



Universidad Nacional de Córdoba.  
Facultad de Ciencias Químicas.  
Departamento de Bioquímica Clínica.

Centro de Investigaciones en  
Bioquímica Clínica e Inmunología  
(CIBICI-CONICET).

Lic. en Bioquímica Clínica María Cecilia Ramello.

**TESIS DE DOCTORADO EN CIENCIAS QUÍMICAS.**

***SENESCENCIA DE LINFOCITOS T INDUCIDA POR TUMORES:***

***UN NUEVO MECANISMO DE EVASIÓN DE LA RESPUESTA INMUNE***

Directora de Tesis: Dra. Carolina Lucía Montes.

Córdoba, Argentina.

RECEBIMOS DE VOSSE EXCELÊNCIA

o valor de R\$ 514,29

correspondente a

R\$ 13,767

de

doze

Reais

por

conta

de

de

de

de

de

de

de

702L		
------	--	--

Directora de Tesis:

Dra. Carolina L. Montes

Comisión Asesora:



Dra. Eva V. Acosta Rodríguez

Dra. Beatríz L. Caputto

Dra. Liliana M. Cancela

Evaluador Externo:



Dr. Norberto W. Zwirner

*Este trabajo de tesis fue realizado gracias al apoyo económico del Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), la Secretaría de Ciencia y Tecnología de la Universidad Nacional de Córdoba (SeCyT-UNC), el Ministerio de Ciencia y Tecnología de la provincia de Córdoba (MINCyT), la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica (ANPCyT-FonCyT) y el Instituto Nacional del Cáncer del Ministerio de Salud de la Nación (INC).*



*A Sebastián, mi compañero de la vida,  
cuyo amor me ha sostenido mucho más de lo que él puede imaginar...*

*A mis padres, ejemplo de tenacidad y compromiso, de amor infinito...*

*A mis hermanas, dueñas de sueños tan distintos,  
cuya compañía necesito para siempre...*

*A mi sobrina Hanna, a quien amo aún desde antes de conocerla...*

*A mis sobrinos que me enseñan todos los días el verdadero valor de la vida...*

Es verdad lo que me enseñaron de pequeña: que con esfuerzo, casi siempre, uno puede conseguir lo que desea. Sin embargo, hay decenas de personas alrededor de uno que ayudan a que eso sea posible.

Para empezar, nada hubiese sido posible sin *Fabio* y *Pilar* quienes me dieron la confianza suficiente para hacer lo que soñaba: investigación. Y mis eternas gracias a la *Facu de Ciencias Químicas* que, una vez más, me abrió sus puertas para crecer.

Después la conocí a *Caro*, fue la entrevista de trabajo más extraña del mundo. Desde el primer día fue conmigo tan sincera como compañera. No se cuándo decidí decirle Jefa, porque en realidad fue siempre mucho más que eso, fue como una maestra que hizo a las veces de mamá y de hermana mayor. Nunca sentí órdenes, sólo consejos. Nunca reproches, sólo palabras de aliento. Siempre solidaria y de gran corazón. Siempre alegre y agradecida. Agradezco a la vida que te haya puesto en mi camino Caro!

Empezar el doctorado parecía algo mucho más complicado que dejar el aula de TP. Pero las personas que me recibieron me lo hicieron muy fácil. Las Gruppi: *Adriana*, que me recordaba mucho a mi mamá, siempre me sentí protegida y acompañada por ella. La admiro profundamente por su pasión por la inmunología y su trabajo. Gracias Adri por valorar siempre mi trabajo, por tu generosidad y por hacerme sentir cómoda desde el primer día. *Eva*, quien fue también mi guía. Escucharla me inspiraba. Voy a estar agradecida eternamente con vos Eva por compartir siempre conmigo tu experiencia y tu sabiduría, por alentarme siempre para adelante, por ser mi ejemplo de lucha por conseguir lo que uno desea. La *Dani* y la *Carito* que me acompañaron con mucha paciencia en el comienzo. La *Dani*, la trotamundos, sus historias y su amor por la vida. La *Carito* y su lucha constante por mejorar el mundo. Las guardo en mi corazón para siempre!

La *Vani* y la *Lau* (las Cerbán) que me convencieron de que había dos cosas muy importantes: aprender a matar ratones y comer fruta (jajaja). Las adoré desde el día en que las conocí!. La *Caro K.* y la *Magda* que me introdujeron a la noche cordobesa. La *Tami*, siempre alegre y con una versión animosa para cada obstáculo que encontrara. La *Andre* y su naturaleza de madre! Disfruté tanto su compañía como sus consejos y la extrañé más que a nadie en el lab. El *Fer* y el *Antonio* que, con su simpleza, me enseñaron el verdadero valor de una palabra y del silencio. La *Cin Stempin* era algo etéreo, no estaba en el lab pero todo el mundo hablaba de ella. Años después la conocí y entendí porque todos la extrañaban tanto. El *Gera*, su paciencia y los dos mil protocolos que intercambiamos. La *Dan Arroyo* que con su humor y su sonrisa permanente me hizo

sentir como en casa desde que la conocí. La *Vico*, el *Javi S.* y las eternas charlas acompañadas de cerveza, por supuesto. *Rubén* por impulsarme todo el tiempo a mejorar, por compartir su pasión por la docencia y sus conocimientos. La *Cris Motrán*, ejemplo de dedicación y compromiso. La *Susi*, directora y madre a la vez. La *Vicky R.*, por su confianza en mí y por ser mi motivación para la docencia.

A los que estuvieron a mi lado durante todo este camino. *Emí, Lucas y Nico Pon* mis compañeros de la facu. Qué hermoso fue compartir, una vez más, todos estos años con ustedes!. Emí, sos la persona más honesta y paciente que he conocido. Si en el mundo existieran más personas como vos estoy segura, completamente segura, que todo sería muy diferente. Nico y Lucas, los admiro por su simpleza y por su capacidad para resolver casi cualquier obstáculo. A los tres, los adoro!. *Lucho*, mi gran compañero! Gracias por nuestras eternas y tan variadas charlas y por evitar que me convirtiera en una amarga, aunque eso inevitablemente ocurrió cuando empezaste a irte. Te extraño tanto!. *Colito*, y nuestras eternas planificaciones de experimentos durante los primeros años! Gracias por tu paciencia y por tu compañía. *Nico Núñez*, el cabezón le decían todos, pero yo le hubiese dicho el de gran corazón. Nunca una palabra tuya sonó desalentadora, gracias por enseñarme a ver las cosas simples. *Leo*, creo que nunca voy a terminar de entender tus bromas! Gracias por ponerle siempre un toque positivo y de humor a mis días de laboratorio. *David Nocera*, aparato!, gracias por tu compañía y por tus chistes malos, jaja. Gracias por compartir conmigo todos estos años!. *Luchi*, la persona más fuerte y tierna que he conocido. Gracias por enseñarme que una sonrisa todo lo puede. *Augustito* de mi alma, quererte fue innato. Sólo escuchar tu voz me llena de paz. Gracias por acompañarme siempre (y por enseñarme a cebar mates!). *Don Peralta Ramos*, otro personaje! Gracias por contagiarme de energía y alegría siempre. *Meli Cian*, por estar siempre, por tu ternura y tu cariño. *Tefi, Flor y Fer*, amigas del alma! Haberlas conocido y compartir este camino con ustedes fue hermoso. Son mujeres auténticas, sensibles y generosas. Gracias por estar siempre a mi lado, por escucharme, acompañarme y por dejarme ser parte de sus vidas. Las quiero!. *Cande*, porque sos un ejemplo de fortaleza y respeto, y porque vivís para contagiarme de buena onda, gracias! te quiero!.

Y un día, el lab se llenó de música y energía. Es que llegaron ellos, los más peques, para cambiarlo todo y recordarme que el trabajo en el lab era más que divertido. La *Jime*, mi querida amiga y mi fiel compañera. Admiro tu energía Jime, tu generosidad y tu simpleza. Si hay algo que voy a extrañar de vos es que con sólo mirarme ya sabés lo que pasa. La *Meli*, mi hermanita menor y la inventapalabras!. Tu cariño desbordante y tus abrazos lo han podido todo. Gracias por enseñarme a vivir sin prejuicios y a disfrutar de las pequeñas cosas. Te quiero hasta el infinito!. El *Cris*, tu visión del amor y de las cosas cambió mi vida para siempre. Compartir mis días con vos ha sido hermoso. Deseo que la vida te conserve a mi lado hasta la eternidad!. El *Facu* y su alegría contagiosa de vivir. Cómo voy a extrañar tus historias exageradas!. El *Fer*, mi compa querido! Tu llegada al grupo Montes fue mucho más de lo que imaginaba. No podría haber pedido un



compañero mejor!. Llegaste para enseñarme muchas cosas, pero sobre todo a confiar en mi misma. Tu apoyo ha sido incondicional. Voy a estar eternamente agradecida con vos compa. Te admiro muchísimo. Adoro compartir mis días, mis experimentos y mi vida con vos! Espero y deseo que la vida no me aleje nunca de tu lado. La *Cincha A.*, la dulzura de tu voz es el reflejo de lo que sos, una persona tierna y leal. La *Eli*, minuciosa y dedicada. De corazón enorme, en el que cabían sus dos grandes amores: su familia y la ciencia. El *Deivid*, su risa contagiosa y sus convicciones admirables. La *Fer*, su silencio tramposo y su calma. La *Lauri* y su ternura, sus pilas para trabajar y sus abrazos cariñosos. La *Xime*, mi alumna adorada primero y mi compa ahora. Su valioso compromiso y dedicación. La *Lili*, siempre lista para ayudar a quien lo necesite. Su dulzura y su inocencia. La *Coti* y su visión realista y justa de la vida. *Andrecito A.*, gracias por ser un ejemplo de búsqueda incansable de sueños!.

A todos los integrantes del Lab 104: *Sole M.*, *Nati*, *Bibi*, *Pau*, *Emi R.*, *Ceci V.*, *Jan*, *Emi*, *Iva* y *Lisa* gracias por los mates, las charlas y las fiestas compartidas!. A la *Rachi*, la *Anita*, la *Ine* y la *Sofi* gracias por el aguante, las catarsis y los cinco mil mates que me han cebado!. Al *Clau*, por las charlas siempre muuuy interesantes!. A *Nati C.*, *Anita R.*, *Ale G.*, *Hernán* y *Jime L.* por las charlas de pasillo y su súper buena onda.

A mis queridas *Ana Belén* y *Ana Caro*. Anita, la persona más dulce que he conocido y Ana Caro la más alegre y constante. Gracias a ambas por hacerme sentir siempre útil.

A *Adri* y *Lau*, por su predisposición constante a ayudarme y por su cariño inmenso. A la *Ale* por su paciencia y su ayuda desinteresada. A *Pau A.* y *Pilar* por darme siempre una mano y por las hermosas charlas compartidas entre tantas horas de citómetro!. A la dulce *Ceci Berta* por su predisposición y su sonrisa inquebrantable. Gracias!

A *Belkys*, *Cristina* y *Gabriel* por no correrme de su lab y por tener siempre una palabra de aliento para mí. Gracias!

A la gente del *Banco de Sangre* por su predisposición y ayuda desinteresada todos estos años. Gracias!

A *Marta* y *Andrés* por su compañía en esta etapa final. Los admiro por su trato con la gente y por el empeño que ponen a su trabajo. Gracias por devolverme la confianza en la salud pública.

Me gustaría también expresar mi inmensa gratitud a las *Dras. Beatríz* y *Liliana* por su compañía y su apoyo durante estos años de tesis. Ha sido un placer para mí compartir mi trabajo con ustedes a quienes admiro muchísimo. Mi profundo agradecimiento al *Dr. Norberto Zwirner*, quien generosamente aceptó leer mi trabajo y acompañarme en este día tan especial para mí.

Además de todas las personas con quienes esta tesis me reunió hay otras decenas de personas que me acompañaron desde mucho antes...

*Mis padres, Bibiana y Hugo*, que han sido y son mi ejemplo de tenacidad, compromiso y honestidad. Gracias por dejarme a soñar y enseñarme que, con esfuerzo, todo es posible. Gracias porque su confianza en mí me fortalece día a día. Gracias por darme la libertad de elegir mi propio camino y por acompañarme, sin juzgarme, cuando me he equivocado. Porque por ustedes estoy aquí hoy, porque su esfuerzo y sacrificio por mí no tiene límites, no tengo palabras para agradecerles!. Los amo!

*Mis hermanas: Maru, Vir (Pipi, como todos la conocen) y Fer (la enana, idem)*. La vida nos ha regalado esta distribución perfecta de edades, para que podamos sostenernos las unas a las otras, pero además porque he aprendido mucho mucho de cada una de ustedes. Maru siempre he admirado tu espíritu aventurero y tu gran sentido del humor. Hoy te admiro también como madre y trabajadora. Gracias por estar siempre a pesar de la distancia. Pipi admiro tu convicción y tu vigor solidario. Gracias por instruirme y por bajarme a la realidad. Gracias por ser mi compañera y amiga confidente. Enana, mi hermanita menor, la ternura en persona. Gracias por darme tu cariño cada día, por ser mi ejemplo de paciencia y tolerancia. Las amo!

*Hannita*, verte sonreír y escuchar tu voz puede cambiar absolutamente mis días. Te amo infinitamente.

A mi gran amor, *Seba*. Gracias por ser mi sostén todos estos años, por ayudarme a no darme por vencida, por enseñarme a confiar en mí misma. Gracias por tu paciencia, por tu amor incondicional y por tu compañía eterna. Gracias por ser mi cable a tierra pero también mi compañero de sueños. Deseo estar con vos hasta el fin de los tiempos... no hay nada como ir juntos a la par! Te amo!

*Mis tíos. Teté e Ida*, las personas más generosas que he conocido. Su corazón es inmenso!. *Emi, Ale y José*, las personas más simples y felices. A los cinco, gracias! Gracias por su cariño fraternal, gracias por ser mi ejemplo de lucha y bondad desmedida.

Mi tío abuelo *Chucho* y mi padrino *Miguel Ángel*, ejemplos de docentes dedicados y apasionados. Tío, gracias por acompañarme siempre a pesar de la distancia y por motivarme constantemente a estudiar y crecer profesionalmente. Miguel gracias por acompañarme desde mis primeros pasos hasta hoy, por llenarme de cariño puro y leal.

*Mis primas: Lau, Noe, Eli y Magui* a quienes siento como hermanas. Lau y Noe ejemplos de madres dedicadas y amorosas. Eli y Magui, compañeras de aventuras para siempre!. A todas, infinitas gracias por estar siempre a mi lado, por ser mi sostén emocional y por tener siempre un consejo sabio para darme. Soy feliz cada vez que



comparto cosas con ustedes. Sus niños *Fran, Santi, Emma y Paquin* no sólo me hacen feliz sino que me enseñan cada día que el amor es lo más importante en la vida.

A mis primos *Ale y Franco* gracias por protegerme siempre. A mi sobri *Maxi*, escuchar tus palabritas me hace feliz!

A *Cristina, Jorge, Luchi, Juli, Caro* y el peque *Santino*. Si hay algo que agradezco de esta etapa de mi vida es haberme re-encontrado con ustedes. Espero que la vida nos permita compartir todos los momentos que perdimos. Los quiero!

A mis amigas de siempre: *Betty, Caro, Clau, Lu, Mai, Orne y Vane* que son mis hermanas de la vida. Porque verlas me llena el alma. Porque re-encontrarme con ustedes es un regalo para mi rutina. Porque sé que pueden pasar los años y puede ganarnos la distancia pero nuestra amistad es indestructible. Porque sé que cuento con ustedes para lo que sea. Porque han sido mi pañuelo y mis festejos. Las adoro!

A *Ceci y Nati*, las amigas que me regaló la facu. Gracias por su compañía incondicional, por su cariño y por ser mis pilares cuando Córdoba todavía no era mi lugar. Gracias por compartir conmigo sus hermosas familias. Las voy a querer toda la vida!. *Benja y Ele*, estar con ustedes me llena el corazón de alegría. Deseo con toda mi fuerza que sean inmensamente felices.

A *Gladis, José, Vale y Esti*. Gracias por acompañarme siempre, siempre, siempre. Porque compartir mis días con ustedes siempre es divertido!. *Gladis y José* su calidez de "padres adoptivos" y el cariño que me han dado es inmenso, siento que los conozco de toda la vida!. A todos, gracias por compartir conmigo su hermosa familia!

A mi querido cuñado, *Alfio*, gracias por compartir tu sencillez y tu solidaridad, gracias por recordarme que pequeñas cosas pueden cambiar el mundo.

A *Carlos y Norma* por estar presente y acompañarme desde niña. Por su generosidad y su cariño.

A *Marisa y Dani* por su cariño y su humildad vivificante.

Y bueno, tengo que dejar de escribir porque ya la piel de gallina me duele y mis ojos lagrimosos no me dejan ver bien lo que escribo. Ojalá algún día pueda devolverles a ustedes todo lo que me han dado. Ojalá el destino me encuentre con ustedes para toda la vida!.

Abreviaturas .....	1
Listado de ilustraciones y tablas .....	4
Resumen .....	7
1. Introducción .....	11
1.1. El cáncer en cifras .....	12
1.2. Los rasgos distintivos del cáncer .....	13
1.3. La inmunoección del cáncer .....	18
1.4. Mecanismos tumorales de evasión del sistema inmune .....	22
Estrategia 1: Lo esencial se vuelve invisible a los ojos del sistema inmune ...	22
Estrategia 2: Sobrevivir ante todo .....	24
Estrategia 3: Los tumores contraatacan .....	24
Estrategia 4: En la búsqueda de aliados .....	26
1.5. Los tres obstáculos principales para las células T contra el cáncer. ....	28
Linfocitos T senescentes .....	29
Linfocitos T agotados .....	33
¿Senescencia o agotamiento de Linfocitos T? .....	38
1.6. Macrófagos como jugadores clave en la progresión tumoral .....	40
Macrófagos y la iniciación tumoral .....	42
Macrófagos y angiogénesis .....	43
Macrófagos e invasión y metástasis .....	44
Macrófagos e inmunosupresión .....	45
2. Hipótesis y Objetivos .....	46

---

3. Resultados .....	49
I. Estudio fenotípico y funcional de Linfocitos T senescentes inducidos por tumores .....	50
Conclusiones I .....	70
II. Estudio de la modulación de monocitos/macrófagos mediada por Linfocitos T senescentes inducidos por tumores.....	72
Conclusiones II .....	98
4. Discusión .....	100
5. Materiales y Métodos .....	116
6. Referencias Bibliográficas .....	130
7. Producción Científica.....	145



## ABREVIATURAS

---

Ac(s)	Anticuerpo(s)
ADN	Ácido desoxirribonucleico
Ag(s)	Antígeno(s)
ANOVA	Análisis de la varianza
Bcl-2	(del inglés: <i>B- cell lymphoma 2</i> )
Blimp-1	(del inglés: <i>B- lymphocyte induced maturation protein-1</i> )
cAMP	adenosina monofosfato cíclico (del inglés: <i>cyclic adenosine monophosphate</i> )
CD	(del inglés: <i>cluster of differentiation</i> )
CDs	Células dendríticas
CMS	Células mieloides supresoras
CMH	Complejo mayor de histocompatibilidad
CMSP	Células mononucleares de gangre periférica humana
col.	Colaboradores
CTLA-4	(del inglés: <i>cytotoxic T-lymphocyte antigen 4</i> )
DAMPs	(del inglés: <i>damage-associated molecular pattern molecules</i> )
DMSO	Dimetil sulfóxido
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
ELISA	Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (del inglés: <i>enzyme-linked immunosorbent assay</i> )
Eomes	(del inglés: <i>eomesodermin</i> )
FMO	Control de fluorescencia (del inglés: <i>fluorescence minus one</i> )
FT(s)	Factor(es) de Transcripción
GITR	Receptor de TNF inducido por glucocorticoides (del inglés: <i>glucocorticoid-induced TNF receptor</i> )
H(s)	Hora(s)
HIF-1	Factor inducible por hipoxia (del inglés: <i>hypoxia inducible factor</i> )
HMEC	Células endoteliales de microvasculatura humana (del inglés: <i>human microvascular endothelial cells</i> )

IDO	Indolamina 2,3- <u>d</u> ioxigenasa
IFM	Intensidad de <u>f</u> luorescencia <u>m</u> edia
IFN- $\gamma$	Interferón gama ( <i>del inglés: <u>i</u>nterferon- <u>\gamma</u></i> )
Ig(s)	Inmunoglobulina(s)
IL-	Interleukina
iNOS	Enzima óxido nítrico sintetasa inducible ( <i>del inglés: <u>i</u>nducible <u>n</u>itric <u>o</u>xide <u>s</u>ynthase</i> )
IP	Ioduro de <u>p</u> ropidio
KLRG-1	( <i>del inglés: <u>k</u>iller cell <u>l</u>ectin-like <u>r</u>eceptor <u>G</u>1</i> )
LAG-3	( <i>del inglés: <u>l</u>ymphocyte <u>a</u>ctivation <u>g</u>ene-3</i> )
LiT	Linfocitos T
Li Th	Linfocitos T CD4+ cooperadores ( <i>del inglés: T <u>h</u>elper lymphocytes</i> )
LiT SIT	Linfocitos T <u>s</u> enescentes <u>i</u> nducidos por <u>t</u> umores
Li Tregs	Linfocitos T regulatorios (CD4+ CD25+ Foxp3+)
LCMV	Virus de la linfocoriomeningitis murina ( <i>del inglés: <u>l</u>ymphocytic <u>c</u>horiomeningitis <u>v</u>irus</i> )
LPS	Lipopolisacárido
mAc	Anticuerpo <u>m</u> onoclonal
MAPK	Protein-quinasas activadas por mitógenos ( <i>del inglés: <u>m</u>itogen-<u>a</u>ctivated <u>p</u>rotein <u>k</u>inase</i> )
Min(s)	Minuto(s)
MMPs	Metaloproteasas de matriz ( <i>del inglés: <u>m</u>atrix <u>m</u>etalloproteinases</i> )
Mo/Ma	Monocitos/Macrófagos
M1	Macrófagos tipo I o clásicamente activados
M2	Macrófagos tipo II o alternativamente activados
NFAT	( <i>del inglés: <u>n</u>uclear <u>f</u>actor of <u>a</u>ctivated <u>T</u>-cells</i> )
NF- $\kappa$ B	( <i>del inglés: <u>n</u>uclear <u>f</u>actor-<u>\kappa</u>B</i> )
NK	Células asesinas naturales ( <i>del inglés: <u>n</u>atural <u>k</u>iller</i> )
NO	Óxido Nítrico
PBS	Buffer fosfato salino
PD-1	( <i>del inglés: <u>p</u>rogrammed cell <u>d</u>eath-1</i> )
PMA	( <i>del inglés: <u>p</u>horbol 12-<u>m</u>yristate 13-<u>a</u>cetate</i> )

RI(s)	Receptor(es) inhibitorio(s)
RNI	Intermediarios reactivos de nitrógeno ( <i>del inglés: reactive nitrogen intermediates</i> )
ROS	Especies reactivas de oxígeno ( <i>del inglés: reactive oxygen species</i> )
Sbte.	Sobrenadante de cultivo
SI	Sistema inmune
SEM	Error estándar de la media ( <i>del inglés: standard error mean</i> )
SSC	Dispersión de la luz a 90°. Complejidad citoplasmática ( <i>del inglés: side scatter</i> )
TA	Temperatura Ambiente (25° C)
TAM(s)	Macrófago(s) asociados al tumor ( <i>del inglés: tumor-associated macrophages</i> )
T-bet	( <i>del inglés: T-box-containing protein expressed in T cells</i> )
TCR	Receptor específico de la célula T ( <i>del inglés: T-cell receptor</i> )
Tim-3	( <i>del inglés: T-cell immunoglobulin domain 3</i> )
TLR	Receptor tipo Toll ( <i>del inglés: Toll-like receptor</i> )
TNF	Factor de necrosis tumoral ( <i>del inglés: tumor necrosis factor</i> )
VEGF	Factor de crecimiento de endotelio vascular ( <i>del inglés: vascular endothelial growth factor</i> )
VIH	Virus de la Inmunodeficiencia Humana
VHC	Virus de la Hepatitis C
VHB	Virus de la Hepatitis B

Introducción

Figura 1. <i>Los rasgos distintivos del cáncer</i> .....	14
Figura 2. <i>La inmunoección del cáncer</i> .....	19
Figura 3. <i>Mecanismos tumorales de inmuno-evasión</i> .....	23
Figura 4. <i>Agotamiento de LiT durante infecciones crónicas</i> .....	35
Figura 5. <i>Características generales de LiT senescentes versus LiT agotados</i> .....	39
Figura 6. <i>El yin y el yang de los macrófagos asociados al tumor en la progresión tumoral y su regulación por las células leucocitarias infiltrantes</i> .....	41
Figura 7. <i>Macrófagos como jugadores claves en la progresión tumoral</i> .....	43

Resultados

**Sección I: Estudio fenotípico y funcional de Linfocitos T senescentes inducidos por tumores**

Esquema Experimental 1. <i>Inducción de senescencia de LiT CD4+ y CD8+ humanos por co-incubación con células tumorales</i> .....	51
Figura 1. <i>Inducción de senescencia en LiT CD4+ y CD8+ mediada por células tumorales</i> .....	51
Figura 2. <i>LiT CD4+ y CD8+ SIT constituyen una población de memoria efectora o terminalmente diferenciadas</i> .....	53
Figura 3. <i>LiT CD4+ y CD8+ SIT expresan elevados niveles de los receptores inhibitorios Tim-3 y KLRG-1, pero no de PD-1</i> .....	55
Figura 4. <i>LiT CD4+ y CD8+ SIT no aumentan la expresión de PD-1 aún frente a estimulación</i> .....	56
Figura 5. <i>LiT CD4+ y CD8+ SIT no producen citoquinas efectoras</i> .....	57
Figura 6. <i>LiT CD4+ y CD8+ SIT no secretan citoquinas</i> .....	58
Figura 7. <i>LiT CD8+ SIT expresan granzimas A, B y perforinas</i> .....	59
Figura 8. <i>Los LiT CD8+ SIT son incapaces de degranular</i> .....	60
Figura 9. <i>LiT CD4+ y CD8+ SIT expresan menores niveles de la cadena zeta del complejo TCR/CD3</i> .....	61



Figura 10. <i>LiT CD4+ SIT expresan niveles reducidos o nulos de factores de transcripción T-bet y Blimp-1</i> .....	62
Figura 11. <i>LiT CD8+ SIT expresan niveles reducidos o nulos de factores de transcripción T-bet, Blimp-1 y Eomes</i> .....	63
Figura 12. <i>LiT CD8+ SIT no producen IL-17</i> .....	64
Figura 13. <i>LiT CD4+ y CD8+ SIT suprimen in vitro la proliferación policlonal de LiT autólogos a tiempos muy tempranos de co-cultivo</i> .....	65
Figura 14. <i>LiT CD4+ y CD8+ SIT muestran una mayor expresión de PD-L1</i> .....	66
Figura 15. <i>LiT CD4+ y CD8+ SIT muestran una mayor expresión de Gal-9 en superficie</i> .....	68
Figura 16. <i>LiT CD4+ y CD8+ SIT no expresan Cadherina E en superficie</i> .....	69
Figura 17. <i>Conclusiones I: LiT CD4+ y CD8+ SIT son una población de LiT con funcionalidad reducida pero con potencial inmuno-modulatorio</i> .....	71

## **Sección II: Estudio de la modulación de monocitos/macrófagos mediada por Linfocitos T senescentes inducidos por tumores**

Esquema Experimental 2. <i>Co-cultivo de LiT CD4+ y CD8+ SIT con monocitos autólogos purificados</i> .....	72
Figura 18. <i>LiT CD4+ y CD8+ SIT inducen activación clásica de Mo/Ma</i> .....	74
Figura 19. <i>LiT CD4+ y CD8+ SIT favorecen la producción de ROS y NO por parte de Mo/Ma</i> .....	76
Figura 20. <i>LiT CD4+ y CD8+ SIT promueven la producción de citoquinas pro-inflamatorias por Mo/Ma</i> .....	78
Figura 21. <i>Los Mo/Ma son la única fuente productora de Citoquinas pro-inflamatorias en los co-cultivos de con LiT SIT</i> .....	79
Figura 22. <i>LiT CD4+ y CD8+ SIT no modifican la expresión de moléculas involucradas en la señalización inducida por LPS en Mo/Ma</i> .....	80
Figura 23. <i>LiT CD4+ y CD8+ SIT promueven una mayor activación de la vía clásica/canónica de NF-<math>\kappa</math>B en Mo/Ma</i> .....	83
Figura 24. <i>LiT CD4+ y CD8+ SIT promueven la producción factores pro-angiogénicos por Mo/Ma</i> .....	85
Figura 25. <i>Factores pro-angiogénicos en los co-cultivos de Mo/Ma con LiT SIT son producidos exclusivamente por Mo/Ma</i> .....	86

Figura 26. Efecto de los sobrenadantes de co-cultivos de Mo/Ma con LiT SIT o LiT controles en la formación de túbulos.....	88
Figura 27. Efecto de los sobrenadantes de co-cultivos de Mo/Ma con LiT SIT o LiT controles en procesos de cicatrización mediados por células endoteliales.	89
Figura 28. Efecto de los sobrenadantes de co-cultivos de Mo/Ma con LiT SIT o LiT controles en la supervivencia de células tumorales.....	91
Figura 29. La modulación de Mo/Ma mediada por LiT SIT requiere el contacto Mo/Ma-LiT.....	92
Figura 30. Estudio fenotípico de LiT CD4+ o CD8+ SIT y Mo/Ma.....	94
Figura 31. La producción de IL-1 $\beta$ y VEGF-A por Mo/Ma modulados por LiT SIT disminuye en presencia de lactosa.....	95
Figura 32. LiT SIT modulan la secreción de citoquinas y factores pro-angiogénicos por parte de Mo/Ma a través de un mecanismo que involucra las vías Tim-3/Gal-9 y CD40L/CD40.....	97
Figura 33. Conclusiones II: LiT SIT modulan la activación de Mo/Ma.....	99

## Discusión

Figura 1. Una visión integral: Linfocitos T CD4+ y CD8+ senescentes inducidos por tumores (SIT): una población con capacidad moduladora de la respuesta inmune.....	114
---	-----

## Materiales y Métodos

Tabla 1. Medios de cultivo empleados para el mantenimiento de líneas tumorales en cultivo.....	117
Tabla 2. Anticuerpos contra moléculas de superficie.....	121
Tabla 3. Anticuerpos contra citoquinas intracelulares.....	122
Tabla 4. Anticuerpos contra las proteínas intracelulares indicadas.....	123
Figura 1. Representación esquemática del sistema de captura y de detección de factores solubles para su cuantificación por citometría de flujo.....	125



14

## **RESUMEN**



Los tumores sólidos son extensamente infiltrados por células del sistema inmune (SI). Dentro del microambiente tumoral, una dinámica interacción entre las células infiltrantes y las células neoplásicas, como asimismo entre las células infiltrantes entre sí, resulta en el establecimiento de una respuesta inmune *in situ*, que generalmente favorece la progresión tumoral<sup>1,2</sup>. Esto se debe a que las células tumorales emplean diversos mecanismos que actúan en concierto para evadir la respuesta inmune. En este sentido, se ha demostrado que líneas tumorales de diversos orígenes inducen senescencia en Linfocitos T (LiT) humanos de donantes sanos<sup>3,4</sup>. En concordancia con estos resultados, se ha reportado que LiT con características de senescencia se encuentran incrementados en sangre periférica e infiltrando tumores primarios y metástasis en pacientes con cáncer<sup>5,6</sup>. Asimismo, se ha reportado que LiT senescentes son capaces de suprimir respuestas linfoproliferativas<sup>3-5</sup>, sugiriendo que su presencia en el nicho tumoral podría favorecer la progresión tumoral.

Basándonos en reportes previos y en resultados de nuestro grupo de trabajo, construimos la *hipótesis* que forma parte de esta Tesis Doctoral. El microambiente tumoral conforma una red muy compleja en la cual las células interaccionan entre sí, ya sea por medio de factores solubles o moléculas de superficie. Así, postulamos que las células cancerosas pueden llevar a los LiT CD4+ y CD8+ a un estado *disfuncional* y a adquirir un fenotipo que se correlaciona con la *senescencia*. Estos LiT senescentes que están arrestados en el ciclo celular y que además son capaces de suprimir una respuesta linfoproliferativa de células T, podrían modular tanto en sangre periférica como en el tumor la respuesta mediada por otras células del SI, tanto innato como adaptativo favoreciendo el desarrollo tumoral. De esta manera, *la inducción de senescencia en los LiT podría plantearse como un nuevo mecanismo de evasión de la respuesta inmune*.

Utilizando como modelo experimental un sistema de inducción de senescencia *in vitro* desarrollado en nuestro laboratorio, se planteó como objetivo general evaluar si LiT CD4+ y CD8+ senescentes inducidos por tumores (LiT SIT) eran capaces de modular la respuesta de otras células del SI impactando de esta manera en la respuesta inmune frente a tumores. En consecuencia, en primer lugar se propuso estudiar características fenotípicas y funcionales de la población de LiT SIT que puedan impactar en la



modulación de otras poblaciones celulares. En segundo lugar, dado que macrófagos y LiT son células claves en la progresión tumoral, se propuso evaluar si LiT SIT eran capaces de modular monocitos/macrófagos (Mo/Ma) humanos.

La evaluación fenotípica y funcional de LiT SIT reveló que estas células constituyen una población *disfuncional per se*, ya que son incapaces de producir citoquinas como IL-2, IFN- $\gamma$ , TNF, IL-6 e IL-10. Además, LiT CD8+ SIT presentan una capacidad de degranulación disminuída, sugiriendo que su capacidad citotóxica está afectada. En concordancia con su fenotipo de senescencia, que incluye pérdida de la expresión de las moléculas co-estimuladoras CD27 y CD28, y acortamiento de sus telómeros, dichas células expresan altos niveles de los receptores inhibitorios Tim-3 y KLRG-1, pero no de PD-1. Además, exhiben niveles reducidos de la cadena  $\zeta$  del complejo de señalización del TCR. Por otro lado, factores de transcripción involucrados en la diferenciación y función efectora de LiT se encuentran disminuídos o ausentes en LiT SIT. Confirmando resultados previos<sup>3-5</sup>, se observó que los LiT SIT suprimen la proliferación de LiT autólogos. Interesantemente, el estudio cinético de supresión de la linfoproliferación realizado reveló que la supresión mediada por LiT SIT es un evento que ocurre tempranamente, sugiriendo que los LiT SIT constituyen, además, una población *regulatoria per se*. De hecho, se demostró que un gran porcentaje de los LiT SIT, aún en ausencia de estímulo, expresan en superficie moléculas inmuno-moduladoras como PD-L1 (ligando de PD-1) y Galectina-9 (ligando de Tim-3) que han sido implicadas en el control de respuestas linfoproliferativas.

Por otra parte, se demostró que LiT CD4+ y CD8+ SIT son capaces de modular la activación de Mo/Ma autólogos hacia un perfil pro-inflamatorio y pro-angiogénico. Así, luego del co-cultivo con los LiT SIT, los Mo/Ma expresaron mayores niveles de la molécula CD16 (marcador de macrófagos M1, pro-inflamatorios) y menores de la molécula CD206 (marcador de macrófagos M2, anti-inflamatorios). Sin embargo, no mostraron cambios en su capacidad fagocítica ni en la expresión de moléculas co-estimuladoras o del complejo mayor de histocompatibilidad. En concordancia con su fenotipo de activación clásica (M1), un mayor porcentaje de los Mo/Ma modulados por los LiT SIT produjeron especies reactivas de oxígeno y nitrógeno. Además, secretaron mayores niveles de citoquinas pro-inflamatorias tales como TNF, IL-6 e IL-1 $\beta$  y menores cantidades de la citoquina anti-inflamatoria IL-10. En relación con su activación hacia un

perfil inflamatorio, Mo/Ma modulados por los LiT SIT exhibieron una mayor activación de la vía canónica de NF- $\kappa$ B. De acuerdo con reportes que demuestran una estrecha relación entre la producción de citoquinas pro-inflamatorias, la activación de la vía de NF- $\kappa$ B y la producción de factores angiogénicos, se encontró que los Mo/Ma incrementaron la producción de IL-8, VEGF-A y MMP-9 luego del cultivo con los LiT SIT e interesantemente, mostraron cantidades reducidas del factor angiostático IP-10. De acuerdo con el rol bien establecido de estos factores en la progresión tumoral, se observó que mediador/es presente/s en los sobrenadantes de co-cultivos de los Mo/Ma con LiT SIT promueve/n la sobrevida de células tumorales y la formación de túbulos por parte de células endoteliales humanas en ensayos *in vitro*. En concordancia con la incapacidad de los LiT SIT para producir citoquinas, se demostró que la modulación de los Mo/Ma por dichas células requiere el contacto Mo/Ma-LiT SIT. Aunque los LiT CD4+ SIT muestran un comportamiento diferente al de los LiT CD8+ SIT, el bloqueo de la interacción entre dichas células con anticuerpos monoclonales dirigidos contra las moléculas Tim-3 y CD40L, diferencialmente expresadas en los LiT SIT, redujo significativamente la producción de citoquinas pro-inflamatorias y factores angiogénicos en la mayoría de los donantes evaluados. Aunque no es posible descartar vías adicionales, estos resultados indican que las vías Tim-3/Gal-9 y CD40L/CD40 están implicadas en la modulación de los Mo/Ma inducida por los LiT SIT.

Los resultados obtenidos en esta tesis doctoral permiten demostrar que los LiT SIT son jugadores relevantes en la compleja interacción entre células tumorales y células del SI infiltrantes que potencialmente favorece la progresión tumoral. Por ello, estas interacciones deberían ser consideradas con el fin de adaptar mejor la inmunoterapia contra el cáncer.

**Palabras Clave:** *Linfocitos-T-senescentes, monocitos/macrófagos, tumor.*

# INTRODUCCIÓN

El cáncer es la principal causa de muerte a escala mundial. La Organización Mundial de la Salud (OMS) ha reportado que a nivel mundial, durante el año 2012 el número de defunciones ocurridas por cáncer alcanzó los 8,2 millones.

De acuerdo a las estimaciones realizadas por la Agencia Internacional de Investigación por el Cáncer, la Argentina se encuentra dentro del rango de países con incidencia de cáncer media-alta (172.3-242.9 casos cada 100.000 habitantes en el año 2012). Esta estimación corresponde a más de 100.000 casos nuevos de cáncer en ambos sexos por año, con porcentajes similares tanto en hombres como en mujeres. En Argentina, los tumores malignos constituyen la principal causa de muerte entre los 40 y los 64 años, y la segunda en los grupos de 5 a 39 años y en mayores de 64 (Fuente: Instituto Nacional del Cáncer, INC, Ministerio de Salud de la Nación).

El cáncer se inicia con la transformación de una célula normal en tumoral y es un proceso multifásico que suele consistir en la progresión de una lesión precancerosa a un tumor maligno. Estas alteraciones son el resultado de la interacción entre factores genéticos del paciente y agentes externos como carcinógenos químicos, físicos y biológicos. Dichos agentes externos que han sido definidos por la OMS son, la mayoría, prevenibles.

En los últimos años, se han realizado grandes avances que han permitido un mejor entendimiento de las bases moleculares y del rol del SI en la progresión tumoral. Sin embargo, las cifras de incidencia y muerte por cáncer indican claramente que todavía quedan muchos obstáculos por resolver. La investigación básica en inmunología tumoral constituye un pilar fundamental en el que se apoya actualmente la mayoría de los adelantos en la terapéutica del cáncer. El desafío consiste en potenciar o mejorar la respuesta inmune anti-tumoral, disminuir la inmuno-supresión y evitar la angiogénesis. De esta manera, se podría generar un rechazo del tumor o bien un estado de equilibrio entre hospedador-tumor que convierta al cáncer en una enfermedad crónica controlada con la que el paciente pueda vivir.

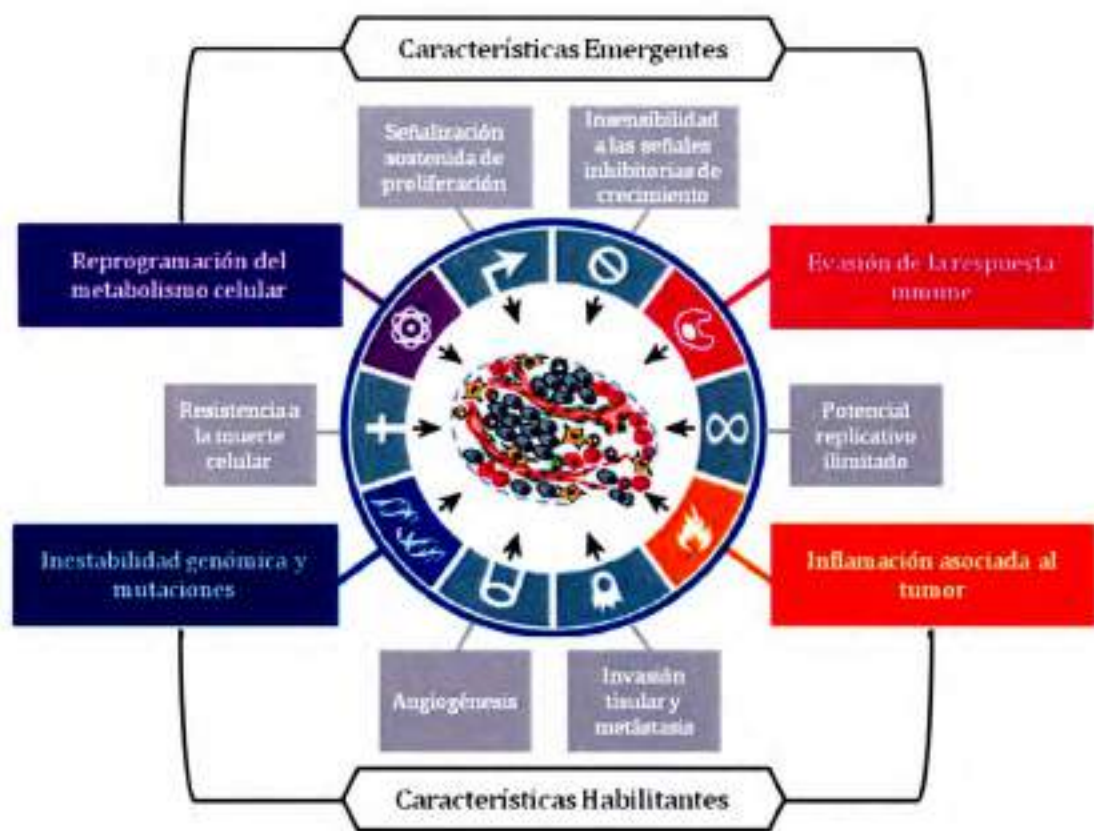
---



Los tumores sólidos están compuestos por células neoplásicas, colectivamente llamadas *parénquima*, y elementos no tumorales, el *estroma*, que es altamente complejo y está compuesto por: células madre mesenquimales, fibroblastos, células del sistema inmune tanto innato como adaptativo, vasos sanguíneos y linfáticos y células perivasculares mesenquimales (pericitos), todos embebidos en una matriz extracelular<sup>7</sup>.

La evolución de células recientemente transformadas constituye un proceso que involucra múltiples pasos y la adquisición de rasgos característicos que son el sello de una célula maligna. Estas características han sido sintetizadas por Hanahan y Weinberg<sup>8</sup> quienes sugirieron que el inmenso catálogo de genotipos de células tumorales es una manifestación de seis alteraciones esenciales en la fisiología celular que colectivamente comandan el crecimiento maligno (Figura 1). Las primeras cuatro características incluyen: (a) *autosuficiencia en las señales de crecimiento*, que se traduce en una sostenida señalización de proliferación; (b) *insensibilidad a las señales inhibitorias de crecimiento*; (c) *resistencia a la muerte celular programada* y (d) *potencial replicativo ilimitado*. Todas ellas representan modificaciones **intrínsecas** en la capacidad replicativa de las células transformadas, que dependen en parte de mutaciones somáticas progresivas o modificaciones epigenéticas en tumores en evolución. Las otras dos características: (e) *angiogénesis sostenida* y (f) *invasión tisular y metástasis* constituyen una capacidad **adquirida** de las células tumorales para crecer y diseminarse a sitios distantes a través de la modificación de su microambiente (Figura 1).

Estudios más recientes sugieren que dos atributos adicionales de las células tumorales están involucrados en la patogénesis de algunos o tal vez todos los cánceres. Uno de ellos consiste en la *capacidad de modificar o reprogramar el metabolismo celular* con el fin de apoyar más eficazmente la proliferación neoplásica. El segundo permite que las células cancerosas puedan *evadir la destrucción inmunológica* mediada por linfocitos T y B, macrófagos, y células asesinas naturales (células NK, del inglés: *natural killer*). Ambos atributos facilitan el desarrollo y la progresión tumoral por lo que en la actualidad son considerados *características distintivas emergentes* del cáncer<sup>9</sup> (Figura 1).



**Figura 1.** *Los rasgos distintivos del cáncer.* La mayoría, si no todos, los tipos de cáncer adquieren el mismo conjunto de capacidades funcionales durante su desarrollo, que se resumen en diez características distintivas que contribuyen a la progresión tumoral. En gris, están representadas las seis características inicialmente descritas por Hanahan y Weinberg en el año 2000. Dichas características representan cualidades autónomas, tanto intrínsecas como adquiridas, de las células tumorales.

En violeta y rosa, están representadas las características autónomas de las células tumorales, recientemente propuestas por Hanahan y Weinberg como características **emergentes** del cáncer.

En azul y naranja, se resaltan las características "habilitantes" del cáncer.

*Adaptado de: Hanahan D. y Weinberg R.A., Cell 2011.*

Por otro lado, se ha demostrado que las células tumorales poseen atributos habilitantes que facilitan la adquisición de las características distintivas arriba mencionadas. Uno de estos atributos "habilitantes" es el desarrollo de la inestabilidad genómica que genera mutaciones aleatorias, incluyendo rearrreglos cromosomales, que dotan a las células cancerosas con las alteraciones genéticas que conducen a la progresión tumoral. El segundo atributo quizás el más estudiado durante la última década, está representado por la inflamación asociada al tumor<sup>9</sup> (Figura 1). En este sentido, numerosos trabajos han demostrado que un componente inflamatorio es una característica común a la mayoría de, sino todos, los tumores sólidos; aún aquellos que



no están epidemiológicamente relacionados a procesos inflamatorios crónicos<sup>2</sup>. La conexión entre inflamación y cáncer es bidireccional. Evidencias demuestran que procesos inflamatorios crónicos como aquellos asociados a infecciones, autoinmunidad y obesidad, entre otros, pueden incrementar la velocidad de mutaciones e inestabilidad genómica, enviando a células normales a una trayectoria tumorigénica. Asimismo, el daño en el ADN conduce al desarrollo de una respuesta inflamatoria y así promueve la tumorigénesis<sup>10,11</sup>. Por otro lado, una fuerte respuesta inflamatoria puede iniciarse luego de la terapia. En este sentido, se ha demostrado que la radiación y la quimioterapia al causar muerte masiva de células tumorales y tejidos adyacentes, gatillan una respuesta inflamatoria similar a la de los procesos de cicatrización<sup>2,12,13</sup>.

Habitualmente, la inflamación se manifiesta en respuesta a un daño de las células o tejidos de un organismo provocado por agentes patógenos o por cualquier otro agresor de naturaleza biológica, física, química o mecánica. La respuesta inflamatoria surge entonces con el fin de aislar y/o destruir al agente dañino, como así también para reparar el tejido dañado. Se trata de una respuesta inespecífica, durante la cual ocurren tres hechos fundamentales: aumento del aporte sanguíneo a la zona afectada, incremento en la permeabilidad vascular y posteriormente la llegada de células del SI innato y adaptativo. En el curso de una herida aséptica o en respuesta a una infección, las células inflamatorias aparecen transientemente. En contraste, en sitios de inflamación crónica como son las neoplasias, dichas células persisten y contribuyen al mantenimiento del microambiente tumoral. De hecho, se ha demostrado que los tumores son extensamente infiltrados por células leucocitarias del SI innato (incluyendo macrófagos, neutrófilos, células supresoras mieloides, células dendríticas y células NK) y del SI adaptativo (que incluyen linfocitos T y B), que permanecen en estrecho contacto con células neoplásicas y otras células estromales (revisado por Fridman y col.<sup>1</sup>). Las poblaciones celulares que infiltran los tumores se comunican por medio de contacto directo o a través de la producción de citoquinas, quemoquinas, prostaglandinas y factores de crecimiento que pueden actuar de forma autócrina y/o parácrina sosteniendo el microambiente inflamatorio. Así, los tumores son descritos como *"heridas que nunca cicatrizan"*.

La inflamación contribuye a la adquisición de múltiples capacidades distintivas del cáncer mediante el suministro de moléculas bioactivas al microambiente tumoral.

Dentro de dichas moléculas se pueden incluir: factores de crecimiento que sostienen el potencial proliferativo; factores de supervivencia que limitan la muerte de las células tumorales; factores pro-angiogénicos y enzimas que modifican la matriz extracelular facilitando la angiogénesis, la invasión y la metástasis y finalmente citoquinas y quemoquinas que amplifican el estado inflamatorio, asegurando el reclutamiento continuo de células inflamatorias al nicho tumoral (revisados por Grivennikov y col.<sup>2</sup>).

Adicionalmente las células inflamatorias, particularmente macrófagos y células supresoras de origen mieloide, pueden liberar especies reactivas de oxígeno e intermediarios reactivos de nitrógeno que inducen daño en el ADN e inestabilidad genómica<sup>14</sup>. De manera que las células inflamatorias contribuyen también al desarrollo y mantenimiento de una de las características "habilitantes" del cáncer. Asimismo, especies reactivas de oxígeno pueden incrementar la expresión y activación de metaloproteasas de matriz (MMPs, *del inglés: matrix metalloproteinases*), facilitando los procesos de invasión y metástasis<sup>15</sup>.

Otro mecanismo a través del cual la inflamación afecta a la progresión tumoral involucra el llamado "cambio angiogénico" que permite al tumor un mayor suministro sanguíneo favoreciendo su crecimiento. Este mecanismo es gatillado por la hipoxia (condición que se genera ante baja tensión de oxígeno en un tejido) y depende en gran medida del reclutamiento de monocitos/macrófagos al nicho tumoral. En respuesta a señales hipóxicas, los macrófagos asociados al tumor producen citoquinas, quemoquinas y factores pro-angiogénicos que contribuyen al crecimiento tumoral (revisados por Lewis y Pollard<sup>16</sup>). Así, la presencia de macrófagos infiltrando el tumor, parece ser "obligatoria" para gatillar procesos de angiogénesis, invasión y metástasis<sup>17</sup>. Reforzando este concepto, algunos autores proponen que dichas células constituyen uno de los actores principales de la inflamación asociada a tumores y por lo tanto de la progresión tumoral<sup>11,18</sup>.

Asimismo, se ha demostrado que la inflamación asociada al tumor participa en la supresión de respuestas inmunológicas anti-tumorales y afecta la respuesta a las drogas quimioterapéuticas y/o terapias hormonales<sup>2,10</sup>.

