F. G., ... Zhang, S.-Y. (2014). TLR3 deficiency in herpes simplex encephalitis: High allelic heterogeneity and recurrence risk. *Neurology*, 83(21), 1888–1897. doi:10.1212/WNL.0000000000000999
- Lim, J. Y. H., Gerber, S. a, Murphy, S. P., & Lord, E. M. (2014). Type I interferons induced by radiation therapy mediate recruitment and effector function of CD8(+) T cells. *Cancer Immunology, Immunotherapy : CII*, 63, 259–71. doi:10.1007/s00262-013-1506-7
- Liu, L., Botos, I., Wang, Y., Leonard, J. N., Shiloach, J., David, M., & Davies, D. R. (2008). Structural basis of Toll-Like Receptor 3 Signaling with double- stranded RNA, 320(5874), 379–381. doi:10.1126/science.1155406.Structural
- Liu, Y., Carlsson, R., Comabella, M., Wang, J., Kosicki, M., Carrion, B., ... Issazadeh-Navikas, S. (2014). FoxA1 directs the lineage and immunosuppressive properties of a novel regulatory T cell population in EAE and MS. *Nature Medicine*, 20(3), 272–82. doi:10.1038/nm.3485
- Loke, S. L., Stein, C. a, Zhang, X. H., Mori, K., Nakanishi, M., Subasinghe, C., ... Neckers, L. M. (1989). Characterization of oligonucleotide transport into living cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 86(May), 3474–3478. doi:10.1073/pnas.86.10.3474

- Longman, R. S., Braun, D., Pellegrini, S., Rice, C. M., Darnell, R. B., & Albert, M. L. (2007). Dendritic-cell maturation alters intracellular signaling networks, enabling differential effects of IFN-alpha/beta on antigen cross-presentation. *Blood*, *109*(3), 1113–1122. doi:10.1182/blood-2006-05-023465.
- Lorenzi, S., Mattei, F., Sistigu, A., Bracci, L., Spadaro, F., Sanchez, M., ... Schiavoni, G. (2011). Type I IFNs control antigen retention and survival of CD8 α (+) dendritic cells after uptake of tumor apoptotic cells leading to cross-priming. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, *186*(9), 5142–50. doi:10.4049/jimmunol.1004163
- Lu, S., Pardini, B., Cheng, B., Naccarati, A., Huhn, S., Vymetalkova, V., ... Försti, A. (2014). Single Nucleotide Polymorphisms within Interferon Signaling Pathway Genes Are Associated with Colorectal Cancer Susceptibility and Survival. *PLoS ONE*, *9*(10), e111061. doi:10.1371/journal.pone.0111061
- Ma, Y., Adjemian, S., Mattarollo, S. R., Yamazaki, T., Aymeric, L., Yang, H., ... Kroemer, G. (2013). Anticancer chemotherapy-induced intratumoral recruitment and differentiation of antigen-presenting cells. *Immunity*, *38*(4), 729–741. doi:10.1016/j.immuni.2013.03.003
- Magrath, J., Connaughton, S. E., Warriar, R. R., Carvajal, D. M., Wu, C. Y., Ferrante, J., ... Gately, M. K. (1996). IL-12-deficient mice are defective in IFN gamma production and type 1 cytokine responses. *Immunity*, *4*(5), 471–481.
- Mahindra, A., & Anderson, K. C. (2012). Role of interleukin 16 in multiple myeloma pathogenesis: a potential novel therapeutic target? *Journal of the National Cancer Institute*, *104*(13), 964–5. doi:10.1093/jnci/djs274
- Mahvi, D. M., Henry, M. B., Albertini, M. R., Weber, S., Meredith, K., Schalch, H., ... Sondel, P. (2007). *Intratumoral injection of IL-12 plasmid DNA--results of a phase I/IB clinical trial. Cancer gene therapy* (Vol. 14). doi:10.1038/sj.cgt.7701064
- Manh, T.-P. V., Alexandre, Y., Baranek, T., Crozat, K., & Dalod, M. (2013). Plasmacytoid, conventional, and monocyte-derived dendritic cells undergo a profound and convergent genetic reprogramming during their maturation. *European Journal of Immunology*, *43*(7), 1706–15. doi:10.1002/eji.201243106
- Manoury, B. (2013). Proteases: essential actors in processing antigens and intracellular toll-like receptors. *Frontiers in Immunology*, *4*(September), 299. doi:10.3389/fimmu.2013.00299
- Mantovani, A. (2014). Macrophages , Neutrophils , and Cancer : A Double Edged Sword, 2014.
- Marabelle, A., Kohrt, H., Caux, C., & Levy, R. (2014). Intratumoral immunization: A new paradigm for cancer therapy. *Clinical Cancer Research*, *20*, 1747–1756. doi:10.1158/1078-0432.CCR-13-2116
- Matsumoto, M., Azuma, M., & Seya, T. (2015). Inflammation and Immunity in Cancer, 229–241. doi:10.1007/978-4-431-55327-4
- Matsumoto, M., Tatematsu, M., Nishikawa, F., Azuma, M., Ishii, N., Morii-Sakai, A., ... Seya, T. (2015). Defined TLR3-specific adjuvant that induces NK and CTL activation without significant cytokine production in vivo. *Nature Communications*, *6*, 6280. doi:10.1038/ncomms7280
- Mcnab, F., Mayer-barber, K., Sher, A., Wack, A., & Garra, A. O. (2015). Type I interferons in infectious disease. *Nature Publishing Group*, *15*(2), 87–103. doi:10.1038/nri3787
- Medzhitov, R. (2001). Toll-like receptors and innate immunity. *Nature Reviews. Immunology*, *1*(November), 135–145. doi:10.1038/35100529
- Medzhitov, R., Preston-Hurlburt, P., & Janeway, C. A. (1997). A human homologue of the Drosophila Toll protein signals activation of adaptive immunity. *Nature*, *388*(6640), 394–397.
