

CONICET



Universidad
Nacional
de Córdoba

C I B I C I



FCQ

Facultad de
Ciencias Químicas

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

Tesis de Doctorado en Ciencias Químicas

**IMPACTO DE LA TERAPIA CON UN AGONISTA DE TOLL LIKE
RECEPTOR 3 SOBRE EL INFILTRADO INMUNOLÓGICO EN UN MODELO
MURINO DE CÁNCER**

Bioq. Emiliano Roselli

Director de Tesis: Prof. Dra. Mariana Maccioni

Córdoba, Argentina

ÍNDICE

RESUMEN.....	5
ABREVIATURAS	8
CAPÍTULO 1: INTRODUCCIÓN	11
INMUNOTERAPIA CONTRA EL CÁNCER	12
Terapias con bloqueantes de punto de control o “ <i>checkpoint inhibitors</i> ”	14
CÉLULAS MIELOIDES Y SU ROL EN CÁNCER	17
Macrófagos asociados a tumor (TAMs)	20
Células Dendríticas.....	21
Neutrófilos, Monocitos y Células Mieloides Supresoras en cáncer	22
CÉLULAS LINFOIDES Y SU ROL EN CÁNCER	22
Células linfoides con capacidad citotóxica en la respuesta inmune antitumoral ...	23
RECEPTORES DE LA INMUNIDAD INNATA	24
Receptores tipo Toll.....	24
Receptores tipo Toll intracelulares.....	25
Receptor tipo Toll 3 (TLR3).....	26
INTERFERONES TIPO I.....	30
Efecto de los IFN-I endógenos y los inducidos farmacológicamente en el microambiente tumoral	32
LIGANDOS DE TLR3 EN INMUNOTERAPIA.....	34
INTRODUCCIÓN AL MODELO EXPERIMENTAL.....	36
CAPÍTULO 2: OBJETIVOS.....	41
OBJETIVO GENERAL Y CONSTRUCCIÓN DE LA HIPÓTESIS DE TRABAJO	42
CAPÍTULO 3: RESULTADOS.....	43
OBJETIVO ESPECÍFICO I: IDENTIFICAR EL BLANCO CELULAR DE POLI A:U QUE EXPRESA EL RECEPTOR TLR3 DENTRO DEL MICROAMBIENTE TUMORAL... ..	44
CARACTERIZACIÓN DEL RATÓN REPORTERO TLR3-GFP	45
EXPRESIÓN DE TLR3 EN POBLACIONES INFILTRANTE DE TUMOR.....	52

OBJETIVO ESPECÍFICO II: DESCRIBIR CÓMO EL TRATAMIENTO TERAPÉUTICO CON POLI A:U, UN LIGANDO DE TLR3, MODIFICA EL PERFIL DEL INFILTRADO INMUNOLÓGICO INTRATUMORAL.....	57
EFICACIA TERAPÉUTICA DE POLI A:U Y SU IMPACTO SOBRE CÉLULAS INMUNES MIELOIDES.....	58
Determinación de macrófagos protumorales M2-like como fuente de IL10 en el microambiente tumoral	63
Estado de activación de células dendríticas convencionales infiltrando tumor luego del tratamiento con poli A:U	64
IMPACTO DEL TRATAMIENTO CON POLI A:U SOBRE EL INFILTRADO TUMORAL LINFOIDE.....	65
Células con capacidad citotóxica presentaron mayor estado de activación en ratones tratados con poli A:U.....	68
EFECTO DEL TRATAMIENTO PERITUMORAL CON POLI A:U SOBRE LOS GANGLIOS LINFÁTICOS	71
OBJETIVO ESPECÍFICO III: ESTUDIAR LA FUNCIONALIDAD DEL COMPARTIMIENTO MIELOIDE LUEGO DEL TRATAMIENTO CON POLI A:U.	75
ESTUDIO DEL EFECTO DEL TRATAMIENTO CON POLI A:U SOBRE EL EJE PD1-PDL1	76
EFECTO DE LOS IFN- γ INDUCIDOS POR POLI A:U SOBRE LOS FENÓMENOS OBSERVADOS EN LAS POBLACIONES MIELOIDES INFILTRANTES DE TUMOR	78
IMPACTO DE TNF EN LA EFICACIA DEL TRATAMIENTO CON POLI A:U	81
ENSAYOS FUNCIONALES DE MONOCITOS INFILTRANTES DE TUMOR.....	83
CAPÍTULO 4: DISCUSIÓN	89
GENERALIDADES DEL MODELO TERAPÉUTICO CON POLI A:U.....	90
TLR3 EN EL MICROAMBIENTE TUMORAL: CÉLULAS DENDRÍTICAS	91
EL TRATAMIENTO CON POLI A:U MODULA EL NÚMERO Y LA ACTIVACIÓN DE CÉLULAS MIELOIDES	93
EL TRATAMIENTO CON POLI A:U MODIFICA EL INFILTRADO INMUNE LINFOIDE HACIA UN PERFIL ANTITUMORAL	97
OBSERVACIONES FINALES	100

CAPÍTULO 5: MATERIALES Y MÉTODOS	102
Análisis Estadístico.....	103
Reactivos.....	103
Líneas Celulares.....	103
Animales.....	103
Inducción de tumores <i>in vivo</i> : modelo terapéutico con poli A:U.....	104
Preparación / Empleo de poli A:U	104
Obtención de células mononucleares infiltrantes de tumor	104
Citometría de Flujo	105
Citometría de Flujo Intracelular	105
Western Blot	106
Ensayo de proliferación <i>in vitro</i>	106
Ensayo de invasión <i>in vitro</i> : Esferoides en 3D	106
Macrófagos derivados de médula ósea (BMDMs).....	107
CAPÍTULO 6: BIBLIOGRAFÍA	108
CAPÍTULO 7: PRODUCCIÓN CIENTÍFICA	121

RESUMEN

RESUMEN

Durante la realización de la presente tesis doctoral se estudió en profundidad el impacto, sobre el infiltrado inmunológico en el sitio del tumor, de una inmunoterapia antitumoral basada en la utilización del ARNdc, poli A:U (Ácido Poliadenílico-Poliuridílico) como ligando sintético del receptor innato TLR3. Trabajos previos del grupo han demostrado que el tratamiento peritumoral con poli A:U inhibe el crecimiento tumoral y el peso tumoral en ratones portadores del melanoma murino B16-OVA.

En primera instancia detectamos las células que expresan el receptor TLR3 en el microambiente tumoral utilizando ratones reporteros TLR3-GFP. Hemos identificado a las células dendríticas (CDs) como la principal célula capaz de detectar este ARNdc, al expresar el receptor TLR3. A su vez, hemos determinado dos subtipos de CDs con distinta expresión del receptor; las CDs CD103+ migratorias expresan en su totalidad TLR3, mientras que las CDs CD11b+ residentes lo hacen en menor medida. Dichas CDs son las células blanco para poli A:U que desencadenan los efectos antitumorales del tratamiento.

Al caracterizar el infiltrado inmunológico determinamos un menor número de CDs CD103+ y CDs CD11b+ luego del tratamiento, pero las mismas presentaban un estado de activación mucho mayor (CDs CD86+) que en animales control no tratados. En el caso de macrófagos asociados a tumor, determinamos una disminución en el número de los subtipos M1-like y M2-like luego del tratamiento, siendo estos últimos una fuente importante de la citocina protumoral IL-10. Al estudiar células derivadas de monocitos en tumor (células que darán origen a macrófagos y CDs intratumorales), no detectamos cambios en su número, pero sí en su fenotipo luego del tratamiento. Poli A:U indujo un aumento en la cantidad de monocitos MHCII- productores de TNF (*Tumour Necrosis Factor*), citocina que participa en la eficacia del tratamiento, al perderse parcialmente el efecto de control de crecimiento tumoral en animales incapaces de detectar dicha citocina proinflamatoria (TNFRp55^{-/-}). Por otro lado, se detectó un aumento en el porcentaje de monocitos MHCII- que expresan el ligando inhibitorio PD-L1, lo cual sumando a lo anterior otorga evidencia de un estado más activado de estos monocitos luego del tratamiento.

Ya ha sido descripta la inducción de interferones tipo I (IFN-I) por parte de poli A:U: las CDs TLR3+ serían la principal fuente de los mismos, que son esenciales para la eficacia del tratamiento, que se perdió en ratones deficientes para el receptor de IFN-I (IFNAR1^{-/-}). Valiéndonos de estos animales, pudimos definir cómo los IFN-I median

algunos de los efectos del tratamiento, como la disminución en las poblaciones ya descritas y el aumento de PD-L1 en monocitos MHCII-.

Las CD8 con fenotipo más activado son capaces de montar una respuesta inmune adaptativa más robusta. En este sentido, hemos observado un aumento muy marcado de linfocitos T CD8+ citotóxicos luego del tratamiento, acompañado por cambios fenotípicos asociados a una mayor capacidad antitumoral (aumento en granzima B capaz de inducir muerte en células neoplásicas). Además, hemos determinado un aumento en linfocitos T CD8+ específicos para el antígeno tumoral modelo OVA luego del tratamiento. Este aumento llevó a un cambio en la relación Treg/CD8 beneficioso, ya que los linfocitos T regulatorios (Treg) son considerados protumorales al inhibir la proliferación de los efectores CD8+ citotóxicos. Por otro lado, evidenciamos un aumento en moléculas citotóxicas (granzima B) dentro de células NK, otra población con capacidad de inducir muerte de las células tumorales, acompañado por cambios fenotípicos asociados a un perfil más maduro y activo de estas células (células NK KLRG1+).

Por todo lo anterior, podemos concluir que la administración de poli A:U como ligando de TLR3 tiene un claro efecto terapéutico, mediado principalmente por los IFN-I generados, que impactan sobre las distintas poblaciones celulares inmunes asociadas a tumor. Nuestros hallazgos aportan conocimientos acerca del impacto de TLR3 sobre el desarrollo tumoral y la utilización de sus ligandos como terapia, con la descripción de los efectos sobre las distintas poblaciones que pueden ser tomadas en cuenta a la hora de diseñar terapias combinadas con otros principios activos, para poder potenciar aún más los enfoques inmunoterapéuticos actuales contra el cáncer.

ABREVIATURAS

ABREVIATURAS

AAT	Antígenos Asociados a Tumores
ARG1	Arginasa I
ARN	Ácido Ribonucleico
BCR	<i>B Cell Receptor</i>
BMDMs	Macrófagos Derivados de Médula Ósea
CDc	Células Dendríticas Convencionales
CDp	Células Dendríticas Plasmocitoides
CDs	Células Dendríticas
CPA	Células Presentadoras de Antígeno
CTL	Célula T Citotóxica – <i>Cytotoxic T Cell</i>
CTLA-1	Cytotoxic T-Lymphocyte Antigen 4
GD	Ganglio Drenante
GFP	Proteína Fluorescente Verde
GND	Ganglio No Drenante
HIF-1 α	<i>Hypoxia-Inducible Factor 1</i>
IFM	Intensidad de Fluorescencia Media
IFNAR	<i>Interferon-α/β Receptor</i>
IFN-I	Interferones tipo I
IFN- γ	Interferón Gamma
IL	Interleucina
IL-1R	Receptor De IL-1
iNOS	<i>Inducible nitric oxide synthase</i>
IRF	<i>Interferon regulatory factor</i>
IRGs	<i>IFN-regulated genes</i>
JAK1	Janus Kinase 1
JNK	quinasas c-Jun N-terminal
KLRG1	<i>Killer-Cell Lectin Like Receptor G1</i>
LPS	Lipopolisacárido

LRR	Regiones Repetidas Ricas en Leucinas
Ly6C	<i>Lymphocyte Antigen 6 Complex, Locus C</i>
Ly6G	<i>Lymphocyte Antigen 6 Complex, Locus G</i>
MAPK	<i>Mitogen-Activated Protein Kinases</i>
MDSCs	<i>Myeloid-Derived Suppressor Cells</i>
MHC	Complejo Mayor de Histocompatibilidad - <i>Major Histocompatibility Complex</i>
NF- κ B	<i>Nuclear factor kappa B</i>
OVA	Ovoalbúmina
p.i.	Post-inoculación
PAMPs	<i>Pathogen-Associated Molecular Patterns</i>
pAU	Poli A:U - Ácido Poliadenílico-Poliuridílico
PD1	<i>Programmed Cell Death Protein 1</i>
PD-L1	<i>Programmed Death-Ligand 1</i>
PD-L2	<i>Programmed Death-Ligand 2</i>
pIC	Poli I:C – Ácido Poliinosínico-policitidílico
PRRs	<i>Pattern Recognition Receptors</i>
Rela	<i>Transcription factor p65</i>
Socs2	<i>Suppressor of cytokine signaling 2</i>
Socs3	<i>Suppressor of cytokine signaling 3</i>
STAT	<i>Signal transducer and activator of transcription</i>
TAMs	<i>Tumour Associated Macrophages</i>
TCR	<i>T Cell Receptor</i>
TGF β	<i>Transforming growth factor beta</i>
Th	T helper o T colaborador
TLR	<i>Toll-like Receptor</i>
TNF	<i>Tumour Necrosis Factor</i>
TRIF	<i>TIR-domain-containing adapter-inducing interferon-β</i>
TYK2	<i>Tyrosin Kinase 2</i>
VEGF	<i>Vascular Endothelial Growth Factor</i>

CAPÍTULO 1: INTRODUCCIÓN

INTRODUCCIÓN

INMUNOTERAPIA CONTRA EL CÁNCER

Hasta el principio del siglo XXI el cáncer era considerado como una patología meramente basada en la transformación de una célula normal que adquiriría una capacidad descontrolada de proliferar al sufrir mutaciones genéticas. Más recientemente ha quedado claro que existe una compleja interrelación entre éstas células neoplásicas y las células normales del hospedador que regula profundamente la progresión del proceso neoplásico. Dentro de las células normales que logran modular el desarrollo tumoral se encuentran los leucocitos asociados a tumor, siendo considerados los linfocitos T como componentes celulares claves de la inmunidad antitumoral, ya que al activarlos de manera terapéutica estas células pueden controlar de forma sostenida distintos tipos de tumores (P. Sharma & Allison, 2015). Es por esto que se ha acuñado el término de microambiente tumoral para describir más acertadamente a la fisiopatología tumoral global. Este microambiente engloba a las propias células neoplásicas junto a células normales del organismo como son las células estromales, los fibroblastos, las células endoteliales y las células inmunes que infiltran el sitio tumoral.

A diferencia de las terapias antitumorales convencionales como la cirugía, la radioterapia y la quimioterapia, que tienen como objetivo la eliminación de la propia célula tumoral, la inmunoterapia antitumoral incluye un conjunto de terapias que presentan como blanco terapéutico al sistema inmune del hospedador. Más precisamente tienen como objetivo modular la respuesta inmune del paciente haciéndola más eficiente en eliminar las células transformadas. La principal ventaja que tienen este tipo de terapias es que presentan un efecto antitumoral duradero y prolongado al impactar sobre el sistema inmune del paciente, citando como ejemplo un estudio de metaanálisis de pacientes con melanoma avanzado tratados con inmunoterapia, en el que se observó una meseta en la curva de supervivencia alrededor de los 3 años que se ha prolongado a 10 años o más en un porcentaje aproximado del 21% de los pacientes tratados (Schadendorf et al., 2015).

La inmunoterapia contra el cáncer se puede clasificar como activa o pasiva dependiendo del tipo de efecto que tiene sobre el sistema inmune. La inmunoterapia activa se basa en la generación de una respuesta inmune específica “de novo” contra antígenos asociados a tumores (AAT) (Banchereau & Palucka, 2017), también llamados

neopéptidos por ser antígenos nuevos resultantes de mutaciones en las células tumorales; estos neopéptidos son utilizados en vacunas personalizadas donde a partir de una muestra del tumor de cada paciente se obtienen AAT que luego son administrados al paciente para que el mismo genere una respuesta específica (Brennick, Corwin, Srivastava, & Ebrahimi-nik, 2017). Estas llamadas vacunas contra el cáncer tienen mucho potencial y son foco de muchos estudios actuales, pero han demostrado no ser tan eficientes ya que sólo una minoría de los pacientes tratados responden a esta modalidad, dando idea de la compleja relación que existe entre un tumor y la inmunidad antitumoral (Ott et al., 2017; Sahin et al., 2017). La inmunoterapia de tipo pasiva modula una respuesta inmune antitumoral ya montada, e incluye la utilización de anticuerpos monoclonales, la transferencia adoptiva de leucocitos y la administración de citocinas en pacientes. Dentro de este tipo de inmunoterapias se encuentran las basadas en el “bloqueo de moléculas inhibitorias/bloqueo de puntos de control inmune” o “checkpoint blockade” que tienen como mecanismo de acción el bloqueo, a través de anticuerpos monoclonales, de moléculas intrínsecamente inhibitorias presentes en células inmunes capaces de frenar una correcta respuesta inmune antitumoral, volviendo eficientes nuevamente a estas células inmunes para atacar células tumorales (Lesokhin, Callahan, Postow, & Wolchok, 2015). Estas vías inhibitorias presentes en células inmunes forman parte de un mecanismo de respuesta fisiológico para aplacar o controlar una respuesta inmune una vez que se generó. Estos mecanismos se llevan a cabo en la fase de contracción de la respuesta inmune, con el objetivo de evitar complicaciones de tipo autoinmune dadas por células que permanecen en estado activo de manera crónica.

Se ha demostrado que dentro de las células inmunes con alta capacidad antitumoral están las células T o linfocitos T. Más específicamente, la subpoblación de linfocitos T CD8+ puede eliminar células neoplásicas que expresan antígenos tumorales específicos presentados en forma de péptidos tumorales en el contexto de moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) clase I. Para que los linfocitos T puedan reconocer a las células tumorales como extrañas y de esta forma eliminarlas eficientemente, deben ser activadas, siendo éste un proceso que involucra la presentación del antígeno en el contexto del MHC por parte de células presentadoras de antígeno (CPA), como las células dendríticas y los macrófagos, que interactúan con el receptor de la célula T (TCR por sus siglas en inglés). Para una completa y correcta activación del linfocito T no sólo es necesaria esta interacción, sino también la coestimulación que está dada por varias moléculas coestimuladoras. Algunas de las más conocidas y relevantes son las moléculas B7 presentes en las CPAs y la molécula CD28 como contraparte en el linfocito T (Figura 1). Esta activación y posterior control es

un proceso complejo altamente regulado mediante la activación de vías de señalización tanto estimulatorias como inhibitorias.