A la luz de estos datos, se puede concluir que las respuestas inflamatorias juegan roles decisivos en los diferentes estadios del desarrollo tumoral, incluyendo: la



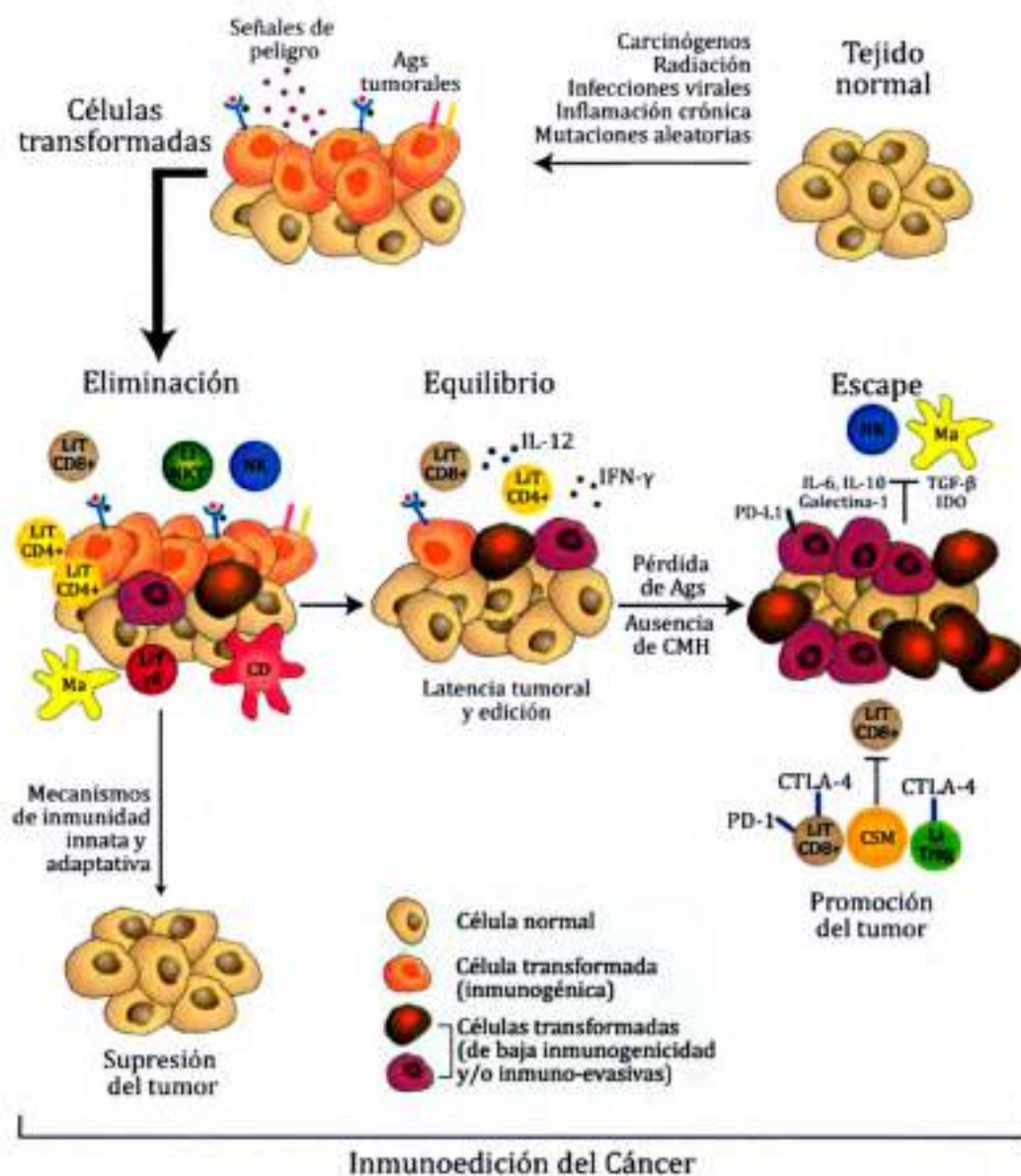
iniciación, la promoción y progresión tumoral como así también la conversión maligna, la invasión y la metástasis.

Además de las células cancerosas, los tumores exhiben otra dimensión de complejidad ya que contienen un repertorio diverso de células reclutadas, aparentemente normales, que contribuyen a la adquisición de los rasgos distintivos a través de la creación del "microambiente tumoral". Así, la biología de un tumor sólo puede ser comprendida a través del estudio tanto individual como colectivo de las distintas poblaciones celulares que componen el nicho tumoral. El estudio de las interacciones entre células neoplásicas y células del SI como las interacciones de células del SI entre si, resulta trascendental para un mejor entendimiento de la contribución de este sistema a la progresión tumoral.

La idea de que el SI es capaz de controlar el cáncer ha sido debatida durante los últimos 100 años. La noción de que el SI puede proteger al hospedador de enfermedades neoplásicas fue inicialmente propuesta por Paul Ehrlich en 1909. Sin embargo, en ese momento poco se sabía acerca de la composición y función del SI por lo que resultó casi imposible validar esta hipótesis. En los años 50, Burnet y Thomas introducen el concepto de "*inmunovigilancia del cáncer*" y sugieren que la inmunidad adaptativa era responsable de prevenir el desarrollo de cáncer en hospedadores inmunocompetentes (revisado por Dunn, Old y Schreiber<sup>19</sup>).

El interés en esta teoría fue reavivado hace unos años, con un trabajo pionero de Shankaran y col.<sup>20</sup>. En este trabajo, los autores demostraron que LiT e IFN- $\gamma$  (*del inglés: interferon gamma*) colaboran para prevenir el desarrollo de tumores tanto espontáneos como inducidos por carcinógenos. Además observaron que tumores inducidos en animales inmunodeficientes fueron más inmunogénicos que aquellos desarrollados en animales inmunocompetentes cuando ambos tumores fueron transplantados en receptores alogénicos inmunocompetentes. Este descubrimiento reveló que el SI, además de ser esencial para prevenir el desarrollo de tumores, paradójicamente condiciona la inmunogenicidad del tumor, favoreciendo un eventual crecimiento de aquellos tumores que son más capaces de escapar a la detección inmunológica. Así, los autores demostraron un rol dual anti- y pro- tumoral del SI en tumores en desarrollo. Este hallazgo, llevó a los autores a postular el concepto de "*inmunoección*" del cáncer que actualmente reemplaza al de "*inmunovigilancia*" acuñado hace décadas.

De acuerdo con esta hipótesis, el proceso de "*inmunoección*" del cáncer se compone de tres fases que Dunn, Old y Schreiber<sup>19</sup> han denominado "*las tres E de la inmunoección del cáncer*": Eliminación, Equilibrio y Escape (Figura 2).



**Figura 2. La inmunomodulación del cáncer.** En su forma más compleja, la inmunomodulación del cáncer consiste de tres fases secuenciales: *eliminación*, *equilibrio* y *escape*. En la fase de *eliminación*, células de la inmunidad innata (macrófagos, células NK y NKT, LIT  $\gamma\delta$ -gamma/delta-) y adaptativa (LIT CD4+ y CD8+) trabajan en conjunto para destruir los tumores en desarrollo mucho antes de que sean clínicamente evidentes. Muchas de las moléculas y células inmunes que participan en la *fase de eliminación* han sido identificadas, aunque se necesita más trabajo para determinar su secuencia de acción exacta. Si esta fase es efectiva, se contiene el crecimiento del tumor. Si las células tumorales no se destruyen en la fase de *eliminación* puede entonces pasar a la *fase de equilibrio*, en la cual el crecimiento tumoral es prevenido por mecanismos inmunológicos. LIT, através de la secreción de IL-12 (del inglés: *interleukin -12*) e IFN- $\gamma$ , mantienen a las células tumorales en este estado de latencia funcional y al mismo tiempo, editan a las células tumorales favoreciendo el desarrollo de un perfil tumoral menos inmunogénico. La fase de *equilibrio* podría también representar una etapa final del proceso de cáncer, debido a que puede mantener cánceres ocultos durante toda la vida del huésped. Sin embargo, como consecuencia de una constante presión selectiva por parte del sistema inmune sobre las células tumorales genéticamente inestables, variantes tumorales adquieren características que les permiten escapar del control del sistema [(i) pérdida de Ags que evitan que sean reconocidos por la inmunidad adaptativa, (ii) insensibilidad a mecanismos efectores inmunes, o (iii)



inducción un estado de inmunosupresión dentro del microambiente tumoral]. Estas células tumorales pueden entonces entrar en la *fase de escape*, y emergen para causar un tumor en crecimiento, clínicamente evidente. [Ag(s), antígeno(s) / CMH, complejo mayor de histocompatibilidad]

Adaptado de: Schreiber R.D. y col. *Science* 2011.

La primera fase, *Eliminación*, esencialmente se refiere a un evento de "inmunovigilancia" del tumor, en la cual células del SI innato y adaptativo trabajan en conjunto para reconocer y destruir tumores en desarrollo antes de que los mismos se vuelvan clínicamente aparentes. Los mecanismos a través de los cuales el SI es alertado de la presencia de un tumor en desarrollo no han sido completamente dilucidados. Sin embargo, se ha identificado que "señales de peligro" como la liberación de interferones tipo I que ocurre tempranamente en tumores en desarrollo, podría activar a células dendríticas y así promover la inducción de una respuesta inmune adaptativa<sup>21</sup>. En los últimos años, se ha demostrado que tejidos dañados y las células tumorales en proceso de muerte liberan moléculas actualmente conocidas como DAMPs (patrones moleculares asociados a daño, *del inglés: damage-associated molecular pattern molecules*). Dichas moléculas son capaces de activar fundamentalmente al SI innato a través de receptores altamente conservados como los receptores tipo Toll (TLRs, *del inglés: Toll-like receptors*)<sup>22</sup>. La activación del SI innato conduce además, a la liberación de citoquinas y quemoquinas que facilitan el desarrollo de una respuesta inmune adaptativa específica contra el tumor. Así, la activación coordinada de ambos sistemas es necesaria para proteger al hospedador de tumores en desarrollo. Si la destrucción del tumor es completa, la fase de eliminación representa, al mismo tiempo, el principio y el final del proceso de *inmunoedición*. Dado que la *fase de eliminación* precede a la aparición clínica de tumores, aún no ha sido directamente observada *in vivo*. Sin embargo, su existencia se ha inferido de hechos como los siguientes: (a) aparición más temprana o mayor incidencia de tumores en animales que carecen de ciertas subpoblaciones del SI; (b) por estudios comparativos de iniciación y crecimiento tumoral, como así también aparición de metástasis entre animales inmunodeficientes y animales inmunocompetentes utilizados como control (revisados por Vesely y col.<sup>23</sup>); (c) por la mayor frecuencia de cáncer documentada en ancianos donde la función del SI comienza a declinar<sup>24</sup> y (d) por la asociación de procesos neoplásicos e inmunodeficiencias tanto primarias como adquiridas<sup>25-28</sup>. Estudios demuestran que pacientes con inmunodeficiencias primarias exhiben una mayor incidencia de cáncer<sup>26</sup>.

Además, Sarcoma de Kaposi y Linfoma no-Hodgkin son algunas de las malignidades prototípicamente asociadas a la infección por el Virus de Inmunodeficiencia Humana (VIH)<sup>27,28</sup>.

Respecto a la segunda fase, *Equilibrio*, se ha propuesto que es un período más prolongado en el cual el SI y aquellas células tumorales que hayan sobrevivido a la *fase de eliminación*, entran en un equilibrio dinámico durante el cual, el SI previene el crecimiento del tumor y al mismo tiempo condiciona la inmunogenicidad de las células tumorales. La *fase de equilibrio* representa así un estado de "latencia tumoral", cuyo crecimiento se encuentra controlado específicamente por el SI del hospedador. Al respecto, Koebel y col.<sup>29</sup> utilizando un modelo murino de carcinogénesis química mediada por la inyección del carcinógeno 3'-*metilcolantreno* (MCA), demostraron que los componentes del SI adaptativo son específicamente quienes mantienen oculto al tumor en un estado de equilibrio, donde las células neoplásicas escasamente proliferan. Además, los autores demostraron que este *equilibrio* es un componente esencial de la *inmunoección* del cáncer ya que las células tumorales en equilibrio son altamente inmunogénicas ("*no editadas*"), mientras que aquellas que comienzan a replicarse y progresan hacia la *fase de escape* atenúan su inmunogenicidad ("*editadas*"). Este trabajo ha aportado evidencia científica de la *inmunoección* del cáncer, ya que ha demostrado que los mecanismos inmunológicos que participan en cada una de las etapas de esta "edición de un tumor" son diferentes.

En la tercera fase, *Escape*, las células tumorales que han burlado el reconocimiento y la destrucción por el SI en las *fases de eliminación y equilibrio* emergen como un tumor en progresivo crecimiento, clínicamente aparente en hospedadores inmunocompetentes. Esta progresión de la *fase de equilibrio* a la *fase de escape* puede ocurrir porque las células tumorales cambian en respuesta a las funciones de edición mediadas por el SI del hospedador o bien porque el SI del hospedador sufre cambios en respuesta a la inmuno-supresión o a la disfunción mediada por el tumor, eventos que se describen en la literatura como *mecanismos de evasión de la respuesta inmune* y que serán desarrollados en detalle más adelante.



## 1. 4. MECANISMOS DE EVASIÓN DE LA RESPUESTA INMUNE EN PROCESOS TUMORALES

---

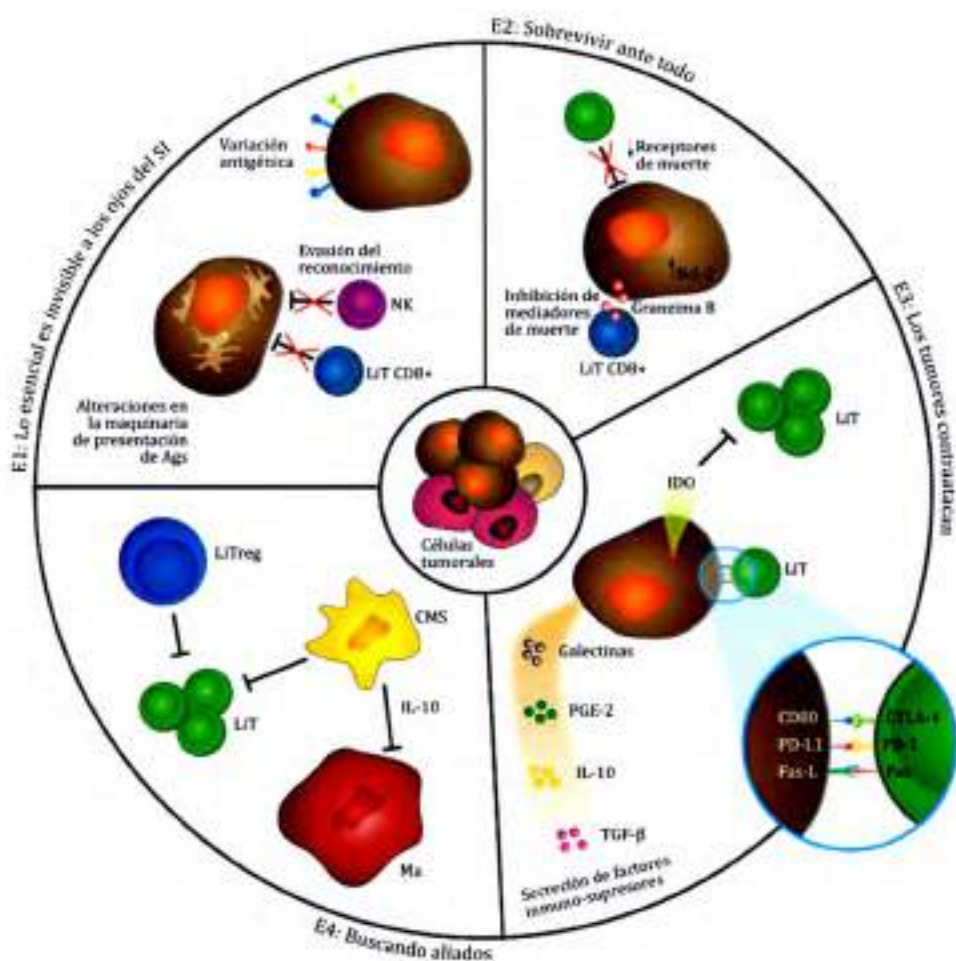
En los últimos años, numerosos estudios han demostrado que células tumorales emplean diversos mecanismos que actúan en concierto para evadir la respuesta inmune. En este sentido, se ha demostrado que los tumores emplean cuatro grandes estrategias: 1) **evitar el reconocimiento** por células del SI; 2) **resistir a la muerte** inducida por células del SI; 3) **suprimir en forma directa** la respuesta inmune adaptativa y 4) **modificar el microambiente tumoral** a través de la inducción de cambios en las diferentes poblaciones celulares que co-habitan el nicho tumoral con el objetivo de perpetuar la inmunosupresión inducida por el tumor (Figura 3). Así, las tres primeras estrategias representan mecanismos *intrínsecos* de las células tumorales. Mientras que la cuarta estrategia comprende un mecanismo indirecto o *extrínseco*, dado que la supresión de la respuesta inmune en el tumor estaría mediada por otras poblaciones celulares infiltrantes.

### ***Estrategia 1: "Lo esencial se vuelve invisible a los ojos del sistema inmune"***

La evasión del reconocimiento por células del SI tiene dos objetivos fundamentales: (a) evitar la generación de una respuesta inmune específica contra antígenos (Ags) tumorales y (b) evitar la destrucción de células tumorales mediada por células citotóxicas como LiT CD8+ y células NK.

(a) El desarrollo de una respuesta inmune antitumoral específica depende de la expansión de LiT CD4+ y LiT CD8+ cuyos receptores específicos (TCRs, *del inglés: T-cell receptors*) reconozcan péptidos provenientes de Ags tumorales presentados en el contexto de las moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (CMH) clase II y I, respectivamente. Sin embargo, dado el elevado índice mitótico de las células tumorales y su inestabilidad genómica, son frecuentes las mutaciones o eliminaciones de los genes que codifican para los Ags tumorales<sup>30</sup>. Asimismo, cambios epigenéticos, como consecuencia de hiper- o hipometilación, afectan la expresión de muchos genes en las células tumorales<sup>31</sup>. Así, los tumores pueden perder la expresión de Ags que desencadenan respuestas inmunes.

---



**Figura 3. Mecanismos tumorales de inmuno-evasión.** Los tumores emplean diversas estrategias que actúan en concierto para evadir la respuesta inmune. Estas incluyen: evitar el reconocimiento por células del SI (E1), resistir a los mecanismos de muerte mediados por células del SI (E2), afectar directamente la respuesta mediada por LiT (E3), reclutar y expandir poblaciones inmunosupresoras, como células mieloides supresoras (CMS), LiTreg Foxp3+ y Ma en el microambiente tumoral. Estas poblaciones infiltrantes contribuyen a la red inmunosupresora y tienen un impacto negativo directo sobre el destino de los LiT efectoras.

Adaptado de: Croci D.O. y col., *Cancer Immunol Immunother* 2007.

**(b)** La destrucción de células tumorales por células del SI está principalmente dirigida por mecanismos de citotoxicidad mediados por LiT CD8+ y células NK. Los tumores pueden escapar a la lisis mediada por linfocitos T CD8+ a través de los siguientes mecanismos:

- **Variación antigénica**, que resulta en la expresión de neo-antígenos que ya no son reconocidos por LiT citotóxicos como consecuencia de la acumulación de mutaciones puntuales;

- *Alteraciones en la maquinaria de presentación de antígenos endógenos (clase I)*, que se traduce en la pérdida, disminución o alteración en la expresión de moléculas del CMH clase I, esenciales para la presentación de péptidos a LiT CD8+ (revisados por Croci y col.<sup>32</sup>).

El reconocimiento de las células tumorales por células NK no es específico de Ag. Al contrario de los LiT CD8+, la ausencia de moléculas del CMH clase I en la superficie de células tumorales activa a las células NK. Esto se debe a que el reconocimiento de estas moléculas, independientemente del péptido que presenten, proporciona señales inhibitorias a las células NK. En este contexto, se podría plantear que si bien la ausencia de moléculas del CMH clase I vuelve a las células tumorales resistentes a la lisis mediada por LiT CD8+ específicos, también las hace susceptibles a la citotoxicidad mediada por células NK. Sin embargo, este supuesto no es del todo acertado ya que se ha demostrado que una gran variedad de tumores expresan moléculas del CMH no clásicas que son reconocidas por células NK y brindan señales negativas inhibiendo la citotoxicidad mediada por estas células<sup>33,34</sup>.

### **Estrategia 2: "Sobrevivir ante todo"**

Otro mecanismo de evasión intrínseco de las células tumorales es su **resistencia a la muerte celular** inducida por células del SI, que puede ser consecuencia de: (a) un aumento en la expresión de moléculas anti- apoptóticas, (b) la expresión de factores que inhiben moléculas, como granzima B, que son claves en la citotoxicidad mediada por LiT citotóxicos, (c) la pérdida de expresión de receptores de muerte, tales como TRAIL o Fas, en la superficie de la célula tumoral.

### **Estrategia 3: "Los tumores contra-atacan"**

En los últimos años, numerosos trabajos han demostrado que células tumorales son capaces de suprimir respuestas adaptativas a través de un efecto directo sobre los LiT. En este sentido, se ha demostrado que:

- Células tumorales inducen apoptosis de células T activadas que expresan el receptor de muerte Fas/CD95, a través de la expresión de FasL/CD95L, o bien a través de la liberación de microvesículas que contienen FasL<sup>35</sup>. Asimismo, células tumorales pueden inducir apoptosis o arresto en el ciclo celular en LiT



a través de la expresión de la enzima *Indolamina 2,3- dióxigenasa* (IDO). Dicha enzima cataliza la ruptura oxidativa del aminoácido triptofano en L-kinurenina. La depleción local de este aminoácido esencial, así como el incremento en la concentración de sus metabolitos, son los responsables de la supresión de LiT mediada por esta enzima. Además, se ha reportado que IDO participa en la diferenciación de LiT CD4+ hacia LiT regulatorios (Li Tregs) contribuyendo de igual manera a la supresión de LiT<sup>36</sup>.

- Las células tumorales inhiben la respuesta inmune mediada por LiT a través de la expresión de moléculas que se unen a receptores inhibitorios expresados en dicha población. El estudio de estos ligandos inhibitorios ha recibido especial atención en los últimos años. La expresión de CD80 y PD-L1 en células tumorales de diversos orígenes contribuye, en el microambiente tumoral, a la *disfunción* de células T que expresan los receptores para dichos ligandos: CTLA-4 (*del inglés: cytotoxic T-lymphocyte antigen 4*) y PD-1 (*del inglés: programmed cell death-1*), respectivamente. Reportes más recientes han demostrado que otros pares de ligando-receptor inhibitorio también están involucrados en el mantenimiento de la *disfunción* de las células T mediada por tumores que será discutida en detalle en el próximo capítulo (revisados por Rabinovich y col.<sup>37</sup>).
- Las células tumorales pueden inducir en LiT, la activación de peptidasas intracelulares que llevan a la disminución o ausencia de moléculas que participan en la transducción de señales de activación a través del TCR. En este sentido, se ha reportado una marcada disminución en la expresión de la cadena  $\zeta$  del complejo TCR-CD3 y de las tirosin kinasas p56<sup>lck</sup> y p59<sup>lyn</sup> en Li infiltrantes de tumor y en Li de sangre periférica de pacientes con cáncer. La ausencia o disminución de dichas moléculas en LiT compromete severamente su activación y en consecuencia su funcionalidad. Otros mecanismos, incluyendo la generación de radicales libres de oxígeno y el aumento de la actividad de la enzima arginasa en el microambiente tumoral, también han sido propuestos para explicar la disminución de la expresión de la cadena  $\zeta$  en cáncer (revisado por Whiteside<sup>35</sup>).

- Los tumores secretan diversas galectinas, entre las que se pueden citar: galectinas 1, 3, 8, 9 y 12<sup>38,39</sup>. Sin embargo, el rol de galectina-1 en la progresión tumoral ha sido el mejor documentado. La expresión de galectina-1 por células tumorales y estromales se correlaciona positivamente con la agresividad del tumor. Concomitantemente, la expresión de dicha galectina se correlaciona negativamente con la infiltración de LiT en la masa tumoral. Esto puede deberse a que galectina-1 modula la sobrevivencia, activación y función de células T<sup>40</sup>. Reportes más recientes del grupo del Dr. Rabinovich han demostrado que galectina-1 tiene un rol esencial en la angiogénesis a través de un efecto directo sobre células endoteliales<sup>41,42</sup>.

#### **Estrategia 4: "En la búsqueda de aliados"**

Las células tumorales reclutan y "educan" a diferentes poblaciones del SI en el microambiente tumoral. La plasticidad es una característica de las células del SI que le permite al tumor **generar y mantener un microambiente inmunosupresor** que continúa inhibiendo la respuesta anti-tumoral y favoreciendo la progresión del tumor. Así, se ha reportado que las células tumorales:

- Secretan factores que alteran la diferenciación de células de origen mieloide. Esto conduce a la acumulación de células inmaduras, particularmente **células mieloides supresoras** (CMS), tanto en circulación como en la masa tumoral. Las CMS son un grupo celular heterogéneo conformado por precursores de neutrófilos, células dendríticas, monocitos y macrófagos. Pueden afectar la respuesta inmune anti-tumoral a través de diversos mecanismos impactando en la función de otras células del SI. Así se ha demostrado que las CMS, son capaces de inhibir varias funciones inflamatorias de los macrófagos. Además, inhiben la respuesta de LiT a través de efectos directos sobre los mismos o bien porque son capaces de reclutar y expandir Li Tregs<sup>43</sup>.
- Favorecen la acumulación de **células T regulatorias** en la masa tumoral. (a) A través de la secreción de quemoquinas como CCL-17 y CCL-22 las células tumorales reclutan Li Tregs (CD4+CD25+Foxp3+) que luego son expandidos en el nicho tumoral. Los Li Tregs son importantes productores de citoquinas inmunosupresoras como IL-10 y TGF- $\beta$  (del inglés: *transforming growth factor-*

*beta*). Estas citoquinas, junto a otros mecanismos que requieren el contacto célula-célula, están involucradas en la supresión de LiT efectores por células Tregs. Asimismo, TGF- $\beta$  actúa sobre los LiT CD8<sup>+</sup> reduciendo su capacidad citotóxica; **(b)** a través de la secreción de IL-10, lo que facilita la inducción de otra población de células regulatorias Tr1, productoras de IL-10 y en menor medida de TGF- $\beta$ , generando así un mecanismo de retroalimentación positiva (revisados por Rabinovich y col.<sup>37</sup>).

- Favorecen el reclutamiento de **macrófagos** a través de la secreción de quemoquinas como CSF-1, CCL12 y MCP-1. La activación de estas células en el microambiente tumoral ha sido objeto de gran controversia y será discutida en detalle en el capítulo 1.6. Sin embargo, la contribución de los macrófagos asociados al tumor (TAM, *del inglés: tumor-associated macrophages*) a la progresión tumoral ha sido ampliamente reportada ya que son capaces de generar un ambiente altamente inflamatorio y pro-angiogénico<sup>2,11,16,44,45</sup>.



## 1.5. LOS TRES OBSTÁCULOS PRINCIPALES QUE ENFRENTAN LOS LINFOCITOS T EN LA LUCHA CONTRA EL CÁNCER

---

Si bien los LiT tienen el potencial de eliminar células transformadas, a menudo fallan en controlar la progresión tumoral, esencialmente porque se encuentran con tres obstáculos principales. En primer lugar, dado que muchos Ags tumorales son o se encuentran estrechamente relacionados a Ags propios, el desarrollo de células T específicas contra el tumor está sujeto a mecanismos de tolerancia. Durante la maduración tímica, LiT capaces de reconocer Ags propios con alta afinidad son eliminados. Este proceso de selección negativa es importante para evitar procesos autoinmunes, sin embargo resulta ser un primer obstáculo para la eliminación de células tumorales ya que, debido a este proceso, no se seleccionarán células T específicas para Ags propios expresados en las células tumorales. No obstante, los mecanismos de tolerancia no son completamente eficientes y en algunos casos permiten que LiT escapen de este proceso de selección negativa. A pesar de ello, evidencias demuestran que el número de células T específicas contra Ags tumorales/propios es relativamente bajo y que, en general, sus TCRs poseen baja afinidad para el Ag<sup>46</sup>.

La ausencia o la escasa estimulación de LiT específicos para Ags tumorales mediada por células dendríticas (CDs) constituye el segundo obstáculo para el desarrollo de una respuesta anti-tumoral específica. Es ampliamente conocido que la activación y expansión de LiT vírgenes depende de la presentación antigénica mediada, principalmente, por CDs. El microambiente tumoral impide una eficiente activación y maduración de las CDs, que se traduce en la ausencia de expresión de moléculas co-estimuladoras. La estimulación de células T a través de su TCR en ausencia de co-estímulo *in vitro* lleva a la célula T a un estado de *anergia*, caracterizado por una represión activa de la señalización a través del TCR y de la producción de IL-2 (factor de crecimiento para las células T)<sup>47</sup>. Al mismo tiempo, el microambiente tumoral, es capaz de expandir CDs regulatorias o tolerogénicas que subsecuentemente inducen tolerancia de células T hacia los Ags tumorales<sup>37</sup>. Además, las células tumorales o sus antígenos pueden ser ingeridos y luego procesados por CDs, las cuales presentan estos Ags tumorales en el contexto de las moléculas del CMH clase I. Este proceso de presentación

de antígenos a los LiT CD8+ se conoce como *presentación cruzada*. Si bien las CDs pueden realizar presentación cruzada de Ags tumorales, este proceso es relativamente ineficiente y sólo una minoría de ellas posee esta capacidad en el microambiente tumoral<sup>48</sup>. Por otro lado, las células tumorales podrían presentar Ags endógenos a LiT CD8+. Sin embargo, ellas no expresan las moléculas co-estimuladoras necesarias para gatillar una respuesta inmune robusta (revisado por Rabinovich y col.<sup>37</sup>). Además, como se mencionó previamente, las células tumorales generalmente disminuyen la expresión de moléculas del CMH, comprometiendo así la presentación antigénica.

El tercer obstáculo que deben sortear las células T en el microambiente tumoral, es la inducción y el mantenimiento de un estado de *disfuncionalidad* mediado, en principio, por una persistencia antigénica crónica y por señales inhibitorias provenientes de otras células del SI, células estromales y/o tumorales. Numerosos trabajos han documentado que en pacientes con cáncer o infecciones virales crónicas, como así también en modelos experimentales de infección o cáncer se observa un aumento en una población de LiT CD4+ o CD8+ disfuncionales. Así, dependiendo del modelo experimental y de las características fenotípicas y funcionales de dichas células, se han definido varios estados de disfunción de la célula T: *senescencia*, *agotamiento* y *anergia*<sup>49</sup>. Si bien los tres estados mencionados comparten características fenotípicas y funcionales, los datos obtenidos hasta el presente avalan la postura que se trataría de tres estados de disfuncionalidad diferentes ya que los procesos son gatillados por mecanismos moleculares distintos<sup>50</sup>.

### **Linfocitos T senescentes**

La *senescencia* celular ha sido reconocida desde los años '60, cuando se demostró que fibroblastos *in vitro* sufrían arresto en el ciclo celular luego de extensiva replicación<sup>51</sup>. Más adelante, se demostró este fenómeno en otros tipos celulares como células epiteliales y endoteliales, hepatocitos y queratinocitos. Sin embargo, actualmente se sabe que todas las células con capacidad de dividirse aunque no indefinidamente, pueden alcanzar un estado denominado *senescencia replicativa*. Este fenómeno se debe a que las células somáticas humanas acortan sus telómeros en cada división celular dado que, la mayoría, no posee actividad telomerasa. En este sentido, se ha demostrado que la



longitud de los telómeros es el reloj biológico que condiciona el estado de senescencia en las células humanas<sup>52</sup>.

Estudios más recientes, han demostrado que células del SI, a pesar de tener una alta capacidad de incrementar la actividad telomerasa y de proliferación luego de activación o estimulación, también pueden alcanzar un estado de *senescencia replicativa*<sup>53</sup>.

Los primeros reportes relacionados con LiT *senescentes* en humanos provienen de estudios realizados durante el envejecimiento natural. Se ha demostrado que en el transcurso de la vida, existe una acumulación progresiva en sangre periférica de LiT con fenotipo de senescencia. Este fenómeno estaría asociado con una pobre respuesta a la vacunación y con una mayor susceptibilidad a infecciones y a desarrollar procesos neoplásicos<sup>54</sup>. Sin embargo, reportes más recientes indican que LiT *senescentes* se encuentran también incrementados en individuos jóvenes que padecen enfermedades que involucran un estado de activación crónica del SI como son las infecciones virales que establecen latencia, el cáncer y las enfermedades autoinmunes. En este sentido, se ha reportado que LiT CD8+ *senescentes* se encuentran incrementados en pacientes con infecciones virales crónicas o latentes como VIH, VHC (*Virus de la Hepatitis C*) y CMV (*Citomegalovirus*)<sup>55</sup> y con enfermedades autoinmunes<sup>56,57</sup>, así como infiltrando tumores y en sangre periférica de pacientes con cáncer de distintos orígenes<sup>5,58-62</sup>. Estudios más recientes demuestran que factores solubles secretados por las células tumorales son capaces de inducir senescencia de LiT CD8+ *in vitro*<sup>3,4</sup>.

Respecto a la generación de LiT CD4+ *senescentes* existe un menor número de reportes. Este hecho puede estar relacionado a la menor susceptibilidad a senescencia de esta población celular respecto a la población CD8+. Aún así, LiT CD4+ *senescentes* se han encontrado incrementados en pacientes con infecciones por *T. cruzi*<sup>63</sup>, con enfermedades autoinmunes<sup>56,64,65</sup> y en individuos con síndrome coronario agudo<sup>66</sup>. Aunque aún no se ha reportado la presencia de LiT CD4+ *senescentes* en pacientes con cáncer, distintos grupos de investigación han demostrado que células tumorales pueden inducir senescencia de LiT CD4+ *in vitro*<sup>3,4</sup>.

El proceso de *senescencia* involucra múltiples cambios a nivel genético y funcional. Es así que, LiT *senescentes* humanos, muestran alteraciones fenotípicas y funcionales que son características y que permiten distinguirlas de otras sub-poblaciones de LiT. Dentro de las características fenotípicas de estas células se han documentado: un crítico



acortamiento en sus telómeros<sup>67-70</sup>, la pérdida en la expresión de moléculas co-estimuladoras CD27 y particularmente CD28<sup>69-71</sup>, un aumento en la expresión de la molécula CD57<sup>72,73</sup> y de receptores inhibitorios tales como KLRG-1 (*del inglés: killer cell lectin-like receptor G1*)<sup>74,75</sup> y Tim-3 (*del inglés: T-cell immunoglobulin domain 3*)<sup>6</sup> los cuales han sido recientemente sugeridos como nuevos marcadores de senescencia en LiT humanos.

Además, los LiT senescentes presentan alteraciones funcionales que son características. Exhiben un arresto irreversible en el ciclo celular. Estudios previos demostraron que, en general, el arresto en el ciclo celular asociado a senescencia es establecido y mantenido por las vías supresoras de tumor p53/p21 y p16/pRB. En este sentido, se ha reportado que LiT senescentes exhiben un incremento en la expresión de moléculas reguladoras del ciclo celular como p53, p21 y p16<sup>3,4,6,76</sup>. Asimismo, y en concordancia con su arresto en el ciclo celular, se ha demostrado que LiT senescentes muestran una capacidad linfoproliferativa disminuida, aún en presencia de altas concentraciones de IL-2, que es el factor de crecimiento de los LiT<sup>52</sup>. Este hecho las diferencia de las células T *anérgicas*, quienes presentan un arresto en el ciclo celular que es reversible frente al agregado de IL-2 *in vitro*<sup>77</sup>. Otra característica importante que presentan los LiT senescentes es que a pesar de su arresto irreversible, son viables. De hecho muestran niveles incrementados de la proteína anti-apoptótica Bcl-2 y son resistentes a la apoptosis cuando son testeados inmediatamente *ex vivo*<sup>78</sup>.

Uno de los mecanismos efectores más conocido de los LiT es la producción de citoquinas. La funcionalidad de LiT senescentes en términos de su capacidad para producir estas moléculas efectoras es aún controversial. Hay considerables reportes que demuestran que los LiT con características de senescencia producen bajos, sino nulos, niveles de citoquinas efectoras como IFN- $\gamma$  e IL-2<sup>6,79,80</sup>. Mientras que otro grupo reportó que LiT senescentes, luego de ser estimulados, producen grandes cantidades de factor de necrosis tumoral (TNF, *del inglés: tumor necrosis factor*), IFN- $\gamma$  e IL-6<sup>76</sup>. Además, Filaci y col.<sup>5</sup> y Ye y col.<sup>76</sup>, demostraron que LiT CD8+ y CD4+ senescentes producen citoquinas inmunosupresoras como IL-10 y TGF- $\beta$ .

Evidencias más recientes indican que una sub-población de LiT CD8+ con características de senescencia (CD8+ CD28-), están presentes en individuos con tumores de diferentes orígenes, y son capaces de suprimir respuestas linfoproliferativas<sup>5</sup>.

Asimismo se ha reportado que LiT CD4+ y CD8+ senescentes inducidos por tumores *in vitro* muestran funciones supresoras<sup>3,4</sup>.

Estos hallazgos sugieren que la senescencia de células T no constituye una ruptura general de la función normal del LiT, más bien comprende alteraciones genéticas y fenotípicas específicas, que resultan no sólo en pérdida, sino también en ganancia de funciones. Conjuntamente, estos hallazgos revelan que los LiT senescentes conforman una sub-población de LiT con características propias que los distinguen de otras sub-poblaciones. Si bien no se han identificado factores de transcripción específicos que regulen el fenotipo y la función de dichas células, reportes recientes demuestran que la vía de las protein-quinasas activadas por mitógenos (MAPK, del inglés: *mitogen-activated protein kinase*), específicamente p38 y ERK pero no JNK, están involucradas en el mantenimiento de ciertas características de senescencia. En este sentido, se reportó que LiT CD4+ senescentes muestran mayor fosforilación de p38 y ERK1/2 en condiciones basales, y que la inhibición de estas vías restaura algunas de las funciones normales del LiT como la proliferación y la actividad telomerasa luego de su estimulación<sup>76,81,82</sup>. Sin embargo, el bloqueo de la vía p38 no restaura la expresión de moléculas involucradas en la señalización a través del TCR, indicando que otros mecanismos estarían involucrados<sup>81</sup>. Los estímulos que mantienen a estas vías activadas en los LiT senescentes no son totalmente comprendidos. No obstante, Lanna y col.<sup>81</sup> demostraron que señales genotóxicas, como daño en el ADN y/o la deprivación de nutrientes, particularmente de glucosa, resultan en la activación de p38.

Por otra parte, la expresión de receptores inhibitorios como KLRG-1 y Tim-3 en los LiT senescentes contribuye de igual manera al mantenimiento del estado disfuncional que presentan dichas células. En este sentido, se ha reportado que el bloqueo de la señalización mediada por KLRG-1 en los LiT senescentes, tanto CD4+ como CD8+, restaura la capacidad proliferativa de dichas células, la producción de IL-2 y disminuye la expresión de los inhibidores del ciclo celular p16 y p27<sup>74,83</sup>. En otro estudio se demostró que el bloqueo de la señalización a través de Tim-3 en LiT CD4+ senescentes, indujo una mayor proliferación y un incremento en la producción de citoquinas efectoras, como IL-2 e IFN- $\gamma$ , por parte de dichas células<sup>6</sup>.

Si bien la activación sostenida de la vía de las MAPK y la expresión de receptores inhibitorios contribuyen al mantenimiento del programa de senescencia, los



mecanismos que conducen al LiT hacia la senescencia no han sido completamente dilucidados. La pérdida de expresión de la molécula CD28 en los LiT, principalmente CD8+, se ha atribuido a la estimulación antigénica repetida. Sin embargo, citoquinas cuyos receptores comparten la cadena gamma (receptores  $\gamma$ c), como IL-2, IL-7 e IL-15, han demostrado acelerar la pérdida de CD28 en LiT CD8+. Además, interferones tipo I (IFN- $\alpha$  e IFN- $\beta$ ) incrementan la proporción de LiT CD4+ y CD8+ CD28- en cultivo. Del mismo modo, TNF induce una reducción significativa de moléculas de CD28 en la superficie de los LiT (revisado por Weng y col.<sup>84</sup>). Por otro lado, el grupo de Filaci demostró que cultivando LiT CD8+ CD28+ de sangre periférica humana en presencia de citoquinas como IL-2 e IL-10 puede generarse un gran número de LiT CD8+CD28-<sup>85</sup>. En otro reporte del mismo grupo, los autores demostraron que el receptor de TNF inducido por glucocorticoides (GITR, *del inglés: glucocorticoid-induced TNF receptor*) está involucrado en la generación de células CD8+ CD28- y que IL-10 es requerida para la función supresora de las mismas<sup>86</sup>. Estos hallazgos resultan interesantes dado que demuestran que la adquisición de este fenotipo CD28- en los LiT no dependería sólo de señales derivadas del TCR al reconocer a su antígeno específico, sino también de señales derivadas de factores solubles.

En concordancia con esta hipótesis, Montes y col.<sup>3</sup> demostraron que células tumorales de diversos orígenes son capaces de inducir senescencia en células T humanas *in vitro* a través de factor/es soluble/s. Estudios posteriores, demostraron que IL-7 es capaz de prevenir la inducción de senescencia mediada por células tumorales en los LiT<sup>87</sup>. Asimismo, en un modelo de inducción de senescencia en LiT mediada por tumores similar al descrito por Montes y col.<sup>3</sup> se demostró que células tumorales inducen senescencia en LiT CD4+ y CD8+ a través de la producción de adenosina monofosfato cíclico (cAMP, *del inglés: cyclic adenosine monophosphate*)<sup>4</sup>.

### **Linfocitos T agotados**

El *agotamiento* de las células T es un estado de disfunción que ocurre cuando los LiT son crónicamente activados en sitios de inflamación como los observados en infecciones crónicas y en procesos tumorales.



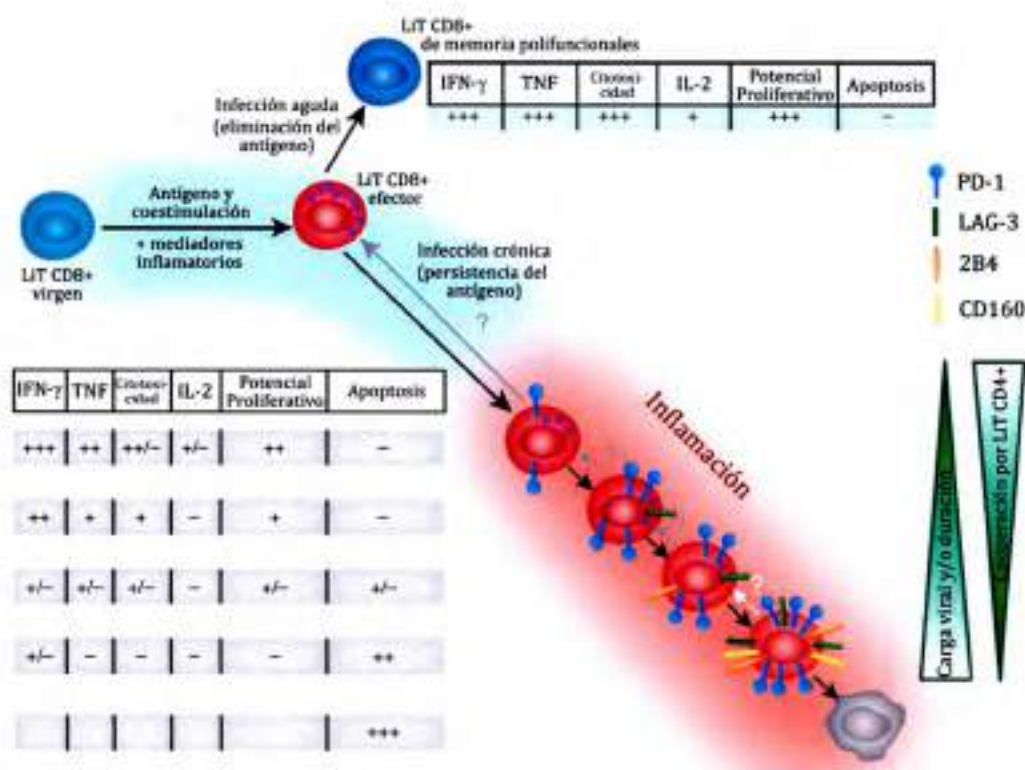
El *agotamiento*, se caracteriza por una pérdida en la función efectora del LiT, expresión sostenida de receptores inhibitorios y un estado transcripcional diferente al de las células T efectoras o de memoria funcionales, sugiriendo que los LiT agotados/exhaustos representan un estado único de diferenciación de las células T<sup>88</sup>.

Durante una infección aguda, los LiT específicos para el antígeno se activan y expanden rápidamente con el objetivo de controlar la infección. Luego de la resolución, se desarrollan LiT de memoria dotados de varias propiedades que los distinguen de otras subpoblaciones de LiT, como los LiT vírgenes y/o efectores. Estas propiedades de los LiT de memoria incluyen: una rápida reactivación de las funciones efectoras después del reencuentro con el Ag, readquisición de moléculas de "homing" que los conducen a los tejidos linfoides secundarios, alto potencial proliferativo y capacidad de persistir a largo plazo sin estimulación antigénica a través de la proliferación homeostática impulsada por citoquinas como IL-7 e IL-15. Estas propiedades se adquieren gradualmente con el tiempo y permiten que las células T de memoria confieran inmunidad protectora al hospedador (Figura 4). En casos de infecciones mediadas por agentes con alto potencial replicativo, como las infecciones por VIH, VHC y VHB (*Virus de la Hepatitis B*) o como en procesos tumorales, donde el Ag persiste crónicamente, la generación de células T efectoras y/o de memoria se encuentra alterada. De hecho, en estos escenarios se describió la presencia de LiT disfuncionales con características de agotamiento.

Los LiT CD8+ agotados/exhaustos fueron descritos por primera vez en un modelo murino de infección crónica con el virus de la linfocoriomeningitis (LCMV, *del inglés: lymphocytic choriomeningitis virus*). Así, en dicho modelo se demostró que los LiT CD8+ específicos para LCMV no producen citoquinas y tienen su capacidad citotóxica severamente afectada<sup>89</sup>.

Estudios realizados en modelos murinos de infección crónica han llevado a postular que el agotamiento de los LiT CD8+ ocurre de manera progresiva. Así, se ha observado que en el contexto de infecciones crónicas, luego del contacto con el Ag, los LiT CD8+ pierden primero funciones efectoras típicas como la producción de IL-2, su capacidad proliferativa y su actividad citotóxica *ex vivo*. Posteriormente, comienzan a expresar receptores inhibitorios como PD-1 y LAG-3 (*del inglés: lymphocyte activation gene-3*). Otras propiedades como la capacidad de producción de citoquinas efectoras, TNF e IFN-

y, se pierden más tarde; al tiempo que comienzan a co-expresarse nuevos receptores inhibitorios tales como 2B4 y CD160, indicando un estado intermedio de disfuncionalidad. El estadio final del agotamiento es consecuencia de su alta susceptibilidad a apoptosis lo que lleva a la depleción de las células T específicas de Ag<sup>88</sup> (Figura 4).



**Figura 4. Agotamiento de LIT durante infecciones crónicas.** Durante una infección aguda, LIT CD8+ vírgenes al contactar con el Ag, en presencia de señales co-estimuladoras y citoquinas apropiadas, se diferencian a LIT efectores. Luego de la resolución de la infección, la respuesta efectora se contrae y una sub-población de estas células se diferencian a LIT de memoria, capaces de producir citoquinas (tales como IFN- $\gamma$ , TNF e IL-2) y con alta capacidad citotóxica y proliferativa. Estas células también tienen una considerable capacidad de supervivencia y se mantienen a largo plazo en ausencia del antígeno (tabla superior). Durante una infección crónica (parte inferior), la infección persiste aún después de la fase efectora. La presencia constante del Ag y de un ambiente inflamatorio lleva a los LIT a perder funciones efectoras de manera jerárquica o gradual (tabla inferior). El agotamiento de LIT también se acompaña de un aumento progresivo en la cantidad y diversidad de receptores inhibitorios expresados en su superficie. En última instancia, si la gravedad y/o duración de la infección es alta y/o prolongada, los LIT específicos pueden ser eliminados por completo. El estado de agotamiento de LIT CD8+ se correlaciona con el aumento de la expresión de los receptores inhibitorios, alta carga antigénica y pérdida de colaboración de LIT CD4+.

Adaptado de: Wherry E.J., *Nature Immunology* 2011.



El desarrollo y mantenimiento de los LiT CD8+ agotados durante infecciones virales crónicas depende no sólo de la persistencia antigénica, sino también de citoquinas principalmente producidas por células T CD4+ cooperadoras. Así, citoquinas inmunosupresoras como IL-10 y TGF- $\beta$  favorecen el agotamiento de los LiT CD8+. En contraste, IL-21 producida por LiT CD4+ específicos para Ags virales inhiben la generación de LiT CD8+ exhaustos específicos de Ag. De hecho, la depleción de LiT CD4+ en animales infectados con el virus LCMV, empeora el agotamiento de los LiT CD8+ (revisados por Wherry<sup>88</sup>).

Posteriormente, se demostró que pacientes con infecciones virales crónicas como VIH, VHC y VHB presentan, en sangre periférica, una población de LiT CD8+ específicos contra antígenos virales con características de agotamiento (revisados por Virgin y col.<sup>90</sup>). Dos estudios longitudinales realizados en pacientes VIH+, corroboran la teoría del agotamiento progresivo de los LiT CD8+ propuesta por Wherry<sup>88</sup>. En uno de esos estudios demuestran que, a medida que progresa la infección, la expresión de PD-1 en los LiT CD8+ aumenta al tiempo que su funcionalidad disminuye. En otro estudio, analizan LiT CD8+ Ag-específicos en pacientes VIH+ antes y después de ser sometidos a tratamiento con drogas anti-retrovirales. Los autores observan que el control de la carga viral, luego de la terapia, resulta en una reducción en la expresión de PD-1 en los LiT CD8+ específicos para VIH (revisados por Kaufmann y Walker<sup>91</sup>).

Al igual que las células T CD8+, los LiT CD4+ específicos contra Ags virales también pierden su función efectora durante infecciones virales crónicas<sup>92-94</sup>. Sin embargo, se sabe mucho menos acerca de la disfunción de las células T CD4+ específicas para Ags virales.

El estudio del agotamiento de LiT en tumores ha ganado considerable interés en los últimos años. Así, numerosos reportes han demostrado que linfocitos T infiltrantes de tumores murinos<sup>95-97</sup> y humanos<sup>98-104</sup> muestran también características de agotamiento. En términos generales, estos trabajos demuestran que LiT CD4+ y CD8+ infiltrantes de tumores y específicos contra Ags tumorales, expresan frecuentemente el receptor inhibitorio PD-1 en asociación con otros receptores inhibitorios, como: Tim-3<sup>99,101,105</sup>, CTLA-4<sup>101,103</sup> y LAG-3<sup>98,101</sup>. Sin embargo, existen reportes que correlacionan en forma inversa la expresión de PD-1 y el receptor inhibitorio KLRG-1 en LiT infiltrantes de tumores<sup>101</sup>. Además, se ha demostrado que LiT que expresan receptores inhibitorios



producen menores niveles de citoquinas efectoras y proliferan menos frente a la estimulación con Ags tumorales *in vitro*. Interesantemente, y en concordancia con el modelo propuesto por Wherry<sup>88</sup> (Figura 4), los LiT que co-expresan 2 o más receptores inhibitorios parecen ser aún más disfuncionales respecto a aquellos que expresan sólo uno de ellos.

En conjunto, estos hallazgos sugieren que la expresión de receptores inhibitorios en los LiT no sólo identifica, sino también mantiene el estado de disfunción o agotamiento. En este sentido, experimentos de bloqueo de la señalización a través de receptores como PD-1 y Tim-3 han demostrado una recuperación parcial de la funcionalidad *in vitro* de LiT agotados en términos de producción de citoquinas y proliferación<sup>99</sup> e *in vivo* promoviendo una reducción del crecimiento del tumor<sup>95</sup>. Asimismo, Matsuzaki y col.<sup>98</sup> observan que el bloqueo dual de PD-1 y LAG-3 en LiT CD8+ Ag-específicos de pacientes con carcinoma de ovario, restaura la proliferación y la producción de citoquinas por dichas células.