- Melero, I., Rouzaut, A., Motz, G. T., & Coukos, G. (2014). T-cell and NK-cell infiltration into solid tumors: A key limiting factor for efficacious cancer immunotherapy. *Cancer Discovery*, *4*, 522–526. doi:10.1158/2159-8290.CD-13-0985
- Milke, L., Schulz, K., Weigert, A., Sha, W., Schmid, T., & Brüne, B. (2013). Depletion of tristetraprolin in breast cancer cells increases interleukin-16 expression and promotes tumor infiltration with monocytes/macrophages. *Carcinogenesis*, *34*(4), 850–7. doi:10.1093/carcin/bgs387

- Mills, C. D., Kincaid, K., Alt, J. M., Heilman, M. J., & Hill, A. M. (2000). M-1/M-2 Macrophages and the Th1/Th2 Paradigm 1. *The Journal of Immunology*.
- Mittal, D., Gubin, M. M., Schreiber, R. D., & Smyth, M. J. (2014). New insights into cancer immunoediting and its three component phases-elimination, equilibrium and escape. *Current Opinion in Immunology*, 27, 16–25. doi:10.1016/j.coi.2014.01.004
- Miyao, T., Floess, S., Setoguchi, R., Luche, H., Fehling, H. J., Waldmann, H., ... Hori, S. (2012). Plasticity of Foxp3 + T Cells Reflects Promiscuous Foxp3 Expression in Conventional T Cells but Not Reprogramming of Regulatory T Cells. *Immunity*, 36, 262–275. doi:10.1016/j.immuni.2011.12.012
- Moon, E. K., Carpenito, C., Sun, J., Wang, L. C. S., Kapoor, V., Predina, J., ... Albelda, S. M. (2011). Expression of a functional CCR2 receptor enhances tumor localization and tumor eradication by retargeted human T cells expressing a mesothelin-specific chimeric antibody receptor. *Clinical Cancer Research*, 17, 4719–4730. doi:10.1158/1078-0432.CCR-11-0351
- Morikawa, H., Ohkura, N., Vandenbon, A., Itoh, M., Nagao-Sato, S., Kawaji, H., ... Sakaguchi, S. (2014). Differential roles of epigenetic changes and Foxp3 expression in regulatory T cell-specific transcriptional regulation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 111(14), 5289–94. doi:10.1073/pnas.1312717110
- Mougiakakos, D., Choudhury, A., Lladser, A., Kiessling, R., & Johansson, C. C. (2010). Regulatory T cells in cancer. *Advances in Cancer Research*, 107(10), 57–117. doi:10.1016/S0065-230X(10)07003-X
- Murray, P. J., Allen, J. E., Biswas, S. K., Fisher, E. A., Gilroy, D. W., Goerdt, S., ... Wynn, T. A. (2014). Macrophage activation and polarization: nomenclature and experimental guidelines. *Immunity*, 41(1), 14–20. doi:10.1016/j.immuni.2014.06.008
- Nakasone, E. S., Askautrud, H. a., Kees, T., Park, J. J. H., Plaks, V., Ewald, A. J., ... Egeblad, M. (2012). Imaging Tumor-Stroma Interactions during Chemotherapy Reveals Contributions of the Microenvironment to Resistance. *Cancer Cell*, 21(4), 488–503. doi:10.1016/j.ccr.2012.02.017
- Nardi, V., Naveiras, O., Azam, M., & Daley, G. Q. (2009). ICSBP-mediated immune protection against BCR-ABL-induced leukemia requires the CCL6 and CCL9 chemokines. *Blood*, 113(16), 3813–3820. doi:10.1182/blood-2008-07-167189
- Nehls, M., Pfeifer, D., Schorpp, M., Hedrich, H., & Boehm, T. (1994). New member of the winged-helix protein family disrupted in mouse and rat nude mutations. *Nature*, 372(6501), 103–107. Retrieved from <http://dx.doi.org/10.1038/372103a0>
- Nelissen, S., Lemmens, E., Geurts, N., Kramer, P., Maurer, M., Hendriks, J., & Hendrix, S. (2013). The role of mast cells in neuroinflammation. *Acta Neuropathologica*, 125(5), 637–650. doi:10.1007/s00401-013-1092-y
- Netea, M. G., Wijmenga, C., & O'Neill, L. a J. (2012). Genetic variation in Toll-like receptors and disease susceptibility. *Nature Immunology*, 13(6), 535–42. doi:10.1038/ni.2284
- Nicodemus, C. F., & Berek, J. S. (2010). TLR3 agonists as immunotherapeutic agents. *Immunotherapy*. doi:10.2217/imt.10.8
- Nishikawa, H., & Sakaguchi, S. (2010). Regulatory T cells in tumor immunity. *International Journal of Cancer. Journal International Du Cancer*, 127(4), 759–67. doi:10.1002/ijc.25429
- Núñez, N. G., Andreani, V., Crespo, M. I., Nocera, D. A., Breser, M. L., Morón, G., ... Maccioni, M. (2012). IFN β produced by TLR4-activated tumor cells is involved in improving the antitumoral immune response. *Cancer Research*, 72(3), 592–603. doi:10.1158/0008-5472.CAN-11-0534
- Oida, T., & Weiner, H. L. (2010). TGF- β induces surface LAP expression on murine CD4 T cells independent of Foxp3 induction. *PLoS ONE*, 5(11), 5–12. doi:10.1371/journal.pone.0015523
- Okano, M., Nishizaki, K., Abe, M., Wang, M. M., Yoshino, T., Satoskar, a R., ... Harn, D. a. (1999). Strain-dependent induction of allergic rhinitis without adjuvant in mice. *Allergy*, 54, 593–601. doi:10.1034/j.1398-9995.1999.00063.x