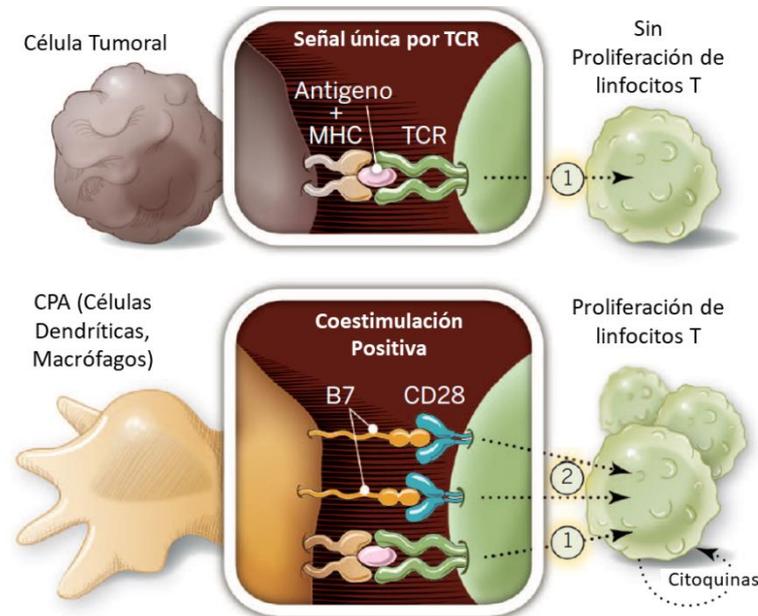


Figura 1. **Activación de linfocitos T.** Para una correcta activación de los linfocitos T se requiere la interacción del receptor de la célula T (TCR) con el antígeno específico presentado en el contexto de la molécula del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) sumado a señales coestimulatorias a través de B7 presentes en las CPAs (vía de señalización estimulatoria) y al estímulo de citocinas. Adaptado de Science Reviews - Sharma & Allison, 2015.

Terapias con bloqueantes de punto de control o “*checkpoint inhibitors*”

Estas terapias presentan como blanco terapéutico vías de señalización de tipo inhibitorias con el objetivo de aumentar la respuesta inmune antitumoral. Utilizando anticuerpos monoclonales se han obtenido resultados clínicos muy importantes y beneficiosos en el tratamiento contra el cáncer. La principal ventaja de estas terapias es que llevan a una respuesta clínica muy duradera a diferencia de otras terapias antitumorales. Por otro lado, la principal desventaja que presentan es que hasta el día de la fecha el porcentaje de pacientes que presentan esta respuesta clínica favorable es bajo, entre un 20-30% de los mismos (Padmanee Sharma, Hu-Lieskovan, Wargo, & Ribas, 2017).

La primera terapia antitumoral de este tipo aprobada por la FDA (*U.S. Food and Drug Administration*) para uso en la clínica fue ipilimumab en 2011. Dicho anticuerpo reconoce la molécula inhibitoria CTLA-4. La expresión de dicha proteína de superficie se induce luego de la activación del linfocito T y, al igual que CD28, puede interaccionar con las moléculas coestimulatorias B7.1 y B7.2 (también denominadas CD80 y CD86 respectivamente) presentes en CPAs pero con mayor afinidad. Y, a diferencia de CD28 que induce activación, CTLA-4 inhibe la activación del linfocito T. Por lo que, una vez

activado el linfocito T comienza a expresar cantidades crecientes de CTLA-4 que al acumularse en membrana bloquea la coestimulación y por ende inhibe una prolongada activación de linfocitos T. Esta vía está más asociada a procesos de activación de linfocitos T vírgenes. El mecanismo de acción de ipilimumab es bloquear esta señal inhibitoria del linfocito T, permitiendo un estado de activación más prolongado que lleva a una mejor respuesta inmune antitumoral. Ipilimumab se ha empleado en pacientes con melanoma, cáncer renal, cáncer de próstata y cáncer de ovario con buenas respuestas clínicas (P. Sharma & Allison, 2015).

Mientras que la interacción CTLA4-B7 ocurre en etapas tempranas de la activación de linfocitos T vírgenes, otro eje inhibitorio que presenta el sistema inmune para mantener bajo control la respuesta ante un estímulo está conformado por PD1 y su ligando PD-L1. La vía PD1-PDL1 cumple un rol de control en estadios posteriores de la respuesta inmune, ejerciendo su función sobre linfocitos T ya activados. PD1 (*Programmed cell death protein 1*) es un receptor presente en la superficie de las células T, B y NK cuya expresión aumenta luego de la activación de estas células como mecanismo fisiológico compensatorio para regular una posible acción descontrolada que pueda llevar a daños autoinmunes (Keir, Butte, Freeman, & Sharpe, 2008). PD1 interacciona con dos ligandos, PD-L1 (*Programmed death-ligand 1*) y PD-L2 (*Programmed death-ligand 2*) siendo PD-L1 el más estudiado en inmunoterapia contra el cáncer. PD-L2 tiene una expresión constitutiva más baja y restringida prácticamente a las CPAs (Latchman et al., 2001; Taube et al., 2015). El ligando PD-L1 es expresado por macrófagos, células dendríticas, y es inducido en linfocitos activados (células T, B y NK), células endoteliales y células no transformadas en un ambiente inflamatorio (Dong et al., 2002). A su vez, PD-L1 puede ser expresado por las propias células neoplásicas y estromales de distintos tipos de tumores como mecanismo de escape o evasión inmune (Topalian, Taube, Anders, & Pardoll, 2016). Cuando PD-L1 interacciona con PD1 expresado sobre linfocitos lleva a una disminución en la proliferación de los mismos, a un menor estado de activación con menor producción de citocinas, a muerte por apoptosis y hasta a alteraciones metabólicas de los mismos (Sharpe & Pauken, 2017). Es por esto que muchos tumores se valen de este eje inhibitorio como mecanismo de escape tumoral. Como ejemplo, en algunos tipos de cáncer como melanoma, cáncer de mama y carcinoma renal se encuentra con frecuencia expresión de PD-L1 en la superficie de las células tumorales además de en células inmunes infiltrantes (Cimino-Mathews et al., 2016; Taube et al., 2015). En otros tumores, tales como el cáncer colorrectal y el carcinoma gástrico, PD-L1 puede ser detectado casi con

exclusividad en las células inmunes que infiltran el tumor, y en muy raras ocasiones se expresa en las propias células tumorales (Llosa et al., 2015; Thompson et al., 2017).

Por la estrecha relación que existe entre ligando y receptor, es que se considera a PD-L1 como un posible biomarcador de selección de pacientes para recibir el tratamiento con anti-PD1 (nivolumab). A partir de esto, en ensayos clínicos de fase I se observó una respuesta positiva del 36% (9 de 25 pacientes) al tratamiento en pacientes con tumores PD-L1 positivos ($\geq 5\%$ de expresión de PD-L1 en células tumorales), mientras que en pacientes con tumores negativos para PD-L1 no se observó respuesta clínica en ninguno de ellos (0 de 17 paciente) (Topalian et al., 2012). De cualquier manera, ensayos clínicos posteriores mostraron que pacientes con tumores PD-L1 negativos tuvieron respuesta clínica a anti-PD1 y anti-PD-L1 tanto en forma de regresión tumoral como de estabilización de la enfermedad (Grosso et al., 2013). Estos y otros trabajos demuestran que es necesario tener en cuenta más de un biomarcador para seleccionar la mejor inmunoterapia personalizada al paciente y así obtener una mejor respuesta clínica.

El hecho de que CTLA-4 y PD1 regulen distintas vías de señalización inhibitorias y no se superpongan sus mecanismos de acción los ha convertido en buenos candidatos para terapias combinadas que pudieran aumentar la eficacia de estas inmunoterapias. En 2015 se demostró un aumento en el tiempo libre de enfermedad y supervivencia de pacientes con melanoma tratados con terapia combinada anti-CTLA4 y anti-PD1 comparado a las monoterapias (Larkin et al., 2015).

En la actualidad existe una gran cantidad de grupos de investigación centrados en conocer con más profundidad los distintos aspectos de la inmunoterapia antitumoral. El objetivo primordial es profundizar en los mecanismos celulares involucrados en las vías inhibitorias para poder aumentar la eficiencia que estas terapias poseen al presente. El principal inconveniente en muchas de las inmunoterapias actuales es que sólo el 20-30% de los pacientes responden favorablemente, y es por ello que se está trabajando arduamente en identificar biomarcadores predictivos para poder seleccionar pacientes que puedan beneficiarse del tratamiento o en descubrir nuevas estrategias terapéuticas que conviertan a pacientes no respondedores en respondedores. Uno de los principales interrogantes a resolver es el motivo por el cual algunos pacientes no se benefician con este tipo de inmunoterapia. Algunas de las posibles causas en investigación son las características del propio repertorio inmunológico del paciente, generado durante la ontogenia T en el timo. Los pacientes no respondedores pueden no contar dentro de su repertorio inmunológico con células T específicas para

neoantígenos tumorales. Otro motivo puede ser que dichas células T específicas existan pero estén inhibidas o controladas por vías independientes de PD1-PDL1 o CTLA4 como por lo ejemplo, la presencia de células Treg, Breg o la existencia de un microambiente tumoral supresor promovido por células Th2, rico en células mieloides (Coussens, Zitvogel, & Palucka, 2013). Por otro lado, puede que realmente existan estas células T específicas, pero no en suficiente cantidad o que no estén infiltrando el sitio del tumor en donde debe llevarse a cabo su acción efectora. Es por ello que para el éxito de la inmunoterapia con “checkpoint inhibitors” es necesario promover la inducción y expansión de clones específicos y facilitar su infiltración en el sitio de tumor.

Es por todo lo anterior que el estudio de la conformación del infiltrado inmunológico en tumores sólidos ha adquirido una relevancia inusitada en los últimos años, ya que se cree que de él depende el éxito de este tipo de inmunoterapia. Además, el infiltrado inmunológico, su calidad, densidad y localización dentro del tumor ha pasado a ser considerado en muchos casos un factor pronóstico más preciso que el utilizado convencionalmente por la UICC-TNM (Galon et al., 2006). El entender cómo se conforma este infiltrado inmunológico, cómo se puede manipular su composición, favoreciendo algunos tipos celulares cruciales en detrimento de otros, ha sido motivo de intensa investigación en los últimos años. Durante el desarrollo de este trabajo de tesis hemos caracterizado exhaustivamente cómo el infiltrado inmunológico puede ser modificado a nivel mieloides y linfoides utilizando la administración de un ligando de TLR3, promoviendo la inducción, expansión e infiltrado de las células T CD8+ citotóxicas específicas para antígenos tumorales y modificando otros actores importantes del microambiente tumoral, como lo es el infiltrado de células mieloides.

CÉLULAS MIELOIDES Y SU ROL EN CÁNCER

Las células mieloides forman parte del sistema inmune innato y pertenecen a un grupo heterogéneo de células inmunes capaces de otorgar protección al hospedador contra infecciones, lesiones y prácticamente cualquier noxa. Son claves en la mantención y regulación de la homeostasis en distintos tejidos (Arandjelovic & Ravichandran, 2015; Lavin, Mortha, Rahman, & Merad, 2015) y son capaces de iniciar, sostener o controlar una respuesta inmune adaptativa actuando como CPA en el caso de células dendríticas y macrófagos (Merad, Sathe, Helft, Miller, & Mortha, 2013; Steinman, 2012).

A grandes rasgos las células mieloides pueden tener tanto un rol antitumoral como protumoral dependiendo de factores como el microambiente de citocinas donde

se encuentren y diversos factores intrínsecos a las distintas subpoblaciones celulares de este grupo heterogéneo de células. Existe evidencia que indica que las células mieloides afectan la progresión del cáncer al interactuar directamente con las células tumorales o indirectamente al modificar el estroma tumoral promoviendo el crecimiento de la masa tumoral (M. L. Broz & Krummel, 2015; Gabrilovich, Ostrand-Rosenberg, & Bronte, 2012). Las células mieloides pueden dividirse en mononucleares y polimorfonucleares dependiendo de la morfología de sus núcleos. Dentro de las mononucleares encontramos a los **macrófagos** como células residentes de prácticamente todos los tejidos, donde llevan a cabo funciones específicas como regulación de la homeostasis y vigilancia inmune. Otra de las células mononucleares son las **células dendríticas** (CDs) que a su vez presentan diversos subtipos. Las células dendríticas convencionales (CDc) son el subtipo predominante y se especializan en captar antígenos, procesarlos y migrar a los ganglios linfáticos drenantes locales para inducir células T específicas o tolerancia (Merad et al., 2013); a su vez las CDc controlan la respuesta de células T en tejidos no linfoides, incluyendo tumores sólidos (Palucka & Banchereau, 2012). Las células dendríticas plasmocitoides (CDp) son otro subtipo que tienen la capacidad de producir grandes cantidades de interferones tipo I pudiendo regular la progresión tumoral (Swiecki & Colonna, 2015). Los macrófagos y las CDs que se acumulan en tumores derivan en su gran mayoría de precursores que circulan por el torrente sanguíneo llamados monocitos y pre-CDs, respectivamente, los cuales a su vez provienen de médula ósea. Las células polimorfonucleares también derivan de médula ósea e incluyen a neutrófilos, eosinófilos, mastocitos y basófilos (Figura 2). Estas células pueden acumularse en sitios inflamados y liberar agentes tóxicos para proteger al huésped de diversas noxas incluyendo infecciones bacterianas y parasitarias (Galli, Borregaard, & Wynn, 2011).

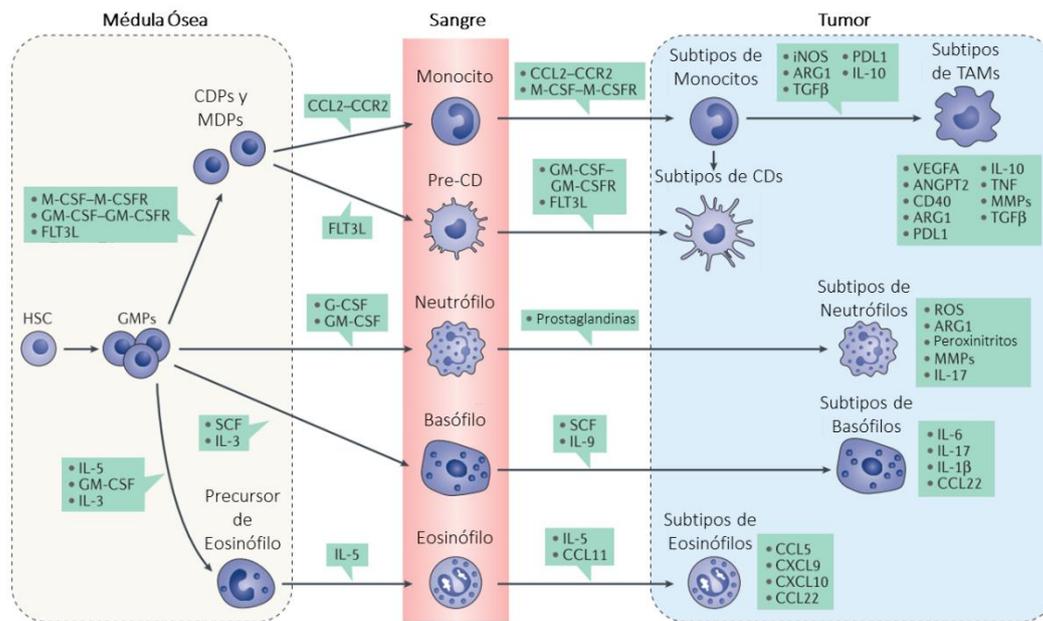


Figura 2. **Hematopoyesis de células mieloides e infiltrado tumoral.** Progresión en el desarrollo de células mieloides desde médula ósea a partir de una célula progenitora hematopoyética (HSC) que da lugar a los progenitores de las distintas poblaciones mieloides (GMPs, CDPs y MDPs) con su posterior salida a circulación sanguínea como células diferenciadas. Reclutamiento de las células circulantes hacia el estroma tumoral con la diferenciación y/o polarización a distintos subtipos de cada población mieloides por parte de los distintos mediadores. Se recalcan las distintas moléculas efectoras a través de las cuales las células mieloides llevan a cabo sus funciones dentro del microambiente tumoral. (IL: interleucina; GM-CSF: factor de crecimiento granulocítico-monocítico; M-CSF: factor de crecimiento de macrófagos; FLT3L: ligando de tirosin quinasa 3 símil-FMS; SCF: Factor de células madre; ROS: Especies reactivas del oxígeno; ARG1: arginasa I; ANGPT2: Angiopietina 2; TGFβ: *Transforming growth factor beta*; iNOS: óxido nítrico sintasa inducible; TAM: Macrófago asociado a tumor; CCL y CXCL: quimiocinas; MMP: metaloproteinasas) ver sección abreviaturas). Adaptado de Nature Reviews - Engblom, Pfirschke, & Pittet, 2016.

El impacto que tienen las células mieloides sobre el desarrollo tumoral se basa en distintas observaciones basadas en marcadores moleculares presentes en muestras de pacientes. En primera instancia se ha evaluado si el infiltrado de células mieloides en tumores humanos podría predecir el desenlace de los pacientes. En análisis inmunohistoquímico de biopsias de distintos tipos de tumores se ha encontrado una correlación entre el contenido de células mieloides en el estroma tumoral y la progresión de la enfermedad. Estos estudios están restringidos por la utilización de marcadores celulares limitados que puede variar mucho de un tipo de tumor a otro como el caso de CD68 y CD163 para macrófagos infiltrantes de tumor (Engblom, Pfirschke, & Pittet, 2016).