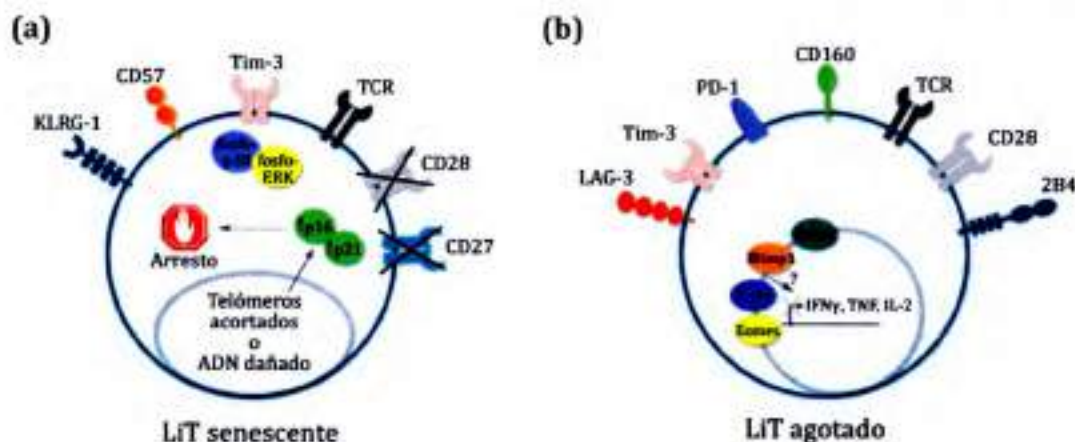
Estudios genómicos apoyan la idea de que los LiT agotados/exhaustos representan un estado único de diferenciación de la célula T. Al presente, no se ha identificado un factor de transcripción (FT) específico que caracterice a la población de los LiT agotados. Sin embargo, se ha reportado que algunos perfiles transcripcionales de células T agotadas difieren respecto a aquellos encontrados en células T efectoras y/o de memoria<sup>106</sup>. Un estudio reciente demuestra que LiT CD4+ tanto como CD8+ agotados muestran niveles bajos de expresión de **T-bet** (*del inglés: T-box-containing protein expressed in T cells*), un FT de la familia de genes *T-box*. En LiT activados, la expresión de T-bet reprime la expresión de PD-1. En concordancia con ello, en LiT agotados, mientras se observa una reducción en la expresión de este FT, la expresión de PD-1 aumenta. Al mismo tiempo, los autores demuestran que bajos niveles de T-bet son necesarios para sostener el agotamiento de los LiT durante infecciones crónicas. Otro FT de la familia de genes *T-box*, **Eomes** (*del inglés: eomesodermin*), involucrado en la diferenciación de los LiT CD8+, se encuentra altamente expresado en los LiT CD8+ exhaustos respecto a los LiT CD8+ efectoras/memoria. Interesantemente, Eomes se expresa diferencialmente en los LiT CD4+ agotados respecto a otras sub-poblaciones de LiT CD4+. El FT **Blimp-1** (*del inglés: B-lymphocyte induced maturation protein-1*) también se encuentra substancialmente expresado en los LiT CD4+ y CD8+ exhaustos, y se ha reportado que

promueve la expresión de receptores inhibitorios en los mismos. Por otra parte, **Helios**, un FT comúnmente expresado en una sub-población de células Tregs, es uno de los FTs más diferencialmente expresado en LiT CD4+ agotados comparado con LiT CD4+ de memoria e incluso con LiT CD8+ agotados<sup>107-110</sup>. Asimismo, se ha reportado que los LiT agotados muestran una defectuosa translocación del factor NFAT (*del inglés: nuclear factor of activated T-cells*) involucrado, fundamentalmente, en la transcripción de citoquinas efectoras. Este hecho, podría explicar la menor producción de citoquinas observada en LiT agotados<sup>110,111</sup>.

La evaluación conjunta de la expresión de FTs en LiT exhaustos lleva a concluir que no existe un único FT que actúe como un "regulador maestro/dominante" del programa de agotamiento, si no más bien hay un conjunto básico de FTs que se expresan diferencialmente en las células T exhaustas. Por lo tanto, el agotamiento de LiT refleja un mecanismo en el que participan múltiples factores de transcripción.

### ¿Senescencia o agotamiento de LiT?

Los términos *senescencia* y *agotamiento* a menudo son usados indistintamente cuando se refiere a células T *disfuncionales*, sin embargo, los mecanismos teóricos que se proponen para definir a cada uno de estos estados son diferentes<sup>50</sup>. A pesar de que ha habido un avance substancial en la identificación de los mecanismos que subyacen a estos procesos, los mismos han sido estudiados independientemente uno de otro. Por otro lado, la ausencia de marcadores de senescencia de LiT en roedores resulta en la falta de modelos de experimentación que permitan dilucidar de manera más directa el rol de estas células en diferentes patologías. Además, como se expuso previamente, los indicadores de *agotamiento* y *senescencia* a menudo están muy solapados (Figura 5). Esto lleva a que la terminología utilizada en la literatura sea, esencialmente, dependiente del autor. Estos motivos resaltan un interrogante que aún permanece abierto y que tiene que ver con que si ambos estados son mutuamente excluyentes o si células T *agotadas* son también *senescentes* o viceversa.



**Figura 5. Características generales de LiT senescentes versus LiT agotados.** (a) La principal característica de los LiT senescentes es su arresto en el ciclo celular, que puede ser gatillado por daño en el ADN o bien por acortamiento de sus telómeros frente a repetida estimulación. Otra característica distintiva es la pérdida de expresión de las moléculas co-estimuladoras CD27 y CD28. Además expresan altos niveles de receptores inhibitorios. Estas células no responden a estímulos policlonales de LiT. No se han identificado aún FTs asociados al programa de senescencia. Sin embargo, LiT senescentes muestran activación basal de la vía de las quinasas MAPK, en particular p38 y ERK1/2. (b) Los LiT agotados se caracterizan por la expresión de múltiples receptores inhibitorios en su superficie. Frente a estimulación policlonal o Ag-específica, los LiT agotados producen bajos, sino nulos, niveles de citoquinas efectoras. FT como Blimp-1, T-bet y Eomes han sido asociados al agotamiento de LiT tanto CD8+ como CD4+. Mientras tanto, el FT Helios sólo se ha asociado al agotamiento de LiT CD4+.

*Adaptado de: Crespo J., y col. Current Opinion in Immunology 2012.*



Como se mencionó previamente, numerosos estudios demuestran que los tumores están infiltrados por diversas poblaciones celulares del sistema inmune tales como macrófagos, células NK, Li Tregs, linfocitos B, Li Th1 y Th2, LiT senescentes, entre otras<sup>5,112,113</sup>. Sin embargo, los macrófagos representan una de las poblaciones más abundantes en el microambiente tumoral. La importancia de esta población celular en la progresión tumoral se ha puesto en evidencia por estudios clínicos que demuestran una correlación entre la densidad de macrófagos asociados al tumor y un peor pronóstico en el 80% de los estudios reportados<sup>16,114</sup>.

En términos generales, los macrófagos han sido clasificados en dos categorías: (i) macrófagos tipo I o clásicamente activados (M1) caracterizados por un fenotipo pro-inflamatorio y (ii) macrófagos tipo II o alternativamente activados (M2) quienes promueven procesos anti-inflamatorios y de reparación tisular. Es de conocimiento general que, en respuesta a determinadas señales como citoquinas o aquellas derivadas de la unión de ligandos a receptores de membrana, los macrófagos se someten a estados de polarización M1 o M2. Estos estados están caracterizados por perfiles fenotípicos y producción de citoquinas y quemoquinas particulares. Así, macrófagos M1 producen grandes cantidades de citoquinas pro-inflamatorias (TNF, IL-1 $\beta$ , IL-6 y principalmente IL-12) y expresan altos niveles de moléculas del CMH clase II, de moléculas co-estimuladoras y de la enzima óxido nítrico sintetasa inducible (*iNOS*, *del inglés: inducible nitric oxide synthase*), involucrada en la producción de óxido nítrico (NO). Por el contrario, los macrófagos M2 muestran niveles muy bajos, sino ausentes, de moléculas del CMH de clase II y co-estimuladoras, exhiben una alta expresión del receptor de manosa (CD206), y producen grandes niveles de la citoquina anti-inflamatoria IL-10 en ausencia de producción de IL-12<sup>44</sup>. Además, los macrófagos también pueden ser polarizados en un estado similar al M2 (*en inglés: "M2-like"*) que comparte algunas pero no todas las características del perfil M2<sup>113</sup>. Asimismo, se ha observado que durante procesos tumorales los macrófagos adquieren un fenotipo con características M1/M2 intermedias o superpuestas<sup>45,115</sup>. Probablemente, en dichas circunstancias, los

macrófagos se ven expuestos a una mezcla de estímulos o bien a un cambio constante de moléculas efectoras a lo largo de diferentes etapas de la respuesta inmune. Estos hallazgos reflejan la heterogeneidad y plasticidad de la población de los macrófagos. Además, revelan que la clasificación M1 y M2, si bien resulta útil en términos teóricos, representa dos extremos de una galaxia de estados funcionales intermedios<sup>116</sup>.

Los macrófagos asociados al tumor derivan casi enteramente de monocitos circulantes, cuyo reclutamiento al nicho tumoral está mediado por factores quimiotácticos derivados del tumor<sup>117-119</sup>. Allí, el perfil de activación de los macrófagos puede estar regulado por numerosas poblaciones del sistema inmune que infiltran el tumor como asimismo por células tumorales (Figura 6). En este sentido se ha reportado que LiB, células NK, Li Th1, Th2 y Tregs pueden polarizar la activación de los macrófagos a un estado M1 o M2 a través de la producción de citoquinas<sup>113,120</sup>. Sin embargo, aún no ha sido reportado si LiT senescentes son capaces de modular el perfil de activación de macrófagos. Por otro lado, factores solubles derivados de células tumorales pueden modificar, directa e indirectamente, la polarización de macrófagos asociados al tumor (revisados por Ruffell<sup>121</sup> y Biswas y Mantovani<sup>113</sup>).

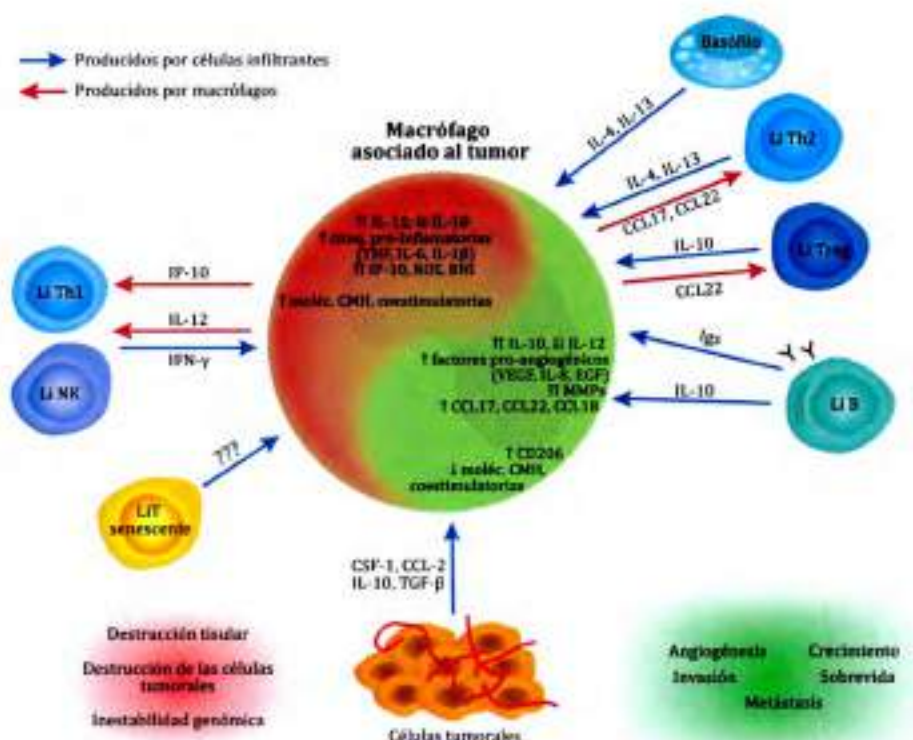


Figura 6. El yin y el yang de los macrófagos asociados al tumor en la progresión tumoral y su regulación por las células leucocitarias infiltrantes. En letras negras dentro de la célula, se destacan las características más



distintivas de macrófagos activados clásicamente (M1) o alternativamente (M2). Sin embargo, los macrófagos intra-tumorales pueden presentar características de ambas poblaciones. Los macrófagos asociados al tumor pueden tener papeles potencialmente beneficiosos (rojo) o patológicos (verde) en el cáncer dependiendo del entorno celular y tisular.

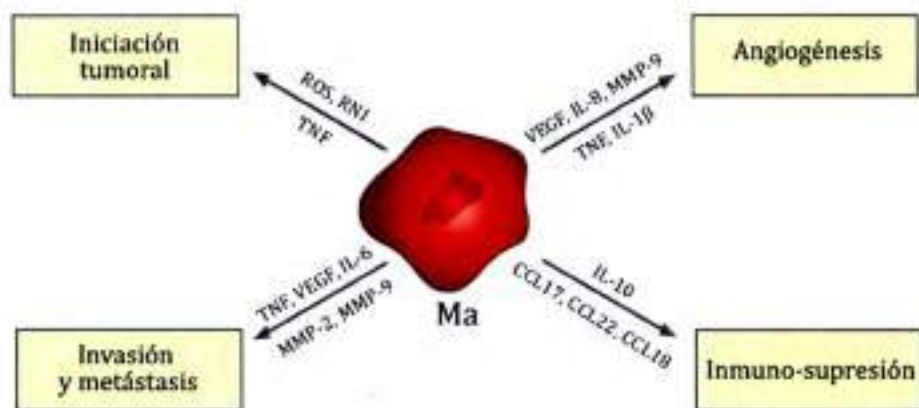
*Adaptado de: Biswas S.K. y Mantovani A., Nature Immunology 2010.*

Históricamente se ha considerado que macrófagos M1 son capaces de destruir a las células tumorales y al mismo tiempo, favorecer la presentación de Ags tumorales a LiT efectoras para desencadenar una respuesta inmune anti-tumoral. Mientras que los macrófagos M2 son potencialmente pro-tumorales, dado que participan en procesos de reparación tisular que favorecen la angiogénesis, la invasión y la metástasis. Así, los macrófagos simbolizan un arma de doble filo en cáncer, con el potencial de expresar actividades pro- y anti-inflamatorias de acuerdo al microambiente tumoral (Figura 6). No obstante, la mayoría de las citoquinas con potencial pro-tumoral confirmado son aquellas asociadas al perfil M1<sup>122</sup>. En tanto que IL-10, la principal citoquina asociada a macrófagos M2, ha demostrado tener roles anti-tumorales en un modelo murino de cáncer colorectal<sup>123</sup>. Además, aunque el desarrollo de una respuesta inflamatoria podría ser beneficioso para el huésped a corto plazo, en los últimos años se ha demostrado que su persistencia resulta perjudicial para el hospedador ya que favorece la progresión del tumor en múltiples niveles de su desarrollo. En este sentido, mediadores inflamatorios, principalmente producidos por macrófagos en el microambiente tumoral, juegan papeles decisivos en las etapas de: (i) iniciación tumoral, (ii) conversión maligna, (iii) invasión y metástasis, y (iv) mantenimiento del microambiente inmunosupresor<sup>2</sup>, que se detallan a continuación y se resumen en la Figura 7.

**Macrófagos e iniciación tumoral.** Numerosos trabajos han demostrado que los macrófagos desempeñan un papel protagónico en la iniciación del proceso tumoral. En este sentido, se ha sugerido que un microambiente inflamatorio puede aumentar las tasas de mutación, además de mejorar la proliferación de las células mutadas. Macrófagos activados sirven como fuentes de especies reactivas de oxígeno (ROS, *del inglés: reactive oxygen species*) y de productos intermedios de nitrógeno reactivos (RNI, *del inglés: reactive nitrogen intermediates*), principalmente NO, que inducen daño en el ADN e inestabilidad genómica. Alternativamente, a través de la secreción de la citoquina



TNF, macrófagos estimulan la acumulación de ROS en células epiteliales vecinas<sup>2,18</sup>. Estos mecanismos pueden llevar, además, a la activación de lesiones premalignas en estado latente.



**Figura 7.** Macrófagos como jugadores claves en la progresión tumoral. Macrófagos asociados al tumor (Ma) desempeñan roles decisivos en distintas etapas del desarrollo tumoral, como iniciación, angiogénesis, invasión y metástasis. Asimismo, contribuyen al mantenimiento de un microambiente inmuno-supresor. Así, macrófagos asociados al tumor pueden impactar en la progresión tumoral desde múltiples flancos. Adaptado de: Sica A. y col., *European Journal of Cancer* 2006.

**Macrófagos y angiogénesis.** En la mayoría de los tumores, hay un dramático aumento de la densidad vascular durante la transición benigno a maligno, un proceso referido como "cambio angiogénico". La formación de una vasculatura completa es un proceso complejo que involucra muchos tipos de células, a menudo con superposición de funciones, que influyen en el desarrollo tumoral. Los macrófagos asociados al tumor son los principales contribuyentes a los procesos de angiogénesis y la hipoxia es un disparador vital del mismo. De hecho, Leek y col.<sup>124,125</sup> demostraron que existe una fuerte asociación entre la presencia de macrófagos y la densidad de vasculatura en varios carcinomas. Además, se demostró que numerosas moléculas secretadas por los macrófagos asociados al tumor están involucradas en eventos de angiogénesis<sup>18,126,127</sup>, entre ellas:

- El factor de crecimiento de endotelio vascular, **VEGF** (*del inglés: vascular endothelial growth factor*) producido también por células tumorales, promueve la proliferación de células endoteliales y la formación de nuevos vasos sanguíneos. Asimismo, se ha reportado que VEGF incrementa la

permeabilidad vascular, favorece el reclutamiento de monocitos al nicho tumoral e induce la expresión de metaloproteasas de matriz, principalmente MMP-9. Aunque múltiples factores promueven la formación de vasos sanguíneos, en tumores humanos, VEGF parece tener un rol dominante.

- **IL-8** es un potente factor angiogénico. Su expresión correlaciona negativamente con la supervivencia de los pacientes y positivamente con el infiltrado de macrófagos en tumores. Su expresión está regulada por el FT NF- $\kappa$ B, y puede ser estimulada por citoquinas inflamatorias como TNF e IL-1 $\beta$ , también producidas principalmente por macrófagos asociados al tumor.
- **IL-1 $\beta$** , una citoquina altamente inflamatoria, induce selectivamente la expresión del FT inducido por hipoxia, HIF-1 (*del inglés: hypoxia inducible factor*). HIF-1 regula la transcripción de un gran panel de genes asociados con la angiogénesis, incluyendo VEGF. Asimismo, IL-1 $\beta$  es capaz de inducir la expresión de TNF e IL-8, contribuyendo a la amplificación del bucle angiogénico.
- **TNF**, principalmente expresado por los macrófagos asociados al tumor, contribuye a la angiogénesis a través de la activación de FTs, tanto en células tumorales como estromales, que llevan a la producción de IL-8, VEGF y MMP-9.
- La metaloproteasa de matriz, **MMP-9**, contribuye a la angiogénesis mediante la promoción de la morfogénesis de los vasos sanguíneos y el reclutamiento de pericitos, que favorecen la estabilización de los nuevos vasos formados. Además, MMP-9 incrementa la biodisponibilidad de VEGF a través de su liberación desde depósitos extracelulares.

**Macrófagos, invasión y metástasis.** Desde una perspectiva clínica, la metástasis es el aspecto más crítico de la tumorigénesis, ya que el 90% de la mortalidad por cáncer es causada por las metástasis. El proceso de la metástasis puede ser brevemente dividido en cuatro pasos principales. El primero está representado por la transición epitelio-mesenquimal, en la cual células tumorales adquieren características fibroblastoides que incrementan su movilidad y les permiten invadir revestimientos epiteliales y/o membranas basales y alcanzar los vasos sanguíneos eferentes o linfáticos. La citoquina

**TNF** facilita la transición epitelio-mesenquimal. Dado que los macrófagos son la principal fuente de producción de dicha citoquina en el microambiente tumoral, su contribución es crucial en este paso. En el segundo paso, las células tumorales intravascan en circulación sanguínea y linfática. Factores como **VEGF**, también producidos por macrófagos asociados al tumor, promueven este paso a través de un aumento de la permeabilidad vascular. En la tercera etapa, las células metastásicas deben sobrevivir y viajar a través de la circulación para dar lugar a micrometástasis. La supervivencia de estas células circulantes es mantenida por **TNF** e **IL-6**, citoquinas pro-inflamatorias derivadas de macrófagos intra-tumorales y de monocitos circulantes. Finalmente, progenitores metastásicos individuales interactúan con células estromales en el nicho pre-metastásico y comienzan a proliferar. En este paso de invasión, las células tumorales requieren una amplia proteólisis de la matriz extracelular, donde **MMP-2** y **MMP-9** son claves, sugiriendo también que macrófagos a través de la producción de dichas proteasas se convierten en células clave en la invasión tumoral<sup>2,128</sup>.

**Macrófagos e inmunosupresión.** Los macrófagos intra-tumorales ejercen una actividad fuertemente inmunosupresora, no sólo mediante la producción de IL-10, sino también por la secreción de quemoquinas como CCL-17 y CCL-22, que preferentemente atraen sub-poblaciones de LiT con potencial pro-tumoral e incluso inmunosupresor como Li Th2 y Li Tregs. Además, los macrófagos asociados al tumor secretan la quemoquina CCL-18 que recluta LiT vírgenes. Ante el balance de señales inhibitorias sobre activadoras en el microambiente tumoral, estos LiT vírgenes, sufren *anergia*, *agotamiento* o *senescencia* como se describió previamente<sup>121,128</sup>.



## **HIPÓTESIS y OBJETIVOS**

2.

Los tumores sólidos son extensamente infiltrados por células del SI. Dentro del microambiente tumoral se establecen una serie de interacciones dinámicas entre las células infiltrantes y las neoplásicas, así como entre las células infiltrantes entre sí. Estas interacciones resultan en el establecimiento de una respuesta inmune *in situ*, que generalmente favorece la progresión tumoral<sup>1,2</sup>. En este sentido, se ha demostrado que las células tumorales pueden reclutar y expandir diversas sub-poblaciones de LiT con diferentes funciones efectoras que contribuirían a la progresión del tumor<sup>1,37,46</sup>.

Recientemente, se ha demostrado que líneas tumorales de diversos orígenes inducen senescencia en LiT humanos<sup>3,4</sup>. Asimismo, LiT con características de senescencia se encuentran incrementados en sangre periférica e infiltrando tumores primarios y metástasis en pacientes con cáncer<sup>5,6,58,60,62</sup>. Interesantemente, esta población de LiT senescentes es capaz de suprimir respuestas linfoproliferativas<sup>3-5</sup>, sugiriendo que su presencia en el nicho tumoral podría favorecer la progresión del tumor. Sin embargo, hasta el momento, la función de los LiT senescentes y su potencial modulador sobre otras poblaciones celulares no han sido estudiados.

En este contexto y basándonos en resultados de nuestro grupo de trabajo, construimos la *hipótesis* que forma parte de esta Tesis Doctoral. Postulamos que las células cancerosas pueden llevar a los LiT CD4+ y CD8+ a un estado de *senescencia*. Estos LiT senescentes que están arrestados en el ciclo celular y que además son capaces de suprimir una respuesta linfoproliferativa de LiT podrían modular, tanto en sangre periférica como en el tumor, la respuesta mediada por otras células del SI, tanto innato como adaptativo favoreciendo el desarrollo tumoral. De esta manera, *la inducción de senescencia en los LiT podría plantearse como un novedoso mecanismo de evasión de la respuesta inmune que aún no ha sido descripto*.

### **General:**

Evaluar si linfocitos T CD4+ y CD8+ senescentes inducidos por tumores (LiT SIT) son capaces de modular la respuesta de otras células del sistema inmune impactando de esta manera en la respuesta inmune frente a tumores.

### **Específicos:**

- I. **Evaluar características fenotípicas y funcionales de LiT CD4+ y CD8+ SIT que puedan impactar en la modulación de otras poblaciones celulares.** Para ello, proponemos:
  - a. Estudiar el estadio de activación y de diferenciación como así también la funcionalidad de LiT CD4+ y CD8+ SIT.
  - b. Estudiar vías de señalización y la expresión de moléculas que pudieran estar involucradas en la *hipo*-respuesta de LiT SIT.
  - c. Investigar las características de la supresión de LiT convencionales mediada por LiT SIT como así también las posibles moléculas involucradas.
  
- II. **Evaluar si LiT CD4+ y CD8+ SIT son capaces de modular células clave del sistema inmune innato como monocitos/macrófagos.** Para ello, proponemos:
  - a. Evaluar si LiT CD4+ y CD8+ SIT modulan el fenotipo y la funcionalidad de Mo/Ma humanos.
  - b. Indagar posibles vías de señalización y mecanismos involucrados en la modulación de Mo/Ma como resultado de su interacción con los LiT CD4+ y CD8+ SIT.



**RESULTADOS**

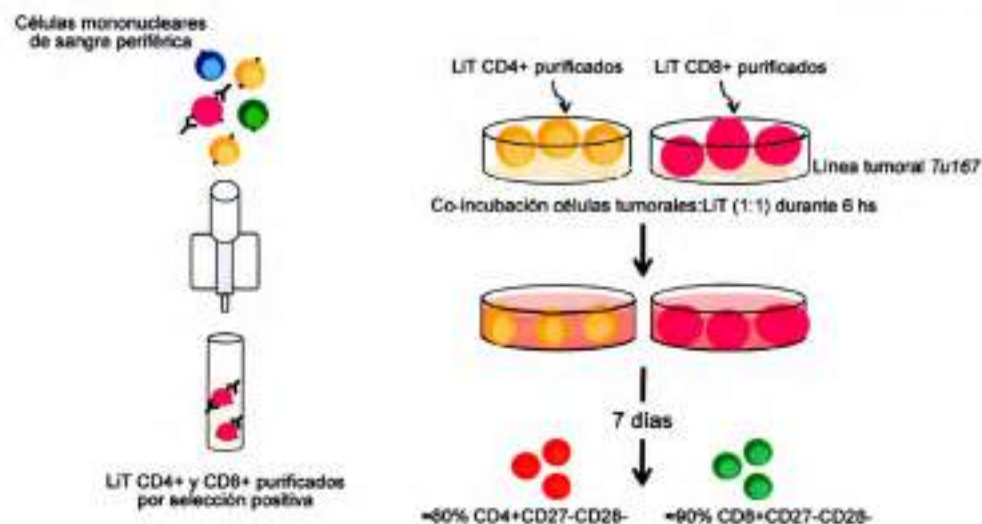
## ESTUDIO FENOTÍPICO Y FUNCIONAL DE LINFOCITOS T SENESCENTES INDUCIDOS POR TUMORES.

---

Los resultados previos obtenidos y que dan lugar a la hipótesis de la presente tesis doctoral demuestran que factores solubles secretados por líneas tumorales de diversos orígenes son capaces de inducir senescencia en LiT CD4+ o CD8+ de donantes jóvenes y sanos. Así, se demostró que a los 7 días posteriores a la co-incubación *in vitro* con una línea tumoral, los LiT CD4+ y CD8+ muestran características de senescencia tales como: disminución de la expresión de las moléculas coestimuladoras CD27 y CD28, acortamiento de sus telómeros y aumento en la expresión de moléculas que participan en el ciclo celular como p53, p21 y p16. Además estos LiT senescentes, tanto los CD4+ como los CD8+, suprimen la proliferación de LiT normales<sup>3</sup>.

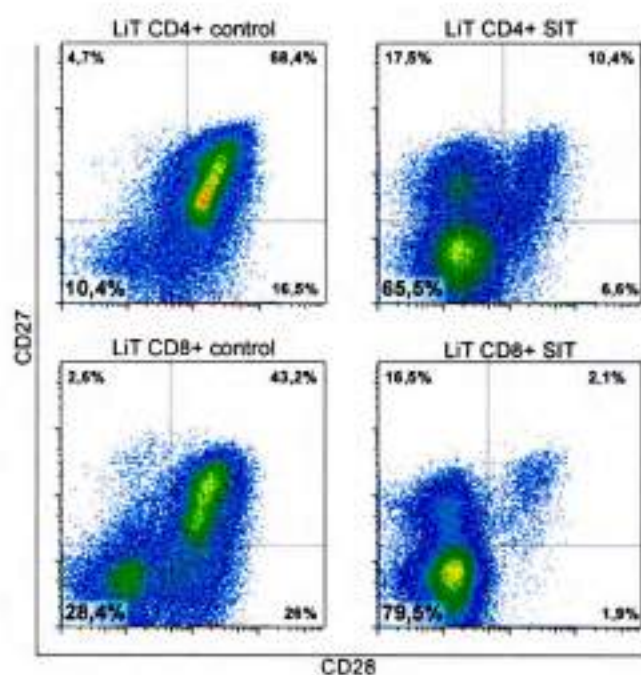
Con el objetivo de evaluar si Linfocitos T senescentes inducidos por tumores (LiT SIT) representan una población celular con capacidad moduladora sobre otras poblaciones del SI, se realizó una profunda caracterización, tanto fenotípica como funcional, de dicha población celular.

Para desarrollar el objetivo, se obtuvieron las poblaciones de LiT CD4+ y CD8+ senescentes, siguiendo el modelo experimental previamente desarrollado por Montes y col.<sup>3</sup> y que se detalla en la sección Materiales y Métodos. En forma breve, los LiT CD4+ y CD8+ fueron purificados a partir de sangre periférica de donantes sanos y jóvenes y posteriormente ambas poblaciones de LiT fueron co-incubadas con una línea tumoral de carcinoma humano de cabeza y cuello, *Tu167*, durante 6 hs. Luego, las células T fueron mantenidas en cultivo durante 7 días. Como controles, los LiT CD4+ y CD8+ purificados -sin co-incubar con la línea tumoral- fueron mantenidos en cultivo en las mismas condiciones (Esquema Experimental 1). En el día 7 post-incubación con la línea tumoral se realizaron todos los experimentos que se mostrarán a continuación.



**Esquema Experimental 1.** Inducción de senescencia de LiT CD4+ y CD8+ humanos por co-incubación con células tumorales (Detalles experimentales en la sección Materiales y Métodos).

Durante el trabajo experimental de la presente tesis doctoral rutinariamente se controló el estado de senescencia de LiT CD4+ y CD8+, evaluando por citometría de flujo la pérdida de moléculas coestimuladoras. La Figura 1 muestra uno de los ensayos rutinarios, en donde se puede observar que en el día 7, LiT CD4+ o CD8+, que fueron previamente co-incubados con la línea tumoral *Tu167* exhibieron una marcada disminución en la expresión de ambas moléculas coestimuladoras respecto a LiT CD4+ y CD8+ controles.

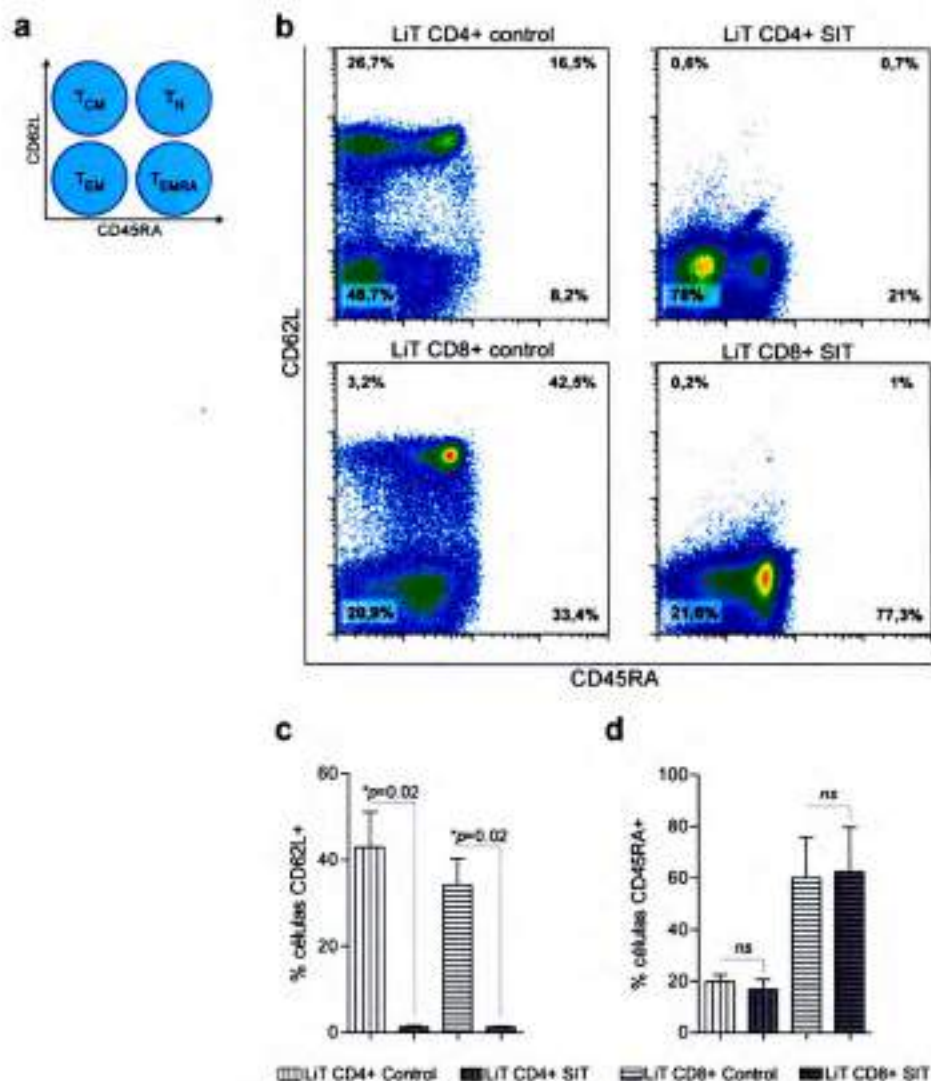


**Figura 1.** Inducción de senescencia en LiT CD4+ y CD8+ mediada por células tumorales. Gráficos de dos parámetros muestran la expresión en superficie de las moléculas coestimuladoras CD28 y CD27 en LiT CD4+ o CD8+ controles (izquierda) o LiT CD4+ o CD8+ SIT (derecha), que fueron obtenidos como se describió en Esquema Experimental 1 y en la sección Materiales y Métodos.



## **LiT SIT exhiben un fenotipo de células de memoria efectora terminalmente diferenciadas**

Teniendo en cuenta que la caracterización fenotípica permite profundizar en el conocimiento de las características funcionales de los LiT SIT, se estudiaron por citometría de flujo marcadores relacionados con el estadio de diferenciación de LiT. El estudio conjunto del marcador de "homing" CD62L y de la molécula CD45 en su isoforma RA permiten definir cuatro sub-poblaciones de LiT<sup>129</sup> en sangre periférica (Figura 2a). La evaluación conjunta de ambos marcadores reveló que dentro de la población de LiT SIT (CD4+ o CD8+) no se encuentran representadas las sub-poblaciones de LiT naïve/virgenes (T<sub>N</sub>) ni de LiT de memoria central (T<sub>CM</sub>). Sin embargo en la población de LiT controles se hallaron las 4 sub-poblaciones previamente definidas (Figura 2b, c y d). Estos resultados indican que la línea tumoral condujo a los LiT de donantes sanos a un estado de senescencia y a la acumulación de sub-poblaciones con fenotipo de células de memoria efectora (T<sub>EM</sub>) o terminalmente diferenciadas (T<sub>EMRA</sub>). Por otra parte, la ausencia de CD62L en LiT CD4+ y CD8+ SIT resulta sumamente interesante si se considera la importancia de esta selectina en la migración de los LiT vírgenes a ganglios linfáticos así como en la de LiT activados al nicho tumoral<sup>130,131</sup>. Así, se podría especular que la disminución en la expresión de CD62L podría afectar la generación de una respuesta de células T específicas al mismo tiempo que podría disminuir la infiltración de tumores.



**Figura 2.** LiT CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> SIT constituyen una población de memoria efectora o terminalmente diferenciadas. **(a)** Esquema de dos parámetros de la expresión de CD62L vs. CD45RA que permite definir cuatro sub-poblaciones de LiT en sangre periférica [ $T_{CM}$ , LiT de memoria central;  $T_H$ , LiT naive/virgenes;  $T_{EM}$ , LiT de memoria efectora;  $T_{EMRA}$ , LiT de memoria efectora terminalmente diferenciados]. **(b)** Gráficos de dos parámetros muestran la expresión de CD62L y CD45RA en la superficie de LiT CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> controles (izquierda) y SIT (derecha). Gráficos de un donante representativo de tres donantes diferentes. **(c)** Porcentaje de LiT controles y SIT que expresan CD62L. Las barras representan el % medio  $\pm$  SEM ( $n=3$ ). **(d)** Porcentaje de LiT controles y SIT que expresan CD45RA. Las barras representan el % medio  $\pm$  SEM ( $n=3$ ). En ambos casos, el test estadístico utilizado fue una prueba *t* de Student apareada (LiT SIT vs. LiT control). *p* se indica en cada gráfico. (*ns*, no significativo)

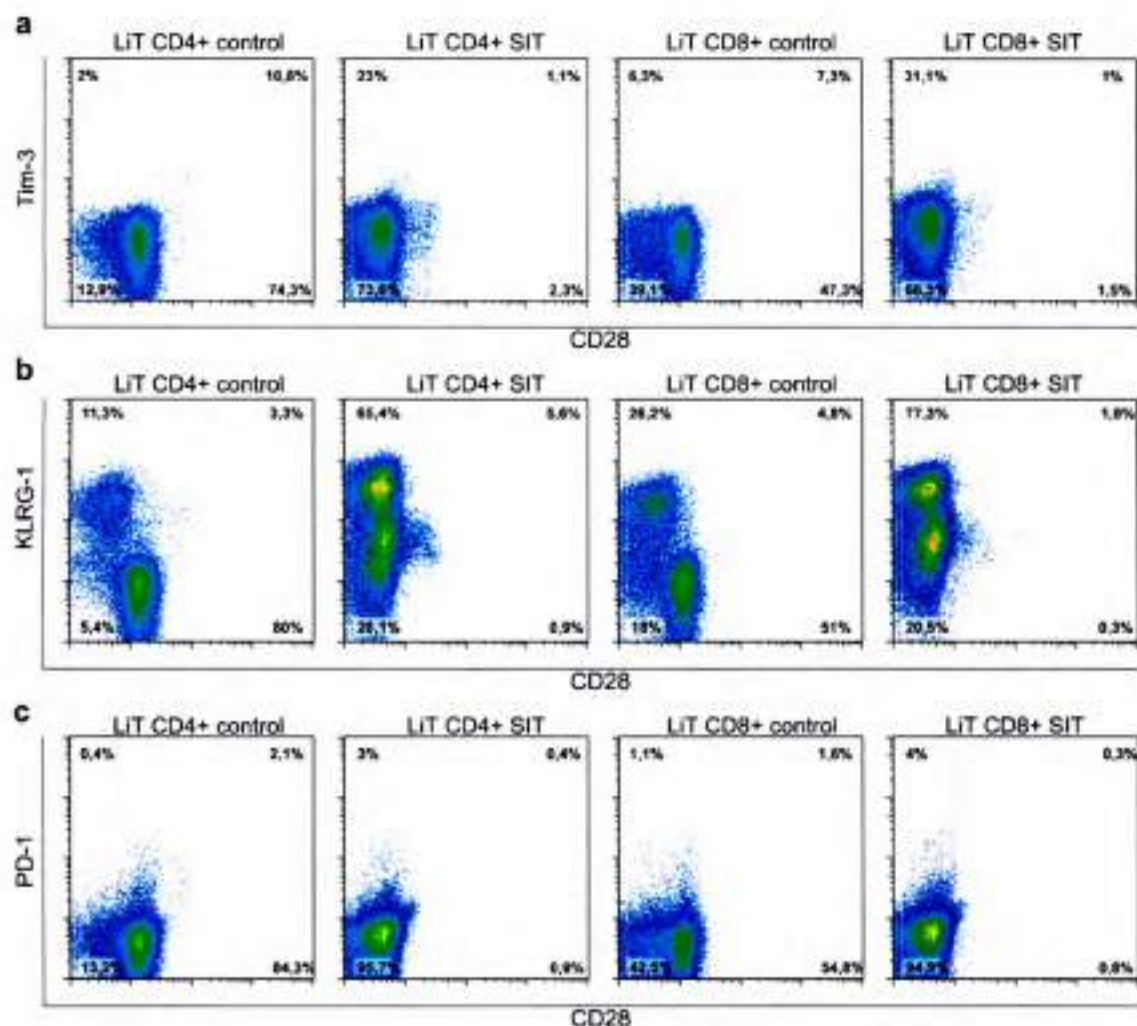
## **LiT SIT expresan receptores inhibitorios en su superficie**

Reportes previos han demostrado que LiT CD4+ y CD8+ crónicamente activados muestran una elevada expresión de receptores inhibitorios (RIs) tales como PD-1, Tim-3 y KLRG-1<sup>6,74,75,88,99,101</sup>. La expresión de estos receptores inhibitorios resulta de fundamental importancia dado que los mismos inhiben funciones celulares complejas manteniendo a los LiT en un estado de *disfuncionalidad y/o quiescencia*. Al mismo tiempo, el conocimiento del espectro de receptores inhibitorios en dichas células sugiere cómo esta población celular censa señales de su microambiente y cómo interaccionaría con otros tipos celulares.

Dado que estos RIs se expresan normalmente luego de la activación y la diferenciación progresiva a LiT efectores como un mecanismo de "auto-regulación" de la activación de células T, la expresión de los mismos fue evaluada en LiT CD4+ y CD8+ *ex vivo* y en LiT SIT y controles. Así, se observó que, *ex vivo*, LiT CD4+ y CD8+ provenientes de donantes jóvenes y sanos no expresan ninguno de los tres RIs evaluados, PD-1, Tim-3 ni KLRG-1 (datos no mostrados).

El estudio comparativo de la expresión de RIs en LiT CD4+ y CD8+ SIT *versus* la población de LiT controles, reveló que un mayor porcentaje de LiT CD4+ y CD8+ SIT (CD28-) expresan Tim-3 respecto a LiT controles (Figura 3a). Asimismo, un porcentaje significativamente mayor de LiT SIT (CD28-) expresó KLRG-1 respecto a LiT controles. Además, los niveles de KLRG-1 en superficie fueron mayores en LiT SIT *versus* LiT controles (Figura 3b). Interesantemente, la expresión de KLRG-1 en la población de LiT controles, tanto CD4+ como CD8+, se detectó dentro de la población CD28-. Estos resultados, en concordancia con los obtenidos por Henson y col.<sup>74,75</sup>, sugieren que la expresión de KLRG-1 podría estar asociada con la disminución de CD28. El perfil de expresión de PD-1 fue diferente al de los demás RIs ya que los LiT SIT y controles expresaron niveles similares de PD-1 (Figura 3c).

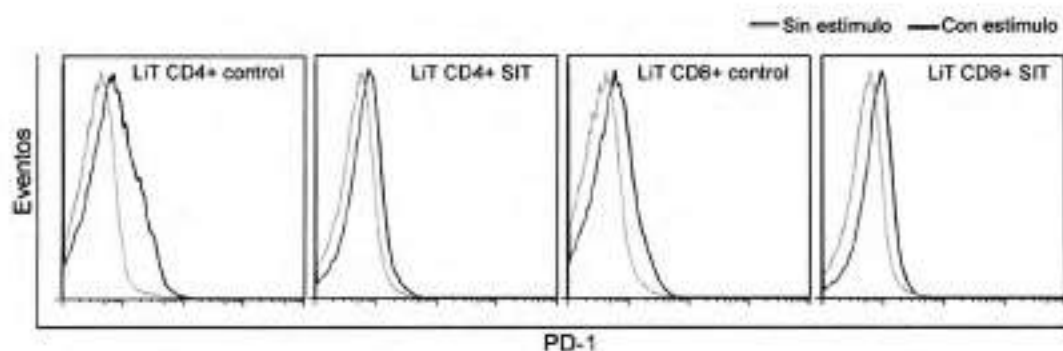




**Figura 3.** *LIT CD4+* y *CD8+* *SIT* expresan elevados niveles de los receptores inhibitorios *Tim-3* y *KLRG-1*, pero no de *PD-1*. Gráficos de dos parámetros muestran la expresión de *Tim-3* (a), *KLRG-1* (b) y *PD-1* (c), en función de la expresión de *CD28*, en *LIT CD4+* o *CD8+* controles y *SIT* como se indica. Los números en los gráficos indican el % de células en cada cuadrante. Gráficos de un donante representativo de tres donantes diferentes.

Dado que *PD-1* es rápidamente expresado en la superficie de *LIT* luego de su estimulación, se evaluó si *LIT SIT* son capaces de modular la expresión de dicho receptor frente a un estímulo policlinal. Así, observamos que mientras los *LIT CD4+* controles expresaron *PD-1* luego de la estimulación, los *LIT CD4+* *SIT* fueron incapaces de aumentar la expresión de dicho receptor. Mientras que no se observó un incremento en la expresión de *PD-1* luego de la activación de *LIT CD8+* controles ni *SIT* (Figura 4). Estos resultados concuerdan con los obtenidos por Baitsch y col.<sup>101</sup> y Li y col.<sup>6</sup> que demuestran

que LiT con características de senescencia aumentan la expresión de múltiples receptores inhibitorios pero no de PD-1.

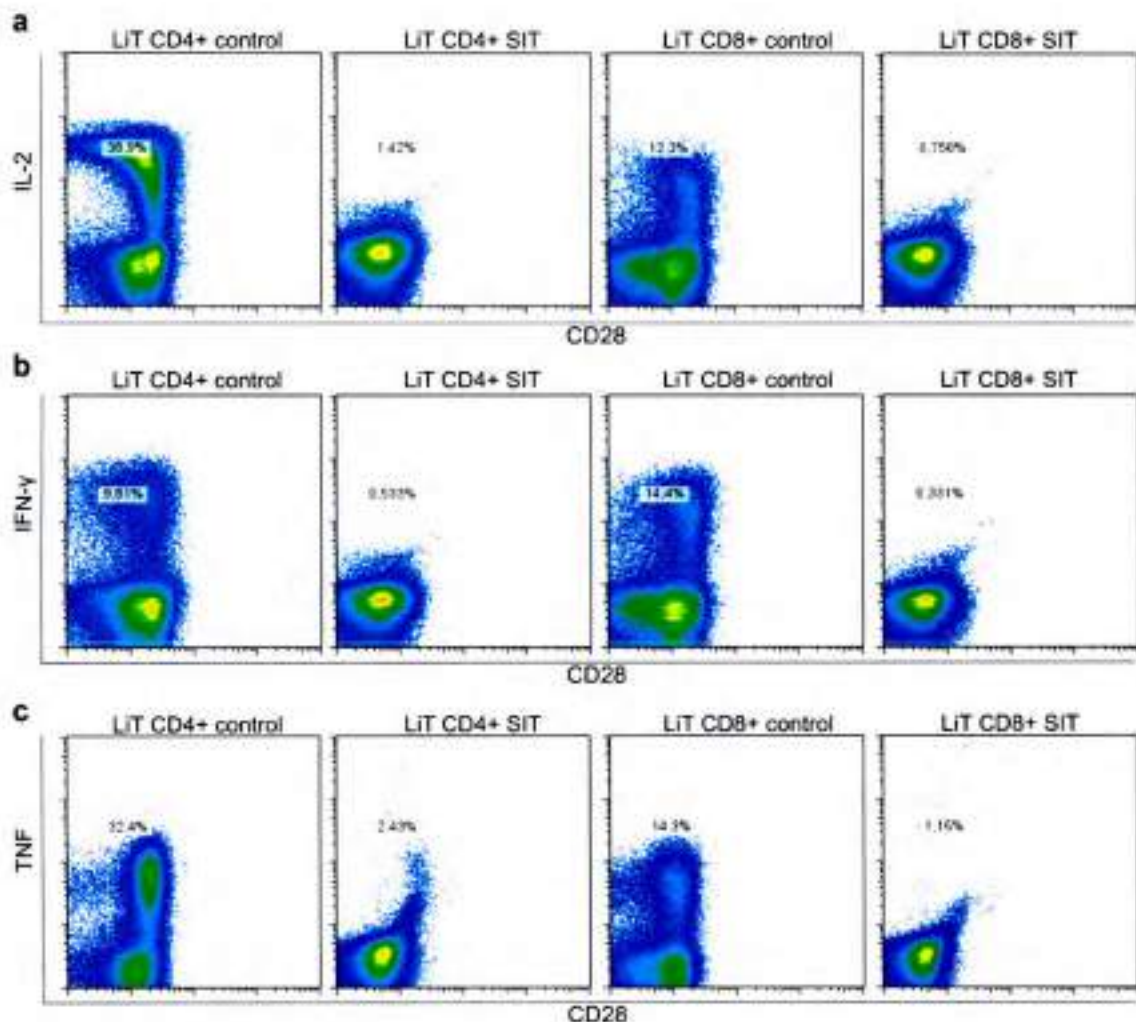


**Figura 4.** LiT CD4+ y CD8+ SIT no aumentan la expresión de PD-1 aún frente a estimulación. Expresión de PD-1 en LiT controles y SIT post-estímulo con anti-CD3/anti-CD28 durante 12 horas. Los histogramas representan la expresión de PD-1 en LiT controles y SIT como se indica. Los histogramas llenos corresponden a LiT sin estimular y las líneas negras a LiT post-estímulo. Resultados representativos de un donante.

### **LiT SIT representan una población de células T disfuncional**

Sabiendo que el proceso de senescencia involucra múltiples cambios a nivel genético y funcional, y que LiT CD4+ y CD8+ SIT mostraron alteraciones fenotípicas, se dispuso evaluar si dichas células eran funcionalmente competentes.

Resultados previos han demostrado que una robusta y eficiente respuesta anti-tumoral mediada por LiT se correlaciona con la capacidad de dichas células para producir citoquinas efectoras como IL-2, IFN- $\gamma$  y TNF<sup>20</sup>. Teniendo en cuenta la relevancia de dichas citoquinas, se evaluó si LiT CD4+ y CD8+ SIT eran capaces de producirlas. Para ello, LiT SIT y controles fueron estimulados policlonalmente con PMA/Ionomicina en presencia de inhibidores del transporte vesicular desde el aparato de Golgi, y posteriormente se determinó por citometría de flujo la producción intracelular de tales citoquinas. La Figura 5 muestra que, mientras un alto porcentaje de LiT CD4+ y CD8+ controles produjeron las citoquinas testeadas luego de su estimulación, los LiT CD4+ y CD8+ SIT (CD28-) fueron incapaces de producir IL-2, IFN- $\gamma$  y TNF aún frente a un estímulo policlonal.



**Figura 5.** *LiT CD4+ y CD8+ SIT no producen citoquinas efectoras.* Gráficos de dos parámetros muestran la expresión intracelular de IL-2 (a), IFN- $\gamma$  (b) y TNF (c), en función de la expresión superficial de CD28, en LiT controles y SIT como se indica en cada figura (arriba). En cada gráfico se indica el porcentaje de LiT productores de citoquinas. Resultado representativo de tres experimentos independientes realizados con donantes diferentes.

Dado que la citometría de flujo intracelular permite evaluar la producción de citoquinas en un período corto de tiempo, se evaluaron citoquinas en sobrenadantes de cultivo de LiT controles y SIT frente al estímulo con anti-CD3/anti-CD28 durante 72 horas. En concordancia con los resultados anteriores, los sobrenadantes de LiT CD4+ y CD8+ SIT estimulados mostraron niveles significativamente menores de todas las citoquinas evaluadas (IL-2, IFN- $\gamma$  y TNF) respecto a sobrenadantes de LiT CD4+ y CD8+ controles (Figura 6 a, b y c). Además, se evaluó si los LiT SIT eran capaces de producir



otras citoquinas como IL-6 e IL-10 asociadas a respuestas pro-inflamatorias e inmunosupresoras, respectivamente. La evaluación de estas citoquinas en los sobrenadantes de cultivo mencionados previamente reveló que LiT SIT, tanto CD4+ como CD8+, produjeron cantidades significativamente menores, sino indetectables, de ambas proteínas respecto a LiT controles (Figura 6 d y e).