- Oliveira, L. S., De Queiroz, N. M. G. P., Veloso, L. V. S., Moreira, T. G., Oliveira, F. S., Carneiro, M. B. H., ... Horta, M. F. (2014). A defective TLR4 signaling for IFN- β expression is responsible for the innately lower ability of BALB/c macrophages to produce NO in response to LPS as compared to

- C57BL/6. *PLoS ONE*, 9(6). doi:10.1371/journal.pone.0098913
- Palucka, K., & Banchereau, J. (2012). Cancer immunotherapy via dendritic cells. *Nature Reviews Cancer*, 12(April), 265–277. doi:10.1038/nrc3258
- Pandey, S., Kawai, T., & Akira, S. (2015). Microbial Sensing by Toll-Like Receptors and Intracellular Nucleic Acid Sensors. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 7(1), a016246. doi:10.1101/cshperspect.a016246
- Paone, A., Galli, R., Gabellini, C., Lukashev, D., Starace, D., Gorlach, A., ... Riccioli, A. (2010). Toll-like Receptor 3 Regulates Angiogenesis and Apoptosis in Prostate Cancer Cell Lines through Hypoxia-Inducible Factor 1 α . *Neoplasia*, 12(7), 539–549. doi:10.1593/neo.92106
- Parmiani, G., Cimminiello, C., Maccalli, C., & Russo, V. (2015). Vaccination in Human Solid Tumors: Recent Progress in the Clinical Arena. In *Cancer Immunology* (pp. 41–46). Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg. doi:10.1007/978-3-662-46410-6_2
- Peiser, L., Mukhopadhyay, S., & Gordon, S. (2002). Scavenger receptors in innate immunity. *Current Opinion in Immunology*, 14, 123–128. doi:10.1016/S0952-7915(01)00307-7
- Pentcheva-Hoang, T., Simpson, T. R., Montalvo-Ortiz, W., & Allison, J. P. (2014). Cytotoxic T Lymphocyte Antigen-4 (CTLA-4) Blockade Enhances Anti-Tumor Immunity by Stimulating Melanoma-Specific T Cell Motility. *Cancer Immunology Research*, 4(October), 970–981. doi:10.1158/2326-6066.CIR-14-0104
- Perrot, I., Deauvieu, F., Massacrier, C., Hughes, N., Garrone, P., Durand, I., ... Caux, C. (2010). TLR3 and Rig-like receptor on myeloid dendritic cells and Rig-like receptor on human NK cells are both mandatory for production of IFN-gamma in response to double-stranded RNA. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 185(4), 2080–8. doi:10.4049/jimmunol.1000532
- Perry, A. K., Chen, G., Zheng, D., Tang, H., & Cheng, G. (2005). The host type I interferon response to viral and bacterial infections. *Cell Research*, 15(6), 407–422. doi:10.1038/sj.cr.7290309
- Petrasek, J., Dolganiuc, A., Csak, T., Kurtjones, E. a., & Szabo, G. (2011). Type I interferons protect from toll-like receptor 9-associated liver injury and regulate IL-1 receptor antagonist in mice. *Gastroenterology*, 140(2), 697–708. doi:10.1053/j.gastro.2010.08.020
- Pickup, M., Novitskiy, S., & Moses, H. L. (2013). The roles of TGF β in the tumour microenvironment. *Nature Reviews. Cancer*, 13(October), 788–99. doi:10.1038/nrc3603
- Piconese, S., Pacella, I., Timperi, E., & Barnaba, V. (2014). Divergent effects of type-I interferons on regulatory T cells. *Cytokine & Growth Factor Reviews*. doi:10.1016/j.cytogfr.2014.10.012
- Pirher, N., Ivicak, K., Pohar, J., Bencina, M., & Jerala, R. (2008). A second binding site for double-stranded RNA in TLR3 and consequences for interferon activation. *Nature Structural & Molecular Biology*, 15(7), 761–3. doi:10.1038/nsmb.1453
- Pohar, J., Pirher, N., Benčina, M., Manček-Keber, M., & Jerala, R. (2014). The ectodomain of TLR3 receptor is required for its plasma membrane translocation. *PloS One*, 9(3), e92391. doi:10.1371/journal.pone.0092391
- Pol, J., Vacchelli, E., Aranda, F., Castoldi, F., Eggermont, A., Cremer, I., ... Galluzzi, L. (2015). Trial Watch: Immunogenic cell death inducers for anticancer chemotherapy. *OncoImmunology*, 4(4), e1008866. doi:10.1080/2162402X.2015.1008866
- Poltorak, A., He, X., Smirnova, I., Liu, M.-Y., Huffel, C. Van, Du, X., ... Beutler, B. (1998). Defective LPS Signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr Mice: Mutations in Tlr4 Gene. *Science*, 282 (5396), 2085–2088. doi:10.1126/science.282.5396.2085
- Porritt, R. a., & Hertzog, P. J. (2015). Dynamic control of type I IFN signalling by an integrated network of negative regulators. *Trends in Immunology*, 36(3), 1–11. doi:10.1016/j.it.2015.02.002
- Pothlichet, J., Meunier, I., Davis, B. K., Ting, J. P.-Y., Skamene, E., von Messling, V., & Vidal, S. M. (2013). Type I IFN triggers RIG-I/TLR3/NLRP3-dependent inflammasome activation in influenza A virus infected cells. *PLoS Pathogens*, 9(4), e1003256. doi:10.1371/journal.ppat.1003256
- PREHN, R. T., & MAIN, J. M. (1957). Immunity to methylcholanthrene-induced sarcomas. *Journal of the*

- National Cancer Institute*, 18(6), 769–778.