Macrófagos asociados a tumor (TAMs)

En la gran mayoría de los casos, esta población suele ser una de las más abundantes dentro del tumor. Teniendo en cuenta que esta población celular es heterogénea, existe un amplio espectro de marcadores celulares y funcionales que van a definir el rol del macrófago en la progresión tumoral. La mayoría de los estudios demuestran una importante asociación entre una alta densidad de estos macrófagos asociados a tumor (TAMs, por sus siglas en inglés) con un peor pronóstico en cáncer de mama, tiroides, cabeza y cuello, hígado, vejiga, riñón, páncreas, ovario, oral, y de pulmón (Ruffell & Coussens, 2015). Estos resultados, le otorgan un rol principalmente protumoral a esta población celular. A estos análisis clínicos se le suman estudios experimentales en animales que demuestran cómo estos TAMs pueden promover el crecimiento tumoral al producir mediadores que modulan el microambiente tumoral. Estos mediadores incluyen factores de crecimiento y citocinas que permiten la supervivencia y proliferación de células tumorales (EGF o factor de crecimiento epidermal e IL-6); sumado a factores que modulan la arquitectura del estroma tumoral favoreciendo la migración, invasión y metástasis como son las metaloproteinasas (MMP) capaces de degradar la matriz extracelular y proteínas angiogénicas como VEGF (*Vascular Endothelial Growth Factor*), inductora de la generación de vasos sanguíneos (Harney et al., 2015; Kessenbrock, Plaks, & Werb, 2010). Los TAMs también pueden promover la evasión tumoral al expresar proteínas de superficie o secretar mediadores solubles inmunomodulatorios que pueden frenar una respuesta inmune antitumoral, como pueden ser arginasa I (ARG1), interleucina 10 (IL-10) o el ligando inhibitorio PD-L1 (Kuang et al., 2009; Murray & Wynn, 2011). Estos resultados en animales de experimentación se han corroborado en algunos estudios clínicos (Ruffell & Coussens, 2015). En contraste, se ha encontrado una alta asociación entre una alta densidad de células CD68+ (como marcador clásico de macrófagos) y un mejor pronóstico en cáncer de colon (Forssell et al., 2007), gástrico (Ohno et al., 2002) y endometrial (Ohno et al., 2004).

Estos resultados pueden ser explicados, en parte, debido al gran espectro de estados de activación de los macrófagos, los cuales presentan distintos mecanismos efectores para llevar a cabo sus funciones. A los macrófagos se los suele categorizar en activados de manera clásica (M1) o activados de manera alternativa (M2) *in vitro*. En ensayos *in vivo* reciben el nombre de macrófagos M1-like o M2-like y presentan funciones de protección diferentes, combatiendo bacterias intracelulares y controlando infecciones parasitarias respectivamente. Estas dos poblaciones están definidas por los estímulos que las indujeron (ligandos de receptores tipo Toll o interferones para M1 e

IL-4, IL-10 o TGF β para macrófagos M2) junto al perfil de citocinas que secretan y a distintos factores de transcripción (expresión de *IL-12*, *iNOS*, *Socs3* para macrófagos M1; y *Rela*, *Socs2*, *Arg1* para macrófagos M2). En los casos de tumores en crecimiento, los TAMs suelen presentar un fenotipo M2-like (Biswas & Mantovani, 2010), los cuales promueven la proliferación de las células tumorales, la invasión, la angiogénesis, e incluso frenan la respuesta antitumoral mediada por células T (Spiller et al., 2014). La compleja biología e identificación de marcadores moleculares de macrófagos asociados a tumor sigue siendo un amplio campo de investigación actual dentro de la inmunología antitumoral innata.

Células Dendríticas

A diferencia de los TAMs, las CDs no suelen ser abundantes en el sitio del tumor, pero son consideradas de gran importancia debido a su eficiente capacidad de presentar antígenos a linfocitos T vírgenes y montar una respuesta inmune adaptativa antitumoral. Una alta densidad de CDs infiltrando tumores, especialmente CDc, podría ser beneficioso. Estas CDc se acumulan en órganos linfáticos terciarios en tumores de pacientes con cáncer de pulmón activando a linfocitos T, demostrando la interacción de CDs y linfocitos T en el sitio del tumor (Dieu-Nosjean et al., 2008). La abundancia relativa de CDs y el grado en el cual los tumores modulan a las mismas puede variar de un tipo de tumor a otro. Existen varios subtipos de CDc que reciben sus nombres a partir de los marcadores moleculares que las definen. A grandes rasgos se las divide en CDc1 y CDc2, ambas caracterizadas por ser CD11c+; MHCII+. A su vez, las CDc1 expresan el marcador CD11b (CDs CD11b+) y a las que se encuentran infiltrando tumores se las denomina como “residentes”. En contraposición a las CDc2 se las denomina como “migratorias” al presentar una alta capacidad de migrar a ganglios drenantes para llevar a cabo la presentación antigénica a linfocitos T. Además, estas CDc2 se caracterizan por expresar el marcador CD103 (CDs CD103+) y tienen la capacidad de presentar antígenos de manera cruzada. La presentación cruzada de antígeno es un proceso celular definido como la capacidad de captar antígenos extracelulares, que en lugar de ser procesados canónicamente por la vía endosomal para presentarse en el contexto del MHC clase II a linfocitos T CD4+ cooperadores, pasan a citosol para ser procesados por la vía endógena y posteriormente ser transportados a la membrana de la célula asociados al MHC clase I para ser presentados a linfocitos T CD8+ citotóxicos (Bevan, 2006). De manera tal que un antígeno soluble, que normalmente es fagocitado por una CD para ser procesado por la vía endosomal y presentado en el contexto del MHC clase II a un linfocito T CD4+, termina siendo presentado en el contexto del MHC clase I a un linfocito T CD8+. Otra característica importante de las CDs CD103+ es que son las

únicas hasta el momento, que demostraron ser capaces de re-estimular linfocitos T citotóxicos específicos de antígenos en el mismo sitio del tumor (Miranda L. Broz et al., 2014).

Neutrófilos, Monocitos y Células Mieloides Supresoras en cáncer

La abundancia de neutrófilos, monocitos y células mieloides supresoras o MDSCs (*Myeloid-Derived Suppressor Cells*, de sus siglas en inglés) infiltrando tumores está asociada a estadios avanzados de cáncer y a una disminución en el tiempo libre de enfermedad en pacientes con diversos tipos de cáncer, entre los que se incluyen adenocarcinoma de pulmón, cáncer de mama y carcinoma colorectal (Gentles et al., 2015; K. H. Parker, Beury, & Ostrand-Rosenberg, 2015). Los monocitos de ratón pueden ser identificados por el marcador Ly6C (*lymphocyte antigen 6 complex, locus C*), siendo las Ly6C^{hi} las que pueden diferenciarse a macrófagos o CDs luego de extravasar al tejido (Pittet, Nahrendorf, & Swirski, 2014). Los neutrófilos murinos expresan el marcador Ly6G (*lymphocyte antigen 6 complex, locus G*) y presentan actividad citotóxica antitumoral en algunos modelos de cáncer (Finisguerra et al., 2015; Granot et al., 2011). Las MDSCs presentan marcadores moleculares idénticos a monocitos y neutrófilos, pero a diferencia de ellos son células con un fenotipo más inmaduro y tienen la capacidad de suprimir la proliferación de linfocitos T. Es por esto que estas células tienen una potente capacidad inmunosupresora modificando el microambiente tumoral permitiendo el crecimiento del tumor (Kumar, Patel, Tcyganov, & Gabrilovich, 2016). Todas estas poblaciones presentan en general una actividad protumoral, favoreciendo la angiogénesis y la metástasis. Aunque, se han descrito algunas situaciones en donde participan del control del crecimiento tumoral, favoreciendo una respuesta inmune al promover mecanismos citotóxicos que eliminen células transformadas. Estas funciones tan contrapuestas parecerían depender del tipo de cáncer, del estadio del mismo y de distintas variables que no están del todo dilucidadas. Es por esto que el estudio de células mieloides y cáncer continúa siendo un campo de estudio importante y vigente.

CÉLULAS LINFOIDES Y SU ROL EN CÁNCER

El compartimiento linfoide que infiltra un tumor sólido está constituido por células asesinas naturales (*natural killer*, NK), células T $\gamma\delta$, células NKT, células T CD4+ (convencionales y regulatorias), células T CD8+ y células B. Durante este trabajo de tesis nos focalizamos principalmente en las células T CD8+ citotóxicas, ya que estas son las principales efectoras en la inmunidad antitumoral.

Células linfoides con capacidad citotóxica en la respuesta inmune antitumoral

Los linfocitos T CD8⁺ presentan como una de sus funciones efectoras la capacidad de inducir apoptosis en células blanco que estén expresando antígenos específicos en el contexto de moléculas del MHC clase I. Una vez reconocida la célula blanco por un linfocito T CD8⁺, el mismo despliega mecanismos efectores para eliminar dicha célula tumoral. Dentro de estos mecanismos se encuentra la liberación de granzimas y perforinas que desestabilizan la integridad de membrana de la célula blanco y la llevan a la lisis y muerte celular por apoptosis (Zhang & Bevan, 2011). Las células T CD8⁺ son consideradas la principal herramienta con la que cuenta el sistema inmune para eliminar a través de la muerte celular programada a las células tumorales que presenten neoantígenos tumorales en el contexto del MHC clase I. Las células T citotóxicas (CTL) se generan a partir de la activación de las células T CD8⁺ naïve o de la reactivación de células T CD8⁺ de memoria. Las células T CD8⁺ naïve se diferencian a células CTL en el ganglio linfático, (en el drenante de tumor en el caso de cáncer) y para ello, deben encontrarse con las CPAs que presenten estos péptidos derivados de tumores, en un contexto de adecuada coestimulación y en presencia de las citocinas apropiadas. Para que se genere una buena respuesta CTL antitumoral es necesario que las células T CD8⁺ reconozca el complejo MHC I-péptido tumoral con alta afinidad, que se generen niveles elevados de enzimas citotóxicas como granzimas y perforinas y que dicha activación promueva la expresión en la superficie celular de moléculas de adhesión y receptores de quimiocinas necesarios para permitir el tráfico desde ganglio al sitio del tumor.

A su llegada al lecho tumoral, las células T CD8⁺ deben confrontar numerosas barreras, incluida la presencia de elevados niveles de expresión de las moléculas reguladoras o inhibitorias intrínsecas, tales como CD28-CTLA-4, PD1-PD-L1 (Pardoll, 2012) y la presencia de otras células que regulan negativamente su función como las células Treg (Tanaka & Sakaguchi, 2017) o las MDSCs antes mencionadas (Marvel & Gabrilovich, 2015). Este microambiente tumoral es muy poco propicio para la célula CTL, ya que las células tumorales expresan bajos niveles del complejo MHC I-péptido en su superficie. La disminución en los niveles del MHC clase I es uno de los mecanismos de evasión que desarrolla el tumor más exhaustivamente descrito, y definir estrategias para eludir estos obstáculos y mejorar la eficacia clínica de la inmunoterapia es objeto de intensa investigación.

Se ha demostrado que un número elevado de linfocitos T CD8⁺ infiltrando tumores suele ser marcador predictivo de buen pronóstico de la enfermedad (Galon et al., 2006; Mahmoud et al., 2011), e incluso se ha propuesto clasificar a los tumores en

función de un “*immunoscore*” que tiene en cuenta el grado de infiltración por células T CD8+ de un tumor, y que en algunos tipos tumorales tiene mayor precisión pronóstica que los clásicos parámetros UICC-TNM.

Las células NK son células de la inmunidad innata con capacidad citotóxica, utilizando también como moléculas efectoras granzimas y perforinas. Se las ha estudiado en cáncer por sus implicancias en los procesos tempranos de eliminación de células tumorales controlando la generación de una masa tumoral (Vivier, 2006). Se ha descrito, tanto en pacientes como en modelos experimentales, que la deficiencia o el mal funcionamiento de células NK está asociado no solo a infecciones virales recurrentes, sino también a una mayor incidencia de varios tipos de cáncer (Orange, 2013).

RECEPTORES DE LA INMUNIDAD INNATA

Las células de la inmunidad innata poseen receptores codificados en línea germinal llamados receptores de reconocimiento de patrones o “*pattern recognition receptors*” (PRRs), los cuales a diferencia de los receptores de la inmunidad adaptativa (TCR para linfocitos T y BCR para linfocitos B) no reconocen antígenos específicos, sino estructuras químicas conservadas entre los distintos tipos de microorganismos que suelen ser esenciales para su supervivencia también llamados patrones moleculares asociados a patógenos o PAMPs (*Pathogen-associated molecular patterns*). La activación de estos receptores gatilla cascadas de señalizaciones esenciales para la iniciación de una respuesta inflamatoria. En CDs, inducen un proceso conocido como “maduración” que implica un aumento en la secreción de citocinas proinflamatorias y en la expresión de moléculas coestimuladoras en su superficie (CD80, CD86 y CD40). De esta manera, las CDs maduras son capaces de presentar antígenos y montar una respuesta inmune adaptativa eficiente (Steinman, 2012).

Receptores tipo Toll

Los receptores tipo Toll o TLR (*Toll-like Receptors*) constituyen un ejemplo de PRRs. Estos receptores son glicoproteínas integrales de membrana con un dominio extracelular, un dominio de transmembrana y un dominio de señalización intracelular. Los mismos, forman parte de la gran familia de receptores de transmembrana del receptor de IL-1 (IL-1R) al presentar una gran homología con su dominio de señalización intracelular (Kawai & Akira, 2010). Sus dominios extracelulares de reconocimiento de ligando contiene regiones repetidas ricas en leucinas (LRR) ancladas a membrana por

un único dominio de transmembrana asociado al dominio intracelular Toll/IL-1R (TIR) (Krishnan, Selvarajoo, Tsuchiya, Lee, & Choi, 2007) (Figura 3).

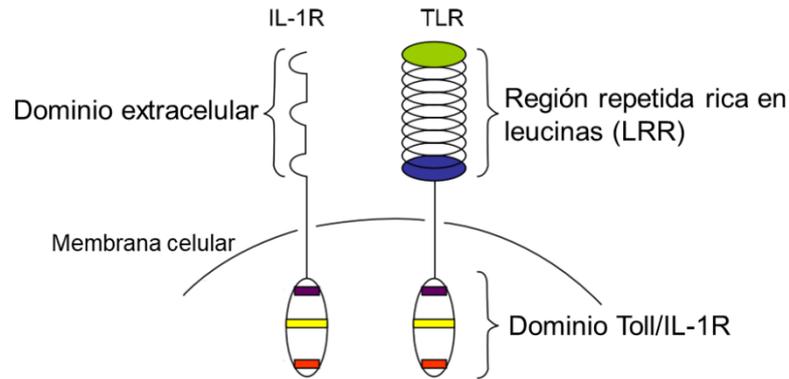


Figura 3. **Estructura del receptor de IL-1 y de los TLRs.** Existe alto grado de homología entre ambos receptores, solo difieren en su dominio extracelular donde los TLRs presentan regiones repetidas ricas en leucinas mientras que el IL-1R presenta dominios símil inmunoglobulinas. Ambas regiones intracelulares contienen iguales dominios TIR confiriéndoles vías de señalización muy similares. Adaptado de Krishnan, Selvarajoo, Tsuchiya, Lee, & Choi, 2007.

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

Receptores tipo Toll intracelulares

Los TLRs intracelulares son capaces de detectar ácidos nucleicos, sin embargo, se vuelve una tarea difícil poder discernir los propios de los foráneos ya que los mismos son una de las estructuras más conservadas a nivel evolutivo. En el caso de algunas infecciones virales se generan ARNs de doble hebra durante sus ciclos de replicación que pueden ser detectado por TLR3 (Xagorari & Chlichlia, 2008). Por otro lado, en ciertas situaciones estos TLRs tienen la potencialidad de detectar ácidos nucleicos propios y desencadenar una respuesta inflamatoria. Una razón por la cual, en condiciones fisiológicas normales, estos receptores no responden a moléculas propias es por su compartimentalización ya que los TLRs intracelulares están presentes en vesículas donde los ácidos nucleicos propios tienen acceso restringido (He et al., 2015). La gran mayoría de la evidencia respecto a la función protectora de estos receptores se

basa en la respuesta inmune frente a infecciones virales, y es por eso que se los postula como importantes mediadores frente a este tipo de infecciones. En los últimos años se han realizado numerosos estudios con el fin de identificar ligandos endógenos capaces de activar a estos receptores con algunos aciertos, pero con mucho trabajo por delante.

TLR7, fue originalmente identificado por el reconocimiento de derivados de imidazoloquina tal como imiquimod (R-837) y resiquimod (R-848). TLR7 reconoce ARN simple cadena (ARNsc) derivados de virus de ARN tal como el virus de la estomatitis vesicular, virus de la influenza A y virus de inmunodeficiencia humana, pero también ARNsc de algunas bacterias como *Streptococo* del grupo B (Pandey, Kawai, & Akira, 2014). TLR7 reconoce además el ARN sintético poliU y determinados ARN interferentes (ARNi). Existe una alta expresión de TLR7 en CDp, lo cual le permite a esta población producir grandes cantidades de interferones tipo I (IFN-I) después de una infección viral.

TLR9 reconoce motivos de ADN CpG (citosina-guanina) no metilados, los cuales se encuentran presentes en bacterias y virus, y raramente en mamíferos. Oligonucleótidos sintéticos de CpG funcionan como ligandos de TLR9 y directamente activan células tales como CDs, macrófagos y linfocitos B, promoviendo una respuesta Th1 (Kaisho, 2012).

TLR3 fue originalmente identificado al reconocer análogos sintéticos de ARN doble cadena (ARNdc), tales como poli I:C (Ácido Poliinosínico-Policitidílico) o más específicamente poli A:U (Ácido Poliadenílico-Poliuridílico), los cuales simulan infecciones virales e inducen una respuesta inmune antiviral mediante la inducción de IFN-I y citocinas proinflamatorias. Además, TLR3 reconoce ARN de distintos virus como el de la influenza A generando IFN-I como molécula efectora (Pothlichet et al., 2013). A grandes rasgos, la activación de TLR3 desencadena una respuesta inmune antiviral a través de la producción de IFN-I y citocinas proinflamatorias, lo que sugiere que TLR3 tiene un rol esencial en combatir infecciones virales. Consistente con esta idea, ratones deficientes en TLR3 son susceptibles a infecciones letales con citomegalovirus murino (Tabeta et al., 2006).

Receptor tipo Toll 3 (TLR3)

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

Estudios cristalográficos demostraron que TLR3 reconoce ARNdc viral de una manera independiente de su secuencia nucleotídica (Yan Wang, Liu, Davies, & Segal, 2010). El dominio de reconocimiento de TLR3 presenta un motivo α hélice compuesto por 23 regiones LRR en tándem, formando una herradura, cuya porción N-terminal se encuentra enriquecida con 15 glicanos y posee también una superficie libre de éstos capaz de interactuar principalmente con las cadenas de azúcares más que con las bases púricas/pirimidínicas de la secuencia de ARNdc (L. Liu et al., 2008; Pirher, Ivičak, Pohar, Benčina, & Jerala, 2008). El correcto plegamiento del receptor y una buena interacción con su ligando requieren de condiciones ligeramente ácidas, tales como los valores de pH encontrados en endosomas tempranos y tardíos (pH alrededor de 6,6 a 5,5 respectivamente) (Qi, Singh, & Kao, 2012). Dichas condiciones favorecen también la dimerización del receptor para formar un complejo estable, lo cual requiere que interactúen ambos sitios de unión con un único oligonucleótido de entre 46 a 50 pares de bases de longitud (Pirher et al., 2008) (Figura 3). Cuando el receptor interactúa con su ligando no ocurren cambios conformacionales en el mismo, la interacción con ARNdc facilita y estabiliza la homodimerización, permitiendo que los dominios intracelulares de los monómeros de TLR3 se aproximen entre sí y se lleve a cabo la transducción de la señal (Yan Wang et al., 2010). Por lo tanto, segmentos cortos de ARNdc, tales como aquellos presentes en ARN de transferencia propios y micro ARN no podrían activar TLR3 debido a que el ARNdc sólo pueden formar complejos estables con TLR3 interactuando con ambos sitios de unión presentes en ambas moléculas del dímero, lo cual requiere una longitud mínima de 45 pares de bases (Chattopadhyay & Sen, 2014).