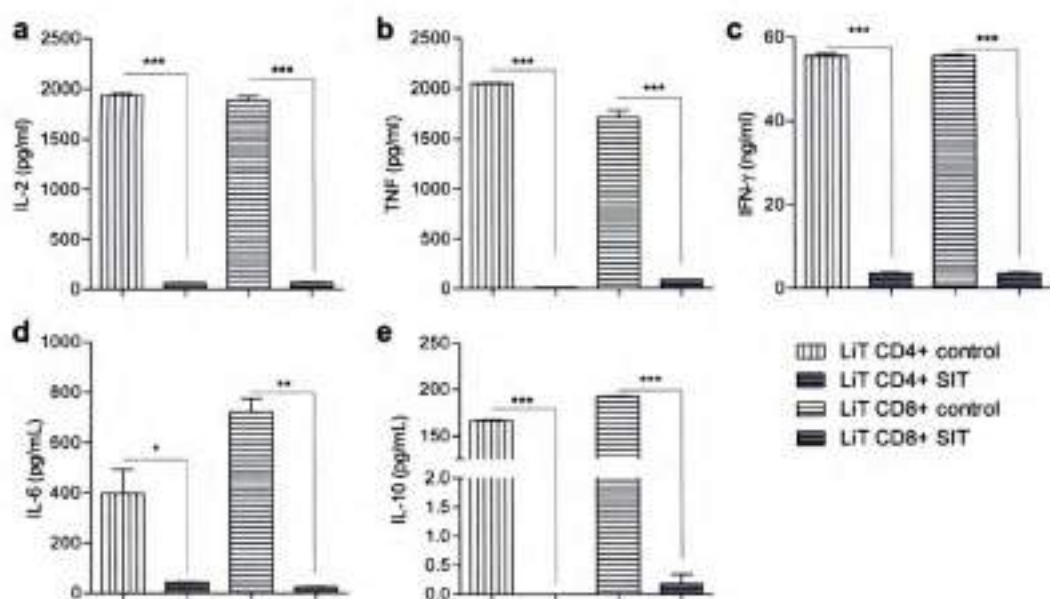


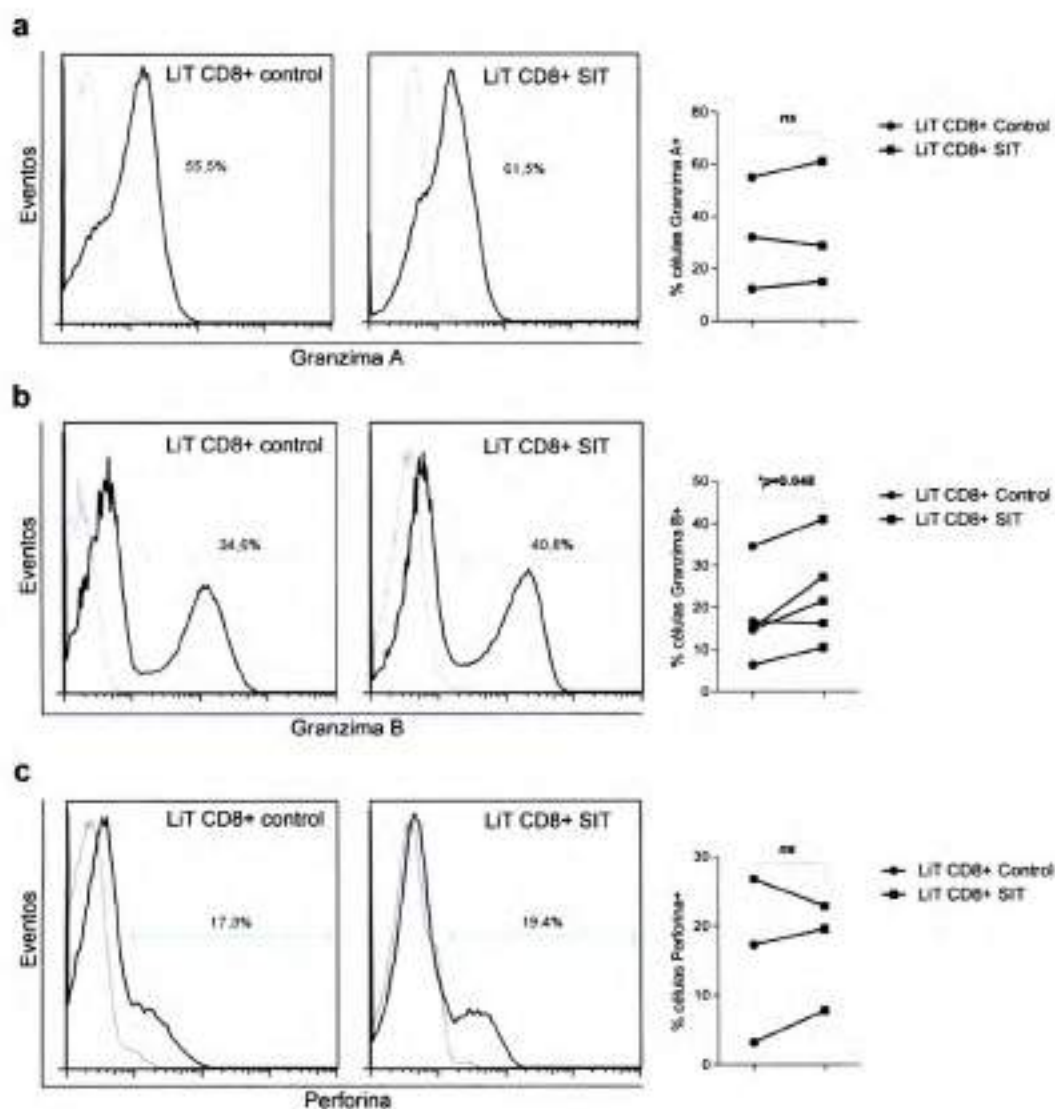
Figura 6. LiT CD4+ y CD8+ SIT no secretan citoquinas. Gráficos de barras muestran la producción de citoquinas: IL-2 (a), TNF (b), IFN- $\gamma$  (c), IL-6 (d) e IL-10 (e) en sobrenadantes de cultivo de LiT controles y SIT estimulados con anti-CD3/anti-CD28 durante 72hs. Las barras representan la producción promedio de cada citoquina  $\pm$  SEM. En todos los casos, el test estadístico utilizado fue ANOVA de una vía, post-test: Bonferroni [LiT SIT vs. LiT control]. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ .

### **LiT CD8+ SIT son incapaces de liberar el contenido de sus gránulos**

Los estudios presentados anteriormente revelan que los LiT SIT fueron incapaces de secretar citoquinas efectoras. Sin embargo, el mecanismo efector más relevante de los LiT CD8+ en el contexto tumoral es su capacidad citotóxica, que depende de la producción y liberación de perforinas y granzimas. Esto motivó la evaluación de dichas moléculas en la población de LiT SIT vs. LiT controles.

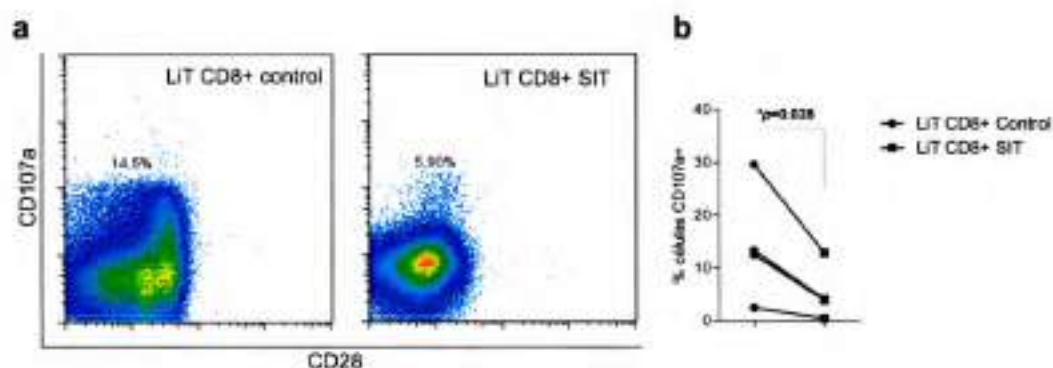
La evaluación intracelular de granzima A en LiT CD8+ controles y SIT reflejó que, en ausencia de estímulo, ambas poblaciones muestran el mismo porcentaje de células que

expresan este mediador (Figura 7a). Sin embargo, un mayor porcentaje de LiT CD8+ SIT expresaron granzima B respecto a la población de LiT CD8+ controles (Figura 7b). Por otra parte se observó que el porcentaje de LiT que expresan perforina fue similar en la población de LiT CD8+ SIT y controles (Figura 7c).



**Figura 7.** LiT CD8+ SIT expresan granzimas A, B y perforinas. Histogramas representativos muestran la expresión intracelular de granzima A (a), granzima B (b) y perforinas (c) en LiT CD8+ controles (izquierda) y SIT (derecha). En todos los casos, los histogramas llenos representan el control negativo de fluorescencia (FMO, del inglés: *fluorescence minus one*). A la derecha de cada histograma se grafica el porcentaje de LiT CD8+ controles (círculos negros) y de LiT CD8+ SIT (cuadrados negros) que expresan cada uno de los mediadores evaluados para diferentes donantes. Las líneas indican que los datos están apareados (LiT CD8+ controles y SIT corresponden al mismo donante). En todos los casos, el test estadístico utilizado fue una prueba t de Student apareada (LiT CD8+ SIT vs. LiT CD8+ control). *p* se indica en cada gráfico.

Posteriormente, se evaluó por citometría de flujo si LiT CD8+ SIT eran capaces de liberar el contenido de sus gránulos. La proteína CD107a se encuentra asociada a la membrana lisosomal de los gránulos que contienen perforinas. Cuando el LiT CD8+ se activa, degranula y esta molécula se expresa de manera transiente en la superficie celular, de manera que una mayor expresión de CD107a correlaciona con mayor degranulación. La Figura 8 muestra que luego de la estimulación, un porcentaje significativamente menor de LiT CD8+ SIT expresó CD107a en superficie respecto a LiT CD8+ controles, indicando que la capacidad para degranular se encuentra severamente disminuída en LiT CD8+ SIT.



**Figura 8.** Los LiT CD8+ SIT son incapaces de degranular. (a) Gráficos de dos parámetros representativos muestran la expresión de CD107a, en función de CD28, en LiT CD8+ controles (izquierda) y SIT (derecha). En cada gráfico se indica el porcentaje de LiT que expresan CD107a. Los gráficos corresponden a un donante representativo de cuatro donantes diferentes. (b) Porcentaje de LiT CD8+ controles (círculos negros) y SIT (cuadrados negros) que expresan CD107a. Las líneas indican que los datos están apareados (LiT CD8+ controles y SIT corresponden al mismo donante). Test estadístico utilizado: prueba *t* de Student apareada (LiT CD8+ SIT vs. LiT CD8+ control), *p* se indica en cada gráfico.

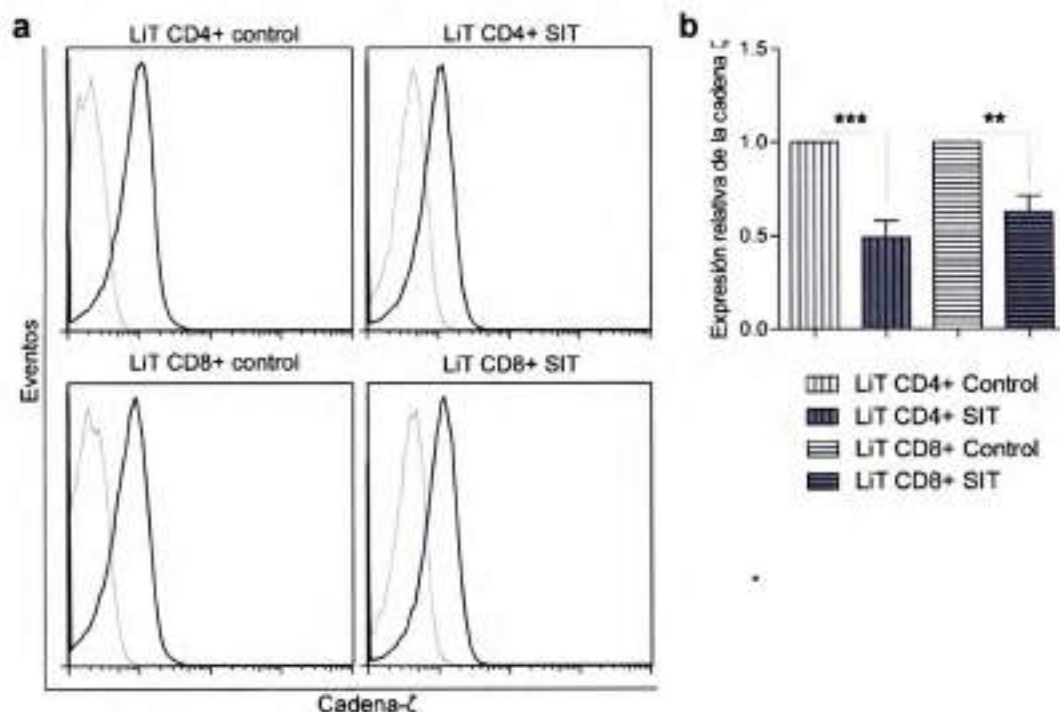
### LiT SIT expresan niveles reducidos de la cadena zeta del complejo TCR-CD3

Dentro de las subunidades que conforman el receptor de la célula T (TCR), la cadena *zeta* ( $\zeta$ ) tiene roles clave en el ensamblaje, expresión y la señalización a través del TCR. Dado que dicha cadena es un componente fundamental en la cascada de señales gatilladas a través del TCR, la reducción en su expresión compromete severamente la funcionalidad de los LiT (revisados por Baniyash<sup>132</sup>).

Con el objetivo de investigar si la respuesta reducida de LiT SIT a estímulos policlonales como anti-CD3/anti-CD28 podría explicarse, en parte, por una reducción en



la expresión de la cadena  $\zeta$ , se evaluó por citometría de flujo la expresión de dicha molécula en LiT SIT vs. LiT controles. En concordancia con su característica de células disfuncionales, los LiT CD4+ y CD8+ SIT mostraron una expresión significativamente reducida de la cadena  $\zeta$  respecto a LiT controles (Figura 9 a y b).



**Figura 9.** LiT CD4+ y CD8+ SIT expresan menores niveles de la cadena zeta del complejo TCR/CD3. (a) Histogramas representativos muestran la expresión de la cadena  $\zeta$  (líneas negras) en LiT controles (izquierda) y LiT SIT (derecha). Los histogramas llenos representan el control negativo de fluorescencia (FMO). Gráficos de un donante representativo de tres donantes diferentes. (b) Las barras representan la expresión relativa de la cadena  $\zeta$  en LiT SIT respecto a sus correspondientes controles  $\pm$  SEM ( $n=3$ ). El test estadístico utilizado fue ANOVA de una vía, post-test: Bonferroni (LiT SIT vs. LiT control). \*\* $p<0.01$ , \*\*\* $p<0.001$ .

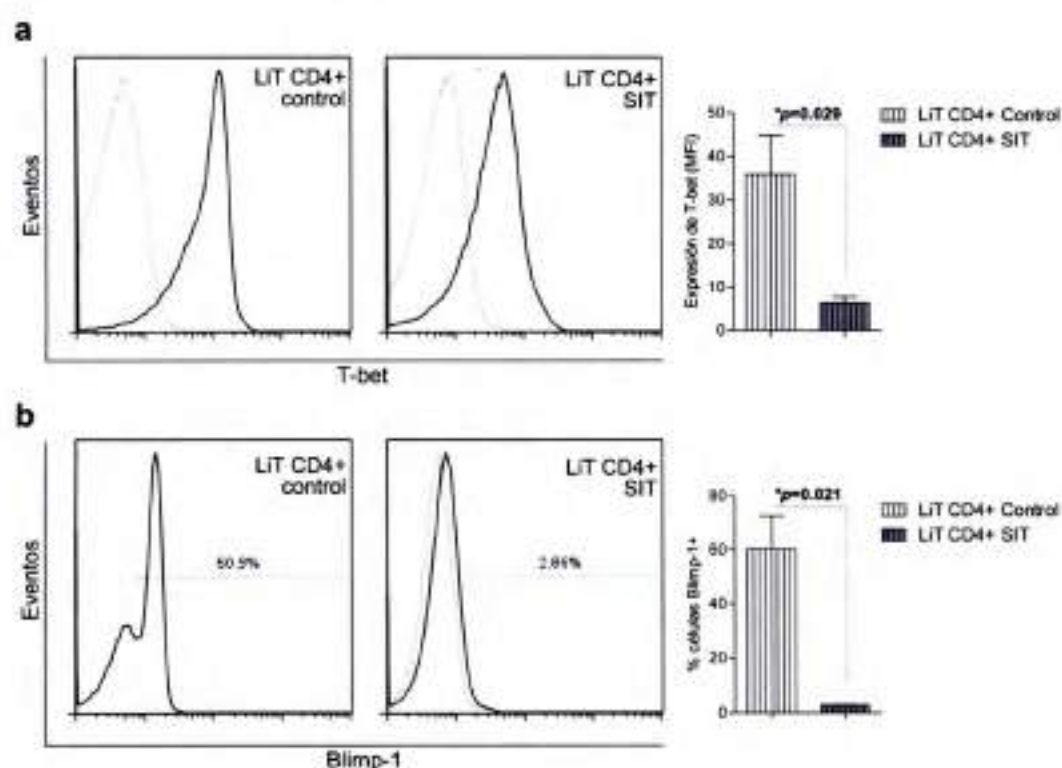
### **LiT SIT expresan niveles reducidos de factores de transcripción involucrados en la diferenciación o función efectora de LiT**

Es ampliamente conocido que factores de transcripción como Blimp-1, T-bet y Eomes regulan múltiples funciones efectoras de los LiT. Por ejemplo, Blimp-1 es un conocido represor de la expresión de IL-2 en LiT tanto CD4+ como CD8+<sup>133,134</sup>. Por otro lado, Blimp-1 es requerido para una respuesta citotóxica eficiente en LiT CD8+<sup>110</sup>. Mientras que T-bet es necesario para la producción de IFN- $\gamma$  por LiT CD4+ y CD8+<sup>110,135,136</sup>.

Eomes, es un factor de transcripción asociado comúnmente a LiT CD8+ y su expresión es necesaria para la producción IFN- $\gamma$  y perforinas en dichas células<sup>110</sup>.

Con el objetivo de investigar si la expresión de factores de transcripción arriba mencionados se correlacionaba con el estado disfuncional de los LiT SIT, se evaluó por citometría de flujo la expresión de dichos factores.

La Figura 10 muestra la expresión de T-bet y Blimp-1 en LiT CD4+ controles y SIT. La evaluación de la expresión de T-bet reveló que si bien la mayoría de los LiT CD4+ SIT expresan este factor, su nivel de expresión fue significativamente menor al hallado en LiT CD4+ controles (Figura 10a). Este dato está en concordancia con el hallazgo previo que demuestra que LiT CD4+ SIT son incapaces de producir IFN- $\gamma$  (Figura 5b). Respecto a la expresión de Blimp-1, a diferencia de los LiT CD4+ controles, los LiT CD4+ SIT no expresaron dicho factor (Figura 10b). Dado que los LiT CD4+ SIT son incapaces de producir IL-2 este dato resultó inesperado.



**Figura 10.** LiT CD4+ SIT expresan niveles reducidos o nulos de factores de transcripción T-bet y Blimp-1. Histogramas de un donante representativo de tres donantes muestran la expresión de T-bet (a) y Blimp-1 (b) (líneas negras) en LiT controles (izquierda) y LiT SIT (derecha). Los histogramas llenos representan el control negativo de fluorescencia (FMO). Las barras representan la expresión promedio de T-bet en LiT controles y SIT (normalizado a su respectivo control FMO)  $\pm$  SEM ( $n=3$ ). En ambos casos, una prueba *t* de Student apareada (LiT CD8+ SIT vs. LiT CD8+ control), *p* se indica en cada gráfico.

La expresión de T-bet y Blimp-1 en LiT CD8+ SIT mostró el mismo patrón que los LiT CD4+ SIT. En la Figura 11 se observa que LiT CD8+ SIT exhibieron niveles significativamente reducidos de T-bet respecto a LiT CD8+ controles (Figura 11a) mientras que no expresaron Blimp-1 (Figura 11b). El estudio de la expresión de Eomes reveló que los LiT CD8+ SIT no expresan Eomes, mientras que un 23±12% de los LiT CD8+ controles expresaron dicho factor (Figura 11c). Este resultado esta en concordancia con las observaciones previas que muestran que los LiT CD8+ SIT no producen IFN- $\gamma$  ni son capaces de degranular, hallazgos indicativos de una función citotóxica comprometida.

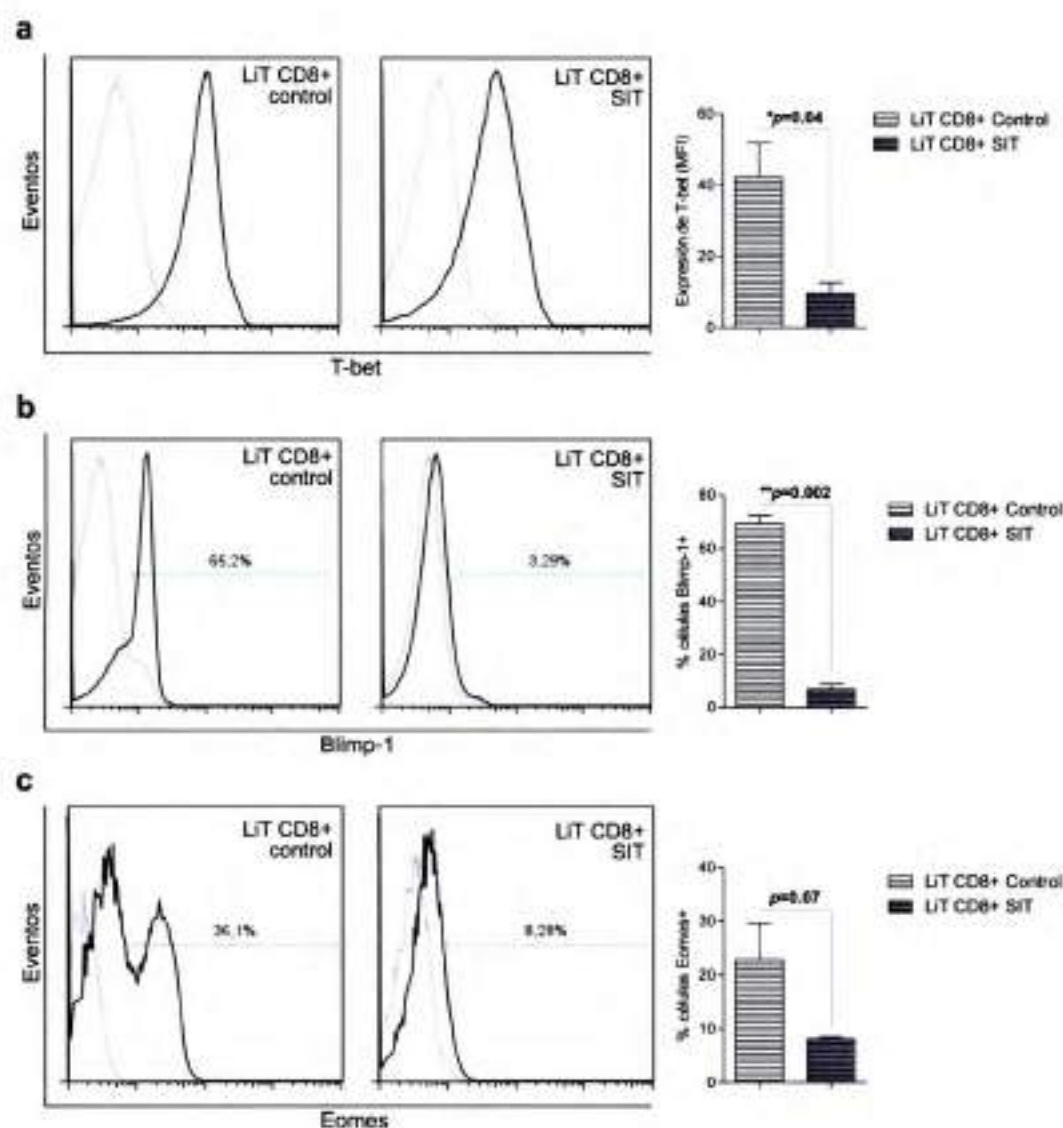


Figura 11. LiT CD8+ SIT expresan niveles reducidos o nulos de factores de transcripción T-bet, Blimp-1 y Eomes. Histogramas de un donante representativo de tres donantes muestran la expresión de T-bet (a),



Blimp-1 (b) y Eomes (c) (líneas negras) en LiT controles (izquierda) y LiT SIT (derecha). En todos los casos, los histogramas llenos representan el control negativo de fluorescencia (FMO). Las barras representan la expresión promedio de T-bet en LiT controles y SIT (normalizado a su respectivo control FMO)  $\pm$  SEM ( $n=3$ ). En todos los casos, una prueba *t* de Student apareada (LiT SIT vs. LiT control), *p* se indica en cada gráfico.

Intlekofer y col.<sup>137</sup> demostraron que la ausencia de T-bet y Eomes en LiT CD8+ conduce a una falla en la generación de LiT CD8+ citotóxicos funcionales. Es más, en ausencia de ambos factores de transcripción, dichas células secretan cantidades aberrantes de la citoquina IL-17. En base a este reporte y a los resultados obtenidos previamente, se decidió evaluar si LiT CD8+ SIT estaban produciendo elevados niveles de IL-17. Dado que el principal linaje de LiT productor de IL-17 son los LiT CD4+, LiT CD4+ controles fueron utilizados como control. La Figura 12 muestra claramente que LiT CD8+ SIT no producen IL-17.

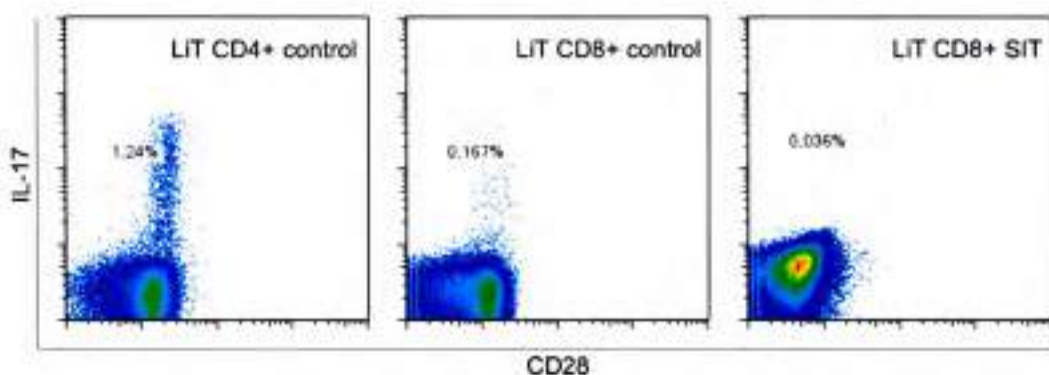


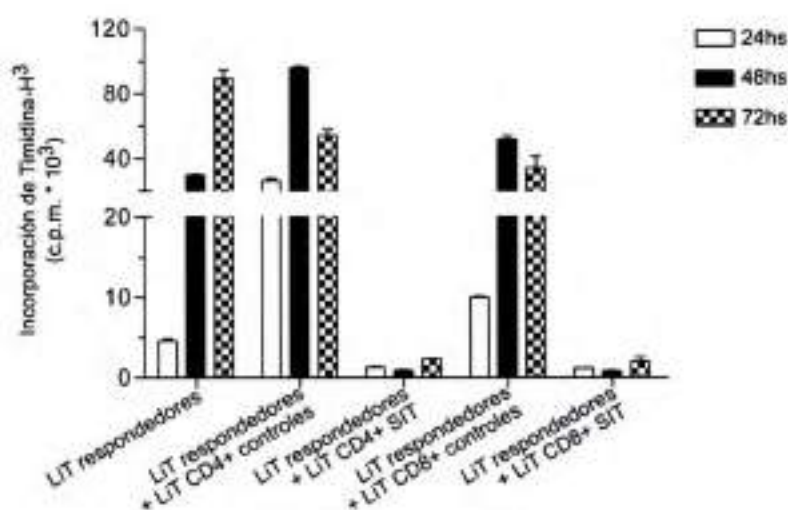
Figura 12. *LiT CD8+ SIT no producen IL-17*. Gráficos de dos parámetros muestran la expresión intracelular de IL-17, en función de CD28, en LiT CD4+ controles (panel de la izquierda), LiT CD8+ controles (panel central) y en LiT CD8+ SIT (panel de la derecha) luego del estímulo con PMA/ionomicina. En cada gráfico se indica el porcentaje de LiT que expresan IL-17. Gráficos de un donante representativo de dos donantes diferentes.

### **LiT SIT suprimen respuestas linfoproliferativas *in vitro***

La capacidad supresora de LiT CD4+ y CD8+ SIT ha sido previamente reportada<sup>3-5</sup>. Sin embargo, los mecanismos de supresión de la linfoproliferación empleados por dichas células no han sido descritos aún. Montes y col.<sup>3</sup> demostraron que LiT SIT suprimen la

proliferación de LiT convencionales a través de un mecanismo que requiere el contacto célula-célula.

Con el objetivo de profundizar en el estudio de los mecanismos involucrados en dicha supresión, se realizó una evaluación cinética de la capacidad supresora de los LiT SIT. Entender en qué etapa (temprana o tardía) ocurre la inhibición de la proliferación, ayudaría a dilucidar qué tipo de moléculas podrían estar involucradas en este fenómeno. Para ello, mediante ensayos de incorporación de timidina tritiada, se evaluó la proliferación de LiT CD3+ (a quienes se denominó LiT *respondedores*) frente a un estímulo policlonal y en presencia de LiT CD4+ o CD8+ controles o SIT autólogos. La Figura 13 muestra que, a los distintos tiempos evaluados, los LiT *respondedores* cultivados solos o en presencia de LiT CD4+ o CD8+ controles son capaces de proliferar frente al estímulo. Sin embargo, cuando los LiT *respondedores* fueron co-cultivados con LiT SIT, tanto CD4+ como CD8+, la proliferación se encontró significativamente disminuída aún a tiempos muy tempranos de co-cultivo (24hs). Este hallazgo sugiere que LiT SIT constituyen una población celular con capacidad regulatoria intrínseca.



**Figura 13.** LiT CD4+ y CD8+ SIT suprimen *in vitro* la proliferación policlonal de LiT autólogos a tiempos muy tempranos de co-cultivo. LiT CD3+ purificados fueron co-cultivados con LiT controles o SIT en presencia de anti-CD3/anti-CD28. Luego de 24, 48 y 72hs se evaluó la proliferación por incorporación de <sup>3</sup>H-Timidina. Las barras representan las cuentas por minuto (c.p.m.) promedio  $\pm$  SD.

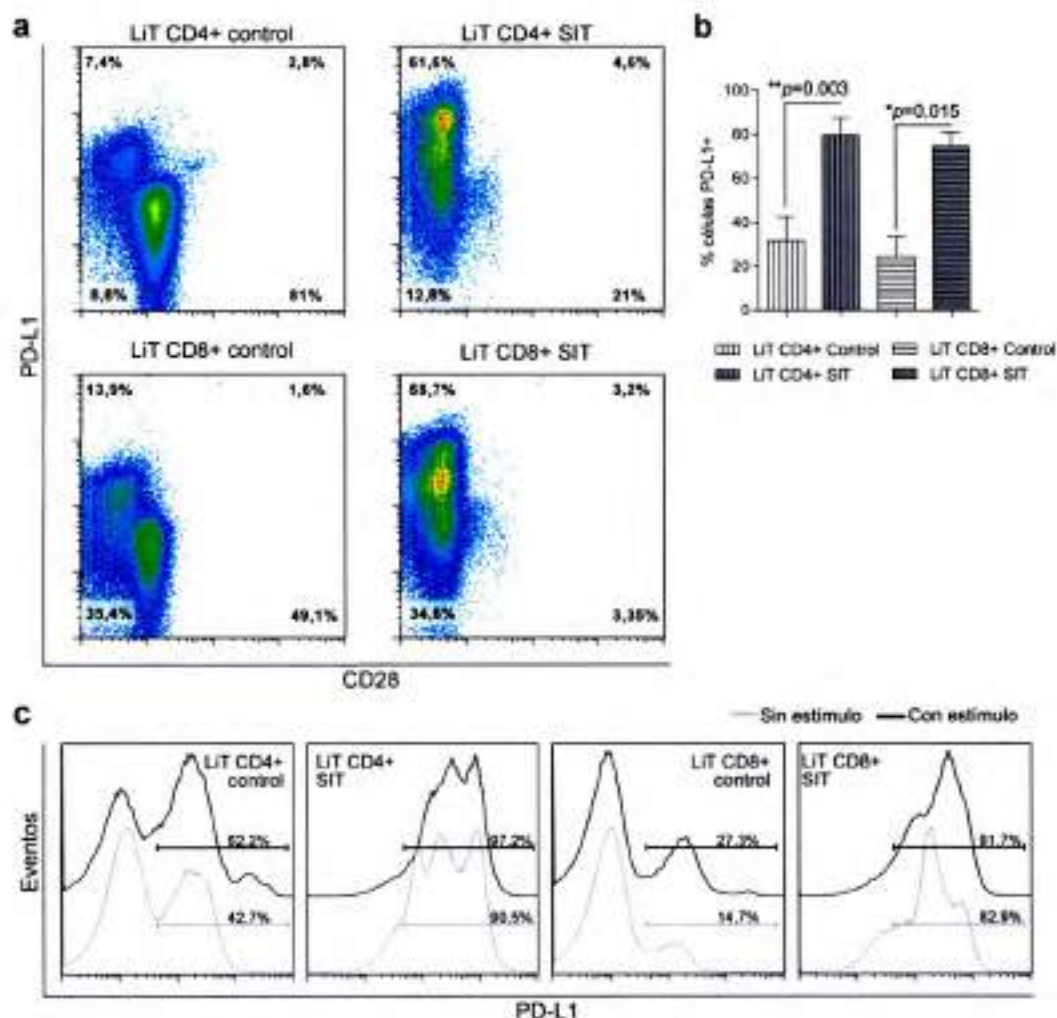
### **LiT SIT expresan moléculas inmuno-moduladoras**

El estudio cinético de la capacidad supresora de LiT SIT demostró que LiT SIT son potentes supresores de la linfoproliferación a tiempos muy tempranos de co-cultivo. Este hallazgo, junto con los resultados previamente publicados que demuestran que la supresión mediada por LiT SIT requiere el contacto celular con los LiT respondedores<sup>3</sup>, nos llevó a estudiar si LiT SIT expresaban, de manera diferencial, moléculas inmuno-moduladoras que pudieran afectar la proliferación de LiT.

Es bien conocido que la activación del LiT debe estar regulada con el fin de limitar las respuestas inmunes y evitar inflamación y linfoproliferación descontroladas. Las señales inhibitorias en los LiT están mediadas, principalmente, por receptores inhibitorios. Así, tras su activación, los LiT comienzan a expresar RIs como CTLA-4, PD-1, Tim-3 y KLRG-1, entre otros. Al contactar con sus ligandos, CD80/CD86, PD-L1, Galectina-9 y Cadherina E, respectivamente, los RIs transmiten señales negativas al LiT que detienen su proliferación (entre otras funciones). Teniendo en cuenta que la expresión de los ligandos de CTLA-4, CD80 y CD86, está restringida a células presentadoras de antígeno, sólo los ligandos PD-L1, Galectina-9 y Cadherina E fueron evaluados. Además, considerando que dichas moléculas podrían participar en la supresión de la linfoproliferación, su expresión se evaluó en LiT controles y SIT sin estimular y estimulados con anti-CD3/anti-CD28.

La evaluación de la expresión de PD-L1 reveló que, en ausencia de estímulo, más del 50% de los LiT SIT (CD28-), tanto CD4+ como CD8+, expresan dicha molécula en superficie; mientras que en la población de LiT controles la expresión es significativamente menor (Figura 14 a y b). Interesantemente, las únicas células que expresaron este ligando en la población de LiT controles fueron CD28- (Figura 14 a), sugiriendo que la expresión de PD-L1 podría estar asociada a la disminución de CD28. Por otro lado, si bien el estímulo con anti-CD3/anti-CD28 indujo un aumento en la expresión de PD-L1 tanto en LiT SIT como en LiT controles, casi el 100% de los LiT SIT estimulados expresaron dicha molécula (Figura 14c).



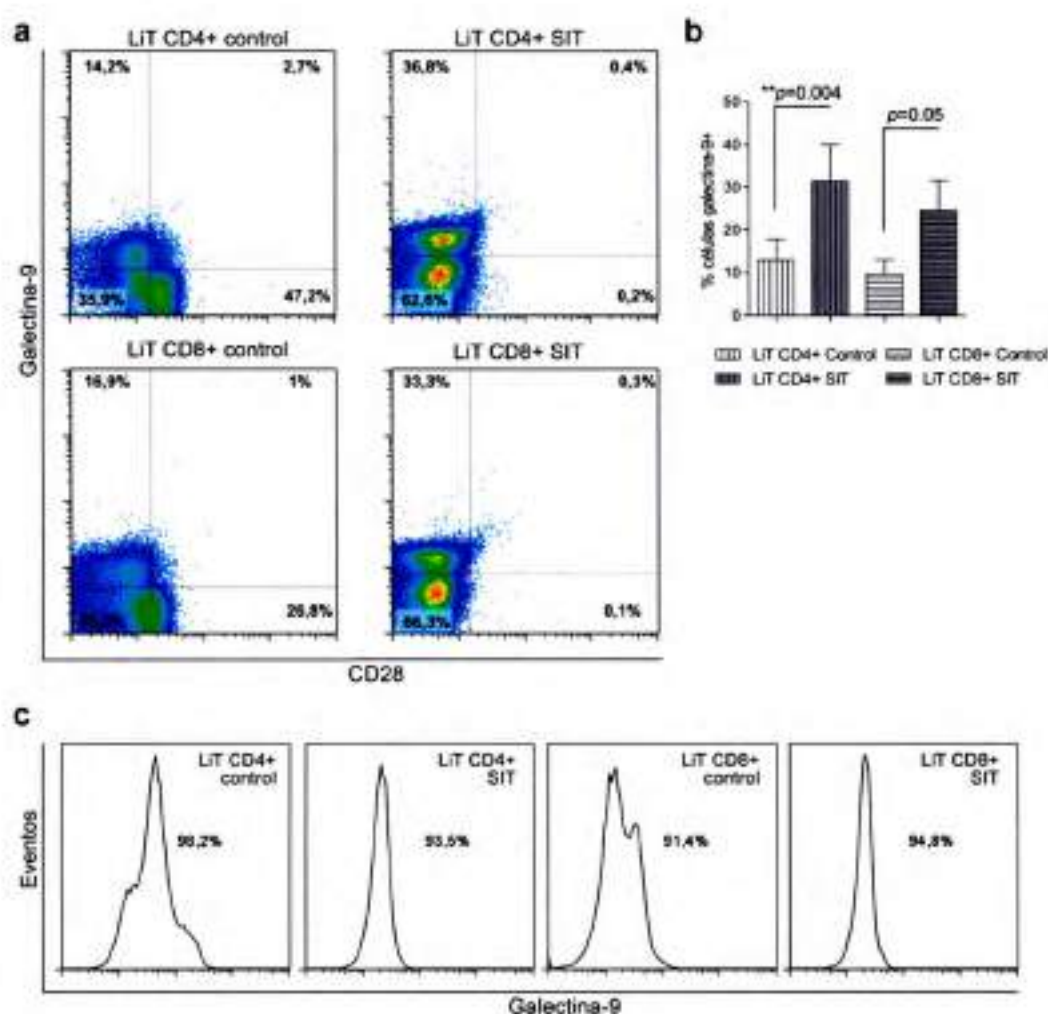


**Figura 14.** *LIT CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> SIT muestran una mayor expresión de PD-L1.* (a) Gráficos de dos parámetros muestran la expresión de PD-L1, en función de CD28, en LiT controles (izquierda) y SIT (derecha). En cada gráfico se indican los porcentajes de células en cada cuadrante. Gráficos de un donante representativo de tres donantes diferentes. (b) Las barras representan el porcentaje promedio de LiT PD-L1<sup>+</sup> ± SEM (n=3). Test estadístico utilizado: prueba t de Student apareada (LiT SIT vs. LiT control). p se indica en el gráfico. (c) Histogramas muestran la expresión de PD-L1 (%) en LiT controles y LiT SIT (como se indica en la figura) en ausencia de estímulo (histogramas llenos) y post-estímulo (líneas negras). Gráficos de un donante representativo de tres donantes diferentes.

Previamente se ha demostrado que pacientes con infección crónica con el virus de Hepatitis C muestran un incremento en la población de LiT regulatorios (CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>) que expresan Galectina-9 (Gal-9). En esta misma cohorte de pacientes, se demostró que la expresión de dicha galectina contribuye a la capacidad supresora de estos LiT regulatorios<sup>138</sup>. Además, se ha demostrado que Gal-9 soluble interacciona con Tim-3 expresado en Li Th1 activados, y que tal interacción, gatilla una serie de señales que llevan a su apoptosis, conduciendo de esta manera a una

contracción de los Li Th1 efectores<sup>139</sup>. Así, Gal-9 representa una molécula con capacidad inmuno-moduladora.

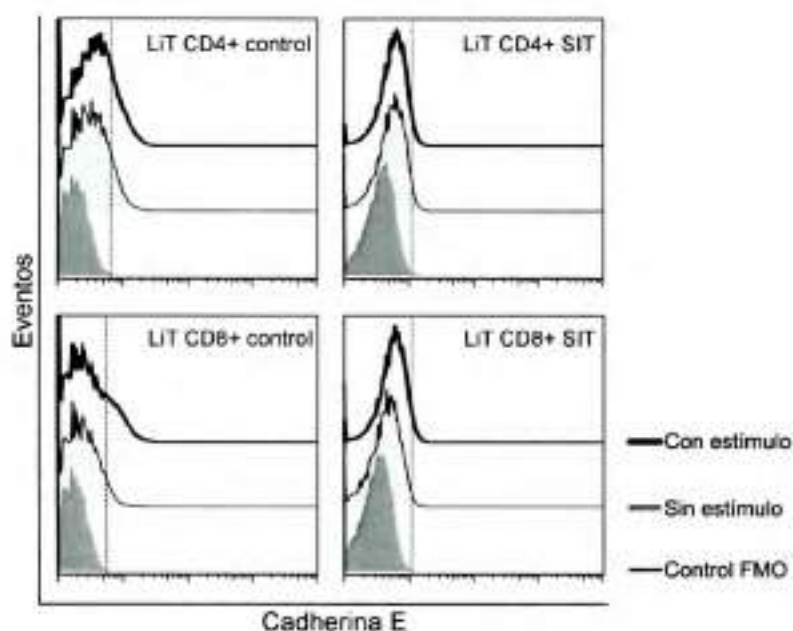
El estudio de la expresión de Gal-9 reveló que un porcentaje significativamente mayor de LiT CD4+ y CD8+ SIT expresaron Gal-9 en superficie respecto a LiT controles (Figura 15a y b), mientras que la expresión intracelular fue similar en ambas poblaciones de LiT (Figura 15c). Interesantemente, los LiT controles que expresaron Gal-9 en superficie fueron CD28-, sugiriendo que podría existir una asociación entre la expresión de CD28 y la de Gal-9 en la superficie de LiT.



**Figura 15.** *LiT CD4+ y CD8+ SIT muestran una mayor expresión de galectina-9 en superficie.* (a) Gráficos de dos parámetros muestran la expresión de Gal-9, en función de CD28, en LiT controles (izquierda) y SIT (derecha). En cada gráfico se indican los porcentajes de células en cada cuadrante. Gráficos de un donante representativo de tres donantes diferentes. (b) Las barras representan el porcentaje promedio de LiT Gal-9+  $\pm$  SEM ( $n=3$ ). Test estadístico utilizado: prueba t de Student apareada (LiT SIT vs. LiT control).  $p$  se indica en el gráfico. (c) Histogramas muestran la expresión intracelular de Gal-9 (%) en LiT controles y LiT SIT como se indica en la figura. Gráficos de un donante representativo de tres donantes diferentes.

Muy poco se conoce acerca de la expresión de Cadherina E en células T de sangre periférica humana. Un único reporte demuestra que varias sub-poblaciones leucocitarias, incluyendo LiT CD8+, expresan Cadherina E. Sin embargo, los mayores niveles de expresión de esta molécula son observados en la población de células dendríticas de origen mieloide<sup>74</sup>.

En nuestras condiciones experimentales se observó que LiT CD8+ controles, y en menor medida LiT CD4+ controles, expresaron bajos niveles de Cadherina E en superficie luego de ser estimuladas (Figura 16).



**Figura 16.** LiT CD4+ y CD8+ SIT no expresan Cadherina E en superficie. Histogramas representativos muestran la expresión de Cadherina E en la superficie de LiT CD4+ o CD8+ controles y SIT como se indica en la figura. Los histogramas llenos representan el control negativo de fluorescencia (FMO). Gráficos de un donante representativo de tres donantes diferentes.

Estos resultados, analizados en conjunto, sugieren que PD-L1 y Gal-9 podrían ser potenciales moduladores de la supresión mediada por LiT SIT. Estudios funcionales son requeridos para evaluar si dichas moléculas realmente participan en la supresión de LiT respondedores.



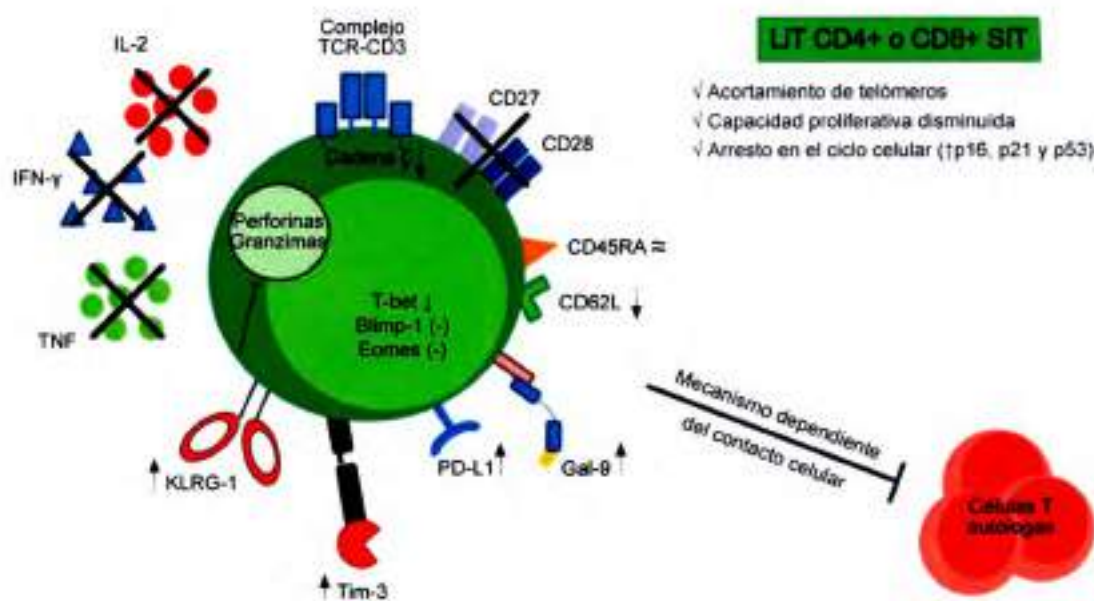
## CONCLUSIONES I

---

En esta sección se demostró que:

- LiT CD4+ y CD8+ SIT muestran un fenotipo compatible con el de células T "experimentadas" o de memoria efectora altamente diferenciadas, dado que pierden completamente la expresión de CD62L, receptor de homing a ganglio linfático.
- LiT CD4+ y CD8+ SIT expresan niveles elevados de los receptores inhibitorios Tim-3 y KLRG-1, mientras que exhiben niveles similares de expresión del receptor inhibitorio PD-1 respecto a LiT CD4+ y CD8+ controles.
- LiT CD4+ y CD8+ SIT son incapaces de producir y/o secretar citoquinas efectoras como IL-2, IFN- $\gamma$ , TNF, IL-6 e IL-10 aún en condiciones de estímulo policlonal.
- Si bien expresan granzimas y perforinas intracelulares, los LiT CD8+ SIT muestran una reducida capacidad de degranulación frente al estímulo con PMA/Ionomicina respecto a LiT CD8+ controles. Estos resultados sugieren que la función citotóxica de LiT CD8+ SIT está severamente comprometida.
- LiT CD4+ y CD8+ SIT expresan niveles significativamente disminuídos de la cadena  $\zeta$  del complejo TCR/CD3, hecho que podría comprometer la señalización a través del TCR.
- LiT CD4+ y CD8+ SIT expresan niveles significativamente disminuídos, y hasta en algunos casos ausentes, de factores de transcripción asociados a la diferenciación y función de LiT como T-bet, Blimp-1 y Eomes.
- LiT CD4+ y CD8+ SIT suprimen *in vitro* la proliferación policlonal de LiT autólogos a tiempos muy tempranos de co-cultivo, indicando que LiT SIT constituyen una población celular con capacidad regulatoria/supresora intrínseca.
- LiT CD4+ y CD8+ SIT, expresan, en ausencia de estímulo, mayores niveles de las moléculas inmuno-moduladoras PD-L1 y Galectina-9 en superficie, respecto a LiT controles. Estos hallazgos sugieren que dichas moléculas podrían mediar la función supresora de LiT SIT.

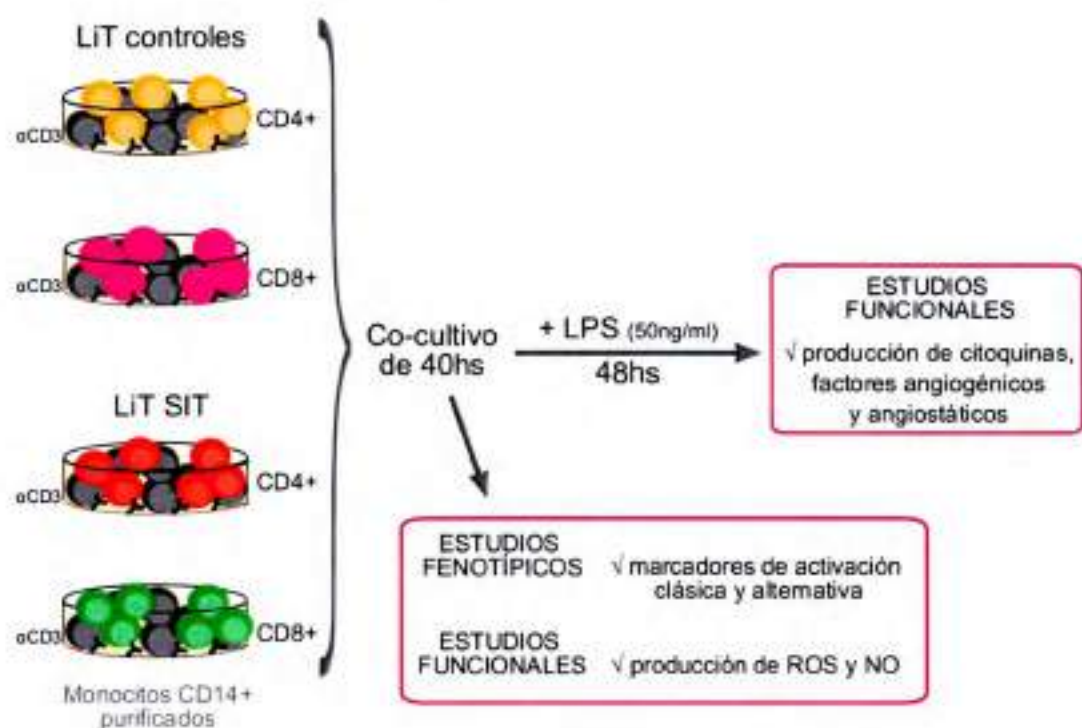
Los resultados obtenidos, analizados en conjunto, permiten concluir que los LiT SIT muestran características de LiT disfuncionales, debido a que son incapaces de producir citoquinas efectoras y/o de degranular. Sin embargo, la expresión basal de moléculas inmuno-modulatorias en LiT SIT, los posiciona como una población con potencial regulatorio sobre otras sub-poblaciones leucocitarias. En esta parte de la tesis se demostró, particularmente, que LiT SIT muestran capacidad supresora intrínseca sobre la proliferación de LiT respondedores ante un estímulo policlonal.