- Pulendran, B. (2015). The Varieties of Immunological Experience: Of Pathogens, Stress, and Dendritic Cells. *Annual Review of Immunology*, 33(1), 563–606. doi:10.1146/annurev-immunol-020711-075049
- Qi, R., Singh, D., & Kao, C. C. (2012). Proteolytic processing regulates Toll-like receptor 3 stability and endosomal localization. *The Journal of Biological Chemistry*, 287(39), 32617–29. doi:10.1074/jbc.M112.387803
- Qian, B., Li, J., Zhang, H., Kitamura, T., Zhang, J., Liang, R., ... Pollard, J. W. (2012). CCL2 recruits inflammatory monocytes to facilitate breast tumor metastasis. *Nature*, 475(7355), 222–225. doi:10.1038/nature10138.CCL2
- Qian, C., Liu, X. Y., & Prieto, J. (2006). Therapy of cancer by cytokines mediated by gene therapy approach. *Cell Research*, 16, 182–188. doi:10.1038/sj.cr.7310025
- Qian, X., Gu, L., Ning, H., Zhang, Y., Hsueh, E. C., Fu, M., ... Liu, J. (2013). Increased Th17 cells in the tumor microenvironment is mediated by IL-23 via tumor-secreted prostaglandin E2. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 190, 5894–902. doi:10.4049/jimmunol.1203141
- Qin, X. Q., Tao, N., Dergay, A., Moy, P., Fawell, S., Davis, A., ... Barsoum, J. (1998). Interferon-beta gene therapy inhibits tumor formation and causes regression of established tumors in immune-deficient mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95(November), 14411–14416. doi:10.1073/pnas.95.24.14411
- Quinn, D. I., Vaishampayan, U., Higano, C. S., Lin, D. W., Shore, N. D., & Beer, T. M. (2014). Sequencing therapy in advanced prostate cancer: focus on sipuleucel-T. *Expert Review of Anticancer Therapy*, 11(2014), 1–11. doi:10.1586/14737140.2014.848065
- Rammensee, H.-G. (2014). From Basic Immunology to New Therapies for Cancer Patients. In *Cancer Immunotherapy Meets Oncology* (pp. 3–11). Cham: Springer International Publishing. doi:10.1007/978-3-319-05104-8_1
- Rao, U. N. M., Lee, S. J., Luo, W., Mihm, M. C., & Kirkwood, J. M. (2010). Presence of Tumor-Infiltrating Lymphocytes and a Dominant Nodule Within Primary Melanoma Are Prognostic Factors for Relapse-Free Survival of Patients With Thick (T4) Primary Melanoma: Pathologic Analysis of the E1690 and E1694 Intergroup Trials. *American Journal of Clinical Pathology*, 133(4), 646–653. doi:10.1309/AJCPTXMEFOVYWDA6
- Rauta, P. R., Samanta, M., Dash, H. R., Nayak, B., & Das, S. (2014). Toll-like receptors (TLRs) in aquatic animals: Signaling pathways, expressions and immune responses. *Immunology Letters*, 158(1–2), 14–24. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.imlet.2013.11.013
- Ray-Coquard, I., Cropet, C., Van Glabbeke, M., Sebban, C., Le Cesne, A., Judson, I., ... Labidi, I. (2009). Lymphopenia as a prognostic factor for overall survival in advanced carcinomas, sarcomas, and lymphomas. *Cancer Research*, 69(13), 5383–5391.
- Reder, A. T., & Feng, X. (2014). How type I interferons work in multiple sclerosis and other diseases: some unexpected mechanisms. *Journal of Interferon & Cytokine Research : The Official Journal of the International Society for Interferon and Cytokine Research*, 34(8), 589–99. doi:10.1089/jir.2013.0158
- Restifo, N. P., Dudley, M. E., & Rosenberg, S. a. (2012). Adoptive immunotherapy for cancer: harnessing the T cell response. *Nature Reviews Immunology*, 12(4), 269–281. doi:10.1038/nri3191
- Reynolds, J. M., & Dong, C. (2013). Toll-like receptor regulation of effector T lymphocyte function. *Trends in Immunology*, 34(10), 511–519. doi:10.1016/j.it.2013.06.003
- Ridnour, L. a., Cheng, R. Y. S., Switzer, C. H., Heinecke, J. L., Ambs, S., Glynn, S., ... Wink, D. a. (2013). Molecular pathways: Toll-like receptors in the tumor microenvironment-poor prognosis or new therapeutic opportunity. *Clinical Cancer Research*, 19, 1340–1346. doi:10.1158/1078-0432.CCR-12-0408
- Rudensky, A. Y. (2012). Regulatory T Cells and Foxp3. *Immunol Rev*, 241(1), 260–268. doi:10.1111/j.1600-065X.2011.01018.x.Regulatory

- Sakaguchi, S., Vignali, D. a a, Rudensky, A. Y., Niec, R. E., & Waldmann, H. (2013). The plasticity and stability of regulatory T cells. *Nature Reviews. Immunology*, *13*(6), 461–7. doi:10.1038/nri3464
- Salaun, B., Coste, I., Risoan, M.-C., Lebecque, S. J., & Renno, T. (2006). TLR3 can directly trigger apoptosis in human cancer cells. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, *176*, 4894–4901. doi:10.4049/jimmunol.176.8.4894
- Salaun, B., Zitvogel, L., Asselin-Paturel, C., Morel, Y., Chemin, K., Dubois, C., ... Andre, F. (2011). TLR3 as a biomarker for the therapeutic efficacy of double-stranded RNA in breast cancer. *Cancer Research*, *71*(5), 1607–14. doi:10.1158/0008-5472.CAN-10-3490
- Salem, M. L., Hammad, S. M., El-shanshory, M. R., Attia, M. A., Zidan, A. A., Elshanshory, M. R., ... Zidan, A. A. (2014). Immunostimulatory Effects of Triggering TLR3 Signaling Pathway — Implication for Cancer Immunotherapy. In *Immune Response Activation*. InTech. doi:10.5772/58575
- Sancho-Shimizu, V., Pérez de Diego, R., Lorenzo, L., Halwani, R., Alangari, A., Israelsson, E., ... Casanova, J.-L. (2011). Herpes simplex encephalitis in children with autosomal recessive and dominant TRIF deficiency. *Journal of Clinical Investigation*, *121*(12), 4889–4902. doi:10.1172/JCI59259
- Sasai, M., & Yamamoto, M. (2013). Pathogen Recognition Receptors: Ligands and Signaling Pathways by Toll-Like Receptors. *International Reviews of Immunology*, *32*(2), 116–133. doi:10.3109/08830185.2013.774391
- Sato, M., Suemori, H., Hata, N., Asagiri, M., Ogasawara, K., Nakao, K., ... Taniguchi, T. (2000). Distinct and essential roles of transcription factors IRF-3 and IRF-7 in response to viruses for IFN-alpha/beta gene induction. *Immunity*, *13*, 539–548. doi:10.1016/S1074-7613(00)00053-4
- Sawant, D. V., & Vignali, D. a a. (2014). Once a Treg, always a Treg? *Immunological Reviews*, *259*, 173–191. doi:10.1111/imr.12173
- Schmeisser, H., Bekisz, J., & Zoon, K. C. (2014). New function of type I IFN: induction of autophagy. *Journal of Interferon & Cytokine Research : The Official Journal of the International Society for Interferon and Cytokine Research*, *34*(2), 71–8. doi:10.1089/jir.2013.0128
- Schneider, W. M., Chevillotte, M. D., & Rice, C. M. (2014). Interferon-stimulated genes: a complex web of host defenses. *Annual Review of Immunology*, *32*, 513–45. doi:10.1146/annurev-immunol-032713-120231