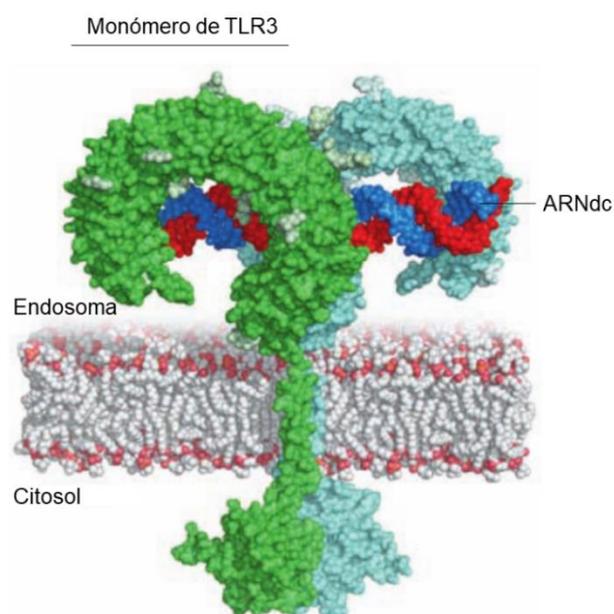


Figura 4. **Estructura de TLR3.** Cada monómero de TLR3 presenta un dominio de reconocimiento de ligando hacia la luz del endosoma, un dominio de transmembrana anclando el receptor a la vesícula y un dominio citosólico. Al interactuar con un ARNdc se ensamblan homodímeros de TLR3 que permiten el acercamiento de sus dominios citosólicos con la subsiguiente transducción de la señal. Adaptado de Liu et al., 2008

TLR3 está expresado principalmente en CPA del compartimiento mielóide como son CD8 y macrófagos (Muzio et al., 2000), pero se ha detectado expresión en un amplio espectro de células inmunes como monocitos, células NK (Schmidt et al., 2004) y linfocitos T CD4+ y CD8+ (Gelman, Zhang, Choi, & Turka, 2004; Salem et al., 2009) lo que lleva a efectos inmunoestimulatorios. Lamentablemente, la carencia de anticuerpos capaces de detectar confiablemente TLR3 a nivel de proteína ha focalizado el estudio de este receptor a nivel de ARNm.

El análisis de expresión de ARNm para TLR3 en distintas subpoblaciones de CD8 humanas demostró que este transcrito se expresa selectivamente en CD8 de linaje mielóide, incluyendo CD8 derivadas de monocitos humanos y CD8 BDCA1+ de sangre periférica, pero no en CD8p (Cristina Gauzzi, Del Cornò, & Gessani, 2010). En ratón, TLR3 se expresa fundamentalmente en subpoblaciones de CD8 convencionales (CD8c) CD8 α + y CD8 migratorias CD103+ pero no en CD8p (Kaisho, 2012). Tanto las CD8c CD8 α + como CD103+ están altamente especializadas en producir IFN- β vía TLR3 y realizar eficientemente la presentación cruzada de antígenos (Jelinek et al., 2011; Széles et al., 2015). En modelos de cáncer se ha reportado, tanto en modelos murinos como en 12 tipos diferentes de tumores humanos, que la función de las CD8 CD103+ es crucial para desarrollar una efectiva respuesta citotóxica antitumoral y asimismo su presencia en tumor se correlacionó con un considerable aumento en la supervivencia de los pacientes (Miranda L. Broz et al., 2014).

Los macrófagos también expresan niveles detectables de TLR3. En un modelo de carcinoma de pulmón de Lewis, los ratones tratados con el ligando sintético poli I:C tuvieron regresión tumoral mediada por la conversión de los macrófagos M2-like (F4/80+;CD206+;Gr1-) a macrófagos antitumorales M1-like, induciendo grandes cantidades de citocinas proinflamatorias como TNF, promoviendo la necrosis hemorrágica del tumor y la consecuente supresión del crecimiento (Shime et al., 2012).

A sí mismo, se ha reportado expresión de TLR3 en células del linaje linfóide. En ratón, se ha descrito que luego de la estimulación del TCR, linfocitos T CD4+ disminuyen la expresión de TLR2 y TLR4 mientras que aumentan la expresión de TLR3 y TLR9. Además, la estimulación de TLR3 en linfocitos T CD4+ es capaz de inducir NF- κ B y MAPK, promoviendo su supervivencia, mejorando la producción de IFN- γ y quimiocinas tras su activación vía TCR (Reynolds & Dong, 2013). A su vez, se ha descrito que linfocito T CD8+ efectores, pero no los vírgenes o de memoria central, expresan constitutivamente TLR3 y que luego de la estimulación dependiente e

independiente del TCR, aumenta directamente la producción de IFN- γ sin afectar su proliferación o actividad citotóxica (Tabiasco et al., 2006).

La expresión de TLR3 no está restringida a células inmunes, otros tipos celulares tales como fibroblastos, células endoteliales y epiteliales, incluyendo las células transformadas derivadas de éstas, también pueden expresar diferentes niveles de TLR3. Se ha reportado que la activación de TLR3 en células de cáncer de próstata PC3 aumenta la expresión de la isoforma I.3 del factor de transcripción HIF-1 α (*hypoxia-inducible factor 1*), promoviendo su acumulación nuclear en condiciones de normoxia, y consecuente secreción de la citocina proangiogénica VEGF (Paone et al., 2010). En otro estudio, se ha reportado que pacientes con carcinoma hepatocelular cuyo tumor expresa altos niveles de TLR3 tienen una media de supervivencia 17 veces mayor que los pacientes que presentan bajos niveles de expresión TLR3 intratumoral, sin dilucidarse la razón de este fenómeno (Chew & Abastado, 2013). Dicha expresión de TLR3 también se correlaciona positivamente con la producción de citocinas y con una mayor densidad de linfocito T y células NK intratumorales (Chew & Abastado, 2013).

En un análisis retrospectivo de un ensayo llevado a cabo entre 1982 y 1986 en 517 pacientes con cáncer de mama se demostró que las pacientes cuyo tumor expresaban TLR3, manifestaban una disminución a la mitad del riesgo de recidiva metastásica en el tratamiento combinado de radiación local y poli (A:U) como adyuvante, en comparación con los pacientes tratados con quimioterapia únicamente (Salaun et al., 2011). Este análisis retrospectivo es interesante ya que se realizó sobre resultados de un ensayo clínico previo, en donde se administró poli A:U de forma empírica como tratamiento adyuvante, en una época en donde se desconocía la existencia de TLR3 y por lo tanto, su mecanismo de acción.

La unión del ARNdc a la región LRR de TLR3 inducen el acercamiento de los dominios TIR citoplasmáticos que gatillan una cascada de señalización. Se recluta la molécula adaptadora TRIF (*TIR-domain-containing adapter-inducing interferon- β*) que activa dos vías de señalización: una va a activar al factor de transcripción maestro NF- κ B que inducirá la transcripción de genes de citocinas proinflamatorias y quimiocinas (IL-6, IL-12, TNF), mientras que la otra vía inducirá la transcripción del gen del IFN- β a través de la molécula adaptadora IRF3 (Kawai & Akira, 2010) (Figura 5).

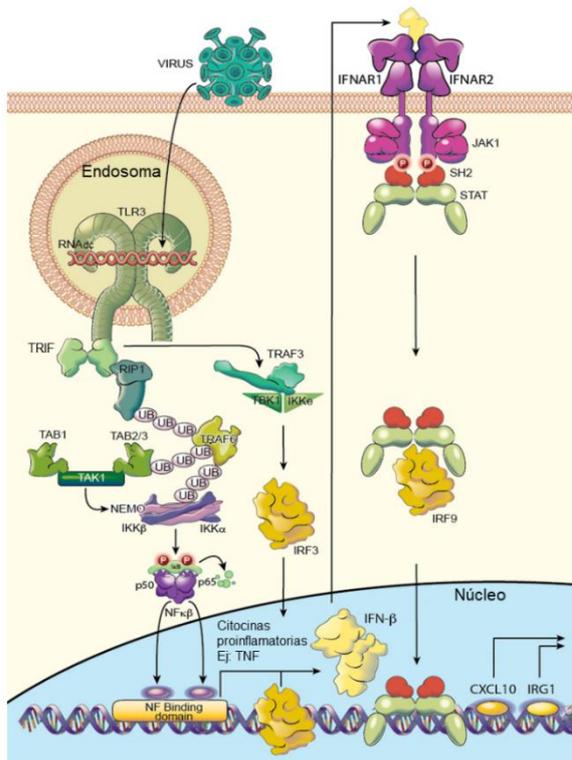


Figura 5. **Vías de señalización de TLR3.** Al reconocer ARNdc, TLR3 gatilla una cascada de señalización intracelular reclutando a la molécula adaptadora TRIF. Por un lado, induce citocinas proinflamatorias y quimiocinas por la vía de NF-κB. Por otro lado, induce producción de IFN-β por la vía de IRF3. Adaptado de Mutagenetix, UT Southwestern Medical Center (<https://mutagenetix.utsouthwestern.edu>).

Es por todo lo anterior que podemos decir que TLR3 puede ser utilizado para generar terapias como para prevenir distintas enfermedades, con la necesidad actual de encontrar maneras de modularlo para influenciar los mecanismos efectores de las células que lo expresan, y así impactar positivamente sobre distintas patologías.

INTERFERONES TIPO I

La familia de los IFN-I incluye un gen para IFNβ y 13 o 14 genes para IFNα, en humanos y ratón respectivamente. Es importante diferenciarlos de los interferones tipo II y de los menos conocidos interferones tipo III. La familia de los interferones tipo II, incluye únicamente al IFNγ que es producido principalmente por células T en el contexto de una respuesta inmune adaptativa. Los IFN-I fueron descritos por primera vez en la década de los '50 como agentes antivirales, al volver resistentes a infecciones a células cultivadas con los mismos (Chen, Liu, & Cao, 2017).

La gran mayoría de los tipos celulares tienen la potencialidad de producir IFN-I en respuesta a la activación de receptores de la inmunidad innata (PRRs), principalmente ante el reconocimiento de ácidos nucleicos virales, esta es una gran diferencia con el IFNγ, producido principalmente por células T durante el curso de una respuesta inmune adaptativa. Dentro de estos PRRs capaces de inducir IFN-I se encuentran los TLRs (TLR4, TLR3, TLR7, TLR9), los RLRs (RIG-I, MDA5) y sensores

de ADN citosólicos (cGAS); sus vías de señalización son distintas, pero todos convergen en la producción de citocinas proinflamatorias (IL-6, IL-12, TNF) e IFN-I (IFN α , IFN β).

Dentro de las células de la inmunidad innata, una subpoblación de CD, las CDp tienen como rol principal la producción de grandes cantidades de IFN α en respuesta principalmente a infecciones virales, debido a sus altos niveles de expresión del factor de transcripción IRF7 y a la expresión constitutiva de muchos de los PRRs involucrados en la inducción de una respuesta de IFN-I.

Una vez secretados, los IFN-I son reconocidos por el receptor heterodimérico IFNAR constituido por la subunidad IFNAR1 e IFNAR2 presente en una gran variedad de tipos celulares, desde células inmunes a células estromales y las propias células tumorales. Al interactuar con IFN-I, se fosforila el propio receptor y las quinasas asociadas al mismo JAK1 (*Janus Kinase 1*) y TYK2 (*Tyrosin Kinase 2*) que llevan a la fosforilación de proteínas STAT induciendo su dimerización y posterior translocación al núcleo e inducen la transcripción de un conjunto de genes denominados genes regulados por IFN (*IRGs, IFN-regulated genes*). Se han identificado miles de potenciales IRGs a lo largo de los años que han sido recolectados en una base de datos denominada Interferoma, donde se demuestra que sólo un conjunto de estos genes se activan dependiendo del contexto y del tipo celular reconociendo IFN-I (Samarajiwa, Forster, Auchettl, & Hertzog, 2009). El complejo STAT de señalización prototípico para IFN-I es el factor de genes regulados por IFN 3 (ISGF3, *IFN-stimulated gene factor 3*) compuesto por STAT1, STAT2 e IRF9. Este ISGF3 induce la transcripción de la mayoría de los genes de respuesta a IFN-I, que llevan a la síntesis de proteínas efectoras responsables de los efectos antivirales, antitumorales e inmunorregulatorios de los IFN-I (B. S. Parker, Rautela, & Hertzog, 2016) (Figura 6).

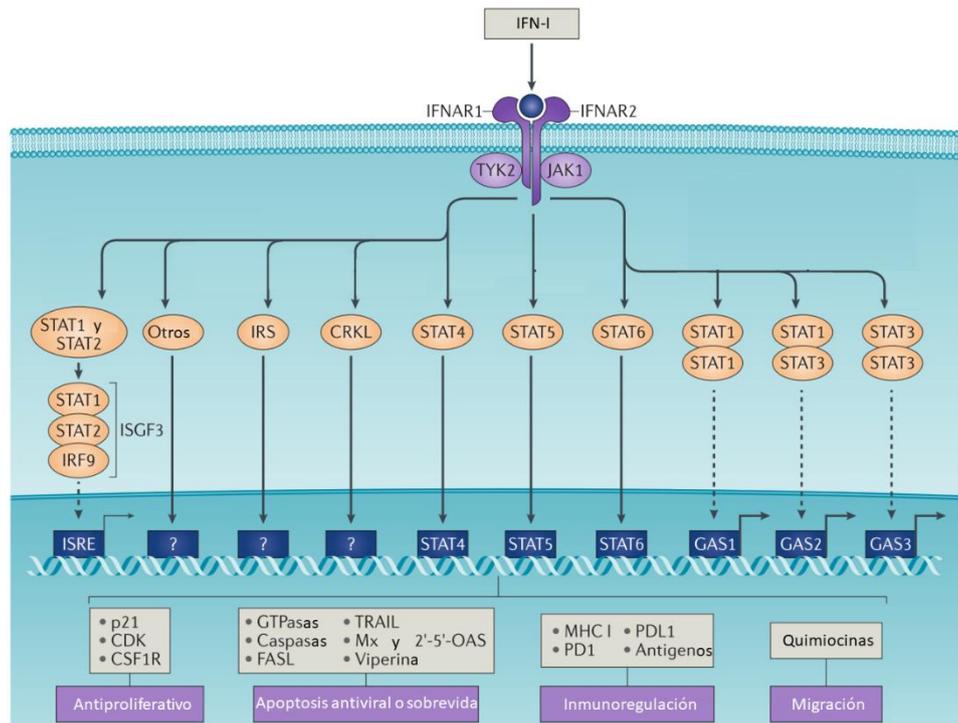


Figura 6. **Vías de señalización de IFN-I con sus efectos antitumorales.** La interacción de IFN-I con el heterodímero IFNAR1/2 activa TYK2 y JAK1, las cuales desencadenan distintas vías de señalización siendo la de ISGF3 la principal. Al translocar al núcleo se induce todo un programa antiviral, antitumoral e inmunorregulatorio. Adaptado de B. S. Parker, Rautela, & Hertzog, 2016.

Efecto de los IFN-I endógenos y los inducidos farmacológicamente en el microambiente tumoral

La infección no es el único estímulo para la producción de los IFN-I. En los últimos años, varios trabajos han desenmascarado el papel crucial que el IFN- β , producido de forma constitutiva o generado en respuesta a estímulos endógenos, tiene en la respuesta inmune contra el cáncer. Por un lado, se ha demostrado que niveles constitutivos de IFN- β , producidos a niveles fisiológicos, tienen un papel fundamental en la inmunovigilancia y en el control del desarrollo tumoral (Fuentes et al., 2011). Esto se manifiesta claramente en ratones deficientes en la subunidad 1 del receptor IFNAR, incapaces de responder a IFN-I. Estos ratones IFNAR1^{-/-} demuestran una mayor susceptibilidad a desarrollar tumores y sus macrófagos liberan mayor cantidad de factores proangiogénicos (U'Ren, Guth, Kamstock, & Dow, 2010). Utilizando estos ratones como modelo, se determinó que los IFN-I inhiben el reclutamiento de neutrófilos al sitio del tumor, reducen la secreción de metaloproteinasas y VEGF. Además, el IFN- β neutraliza el efecto proangiogénico de los neutrófilos y otras células mieloides (Wu et al., 2015).

En modelos murinos, el IFN- β es producido por células CD11c+ muy temprano después de la implantación del tumor y esta primera ola de IFN- β es crucial para el “priming” de los linfocitos T CD8+ específicos contra antígenos tumorales (Diamond et al., 2011; Fuertes et al., 2011). Estos datos sugieren que las CDs detectan señales o patrones moleculares asociados a daño DAMPs (*Damage-associated molecular patterns*) derivados del tumor lo cual genera la inducción de IFN-I, cruciales para la presentación cruzada de antígenos a los linfocitos T CD8+. Recientemente, se ha demostrado que las antraciclinas estimulan la producción de IFN-I por parte de las propias células tumorales y esa producción es dependiente del receptor endosomal TLR3 (Sistigu et al., 2014). Se hipotetiza que TLR3 estaría reconociendo ARNs endógenos, liberados por las células tumorales en proceso de muerte, que culminaría en la producción de IFN-I y la quimiocina asociada CXCL10, causando cambios en la respuesta inmune antitumoral.

Se ha observado que los IFN-I endógenos pueden modular la respuesta inmune antitumoral afectando la función de varias de las poblaciones de células inmunes (Dunn et al., 2005). Las CDp productoras de altos niveles de IFN-I impactan sobre las células NK promoviendo su reclutamiento y activación para un mejor control del crecimiento tumoral en un modelo murino (C. Liu et al., 2008). Los IFN-I también activan CDc CD8 α + mejorando el proceso de presentación cruzada de antígeno promoviendo una respuesta de linfocitos T CD8+ antitumorales más eficiente (Fuertes et al., 2011). Por otro lado, en infecciones virales se ha demostrado un efecto directo de los IFN-I sobre las células T regulatorias (Treg), inhibiendo la activación y proliferación de las mismas lo que lleva a una mejor respuesta de linfocitos T efectores (Srivastava, Koch, Pepper, & Campbell, 2014). También se ha reportado que los IFN-I reducen la acumulación y la función supresora de MDSCs que tienen la capacidad de suprimir la actividad citotóxica de linfocitos T CD8+ (Zoglmeier et al., 2011).