**Figura 17. Conclusiones I:** LiT CD4+ y CD8+ SIT son una población de LiT con funcionalidad reducida pero con potencial inmuno-modulatorio. LiT CD4+ y CD8+ SIT muestran características de células altamente diferenciadas/experimentadas (CD45RA<sup>+</sup>/CD62L<sup>-</sup>). Son incapaces de producir citoquinas. LiT CD8+ SIT presentan una reducida capacidad de degranulación. Muestran una mayor expresión de receptores inhibitorios en membrana. La expresión de la cadena  $\zeta$  del complejo TCR-CD3 se encuentra significativamente disminuida, sugiriendo un compromiso en la señalización a través del TCR. Factores de transcripción involucrados en la diferenciación y funcionalidad de LiT están significativamente reducidos e incluso ausentes en LiT SIT. Estos datos indicarían que LiT SIT son células con casi total pérdida de función. Sin embargo, LiT SIT, tanto CD4+ como CD8+, suprimen la proliferación de LiT autólogos y expresan en su superficie moléculas inmuno-modulatorias como PD-L1 y Gal-9. En conjunto, estos resultados indican que LiT SIT pierden algunas funciones clásicas de los LiT pero podrían adquirir nuevas funciones regulatorias sobre otras poblaciones del SI.

## ESTUDIO DE LA MODULACIÓN DE MONOCITOS/MACRÓFAGOS MEDIADA POR LINFOCITOS T SENESCENTES INDUCIDOS POR TUMORES

Con el propósito de desarrollar el objetivo específico 2 de la presente tesis, se propuso evaluar si LiT SIT son capaces de modular la activación de monocitos/macrófagos humanos. Para ello, se utilizó un modelo experimental previamente reportado por Tiemessen y col.<sup>120</sup>. Así, LiT CD4+ y CD8+ SIT obtenidos como se indicó previamente (Esquema Experimental 1, Resultados I) fueron cultivados con monocitos autólogos en una relación 1:1 monocito/LiT SIT, en presencia de anti-CD3 durante 40hs. Luego de este período de tiempo se realizaron estudios fenotípicos y funcionales (Esquema Experimental 2). Además, con la finalidad de simular un ambiente inflamatorio (componente común a todos los tumores sólidos) los co-cultivos fueron estimulados con LPS durante 48hs adicionales. Posteriormente, se realizaron los estudios funcionales indicados en el Esquema Experimental 2.



Esquema Experimental 2. Co-cultivo de LiT CD4+ y CD8+ SIT con monocitos autólogos purificados [Detalles experimentales en sección Materiales y Métodos].



### **LiT SIT inducen activación clásica de monocitos/macrófagos**

Como primer objetivo se evaluó si los LiT CD4+ y CD8+ SIT eran capaces de modular la diferenciación de monocitos humanos. Es relevante aclarar en este punto que la adherencia de los monocitos a la placa de cultivo es un evento de activación que puede inducir expresión génica y hasta secreción de proteínas<sup>140</sup>. De manera que, luego de varias horas de cultivo los monocitos humanos se convierten en una mezcla indistinguible de monocitos y macrófagos. Es por ello que a esta población se la nombrará como monocitos/macrófagos (Mo/Ma) durante el desarrollo del resto del manuscrito.

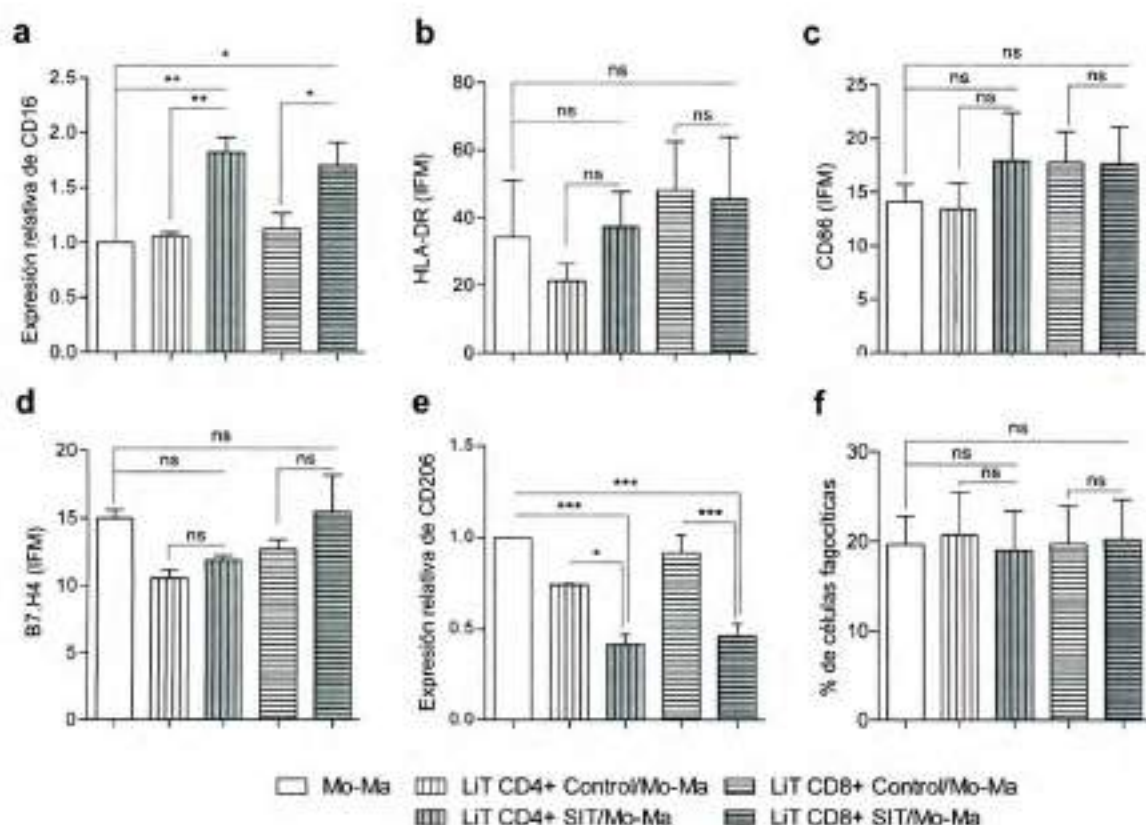
Monocitos CD14+ fueron cultivados solos o con LiT autólogos SIT o controles. Luego de 40 horas de co-cultivo, se evaluaron marcadores fenotípicos por citometría de flujo en la población de Mo/Ma CD14+. Se analizó la expresión de moléculas como CD16, CMH y co-estimuladoras cuyo incremento ha sido asociado a un perfil de activación clásica (M1). Además, se evaluó la expresión de CD206 y la capacidad fagocítica de Mo/Ma cuyo incremento habitualmente se asocia a un perfil de activación alternativa (M2)<sup>113</sup>.

El análisis de la expresión de CD16, molécula típicamente asociada con macrófagos pro-inflamatorios o clásicamente activados<sup>141-144</sup>, reflejó que los Mo/Ma co-cultivados con LiT CD4+ y CD8+ SIT mostraron niveles significativamente mayores de dicha molécula respecto a los Mo/Ma co-cultivados con LiT CD4+ y CD8+ controles (Figura 18a). Además, se observó que los Mo/Ma co-cultivados con LiT controles expresaron niveles de CD16 similares a los observados en los Mo/Ma cultivados solos (Figura 18a), indicando que LiT SIT, tanto CD4+ como CD8+, indujeron un aumento en la expresión de CD16 en la población de Mo/Ma CD14+. En contraste, no se hallaron diferencias en la expresión de HLA-DR (una molécula del CMH clase II clásica) (Figura 18b) ni de moléculas co-estimuladoras/inhibitorias como CD86 (Figura 18c) y B7.H4 (Figura 18d), respectivamente.

Conjuntamente, el análisis de la expresión del receptor de manosa, CD206, reveló que los Mo/Ma co-cultivados con LiT CD4+ y CD8+ SIT exhiben una expresión significativamente menor de dicho receptor respecto a los Mo/Ma co-cultivados con LiT CD4+ y CD8+ controles (Figura 18e).

Teniendo en cuenta que macrófagos activados alternativamente muestran mayor capacidad fagocítica<sup>113</sup> y con el objetivo de profundizar aún más en el perfil de activación de los Mo/Ma co-cultivados con LiT SIT, se realizó un ensayo de fagocitosis utilizando partículas de poliestireno fluorescentes. En concordancia con su fenotipo de células clásicamente activadas, los Mo/Ma co-cultivados con LiT CD4+ y CD8+ SIT no mostraron un incremento en su actividad fagocítica respecto a aquellos co-cultivados con LiT controles o cultivados en ausencia de LiT (Figura 18f).

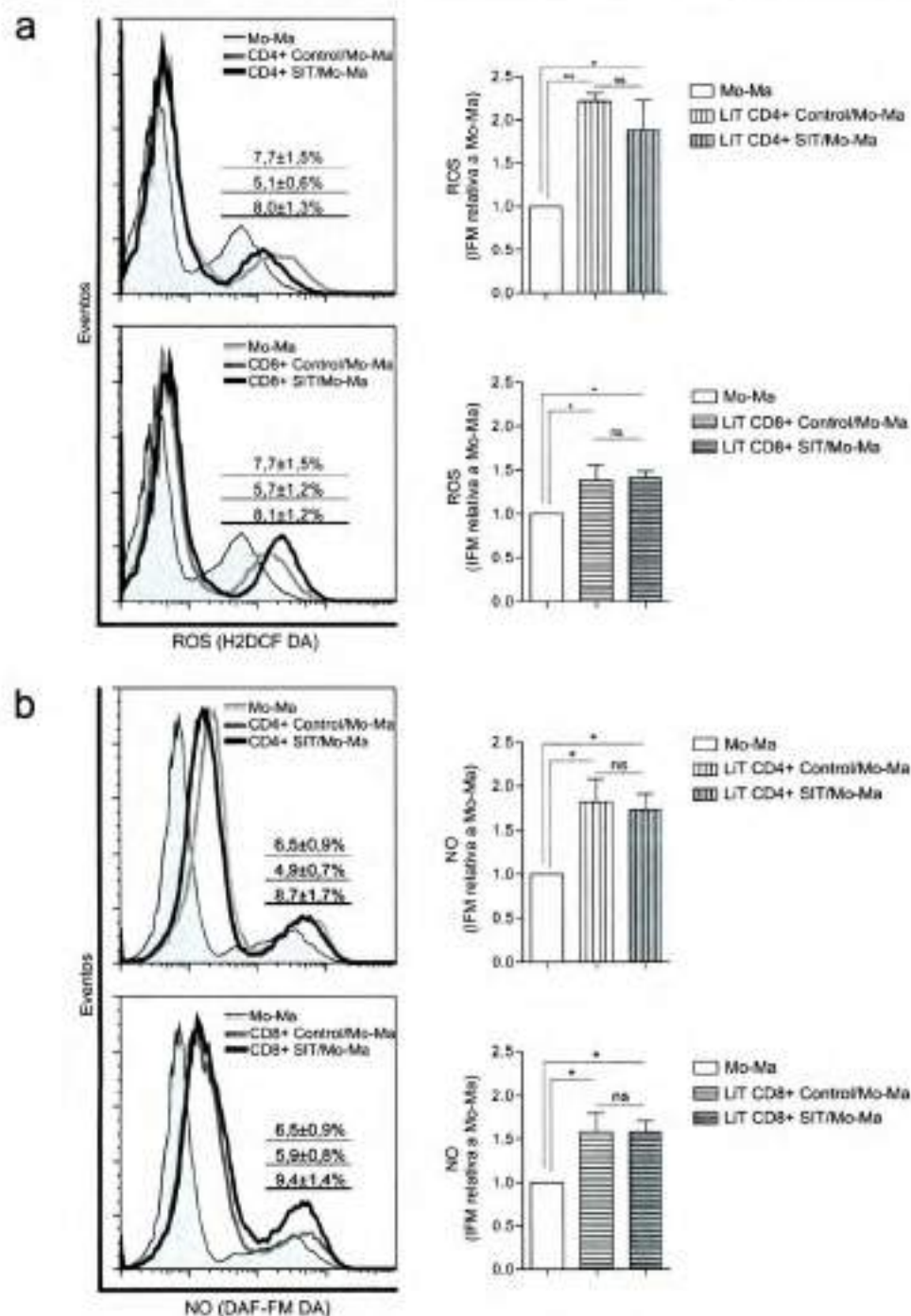
El análisis de los resultados, en conjunto, indica que los LiT SIT conducen a los Mo/Ma humanos hacia un perfil de activación clásica.



**Figura 18.** LiT CD4+ y CD8+ SIT inducen activación clásica de Mo/Ma. (a) Expresión de CD16 ( $\pm$  SEM) en Mo/Ma cultivados con LiT controles o LiT SIT relativa a Mo/Ma cultivados en ausencia de LiT. (b) Expresión de HLA-DR (IFM promedio  $\pm$  SEM) en Mo/Ma cultivados en ausencia de LiT, o con LiT controles o SIT. (c) Expresión de CD86 (IFM promedio  $\pm$  SEM) en Mo/Ma cultivados en ausencia de LiT, o con LiT controles o SIT. (d) Expresión de B7.H4 (IFM promedio  $\pm$  SEM) en Mo/Ma cultivados en ausencia de LiT, o con LiT controles o SIT. (e) Expresión de CD206 ( $\pm$  SEM) en Mo/Ma cultivados con LiT controles o LiT SIT relativa a Mo/Ma cultivados en ausencia de LiT. (f) Porcentaje  $\pm$  SEM de células CD14+ fagocíticas (FITC+). En todos los casos, el test estadístico utilizado fue ANOVA de una vía, post-test: Bonferroni. \* $p < 0.05$ , \*\*\* $p < 0.001$  ( $n = 4$ ).

Para establecer si la adquisición de un fenotipo de activación clásica se correspondía con su función efectora se determinó, por citometría de flujo, la producción de ROS y NO en la población de Mo/Ma CD14+. Así, se encontró un porcentaje significativamente mayor de Mo/Ma productores de ROS (Figura 19a) y de NO (Figura 19b) cuando fueron co-cultivados con LiT SIT, tanto CD4+ como CD8+, respecto a los Mo/Ma co-cultivados con LiT controles. Además, como se aprecia del análisis de los valores de intensidad de fluorescencia media (Figura 19), los Mo/Ma co-cultivados con LiT controles y SIT produjeron mayores niveles de ROS y NO respecto a los Mo/Ma cultivados en ausencia de células T.



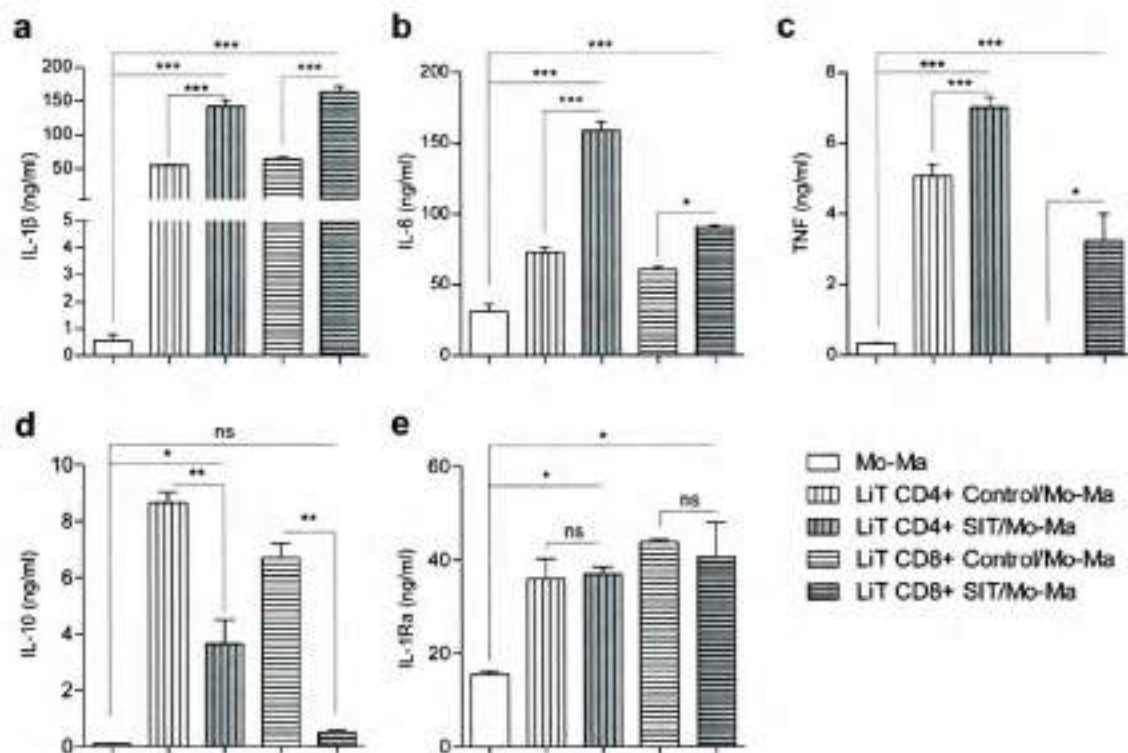


**Figura 19.** LIT CD4+ y CD8+ SIT favorecen la producción de ROS y NO por parte de Mo/Ma. Histogramas representan la producción de ROS (**a**) y NO (**b**) por Mo/Ma cultivados solos o co-cultivados con LIT CD4+ (gráficos superiores en ambos casos) y con LIT CD8+ (gráficos inferiores). Los números indican el porcentaje medio  $\pm$  SEM ( $n=5$ ) de Mo/Ma productores de especies reactivas en cada condición de cultivo (ROS:  $p=0.041$  CD4+ SIT/Mo-Ma vs. CD4+ Control/Mo-Ma y  $p=0.006$  CD8+ SIT/Mo-Ma vs. CD8+ Control/Mo-Ma. NO:  $p=0.011$ , CD4+ SIT/Mo-Ma vs. CD4+ Control/Mo-Ma y  $p=0.014$  CD8+ SIT/Mo-Ma vs. CD8+ Control/Mo-Ma. Test estadístico utilizado: prueba *t* de Student apareada).

Los gráficos de barras representan la IFM de ROS (arriba) y NO (abajo) en Mo/Ma co-cultivados con LIT SIT o controles relativo a Mo/Ma cultivados en ausencia de células T. En todos los casos, el test estadístico utilizado fue ANOVA de una vía, post-test: Bonferroni. \* $p<0,05$ , \*\* $p<0,01$  ( $n=5$ ).

## **LiT SIT favorecen la producción de citoquinas pro-inflamatorias por parte de Mo/Ma**

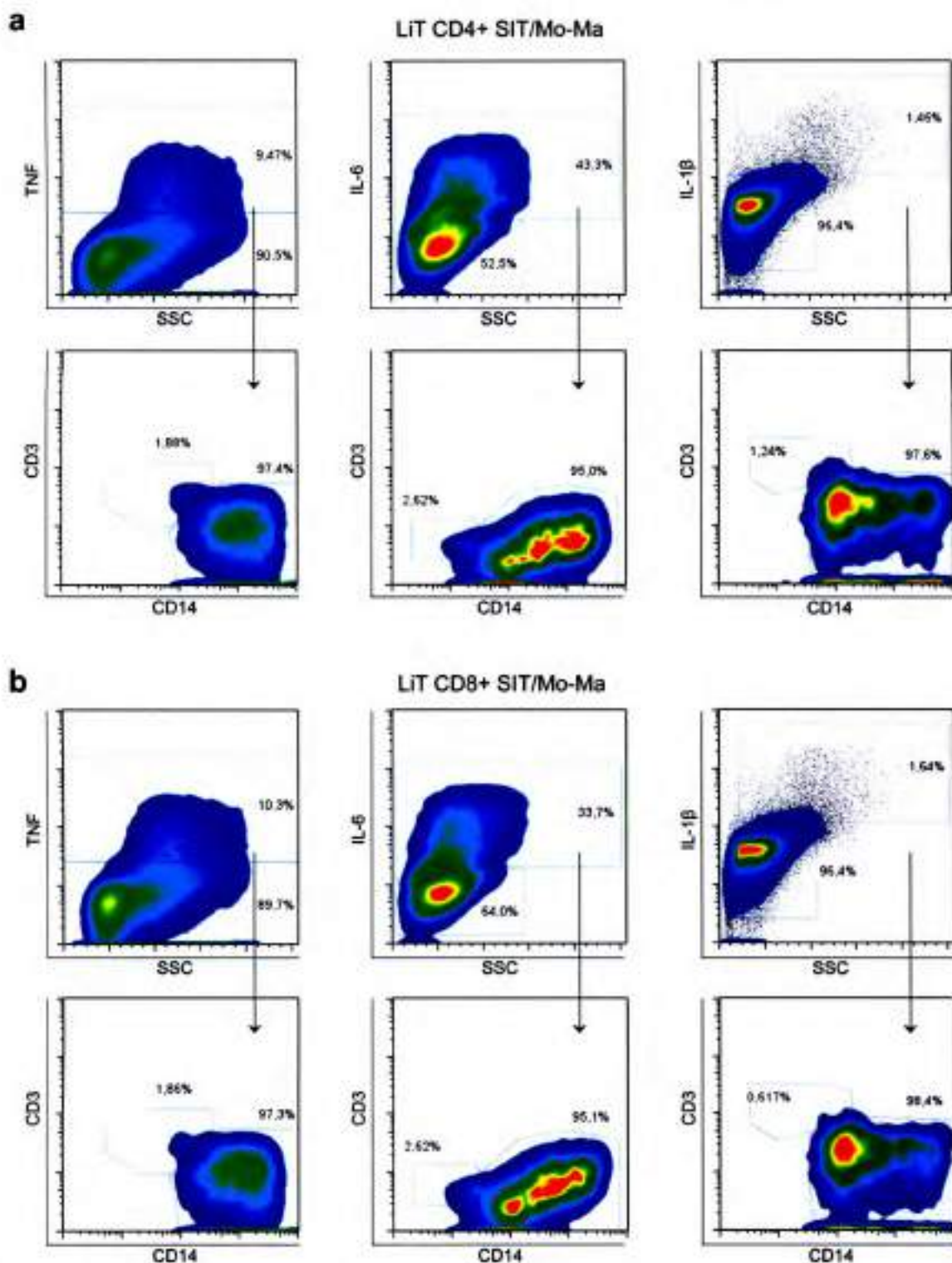
La respuesta inflamatoria juega roles decisivos en los diferentes estadios de desarrollo de un proceso tumoral incluyendo: iniciación, progresión, conversión hacia malignidad, invasión y metástasis. Además, en los últimos años, muchos estudios han demostrado que la inflamación también afecta la inmunovigilancia en tumores y la respuesta a la terapia<sup>2</sup>. La mayoría de los tumores sólidos promueven respuestas inflamatorias a través de la secreción de moléculas capaces de activar a macrófagos asociados al tumor (TAM, *del inglés: tumor-associated macrophages*) a través de receptores tipo Toll, como TLR4 y TLR2. Además, células tumorales muertas (resultado de quimioterapias o de una respuesta inmune anti-tumoral efectiva) liberan ligandos endógenos de estos TLRs, como HMGB1 (*del inglés: high-mobility group protein B 1*), que también promueven la inflamación<sup>145</sup>. Considerando entonces que un microambiente inflamatorio es un componente común y característico a la mayoría de los tumores, se evaluó si LiT CD4+ o CD8+ SIT son capaces de modular la función efectora de Mo/Ma gatillada por LPS (ligando de TLR4), un estímulo inflamatorio habitualmente utilizado para estos fines. Así, se realizó el co-cultivo de Mo/Ma con LiT controles o SIT en presencia de LPS como se indica en el Esquema Experimental 2. En estas condiciones experimentales, los sobrenadantes de Mo/Ma co-cultivados con LiT CD4+ y CD8+ SIT mostraron niveles significativamente mayores de citoquinas pro-inflamatorias como IL-1 $\beta$ , IL-6 y TNF y menores de la citoquina anti-inflamatoria IL-10 comparado con los sobrenadantes de Mo/Ma cultivados con LiT controles o en ausencia de LiT. Por otro lado, los sobrenadantes de Mo/Ma co-cultivados tanto con LiT controles como SIT exhibieron mayores niveles del receptor antagonista de IL-1 (IL-1Ra) respecto a los Mo/Ma cultivados solos (Figura 20).



**Figura 20.** *LIT CD4+ y CD8+ SIT promueven la producción de citoquinas pro-inflamatorias por Mo/Ma.* Niveles de IL-1 $\beta$  (a), IL-6 (b), TNF (c), IL-10 (d) e IL-1Ra (e) en sobrenadantes de cultivo de Mo/Ma cultivados solos o con LIT controles o SIT como se indica. Las barras representan el promedio de las concentraciones de cada citoquina  $\pm$  SEM. Los gráficos corresponden a un donante representativo de 7. En todos los casos, el test estadístico utilizado fue ANOVA de una vía, post-test: Bonferroni. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ .

Si bien los hallazgos obtenidos y expuestos en la sección anterior demostraban que LIT CD4+ y CD8+ SIT no son capaces de producir citoquinas luego de estimulación (Resultados I, Figuras 5 y 6), se decidió corroborar que el aumento en los niveles de citoquinas observado en los co-cultivos de Mo/Ma con LIT SIT era el resultado de una mayor producción de las mismas por parte de los Mo/Ma exclusivamente. Para ello, se evaluó la producción de citoquinas por citometría de flujo intracelular en co-cultivos de Mo/Ma y LIT SIT luego de estimulación con LPS. Tal como se esperaba y consistentemente con la disfuncionalidad de los LIT SIT, más del 90% de las células productoras de TNF, IL-1 $\beta$  e IL-6 fueron CD14+ (Figura 21), mientras que las células CD3+ fueron detectadas sólo en la población no productora de citoquinas (datos no mostrados).

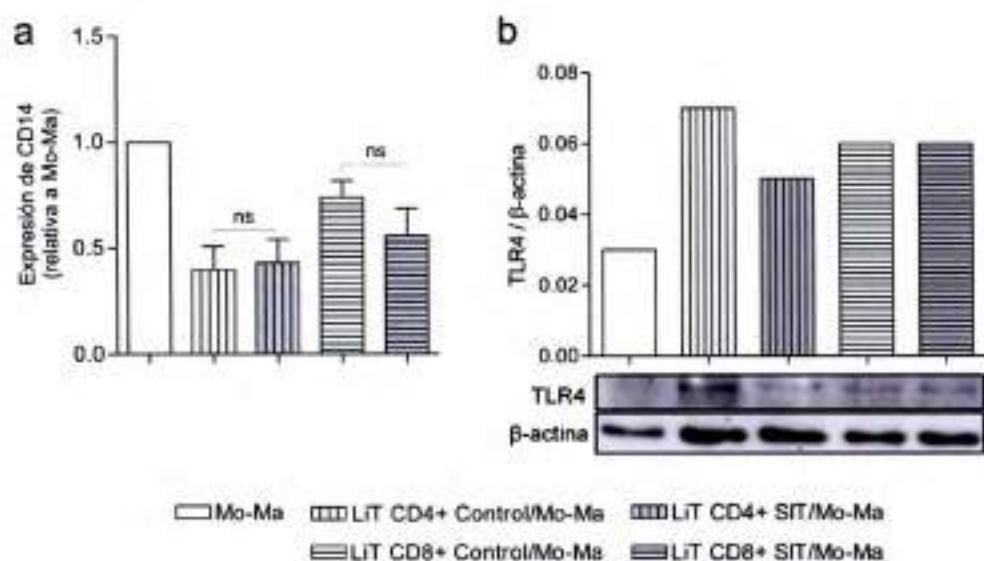




**Figura 21.** *Los Mo/Ma son la única fuente productora de Citoquinas pro-inflamatorias en los co-cultivos de con LIT SIT.* Gráficos de dos parámetros muestran la expresión de TNF (izquierda), IL-6 (centro) e IL-1 $\beta$  (derecha) y la expresión de CD14+ y CD3+ (gráficos inferiores) dentro de la población productora de citoquinas (gráficos superiores) en los co-cultivos de Mo/Ma con LIT CD4+ (a) y CD8+ (b) SIT. En cada gráfico se indica el porcentaje de células que expresan cada marcador. Resultados de un donante representativo de 3.

### **LiT SIT inducen mayor activación de la vía de NF- $\kappa$ B en la población de Mo/Ma**

Dado que los Mo/Ma modulados por LiT SIT mostraron una respuesta inflamatoria exacerbada frente a LPS, se evaluó si luego del co-cultivo con LiT SIT, los Mo/Ma exhibían una expresión incrementada del receptor de LPS (CD14) o del receptor tipo Toll TLR4, involucrado en la traducción de señales mediadas por LPS. La expresión de CD14 y de TLR4 evaluadas por citometría de flujo y western blot, respectivamente, no se encontraron modificadas en los Mo/Ma co-cultivados con LiT CD4+ y CD8+ SIT respecto a los Mo/Ma co-cultivados con LiT controles (Figura 22). Estos resultados, en conjunto, demuestran que el aumento en la respuesta pro-inflamatoria observada en los Mo/Ma co-cultivados con LiT CD4+ y CD8+ SIT respecto a LiT controles no es resultado de una modulación en la expresión de moléculas involucradas en la señalización mediada por LPS.



**Figura 22.** LiT CD4+ y CD8+ SIT no modifican la expresión de moléculas involucradas en la señalización inducida por LPS en Mo/Ma. (a) Expresión de CD14 en Mo/Ma cultivados con LiT controles o SIT relativa a Mo/Ma cultivados en ausencia de LiT ( $\pm$ SEM). ANOVA de una vía, post-test: Bonferroni ( $n=6$ ). (b) Expresión de TLR4 en Mo/Ma cultivados solos o con LiT controles o SIT.  $\beta$ -actina se utilizó como control de carga proteica. El gráfico de barras representa los niveles densitométricos de TLR4 respecto a  $\beta$ -actina. Resultado de un donante representativo de 2.

Es bien conocido que la familia de factores de transcripción de NF- $\kappa$ B regula la expresión de múltiples genes involucrados en el desarrollo de una respuesta

inflamatoria. En mamíferos, la familia de factores de transcripción NF- $\kappa$ B está compuesta por homo- y heterodímeros de cinco miembros de la familia de proteínas Rel, que incluye: NF- $\kappa$ B1 (p105/p50), NF- $\kappa$ B2 (p100/p52), RelA (p65), RelB y c-Rel. En ausencia de estímulo, los homo- y heterodímeros de NF- $\kappa$ B son retenidos en el citoplasma por interacción física con proteínas inhibitorias. Sin embargo, cuando la célula recibe señales extracelulares determinadas, NF- $\kappa$ B rápidamente ingresa a núcleo y activa la expresión de múltiples genes. Dos vías de activación de NF- $\kappa$ B han sido descritas. Una de ellas es la vía canónica, o clásica, que involucra la fosforilación y posterior degradación del inhibidor de NF- $\kappa$ B, I $\kappa$ B $\alpha$ , lo cual favorece la liberación y posterior translocación del dímero p50/p65, quien favorece la transcripción de genes inflamatorios (Figura 23a-I). La otra vía, denominada no- canónica o alternativa, y menos estudiada en macrófagos, involucra el procesamiento del precursor p100 que permite la translocación del dímero p52/RelB y con ello la transcripción de varios genes involucrados en inflamación y en el desarrollo y mantenimiento de órganos linfoides secundarios (Figura 23a-II)<sup>146</sup>.

Teniendo en cuenta que la modulación de Mo/Ma dirigida por LiT SIT conduce a una mayor producción de mediadores pro-inflamatorios y considerando que la activación de NF- $\kappa$ B generalmente está asociada al desarrollo de una respuesta inflamatoria, se evaluó si esta vía se encontraba preferencialmente activada en los Mo/Ma modulados por los LiT SIT. Específicamente, se estudiaron ambas vías de activación de NF- $\kappa$ B en los Mo/Ma co-cultivados con LiT SIT o LiT controles y en los Mo/Ma cultivados en ausencia de LiT. Para ello, se evaluó por western blot la expresión de fosfo-I $\kappa$ B $\alpha$  y la translocación a núcleo de p65 por microscopía confocal, como indicadores de activación clásica de dicha vía. Además, se evaluó por western blot, la expresión de p100 y p52 como indicadores de activación alternativa de NF- $\kappa$ B. Se observó que, luego de 120 minutos de estimulación con LPS, los Mo/Ma modulados por LiT CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> SIT mostraron una mayor expresión de fosfo-I $\kappa$ B $\alpha$  respecto a aquellos co-cultivados con LiT controles (Figura 23b). En concordancia con este resultado, por microscopía confocal se observó que luego de 120 minutos de estimulación con LPS, los Mo/Ma que habían sido co-cultivados con LiT CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> SIT mostraron mayor expresión nuclear de p65 respecto a los Mo/Ma co-cultivados con LiT controles o cultivados en ausencia de LiT (Figura 23c). Además, por citometría de flujo intracelular, se encontró que luego de la



estimulación con LPS, los Mo/Ma co-cultivados con LiT SIT exhibieron mayores niveles de tirosinas fosforiladas respecto a los co-cultivos con LiT controles (Figura 23d), indicando que los Mo/Ma modulados por LiT SIT se encontraban más activados. Por otra parte, la expresión de p100 y p52 no se halló substancialmente modificada en los Mo/Ma co-cultivados con LiT SIT respecto a los co-cultivos con LiT controles (Figura 23e). Estos resultados, en conjunto, indican que los Mo/Ma modulados por LiT SIT, tanto CD4+ como CD8+, muestran una mayor activación de la vía canónica/clásica de NF- $\kappa$ B.

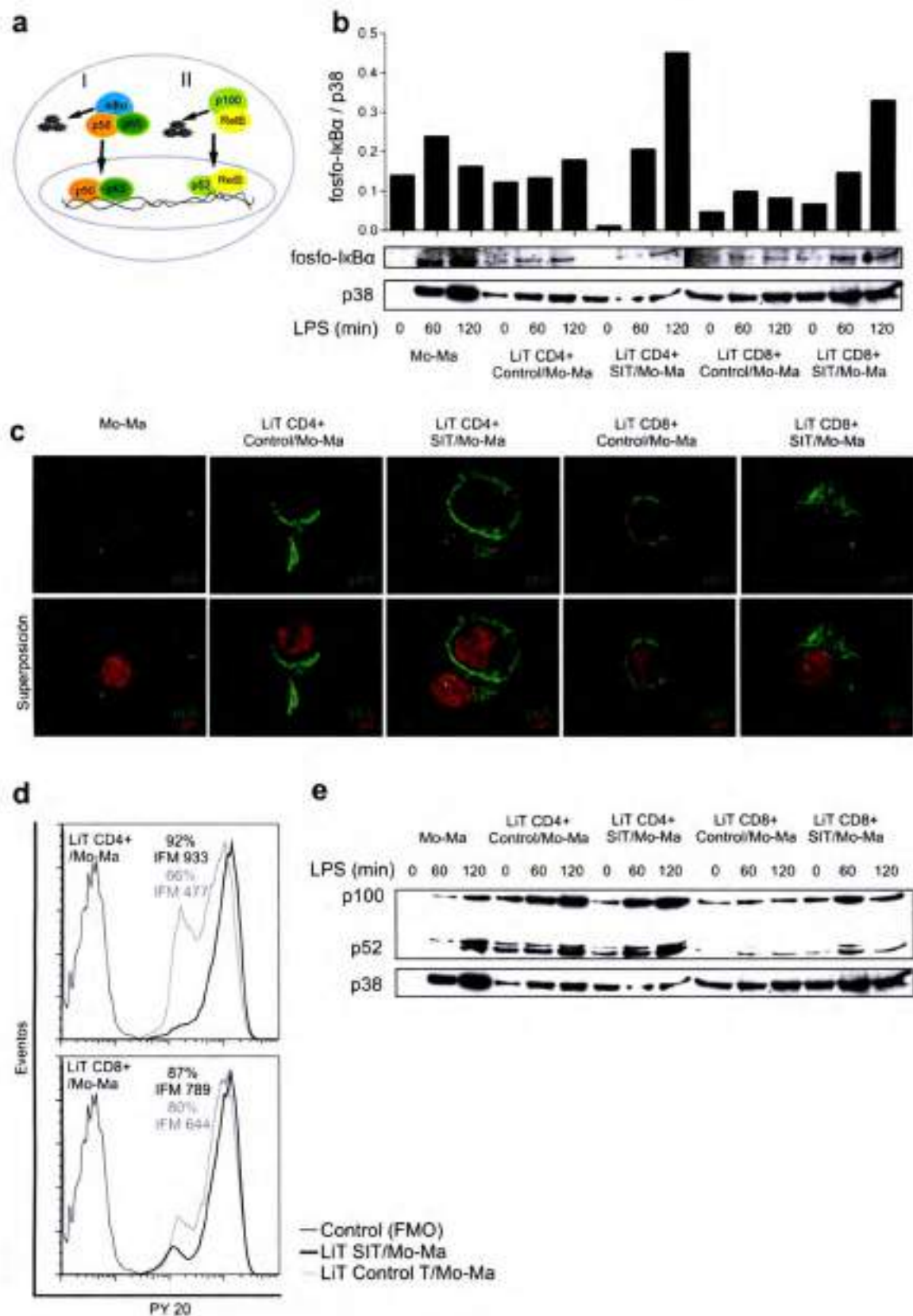


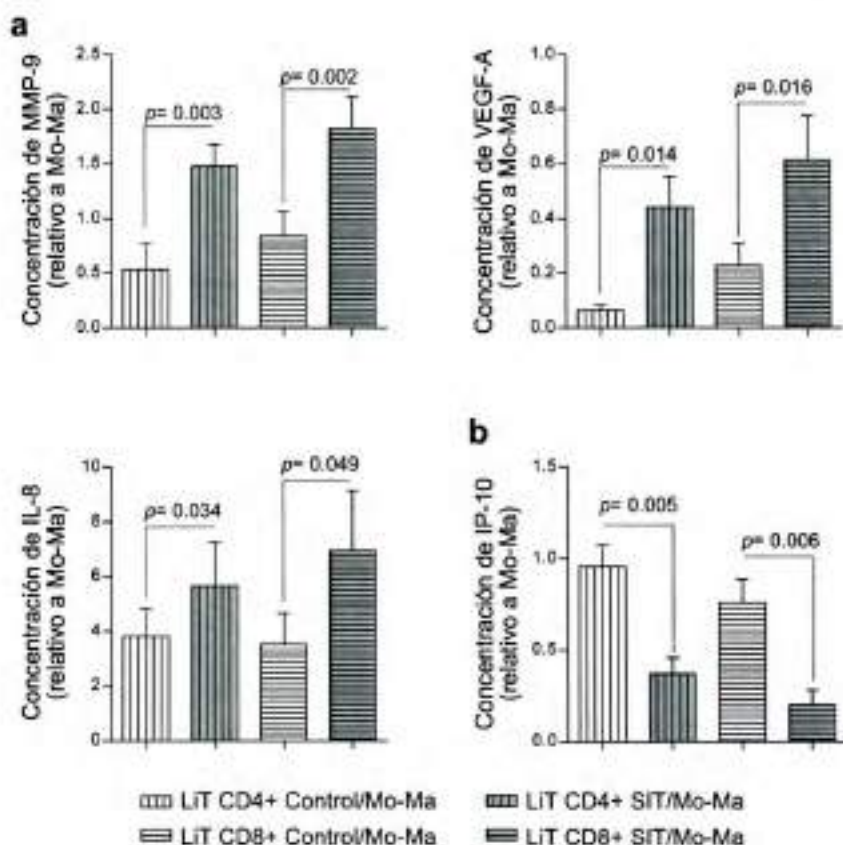
Figura 23. LIT CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> SIT promueven una mayor activación de la vía clásica/caonónica de NF-κB en Mo/Ma. (a) Representación esquemática simplificada de las moléculas involucradas en las vías de

activación canónica (I) y no canónica (II) de NF- $\kappa$ B. (b) Expresión de  $\kappa$ B $\alpha$  fosforilado y p38 en Mo/Ma cultivados solos o con LiT controles o SIT pre- y post- estímulo con LPS a distintos tiempos como se indica en la figura. El gráfico de barras representa los niveles densitométricos de fosfo- $\kappa$ B $\alpha$  respecto a p38. (c) Expresión de p65 (verde) y tinción nuclear con Yoduro de Propidio (IP, rojo) en Mo/Ma cultivados solos o con LiT controles o SIT y estimulados con LPS durante 120 min. Fotografías de microscopía confocal (60X). (d) Histogramas muestran la expresión intracelular de tirosinas fosforiladas (PY20) evaluada por citometría de flujo en Mo/Ma CD14<sup>+</sup> cultivados con LiT controles o SIT estimulados con LPS durante 120 min. (e) Expresión de p100, p52 y p38 en Mo/Ma cultivados solos o con LiT controles o SIT pre- y post- estímulo con LPS a distintos tiempos como se indica en la figura. En todos los casos, los resultados corresponden a un donante representativo de 3.

### **LiT SIT favorecen la producción de factores pro-angiogénicos por parte de Mo/Ma**

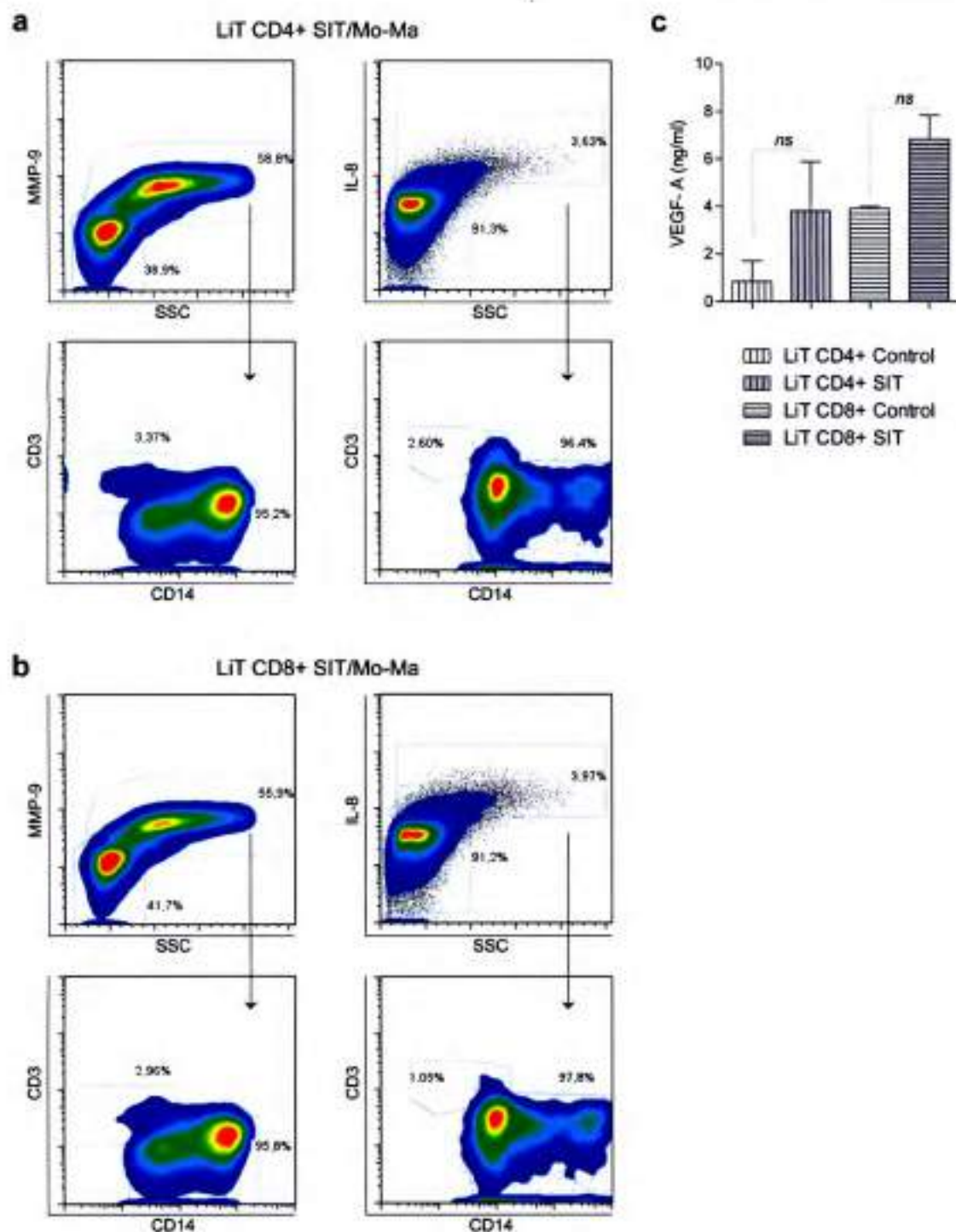
Considerando que la activación de la vía canónica de NF- $\kappa$ B ha sido implicada en la inducción de mediadores pro-tumorigénicos<sup>11</sup> y que dicha vía se encuentra activada en los Mo/Ma modulados por LiT SIT, se determinó la producción de factores relacionados con la angiogénesis como VEGF-A, MMP-9 e IL-8 en los sobrenadantes de cultivo post-estímulo con LPS. En la Figura 24a se muestran las cantidades normalizadas de estos factores, respecto a Mo/Ma cultivados en ausencia de células T. Se puede observar que, los niveles de los tres factores angiogénicos evaluados se encontraron significativamente incrementados en los sobrenadantes de co-cultivo de Mo/Ma con LiT CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> SIT respecto a los LiT controles.





**Figura 24.** LiT CD4+ y CD8+ SIT promueven la producción factores pro-angiogénicos por Mo/Ma. (a) Los gráficos de barras muestran la concentración promedio cada factor angiogénico en co-cultivos de Mo/Ma con LiT SIT o controles relativo a la producción de los mismos por Mo/Ma cultivados en ausencia de LiT ( $n=7$ ). (b) El gráfico de barras muestra la concentración promedio de IP-10 en los co-cultivos de Mo/Ma con LiT SIT o controles relativo a la producción de los mismos por Mo/Ma cultivados en ausencia de LiT ( $n=7$ ). En todos los casos, el test estadístico utilizado fue una prueba *t* de Student apareada (Mo-Ma/LiT SIT vs. Mo-Ma/LiT control). *p* se indica en cada gráfico.

Con el objetivo de excluir a los LiT como posibles productores de factores angiogénicos, realizamos co-cultivos de LiT SIT (CD4+ o CD8+) con Mo/Ma autólogos y posteriormente realizamos una tinción intracelular de dichos factores. Se observó que tanto en los co-cultivos con LiT CD4+ SIT (Figura 25a) como CD8+ SIT (Figura 25b) más del 90% de las células productoras de MMP-9 e IL-8 fueron Mo/Ma CD14+. Además, se confirmó que LiT CD4+ y CD8+ SIT no producen cantidades significativamente mayores de VEGF-A respecto a LiT controles luego del estímulo con anti-CD3/anti-CD28 (Figura 25c).



**Figura 25.** Factores pro-angiogénicos en las co-cultivos de Mo/Ma con LIT SIT son producidos exclusivamente por Mo/Ma. (a y b) Gráficos de dos parámetros muestran la expresión de MMP-9 (izquierda) e IL-8 (derecha) y la expresión de CD14+ y CD3+ [gráficos inferiores] dentro de la población productora de dichos factores (gráficos superiores) en los co-cultivos de Mo/Ma con LIT CD4+ (a) y CD8+ (b) SIT. En cada gráfico se indica el porcentaje de células que expresan cada marcador. Resultados de un donante representativo de 3. (c) Concentración promedio de VEGF-A  $\pm$  SEM en sobrenadante de cultivo de LIT controles o SIT post-estimulo con anti-CD3/anti-CD28 ( $n=3$ ). Test estadístico utilizado: prueba t de Student apareada (Mo-Ma/LIT SIT vs. Mo-Ma/LIT control).

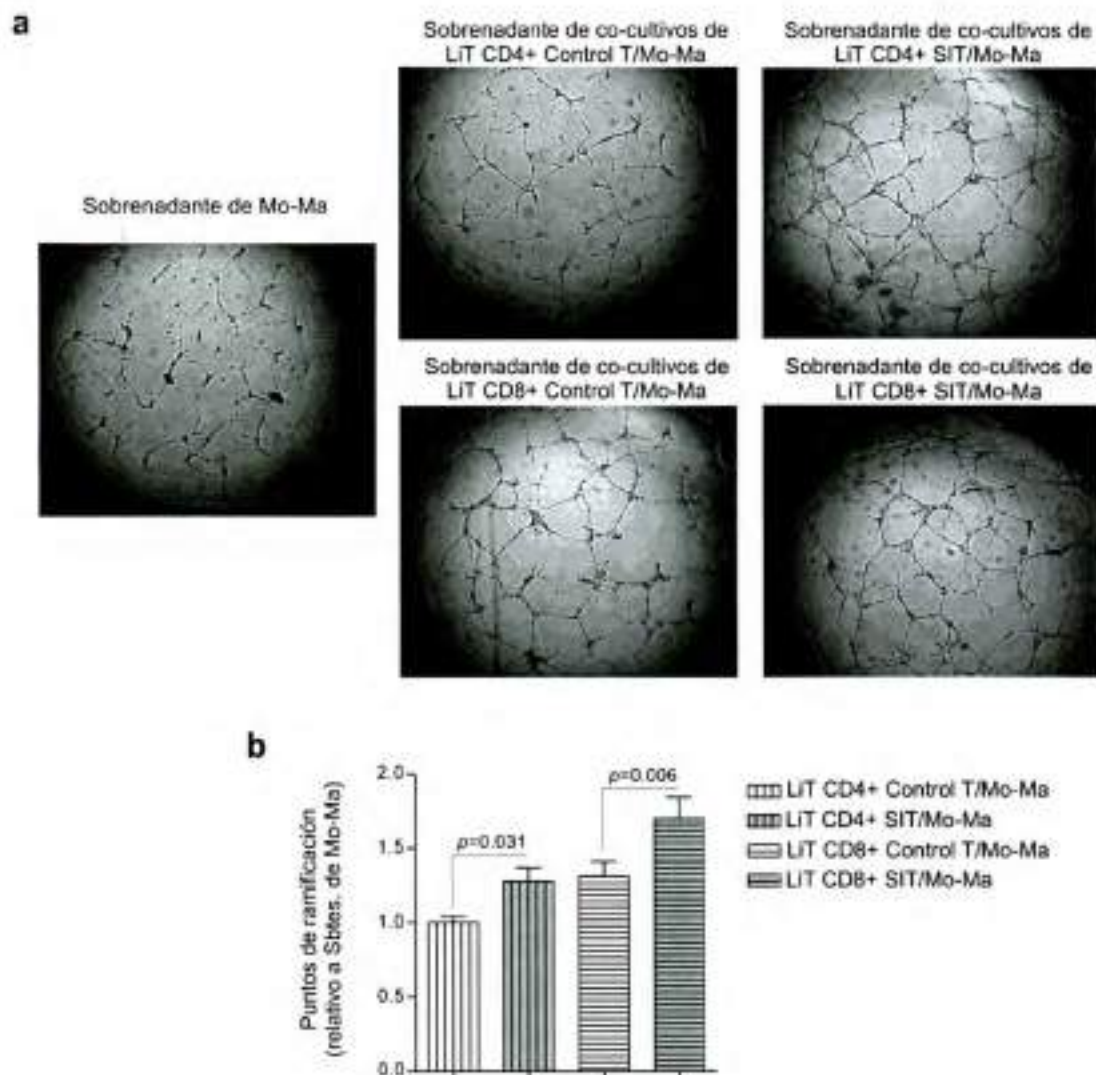
Además, se evaluó la producción de IP-10/CXCL10, un factor comúnmente producido por macrófagos, que exhibe una potente actividad angiostática e inhibe la tumorigénesis<sup>147</sup>. En los sobrenadantes de co-cultivo de Mo/Ma y LiT CD4+ o CD8+ SIT se detectaron concentraciones significativamente menores de este factor respecto a las concentraciones halladas en los sobrenadantes de co-cultivos de Mo/Ma y LiT controles (Figura 24b).