- Schreiber, G., & Piehler, J. (2015). The molecular basis for functional plasticity in type I interferon signaling. *Trends in Immunology*, 1–11. doi:10.1016/j.it.2015.01.002
- Schroder, J., Moll, J. M., Baran, P., Grotzinger, J., Scheller, J., & Floss, D. M. (2015). Non-canonical interleukin 23 receptor complex assembly: p40 protein recruits interleukin 12 receptor beta1 via site II and induces p19/interleukin 23 receptor interaction via site III. *The Journal of Biological Chemistry*, *290*(1), 359–370. doi:10.1074/jbc.M114.617597
- Schwartzentruber, D. J., Lawson, D. H., Richards, J. M., Conry, R. M., Miller, D. M., Treisman, J., ... Hwu, P. (2011). Gp100 Peptide Vaccine and Interleukin-2 in Patients With Advanced Melanoma. *The New England Journal of Medicine*, *364*(22), 2119–2127. doi:10.1056/NEJMoa1012863
- Shankaran, V., Ikeda, H., Bruce, A. T., White, J. M., Swanson, P. E., Old, L. J., & Schreiber, R. D. (2001). IFN[gamma] and lymphocytes prevent primary tumour development and shape tumour immunogenicity. *Nature*, *410*(6832), 1107–1111. Retrieved from <http://dx.doi.org/10.1038/35074122>
- Sharma, M. D., Hou, D.-Y., Baban, B., Koni, P. a, He, Y., Chandler, P. R., ... Munn, D. H. (2010). Reprogrammed foxp3(+) regulatory T cells provide essential help to support cross-presentation and CD8(+) T cell priming in naive mice. *Immunity*, *33*(6), 942–54. doi:10.1016/j.immuni.2010.11.022
- Shi, Z., Wakil, a E., & Rockey, D. C. (1997). Strain-specific differences in mouse hepatic wound healing are mediated by divergent T helper cytokine responses. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *94*(September), 10663–10668. doi:10.1073/pnas.94.20.10663
- Shibuya, K., Robinson, D., Zonin, F., Hartley, S. B., Macatonia, S. E., Somoza, C., ... O'Garra, a. (1998). IL-1 alpha and TNF-alpha are required for IL-12-induced development of Th1 cells producing high

- levels of IFN-gamma in BALB/c but not C57BL/6 mice. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, *160*, 1708–1716.
- Shime, H., Matsumoto, M., Oshiumi, H., Tanaka, S., Nakane, a., Iwakura, Y., ... Seya, T. (2012). Toll-like receptor 3 signaling converts tumor-supporting myeloid cells to tumoricidal effectors. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *109*(6), 2066–2071. doi:10.1073/pnas.1113099109
- Shir, A., Ogris, M., Roedl, W., Wagner, E., & Levitzki, A. (2011). EGFR-Homing dsRNA Activates Cancer-Targeted Immune Response and Eliminates Disseminated EGFR-Overexpressing Tumors in Mice. *Clinical Cancer Research*, *17*(5), 1033–1043. doi:10.1158/1078-0432.CCR-10-1140
- Shurin, G. V., Tourkova, I. L., Kaneno, R., & Shurin, M. R. (2009). Chemotherapeutic agents in noncytotoxic concentrations increase antigen presentation by dendritic cells via an IL-12-dependent mechanism. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, *183*(1), 137–44. doi:10.4049/jimmunol.0900734
- Singh, D., Vaughan, R., & Kao, C. C. (2014). LL-37 Peptide Enhancement of Signal Transduction by Toll-like Receptor 3 Is Regulated by pH. *Journal of Biological Chemistry*, *289*(40), 27614–27624. doi:10.1074/jbc.M114.582973
- Sirois, C. M., Jin, T., Miller, A. L., Bertheloot, D., Nakamura, H., Horvath, G. L., ... Latz, E. (2013). RAGE is a nucleic acid receptor that promotes inflammatory responses to DNA. *The Journal of Experimental Medicine*, *210*(11), 2447–63. doi:10.1084/jem.20120201
- Sistigu, A., Yamazaki, T., Vacchelli, E., Chaba, K., Enot, D. P., Adam, J., ... Quidville, V. (2014). Cancer cell – autonomous contribution of type I interferon signaling to the efficacy of chemotherapy, (October). doi:10.1038/nm.3708
- Sistigu, A., Yamazaki, T., Vacchelli, E., Chaba, K., Enot, D. P., Adam, J., ... Zitvogel, L. (2014). Cancer cell-autonomous contribution of type I interferon signaling to the efficacy of chemotherapy. *Nature Medicine*, *20*(11). doi:10.1038/nm.3708
- Slack, J. L., Schooley, K., Bonnert, T. P., Mitcham, J. L., Qwarnstrom, E. E., Sims, J. E., & Dower, S. K. (2000). Identification of two major sites in the type I interleukin-1 receptor cytoplasmic region responsible for coupling to pro-inflammatory signaling pathways. *Journal of Biological Chemistry*, *275*(7), 4670–4678. doi:10.1074/jbc.275.7.4670
- Smyth, M. J. (2005). Type I interferon and cancer immunoediting. *Nature Immunology*. doi:10.1038/ni0705-646
- Smyth, M. J., Ngiow, S. F., & Teng, M. W. L. (2014). Targeting regulatory T cells in tumor immunotherapy. *Immunology and Cell Biology*, *92*(6), 473–474. doi:10.1038/icb.2014.33
- Solodova, E., Jablonska, J., Weiss, S., & Lienenklaus, S. (2011). Production of IFN- β during *Listeria* monocytogenes infection is restricted to monocyte/macrophage lineage. *PloS One*, *6*(4), e18543. doi:10.1371/journal.pone.0018543
- Son, K.-N., Liang, Z., & Lipton, H. L. (2015). Double-strand RNA is detected by immunofluorescence analysis in RNA and DNA virus infections including those by negative-strand RNA viruses. *Journal of Virology*, (July), JVI.01299–15. doi:10.1128/JVI.01299-15
- Spaapen, R. M., Leung, M. Y. K., Mercedes, B., Kline, J. P., Zhang, L., Zheng, Y., ... Gajewski, T. F. (2014). Therapeutic Activity of High-Dose Intratumoral IFN- β Requires Direct Effect on the Tumor Vasculature. *The Journal of Immunology*. doi:10.4049/jimmunol.1401109
- Srivastava, S., Koch, M. a, Pepper, M., & Campbell, D. J. (2014). Type I interferons directly inhibit regulatory T cells to allow optimal antiviral T cell responses during acute LCMV infection. *The Journal of Experimental Medicine*, *211*(5), 961–74. doi:10.1084/jem.20131556
- Starbeck-Miller, G. R., Xue, H.-H., & Harty, J. T. (2014). IL-12 and type I interferon prolong the division of activated CD8 T cells by maintaining high-affinity IL-2 signaling in vivo. *The Journal of Experimental Medicine*, *211*(1), 105–20. doi:10.1084/jem.20130901
- Steinman, R. M. (2012). Decisions About Dendritic Cells: Past, Present, and Future. *Annual Review of Immunology*, *30*, 1–22. doi:10.1146/annurev-immunol-100311-102839

- Sterman, D. H., Gillespie, C. T., Carroll, R. G., Coughlin, C. M., Lord, E. M., Sun, J., ... Vonderheide, R. H. (2006). Interferon beta adenoviral gene therapy in a patient with ovarian cancer. *Nature Clinical Practice. Oncology*, 3(11), 633–9. doi:10.1038/ncponc0658
- Stewart, W. E., Clercq, E. D. E., Billiau, A., Desmyter, J. a N., & Somer, P. D. E. (1972). Increased Susceptibility of Cells Treated with Interferon to the Toxicity of, 69(7), 1851–1854.