Por otro lado, los IFN-I regulan genes que pueden afectar la proliferación, diferenciación, supervivencia y migración de las propias células transformadas. En una línea celular humana de cáncer de mama tratada con IFN-I recombinantes se observó un efecto antiproliferativo directo atribuido al alargamiento de todas las fases del ciclo celular (Balkwill, Watling, & Taylor-Papadimitriou, 1978). De manera similar, el tratamiento de una línea celular de cáncer de próstata con IFN α induce un aumento en inhibidores de quinasas dependientes de ciclinas (Cdks) como p21 que median el efecto antiproliferativo de IFN α (Hobeika, Subramaniam, & Johnson, 1997). La estimulación de líneas humanas de cáncer de mama con pIC como agonista de TLR3 induce IFN-I que llevan a la apoptosis de dichas células al aumentar la expresión de TRAIL (*tumor*

necrosis factor (TNF)-related apoptosis-inducing ligand) (Bernardo, Cosgaya, Aranda, & Jiménez-Lara, 2013).

Sin embargo, se ha observado que células tumorales pueden adquirir resistencia a los efectos de los IFN-I. Este fenómeno se da al afectarse la señalización de los mismos a distintos niveles, como en una disminución en la expresión del receptor IFNAR o en la pérdida de moléculas involucradas en las vías de señalización como STAT1 (B. S. Parker et al., 2016).

Los IFN-I han sido utilizados en terapias antitumorales con un éxito variable debido a la gran cantidad de efectos adversos, durante más de 30 años (B. X. Wang, Rahbar, & Fish, 2011). Es por eso, que la utilización de ligandos sintéticos capaces de inducir la producción de IFN-I de una manera más controlada ha tenido mejores resultados al poder modificar dosis y esquemas de administración con el objetivo de obtener una mejor respuesta terapéutica.

LIGANDOS DE TLR3 EN INMUNOTERAPIA

Se ha observado que los ARNdc de distintas fuentes, tanto de origen viral como los de origen sintético, son algunos de los principales compuestos reportados para inducir IFN-I como molécula efectora. No obstante, el uso de ARNdc en el tratamiento contra el cáncer ha tenido resultados variados (Gosu, Basith, Kwon, & Choi, 2012). Muchos estudios demuestran que la inducción de grandes cantidades de IFN-I por algunos ARNdc están asociados a efectos tóxicos en pacientes (Zitvogel, Galluzzi, Kepp, Smyth, & Kroemer, 2015).

El principal inconveniente que presentan los ARNdc cuando son utilizados en terapias es la corta vida media que presentan, ya que son fácilmente degradados por parte de distintas nucleasas presentes en el organismo. Es por esto, que lograr una buena biodisponibilidad de los mismos en pacientes se ha vuelto el foco de distintos trabajos (He et al., 2015; Kranz et al., 2016; Sahin et al., 2017). Con el objetivo de disminuir la toxicidad y alargar la vida media de ligandos de TLR3, se ha desarrollado para la clínica el Ampligen® (Hemispherx Biopharma) e Hiltonol® (Oncovir Inc), ambos derivados menos potentes del poli I:C (Aranda et al., 2014).

Ampligen® (también conocido como rintatolimod® o poli I:C12U), es una cadena sintética de ARNdc de ácido poliriboinosínico-poliribocitidílico, en donde algunas bases citosina en la secuencia poliI-poliC son reemplazadas por uracilo (generando zonas de mismatched), que lo hacen menos susceptible al ataque de nucleasas. *In vitro*,

Ampligen® no sólo activa CDs (ya sean provenientes de un paciente sano o con cáncer) para promover respuesta Th1, sino que también tiene un efecto directo citostático/citotóxico contra un gran espectro de células tumorales (Navabi et al., 2009). Ampligen® es bien tolerado, incluso durante largos periodos de administración (mayores a un año). Ha sido probado en distintos ensayos clínicos, en combinación con una vacuna peptídica en pacientes con cáncer de mama HER2 positivos (NCT01355393), con lisados de células tumorales autólogas en pacientes afectados por neoplasias del tracto reproductivo (NCT01312389), o con Celecoxib®, IFN- α e Hiltonol® en pacientes con cáncer colorectal (NCT01545141) (Gosu et al., 2012). Al día de la fecha, se utilizará en un ensayo clínico I/II en fase de reclutamiento para distintos tipos de tumores de alcance peritoneal en forma combinada con interferón alfa y celecoxib (NCT02151448) (www.clinicaltrials.gov).

Hiltonol®, también conocido como poli IC:LC, es una formulación particular de poli I:C que incluye carboximetilcelulosa y poli-L-lisina como agentes estabilizantes (Aranda et al., 2014). Numerosos ensayos clínicos fase I/II probaron la seguridad y eficacia de Hiltonol® (a menudo en protocolos de vacunación como único agente o combinado a otros) en múltiples y variadas indicaciones oncológicas: incluyendo enfermedades hematológicas malignas, tumores cerebrales, melanoma, carcinoma de ovario, cáncer renal y otras neoplasias avanzadas. Hoy en día hay 26 ensayos clínicos fase I/II utilizando Hiltonol® en estado de reclutamiento de pacientes (www.clinicaltrials.gov).

El ligando poli I:C (pIC), en el cual están basados estos tratamientos, puede ser reconocido por otros receptores además de TLR3. Se ha descrito que pIC puede ser reconocido por los receptores inmunes innatos RIG-I y MDA5 (Nielsen, Hantho, & Mancini, 2017). Ambos pertenecen a la familia de receptores tipo RIG (RLRs, *RIG-like Receptors*) de localización citoplasmática capaces de inducir producción de IFN-I al reconocer ARNdc. A pesar de que las vías de señalización son distintas a las de TLR3, ambos confluyen en la activación de los mismos factores de transcripción maestros como son IRF3 e IRF7, para la inducción de IFN-I y NF- κ B para la inducción de citocinas proinflamatorias y quimiocinas (Dixit & Kagan, 2013).

Hasta el momento, el ligando sintético más específico para TLR3 es poli A:U (pAU), con una menor capacidad de inducir IFN-I que pIC, lo que conllevaría a un menor número de efectos tóxicos asociados a los mismos (Perrot et al., 2010). El primer ensayo clínico de poli A:U en cáncer de mama se realizó a principio de los '80 e incorporó 300 pacientes con tumores de mama resecables tratados con quimioterapia convencional

sola o en combinación con poli A:U. No solo la toxicidad por adicionar poli A:U fue baja, sino que también se observó un incremento significativo en la supervivencia global del grupo recibiendo la terapia combinada (Petit, Sarrazin, & Lacour, 1980). Se llevó a cabo otro ensayo clínico multicéntrico donde se incluyeron a más de 500 pacientes con tumores de mama recibiendo quimioterapia (270 pacientes) o poli A:U con radioterapia locoregional (257 pacientes) combinada con quimioterapia (Laplanche et al., 2000). Nuevamente, el tratamiento fue bien tolerado y pacientes recibiendo poli A:U presentaron mayores tiempos libre de enfermedad con una reducida incidencia de metástasis. Hay que notar que la propia radioterapia puede haber impactado de por sí en los resultados alentadores observados. De cualquier manera, la gran cantidad de pacientes que formaron parte de estos ensayos le otorga robustez a los resultados positivos obtenidos con un ligando de TLR3. En ese momento, poco se conocía sobre la importancia de modular el microambiente tumoral, recién se estaban descubriendo los TLRs y los mecanismos inmunológicos gatillados por poli A:U no fueron analizados exhaustivamente.

Un análogo sintético de ARNdc viral de alto peso molecular enriquecido en secuencias poli A-poli U, conocido comercialmente como IPH-3102® (Innate Pharma) fue patentado por Aubin y colaboradores en 2009 (Aubin et al., 2009; Basith, Manavalan, Yoo, Kim, & Choi, 2012). IPH-3102® demostró ser capaz de promover la activación y de sostener la respuesta de IFN- I *in vitro*. Hasta el momento, IPH-3102® aún no ha sido incluido en ensayos clínicos (www.clinicaltrials.gov). Poli A:U es comercializado por distintas firmas como sal de sodio (Innate Pharma, Invivogen), siendo ésta la utilizada en este trabajo de tesis, pero entendemos que no existe en la actualidad ninguna empresa que lo esté desarrollando en grado clínico. Por lo cual, explorar su potencialidad como un fuerte inmunomodulador del microambiente tumoral constituye una alternativa atractiva frente a los otros ARNdc presentes en el mercado.

INTRODUCCIÓN AL MODELO EXPERIMENTAL

Los ligandos de TLR3 han sido utilizados empíricamente en distintos ensayos preclínicos y clínicos de inmunoterapia por varias décadas. Como ya se ha mencionado, se han llevado a cabo dos importantes ensayos clínicos utilizando poli A:U como ligando de TLR3 en pacientes con cáncer de mama con resultados alentadores, donde se ha demostrado una mejoría en la respuesta al tratamiento con una prolongada supervivencia comparado a otros tratamientos basados en el uso de IFN-I (Figura 7). A su vez, a diferencia del tratamiento con IFN-I, con poli A:U se ha reportado muy baja

toxicidad (Ducret et al., 1985). Además, poli A:U puede estimular no sólo la producción de IFN-I vía IRF3, sino también la de citocinas proinflamatorias vía NF-κB.

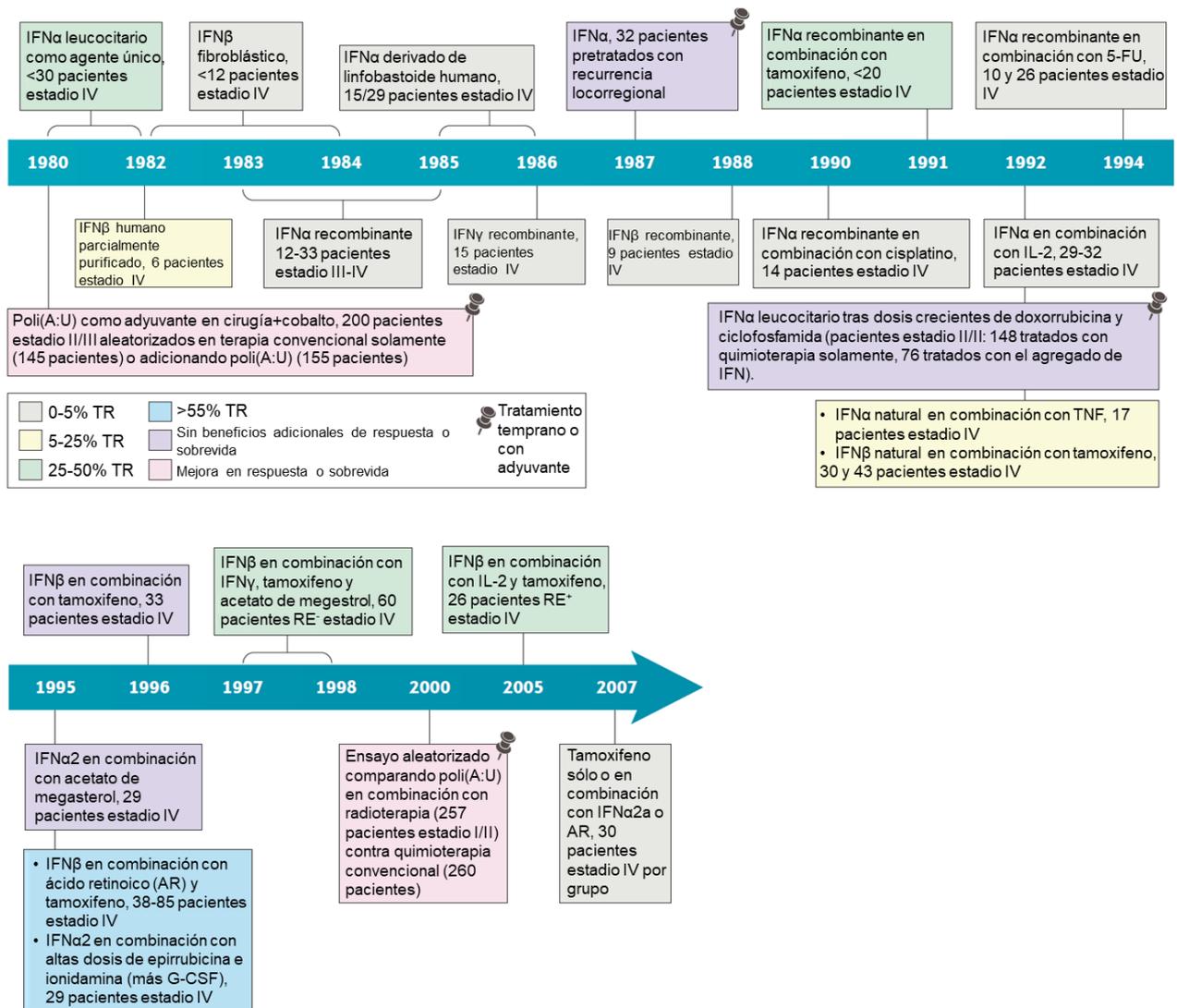


Figura 7. Línea del tiempo mostrando resultados reportados de uso de interferones en terapia contra cáncer de mama. Utilización de terapias basadas en interferones en ensayos clínicos a lo largo de los años en pacientes con cáncer de mama con los detalles de cada tratamiento. TR, tasa de respuesta. RE, receptor de estrógenos. AR, ácido retinoico. Adaptado de B. S. Parker, Rautela, & Hertzog, 2016.

Resultados previos de nuestro grupo demostraron que las células tumorales pueden expresar TLRs funcionales, más precisamente TLR4 y TLR3. La estimulación *in vitro* de líneas tumorales murinas con LPS (lipopolisacarido) o poli A:U por 48h (ligandos de TLR4 y TLR3 respectivamente), y su posterior inoculación en cepas de ratones singénicas, genera tumores con un crecimiento tumoral *in vivo* retardado en ratones WT, TLR4^{-/-} y TLR3^{-/-}, pero no en ratones IFNAR1^{-/-} (Gatti et al., 2013; Núñez et al., 2012). Este tratamiento *in vitro* de las células tumorales con ligandos de TLR4 y TLR3 no induce

la muerte ni disminuye la capacidad proliferativa de las mismas; es más, estas mismas líneas celulares estimuladas son capaces de inducir tumores de igual velocidad de crecimiento que las no tratadas cuando se las inoculan en ratones atímicos nude (carentes de linfocitos T), indicando que la disminución del crecimiento tumoral observado en ratones WT es dependiente del compartimiento de células T y no de un efecto directo de los ligandos de TLR4/TLR3 sobre la muerte o proliferación de las células tumorales. En la figura 8A se muestra un experimento representativo, donde la estimulación con poli A:U, acompañado a polietilenimina (PEI, un compuesto policatiónico que favorece la internalización de poli A:U a células sin alta capacidad fagocítica) de células tumorales B16 y su posterior inoculación en ratones WT y TLR3^{-/-} produce una inhibición del crecimiento tumoral.

Trabajos previos de grupo fueron dilucidando este efecto y así se demostró que LPS y poli A:U son adyuvantes efectivos capaces de actuar directamente sobre TLRs funcionales presentes en la propia célula tumoral. En efecto, las líneas tumorales estimuladas con ligandos de TLR3 y TLR4 indujeron tumores que crecían más lentamente en ratones WT o incluso en animales deficientes en TLR4 o TLR3, indicando que el efecto no se debía a una estimulación *in vivo* de células inmunes por remanentes o contaminantes de la estimulación *in vitro*. Este tratamiento indujo la producción de IFN-I por parte de las células tumorales, el cual, al disparar la señalización vía el receptor IFNAR presente en células del huésped, promovía una respuesta inmune antitumoral. Esto quedó demostrado al perderse el efecto en ratones deficientes en el receptor IFNAR.

El esquema experimental anterior tenía como objetivo demostrar la presencia y funcionalidad de TLR4 y TLR3 en células tumorales y su potencialidad de ser manipulados *in vivo* de manera de contribuir con la respuesta inmune antitumoral, a través de la secreción de IFN-I. En función de estos resultados, se trató de dilucidar cuál era la contribución efectiva de los TLRs presentes sobre la célula tumoral en un contexto de administración terapéutica de estos ligandos. Para ello, en lugar de inducir los tumores con líneas celulares tratadas o no con poli A:U, se trataron ratones WT o TLR3^{-/-} con tumores ya establecidos. Dicho tratamiento se realizó con poli A:U/PEI en ratones TLR3^{-/-}, portadores de tumores B16, es decir en un contexto en donde poli A:U sólo puede ser reconocido por el TLR3 presente en las células tumorales. Lo que se observó fue que en esas condiciones hubo un moderado y transitorio control del crecimiento tumoral (Gatti et al., 2013) (Figura 8B), poniendo en evidencia que, en un contexto terapéutico, la activación de TLR3 presente en las células del huésped están implicadas y juegan un rol crucial en la inhibición del crecimiento tumoral, posiblemente

contribuyendo con la producción endógena de IFN-I. Resultados similares fueron obtenidos utilizando ligandos de TLR4 (LPS y monofosforil lípido A).