### **Mediadores liberados por Mo/Ma modulados por los LiT SIT favorecen la formación de estructuras tubulares/capilares in vitro**

Ha sido extensamente demostrado que la angiogénesis (formación de vasos sanguíneos *de novo*) es un paso imprescindible para el crecimiento y la diseminación de un tumor. Por otra parte, se ha reportado que macrófagos asociados al tumor son células clave en la regulación de este proceso a través de la secreción de citoquinas y factores de crecimiento que influyen en el comportamiento de células endoteliales<sup>18,126,127</sup>. Teniendo en cuenta estos reportes, se evaluó si factor/es soluble/s liberados por los Mo/Ma modulados por LiT SIT eran capaces de favorecer la angiogénesis.

Para evaluar si factores secretados por los Mo/Ma modulados por LiT SIT eran capaces de favorecer la formación de estructuras tubulares/capilares a partir de células endoteliales, se realizaron ensayos de *tubulogénesis in vitro*. Para ello, células endoteliales de microvasculatura humana (HMEC, del inglés: *human microvascular endothelial cells*) sembradas sobre Matrigel, fueron cultivadas con los sobrenadantes de co-cultivo de Mo/Ma y LiT SIT o LiT controles, o bien con los sobrenadantes de los Mo/Ma cultivados en ausencia de LiT. Luego de 18 horas de cultivo, se evaluó la formación de túbulos/capilares a través de la cuantificación de puntos de ramificación. Como se puede observar en las fotografías de la Figura 26, las células HMEC cultivadas con los sobrenadantes de co-cultivos de Mo/Ma y LiT CD4+ o CD8+ SIT poseen un número significativamente mayor de puntos de ramificación respecto a células HMEC cultivadas con los sobrenadantes de co-cultivo controles (Figura 26a y b). Este resultado indica que los Mo/Ma modulados por LiT SIT podrían favorecer la angiogénesis.

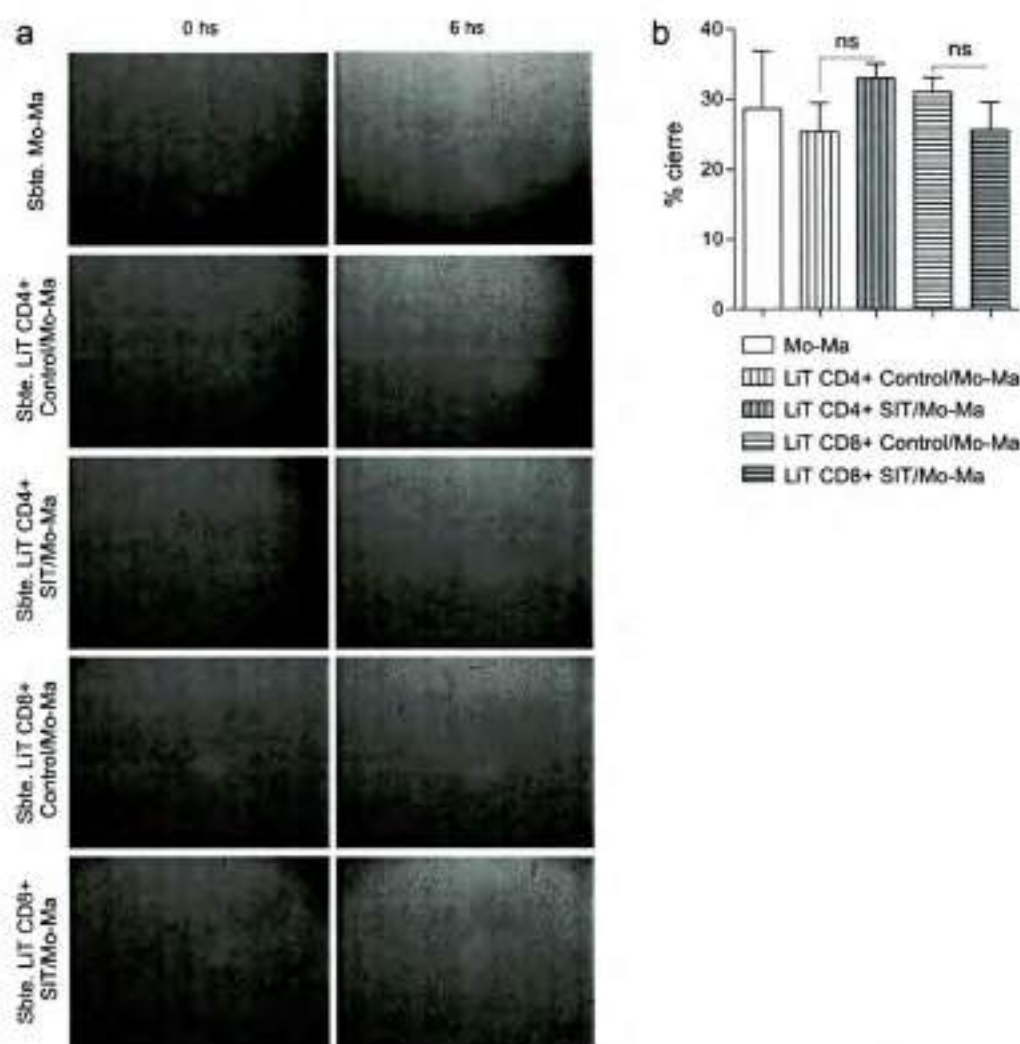




**Figura 26.** Efecto de los sobrenadantes de co-cultivos de Mo/Ma con LiT SIT o LiT controles en la formación de túbulos. (a) Fotografías muestran la formación de estructuras tubulares/capilares por células HMEC luego de la incubación con sobrenadantes (Sbtes.) de cultivo de Mo/Ma solos o de Mo/Ma y LiT controles o SIT. Las fotografías corresponden a un donante representativo de 3. (b) Las barras representan la cantidad de puntos de ramificación promedio (relativos a Sbtes. de Mo/Ma solos)  $\pm$  SEM ( $n=3$ ). Test estadístico utilizado: prueba *t* de Student apareada (Mo-Ma/LiT SIT vs. Mo-Ma/LiT control). *p* se indica en el gráfico.

Con el objetivo de determinar si mediadores secretados por los Mo/Ma modulados por LiT CD4+ y CD8+ SIT podrían influenciar el comportamiento migratorio de células endoteliales se realizaron ensayos de "Wound Healing" o cicatrización. Para ello, células HMEC fueron cultivadas hasta confluencia y posteriormente se realizó una "herida" en la monocapa celular. Estas células fueron luego cultivadas durante 6hs. con los

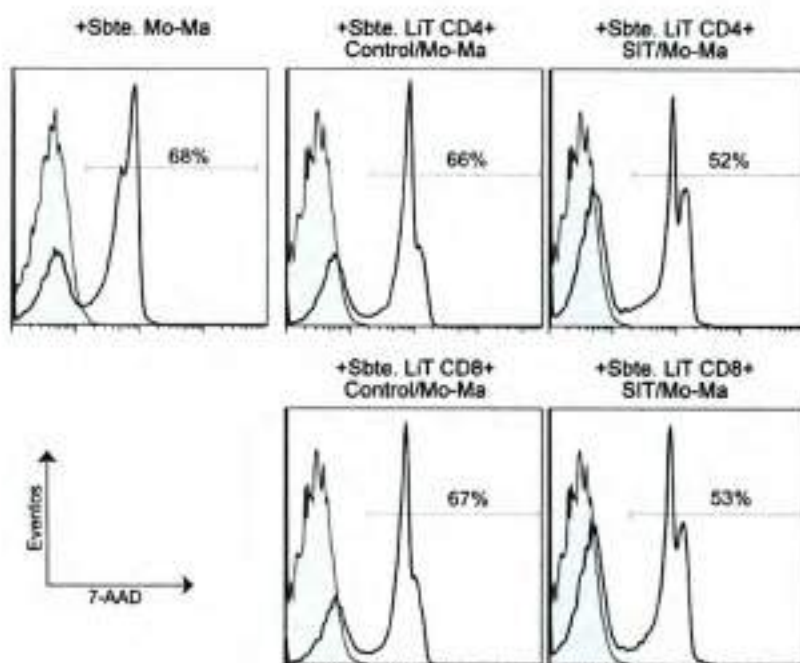
sobrenadantes de co-cultivos de Mo/Ma con LiT SIT o LiT controles o sobrenadantes de Mo/Ma cultivados solos. La Figura 27a muestra las fotografías tomadas a distintos tiempos de cultivo para cada una de las condiciones. La cuantificación del porcentaje de cierre de las heridas en presencia de los distintos sobrenadantes de co-cultivo reflejó que mediadores secretados por los Mo/Ma modulados por los LiT SIT no afectan de manera diferencial el comportamiento migratorio de las células endoteliales (Figura 27b). Este hallazgo no resulta contradictorio en relación al de tubulogénesis dado que los mecanismos moleculares involucrados en los procesos de *tubulogénesis* y *wound healing* son diferentes<sup>148</sup>.



**Figura 27.** Efecto de los sobrenadantes de co-cultivos de Mo/Ma con LiT SIT o LiT controles en procesos de cicatrización mediados por células endoteliales. **(a)** Fotografías muestran el tamaño de la herida al inicio del cultivo (0hs) y a las 6hs de incubación para cada condición como se indica en la figura. **(b)** Las barras representan el porcentaje de cierre de la herida  $\pm$  SEM ( $n=3$ ). Test estadístico utilizado: ANOVA de una vía, post-test: Bonferroni.

Otro evento imprescindible para el crecimiento y la diseminación de un tumor depende de la capacidad de sobrevida de las células tumorales. En este sentido, como se mencionó previamente en la introducción, células tumorales pueden escapar a los mecanismos de inmunosupresión a través de la expresión de moléculas anti-apoptóticas y a la vez pueden recibir señales de sobrevida mediadas por receptores para factores de crecimiento, factores angiogénicos, citoquinas pro-inflamatorias, entre otras<sup>2,9</sup>. Considerando estos reportes, se investigó si mediadores secretados por los Mo/Ma modulados por LiT CD4+ y CD8+ SIT podrían afectar la sobrevida de células tumorales. Para ello, células *HeLa* (derivadas de cáncer cervical humano) se trataron con Mitomicina para inhibir su capacidad proliferativa y evaluar de esta manera sólo su sobrevida. Posteriormente fueron cultivadas con los sobrenadantes de co-cultivos de Mo/Ma con LiT SIT o LiT controles o con los sobrenadantes de Mo/Ma cultivados en ausencia de LiT. A las 48hs de cultivo, la viabilidad de dichas células fue evaluada por citometría de flujo a través de la utilización de un compuesto químico fluorescente con fuerte afinidad por el ADN llamado 7-AAD (7-AminoActinomicinaD). La Figura 28 muestra que células *HeLa* tratadas con los sobrenadantes de co-cultivo de Mo/Ma con LiT CD4+ y CD8+ SIT mostraron menor porcentaje de muerte (células 7-AAD positivas) respecto a aquellas tratadas con los sobrenadantes de Mo/Ma cultivados en ausencia de LiT o con LiT controles, indicando que algun/os mediador/es presente/s en los sobrenadantes de co-cultivo de Mo/Ma con LiT SIT promovería/n la sobrevida de células tumorales.





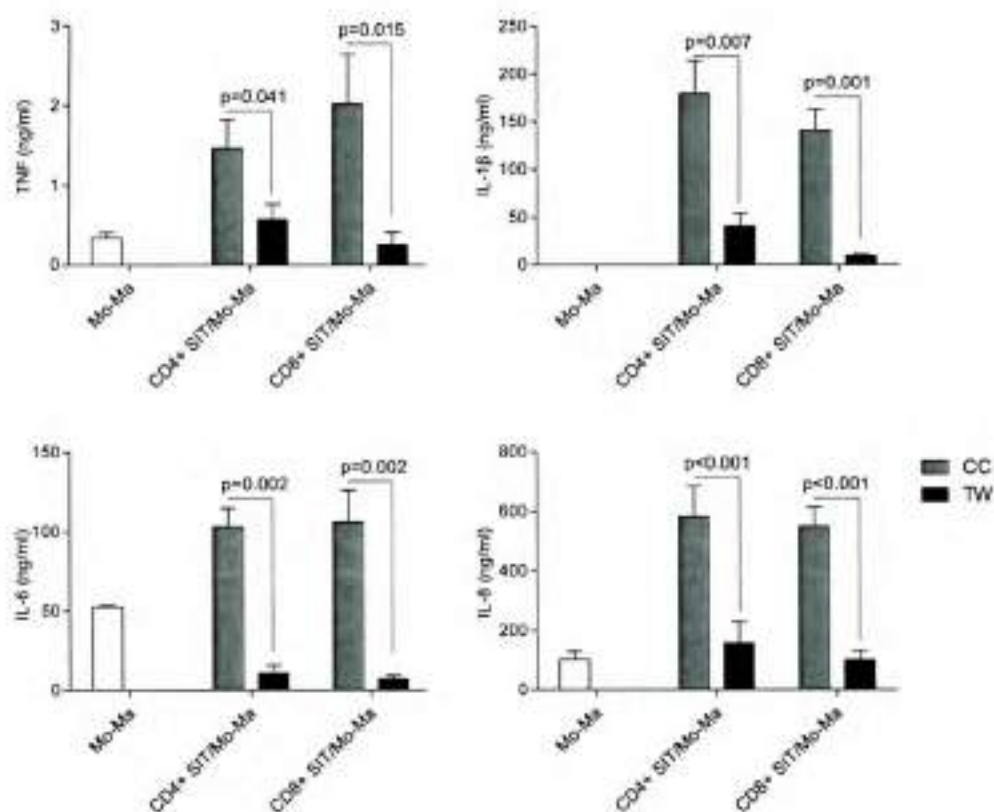
**Figura 28.** Efecto de las sobrenadantes de co-cultivos de Mo/Ma con LiT SIT o LiT controles en la sobrevivencia de células tumorales. Histogramas muestran la incorporación de 7-AAD por células HeLa luego de 48hs. De cultivo en presencia de Sbtes. de Mo/Ma cultivados solos o con LiT controles o SIT. Los números indican el porcentaje de células 7-AAD positivas en cada gráfico. En todos los casos, los histogramas llenos representan a células HeLa no teñidas. Los resultados corresponden a un donante representativo de 3.

Este hallazgo, junto con los datos que indican que factores solubles secretados por los Mo/Ma modulados por LiT SIT favorecerían la formación de estructuras tubulares/capilares, permiten especular que la interacción Mo/Ma - LiT SIT podría facilitar la progresión tumoral.

### **La modulación de monocitos/macrófagos mediada por los LiT SIT requiere el contacto célula-célula**

Para investigar si la modulación de Mo/Ma mediada por LiT CD4+ y CD8+ SIT requería señales derivadas del contacto celular o de factores solubles, se realizaron co-cultivos de Mo/Ma con LiT CD4+ y CD8+ SIT (CC) tal como fue descrito previamente o en presencia de un transwell (TW) que permite que Mo y LiT CD4+ y CD8+ SIT estén

separados por una membrana semipermeable. Como se puede observar en la Figura 29, la interrupción del contacto físico entre los Mo/Ma y los LiT CD4+ o CD8+ SIT anula casi completamente la capacidad de los LiT SIT de potenciar la producción de TNF, IL-1 $\beta$ , IL-6 e IL-8 por parte de Mo/Ma.

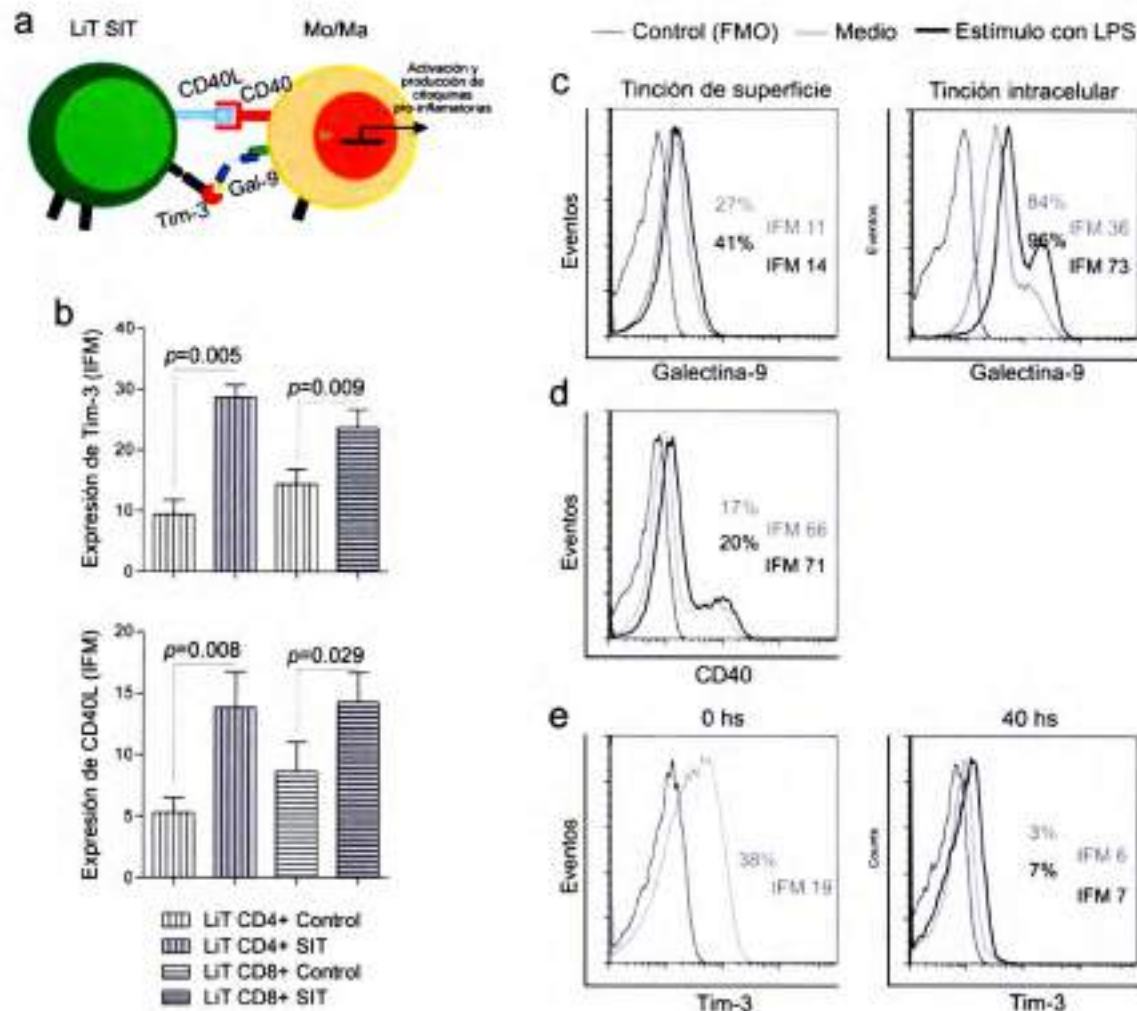


**Figura 29.** La modulación de Mo/Ma mediada por LiT SIT requiere el contacto Mo/Ma-LiT. Niveles de TNF, IL-1 $\beta$ , IL-6 e IL-8 en sobrenadantes de cultivo de Mo/Ma cultivados solos o de Mo/Ma co-cultivados con LiT CD4+ y CD8+ SIT en el mismo pocillo (CC, barras grises) o cultivados separadamente por un transwell (TW, barras negras), con LiT CD4+ y CD8+ SIT estimulados en el TW y monocitos bajo el TW. Las barras representan la concentración promedio de cada citoquina  $\pm$  SEM ( $n=3$ ). Test estadístico utilizado: prueba *t* de Student apareada (CC vs. TW). *p* se indica en cada gráfico.

Los resultados obtenidos permitieron concluir que la modulación de Mo/Ma por LiT SIT requiere el contacto celular entre ambas poblaciones celulares. Por consiguiente, nuestro siguiente objetivo fue profundizar aún más en las vías implicadas en dicha modulación. Para ello, se realizó un exhaustivo estudio fenotípico tanto de LiT CD4+ o CD8+ SIT como de Mo/Ma, focalizando el estudio específicamente a moléculas

expresadas en la superficie celular cuya interacción pudiera estar involucrada en la inducción de citoquinas pro-inflamatorias en Mo/Ma<sup>149-151</sup>. El estudio fenotípico reveló que, luego de la estimulación con anti-CD3, los LiT CD4+ y CD8+ SIT expresaban niveles significativamente mayores de Tim-3 y CD40L respecto a LiT controles (Figura 30b). Asimismo, se observó que los Mo/Ma estimulados *in vitro* con LPS expresaron, tanto en superficie como en citoplasma, Gal-9 uno de los ligandos de Tim-3 más estudiados<sup>139</sup> (Figura 30c). Además, se observó que el 20% de la población de Mo/Ma expresaron la molécula CD40, receptor de CD40L (Figura 30d). Por otra parte, se confirmaron observaciones previas publicadas por Zhang Y. y col.<sup>152</sup>, que demuestran que monocitos humanos CD14+ expresan altos niveles de Tim-3 en ausencia de estímulo; sin embargo, cuando dicha población se estimula con LPS la expresión de Tim-3 se reduce significativamente. En concordancia con dichas observaciones, en nuestras condiciones de co-cultivo, la expresión de Tim-3 en los Mo/Ma se halló completamente disminuída respecto a la observada en monocitos obtenidos *ex vivo* (Figura 30e). Este resultado permite descartar posibles interacciones homotípicas entre Tim-3 y Gal-9 de los Mo/Ma en los co-cultivos así como que Tim-3 esté involucrado en el aumento de la producción de citoquinas pro-inflamatorias en respuesta a LPS como ha sido previamente reportado<sup>152,153</sup>.



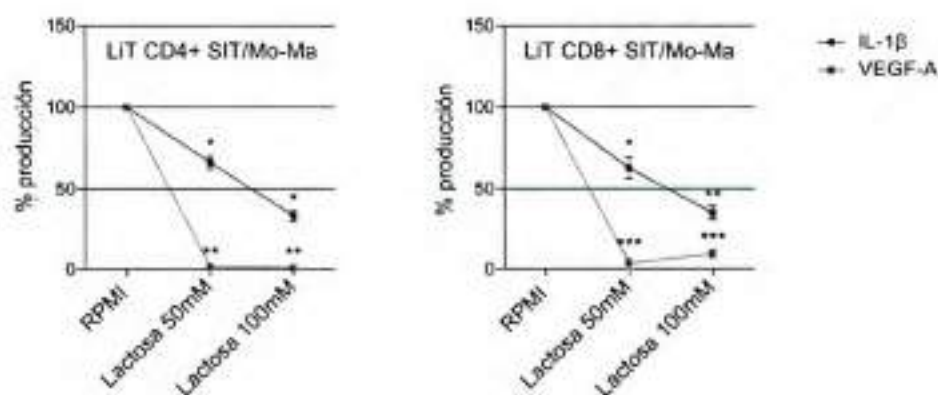


**Figura 30.** Estudio fenotípico de LIT CD4+ o CD8+ SIT y Mo/Ma. (a) Representación esquemática de moléculas expresadas en LIT y Mo/Ma que, de acuerdo a la bibliografía, están involucradas en la activación de Mo/Ma e inducción de citoquinas. (b) Expresión superficial de Tim-3 y CD40L en LIT SIT y LIT controlados estimulados con anti-CD3. Las barras representan la expresión de estas moléculas (medida como IFM)  $\pm$  SEM ( $n=6$ ). Test estadístico utilizado: prueba  $t$  de Student apareada (LIT SIT vs LIT controlados),  $p$  se indica en cada gráfico. (c d y e) Mo fueron cultivados 40hs y luego fueron estimulados con LPS o no estimulados y cultivados 18hs. (c) Histograma representativo de la expresión de Galectina-9 en superficie e intracelular, (d) Histograma representativo de la expresión de CD40, (e) Histograma representativo de la expresión de Tim-3 en Mo recién purificados ex vivo (0hs, o antes del cultivo) y en Mo/Ma estimulados o no estimulados con LPS. En todos los casos, los histogramas llenos representan el control de fluorescencia (FMO). Los resultados corresponden a un donante representativo de 3.

### LiT SIT modulan la actividad de Mo/Ma a través de mecanismos que involucran las vías Tim-3/Gal-9 y CD40L/CD40

El aumento en la expresión de Tim-3 y CD40L en LiT CD4+ y CD8+ SIT y la expresión de sus contrapartes Gal-9 y CD40 en la superficie de los Mo/Ma llevó a determinar si interacciones entre LiT SIT y Mo/Ma a través de estas moléculas estaban involucradas en el fenómeno de modulación observado.

Previamente se ha demostrado que la interacción entre Tim-3 y Gal-9 puede ser bloqueada competitivamente por lactosa<sup>149</sup>. Con el fin de evaluar si la interacción Tim-3/Gal-9 estaba involucrada en la modulación de Mo/Ma mediada por LiT SIT, se realizaron los co-cultivos de Mo/Ma y LiT SIT en presencia de dos concentraciones diferentes de lactosa. Luego, se evaluaron en los sobrenadantes de co-cultivos la citoquina pro-inflamatoria IL-1 $\beta$  y el factor angiogénico VEGF-A. Como se puede observar en la Figura 31, ambas concentraciones de lactosa fueron capaces de reducir significativamente la producción de IL-1 $\beta$  y VEGF-A, sugiriendo que la interacción Tim-3/Gal-9 podría estar involucrada en la modulación de Mo/Ma mediada por LiT tanto CD4+ como CD8+ SIT.

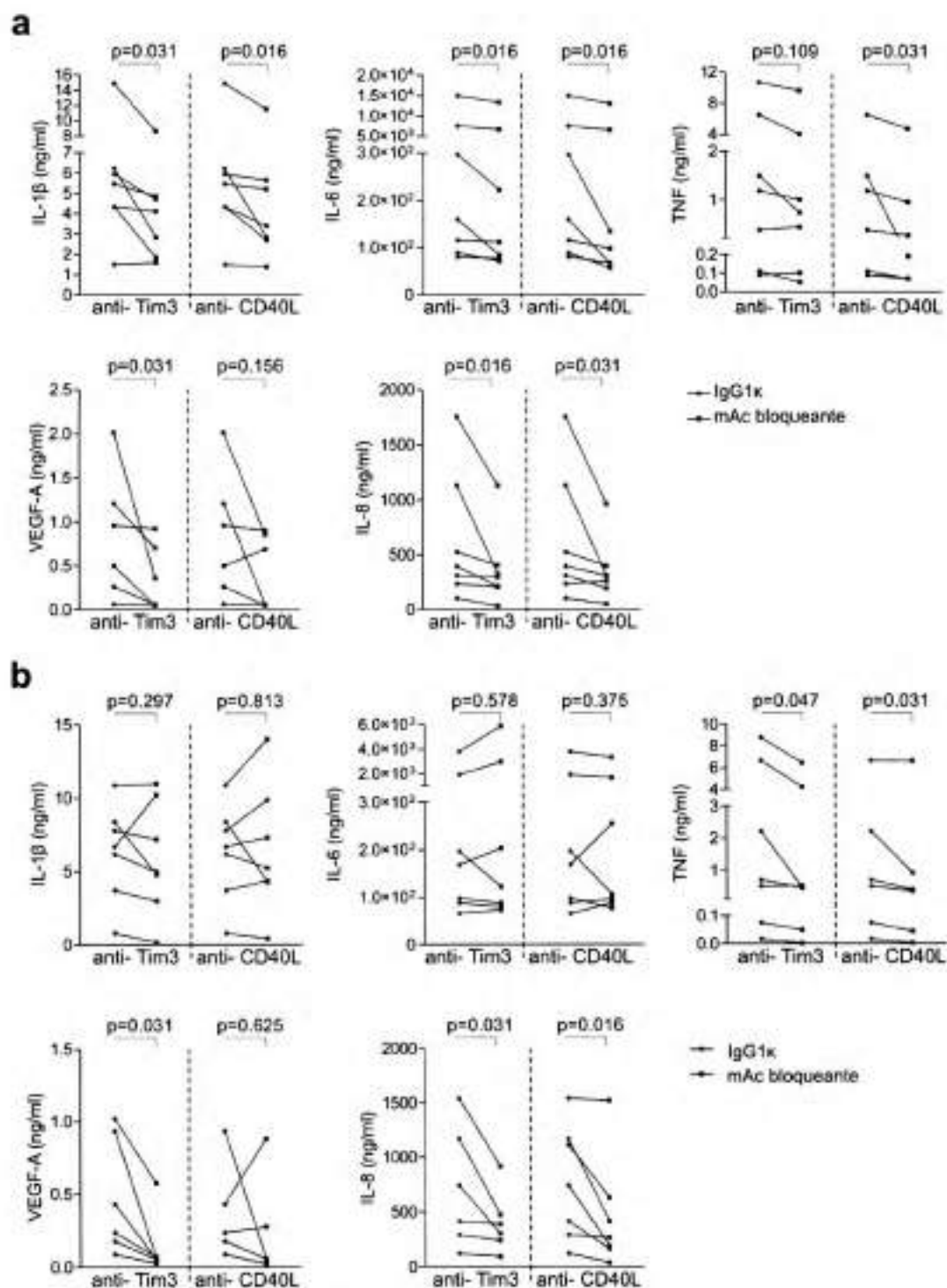


**Figura 31.** La producción de IL-1 $\beta$  y VEGF-A por Mo/Ma modulados por LiT SIT disminuye en presencia de lactosa. Los gráficos muestran el porcentaje de producción de IL-1 $\beta$  y VEGF-A  $\pm$  SEM en los sobrenadantes de co-cultivo de Mo/Ma y LiT SIT en presencia de diferentes concentraciones de lactosa respecto a co-cultivos en ausencia de lactosa. Test estadístico utilizado: ANOVA de una vía, post-test: Bonferroni ( $n=2$ ). \* $p<0.05$ , \*\* $p<0.01$ , \*\*\* $p<0.001$ .

Para confirmar el resultado anterior y para determinar si la vía CD40L/CD40 participa en la interacción Mo-Ma/LiT SIT favoreciendo la producción de factores angiogénicos y citoquinas pro-inflamatorias, se realizaron ensayos bloqueando específicamente las interacciones Tim-3/Gal-9 y CD40L/CD40. Así, monocitos CD14+ fueron cultivados con LiT CD4+ y CD8+ SIT en presencia de anticuerpos monoclonales dirigidos contra Tim-3 y CD40L. La Figura 32a muestra que la producción de IL-1 $\beta$ , IL-6, VEGF-A e IL-8 por parte de Mo/Ma modulados por LiT CD4+ SIT estuvo significativamente reducida luego del tratamiento con anti-Tim-3 (Mediana de reducción: 12, 11, 59 y 36%, respectivamente). Asimismo, en los sobrenadantes de co-cultivo de 5 donantes de un total de 7 se observó una reducción en los niveles de TNF luego del tratamiento con anti-Tim-3, sin embargo, la inclusión de los donantes menos/no respondedores en el análisis llevó a determinar que la diferencia observada no era estadísticamente significativa. Por otra parte, el bloqueo de la interacción de CD40L/CD40 resultó en una menor producción de IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF e IL-8 por parte de Mo/Ma modulados por LiT CD4+ SIT (Mediana de reducción: 22, 17, 37 y 38%, respectivamente) (Figura 32a). Es interesante recalcar que los sobrenadantes de Mo/Ma modulados por LiT SIT de la mayoría de los donantes (5 de 6) produjeron menores cantidades de VEGF-A en presencia de anti-CD40L (Mediana de reducción: 31%). Sin embargo, el análisis que incluye a todos los donantes revela que la disminución no fue estadísticamente significativa.

Por otra parte, Mo/Ma co-cultivados con LiT CD8+ SIT mostraron una respuesta levemente diferente a la observada en aquellos co-cultivados con LiT CD4+ SIT. Así, se observó que anticuerpos contra Tim-3 fueron capaces de reducir de manera significativa la producción de TNF, VEGF-A e IL-8 (Mediana de reducción: 36, 70 y 23%, respectivamente) pero no de IL-1 $\beta$  ni IL-6. Sin embargo, los Mo/Ma de la mayoría de los donantes evaluados mostraron una tendencia a disminuir la secreción de ambas citoquinas (Figura 32b). El tratamiento con anti-CD40L redujo significativamente sólo la producción de TNF e IL-8 en estos co-cultivos (Mediana de reducción: 41 y 61%, respectivamente), mientras que no tuvo efectos evidentes en la producción de IL-1 $\beta$ , IL-6 ni VEGF-A (Figura 32b), sugiriendo un rol más limitado de la vía CD40L/CD40 en la modulación de Mo/Ma mediada por LiT CD8+ SIT.





**Figura 32.** LIT SIT modulan la secreción de citoquinas y factores pro-angiogénicos por parte de Mo/Ma a través de un mecanismo que involucra las vías Tim-3/Gal-9 y CD40L/CD40. Niveles de citoquinas y factores angiogénicos en sobrenadantes de Mo/Ma cultivados con LIT CD4+ (a) y CD8+ (b) SIT en presencia de anticuerpos monoclonales contra Tim-3 o CD40L (cuadrados negros) o su correspondiente Ig control de isotipo (círculos negros). Las líneas indican que los datos están apareados. En todos los casos, el test estadístico utilizado fue una prueba t no paramétrica o Test de Wilcoxon (co-cultivo de Mo-Ma/LIT SIT + Ig control de Isotipo vs. co-cultivo de Mo-Ma/LIT SIT + anticuerpo bloqueante).  $p$  se indica en cada gráfico y para cada tratamiento.

## CONCLUSIONES II

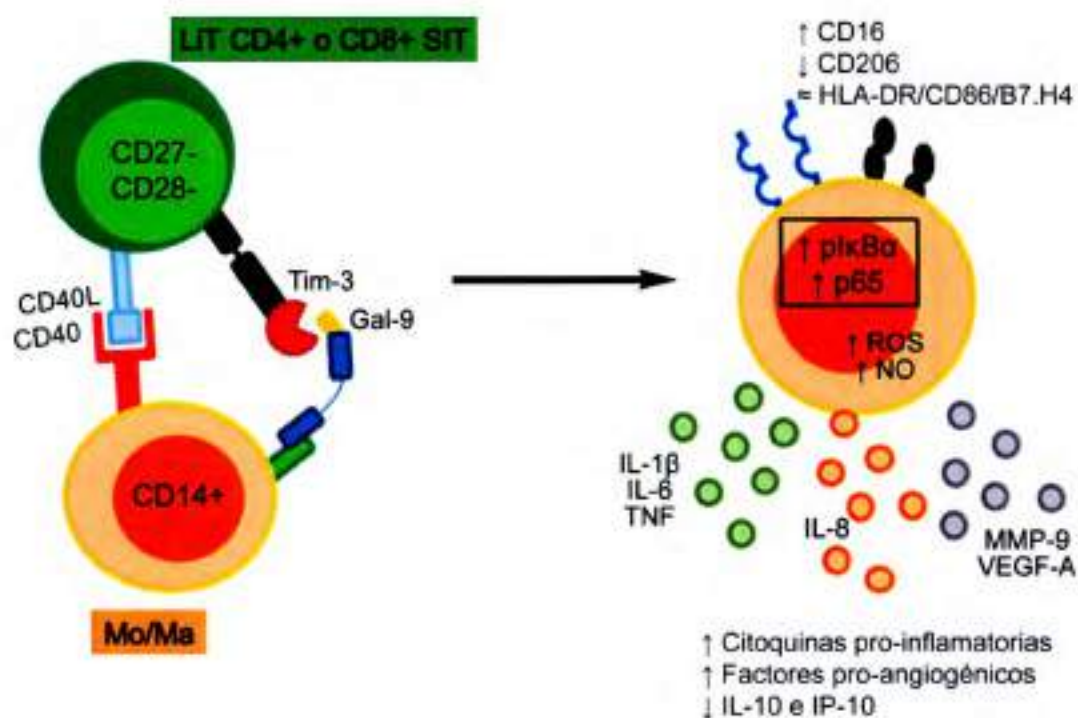
---

En esta parte de la tesis se demostró que:

- LiT CD4+ y CD8+ SIT promueven la activación clásica de Mo/Ma humanos, ya que favorecen un aumento en la expresión de CD16, una disminución de CD206 y un aumento en la producción de ROS y NO.
- En condiciones inflamatorias, LiT CD4+ y CD8+ SIT promueven una mayor producción de citoquinas pro-inflamatorias y de factores pro-angiogénicos por parte de Mo/Ma y disminuyen la producción de IL-10 y del factor angiostático IP-10 como consecuencia de una mayor activación de la vía canónica de NF- $\kappa$ B.
- *In vitro*, factores solubles liberados por Mo/Ma modulados por los LiT SIT favorecen la sobrevida de células tumorales y la formación de estructuras tubulares a partir de células endoteliales sugiriendo que la interacción de los Mo/Ma con los LiT SIT podría favorecer la progresión tumoral.
- La modulación de Mo/Ma mediada por LiT CD4+ y CD8+ SIT requiere el contacto célula-célula e involucra las vías Tim-3/Gal-9 y CD40L/CD40. El tratamiento de los co-cultivos de Mo/Ma con LiT SIT con anticuerpos monoclonales anti-Tim-3 redujo la producción de citoquinas y factores angiogénicos en el 80% de los donantes testeados. El tratamiento con anticuerpos anti-CD40L mostró el mismo efecto en Mo/Ma co-cultivados con LiT CD4+ SIT mientras que demostró ser más limitado en co-cultivos de Mo/Ma con LiT CD8+ SIT, indicando que la vía CD40L/CD40 tendría un rol menos importante en la modulación de Mo/Ma mediada por LiT CD8+ SIT respecto a LiT CD4+ SIT.

Los resultados obtenidos, analizados en conjunto, permiten concluir que LiT SIT podrían afectar la respuesta inmune innata a través de la modulación de la activación de Mo/Ma hacia un perfil pro-inflamatorio y pro-angiogénico. Mediadores liberados por Mo/Ma modulados por los LiT CD4+ y CD8+ SIT sustentan la sobrevida de células tumorales y favorecen la formación de túbulos/capilares *in vitro*, a través de un efecto directo sobre células endoteliales. Estos hallazgos sugieren que la interacción entre Mo/Ma y LiT SIT podría promover la progresión tumoral. De esta manera, los LiT SIT

emergen como una nueva población celular relevante en la compleja interacción entre el tumor y las células infiltrantes de tumores que influiría en la progresión tumoral.



**Figura 33. Conclusiones II: LiT SIT modulan la activación de Mo/Ma.** Luego del contacto con LiT SIT, los Mo/Ma muestran características de activación clásica (M1) como son: una mayor expresión de la molécula CD16 y de especies reactivas como NO y ROS. En condiciones inflamatorias, el co-cultivo con LiT SIT induce una mayor activación de la vía clásica de NF-κB en los Mo/Ma. Además, los LiT SIT inducen la producción de citoquinas pro-inflamatorias y factores pro-angiogénicos por parte de los Mo/Ma a través de un mecanismo que involucra las vías Tim-3/Gal-9 y CD40L/CD40, entre otras posibles vías que involucran el contacto célula-célula. Así, los LiT SIT constituyen una población que lejos de mostrar una total pérdida de función, son capaces de modular a Mo/Ma generando un microambiente pro-inflamatorio y pro-angiogénico que podría promover el crecimiento del tumor.



## DISCUSIÓN

En los últimos años se ha demostrado que las células tumorales emplean diversos mecanismos que actúan en concierto para evadir la respuesta inmune del hospedador. La hipótesis del presente trabajo de tesis postula que la inducción de senescencia de linfocitos T podría ser considerada como un nuevo mecanismo de evasión de la respuesta inmune. En este sentido, trabajos previos que dieron sustento a la hipótesis, demostraron que líneas tumorales de diversos orígenes a través de la secreción de factor/es soluble/s pueden inducir, *in vitro*, senescencia de linfocitos T humanos tanto CD4+ como CD8+<sup>3,4</sup>. Además, se ha reportado que la población de LiT senescentes se encuentra incrementada en sangre periférica e infiltrando tumores en pacientes con distintos tipos de cáncer<sup>5,58,60,62</sup>. De hecho, es interesante destacar que, el número de LiT CD8+ CD28- en periferia es un indicador pronóstico negativo en algunos tipos de cáncer<sup>58,154,155</sup>.

Los resultados obtenidos en esta tesis doctoral muestran que LiT SIT presentan alteraciones fenotípicas y funcionales que comprometen severamente su función como células T efectoras. Así, demostramos que luego de la estimulación con PMA/Ionomicina o con anti-CD3/anti-CD28, los LiT SIT no producen citoquinas como IL-2, IFN- $\gamma$ , TNF, IL-6 e IL-10. Nuestros resultados concuerdan con los publicados por varios grupos de investigación que demuestran que LiT con características de senescencia producen niveles muy bajos de IFN- $\gamma$  e IL-2<sup>6,79,80</sup>. Sin embargo, hasta el presente no se había reportado que LiT SIT pierdan la capacidad de secretar un abanico tan amplio de citoquinas. De hecho, Filaci y col.<sup>5</sup> reportaron que LiT CD8+ CD28- de pacientes con cáncer son importantes productores de IL-10. Si bien nuestros resultados indican que LiT SIT *in vitro* son incapaces de producir IL-10, es posible que LiT senescentes de pacientes con cáncer hayan recibido múltiples señales *in vivo*, tanto sinérgicas como antagonicas, que diluyan el efecto neto de la célula tumoral sobre la inducción de senescencia en el LiT como se observa en nuestros resultados *in vitro*. Por otra parte, Ye y col.<sup>76</sup> demostraron que LiT senescentes, aunque no inducidos por células tumorales sino por LiTregs *in vitro*, producen elevados niveles de IFN- $\gamma$ , TNF, IL-6 e IL-10, pero

muy bajos de IL-2. Existen varias razones que pueden explicar estos resultados discordantes. En primer lugar, dado que los mecanismos que conducen al LiT hacia la senescencia -ya sea factores secretados por la línea tumoral o por los LiTregs- podrían ser diferentes, se podría esperar que dichas células respondan en forma diferente a la estimulación. En segundo lugar, en nuestro modelo experimental, la evaluación de la funcionalidad de LiT SIT fue realizada a los 7 días de cultivo post-incubación con la línea tumoral. En este tiempo, se observó la máxima pérdida de expresión de moléculas co-estimuladoras, indicando un estadio de senescencia probablemente mayor, que podría correlacionarse con la total pérdida de producción de citoquinas. Posiblemente, la realización de los estudios funcionales de los LiT SIT en tiempos más tempranos nos permitirá arrojar luz a estas aparentes discrepancias.

Adicionalmente, observamos que la expresión de granzima A y perforina en LiT CD8+ SIT fue comparable a la encontrada en LiT CD8+ controles. Mientras que un mayor porcentaje LiT CD8+ SIT expresaron granzima B intracelular. Sin embargo, dichas células mostraron una reducida capacidad de degranulación en comparación con LiT controles. Estos resultados están en concordancia con los datos reportados por Sakhdari y col.<sup>156</sup> quienes demostraron que individuos infectados con el VIH presentan, en sangre periférica, LiT CD8+ específicos para antígenos virales que expresan grandes niveles de granzimas y perforinas pero que son incapaces de degranular. Por otro lado, el hecho que un mayor porcentaje de LiT SIT expresaran granzima B no fue completamente sorprendente, dado que concuerda con los reportes que demuestran que LiT CD8+ con características de senescencia expresan niveles elevados de este mediador citotóxico<sup>157-159</sup>. Sin embargo, hasta el presente no hemos dilucidado si el contenido de granzima B en los LiT SIT se debe a una mayor síntesis de dicha molécula o a un mayor almacenamiento en los gránulos como resultado de su capacidad reducida de degranular. Sería sumamente interesante evaluar si LiT CD8+ SIT son capaces de sintetizar granzimas y perforinas *de novo*.

Nuestros resultados demuestran que LiT SIT presentan también modificaciones fenotípicas que podrían estar directamente relacionadas con alteraciones en su funcionalidad. Es bien conocido que la molécula CD62L (L-selectina) está implicada en la migración de los LiT vírgenes a ganglios linfáticos para su activación específica<sup>130</sup> y en el



transporte de LiT activados a sitios de inflamación<sup>131,160</sup>. Nuestros resultados demuestran que LiT SIT pierden completamente la expresión de la molécula de adhesión CD62L, sugiriendo que su capacidad migratoria podría estar afectada. Aún queda por dilucidar si el programa de senescencia inducido en los LiT es responsable *per se* de la modificación en la expresión de CD62L, o si el contacto directo con las células tumorales lleva a la pérdida de dicha molécula. En este sentido, un trabajo reciente demuestra que células supresoras mieloides (CSM) a través de la expresión superficial de una enzima (ADAM17) que cliva el ectodominio de CD62L inducen una disminución en la expresión de esta selectina en LiT CD4+ y CD8+<sup>161</sup>.

En concordancia con reportes bibliográficos, nuestros resultados demuestran que los LiT SIT exhiben elevados niveles de los receptores inhibitorios Tim-3 y KLRG-1 pero no de PD-1. De hecho, mientras la expresión de KLRG-1 se ha propuesto como un marcador de senescencia de LiT humanos, la expresión de PD-1 denota más bien un estado de agotamiento de LiT<sup>74,75,91,103</sup>. Puntualmente Baitsch y col.<sup>101</sup> demostraron que existe una correlación inversa entre la expresión de PD-1 y el receptor inhibitorio KLRG-1 en LiT infiltrantes de tumores. Nuestros resultados demuestran que un bajo porcentaje de LiT controles expresaron KLRG-1. Interesantemente, la expresión de este receptor en dichas células se encontró restringida a la población CD28 negativa. Estos resultados sugieren que la expresión de KLRG-1 podría estar inversamente asociada a la expresión de CD28 en LiT humanos. Además, de alguna manera reafirman la propuesta de utilizar a KLRG-1 como un nuevo marcador de senescencia en LiT humanos.

La expresión de estos receptores inhibitorios resulta de fundamental importancia dado que los mismos inhiben funciones celulares complejas y podrían mantener a los LiT en un estado de *disfuncionalidad, quiescencia y/o hiporrespuesta*<sup>49</sup>. Nuestro objetivo futuro es evaluar si el bloqueo de la señalización por dichos receptores es suficiente para restaurar algunas de las funciones afectadas en los LiT SIT como la producción de citoquinas, la capacidad para degranular de LiT CD8+ y la proliferación frente a estímulos policlonales.

La disminución de la expresión de la cadena  $\zeta$  del complejo de señalización TCR/CD3 representa otro mecanismo que compromete severamente la funcionalidad del LiT. De hecho, la disminución en la expresión de dicha molécula se ha documentado en LiT infiltrantes de tumor o de sangre periférica en pacientes con tumores de diversos

orígenes<sup>162-165</sup>. En este sentido, se ha propuesto que la disminución en la expresión de la misma podría ser considerada como un factor pronóstico en pacientes con cáncer<sup>166</sup>. Nuestros resultados indican que los LiT SIT muestran una reducción significativa de dicha molécula en comparación con los LiT controles. Estos resultados concuerdan con los publicados por Kuss y col.<sup>162</sup> quienes reportaron que LiT CD8+ CD27- de sangre periférica de pacientes con carcinoma de cabeza y cuello, muestran una expresión reducida de la cadena  $\zeta$  y defectos en la producción de IFN- $\gamma$  luego de su estimulación.

Es ampliamente conocido que los factores de transcripción asociados a la diferenciación de LiT controlan y/o regulan funciones efectoras en dichas células, como por ejemplo, producción de citoquinas, quemoquinas, moléculas citotóxicas y la expresión de receptores inhibitorios, entre otros<sup>110,136</sup>. Nuestros resultados indican que LiT SIT muestran una disminución marcada en la expresión de T-bet mientras que los factores Blimp-1 y Eomes están ausentes en esta población celular. Estos hallazgos concuerdan con los obtenidos por Crawford y col.<sup>107</sup> que demuestran que niveles bajos de T-bet son necesarios para mantener a los LiT en un estado de agotamiento/disfuncionalidad. No obstante, la ausencia de Blimp-1 y Eomes resultó sorprendente dado que los LiT agotados -una población cuyo fenotipo y función se encuentran estrechamente relacionados con los LiT senescentes- muestran una elevada expresión de dichos factores<sup>134,167,168</sup>. Se necesitan estudios más profundos para dilucidar si la ausencia o disminución de los factores de transcripción se correlaciona con la pérdida de ciertas funciones en los LiT SIT o bien, si el programa de senescencia involucra modificaciones epigenéticas que impidan/silencien la transcripción de éstas y otras proteínas en LiT. Avalando esta hipótesis, se han reportado cambios en la metilación del ADN durante la diferenciación y el envejecimiento fisiológico en LiT<sup>169</sup>. Por otra parte, resulta sumamente interesante evaluar si el FT asociado a la activación de LiT, NFAT (*del inglés: nuclear factor of activated T-cells*), que está involucrado en la transcripción de citoquinas y otros FTs en los LiT<sup>170</sup>, se encuentra o no activo en los LiT SIT. En este sentido, se ha reportado que dicho factor es incapaz de translocar a núcleo en LiT CD8+ con características de agotamiento<sup>111</sup>.

Nuestros resultados y los publicados por otros autores<sup>3-5</sup> demuestran que LiT SIT son capaces de suprimir la proliferación de LiT autólogos. Asimismo, Ye y col.<sup>76</sup> demostraron que LiT senescentes inducidos por LiTregs también suprimen la linfoproliferación *in vitro* e *in vivo*. Analizados en conjunto estos resultados nos permiten postular que si bien los LiT senescentes pierden algunas funciones efectoras, como la producción de citoquinas, adquieren otras como la capacidad de regular a otras poblaciones celulares.

Previamente se demostró que la supresión de la linfoproliferación mediada por LiT SIT no era dependiente de la expresión del factor de transcripción Foxp3 y que requería el contacto célula-célula<sup>3</sup>. Nuestro estudio cinético aportó que la supresión de la linfoproliferación ocurre a tiempos muy tempranos de co-cultivo con los LiT autólogos respondedores. Estos resultados, en conjunto, llevaron a plantear la hipótesis de que los LiT SIT constituyen una población con *capacidad regulatoria intrínseca*. En concordancia, encontramos que la mayoría de los LiT SIT expresaron en superficie moléculas inmuno-moduladoras tales como PD-L1 y Gal-9.