- Stock, A. T., Smith, J. M., & Carbone, F. R. (2014). Type I IFN suppresses Cxcr2 driven neutrophil recruitment into the sensory ganglia during viral infection. *The Journal of Experimental Medicine*, 211(5), 751–9. doi:10.1084/jem.20132183
- Stoitzner, P., Green, L. K., Jung, J. Y., Price, K. M., Atarea, H., Kivell, B., & Ronchese, F. (2008). Inefficient presentation of tumor-derived antigen by tumor-infiltrating dendritic cells. *Cancer Immunology, Immunotherapy : CII*, 57(11), 1665–73. doi:10.1007/s00262-008-0487-4
- Strauss, L., Bergmann, C., Gooding, W., Johnson, J. T., & Whiteside, T. L. (2007). The frequency and suppressor function of CD4+CD25highFoxp3+ T cells in the circulation of patients with squamous cell carcinoma of the head and neck. *Clinical Cancer Research : An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, 13(21), 6301–11. doi:10.1158/1078-0432.CCR-07-1403
- Sturgeon, K., Schadler, K., Muthukumaran, G., Ding, D., Bajulaiye, A., Thomas, N. J., ... Libonati, J. R. (2014). Concomitant low-dose doxorubicin treatment and exercise. *American Journal of Physiology. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 307(6), R685–92. doi:10.1152/ajpregu.00082.2014
- Stutman, O. (1974). Tumor development after 3-methylcholanthrene in immunologically deficient athymic-nude mice. *Science (New York, N.Y.)*, 183(124), 534–536. doi:10.1126/science.183.4124.534
- Sugiyama, T., Hoshino, K., Saito, M., Yano, T., Sasaki, I., Yamazaki, C., ... Kaisho, T. (2007). Immunoadjuvant effects of polyadenylic: Polyuridylic acids through TLR3 and TLR7. *International Immunology*, 20(1), 1–9. doi:10.1093/intimm/dxm112
- Sugiyama, Y., Kakoi, K., Kimura, A., Takada, I., Kashiwagi, I., Wakabayashi, Y., ... Yoshimura, A. (2012). Smad2 and Smad3 are redundantly essential for the suppression of iNOS synthesis in macrophages by regulating IRF3 and STAT1 pathways. *International Immunology*, 24(4), 253–265. doi:10.1093/intimm/dxr126
- Szeles, L., Meissner, F., Dunand-Sauthier, I., Thelemann, C., Hersch, M., Singovski, S., ... Reith, W. (2015). TLR3-Mediated CD8+ Dendritic Cell Activation Is Coupled with Establishment of a Cell-Intrinsic Antiviral State. *The Journal of Immunology*. doi:10.4049/jimmunol.1402033
- Tabeta, K., Georgel, P., Janssen, E., Du, X., Hoebe, K., Crozat, K., ... Beutler, B. (2004). Toll-like receptors 9 and 3 as essential components of innate immune defense against mouse cytomegalovirus infection. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 101(10), 3516–3521. doi:10.1073/pnas.0400525101
- Tabeta, K., Hoebe, K., Janssen, E. M., Du, X., Georgel, P., Crozat, K., ... Beutler, B. (2006). The Unc93b1 mutation 3d disrupts exogenous antigen presentation and signaling via Toll-like receptors 3, 7 and 9. *Nature Immunology*, 7(2), 156–164. doi:10.1038/ni1297
- Tabiasco, J., Devèvre, E., Rufer, N., Cerottini, J., Speiser, D., Deve, E., & Salaun, B. (2006). Human Effector CD8+ T Lymphocytes Express TLR3 as a Functional Coreceptor. *The Journal of Immunology*.
- Tacar, O., Sriamornsak, P., & Dass, C. R. (2013). Doxorubicin: an update on anticancer molecular action, toxicity and novel drug delivery systems. *The Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 65(2), 157–70. doi:10.1111/j.2042-7158.2012.01567.x
- Tamargo, J., Caballero, R., & Delpón, E. (2015). Cancer Chemotherapy and Cardiac Arrhythmias: A Review. *Drug Safety*, 38, 129–152. doi:10.1007/s40264-014-0258-4
- Tel, J., Anguille, S., Waterborg, C. E. J., Smits, E. L., Figdor, C. G., & de Vries, I. J. M. (2014). Tumoricidal activity of human dendritic cells. *Trends in Immunology*, 35(1), 38–46. doi:10.1016/j.it.2013.10.007
- Thomas, L. (1982). On immunosurveillance in human cancer. *Yale Journal of Biology and Medicine*, 55(3-4), 329–333.