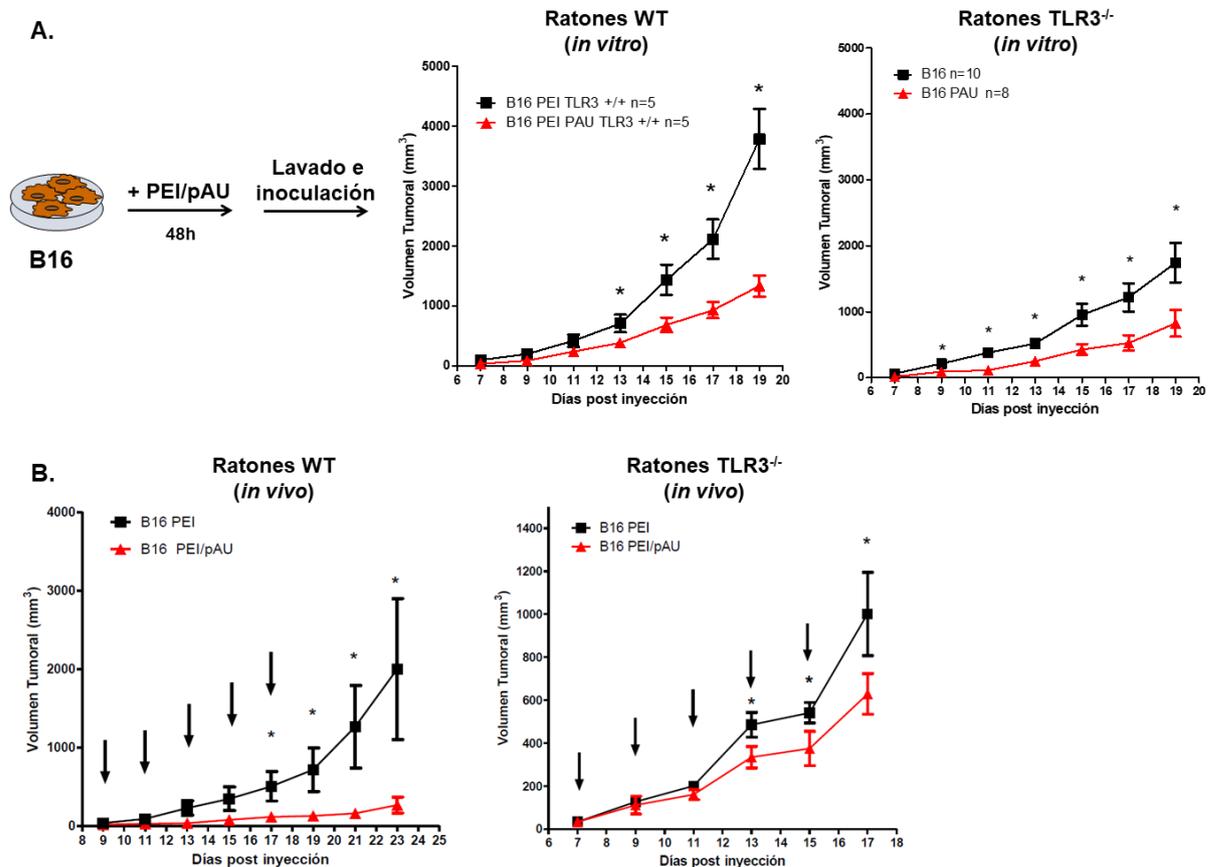


Figura 8. La estimulación de TLR3 presente en la célula tumoral produce una inhibición del crecimiento tumoral. **A.** Esquema experimental de estimulación *in vitro* con poli A:U/PEI. Células B16 fueron incubadas con PEI (B16) o estimuladas con 1 µg/ml de poli A:Uacomplejado a PEI (B16 pAU) y posteriormente fueron inyectadas s.c. en ratones C57BL/6 WT y en ratones TLR3^{-/-}. **B.** Tratamiento *in vivo*. PEI o PEI/pAU fue inyectado en el sitio del tumor 5 veces cada 2 días (flechas) en ratones C57BL/6 WT y TLR3^{-/-} portadores de tumores B16. Los resultados son representativos de dos experimentos independientes (media ± SEM) *p<0,05. Imagen extraída de la tesis doctoral de Nicolás G. Núñez (Gatti et al., 2013).

Con el objetivo de estudiar el impacto de poli A:U no sólo sobre las células tumorales sino sobre las células del huésped, nuestro grupo implementó un esquema de administración peritumoral de poli A:U desnudo *in vivo* tratando tumores ya establecidos. Se observó que en este esquema terapéutico poli A:U retarda el crecimiento tumoral y aumenta la supervivencia de los ratones tratados en modelos tumorales murinos. La eficacia terapéutica estuvo dada por un aumento en el número de leucocitos infiltrantes de tumor con un aumento de linfocitos T CD8+ citotóxicos. Dicho efecto terapéutico se perdía en ratones IFNAR^{-/-}, demostrando que el mecanismo

antitumoral principal ejercido por poli A:U es a través de los IFN-I que induce y posterior acción sobre células inmunes del huésped. (Nocera et al., 2016).

A su vez, se visualizó la producción de IFN β intratumoral inducido por poli A:U utilizando ratones reporteros para dicho interferón. Estos ratones expresan el gen de la luciferasa bajo el control del promotor de IFN β , de tal manera que cada vez que se induce IFN β , si se inyecta el ratón con el sustrato de la enzima (luciferina) se verá la emisión de luminiscencia, que puede ser visualizada y cuantificada *in vivo* con sistemas de detección apropiados. Utilizando ratones reporteros tejido específicos, en donde luciferasa se expresa bajo el promotor de IFN β , pero en determinados tipos celulares, se pudo establecer que la fuente de IFN β intratumoral son células mieloides (LysM+), siendo la mitad de ellas células CD11c+ (CDs y macrófagos) (Nocera et al., 2016) (Figura 9).

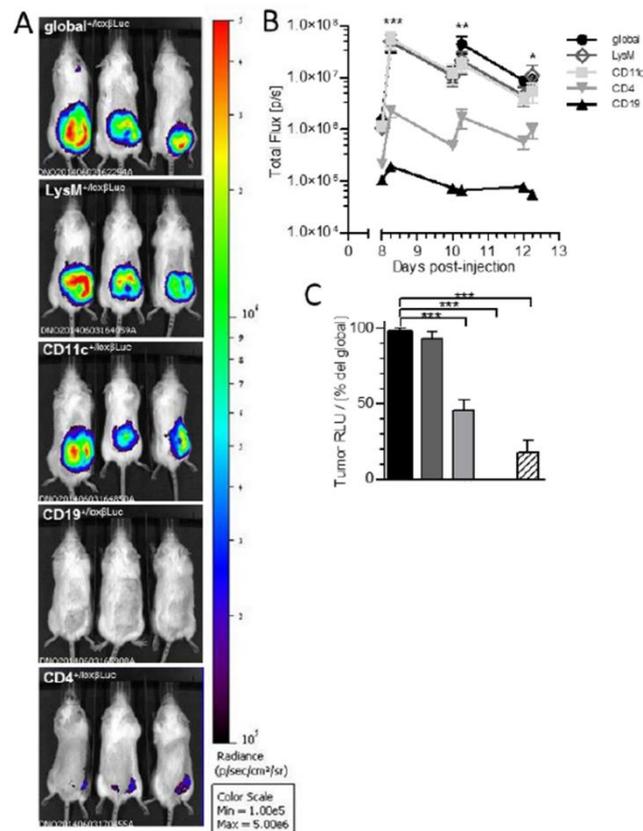


Figura 9. Las células LysM+ y CD11c+ son los principales responsables de la producción de IFN- β luego del tratamiento con poli A:U. A) Imágenes representativas 6h post tratamiento de ratones reporteros linaje-específicos portadores de tumores B16 con pAU. **B)** Cuantificación de las imágenes dorsales capturadas en los distintos días indicados mediante la medición de intensidad de luminiscencia dentro de las regiones seleccionadas de interés (ROI). **C)** Análisis *ex vivo* de la actividad de luciferasa de muestras representativas extraídas de tumor. Imagen extraída de la tesis doctoral de David A. Nocera (Nocera et al., 2016).

CAPÍTULO 2: OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL Y CONSTRUCCIÓN DE LA HIPÓTESIS DE TRABAJO

A diferencia de las terapias antitumorales convencionales como la cirugía, la radioterapia y la quimioterapia, que tienen como objetivo la eliminación de la propia célula tumoral, la inmunoterapia antitumoral incluye un conjunto de terapias que presentan como blanco terapéutico al sistema inmune del hospedador. Más precisamente tienen como objetivo modular la respuesta inmune del paciente haciéndola más eficiente en eliminar las células transformadas.

Resultados de nuestro laboratorio y de otros grupos indican que los IFN-I en el microambiente tumoral juegan un rol crucial en modular la respuesta inmune antitumoral. El hecho de haber descrito la capacidad de poli A:U de actuar tanto sobre la célula tumoral como sobre las células del sistema inmune del hospedador para promover niveles de IFN β adecuados y requeridos para el control del crecimiento tumoral y la mejora de la supervivencia de los animales, nos llevó a proponer a esta molécula como un adyuvante superador a los ya descritos: poli A:U es específico de TLR3 y no de otros PRRs citosólicos, actúa tanto sobre la célula tumoral como sobre las células inmunes del huésped promoviendo la inducción de IFN β , incrementa la respuesta inmune antitumoral y ha sido utilizado empíricamente en humanos con baja toxicidad.

Es por ello que en este trabajo de tesis nos propusimos como objetivo general **caracterizar exhaustivamente el tipo de infiltrado inmunológico que se genera después del tratamiento con poli AU**, con el objetivo a largo plazo de proponer este ARNdc sintético en escenarios terapéuticos que lo utilicen en combinación con “checkpoint inhibitors” u otras drogas convencionales. Dicha caracterización se realizó utilizando citometría de flujo multiparamétrica. Esta tecnología permite evaluar 20 parámetros celulares en simultáneo (18 parámetros de fluorescencia más 2 parámetros ópticos), lo cual enriquece el estudio del infiltrado inmune al aportar en simultáneo, datos relacionados al linaje celular, estado de maduración, secreción de mediadores solubles, etc para una única célula.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Objetivo Específico I: Identificar el blanco celular de poli A:U que expresa el receptor TLR3 dentro del microambiente tumoral.

Parte I: Caracterización de los ratones reporteros TLR3-GFP e identificación de células expresando el receptor TLR3 infiltrando tumores murinos B16-OVA.

Objetivo Específico II: Describir cómo el tratamiento terapéutico con poli A:U, un ligando de TLR3, modifica el perfil del infiltrado inmunológico intratumoral.

Parte IIA: Caracterización de las células mieloides en el microambiente tumoral luego del tratamiento peritumoral con poli A:U.

Parte IIB: Estudio de las células linfoides en el microambiente tumoral luego del tratamiento peritumoral con poli A:U.

Objetivo Específico III: Estudiar la funcionalidad del compartimiento mieloides luego del tratamiento con poli A:U.

Parte IIIA: Impacto de poli A:U sobre la expresión del ligando inhibitorio PD-L1. Ensayos funcionales de monocitos infiltrantes de tumor.

Parte IIIB: Efecto de los IFN-I inducidos por poli A:U sobre el infiltrado tumoral mieloides. Rol de TNF en la eficacia del tratamiento con poli A:U.

CAPÍTULO 3: RESULTADOS

OBJETIVO ESPECÍFICO I: IDENTIFICAR EL BLANCO CELULAR DE POLI A:U QUE EXPRESA EL RECEPTOR TLR3 DENTRO DEL MICROAMBIENTE TUMORAL.

PARTE I: Caracterización de los ratones reporteros TLR3-GFP e identificación de células expresando el receptor TLR3 infiltrando tumores murinos B16-OVA.

CARACTERIZACIÓN DEL RATÓN REPORTERO TLR3-GFP

En la actualidad, los anticuerpos disponibles comercialmente para detectar el receptor TLR3 no son muy fiables. Es por esto que, para abordar el primer objetivo realizamos un trabajo en colaboración con el laboratorio del Dr. Philippe Benaroch en el Institut Curie – Paris, Francia debido a que recientemente su laboratorio ha generado un ratón de la cepa C57BL/6 reportero para TLR3. Éste, es el primero de su clase y es de gran utilidad para el seguimiento y estudio del receptor TLR3. Este ratón se ha construido insertando el gen de la proteína fluorescente verde (GFP, de sus siglas en inglés) bajo el promotor del gen de TLR3, por lo que al activarse dicho gen se transcribirá también el gen de GFP pudiendo ser utilizado como sistema de detección fluorescente para determinar indirectamente las poblaciones celulares que están activando el gen de TLR3, y que por ende pueden estar expresando el receptor a nivel proteico. Es por esta inserción genética que los ratones fueron definidos como TLR3-KI “*knock-in*” (KI). A su vez, a ratones control de camada se los denominó TLR3-KI ^{wt/wt} (WT, *wild-type*, de sus siglas en inglés) al no tener ninguna inserción del gen de GFP. Por otro lado, a los ratones que han sufrido una única inserción en uno de los dos alelos de TLR3 se los clasificó en TLR3-KI ^{gfp/wt} (heterocigotas para GFP) o TLR3-KI ^{gfp/gfp} (homocigotas para GFP) a los que presentan inserción en ambos alelos de TLR3. Esta nomenclatura es la que se tendrá en cuenta a lo largo de todo este trabajo.

Lo primero que se llevó a cabo fue una caracterización del ratón, comparando la distribución de las distintas poblaciones inmunes dentro de algunos órganos linfáticos, con el objetivo de corroborar que el ratón reportero no tuviera una diferencia marcada con respecto al control de camada (ratón TLR3-KI ^{wt/wt}). Posteriormente, evaluamos la expresión de TLR3-GFP a través de citometría de flujo, pudiendo de esta manera determinar las poblaciones celulares que expresan dicho receptor. Se tomaron cuatro ratones de cada uno de los fenotipos (TLR3-KI ^{wt/wt} o WT, TLR3-KI ^{gfp/wt} u homocigota y TLR3-KI ^{gfp/gfp} u homocigota) y se inyectaron de manera intraperitoneal (i.p.) 200µg/ratón de poli I:C, ligando sintético de TLR3, a dos de cada uno de los fenotipos mientras que se inyectó con vehículo (PBS) a otro grupo de dos de cada fenotipo como grupo control. Este experimento nos permitió evaluar la expresión celular de TLR3-GFP y la capacidad de este receptor de responder a un conocido ligando del mismo. A las 24h post-inyección se sacrificaron los animales y se procesaron para citometría de flujo diferentes órganos linfáticos como bazo, ganglio linfático inguinal y ganglio linfático mesentérico, donde se evaluó la expresión de TLR3-GFP en distintas poblaciones leucocitarias. Se caracterizaron a estas distintas poblaciones a través de marcadores clásicos de linaje como TCRβ o cadena β del receptor de células T para definir a células T, CD19 como

marcador clásico de células B, CD11b como molécula que define a todas las células inmunes de origen mieloide y finalmente se estudió a las células dendríticas definidas como doble positivas para CD11c y MHCII, siendo estas últimas una población celular de origen mieloide.

En una primera instancia, al evaluar la distribución de las distintas poblaciones inmunes de células T, células B, células mieloides o células dendríticas en bazo y ganglio inguinal no se encontraron diferencias significativas en los porcentajes de las mismas entre los ratones TLR3-KI *gfp/wt*, TLR3-KI *gfp/gfp* y los ratones control o WT (TLR3-KI *wt/wt*) (Figura I 1B y 1C). A su vez, se observó una leve disminución, aunque no significativa, de células mieloides en ganglio mesentérico en los ratones “*knock-in*” para GFP en relación al ratón control WT (TLR3-KI *wt/wt*) (de ~2,5% en WT a ~1% en KI) (Figura I 1D). Por otro lado, observamos que la inoculación i.p. de pIC no modificó en gran medida el porcentaje de estas poblaciones leucocitarias en los órganos linfoides evaluados (Figura I 1).

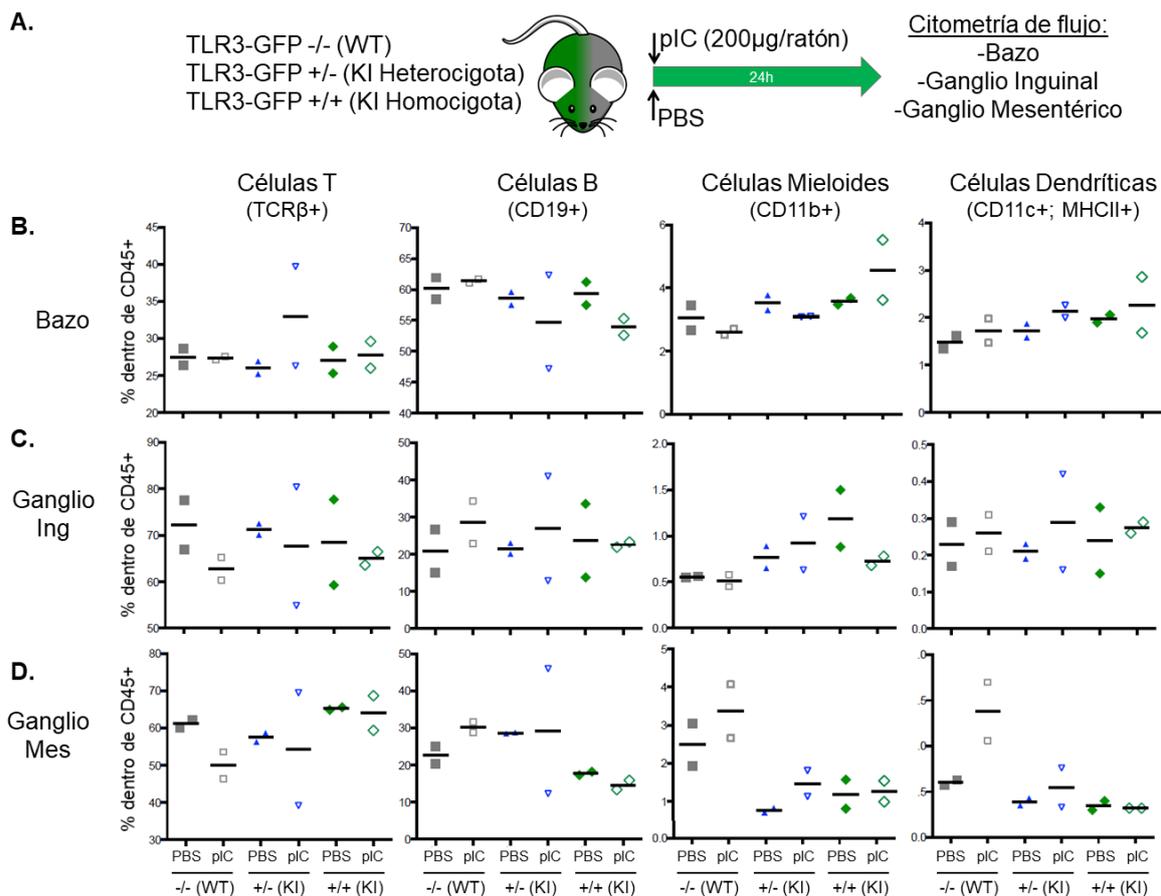


Figura I-1. Distintas poblaciones celulares en los ratones reporteros TLR3-GFP. A) Diseño experimental: inoculación de pIC (200µg/ratón) o PBS a ratones reporteros “*knock-in*” para TLR3, TLR3-KI *wt/wt*, TLR3-KI *gfp/wt* y TLR3-KI *gfp/gfp*. **B)** Frecuencia de cada una de las poblaciones celulares inmunes indicadas en bazo, **C)** ganglio inguinal y **D)** ganglio mesentérico en las tres cepas de ratones. Cada punto representa un animal.