Previamente se ha descrito que en procesos infecciosos y cáncer, las interacciones PD-1/PD-L1 y Tim-3/Gal-9 conducen a la contracción de una respuesta inmune<sup>100,139,171-175</sup>. De hecho, la vía PD-1/PD-L1 es una de las más estudiadas en cáncer ya que involucra un mecanismo de escape tumoral por el cual las células tumorales que expresan PD-L1 mantienen disfuncionales a LiT intra-tumorales activados que expresan PD-1<sup>176-179</sup>. En este sentido es interesante destacar que ensayos clínicos que utilizan anticuerpos bloqueantes tanto contra PD-1 como PD-L1 han mostrado resultados promisorios en pacientes con cáncer<sup>180,181</sup>. La interacción de Gal-9 como molécula soluble con su receptor Tim-3 fue inicialmente descrita como un mecanismo auto-regulatorio de la respuesta de Li Th1. Así, el IFN- $\gamma$  producido por Li Th1 estimula la producción de Gal-9 quien, al unirse a Tim-3 en la superficie de los Li Th1, gatilla una serie de señales que llevan a su apoptosis<sup>139</sup>. Además, se ha demostrado que la expresión de dicha galectina en LiTregs de pacientes infectados crónicamente con el VHC aumenta su capacidad supresora<sup>138</sup>.

Nuestros resultados sugieren que PD-L1 y Gal-9 podrían ser potenciales moduladores de la supresión mediada por LiT SIT. Sin embargo, su participación en la supresión de los LiT respondedores aún debe ser evaluada. A su vez, la expresión de Gal-9 en LiT SIT, aún en ausencia de estímulo, resulta sumamente interesante dado que la expresión



simultánea con su receptor inhibitorio Tim-3 sugiere que dicha vía podría mantener al LiT en ese estado de senescencia. Ensayos preliminares realizados, sugieren que el bloqueo de Tim-3, pero no de KLRG-1, en cultivos de LiT SIT estimulados con anti-CD3/anti-CD28 aumenta la capacidad de dichas células para producir IL-2. Por otra parte, se ha demostrado que la unión de galectinas a glicoproteínas de la superficie celular regula funciones celulares complejas como proliferación, migración y producción de citoquinas<sup>182-185</sup>. Aún no se ha evaluado si la unión de Gal-9 a determinadas glicoproteínas de superficie de LiT SIT contribuye, por sí sola, a la pérdida de funciones observada en dichas células. Además, tampoco ha sido evaluado en este trabajo de tesis si otras galectinas se encuentran diferencialmente unidas a la superficie de LiT SIT, pero resulta un interrogante atractivo para estudios posteriores.

Los resultados obtenidos, analizados en conjunto, permiten concluir que desde una visión tradicional los LiT SIT muestran características de LiT *disfuncionales*, debido a que son incapaces de producir citoquinas efectoras y/o de degranular. Sin embargo, la expresión basal de moléculas inmuno-moduladoras en esta población celular indica que la senescencia de LiT dista de ser un programa que induce total pérdida de función en los LiT sino más bien, conduce a la adquisición de nuevas características y funcionalidades con potencial inmuno-modulatorio sobre otras sub-poblaciones leucocitarias. La capacidad supresora de LiT SIT sugiere que esta población celular podría tener un rol negativo en la progresión tumoral dado que podría contribuir a la amplificación del microambiente tumoral inmuno-supresor. Asimismo, estos resultados abrieron nuevos interrogantes, principalmente si LiT SIT eran capaces de modular otras poblaciones del SI, particularmente de monocitos/macrófagos quienes constituyen el principal infiltrado leucocitario en tumores, y a quienes se atribuye un rol esencial en la progresión tumoral.

Previamente se ha demostrado que los macrófagos asociados al tumor (TAMs) son una población celular heterogénea que adquiere diferentes fenotipos bajo la influencia de células tumorales así como del estroma adyacente (revisados por Ruffell B.<sup>121</sup> y Biswas S.K. y Mantovani A.<sup>113</sup>). Así, se ha descrito que los TAMs interactúan con células del SI como LiTregs<sup>120</sup>, LiB y Li Th1/Th2<sup>113</sup>. Sin embargo, la interacción entre LiT

senescentes y macrófagos y su relevancia biológica no habían sido reportadas. Este trabajo de tesis doctoral provee evidencia del rol de LiT CD4+ y CD8+ SIT en la modulación de monocitos/macrófagos humanos. De esta manera, los LiT SIT surgen como una nueva población celular relevante que debería ser considerada a la hora de estudiar la compleja interacción entre el tumor y las células infiltrantes de tumores.

La diversidad de los macrófagos es crítica para orquestar la gran variedad de sus funciones efectoras, que van desde inflamación y fagocitosis hasta inmuno-supresión y remodelación tisular. Particularmente, en el microambiente tumoral, el fenotipo y la función de los TAMs tienen importantes consecuencias para la progresión tumoral<sup>16,186</sup>. En efecto, los macrófagos M1 son eficientes asesinos, capaces de matar a células tumorales y promover respuestas anti-tumorales a través de la expresión de moléculas co-estimuladoras y de la producción de citoquinas que favorecen el desarrollo de una respuesta mediada por Li Th1<sup>187</sup>. Sin embargo, el fenotipo M1 ha sido asociado también con la iniciación y la promoción tumoral<sup>11,188</sup>. Se postula que una vez que el tumor se inicia y progresa hacia malignidad, el fenotipo de los macrófagos cambia a M2<sup>189,190</sup>. De acuerdo con esto, se ha demostrado que los TAMs están compuestos por distintas poblaciones que comparten características de M1 y M2<sup>45,115</sup>.

Se ha demostrado que los LiT modulan la activación de los macrófagos *in vivo* e *in vitro*. Así, a través de la producción de IFN- $\gamma$ , los Li Th1 pueden conducir una polarización clásica mientras que los Li Th2 dirigen una polarización hacia M2 a través de la producción de IL-4, IL-13 e IL-33 (revisados por Biswas S.K. y Mantovani A.<sup>113</sup>). Estudios recientes realizados por Tiemessen y col.<sup>120</sup> destacan que una sub-población de LiT adicional es capaz de modular la activación de Mo/Ma. Estos autores demostraron que monocitos humanos cultivados con LiTreg (CD4+CD25+Foxp3+) se diferencian a macrófagos con fenotipo similar al M2 (*M2-like*). Nuestros resultados demuestran que después del co-cultivo con LiT CD4+ o CD8+ SIT, los Mo/Ma adquieren una respuesta efectora usualmente atribuible al fenotipo M1. Estos atributos incluyen un aumento de la expresión de CD16 en los Mo/Ma CD14+. Dado que, en humanos, la co-expresión de CD14 y CD16 se utiliza para definir a monocitos inflamatorios<sup>142-144</sup>, este hallazgo junto al aumento significativo de la producción de ROS, NO y citoquinas pro-inflamatorias por parte de Mo/Ma modulados por los LiT SIT, indican que los LiT CD4+ y CD8+ SIT inducen la diferenciación de los Mo/Ma hacia un perfil inflamatorio o M1. No obstante, al



mismo tiempo, los LiT SIT promueven la producción de factores pro-angiogénicos tales como IL-8, VEGF-A, MMP-9 y una baja secreción del factor angiostático IP-10, características de un perfil de activación alternativo o M2. Juntos, nuestros resultados demuestran que la interacción entre LiT SIT y monocitos resulta en la diferenciación a una población de Mo/Ma con características mixtas de M1 y M2.

Numerosos reportes han vinculado estrechamente la inflamación con tumorigénesis, angiogénesis y metástasis<sup>2,9-11</sup>. En función de estos antecedentes, se podría especular que dentro del microambiente tumoral, la interacción entre LiT SIT y macrófagos podría tener importantes consecuencias en la progresión tumoral, ya que los LiT SIT promueven la producción de mediadores pro-inflamatorios tales como TNF, IL-1 $\beta$  e IL-6. TNF es una citoquina clave involucrada en inflamación, homeostasis celular y progresión tumoral<sup>191</sup>. Concretamente, dicha citoquina es requerida para la proliferación y la función de células del SI y está implicada en la inducción de muerte en células tumorales. Evidencias emergentes han mostrado que el TNF es también uno de los principales mediadores de la inflamación relacionada con el cáncer. Así, esta citoquina actúa como un factor promotor del crecimiento tumoral y está vinculada a todos los pasos de la génesis tumoral, incluyendo la transformación, la proliferación, la angiogénesis, la invasión y la metástasis en muchos tipos de cáncer<sup>2,128,191</sup>. Con respecto a IL-6 e IL-1 $\beta$ , dos citoquinas pleiotrópicas que poseen una amplia gama de funciones que contribuyen a la generación/mantenimiento de un microambiente que promueve la angiogénesis y la inflamación en cáncer. Asimismo, IL-6 es esencial para la supervivencia de células tumorales, sobre todo para las células circulantes que se encuentran durante procesos de invasión y metástasis<sup>2</sup>. Las citoquinas pro-inflamatorias TNF e IL-1 $\beta$  tienen una clara función pro-angiogénica ya que son capaces de inducir la expresión de factores angiogénicos tales como VEGF, IL-8 y MMPs en células endoteliales vasculares, células tumorales y células del SI que infiltran los tumores.

Existen evidencias que indican que los TAMs juegan un papel importante en la regulación de la angiogénesis dentro del microambiente tumoral a través de la liberación de mediadores pro-inflamatorios y pro-angiogénicos arriba mencionados. En este sentido, la producción de MMP-9 por los TAMs ha demostrado ser crucial para la regulación de VEGF y la angiogénesis en un modelo murino de cáncer cervical inducido por oncogenes derivados del virus del papiloma humano<sup>192</sup>. Nuestros resultados



demuestran que, además de citoquinas inflamatorias, los Mo/Ma modulados por los LiT CD4+ y CD8+ SIT producen elevadas cantidades de factores como VEGF-A, IL-8 y MMP-9. Además, se observó que factor/es presente/s en los sobrenadantes de los co-cultivos de Mo/Ma y LiT SIT tiene/n potencial pro-angiogénico ya que fueron capaces de promover la tubulogénesis *in vitro* de células endoteliales humanas. Sin embargo, factores derivados de dichos sobrenadantes no modularon de manera diferencial la migración de células endoteliales en ensayos de *wound healing*. En este sentido, se ha reportado que las vías moleculares que se activan durante ambos procesos en las células endoteliales son diferentes<sup>148</sup>. En efecto, nuestros resultados concuerdan con esta hipótesis dado que indican que factores solubles derivados de los Mo/Ma modulados por los LiT SIT potencialmente regulan la activación/diferenciación de células endoteliales favoreciendo procesos de formación tubular/capilar más que de migración celular.

Por otra parte, nuestros resultados indican que los sobrenadantes de co-cultivo de Mo/Ma y LiT SIT promueven la sobrevivencia de células tumorales *in vitro*. A pesar de no identificar el/los mediador/es involucrados en dicho fenómeno, nuestros resultados están de acuerdo con los hallazgos que demuestran que múltiples citoquinas pro-inflamatorias y factores pro-angiogénicos proporcionan señales que previenen la muerte de las células tumorales<sup>193-196</sup>.

Interesantemente, se ha reportado que citoquinas pro-inflamatorias pueden conducir a la inducción y/o mantenimiento de un programa de senescencia en fibroblastos humanos<sup>197</sup>. Si bien los mecanismos que conducen al LiT a la senescencia no han sido completamente dilucidados, evidencias sugieren que la inducción de senescencia de LiT, mediada tanto por células tumorales como por otras poblaciones de LiT regulatorios, está mediada por factores solubles<sup>3,4,76,198</sup>. Nuestros resultados indican que los LiT SIT inducen una mayor producción de citoquinas pro-inflamatorias por parte de Mo/Ma. Así, se podría especular que dichas citoquinas podrían contribuir a la generación y/o el mantenimiento de la senescencia de LiT, creando un mecanismo de retroalimentación positiva que podría favorecer la progresión tumoral. Sería muy interesante evaluar en modelos experimentales *in vivo* si este mecanismo de retroalimentación existe.

Como era de esperar, considerando nuestros resultados que indican que los LiT SIT son incapaces de producir citoquinas efectoras, demostramos que la modulación de Mo/Ma mediada por los LiT SIT requiere el contacto célula-célula. Específicamente, demostramos que las interacciones Tim-3/Gal-9 y CD40L/CD40 participan en la modulación de Mo/Ma por parte de los LiT SIT. Sin embargo, no podemos descartar la participación de otras vías adicionales. Interesantemente, nuestros resultados indican que los LiT CD4+ y CD8+ SIT utilizan diferentes moléculas para interactuar con los Mo/Ma y para regular aspectos particulares tales como la secreción de citoquinas pro-inflamatorias y factores angiogénicos en esta población celular. Cabe destacar que la interrupción del contacto entre los Mo/Ma y los LiT SIT en ensayos de co-cultivo en presencia de un *transwell*, conduce a la disminución casi completa de la producción de citoquinas en dichos co-cultivos. Sin embargo, el bloqueo específico de las vías Tim-3/Gal-9 y CD40L/CD40 en los co-cultivos reduce parcialmente la producción de citoquinas. Estos hallazgos sugieren la participación de otras moléculas en la modulación de los Mo/Ma por parte de los LiT SIT. En los últimos años, se ha reportado que LiT con características de agotamiento expresan niveles elevados del receptor inhibitorio LAG-3<sup>98,101</sup>. Dicho receptor, por su homología estructural con la molécula CD4, puede interactuar con las moléculas del CMH de clase II expresadas en monocitos y células dendríticas humanas conduciendo a su activación y a la secreción de citoquinas pro-inflamatorias como TNF e IL-12<sup>199-202</sup>. Así, LAG-3 se plantea como otro posible mediador de la modulación de monocitos por parte de LiT SIT. La evaluación de la expresión de este receptor en los LiT SIT, así como otros receptores cuyas contrapartes se expresan en Mo/Ma humanos, resulta de gran relevancia para ayudar a la comprensión de mecanismos adicionales que llevan a la modulación de los Mo/Ma.

Las consecuencias de la señalización de Tim-3 en el propio LiT han sido foco de numerosos estudios en los últimos años<sup>6,99,156,203-205</sup>. Sin embargo, trabajos recientes han establecido que existe una señal de transmisión recíproca entre LiT Tim-3+ y células presentadoras de antígeno que expresan Gal-9 en su superficie<sup>149,150</sup>. En este sentido, Jayaraman y col.<sup>150</sup> demostraron que Tim-3 se expresa en los Li Th1 e interactúa con su ligando Gal-9 expresado en la superficie de macrófagos infectados con *Mycobacterium tuberculosis*. En este escenario, la interacción Tim-3/Gal-9 restringe el crecimiento de *M.*

*tuberculosis* en el interior de los macrófagos. Usando un ensayo *in vitro* y un modelo *in vivo* de infección por *M. tuberculosis*, estos autores demostraron específicamente que la interacción Tim-3/Gal-9 estimula la producción de IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF, MIP1 $\alpha\beta$  y G-CSF por parte de los macrófagos infectados, siendo la citoquina IL-1 $\beta$  crítica para el control de la replicación intracelular de la bacteria. En consonancia con estos hallazgos, nuestros resultados demuestran que LiT SIT promueven la producción de citoquinas pro-inflamatorias y factores angiogénicos por parte de los Mo/Ma. El bloqueo de la interacción Tim-3/Gal-9, a través de la utilización de anticuerpos monoclonales dirigidos contra Tim-3, reduce significativamente la mayoría de los factores solubles evaluados en dichos co-cultivos.

Por otra parte, se ha reportado que Tim-3 también se puede expresar en células de origen mieloide. Particularmente, se ha demostrado que monocitos humanos expresan Tim-3 en condiciones de reposo (ausencia de estímulo), sin embargo su expresión se ve severamente disminuida luego del estímulo con diversos ligandos de TLRs<sup>152,153</sup>. Nuestros resultados confirman los hallazgos obtenidos por Zhang y col. dado que demuestran que los Mo/Ma disminuyen la expresión de Tim-3 a las 40hs de cultivo. Por otro lado, Ma y col.<sup>206</sup> demostraron que una interacción *cis* (en el propio monocito) entre Tim-3 y Gal-9 contribuye al desarrollo de una respuesta inflamatoria en presencia de ligandos de TLRs. La disminución de la expresión de Tim-3 en los Mo/Ma en nuestras condiciones de cultivo, permitieron descartar que una interacción *cis* entre Tim-3 y Gal-9 estuviese involucrada en el fenómeno observado. Asimismo, descartamos la posibilidad de una interacción *trans* entre la Gal-9 expresada en la superficie del LiT SIT y su receptor Tim-3 que pudiera expresarse en monocitos humanos.

La molécula CD40 es un receptor de transmembrana, de la superfamilia de los receptores de TNF, que se expresa en una gran variedad de células incluyendo los monocitos humanos. Se ha demostrado que la interacción de este receptor con su ligando, CD40L, aumenta la expresión de citoquinas, quemoquinas, metaloproteasas de matriz, factores de crecimiento y moléculas de adhesión, principalmente a través de la activación de NF- $\kappa$ B<sup>207-213</sup>. En línea con estas publicaciones, nuestros resultados demuestran que el bloqueo de la interacción entre CD40L y CD40 reduce la producción



de citoquinas en los Mo/Ma modulados por LiT CD4+ SIT y en menor medida por LiT CD8+ SIT.

El tratamiento con anticuerpos monoclonales anti-Tim-3 ha sido probado *in vitro* en pacientes con melanoma y carcinoma hepatocelular como una estrategia para revertir la disfuncionalidad de los LiT y potenciar la respuesta inmune anti-tumoral específica<sup>6,99</sup>. A la luz de nuestros resultados, se podría sugerir que la inhibición de la vía Tim-3/Gal-9 puede afectar a la función efectora de diferentes sub-poblaciones leucocitarias. Descifrar los efectos del tratamiento con anti-Tim-3 en estas poblaciones celulares resulta sumamente importante para predecir el enfoque de la inmunoterapia contra el cáncer.

Por otra parte, la utilización de agonistas para CD40 en la inmunoterapia contra el cáncer se encuentra actualmente en ensayos clínicos en fase II. Sin embargo, dicho tratamiento sólo ha mostrado resultados esperanzadores en pacientes con carcinoma pancreático avanzado<sup>214,215</sup>. En contraste, se ha reportado que la activación de la vía de CD40 en macrófagos puede tener un rol dual en la supervivencia y la capacidad invasiva de las células tumorales<sup>216</sup>. En este sentido, se ha propuesto que anticuerpos monoclonales agonistas de CD40 pueden actuar como supresores tanto como activadores del SI en el microambiente tumoral<sup>214,217,218</sup>. No obstante, está claro que los macrófagos activados a través de CD40 producen mediadores inflamatorios que promueven la inflamación crónica. En la misma dirección, nuestros resultados señalan que la vía CD40L/CD40 está implicada en la potenciación de la actividad inflamatoria de los macrófagos mediada por los LiT SIT. Los efectos pro-inflamatorios de CD40 en el microambiente tumoral no han sido discutidos aún, aunque una profunda relación entre inflamación y cáncer ha sido demostrada<sup>2,10,11</sup>. En este sentido, nuestros resultados sugieren que el rol de la interacción entre CD40L y CD40 en la progresión tumoral debería ser reconsiderado y requiere aún más investigación.

Nuestros resultados, analizados en conjunto, sugieren que el bloqueo de las vías Tim-3/Gal-9 y CD40L/CD40 podría tener importantes implicancias terapéuticas ya que contribuiría a la reducción en la producción de múltiples moléculas pro-inflamatorias y pro-angiogénicas por los Mo/Ma. Es importante destacar que numerosos factores de crecimiento, citoquinas y quemoquinas comparten propiedades angiogénicas o pro-tumorales, sugiriendo que el bloqueo de un factor individual probablemente no resulte en la regresión del crecimiento tumoral. En contraste, se podría especular que el

bloqueo de las vías Tim-3/Gal-9 o CD40L/CD40 que reduce simultáneamente la expresión de múltiples factores pro-tumorales, podría representar un blanco terapéutico más promisorio en la inmunoterapia contra el cáncer. Sin embargo, se desconoce si el bloqueo *in vivo* de dichas vías restituiría otras vías de señalización compensatorias.

En resumen, nuestros resultados proporcionan evidencia de un rol previamente no caracterizado de los LiT CD4+ y CD8+ SIT en la modulación de Mo/Ma humanos que podría favorecer la progresión tumoral. Considerando que los macrófagos son mediadores importantes de la inflamación relacionada al cáncer, la modulación de la interacción entre los LiT SIT y los macrófagos podría alterar el equilibrio del tipo de inflamación en el microambiente tumoral y crear oportunidades para obtener mejores respuestas anti-tumorales. Así, los estudios futuros deben dirigirse a comprender mejor los cambios funcionales de los macrófagos inducidos por los LiT SIT en el nicho tumoral con el fin de adaptar mejor la respuesta inmune contra el cáncer.

Los resultados obtenidos en esta tesis también podrían contribuir al entendimiento de otros procesos inflamatorios. En este sentido, se ha reportado que pacientes con síndrome coronario agudo o enfermedades autoinmunes como artritis reumatoidea, presentan un aumento en la población de LiT con características de senescencia<sup>54,65,66</sup>. Asimismo, en estos pacientes se detectaron macrófagos activados clásicamente en los sitios de inflamación (aorta y sinovia, respectivamente). En concordancia, se hallaron altos niveles de citoquinas pro-inflamatorias en plasma. Así, se podría especular que en estos escenarios la interacción LiT senescente/macrófago podría jugar un rol importante en la generación y/o mantenimiento del proceso inflamatorio.

Los resultados expuestos en esta tesis, integrados junto a reportes previos, nos permiten sugerir que la senescencia de LiT inducida por tumores debería ser considerada como un nuevo mecanismo de evasión de la respuesta inmune. En este sentido, factores solubles liberados por las células tumorales conducirían a LiT humanos a un estado de senescencia, y con ello a la pérdida de sus funciones efectoras. Sin embargo la inducción de este programa de senescencia, lejos de mantener a la célula en



un estado de quiescencia, favorecería la diferenciación de los LiT hacia una población con características regulatorias o inmuno-moduladoras. Así, los LiT SIT podrían modular, tanto en sangre periférica como en el microambiente tumoral, a otras poblaciones celulares como LiT y monocitos/macrófagos (Figura 1). Específicamente, los LiT SIT son capaces de suprimir respuestas linfoproliferativas y de conducir la diferenciación de monocitos/macrófagos hacia un perfil pro-inflamatorio y pro-angiogénico. De esta manera, los LiT SIT emergen como una nueva población celular relevante en la interacción entre células tumorales y células infiltrantes en el microambiente tumoral, que podría tener importantes implicancias en la progresión tumoral.

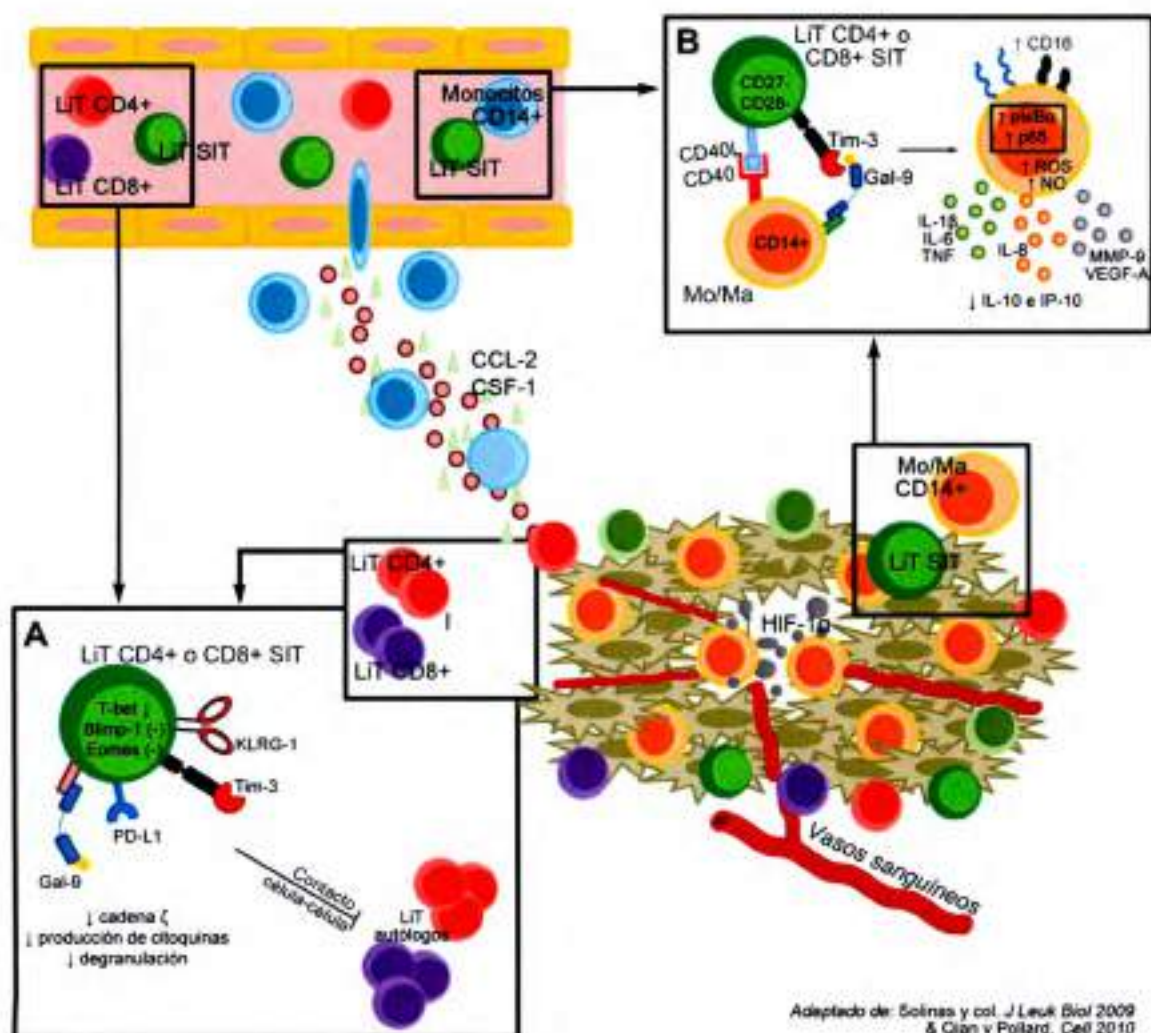


Figura 1. Una visión integral: Linfocitos T CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> senescentes inducidos por tumores (SIT): una población con capacidad moduladora de la respuesta inmune. Factores solubles secretados por las células.



tumorales pueden inducir senescencia de LiT CD4+ y CD8+. LiT SIT (CD27-CD28-) pueden encontrarse en sangre periférica de pacientes con cáncer e infiltrando tumores y/o sitios de metástasis.

**A** LiT SIT constituyen una población de LiT altamente diferenciados, incapaces de producir citoquinas efectoras. Expresan en su superficie receptores inhibitorios como Tim-3 y KLRG-1, pero no PD-1, además de moléculas inmuno-moduladoras como PD-L1 y Gal-9. Suprimen respuestas linfoproliferativas, a través de un mecanismo que requiere el contacto célula-célula. Si bien múltiples receptores y/o moléculas podrían estar involucrados en esta interacción, PD-L1 y Gal-9 son dos candidatos posibles.

**B** LiT SIT Tim-3+ y CD40L+ pueden interactuar con Gal-9 y CD40 expresadas en la superficie de monocitos/macrófagos desviando su activación hacia un perfil pro-inflamatorio y pro-angiogénico. La generación de este microambiente inflamatorio podría tener roles decisivos en los diferentes estadios del desarrollo tumoral como iniciación, conversión hacia un fenotipo maligno, invasión y metástasis. Además, este escenario inflamatorio podría afectar la inmunovigilancia y la respuesta a la terapia.

## **MATERIALES y MÉTODOS**

---

5.

## I. CULTIVO CELULAR

**1. Mantenimiento de líneas celulares.** Las líneas celulares utilizadas se cultivaron en los medios de cultivo detallados abajo (Tabla 1) hasta 90% de confluencia (en estufa a 37°C y a una atmósfera de 5% CO<sub>2</sub>). Habitualmente fueron tripsinizadas con Tripsin-EDTA 0.25% (Gibco) para su posterior utilización.

Línea celular	Medio de cultivo
<i>Tu167</i> [Carcinoma de cabeza y cuello]	RPMI-1640 (Gibco) suplementado con: Suero Bovino Fetal (10%, Hyclone), L-Glutamina (1%, Invitrogen), HEPES (25mmol/L, Cell Gro), Gentamicina.
<i>HeLa</i> [Células de cáncer cervico-uterino humano]	DMEM (Gibco) suplementado con: Suero Bovino Fetal (10%, Hyclone), L-Glutamina (1%, Invitrogen), HEPES (25mmol/L, Cell Gro), Gentamicina.
<i>HMEC-1</i> [Células endoteliales de microvasculatura humanas]	EGM-2 (Lonza).

**Tabla 1.** Medios de cultivo empleados para el mantenimiento de líneas tumorales en cultivo.

**2. Obtención de células mononucleares de sangre periférica humana.** Células mononucleares de sangre periférica humana (CMSP) fueron obtenidas a partir de la fracción leuco-plaquetaria (*Buffy coat*) de sangre periférica de donantes sanos y jóvenes (entre 25-40 años de edad). Los *Buffy coat* fueron provistos por el Banco de Sangre de la Universidad Nacional de Córdoba siguiendo el protocolo aprobado por el Comité de Ética del Hospital Nacional de Clínicas (Octubre de 2008).

En base al protocolo descrito por Strober W.<sup>219</sup>, las CMSP se aislaron por centrifugación sobre gradientes de Ficoll-Hypaque (GE Healthcare Bio-Science AB), en una relación Sangre: Ficoll 2:1. Los gradientes fueron centrifugados durante 30 minutos



a 2000 rpm. La viabilidad de las células mononucleares obtenidas fue siempre controlada a través del recuento con el colorante vital Azul de Tripán.

Las CMSP que no se utilizaron en el mismo día fueron congeladas (para posteriores ensayos autólogos) con 90% de suero bovino fetal (SBF, Hyclone) y 10% de dimetilsulfóxido (DMSO).

### **3. Purificación de sub-poblaciones linfocitarias y monocitos a partir de CMSP.**

Linfocitos T (LiT) CD4+ y CD8+ y monocitos CD14+ se purificaron por selección positiva a partir de CMSP totales utilizando perlas CD4, CD8 o CD14 (Miltenyi Biotech, CA), respectivamente, siguiendo las instrucciones del fabricante. La pureza de cada población se controló rutinariamente por citometría de flujo y fue mayor al 95% en todos los casos.

Las células purificadas fueron mantenidas en cultivo en medio RPMI completo (RPMI-1640 suplementado con 10% de SBF, 1% de L-glutamina, 25mmol/L de HEPES y 0,01% de gentamicina).

**4. Ensayo de inducción de senescencia.** Para inducir senescencia en LiT por parte de líneas tumorales se siguió el protocolo previamente publicado por Montes C.L. y col.<sup>3</sup>. Los LiT CD4+ y CD8+ fueron purificados utilizando perlas magnéticas como se indicó anteriormente. Posteriormente fueron co-incubados con la línea tumoral *Tu167* en una relación 1:1 (LiT: célula tumoral) durante 6 horas. Los LiT recolectados después de la co-incubación con las células tumorales en función de sus propiedades no adherentes, fueron 99% CD3+ como se determinó por citometría de flujo. Estos LiT se lavaron y cultivaron durante 7 días con RPMI completo. Como controles se utilizaron LiT CD4+ y CD8+ purificados, sin co-incubar con la línea tumoral y cultivados durante 7 días en RPMI completo (Esquema Experimental 1, Resultados I). Rutinariamente se controló la expresión de marcadores de senescencia como son la pérdida de expresión de las moléculas CD27 y CD28.

**5. Ensayo de supresión de la linfoproliferación.** El ensayo de supresión se realizó en base a protocolos previamente descritos<sup>3,220</sup>. LiT autólogos (CD3+ purificados, a los que referimos como LiT *respondedores*) fueron co-cultivados con LiT CD4+ o CD8+ controles (sin co-incubar con la línea tumoral) o senescentes inducidos por la línea tumoral (SIT)

en una relación 3:1 (LiT *respondedores*: LiT controles o SIT) en placas previamente sensibilizadas con anti-CD3 y anti-CD28 (2µg/ml de cada estímulo). A los fines de evaluar la proliferación celular, a las 24, 48 y 72 horas de co-cultivo los pocillos fueron pulsados con H<sup>3</sup>-Timidina (1µCi) y cultivados durante 18hs más. Luego, los cultivos fueron cosechados utilizando un cosechador semi-automático. El ADN fue recuperado sobre papel de fibra de vidrio y posteriormente embebido en líquido de centelleo (Optiphase HiSafe 3, Perkin-Elmer). Finalmente, la incorporación de H<sup>3</sup>-Timidina se determinó a través de la evaluación de las cuentas por minuto (c.p.m.) en un contador β de centelleo líquido.

**6. Ensayos de co-cultivo de LiT SIT con monocitos.** Con el objetivo de evaluar si LiT SIT podían modificar la activación y/o función de monocitos humanos, siguiendo el protocolo descrito por Tiemessen M.M. y col.<sup>120</sup>, se realizaron ensayos de co-cultivo en placas previamente sensibilizadas con anti-CD3 (1µg/ml, Clon: TR66) y en las siguientes condiciones:

→ **Co-cultivo clásico (CC):** Monocitos purificados y LiT CD4+ o CD8+ SIT fueron co-cultivadas (en una relación 1:1) en medio RPMI completo. Como controles, monocitos fueron cultivados solos o co-cultivados con LiT CD4+ o CD8+ controles (relación 1:1). En algunos casos, los co-cultivos fueron recolectados a las 40hs para su evaluación fenotípica y funcional por citometría de flujo. En otros casos, fueron estimulados o no con LPS (50 ng, InvivoGen de E. coli 0111: B4) por 48hs adicionales y posteriormente los sobrenadantes fueron recolectados para ensayos funcionales (Esquema Experimental 2, Resultados II).

→ **Transwell (TW):** Experimentos de co-cultivo en presencia de un TW (poros de 0,4µm, Corning Costar) se realizaron colocando los monocitos bajo el TW y los LiT en el inserto (parte superior). Además, en el inserto se agregaron perlas anti-CD3/CD28/CD2 con el objetivo de estimular a los LiT. Después de las primeras 40 horas, los cultivos fueron estimulados con LPS como se describió anteriormente.



→ **Ensayos de bloqueo:** Para experimentos de bloqueo de la interacción entre monocitos y LiT SIT mediada por moléculas de superficie, anticuerpos monoclonales (mAc) contra Tim-3 (10 mg/ml, LEAF mIgG1k Clon F38-2E2, Biolegend) y CD154/CD40L (10 mg/ml, LEAF mIgG1k Clon 24-31, Biolegend) o controles de isotipo (10 mg/ml, LEAF mIgG1k Clon MOPC-21, Biolegend) se añadieron al inicio del co-cultivo. Además, la interacción Tim-3/Gal-9 fue bloqueada utilizando concentraciones crecientes de lactosa (50 y 100 mM) en los co-cultivos de Mo/Ma con LiT CD4+ o CD8+ SIT. En todos los casos, después de las primeras 40 horas, los cultivos fueron estimulados con LPS como se describió anteriormente.

**7. Ensayo de tubulogénesis.** Células *HMEC-1* ( $1.5 \times 10^4$ ) fueron resuspendidas en un pequeño volumen de medio EGM-2 (Lonza, Tabla 1) y sembradas en placas de 96 pocillos recubiertas con 50  $\mu$ l de Matrigel (BD Biosciences) en presencia de los sobrenadantes de co-cultivo de Mo/Ma y LiT controles o Mo/Ma y LiT SIT o de sobrenadantes de Mo/Ma cultivados en ausencia de LiT. Los cultivos se mantuvieron 18hs en estufa a 37°C y 5% CO<sub>2</sub> y posteriormente la formación de túbulos/capilares fue examinada por microscopía de contraste. Se tomaron fotografías de cada condición y los puntos de ramificación fueron cuantificados usando el software Image J (NIH, USA).

**8. Ensayo de cicatrización o "Wound Healing".** Las células *HMEC-1* fueron cultivadas hasta confluencia en placas de 24 pocillos en medio EGM-2 (Lonza, Tabla 1). Posteriormente se realizaron dos heridas paralelas con un tip p200. Los pocillos fueron cuidadosamente lavados con PBS 1X a 37°C para eliminar las células endoteliales que fueron despegadas en el proceso de la herida. Luego, las células *HMEC-1* se cultivaron con los sobrenadantes de co-cultivo de los Mo/Ma con LiT controles o SIT, o sobrenadantes de Mo/Ma cultivados en ausencia de LiT. A las 0 y 6 horas se observaron los cultivos por microscopía de contraste de fase y se tomaron fotografías. El porcentaje de cierre de la herida se calculó como:  $(\text{longitud de la herida a las 6hs}) \times 100 / (\text{longitud de la herida a tiempo cero})$ , en cada caso. Las mediciones de longitud de cada herida fueron realizadas con el software NIS-Elements Viewer (Nikon).



**9. Ensayo de apoptosis en células tumorales.** La línea celular *HeLa* se trató con mitomicina C (75µg/ml) durante 30 minutos para inhibir la proliferación celular. Luego las células tratadas se cultivaron con los sobrenadantes de co-cultivos de Mo/Ma con LiT controles o SIT. Cuarenta y ocho horas después, las células fueron recolectadas y teñidas con 7-aminoactinomicina D (7-AAD, BD Pharmingen) durante 15 minutos, y luego evaluadas por citometría de flujo.

## II. METODOLOGÍAS GENERALES

**1. Citometría de Flujo.** De acuerdo al tipo de moléculas a evaluar se utilizaron distintos protocolos que se detallan a continuación. Todas las muestras se adquirieron en un equipo FACS Canto II (BD) y se analizaron con el software FlowJo.

**a. Moléculas de superficie.** Entre 0,5 y  $1 \times 10^6$  de células fueron resuspendidas en PBS-2%SBF en presencia de anticuerpos conjugados a fluorocromos y dirigidos contra distintas moléculas de superficie (Ver detalle en Tabla 2). Las células fueron incubadas con los anticuerpos durante 30 minutos en hielo, posteriormente lavadas y resuspendidas en PBS-2%SBF. Finalmente fueron adquiridas en el citómetro de flujo.

Marcas para LiT		
Anticuerpos	Fluorocromos	Marca
CD3	PerCP	BD
CD4	PE-Cy7	eBioscience
CD8	PerCP-Cy5.5	eBioscience
CD27	APC-eFluor780	eBioscience
CD28	APC	BD
CD28	FITC	eBioscience
CD28	PE	BD
CD62L	PE-Cy5	eBioscience
CD45RA	FITC	BD
Tim-3	PerCP-eFluor710	eBioscience
KLRG-1	Alexa Fluor 647	Dr. Pircher (Alemania)
PD-1	PE	eBioscience
PD-L1	PE-Cy7	BioLegend

Galectina-9	PE	BioLegend
Cadherina E	APC	BioLegend
Marcas para Monocitos		
CD14	FITC	BioLegend
CD14	Alexa Fluor 647	BioLegend
CD16	FITC	BD
CD206	APC	BioLegend
HLA-DR	PE-Cy7	eBioscience
CD86	FITC	BD
B7.H4	Biotin*	eBioscience
Galectina-9	PE	BioLegend
CD40	PE-Cy5	BD
Tim-3	PerCP-eFluor710	eBioscience

**Tabla 2.** Anticuerpos contra moléculas de superficie.

\*Anticuerpos biotinilados fueron luego incubados con Estreptavidina PE (BD).

**b. Moléculas Intracelulares.**  $1 \times 10^6$  de células fueron teñidas en superficie. Luego fueron fijadas y permeabilizadas con buffer Citofix/Citoperm (BD) de acuerdo a las recomendaciones del fabricante. Posteriormente fueron incubadas en buffer de permeabilización con anticuerpos conjugados dirigidos contra moléculas intracelulares (que se detallan a continuación) durante 30 a 60 minutos.

→ **Citoquinas Intracelulares.** Para la determinación de citoquinas intracelulares LiT fueron previamente estimuladas con PMA/Ionomicina ( $1 \mu\text{g}/\text{ml}$  de PMA -  $1 \text{mg}/\text{ml}$  de Ionomicina) mientras que co-cultivos (Mo-Ma/LiT) se estimularon con LPS ( $50 \text{ng}/\text{ml}$ ). En ambos casos, las células se estimularon durante 5hs en presencia de inhibidores del transporte proteico vesicular (Brefeldina y/o Monensina dependiendo de las citoquinas a evaluar).

Anticuerpos	Fluorocromos	Marca
IL-2	PE	BD
IFN- $\gamma$	FITC	BD
TNF	PE	BD
IL-6	Biotina*	BioLegend
IL-8	Biotina*	BioLegend
IL-1 $\beta$	Biotina*	BioLegend

MMP-9	Biotina*	eBioscience
-------	----------	-------------

**Tabla 3.** Anticuerpos contra citoquinas intracelulares.

\*Anticuerpos biotinilados fueron luego incubados con Estreptavidina PE (BD).

→ **Granzimas y perforinas, TCR  $\zeta$  y factores de transcripción.** La determinación de estas moléculas se realizó en LiT CD4+ y CD8+ controles o SIT no estimulados.

Anticuerpos	Fluorocromos	Marca
Granzima A	PE	BD
Granzima B	APC	BioLegend
Perforina	PE	BioLegend
Cadena $\zeta$	FITC	BD
Blimp-1	PE	Santa Cruz
T-bet	PE-Cy7	BioLegend
Eomes	eFluor 660	eBioscience

**Tabla 4.** Anticuerpos contra las proteínas intracelulares indicadas.

→ **Tirosinas fosforiladas.** Se determinaron en la población de Mo/Ma a las 40hs de co-cultivo con LiT controles o SIT y post-estímulo con LPS durante 120 min. Luego de su fijación y permeabilización, los Mo/Ma fueron marcados con anticuerpos dirigidos contra tirosinas fosforiladas (anti-PY20 Alexa Fluor 647, BioLegend) durante 30 minutos.

**c. Determinación de la movilización de CD107a (LAMP-1) a la superficie celular.** Para ello se siguió el protocolo previamente publicado<sup>221</sup>. Brevemente,  $0.5 \times 10^6$  LiT CD8+ controles o SIT fueron cultivados en placas de 96 pocillos y estimulados con PMA/Ionomicina (1 $\mu$ g/ml de PMA - 1mg/ml de Ionomicina) en presencia de Brefeldina y Monensina durante 5hs. Al inicio del cultivo se agregó el anticuerpo anti-CD107a\*FITC (BD). Mientras el estímulo induce la movilización de CD107a desde la membrana de los gránulos citotóxicos a la superficie celular, el anticuerpo se une a las moléculas que llegan a la superficie. La expresión de CD107a es transiente y es común que dicha molécula sea internalizada y



posteriormente degradada. La monensina y la brefeldina impiden que el anticuerpo sea degradado al inhibir la acidificación de las vesículas.

Luego de las 5hs de cultivo, los LiT fueron lavados y teñidos con anticuerpos dirigidos contra moléculas de la superficie celular (principalmente CD28).

**d. Determinación de CD40L.** La molécula CD40L se expresa en la superficie de LiT activados. Además, su expresión ha demostrado ser transiente dado que sufre procesos de reciclado constantes. Por este motivo, la detección de esta molécula en superficie se realizó siguiendo el protocolo previamente descrito por Chattopadhyay P.K. y col.<sup>222</sup>. Para ello, LiT CD4+ o CD8+ controles y SIT se cultivaron con anticuerpos anti-CD40L/CD154 conjugados con \*PE en presencia de anticuerpos estimulantes anti-CD3 (2µg/ml) y Monensina durante 24 horas. Después de la estimulación, las células se tiñeron en la superficie como hemos mencionado anteriormente y luego se analizaron por citometría de flujo.

**e. Evaluación de fagocitosis.** La evaluación de la capacidad fagocítica de los Mo/Ma se realizó mediante la utilización de microesferas de carboxilato fluorescentes (YG, yellow green) de 1µm (Polysciences, Inc.). Dichas partículas fueron añadidas a los co-cultivos de Mo/Ma con LiT controles o SIT (proporción células:microesferas 1:25). Las células y las partículas se incubaron a 37°C durante 30 minutos para favorecer su incorporación. Luego, las células fueron teñidas con anticuerpos dirigidos contra moléculas de superficie (CD14 y CD3) y finalmente adquiridas en el citómetro de flujo.

**f. Determinación de ROS y NO.** Las sondas moleculares: H<sub>2</sub>DCF-DA (Invitrogen) y DAF-FM DA (Molecular Probes, Inc.) se utilizaron para la detección específica de ROS y NO, respectivamente. Estos compuestos, inicialmente no fluorescentes, difunden pasivamente a través de las membranas celulares. Una vez dentro de la célula, la sonda es deacetilada por esterasas intracelulares, evento que impide que dicho compuesto vuelva al espacio extracelular. En presencia de ROS u NO estos compuestos son oxidados y forman un compuesto benzotriazol fluorescente que puede ser detectado a 495/515 nm.

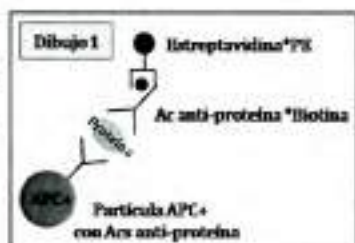
Brevemente, la producción de ROS y NO se evaluó en los co-cultivos de Mo/Ma con LiT SIT o LiT controles luego del agregado de una solución 10  $\mu$ M de las sondas H<sub>2</sub>DCF-DA (ROS) o DAF-FM DA (NO). Los co-cultivos y las sondas se incubaron durante 30 minutos a 37°C. Luego fueron lavados, con el objetivo de eliminar el exceso de sonda. Posteriormente las células fueron teñidas en superficie (con anticuerpos anti-CD14). Como control, la producción intracelular de ROS y NO se evaluó en los Mo/Ma cultivados solos o estimulados con LPS/IFN- $\gamma$  (1 $\mu$ g/ml y 50ng/ml, respectivamente).

**g. "Flow Cytomix".** Se trata de una metodología desarrollada comercialmente para la cuantificación, por citometría de flujo, de múltiples factores solubles (proteínas) en una misma muestra.

Esta metodología se utilizó para la determinación de factores pro-angiogénicos (MMP-9 y VEGF-A) y angiostáticos (IP-10) en los sobrenadantes de co-cultivo de Mo/Ma y LiT controles o SIT.

Brevemente, partículas de un tamaño específico y además fluorescentes (APC+) a las cuales se han adsorbido anticuerpos dirigidos contra las proteínas a evaluar fueron incubados con: (i) los sobrenadantes de co-cultivo y (ii) un anticuerpo secundario dirigido contra otro epítipo de la proteína a evaluar y marcado con biotina. Esta mezcla se incubó durante 3hs a temperatura ambiente (TA). Luego de un lavado, la mezcla de partículas fue incubada con Estreptavidina \*PE durante 1h a TA (Ver Dibujo 1, abajo). Luego de un segundo lavado la mezcla de partículas se resuspende en buffer PBS-1% albúmina sérica bovina (ASB) y es adquirida en el citómetro de flujo.

La cuantificación de los factores solubles se consigue a través de la realización de una curva de calibración con estándares de las proteínas a evaluar.



**Figura 1.** Representación esquemática del sistema de captura y de detección de factores solubles para su cuantificación por citometría de flujo.



**2. ELISA.** Para la determinación de citoquinas como IL-2, TNF, IL-10, IL-6, IL-8, IL-1 $\beta$  (BioLegend) e IFN- $\gamma$  (BD), en sobrenadantes de cultivo de LiT controles o SIT estimulados o en sobrenadantes de co-cultivo de Mo/Ma y LiT controles o SIT se utilizaron kits de ELISA comerciales de acuerdo a las instrucciones del proveedor.

En primer lugar se sensibilizaron placas de 96 reservorios (Costar) con el anticuerpo de captura disuelto en buffer de sensibilización (buffer carbonato pH 9,6 o buffer fosfato salino pH 7,2) durante 18 h a 4 °C. Luego las placas se lavaron 3 veces con buffer de lavado (PBS pH 7,4; 0,01% Tween-20) y se incubaron con buffer de bloqueo (PBS-10% SBF) durante 1 h a TA. Luego, se incubaron, por duplicado, las muestras y la curva estándar (2hs a TA). Luego de 4 lavados se agregó el anticuerpo secundario biotinilado que se incubó 1h a TA. Posteriormente, se lavó el exceso de anticuerpo secundario y se incubó con la estreptavidina-HRP (30min a TA). Finalmente se realizaron 7 lavados y se procedió al revelado con una solución de sustrato tetrametilbenzidina (TMB) y 0,03% de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. La reacción se detuvo con H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2N y se determinó la absorbancia a una longitud de onda de 450 nm en un espectrofotómetro de placa.

**3. Western Blot.** Se utilizó la técnica de Western Blot para la determinación de proteínas en Mo/Ma luego de 40hs de co-cultivo con LiT controles o SIT en presencia o ausencia de estímulo adicional (LPS).

**a. Extracto proteico.** Como se ha descripto anteriormente, Mo y LiT fueron co-cultivados durante 40 horas, posteriormente se estimularon con LPS (o medio de cultivo como control, tiempo cero, sin estímulo) durante 60 y 120 minutos. Después de este período, se eliminaron los LiT por exhaustivos lavados con PBS y los Mo/Ma adherentes se despegaron en forma mecánica, con la ayuda de un "scraper" y con PBS frío. Las Mo/Ma obtenidos se lisaron en SDS-Sample Buffer 1X (BioRad). En todos los casos se controló la pureza de la población de Mo/Ma obtenida: pureza media cercana al 90%. Cada extracto se sometió a ultrasonido durante 15 segundos y posteriormente fueron calentados a 95°C durante 5 min para una completa desnaturalización proteica. Los lisados fueron clarificados por centrifugación a 10000rpm 5min y separados inmediatamente en geles SDS-PAGE.



**b. Preparación de geles.** Geles de poliacrilamida al 10% (gel de resolución) se prepararon agregando 4 ml de agua destilada; 2,5 ml de buffer (1,5M Tris-HCl pH: 8,8); 3,33 ml de acrilamida 30%/bisacrilamida 0,8%; 100  $\mu$ l de SDS 10%; 5  $\mu$ l de TEMED y 200  $\mu$ l de persulfato de amonio 10%. Geles de poliacrilamida concentradores se prepararon agregando 3 ml de agua destilada; 1,25 ml de buffer (0,5M Tris-HCl pH: 6,8); 650  $\mu$ l de acrilamida 30%/bisacrilamida 0,8%; 50  $\mu$ l de SDS 10%; 5  $\mu$ l de TEMED y 100  $\mu$ l de persulfato de amonio.

**c. Electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes.** Luego de la preparación de los geles de poliacrilamida se sembraron las muestras y la corrida electroforética fue realizada en una cuba de electroforesis (Mini Protean II, BioRad) a 150 volt constante, en buffer de electroforesis (25 mM Tris pH 8,3; 192 mM glicina; 0,1% SDS) durante 50 minutos aproximadamente.

**d. Transferencia a membranas de nitrocelulosa.** Las proteínas separadas por electroforesis se transfirieron utilizando un equipo Mini transblot (BioRad) a una membrana de nitrocelulosa (BioRad). Para ello se utilizó un buffer de transferencia (25 mM Tris pH 8,3; 192 mM glicina; 0,1% SDS; 20% metanol) y la misma se realizó a 100 volt constante durante 80min. La transferencia de proteínas fue chequeada por tinción de la membrana con el colorante de unión a proteínas Rojo Ponceau.

**e. Inmunomarcación.** En primer lugar, las membranas se incubaron con buffer de bloqueo (0,15 M NaCl; 50 mM Tris; 0,1% Tween-20 -buffer TTBS - y 5% de leche descremada) durante 1h a TA. Luego del bloqueo, las membranas se incubaron con diferentes anticuerpos (producidos en conejos): anti-fosfo-I $\kappa$ B $\alpha$  (Ser32, 14D4), NF- $\kappa$ B2 p100/p52 (Cell Signaling Technology), TLR4 (Abcam),  $\beta$ -actina (control de carga, Cell Signaling) o p38 (control de carga, Sigma Aldrich) a 4°C durante toda la noche. Luego de lavar, las membranas fueron incubadas con anticuerpos anti-IgG de conejo conjugadas a peroxidasa (Pierce). Las bandas de proteínas se detectaron mediante quimioluminiscencia (ECL, Thermo Scientific Pierce). Las intensidades de las bandas de proteínas se analizaron por

densitometría utilizando el software Gelpro Analyzer y se normalizaron con respecto a las bandas  $\beta$ -actina o p38.