- Thorn, C., Oshiro, C., Marsh, S., Hernandez-Boussard, T., McLeod, H., Klein, T., & Altman, R. (2012). Doxorubicin pathways: pharmacodynamics and adverse effects. *Pharmacogenet Genomics*, *21*(7), 440–446. doi:10.1097/FPC.0b013e32833ffb56.Doxorubicin
- Tomasello, E., Pollet, E., Vu Manh, T.-P., Uzé, G., & Dalod, M. (2014). Harnessing mechanistic knowledge on beneficial versus deleterious IFN-I effects to design innovative immunotherapies targeting cytokine activity to specific cell types. *Frontiers in Immunology*, *5*(October), 1–27. doi:10.3389/fimmu.2014.00526
- Toscano, F., Estornes, Y., Virard, F., Garcia-Cattaneo, A., Pierrot, A., Vanbervliet, B., ... Lebecque, S. (2012). Cleaved/Associated TLR3 Represents the Primary Form of the Signaling Receptor. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, *190*(2), 764–773. doi:10.4049/jimmunol.1202173
- Tosolini, M., Kirilovsky, A., Mlecnik, B., Fredriksen, T., Mauger, S., Bindea, G., ... Galon, J. (2011). Clinical impact of different classes of infiltrating T cytotoxic and helper cells (Th1, Th2, Treg, Th17) in patients with colorectal cancer. *Cancer Research*, *71*, 1263–1271. doi:10.1158/0008-5472.CAN-10-2907
- Tough, D. F. (2012). Modulation of T-cell function by type I interferon. *Immunology and Cell Biology*, *90*(5), 492–497. doi:10.1038/icb.2012.7
- Trinchieri, G. (2010). Type I interferon: friend or foe? *The Journal of Experimental Medicine*, *207*(10), 2053–63. doi:10.1084/jem.20101664
- Tugues, S., Burkhard, S. H., Ohs, I., Vrohling, M., Nussbaum, K., vom Berg, J., ... Becher, B. (2014). New insights into IL-12-mediated tumor suppression. *Cell Death and Differentiation*, *22*, 237–246. doi:10.1038/cdd.2014.134
- Turley, S. J., Fletcher, A. L., & Elpek, K. G. (2010). The stromal and haematopoietic antigen-presenting cells that reside in secondary lymphoid organs. *Nature Reviews. Immunology*, *10*(12), 813–25. doi:10.1038/nri2886
- U'Ren, L., Guth, A., Kamstock, D., & Dow, S. (2010). Type I interferons inhibit the generation of tumor-associated macrophages. *Cancer Immunology, Immunotherapy*, *59*(4), 587–598. doi:10.1007/s00262-009-0776-6
- Uhm, J. E., Park, J. O., Lee, J., Park, Y. S., Park, S. H., Yoo, B. C., ... Lim, H. Y. (2009). A phase II study of oxaliplatin in combination with doxorubicin as first-line systemic chemotherapy in patients with inoperable hepatocellular carcinoma. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, *63*, 929–935. doi:10.1007/s00280-008-0817-4
- Vacchelli, E., Aranda, F., Eggermont, A., Galon, J., & Sautès-fridman, C. (2014). Tumor-targeting monoclonal antibodies in cancer therapy, (January), 1–20.
- Vacchelli, E., Eggermont, A., Sautès-fridman, C., Galon, J., & Zitvogel, L. (2013). Toll-like receptor agonists for cancer therapy, (August), 1–14.
- van der Bruggen, P., Traversari, C., Chomez, P., Lurquin, C., De Plaen, E., Van den Eynde, B., ... Boon, T. (1991). A gene encoding an antigen recognized by cytolytic T lymphocytes on a human melanoma. *Science (New York, N.Y.)*, *254*(5038), 1643–1647. doi:10.1126/science.1840703
- Van Pel, A., Vessière, F., & Boon, T. (1983). Protection against two spontaneous mouse leukemias conferred by immunogenic variants obtained by mutagenesis. *The Journal of Experimental Medicine*, *157*(6), 1992–2001. doi:10.1084/jem.157.6.1992
- Verstak, B., Arnot, C. J., & Gay, N. J. (2013). An alanine-to-proline mutation in the BB-loop of TLR3 Toll/IL-1R domain switches signalling adaptor specificity from TRIF to MyD88. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, *191*, 6101–9. doi:10.4049/jimmunol.1300849
- Vincent, J., Mignot, G., Chalmin, F., Ladoire, S., Bruchard, M., Chevriaux, A., ... Ghiringhelli, F. (2010). 5-Fluorouracil selectively kills tumor-associated myeloid-derived suppressor cells resulting in enhanced T cell-dependent antitumor immunity. *Cancer Research*, *70*(8), 3052–61. doi:10.1158/0008-5472.CAN-09-3690
- Vivier, E., Ugolini, S., Blaise, D., Chabannon, C., & Brossay, L. (2012). Targeting natural killer cells and natural killer T cells in cancer. *Nature Reviews Immunology*, *12*(4), 239–252. doi:10.1038/nri3174

- Wang, B. X., Rahbar, R., & Fish, E. N. (2011). Interferon: current status and future prospects in cancer therapy. *Journal of Interferon & Cytokine Research : The Official Journal of the International Society for Interferon and Cytokine Research*, 31(7), 545–52. doi:10.1089/jir.2010.0158
- Wang, B.-G., Yi, D.-H., & Liu, Y.-F. (2015). TLR3 gene polymorphisms in cancer: a systematic review and meta-analysis. *Chinese Journal of Cancer*, 34(1), 19. doi:10.1186/s40880-015-0020-z
- Wang, E., Miller, L. D., Ohnmacht, G. a, Mocellin, S., Perez-diez, A., Petersen, D., ... Marincola, F. M. (2002). Prospective Molecular Profiling of Melanoma Metastases Suggests Classifiers of Immune Responsiveness Advances in Brief Prospective Molecular Profiling of Melanoma Metastases Suggests Classifiers of Immune Responsiveness, (301), 3581–3586.