Para determinar la identidad de las células capaces de activar el gen de TLR3, se determinó la señal de GFP en bazo, ganglio inguinal y ganglio mesentérico de las tres cepas de ratones. También se marcaron las suspensiones celulares provenientes de cada órgano con anticuerpos monoclonales contra marcadores específicos de linaje celular. Como era de esperarse, no se detectó fluorescencia en los ratones WT (TLR3-KI ^{wt/wt}) mientras que se observó señal de GFP exclusivamente en células leucocitarias (CD45+) provenientes de ambos ratones “*knock-in*” (TLR3-KI ^{gfp/wt}; TLR3-KI ^{gfp/gfp}) (Figura I 2). Se detectó fluorescencia principalmente en bazo (en 1-2% del total de leucocitos en condiciones homostáticas/PBS), en menor medida en ganglio mesentérico y en ganglio inguinal no se detectó señal de GFP (cabe destacar que en estos órganos la frecuencia de células GFP+ es del 0.1% de los leucocitos dificultando el análisis por citometría de flujo). Es por esto que centramos nuestro estudio en bazo, donde pudimos detectar GFP en un ~2% (PBS) de células B (definidas por el marcador de linaje CD19) (Barr, Brown, Ryan, Zhao, & Gray, 2007) y en un ~5% (PBS) de células dendríticas convencionales (definidas por ser positivas para CD11c y MHCII). Luego de la estimulación intraperitoneal con pIC observamos un tendiente aumento en la frecuencia de linfocitos B GFP+ de un 2% (PBS) a un 4%. Determinamos el mismo fenómeno en CDs GFP+ con un cambio de un 5% a un 7% en TLR3-KI ^{gfp/wt} o 7% a 10% en TLR3-KI ^{gfp/gfp}.

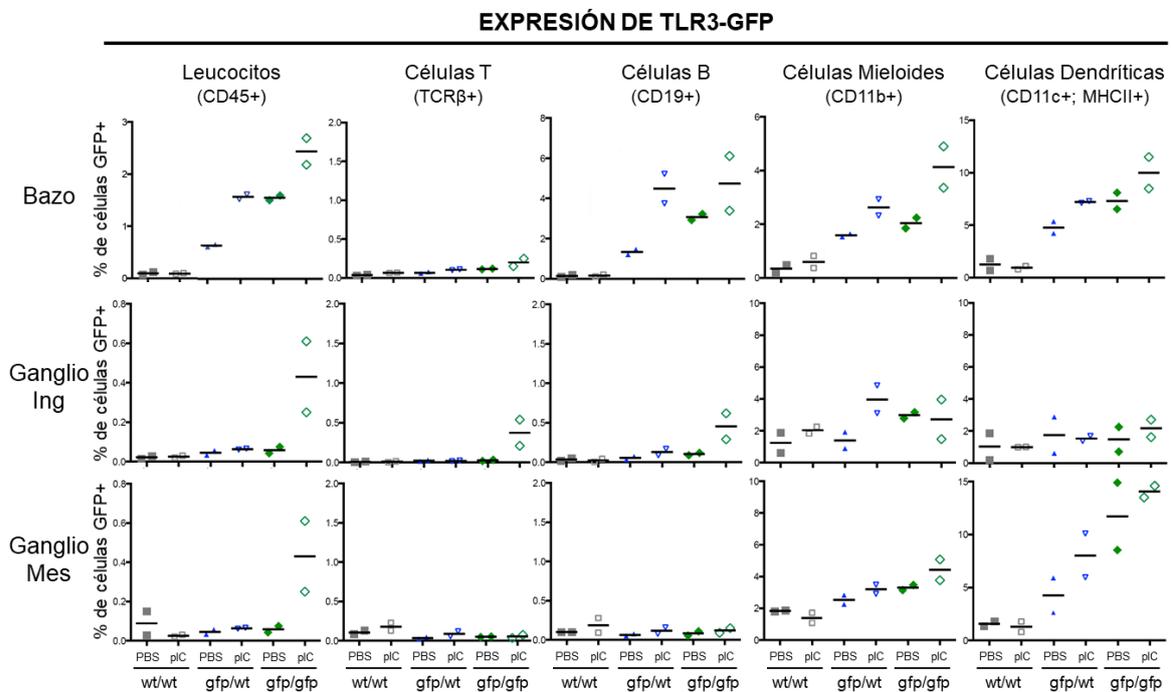


Figura I-2. **Expresión de TLR3-GFP en linfocitos B y células dendríticas en ratones reporteros.** Frecuencia de células GFP positivas dentro de cada una de las poblaciones celulares inmunes indicadas, determinado por citometría de flujo en bazo, ganglio inguinal y ganglio mesentérico de las tres cepas de ratones reporteros.

Existen dos subpoblaciones dentro de las células dendríticas convencionales esplénicas (CDc): una caracterizada por la expresión del marcador CD8 α (CDc CD8 α +) y otra por la ausencia del mismo (CDc CD8 α -). Ambas subpoblaciones tienen distinta localización en el bazo, distinto perfil de citocinas secretadas y por ende distinto perfil de polarización de respuesta adaptativa (Pulendran, 2015). En este trabajo, a partir de estos experimentos, pudimos observar que la expresión de TLR3-GFP estaba principalmente presente en las CDc CD8 α +, con un 60% de las mismas siendo GFP+. Mientras que dentro de las CDc CD8 α - se detectó GFP en solo un 2% de las mismas (Figura I-3).

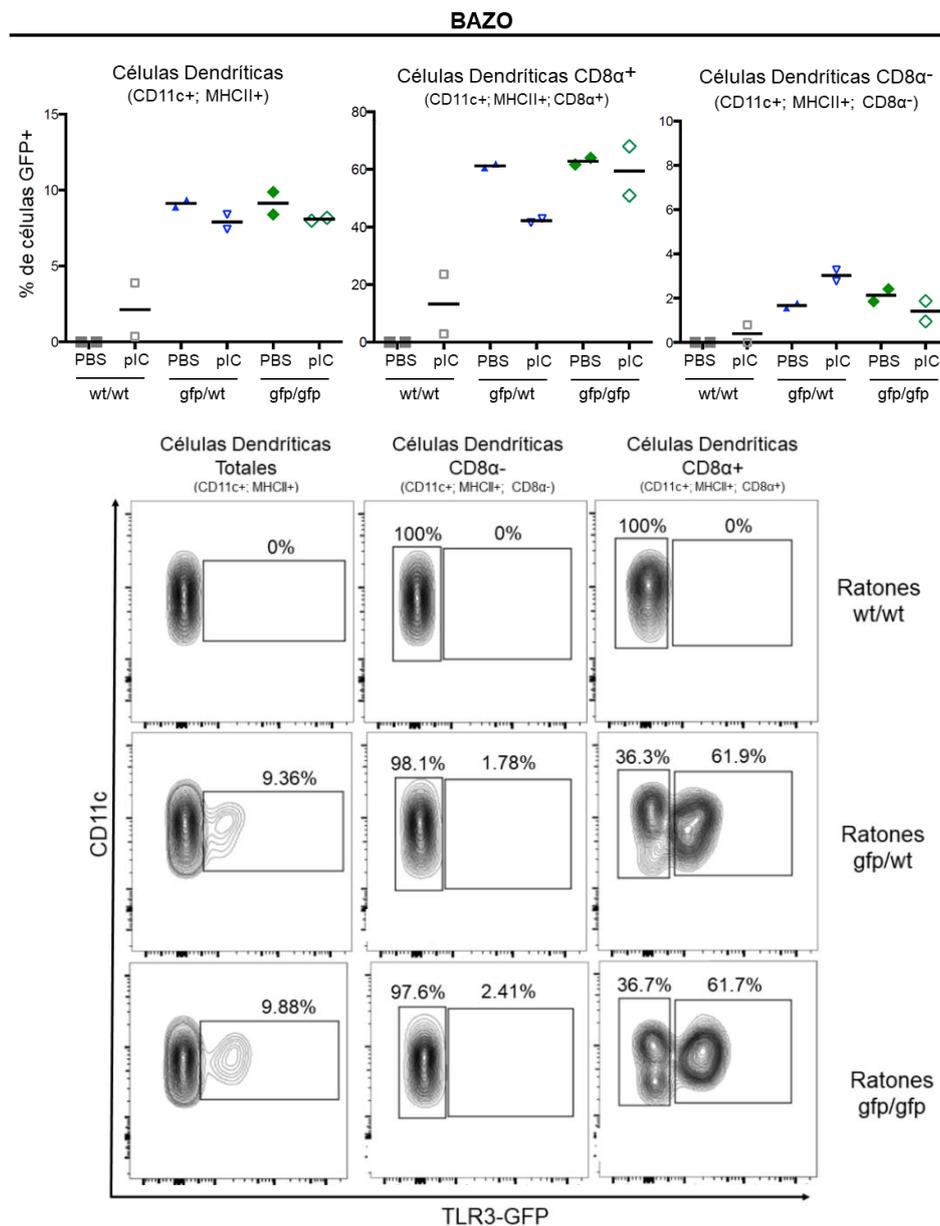


Figura I-3. **Expresión de TLR3-GFP en la subpoblación de CDc CD8α+.** Frecuencia de células GFP positivas dentro de cada una de las subpoblaciones de CDc esplénicas, CDc CD8α+ y CDc CD8α-. Representación gráfica de datos de citometría de flujo correspondiente a un animal de cada cepa de ratones. Cada punto representa un animal.

Nuestros resultados coinciden plenamente con bases de datos como Immgen (www.immgen.org) donde se detalla expresión a nivel de ARNm en distintas poblaciones celulares, observándose la máxima expresión de *Tlr3* en CDc CD8α+ esplénicas y en menor medida en células B de zona marginal de bazo (Figura 4).

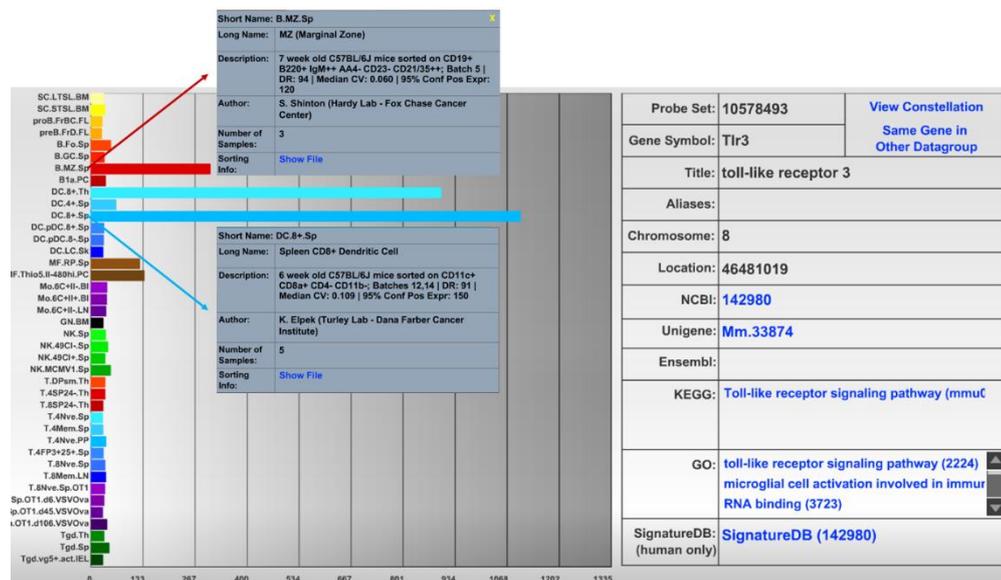


Figura I-4. **Expresión de ARNm para TLR3 en linfocitos B de zona marginal y CDc CD8α+ de bazo.** Información obtenida de la base de datos Immgen donde se detalla expresión de ARNm para TLR3 en linfocitos B de zona marginal de bazo (B.MZ.Sp) en rojo y en CDc CD8α+ (DC.8+Sp) en celeste. En celeste claro se grafica CD CD8α+ de timo (DC.8+.Th); en marrón claro macrófagos de pulpa roja (MF.RP.Sp); en marrón oscuro macrófagos peritoneales (MF.Thio5.II-480hi.PC).

Las células dendríticas son capaces de activarse y madurar una vez reconocida una noxa, siendo los receptores TLRs capaces de inducir este estado de activación. Al activarse, una célula dendrítica aumenta la expresión de ciertas moléculas de superficie como son MHCII y moléculas coestimuladoras como CD80 (B7.1) y CD86 (B7.2), incrementando así su capacidad de presentar antígenos a células T y estimularlas (Worbs, Hammerschmidt, & Förster, 2016). A partir de los resultados anteriores, donde veíamos expresión de TLR3-GFP principalmente en CDc, nos planteamos conocer el estado de activación de estas células en bazo luego de la inyección con pIC como ligando de TLR3. En primera instancia, se evaluó la expresión de MHCII y CD86 en

células dendríticas CD8 α + GFP- observándose un aumento en la expresión de ambos marcadores en las células provenientes de ratones WT (TLR3-KI ^{wt/wt}). Dicho aumento fue menor en CDc TLR3-KI ^{gfp/wt} y nulo en CDc TLR3-KI ^{gfp/gfp}, dando indicio de una incorrecta capacidad del receptor TLR3 para detectar/señalizar en los ratones reporteros (Figura 5A). El mismo análisis fue llevado a cabo en células CD8 α + GFP+ de ratones GFP “*knock-in*” y se observó el mismo fenómeno, donde las células provenientes de los ratones heterocigotas (TLR3-KI ^{gfp/wt}) fueron capaces de activarse con pIC mientras que las provenientes de ratones homocigotas (TLR3-KI ^{gfp/gfp}) no lograron aumentar la expresión de estos marcadores de activación en la misma medida (Figura 5B). Estos datos nos llevaron a estudiar en mayor detalle el correcto funcionamiento del receptor TLR3 en estos ratones reporteros.

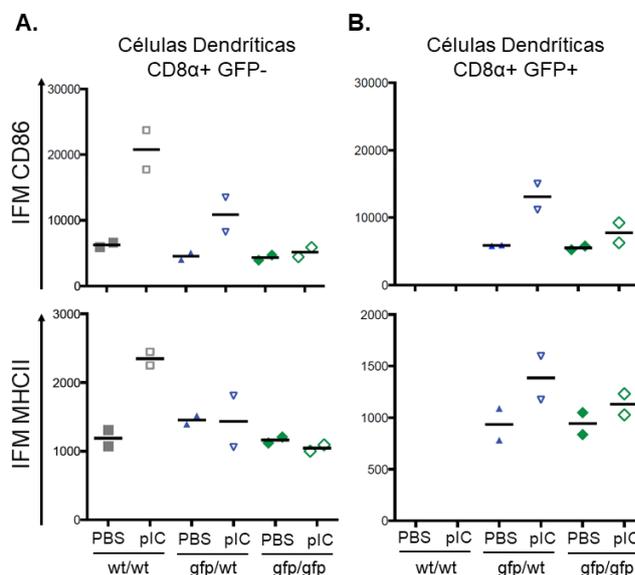


Figura 1-5. **CDc CD8 α + esplénicas de ratones reporteros no son capaces de activarse completamente luego del estímulo *in vivo* con pIC. A)** Intensidad de fluorescencia media (IFM) para los marcadores de activación CD86 y MHCII en CDc CD8 α + GFP- de ratones tratados i.p. con 200 μ g de pIC o PBS de las tres cepas de ratones. **B)** IFM para CD86 y MHCII en CDc CD8 α + GFP+ de ratones tratados i.p. con 200 μ g de pIC o PBS de las tres cepas de ratones.

Para estudiar en más profundidad la funcionalidad de TLR3 se llevaron a cabo ensayos *in vitro* utilizando como célula de estudio macrófagos derivados de médula ósea (BMDMs, de sus siglas en inglés), para ellos se diferenciaron estas células a partir de las dos cepas de ratones reporteros y su control de camada WT. En esta instancia, se agregaron también BMDMs provenientes de ratones deficientes en TLR3, tanto homocigotas (TLR3 ^{ko/ko}) como heterocigotas (TLR3 ^{ko/wt}). Luego de obtener estas células, se las estimuló con ambos ligandos de TLR3 (pIC a 25 μ g/mL y poli A:U a dos

concentraciones de 25µg/mL y 50µg/mL) por 24h. Pasado este tiempo, se determinó por citometría de flujo la expresión de marcadores de activación como CD80, CD86 y PD-L1 en estos macrófagos. En BMDMs provenientes de ratones control WT estimulados tanto con pIC como con poli A:U, se observó un aumento en la expresión de estos tres marcadores; este aumento fue menor en células TLR3-KI ^{gfp/wt} y prácticamente nulo en ratones TLR3-KI ^{gfp/gfp}, observándose una respuesta dependiente de la dosis génica de un TLR3 funcional. Como control, en ratones deficientes en TLR3 no se observó aumento en los marcadores de activación en células estimuladas con poli A:U, detectándose un leve aumento en células estimuladas con pIC, dando nuevamente evidencia experimental de la mayor especificidad por TLR3 por poli A:U y de la capacidad de pIC de estimular receptores citoplasmáticos de ARNdc (Figura 6).

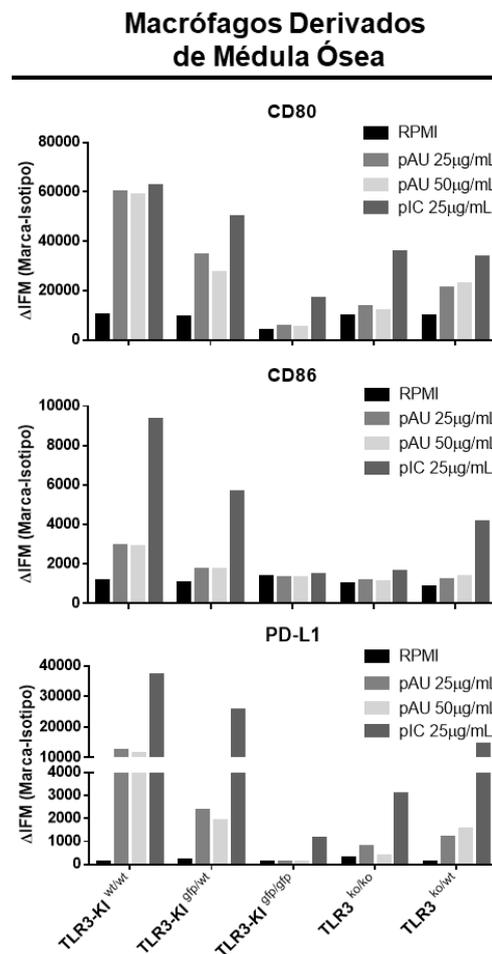


Figura I-6. **Macrófagos derivados de médula ósea de ratones TLR3-GFP son incapaces de aumentar la expresión de moléculas asociadas a activación luego del estímulo *in vitro* con ligandos de TLR3.** IFM para los marcadores de activación CD80, CD86 y PD-L1 en BMDMs en presencia de medio de cultivo (RPMI) o estimulados con pAU a dos concentraciones (25µg/mL y 50µg/mL) o pIC (25µg/mL).