**4. Inmunofluorescencia.** Se utilizó la técnica de inmunofluorescencia para la determinación de la translocación de la subunidad p65 de NF- $\kappa$ B al núcleo de los Mo/Ma luego de 40hs de co-cultivo con LiT controles o SIT y post-estímulo con LPS.

**a. Citospin.** Como se ha descrito anteriormente, Mo y LiT fueron co-cultivados durante 40 horas, posteriormente se estimularon con LPS durante 120 minutos. Después de este período, se eliminaron los LiT por exhaustivos lavados y los Mo/Ma adherentes (aproximadamente  $0.5 \times 10^6$ ) se recolectaron y resuspendieron en 100 $\mu$ l de un medio rico en proteínas (RPMI- 20% de SBF). Posteriormente fueron centrifugadas durante 3 minutos a 600 – 800 rpm sobre portaobjetos pre-tratados (positivamente cargados para favorecer la unión de las células al vidrio).

Los portaobjetos se mantuvieron 15-20 min a TA para su secado y posteriormente las células fueron fijadas con metanol durante 10 min a 4°C. Se lavaron dos veces con PBS 1X y luego se permeabilizaron con PBS- 0,01% de Tritón-X100 durante 10 min a TA. Luego, las células se bloquearon en PBS-0,01% de Tritón-X100 y 2%SBF durante 1h a TA.

**b. Inmunomarcación.** Luego del bloqueo, las células fijadas a los vidrios fueron incubadas con anticuerpos de conejo contra la proteína p65 humana (eBiosciences) durante 18hs a 4°C. Luego de sucesivos lavados, se incubaron con un anticuerpo secundario anti-conejo conjugado a Alexa Fluor 488 durante 30 min a 37°C. Posteriormente, la tinción del núcleo celular se realizó con el agregado del colorante yoduro de propidio (IP) durante 10 min a TA. Luego de lavados con agua bidestilada, las células teñidas fueron montadas con FluorSave (Calbiochem) y analizadas por microscopía confocal (Olympus Fluoview 300).

### **III. ANÁLISIS ESTADÍSTICO**

El análisis estadístico se realizó con el software GraphPad Prism 5.0. De acuerdo a las comparaciones deseadas se utilizaron los siguientes test estadísticos: ANOVA de una vía con post-test de Bonferroni y test-*t* de Student apareado, paramétrico o no paramétrico de acuerdo con la distribución de los datos. Los valores de *p* menores a 0.05 se consideraron significativos (95% de confianza).

En general, en los gráficos de barras se representaron el valor *medio* ± SEM.



**REFERENCIAS**

**BIBLIOGRÁFICAS**

---

6.

- 1 Fridman, W. H., Pages, F., Sautes-Fridman, C. & Galon, J. The immune contexture in human tumours: impact on clinical outcome. *Nat Rev Cancer* **12**, 298-306 (2012).
- 2 Grivennikov, S. I., Greten, F. R. & Karin, M. Immunity, inflammation, and cancer. *Cell* **140**, 883-899 (2010).
- 3 Montes, C. L. *et al.* Tumor-induced senescent T cells with suppressor function: a potential form of tumor immune evasion. *Cancer Res* **68**, 870-879 (2008).
- 4 Ye, J. *et al.* TLR8 signaling enhances tumor immunity by preventing tumor-induced T-cell senescence. *EMBO Mol Med* **6**, 1294-1311 (2014).
- 5 Filaci, G. *et al.* CD8+ CD28- T regulatory lymphocytes inhibiting T cell proliferative and cytotoxic functions infiltrate human cancers. *J Immunol* **179**, 4323-4334 (2007).
- 6 Li, H. *et al.* Tim-3/galectin-9 signaling pathway mediates T-cell dysfunction and predicts poor prognosis in patients with hepatitis B virus-associated hepatocellular carcinoma. *Hepatology* **56**, 1342-1351 (2012).
- 7 Zalutnai, A. Molecular aspects of stromal-parenchymal interactions in malignant neoplasms. *Curr Mol Med* **6**, 685-693 (2006).
- 8 Hanahan, D. & Weinberg, R. A. The hallmarks of cancer. *Cell* **100**, 57-70 (2000).
- 9 Hanahan, D. & Weinberg, R. A. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* **144**, 646-674 (2011).
- 10 Mantovani, A., Allavena, P., Sica, A. & Balkwill, F. Cancer-related inflammation. *Nature* **454**, 436-444 (2008).
- 11 Colotta, F., Allavena, P., Sica, A., Garlanda, C. & Mantovani, A. Cancer-related inflammation, the seventh hallmark of cancer: links to genetic instability. *Carcinogenesis* **30**, 1073-1081 (2009).
- 12 Vacchelli, E. *et al.* Trial Watch: Anticancer radioimmunotherapy. *Oncoimmunology* **2**, e25595 (2013).
- 13 Vacchelli, E., Prada, N., Kepp, O. & Galluzzi, L. Current trends of anticancer immunochemotherapy. *Oncoimmunology* **2**, e25396 (2013).
- 14 Hussain, S. P., Hofseth, L. J. & Harris, C. C. Radical causes of cancer. *Nat Rev Cancer* **3**, 276-285 (2003).
- 15 Dworakowski, R., Anilkumar, N., Zhang, M. & Shah, A. M. Redox signalling involving NADPH oxidase-derived reactive oxygen species. *Biochem Soc Trans* **34**, 960-964 (2006).
- 16 Lewis, C. E. & Pollard, J. W. Distinct role of macrophages in different tumor microenvironments. *Cancer Res* **66**, 605-612 (2006).
- 17 Condeelis, J. & Pollard, J. W. Macrophages: obligate partners for tumor cell migration, invasion, and metastasis. *Cell* **124**, 263-266 (2006).
- 18 Qian, B. Z. & Pollard, J. W. Macrophage diversity enhances tumor progression and metastasis. *Cell* **141**, 39-51 (2010).

- 19 Dunn, G. P., Old, L. J. & Schreiber, R. D. The three Es of cancer immunoediting. *Annu Rev Immunol* **22**, 329-360 (2004).
- 20 Shankaran, V. *et al.* IFN $\gamma$  and lymphocytes prevent primary tumour development and shape tumour immunogenicity. *Nature* **410**, 1107-1111 (2001).
- 21 Matzinger, P. & Kamala, T. Tissue-based class control: the other side of tolerance. *Nat Rev Immunol* **11**, 221-230 (2011).
- 22 Kluwe, J., Mencin, A. & Schwabe, R. F. Toll-like receptors, wound healing, and carcinogenesis. *J Mol Med (Berl)* **87**, 125-138 (2009).
- 23 Vesely, M. D., Kershaw, M. H., Schreiber, R. D. & Smyth, M. J. Natural innate and adaptive immunity to cancer. *Annu Rev Immunol* **29**, 235-271 (2011).
- 24 Foster, A. D., Sivarapatna, A. & Gress, R. E. The aging immune system and its relationship with cancer. *Aging health* **7**, 707-718 (2011).
- 25 Kersey, J. H., Spector, B. D. & Good, R. A. Primary immunodeficiency diseases and cancer: the immunodeficiency-cancer registry. *Int J Cancer* **12**, 333-347 (1973).
- 26 Vajdic, C. M. *et al.* Are antibody deficiency disorders associated with a narrower range of cancers than other forms of immunodeficiency? *Blood* **116**, 1228-1234, doi:10.1182/blood-2010-03-272351 (2010).
- 27 Goedert, J. J. *et al.* Spectrum of AIDS-associated malignant disorders. *Lancet* **351**, 1833-1839 (1998).
- 28 Casper, C. The increasing burden of HIV-associated malignancies in resource-limited regions. *Annual review of medicine* **62**, 157-170, doi:10.1146/annurev-med-050409-103711 (2011).
- 29 Koebel, C. M. *et al.* Adaptive immunity maintains occult cancer in an equilibrium state. *Nature* **450**, 903-907 (2007).
- 30 Bai, X. F. *et al.* Different lineages of P1A-expressing cancer cells use divergent modes of immune evasion for T-cell adoptive therapy. *Cancer Res* **66**, 8241-8249 (2006).
- 31 Drake, C. G., Jaffee, E. & Pardoll, D. M. Mechanisms of immune evasion by tumors. *Adv Immunol* **90**, 51-81 (2006).
- 32 Croci, D. O. *et al.* Dynamic cross-talk between tumor and immune cells in orchestrating the immunosuppressive network at the tumor microenvironment. *Cancer Immunol Immunother* **56**, 1687-1700 (2007).
- 33 Rouas-Freiss, N. *et al.* Switch of HLA-G alternative splicing in a melanoma cell line causes loss of HLA-G1 expression and sensitivity to NK lysis. *Int J Cancer* **117**, 114-122 (2005).
- 34 Wischhusen, J., Friese, M. A., Mittelbronn, M., Meyermann, R. & Weller, M. HLA-E protects glioma cells from NKG2D-mediated immune responses in vitro: implications for immune escape in vivo. *J Neuropathol Exp Neurol* **64**, 523-528 (2005).
- 35 Whiteside, T. L. Immune suppression in cancer: effects on immune cells, mechanisms and future therapeutic intervention. *Semin Cancer Biol* **16**, 3-15 (2006).



- 36 Munn, D. H. & Mellor, A. L. Indoleamine 2,3-dioxygenase and tumor-induced tolerance. *J Clin Invest* **117**, 1147-1154 (2007).
- 37 Rabinovich, G. A., Gabrilovich, D. & Sotomayor, E. M. Immunosuppressive strategies that are mediated by tumor cells. *Annu Rev Immunol* **25**, 267-296 (2007).
- 38 Laderach, D. J. *et al.* A unique galectin signature in human prostate cancer progression suggests galectin-1 as a key target for treatment of advanced disease. *Cancer Res* **73**, 86-96 (2013).
- 39 Rabinovich, G. A. & Croci, D. O. Regulatory circuits mediated by lectin-glycan interactions in autoimmunity and cancer. *Immunity* **36**, 322-335 (2012).
- 40 Toscano, M. A. *et al.* Differential glycosylation of TH1, TH2 and TH-17 effector cells selectively regulates susceptibility to cell death. *Nat Immunol* **8**, 825-834 (2007).
- 41 Croci, D. O. *et al.* Disrupting galectin-1 interactions with N-glycans suppresses hypoxia-driven angiogenesis and tumorigenesis in Kaposi's sarcoma. *J Exp Med* **209**, 1985-2000 (2012).
- 42 Croci, D. O. *et al.* Glycosylation-dependent lectin-receptor interactions preserve angiogenesis in anti-VEGF refractory tumors. *Cell* **156**, 744-758 (2014).
- 43 Youn, J. I. & Gabrilovich, D. I. The biology of myeloid-derived suppressor cells: the blessing and the curse of morphological and functional heterogeneity. *Eur J Immunol* **40**, 2969-2975 (2010).
- 44 Sica, A., Schioppa, T., Mantovani, A. & Allavena, P. Tumour-associated macrophages are a distinct M2 polarised population promoting tumour progression: potential targets of anti-cancer therapy. *Eur J Cancer* **42**, 717-727 (2006).
- 45 Van Ginderachter, J. A. *et al.* Classical and alternative activation of mononuclear phagocytes: picking the best of both worlds for tumor promotion. *Immunobiology* **211**, 487-501 (2006).
- 46 Baitsch, L., Fuertes-Marraco, S. A., Legat, A., Meyer, C. & Speiser, D. E. The three main stumbling blocks for anticancer T cells. *Trends Immunol* **33**, 364-372 (2012).
- 47 Schwartz, R. H. T cell anergy. *Annu Rev Immunol* **21**, 305-334 (2003).
- 48 Colonna, M. & Cella, M. Crosspresentation: plasmacytoid dendritic cells are in the business. *Immunity* **27**, 419-421 (2007).
- 49 Crespo, J., Sun, H., Welling, T. H., Tian, Z. & Zou, W. T cell anergy, exhaustion, senescence, and stemness in the tumor microenvironment. *Curr Opin Immunol* **25**, 214-221 (2013).
- 50 Akbar, A. N. & Henson, S. M. Are senescence and exhaustion intertwined or unrelated processes that compromise immunity? *Nat Rev Immunol* **11**, 289-295 (2011).
- 51 Hayflick, L. The Limited in Vitro Lifetime of Human Diploid Cell Strains. *Exp Cell Res* **37**, 614-636 (1965).
- 52 Effros, R. B., Dagarag, M., Spaulding, C. & Man, J. The role of CD8+ T-cell replicative senescence in human aging. *Immunol Rev* **205**, 147-157 (2005).
- 53 Effros, R. B. Telomerase induction in T cells: a cure for aging and disease? *Exp Gerontol* **42**, 416-420 (2007).

- 54 Fagnoni, F. F. *et al.* Expansion of cytotoxic CD8+ CD28- T cells in healthy ageing people, including centenarians. *Immunology* **88**, 501-507 (1996).
- 55 Filaci, G. *et al.* Non-antigen-specific CD8(+) T suppressor lymphocytes in diseases characterized by chronic immune responses and inflammation. *Ann N Y Acad Sci* **1050**, 115-123 (2005).
- 56 Goronzy, J. J. & Weyand, C. M. Aging, autoimmunity and arthritis: T-cell senescence and contraction of T-cell repertoire diversity - catalysts of autoimmunity and chronic inflammation. *Arthritis Res Ther* **5**, 225-234 (2003).
- 57 Schirmer, M. *et al.* Circulating cytotoxic CD8(+) CD28(-) T cells in ankylosing spondylitis. *Arthritis Res* **4**, 71-76 (2002).
- 58 Tsukishiro, T., Donnenberg, A. D. & Whiteside, T. L. Rapid turnover of the CD8(+)CD28(-) T-cell subset of effector cells in the circulation of patients with head and neck cancer. *Cancer Immunol Immunother* **52**, 599-607 (2003).
- 59 Zhou, J. *et al.* Telomere length of transferred lymphocytes correlates with in vivo persistence and tumor regression in melanoma patients receiving cell transfer therapy. *J Immunol* **175**, 7046-7052 (2005).
- 60 Attig, S. *et al.* Simultaneous infiltration of polyfunctional effector and suppressor T cells into renal cell carcinomas. *Cancer Res* **69**, 8412-8419 (2009).
- 61 Arosa, F. A. CD8+CD28- T cells: certainties and uncertainties of a prevalent human T-cell subset. *Immunol Cell Biol* **80**, 1-13 (2002).
- 62 Meloni, F. *et al.* Foxp3 expressing CD4+ CD25+ and CD8+CD28- T regulatory cells in the peripheral blood of patients with lung cancer and pleural mesothelioma. *Hum Immunol* **67**, 1-12 (2006).
- 63 Albareda, M. C. *et al.* Chronic human infection with *Trypanosoma cruzi* drives CD4+ T cells to immune senescence. *J Immunol* **183**, 4103-4108 (2009).
- 64 Markovic-Plese, S., Cortese, L., Wandinger, K. P., McFarland, H. F. & Martin, R. CD4+CD28- costimulation-independent T cells in multiple sclerosis. *J Clin Invest* **108**, 1185-1194 (2001).
- 65 Schmidt, D., Goronzy, J. J. & Weyand, C. M. CD4+ CD7- CD28- T cells are expanded in rheumatoid arthritis and are characterized by autoreactivity. *J Clin Invest* **97**, 2027-2037 (1996).
- 66 Zal, B. *et al.* Differential pathways govern CD4+ CD28- T cell proinflammatory and effector responses in patients with coronary artery disease. *J Immunol* **181**, 5233-5241 (2008).
- 67 Monteiro, J., Batiwalla, F., Ostrer, H. & Gregersen, P. K. Shortened telomeres in clonally expanded CD28-CD8+ T cells imply a replicative history that is distinct from their CD28+CD8+ counterparts. *J Immunol* **156**, 3587-3590 (1996).
- 68 Effros, R. B. *et al.* Shortened telomeres in the expanded CD28-CD8+ cell subset in HIV disease implicate replicative senescence in HIV pathogenesis. *Aids* **10**, F17-22 (1996).
- 69 Fletcher, J. M. *et al.* Cytomegalovirus-specific CD4+ T cells in healthy carriers are continuously driven to replicative exhaustion. *J Immunol* **175**, 8218-8225 (2005).



- 70 Plunkett, F. J. *et al.* The loss of telomerase activity in highly differentiated CD8+CD28-CD27- T cells is associated with decreased Akt (Ser473) phosphorylation. *J Immunol* **178**, 7710-7719 (2007).
- 71 Effros, R. B. *et al.* Decline in CD28+ T cells in centenarians and in long-term T cell cultures: a possible cause for both in vivo and in vitro immunosenescence. *Exp Gerontol* **29**, 601-609 (1994).
- 72 Brenchley, J. M. *et al.* Expression of CD57 defines replicative senescence and antigen-induced apoptotic death of CD8+ T cells. *Blood* **101**, 2711-2720 (2003).
- 73 Valenzuela, H. F. & Effros, R. B. Divergent telomerase and CD28 expression patterns in human CD4 and CD8 T cells following repeated encounters with the same antigenic stimulus. *Clin Immunol* **105**, 117-125 (2002).
- 74 Henson, S. M. *et al.* KLRG1 signaling induces defective Akt (ser473) phosphorylation and proliferative dysfunction of highly differentiated CD8+ T cells. *Blood* **113**, 6619-6628 (2009).
- 75 Henson, S. M. & Akbar, A. N. KLRG1--more than a marker for T cell senescence. *Age (Dordr)* **31**, 285-291 (2009).
- 76 Ye, J. *et al.* Human regulatory T cells induce T-lymphocyte senescence. *Blood* **120**, 2021-2031 (2012).
- 77 Schietinger, A. & Greenberg, P. D. Tolerance and exhaustion: defining mechanisms of T cell dysfunction. *Trends Immunol* **35**, 51-60 (2014).
- 78 Posnett, D. N., Edinger, J. W., Manavalan, J. S., Irwin, C. & Marodon, G. Differentiation of human CD8 T cells: implications for in vivo persistence of CD8+ CD28- cytotoxic effector clones. *Int Immunol* **11**, 229-241 (1999).
- 79 Golden-Mason, L. *et al.* Negative immune regulator Tim-3 is overexpressed on T cells in hepatitis C virus infection and its blockade rescues dysfunctional CD4+ and CD8+ T cells. *J Virol* **83**, 9122-9130 (2009).
- 80 Perillo, N. L., Naeim, F., Walford, R. L. & Effros, R. B. The in vitro senescence of human T lymphocytes: failure to divide is not associated with a loss of cytolytic activity or memory T cell phenotype. *Mech Ageing Dev* **67**, 173-185 (1993).
- 81 Lanna, A., Henson, S. M., Escors, D. & Akbar, A. N. The kinase p38 activated by the metabolic regulator AMPK and scaffold TAB1 drives the senescence of human T cells. *Nat Immunol* **15**, 965-972 (2014).
- 82 Di Mitri, D. *et al.* Reversible senescence in human CD4+CD45RA+CD27- memory T cells. *J Immunol* **187**, 2093-2100 (2011).
- 83 Shi, L. *et al.* KLRG1 impairs CD4+ T cell responses via p16ink4a and p27kip1 pathways: role in hepatitis B vaccine failure in individuals with hepatitis C virus infection. *J Immunol* **192**, 649-657 (2014).
- 84 Weng, N. P., Akbar, A. N. & Goronzy, J. CD28(-) T cells: their role in the age-associated decline of immune function. *Trends Immunol* **30**, 306-312 (2009).
- 85 Filaci, G. *et al.* Non-antigen specific CD8+ T suppressor lymphocytes. *Clin Exp Med* **4**, 86-92 (2004).



- 86 Fenoglio, D. *et al.* Advancements on phenotypic and functional characterization of non-antigen-specific CD8<sup>+</sup>CD28<sup>-</sup> regulatory T cells. *Hum Immunol* **69**, 745-750 (2008).
- 87 Zhang, Y. *et al.* Interleukin-7 inhibits tumor-induced CD27<sup>-</sup>CD28<sup>-</sup> suppressor T cells: implications for cancer immunotherapy. *Clin Cancer Res* **17**, 4975-4986 (2011).
- 88 Wherry, E. J. T cell exhaustion. *Nat Immunol* **12**, 492-499 (2011).
- 89 Zajac, A. J. *et al.* Viral immune evasion due to persistence of activated T cells without effector function. *J Exp Med* **188**, 2205-2213 (1998).
- 90 Virgin, H. W., Wherry, E. J. & Ahmed, R. Redefining chronic viral infection. *Cell* **138**, 30-50 (2009).
- 91 Kaufmann, D. E. & Walker, B. D. PD-1 and CTLA-4 inhibitory cosignaling pathways in HIV infection and the potential for therapeutic intervention. *J Immunol* **182**, 5891-5897 (2009).
- 92 Brooks, D. G., Teyton, L., Oldstone, M. B. & McGavern, D. B. Intrinsic functional dysregulation of CD4<sup>+</sup> T cells occurs rapidly following persistent viral infection. *J Virol* **79**, 10514-10527 (2005).
- 93 Kaufmann, D. E. *et al.* Upregulation of CTLA-4 by HIV-specific CD4<sup>+</sup> T cells correlates with disease progression and defines a reversible immune dysfunction. *Nat Immunol* **8**, 1246-1254 (2007).
- 94 Antoine, P. *et al.* Functional exhaustion of CD4<sup>+</sup> T lymphocytes during primary cytomegalovirus infection. *J Immunol* **189**, 2665-2672 (2012).
- 95 Sakuishi, K. *et al.* Targeting Tim-3 and PD-1 pathways to reverse T cell exhaustion and restore anti-tumor immunity. *J Exp Med* **207**, 2187-2194 (2011).
- 96 Woo, S. R. *et al.* Immune inhibitory molecules LAG-3 and PD-1 synergistically regulate T-cell function to promote tumoral immune escape. *Cancer Res* **72**, 917-927 (2012).
- 97 Zhang, L., Gajewski, T. F. & Kline, J. PD-1/PD-L1 interactions inhibit antitumor immune responses in a murine acute myeloid leukemia model. *Blood* **114**, 1545-1552 (2009).
- 98 Matsuzaki, J. *et al.* Tumor-infiltrating NY-ESO-1-specific CD8<sup>+</sup> T cells are negatively regulated by LAG-3 and PD-1 in human ovarian cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**, 7875-7880 (2010).
- 99 Fourcade, J. *et al.* Upregulation of Tim-3 and PD-1 expression is associated with tumor antigen-specific CD8<sup>+</sup> T cell dysfunction in melanoma patients. *J Exp Med* **207**, 2175-2186 (2010).
- 100 Wu, K., Kryczek, I., Chen, L., Zou, W. & Welling, T. H. Kupffer cell suppression of CD8<sup>+</sup> T cells in human hepatocellular carcinoma is mediated by B7-H1/programmed death-1 interactions. *Cancer Res* **69**, 8067-8075 (2009).
- 101 Baitsch, L. *et al.* Exhaustion of tumor-specific CD8<sup>(+)</sup> T cells in metastases from melanoma patients. *J Clin Invest* **121**, 2350-2360 (2011).

- 102 Mumprecht, S., Schurch, C., Schwaller, J., Solenthaler, M. & Ochsenbein, A. F. Programmed death 1 signaling on chronic myeloid leukemia-specific T cells results in T-cell exhaustion and disease progression. *Blood* **114**, 1528-1536 (2009).
- 103 Ahmadzadeh, M. *et al.* Tumor antigen-specific CD8 T cells infiltrating the tumor express high levels of PD-1 and are functionally impaired. *Blood* **114**, 1537-1544 (2009).
- 104 Wang, S. F. *et al.* Early T cell signalling is reversibly altered in PD-1+ T lymphocytes infiltrating human tumors. *PLoS One* **6**, e17621 (2011).
- 105 Zhou, Q. *et al.* Coexpression of Tim-3 and PD-1 identifies a CD8+ T-cell exhaustion phenotype in mice with disseminated acute myelogenous leukemia. *Blood* **117**, 4501-4510 (2011).
- 106 Wherry, E. J. *et al.* Molecular signature of CD8+ T cell exhaustion during chronic viral infection. *Immunity* **27**, 670-684 (2007).
- 107 Crawford, A. *et al.* Molecular and transcriptional basis of CD4(+) T cell dysfunction during chronic infection. *Immunity* **40**, 289-302 (2014).
- 108 Collins, M. H. & Henderson, A. J. Transcriptional regulation and T cell exhaustion. *Curr Opin HIV AIDS* **9**, 459-463 (2014).
- 109 Doering, T. A. *et al.* Network analysis reveals centrally connected genes and pathways involved in CD8+ T cell exhaustion versus memory. *Immunity* **37**, 1130-1144 (2012).
- 110 Angelosanto, J. M. & Wherry, E. J. Transcription factor regulation of CD8+ T-cell memory and exhaustion. *Immunol Rev* **236**, 167-175 (2010).
- 111 Agnellini, P. *et al.* Impaired NFAT nuclear translocation results in split exhaustion of virus-specific CD8+ T cell functions during chronic viral infection. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**, 4565-4570 (2007).
- 112 Mueller, M. M. & Fusenig, N. E. Friends or foes - bipolar effects of the tumour stroma in cancer. *Nat Rev Cancer* **4**, 839-849 (2004).
- 113 Biswas, S. K. & Mantovani, A. Macrophage plasticity and interaction with lymphocyte subsets: cancer as a paradigm. *Nat Immunol* **11**, 889-896 (2010).
- 114 Bingle, L., Brown, N. J. & Lewis, C. E. The role of tumour-associated macrophages in tumour progression: implications for new anticancer therapies. *J Pathol* **196**, 254-265 (2002).
- 115 Biswas, S. K. *et al.* A distinct and unique transcriptional program expressed by tumor-associated macrophages (defective NF-kappaB and enhanced IRF-3/STAT1 activation). *Blood* **107**, 2112-2122 (2006).
- 116 Mosser, D. M. & Edwards, J. P. Exploring the full spectrum of macrophage activation. *Nat Rev Immunol* **8**, 958-969 (2008).
- 117 Qian, B. Z. *et al.* CCL2 recruits inflammatory monocytes to facilitate breast-tumour metastasis. *Nature* **475**, 222-225 (2011).
- 118 Conti, I. & Rollins, B. J. CCL2 (monocyte chemoattractant protein-1) and cancer. *Semin Cancer Biol* **14**, 149-154 (2004).



- 119 Lin, E. Y., Nguyen, A. V., Russell, R. G. & Pollard, J. W. Colony-stimulating factor 1 promotes progression of mammary tumors to malignancy. *J Exp Med* **193**, 727-740 (2001).
- 120 Tiemessen, M. M. *et al.* CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T cells induce alternative activation of human monocytes/macrophages. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**, 19446-19451 (2007).
- 121 Ruffell, B., Affara, N. I. & Coussens, L. M. Differential macrophage programming in the tumor microenvironment. *Trends Immunol* **33**, 119-126 (2012).
- 122 Lin, W. W. & Karin, M. A cytokine-mediated link between innate immunity, inflammation, and cancer. *J Clin Invest* **117**, 1175-1183 (2007).
- 123 Berg, D. J. *et al.* Enterocolitis and colon cancer in interleukin-10-deficient mice are associated with aberrant cytokine production and CD4(+) TH1-like responses. *J Clin Invest* **98**, 1010-1020 (1996).
- 124 Leek, R. D. *et al.* Association of macrophage infiltration with angiogenesis and prognosis in invasive breast carcinoma. *Cancer Res* **56**, 4625-4629 (1996).
- 125 Leek, R. D. *et al.* Macrophage infiltration is associated with VEGF and EGFR expression in breast cancer. *J Pathol* **190**, 430-436 (2000).
- 126 Pollard, J. W. Tumour-educated macrophages promote tumour progression and metastasis. *Nat Rev Cancer* **4**, 71-78 (2004).
- 127 Dirkx, A. E., Oude Egbrink, M. G., Wagstaff, J. & Griffioen, A. W. Monocyte/macrophage infiltration in tumors: modulators of angiogenesis. *J Leukoc Biol* **80**, 1183-1196 (2006).
- 128 Solinas, G., Germano, G., Mantovani, A. & Allavena, P. Tumor-associated macrophages (TAM) as major players of the cancer-related inflammation. *J Leukoc Biol* **86**, 1065-1073 (2009).
- 129 Sallusto, F., Geginat, J. & Lanzavecchia, A. Central memory and effector memory T cell subsets: function, generation, and maintenance. *Annu Rev Immunol* **22**, 745-763 (2004).
- 130 Arbones, M. L. *et al.* Lymphocyte homing and leukocyte rolling and migration are impaired in L-selectin-deficient mice. *Immunity* **1**, 247-260 (1994).
- 131 Rosen, S. D. Ligands for L-selectin: homing, inflammation, and beyond. *Annu Rev Immunol* **22**, 129-156 (2004).
- 132 Baniyash, M. TCR zeta-chain downregulation: curtailing an excessive inflammatory immune response. *Nat Rev Immunol* **4**, 675-687 (2004).
- 133 Kallies, A. *et al.* Transcriptional repressor Blimp-1 is essential for T cell homeostasis and self-tolerance. *Nat Immunol* **7**, 466-474 (2006).
- 134 Rutishauser, R. L. *et al.* Transcriptional repressor Blimp-1 promotes CD8(+) T cell terminal differentiation and represses the acquisition of central memory T cell properties. *Immunity* **31**, 296-308 (2009).
- 135 Zhu, J., Yamane, H. & Paul, W. E. Differentiation of effector CD4 T cell populations (\*). *Annu Rev Immunol* **28**, 445-489 (2010).



- 136 Lazarevic, V., Glimcher, L. H. & Lord, G. M. T-bet: a bridge between innate and adaptive immunity. *Nat Rev Immunol* **13**, 777-789 (2013).
- 137 Intlekofer, A. M. *et al.* Anomalous type 17 response to viral infection by CD8+ T cells lacking T-bet and eomesodermin. *Science* **321**, 408-411 (2008).
- 138 Kared, H., Fabre, T., Bedard, N., Bruneau, J. & Shoukry, N. H. Galectin-9 and IL-21 mediate cross-regulation between Th17 and Treg cells during acute hepatitis C. *PLoS Pathog* **9**, e1003422 (2013).
- 139 Zhu, C. *et al.* The Tim-3 ligand galectin-9 negatively regulates T helper type 1 immunity. *Nat Immunol* **6**, 1245-1252 (2005).
- 140 Wahl, L. M., Wahl, S. M., Smythies, L. E. & Smith, P. D. Isolation of human monocyte populations. *Curr Protoc Immunol* **Chapter 7**, Unit 7 6A (2006).
- 141 Ziegler-Heitbrock, H. W. Heterogeneity of human blood monocytes: the CD14+ CD16+ subpopulation. *Immunol Today* **17**, 424-428 (1996).
- 142 Ziegler-Heitbrock, H. W. Definition of human blood monocytes. *J Leukoc Biol* **67**, 603-606 (2000).
- 143 Subimerb, C. *et al.* Circulating CD14(+) CD16(+) monocyte levels predict tissue invasive character of cholangiocarcinoma. *Clin Exp Immunol* **161**, 471-479 (2010).
- 144 Zimmermann, H. W. *et al.* Functional contribution of elevated circulating and hepatic non-classical CD14CD16 monocytes to inflammation and human liver fibrosis. *PLoS One* **5**, e11049 (2010).
- 145 Yu, L., Wang, L. & Chen, S. Exogenous or endogenous Toll-like receptor ligands: which is the MVP in tumorigenesis? *Cell Mol Life Sci* **69**, 935-949 (2012).
- 146 Bonizzi, G. & Karin, M. The two NF-kappaB activation pathways and their role in innate and adaptive immunity. *Trends Immunol* **25**, 280-288 (2004).
- 147 Arenberg, D. A. *et al.* Interferon-gamma-inducible protein 10 (IP-10) is an angiostatic factor that inhibits human non-small cell lung cancer (NSCLC) tumorigenesis and spontaneous metastases. *J Exp Med* **184**, 981-992 (1996).
- 148 Mena, H. A. *et al.* Acidic preconditioning improves the proangiogenic responses of endothelial colony forming cells. *Angiogenesis* **17**, 867-879 (2014).
- 149 Sada-Ovalle, I. *et al.* The Tim3-galectin 9 pathway induces antibacterial activity in human macrophages infected with Mycobacterium tuberculosis. *J Immunol* **189**, 5896-5902 (2012).
- 150 Jayaraman, P. *et al.* Tim3 binding to galectin-9 stimulates antimicrobial immunity. *J Exp Med* **207**, 2343-2354 (2010).
- 151 Kiener, P. A. *et al.* Stimulation of CD40 with purified soluble gp39 induces proinflammatory responses in human monocytes. *J Immunol* **155**, 4917-4925 (1995).
- 152 Zhang, Y. *et al.* Tim-3 regulates pro- and anti-inflammatory cytokine expression in human CD14+ monocytes. *J Leukoc Biol* **91**, 189-196 (2012).
- 153 Zhang, Y. *et al.* Tim-3 negatively regulates IL-12 expression by monocytes in HCV infection. *PLoS One* **6**, e19664 (2011).

- 154 Song, G. *et al.* Elevated level of peripheral CD8(+)CD28(-) T lymphocytes are an independent predictor of progression-free survival in patients with metastatic breast cancer during the course of chemotherapy. *Cancer Immunol Immunother* **62**, 1123-1130 (2013).
- 155 Chen, C. *et al.* Changes of CD4+CD25+FOXP3+ and CD8+CD28- regulatory T cells in non-small cell lung cancer patients undergoing surgery. *Int Immunopharmacol* **18**, 255-261 (2013).
- 156 Sakhdari, A. *et al.* Tim-3 negatively regulates cytotoxicity in exhausted CD8+ T cells in HIV infection. *PLoS One* **7**, e40146 (2012).
- 157 Chattopadhyay, P. K. *et al.* The cytolytic enzymes granzyme A, granzyme B, and perforin: expression patterns, cell distribution, and their relationship to cell maturity and bright CD57 expression. *J Leukoc Biol* **85**, 88-97 (2009).
- 158 Sada-Ovalle, I. *et al.* Characterization of a cytotoxic CD57+ T cell subset from patients with pulmonary tuberculosis. *Clin Immunol* **121**, 314-323 (2006).
- 159 Le Priol, Y. *et al.* High cytotoxic and specific migratory potencies of senescent CD8+ CD57+ cells in HIV-infected and uninfected individuals. *J Immunol* **177**, 5145-5154 (2006).
- 160 Khan, A. I., Landis, R. C. & Malhotra, R. L-Selectin ligands in lymphoid tissues and models of inflammation. *Inflammation* **27**, 265-280 (2003).
- 161 Hanson, E. M., Clements, V. K., Sinha, P., Ilkovitch, D. & Ostrand-Rosenberg, S. Myeloid-derived suppressor cells down-regulate L-selectin expression on CD4+ and CD8+ T cells. *J Immunol* **183**, 937-944 (2009).
- 162 Kuss, I., Donnenberg, A. D., Gooding, W. & Whiteside, T. L. Effector CD8+CD45RO-CD27-T cells have signalling defects in patients with squamous cell carcinoma of the head and neck. *Br J Cancer* **88**, 223-230 (2003).
- 163 Taylor, D. D., Bender, D. P., Gercel-Taylor, C., Stanson, J. & Whiteside, T. L. Modulation of TcR/CD3-zeta chain expression by a circulating factor derived from ovarian cancer patients. *Br J Cancer* **84**, 1624-1629 (2001).
- 164 Yip, W. K., Abdullah, M. A., Yusoff, S. M. & Seow, H. F. Increase in tumour-infiltrating lymphocytes with regulatory T cell immunophenotypes and reduced zeta-chain expression in nasopharyngeal carcinoma patients. *Clin Exp Immunol* **155**, 412-422 (2009).
- 165 Kulkarni, D. P., Wadia, P. P., Pradhan, T. N., Pathak, A. K. & Chiplunkar, S. V. Mechanisms involved in the down-regulation of TCR zeta chain in tumor versus peripheral blood of oral cancer patients. *Int J Cancer* **124**, 1605-1613 (2009).
- 166 Whiteside, T. L. Down-regulation of zeta-chain expression in T cells: a biomarker of prognosis in cancer? *Cancer Immunol Immunother* **53**, 865-878 (2004).
- 167 Buggert, M. *et al.* T-bet and Eomes are differentially linked to the exhausted phenotype of CD8+ T cells in HIV infection. *PLoS Pathog* **10**, e1004251, doi:10.1371/journal.ppat.1004251 (2014).



- 168 Seddiki, N. *et al.* The microRNA-9/B-lymphocyte-induced maturation protein-1/IL-2 axis is differentially regulated in progressive HIV infection. *Eur J Immunol* **43**, 510-520, doi:10.1002/eji.201242695 (2013).
- 169 Wilson, C. B., Makar, K. W., Shnyreva, M. & Fitzpatrick, D. R. DNA methylation and the expanding epigenetics of T cell lineage commitment. *Semin Immunol* **17**, 105-119 (2005).
- 170 Hermann-Kleiter, N. & Baier, G. NFAT pulls the strings during CD4+ T helper cell effector functions. *Blood* **115**, 2989-2997 (2010).
- 171 Fife, B. T. *et al.* Interactions between PD-1 and PD-L1 promote tolerance by blocking the TCR-induced stop signal. *Nat Immunol* **10**, 1185-1192, doi:10.1038/ni.1790 (2009).
- 172 Topalian, S. L., Drake, C. G. & Pardoll, D. M. Targeting the PD-1/B7-H1(PD-L1) pathway to activate anti-tumor immunity. *Curr Opin Immunol* **24**, 207-212, doi:10.1016/j.col.2011.12.009 (2012).
- 173 Jurado, J. O. *et al.* Programmed death (PD)-1:PD-ligand 1/PD-ligand 2 pathway inhibits T cell effector functions during human tuberculosis. *J Immunol* **181**, 116-125 (2008).
- 174 Alvarez, I. B. *et al.* Role played by the programmed death-1-programmed death ligand pathway during innate immunity against Mycobacterium tuberculosis. *The Journal of infectious diseases* **202**, 524-532, doi:10.1086/654932 (2010).
- 175 Klibi, J. *et al.* Blood diffusion and Th1-suppressive effects of galectin-9-containing exosomes released by Epstein-Barr virus-infected nasopharyngeal carcinoma cells. *Blood* **113**, 1957-1966, doi:10.1182/blood-2008-02-142596 (2009).
- 176 Dong, H. *et al.* Tumor-associated B7-H1 promotes T-cell apoptosis: a potential mechanism of immune evasion. *Nature medicine* **8**, 793-800, doi:10.1038/nm730 (2002).
- 177 Taube, J. M. *et al.* Association of PD-1, PD-1 Ligands, and Other Features of the Tumor Immune Microenvironment with Response to Anti-PD-1 Therapy. *Clin Cancer Res* **20**, 5064-5074, doi:10.1158/1078-0432.CCR-13-3271 (2014).
- 178 Lipson, E. J. *et al.* PD-L1 expression in the Merkel cell carcinoma microenvironment: association with inflammation, Merkel cell polyomavirus and overall survival. *Cancer immunology research* **1**, 54-63, doi:10.1158/2326-6066.CIR-13-0034 (2013).
- 179 Topalian, S. L. *et al.* Survival, durable tumor remission, and long-term safety in patients with advanced melanoma receiving nivolumab. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* **32**, 1020-1030, doi:10.1200/JCO.2013.53.0105 (2014).
- 180 Vacchelli, E. *et al.* Trial watch: Monoclonal antibodies in cancer therapy. *Oncoimmunology* **2**, e22789 (2013).
- 181 Sliwkowski, M. X. & Mellman, I. Antibody therapeutics in cancer. *Science* **341**, 1192-1198, doi:10.1126/science.1241145 (2013).



- 182 Garner, O. B. & Baum, L. G. Galectin-glycan lattices regulate cell-surface glycoprotein organization and signalling. *Biochem Soc Trans* **36**, 1472-1477 (2008).
- 183 Lau, K. S. *et al.* Complex N-glycan number and degree of branching cooperate to regulate cell proliferation and differentiation. *Cell* **129**, 123-134 (2007).
- 184 Bi, S., Hong, P. W., Lee, B. & Baum, L. G. Galectin-9 binding to cell surface protein disulfide isomerase regulates the redox environment to enhance T-cell migration and HIV entry. *Proc Natl Acad Sci U S A* **108**, 10650-10655 (2011).
- 185 Gordon-Alonso, M., Demotte, N. & van der Bruggen, P. Sugars boost exhausted tumor-infiltrating lymphocytes by counteracting immunosuppressive activities of galectins. *Oncoimmunology* **3**, e28783 (2014).
- 186 Mantovani, A. & Sica, A. Macrophages, innate immunity and cancer: balance, tolerance, and diversity. *Curr Opin Immunol* **22**, 231-237 (2010).
- 187 Mantovani, A., Sozzani, S., Locati, M., Allavena, P. & Sica, A. Macrophage polarization: tumor-associated macrophages as a paradigm for polarized M2 mononuclear phagocytes. *Trends Immunol* **23**, 549-555 (2002).
- 188 Robinson-Smith, T. M. *et al.* Macrophages mediate inflammation-enhanced metastasis of ovarian tumors in mice. *Cancer Res* **67**, 5708-5716 (2007).
- 189 Sica, A. & Bronte, V. Altered macrophage differentiation and immune dysfunction in tumor development. *J Clin Invest* **117**, 1155-1166 (2007).
- 190 Dunn, G. P., Bruce, A. T., Ikeda, H., Old, L. J. & Schreiber, R. D. Cancer immunoediting: from immunosurveillance to tumor escape. *Nat Immunol* **3**, 991-998 (2002).
- 191 Balkwill, F. Tumour necrosis factor and cancer. *Nat Rev Cancer* **9**, 361-371 (2009).
- 192 Giraud, E., Inoue, M. & Hanahan, D. An amino-bisphosphonate targets MMP-9-expressing macrophages and angiogenesis to impair cervical carcinogenesis. *J Clin Invest* **114**, 623-633 (2004).
- 193 Levina, V. *et al.* Chemotherapeutic drugs and human tumor cells cytokine network. *Int J Cancer* **123**, 2031-2040 (2008).
- 194 Kaneko, T. *et al.* Bcl-2 orchestrates a cross-talk between endothelial and tumor cells that promotes tumor growth. *Cancer Res* **67**, 9685-9693 (2007).
- 195 Naldini, A. *et al.* Cutting edge: IL-1beta mediates the proangiogenic activity of osteopontin-activated human monocytes. *J Immunol* **177**, 4267-4270 (2006).
- 196 Wegiel, B., Bjartell, A., Culig, Z. & Persson, J. L. Interleukin-6 activates PI3K/Akt pathway and regulates cyclin A1 to promote prostate cancer cell survival. *Int J Cancer* **122**, 1521-1529 (2008).
- 197 Acosta, J. C. *et al.* Chemokine signaling via the CXCR2 receptor reinforces senescence. *Cell* **133**, 1006-1018 (2008).
- 198 Ye, J. *et al.* Tumor-derived gammadelta regulatory T cells suppress innate and adaptive immunity through the induction of immunosenescence. *J Immunol* **190**, 2403-2414 (2013).

- 199 Casati, C. *et al.* Human lymphocyte activation gene-3 molecules expressed by activated T cells deliver costimulation signal for dendritic cell activation. *J Immunol* **180**, 3782-3788 (2008).
- 200 Avice, M. N., Sarfati, M., Triebel, F., Delespesse, G. & Demeure, C. E. Lymphocyte activation gene-3, a MHC class II ligand expressed on activated T cells, stimulates TNF-alpha and IL-12 production by monocytes and dendritic cells. *J Immunol* **162**, 2748-2753 (1999).
- 201 Goldberg, M. V. & Drake, C. G. LAG-3 in Cancer Immunotherapy. *Curr Top Microbiol Immunol* **344**, 269-278 (2011).
- 202 Matsuoka, T., Tabata, H. & Matsushita, S. Monocytes are differentially activated through HLA-DR, -DQ, and -DP molecules via mitogen-activated protein kinases. *J Immunol* **166**, 2202-2208 (2001).
- 203 Jones, R. B. *et al.* Tim-3 expression defines a novel population of dysfunctional T cells with highly elevated frequencies in progressive HIV-1 infection. *J Exp Med* **205**, 2763-2779 (2008).
- 204 Clayton, K. L. *et al.* T cell Ig and mucin domain-containing protein 3 is recruited to the immune synapse, disrupts stable synapse formation, and associates with receptor phosphatases. *J Immunol* **192**, 782-791 (2014).
- 205 Lee, J. *et al.* Phosphotyrosine-dependent coupling of Tim-3 to T-cell receptor signaling pathways. *Mol Cell Biol* **31**, 3963-3974 (2011).
- 206 Ma, C. J. *et al.* Cis association of galectin-9 with Tim-3 differentially regulates IL-12/IL-23 expressions in monocytes via TLR signaling. *PLoS One* **8**, e72488 (2013).
- 207 Melter, M. *et al.* Ligation of CD40 induces the expression of vascular endothelial growth factor by endothelial cells and monocytes and promotes angiogenesis in vivo. *Blood* **96**, 3801-3808 (2000).
- 208 Dupoux, A. *et al.* cIAP1-dependent TRAF2 degradation regulates the differentiation of monocytes into macrophages and their response to CD40 ligand. *Blood* **113**, 175-185 (2009).
- 209 Schonbeck, U. & Libby, P. The CD40/CD154 receptor/ligand dyad. *Cell Mol Life Sci* **58**, 4-43 (2001).
- 210 Peters, A. L., Stunz, L. L. & Bishop, G. A. CD40 and autoimmunity: the dark side of a great activator. *Semin Immunol* **21**, 293-300 (2009).
- 211 Wagner, D. H., Jr., Stout, R. D. & Suttles, J. Role of the CD40-CD40 ligand interaction in CD4+ T cell contact-dependent activation of monocyte interleukin-1 synthesis. *Eur J Immunol* **24**, 3148-3154 (1994).
- 212 Alderson, M. R. *et al.* CD40 expression by human monocytes: regulation by cytokines and activation of monocytes by the ligand for CD40. *J Exp Med* **178**, 669-674 (1993).
- 213 Almerighi, C. *et al.* 1Alpha,25-dihydroxyvitamin D3 inhibits CD40L-induced pro-inflammatory and immunomodulatory activity in human monocytes. *Cytokine* **45**, 190-197 (2009).



- 214 Beatty, G. L. *et al.* CD40 agonists alter tumor stroma and show efficacy against pancreatic carcinoma in mice and humans. *Science* **331**, 1612-1616 (2011).
- 215 Ruter, J., Antonia, S. J., Burris, H. A., Huhn, R. D. & Vonderheide, R. H. Immune modulation with weekly dosing of an agonist CD40 antibody in a phase I study of patients with advanced solid tumors. *Cancer Biol Ther* **10**, 983-993 (2010).
- 216 Dumas, G. *et al.* CD40 pathway activation reveals dual function for macrophages in human endometrial cancer cell survival and invasion. *Cancer Immunol Immunother* **62**, 273-283 (2013).
- 217 Kedl, R. M. *et al.* CD40 stimulation accelerates deletion of tumor-specific CD8(+) T cells in the absence of tumor-antigen vaccination. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 10811-10816 (2001).
- 218 Drabick, J. J. & Schell, T. D. Poking CD40 for cancer therapy, another example of the Goldilocks effect. *Cancer Biol Ther* **10**, 994-996 (2010).
- 219 Strober, W. Obtaining human peripheral blood cells. *Curr Protoc Immunol* **Appendix 3**, Appendix 3F, doi:10.1002/0471142735.ima03fs21 (2001).
- 220 Kruisbeek, A. M., Shevach, E. & Thornton, A. M. Proliferative assays for T cell function. *Curr Protoc Immunol* **Chapter 3**, Unit 3 12, doi:10.1002/0471142735.im0312s60 (2004).
- 221 Betts, M. R. *et al.* Sensitive and viable identification of antigen-specific CD8+ T cells by a flow cytometric assay for degranulation. *Journal of immunological methods* **281**, 65-78 (2003).
- 222 Chattopadhyay, P. K., Yu, J. & Roederer, M. Live-cell assay to detect antigen-specific CD4+ T-cell responses by CD154 expression. *Nature protocols* **1**, 1-6, doi:10.1038/nprot.2006.1 (2006).



**PRODUCCIÓN CIENTÍFICA**

---

7.

### **PUBLICACIONES**

Los resultados del Objetivo Específico II forman parte del manuscrito: "Tumor-induced senescent T cells promote the secretion of pro-inflammatory cytokines and angiogenic factors by human monocytes/macrophages through a mechanism that involves Tim-3 and CD40L". **Ramello MC.**, Tosello Boari J., Canale FP., Gastman B., Mena HA., Negrotto S., Gruppi A., Acosta Rodríguez EV., Montes CL. *Cell Death & Disease*. 2014 Nov 6;5:e1507. doi: 10.1038/cddis.2014.451.

Los resultados del Objetivo específico I forman parte de un manuscrito en preparación que será enviado para su publicación en el transcurso de 2015.

Además, durante esta tesis participé en el siguiente Trabajo Científico: "IL-17RA Signaling Reduces Inflammation and Mortality during Trypanosoma cruzi Infection by Recruiting Suppressive IL-10-Producing Neutrophils". Tosello Boari J., Amezcua Vesely MC., Bermejo DA., **Ramello MC.**, Montes CL., Cejas H., Gruppi A., Acosta Rodríguez EV. *PLoS Pathogens* 2012 Apr;8(4):e1002658. Epub 2012 Apr 26.

### **PRESENTACIONES EN REUNIONES CIENTÍFICAS**

Los resultados obtenidos en el transcurso de este trabajo de tesis fueron presentados en las siguientes Reuniones Científicas:

- Tumor-induced senescent T-lymphocytes (TIST): phenotype and functional characterization. **Ramello MC.** Acosta Rodríguez E y Montes CL. *9th Latin American Congress of Immunology*. Noviembre 2009.

- Tumor-induced senescent T-lymphocytes (TIST): phenotype and functional characterization. **Ramello MC**, Acosta Rodríguez E y Montes CL. *LVII Reunión Científica anual de la Sociedad Argentina de Inmunología*. Noviembre 2009.
- Tumor-induced senescent T-lymphocytes (TIST) modulate the activation of human monocytes. **Ramello MC**, Acosta Rodríguez E y Montes CL. *First French-Argentine Immunology Congress*. Noviembre 2010.
- Linfocitos T senescentes inducidos por tumores (TSIT) promueven un perfil inflamatorio de monocitos humanos. **Ramello MC**; Tosello Boari J; Acosta Rodríguez E y Montes CL. *LIX Reunión Científica anual de la Sociedad Argentina de Inmunología*. Octubre de 2011.
- Linfocitos T senescentes inducidos por tumores (LiTSIT) promueven la secreción de factores involucrados en la angiogénesis por parte de monocitos humanos. **Ramello MC**; Tosello Boari J; Gorosito Serrán M; Acosta Rodríguez E y Montes CL. *LX Reunión Anual de la Sociedad Argentina de Inmunología y LVII Reunión Científica Anual de la Sociedad Argentina de Investigación Clínica*. Noviembre de 2012.
- Tumor-induced senescent T cells promote the production of pro-inflammatory cytokines and angiogenic factors by human monocytes through a cell to cell contact mechanism. **Ramello MC**; Tosello Boari J; Canale F; Acosta Rodríguez E; Montes CL. *LXI Reunión Anual de la Sociedad Argentina de Inmunología*. Noviembre de 2013.
- Tumor-induced senescent T cells: a dysfunctional T cell population with immunomodulatory potential. **Ramello MC**; Canale F; Tosello Boari J; Acosta Rodríguez E; Montes CL. *LXII Reunión Anual de la Sociedad Argentina de Inmunología*. Noviembre de 2014.