- Wang, L., Smith, D., Bot, S., Dellamary, L., Bloom, A., & Bot, A. (2002). Noncoding RNA danger motifs bridge innate and adaptive immunity and are potent adjuvants for vaccination. *Journal of Clinical Investigation*, 110(8), 1175–1184. doi:10.1172/JCI200215536
- Wang, Y., Liu, L., Davies, D. R., & Segal, D. M. (2010). Dimerization of Toll-like receptor 3 (TLR3) is required for ligand binding. *The Journal of Biological Chemistry*, 285(47), 36836–41. doi:10.1074/jbc.M110.167973
- Wang, Y., Miao, L., Satterlee, A., & Huang, L. (2015). Delivery of oligonucleotides with lipid nanoparticles. *Advanced Drug Delivery Reviews*. doi:10.1016/j.addr.2015.02.007
- Wang, Y. Y., Li, L., Han, K. J., Zhai, Z., & Shu, H. B. (2004). A20 is a potent inhibitor of TLR3- and Sendai virus-induced activation of NF- κ B and ISRE and IFN- γ promoter. *FEBS Letters*, 576, 86–90. doi:10.1016/j.febslet.2004.08.071
- Watanabe, A., Tatematsu, M., Saeki, K., Shibata, S., Shime, H., Yoshimura, A., ... Matsumoto, M. (2011). Raftlin is involved in the nucleocapture complex to induce poly(I:C)-mediated TLR3 activation. *Journal of Biological Chemistry*, 286(12), 10702–10711. doi:10.1074/jbc.M110.185793
- Whiteside, T. L. (2014). Clinical Impact of Regulatory T cells (Treg) in Cancer and HIV. *Cancer Microenvironment*. doi:10.1007/s12307-014-0159-1
- Wilke, C. M., Wei, S., Wang, L., Kryczek, I., Fang, J., Wang, G., & Zou, W. (2013). Cancer Immunotherapy. *Cancer Immunotherapy*, 17–45. doi:10.1007/978-1-4614-4732-0
- Wilmes, S., Beutel, O., Li, Z., Francois-Newton, V., Richter, C. P., Janning, D., ... Piehler, J. (2015). Receptor dimerization dynamics as a regulatory valve for plasticity of type I interferon signaling. *The Journal of Cell Biology*, 209(4), 579–593. doi:10.1083/jcb.201412049
- Wu, C.-F., Andzinski, L., Kasnitz, N., Kröger, A., Klawonn, F., Lienenklaus, S., ... Jablonska, J. (2015). The lack of type I interferon induces neutrophil-mediated pre-metastatic niche formation in the mouse lung. *International Journal of Cancer*, 00, n/a–n/a. doi:10.1002/ijc.29444
- Yeyeodu, S. T., Kidd, L. R., Oprea-Ilies, G. M., Burns, B. G., Vancleave, T. T., Shim, J.-Y., & Kimbro, K. S. (2013). IRAK4 and TLR3 Sequence Variants may Alter Breast Cancer Risk among African-American Women. *Frontiers in Immunology*, 4(October), 338. doi:10.3389/fimmu.2013.00338
- Yi, F., Jaffe, R., & Prochownik, E. V. (2003). The CCL6 Chemokine Is Differentially Regulated by c-Myc and L-Myc , and Promotes Tumorigenesis and Metastasis, 2923–2932.
- Yu, L., Wang, L., & Chen, S. (2013). Dual character of Toll-like receptor signaling: Pro-tumorigenic effects and anti-tumor functions. *Biochimica et Biophysica Acta - Reviews on Cancer*, 1835, 144–154. doi:10.1016/j.bbcan.2012.10.006
- Zhang, M., Wang, L., Zhao, X., Zhao, K., Meng, H., Zhao, W., & Gao, C. (2012). TRAF-interacting protein (TRIP) negatively regulates IFN- γ production and antiviral response by promoting proteasomal degradation of TANK-binding kinase 1. *Journal of Experimental Medicine*, 209(10), 1703–1711. doi:10.1084/jem.20120024
- Zhang, S.-Y., Jouanguy, E., Ugolini, S., Smahi, A., Elain, G., Romero, P., ... Casanova, J.-L. (2007). TLR3 deficiency in patients with herpes simplex encephalitis. *Science (New York, N.Y.)*, 317(5844), 1522–1527. doi:10.1126/science.1139522
- Zhao, G. N., Jiang, D. S., & Li, H. (2014). Interferon regulatory factors: at the crossroads of immunity, metabolism, and disease. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease*.

doi:10.1016/j.bbadis.2014.04.030

- Zhao, J.-Y., Ma, X.-L., Li, Z.-M., Deng, R., Wang, S.-M., Shen, G.-B., ... Wei, Y.-Q. (2014). Down-regulation of MFG-E8 by RNA interference combined with doxorubicin triggers melanoma destruction. *Clinical and Experimental Medicine*. doi:10.1007/s10238-014-0277-6
- Zhao, X., Ai, M., Guo, Y., Zhou, X., Wang, L., Li, X., & Yao, C. (2012). Poly I:C-Induced Tumor Cell Apoptosis Mediated by Pattern-Recognition Receptors. *Cancer Biotherapy & Radiopharmaceuticals*, 27(9), 530–534. doi:10.1089/cbr.2012.1226
- Zhu, Q., Jia, L., Gao, Z., Wang, C., Jiang, H., Zhang, J., & Dong, L. (2014). A Tumor Environment Responsive Doxorubicin-Loaded Nanoparticle for Targeted Cancer Therapy. *Molecular Pharmaceutics*. doi:10.1021/mp4007776
- Zhu, Z.-F., Tang, T.-T., Dong, W.-Y., Li, Y.-Y., Xia, N., Zhang, W.-C., ... Cheng, X. (2015). Defective circulating CD4⁺LAP⁺ regulatory T cells in patients with dilated cardiomyopathy. *Journal of Leukocyte Biology*, 97(April), 1–9. doi:10.1189/jlb.5A1014-469RR
- Zipfel, C. (2014). Plant pattern-recognition receptors. *Trends in Immunology*, 35(7), 345–351. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.it.2014.05.004
- Zitvogel, L., Galluzzi, L., Kepp, O., Smyth, M. J., & Kroemer, G. (2015). Type I interferons in anticancer immunity. *Nature Reviews Immunology*, (June), 5–9. doi:10.1038/nri3845
- Zitvogel, L., Galluzzi, L., Smyth, M., & Kroemer, G. (2013). Mechanism of Action of Conventional and Targeted Anticancer Therapies: Reinstating Immunosurveillance. *Immunity*, 39(1), 74–88. doi:10.1016/j.immuni.2013.06.014