A partir de estos resultados, podemos concluir que los ratones reporteros para TLR3 presentan una expresión de GFP en las poblaciones celulares esperadas. Anteriormente se ha reportado expresión de *Tlr3* a nivel de ARNm en células B de zona marginal de bazo y células dendríticas convencionales CD8 α ⁺ esplénicas (www.immgen.org); en este trabajo nuestro grupo ha podido detectarlo utilizando un ratón reportero. Por otro lado, tanto ensayos de estimulación *in vivo* como *in vitro* con ligandos de TLR3, pIC y poli A:U, han demostrado que la inserción del gen de GFP bajo el promotor de TLR3 lo vuelve a éste incapaz de detectar/señalar correctamente al no lograr activar células presentadoras de antígeno. Por lo tanto, dichos ratones reporteros pueden ser utilizados para la identificación de células que estén activando el gen del receptor TLR3 en distintos órganos, siendo el ratón heterocigota (TLR3-KI^{gfp/wt}) el más adecuado al presentar un alelo de TLR3 WT (funcional) y otro alelo TLR3 KI (capaz de inducir expresión de GFP para el seguimiento de la expresión del gen).

EXPRESIÓN DE TLR3 EN POBLACIONES INFILTRANTE DE TUMOR

Para poder identificar las células capaces de reconocer al ligando poli A:U, utilizado en nuestro esquema terapéutico, dentro del microambiente tumoral se inocularon ratones reporteros TLR3-GFP heterocigotas (TLR3-KI^{gfp/wt}) con células tumorales B16-OVA. Se evaluó el crecimiento tumoral y trece días luego de la inoculación del tumor se sacrificaron los animales y se procesaron tumor, ganglio inguinal drenante de tumor (ganglio más cercano al tumor donde se lleva a cabo parte de la respuesta inmune contra el tumor - GD) y ganglio inguinal no drenante de tumor (ganglio inguinal proveniente del flanco opuesto de donde se inoculó el tumor - GND) (Figura 7A). Luego se procesaron los órganos para citometría de flujo (detallado en Materiales y Métodos) marcando con anticuerpos conjugados a fluorocromos distintas moléculas marcadoras de linaje celular para poder identificar las distintas poblaciones celulares que pudieran estar expresando el receptor TLR3 dentro del tumor.

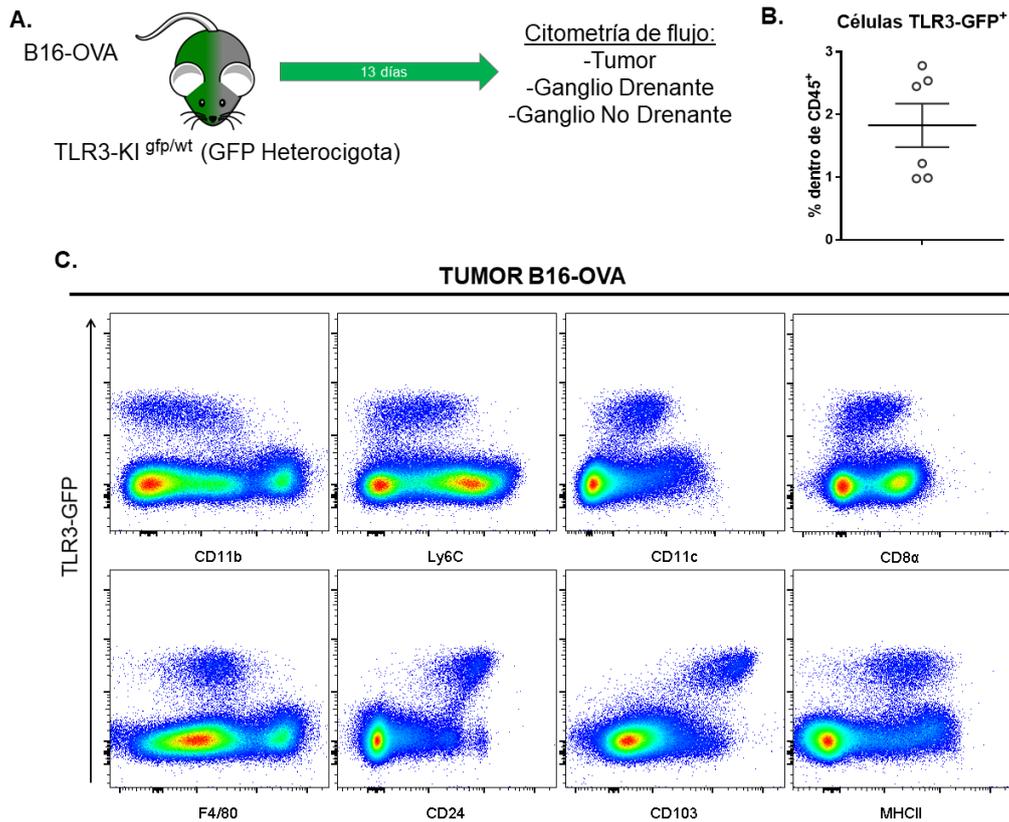


Figura I-7. **Expresión de TLR3-GFP en células infiltrantes de tumor B16-OVA.** **A)** Diseño experimental: ratones TLR3-KI ^{gfp/wt} (n=6) fueron inoculados con 5.10⁵ células B16-OVA, al día 13 luego de la inoculación se analizaron por citometría tumor, ganglio drenante inguinal y ganglio no drenante inguinal. **B)** Frecuencia de células GFP⁺ dentro del total de leucocitos (CD45⁺) infiltrando tumores B16-OVA. **C)** Representación gráfica de datos de citometría de flujo mostrando expresión de GFP en función de distintos marcadores de linaje celular en células CD45⁺ infiltrantes de tumor.

Se observó la expresión de GFP dentro de la población de leucocitos infiltrantes de tumor, definidos por el marcador panleucocitario CD45 (células CD45⁺) representando un 2% de los mismos (Figura 7B). A su vez, definimos por citometría de flujo la población GFP⁺ como CD24⁺, CD103⁺, MHCII⁺, CD8α^{int}, CD11c^{int}, Ly6C^{baja}, CD11b^{baja}, F4/80⁻ (Figura 7C) cuyo patrón de expresión es muy característico de la subpoblación de células dendríticas migratorias CD103⁺ (Miranda L. Broz et al., 2014). Luego, para definir la población expresando GFP seguimos una estrategia de selección o de *gate* validada por otros grupos de investigación, y utilizando distintas metodologías, (Miranda L. Broz et al., 2014; Salmon et al., 2016) donde se hace especial hincapié en el compartimento mieloide infiltrando tumor. Luego de llevar a cabo dicha estrategia (Figura 8A), pudimos definir a la subpoblación de células dendríticas CD103⁺ como la principal célula presente en tumor expresando TLR3-GFP, siendo el 100% de esta población positiva para GFP y expresando los niveles más altos de la proteína, dado por

su intensidad de fluorescencia media (IFM) (Figura 8B). A su vez, otra subpoblación de células dendríticas CD11b+ presentó expresión de GFP, pero con menor IFM y con un porcentaje de células TLR3-GFP+ de alrededor del 40% (Figura 8C).

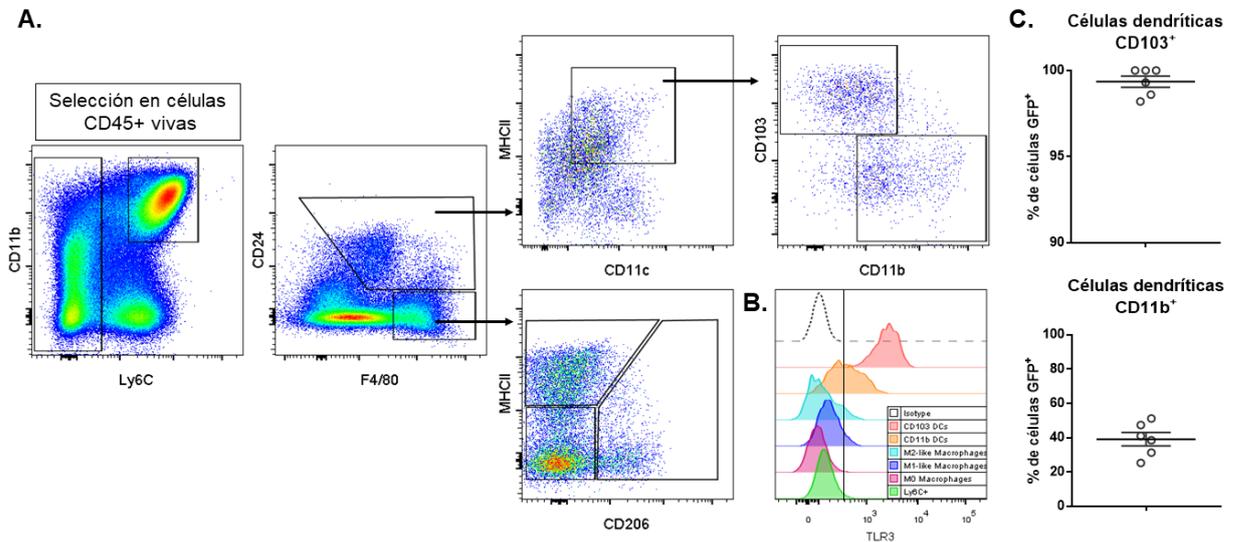


Figura I-8. **Expresión de TLR3-GFP en células dendríticas infiltrantes de tumor.** El 100% de las CDs CD103+ expresan el receptor TLR3 mientras que solo el 40% de las CDs CD11b+ lo hacen. **A)** Estrategia de selección o *gate* para identificar las distintas poblaciones inmunes infiltrando tumores B16-OVA. **B)** Expresión de TLR3-GFP en las distintas poblaciones mieloides infiltrando tumor, caracterizadas por los marcadores mostrados en A. **C)** Porcentaje de expresión de GFP dentro de las dos subpoblaciones de CDs caracterizadas.

Al analizar los ganglios, se observó expresión de GFP en células CD24+, CD103+, MHCII+, CD8 α ^{int}, CD11c^{int}, Ly6C-, CD11b^{baja}, F4/80- (Figura 9). Este fenotipo es el mismo que presentan las células GFP+ infiltrando el tumor, característico de células dendríticas CD103+ migratorias (Figura 9A y 9B). A su vez, observamos un aumento significativo en la cantidad de células CD45+ presentes en los ganglios drenantes, por la presencia del mismo tumor, respecto a los ganglios no drenantes (Figura 9C). Detectamos una tendencia a mayor número absoluto de células TLR3-GFP presentes en GD respecto al GND aunque no significativo (Figura 9C), esto puede estar siendo enmascarado por la gran cantidad de células linfoides en ganglio, ya que como se verá más adelante, las células mieloides (GFP+) representan alrededor de un 3% del total de leucocitos presentes en ganglio.

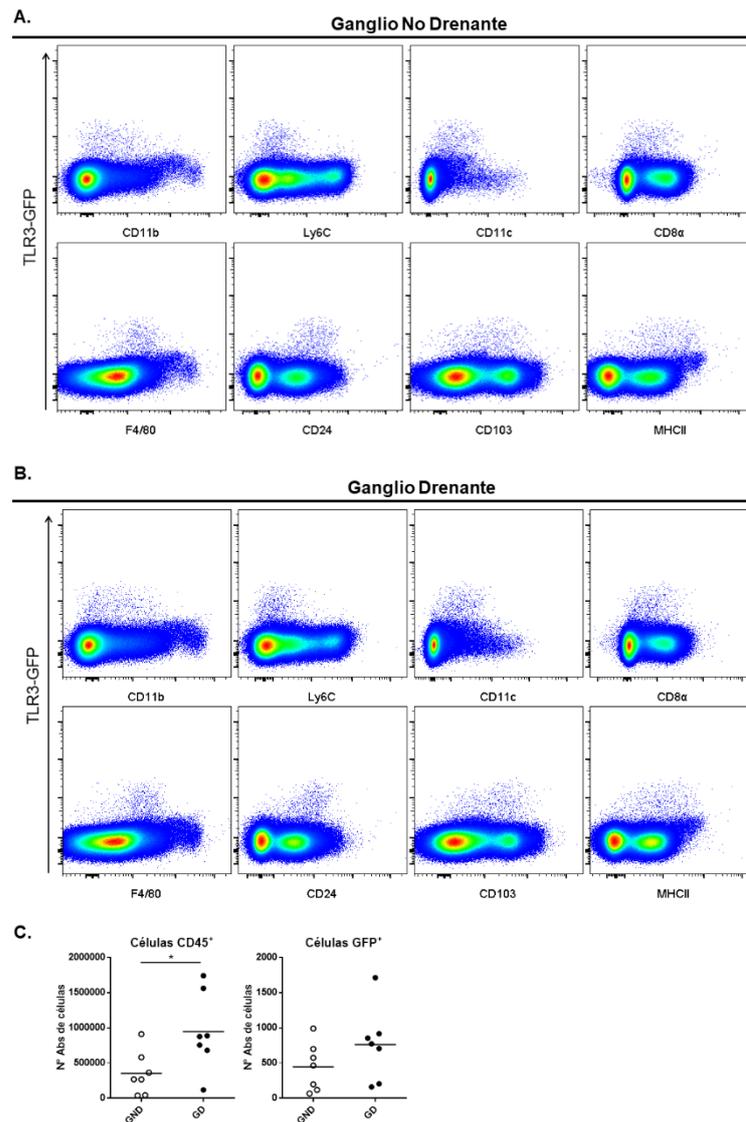


Figura I-9. **Expresión de TLR3-GFP en células de ganglio. A)** Representación gráfica de datos de citometría de flujo mostrando expresión de GFP en función de distintos marcadores de linaje celular en células de ganglio no drenante. **B)** Expresión de GFP en función de distintos marcadores de linaje celular en células de ganglio drenante de tumor. **C)** Número absoluto de células CD45+ conformando GND y GD. Número absoluto de células GFP+ conformando GND y GD. t-test Student *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001; ****p<0,0001.

Estos resultados nos permiten identificar a las células dendríticas como principal población expresando TLR3 en el microambiente tumor, más precisamente la subpoblación de CDc CD103+ migratoria y una proporción de CDc CD11b+ residentes. A su vez, observamos en ganglios inguinales, tanto drenante de tumor como no drenante, expresión de TLR3 nuevamente en CDc CD103+.

Conclusiones Parciales I:

- La composición celular de los órganos linfáticos estudiados es la misma entre los ratones reporteros (TLR3-GFP KI) y los ratones control de camada. A priori, la construcción génica del ratón reportero no modifica la composición de células inmunes en órganos linfáticos.
- Las principales poblaciones en bazo que expresan TLR3-GFP en condiciones fisiológicas son las CDs CD8 α + y una proporción de linfocitos B.
- El porcentaje de células TLR3-GFP en ganglio inguinal y mesentérico es muy bajo, tanto en condiciones fisiológicas (PBS) como estimuladas (pIC).
- Tanto CDs CD8 α + como BMDMs provenientes de ratones reporteros (TLR3-GFP KI) fallan en responder completamente al estímulo con ligandos de TLR3.
- poli A:U presenta mayor especificidad por TLR3, demostrando ser un ligando más adecuado para el estudio de este receptor que pIC.
- Las CDs CD103+ y en menor medida las CDs CD11b+ infiltrantes de tumor son las células inmunes que expresan TLR3, tanto en el microambiente tumoral como en ganglio drenante.

OBJETIVO ESPECÍFICO II: DESCRIBIR CÓMO EL TRATAMIENTO TERAPÉUTICO CON POLI A:U, UN LIGANDO DE TLR3, MODIFICA EL PERFIL DEL INFILTRADO INMUNOLÓGICO INTRATUMORAL.

PARTE IIA: Caracterización de las células mieloides en el microambiente tumoral luego del tratamiento peritumoral con poli A:U.

PARTE IIB: Estudio de las células linfoides en el microambiente tumoral luego del tratamiento peritumoral con poli A:U.

EFICACIA TERAPÉUTICA DE POLI A:U Y SU IMPACTO SOBRE CÉLULAS INMUNES MIELOIDES

Luego de haber identificado las células que expresan el receptor innato TLR3 dentro del microambiente tumoral y con el objetivo de evaluar la eficiencia terapéutica de un ligando sintético de TLR3, empleamos un esquema de inmunoterapia antitumoral en animales de experimentación en el que se utilizó el ARNdc, poli A:U. Dicho compuesto fue administrado de manera desnuda, sin acomplejarlo a sustancias que puedan modificar la forma de entrega del mismo a las células blanco. A su vez, la administración poli A:U desnudo nos permite dirigir la captación del mismo a células con capacidad endocítica del sistema inmune como son las CPAs. Por otro lado, la administración de poli A:U se realizó de manera local en el foco del tumor para centrar nuestro estudio en los efectos locales, minimizando los posibles efectos sistémicos que pueda tener el compuesto.

Para iniciar este esquema de inmunoterapia antitumoral se tomaron ratones de la cepa C57BL/6 a los cuales se les inocularon células tumorales singénicas de melanoma murino B16-OVA de forma subcutánea (s.c.) en el flanco derecho trasero. A los 7 días post-inoculación los tumores fueron medidos y los animales separados en dos grupos lo más homogéneos posibles para iniciar el esquema terapéutico. Un grupo de animales recibió tres dosis de poli A:U (100µg/ratón/dosis) a los días 7, 9 y 11 post-inoculación del tumor (grupo poli A:U), mientras que el grupo de animales control recibió solo vehículo, en este caso PBS, bajo el mismo esquema y en simultáneo (grupo PBS). El crecimiento tumoral fue monitoreado día de por medio en ambos grupos experimentales (Figura II 1A).

A lo largo del experimento se determinó la cinética de crecimiento tumoral a través del volumen tumoral en cada uno de los ratones (Figura II 1C). Sumado a esto, a los 13 días post-inoculación (p.i.) del tumor, es decir una vez finalizado el esquema terapéutico, se determinó el peso de cada uno de los tumores. Se observó una disminución en la cinética de crecimiento tumoral en el grupo tratado con poli A:U, que se volvió significativa al día 11 p.i, con menores volúmenes tumorales y una marcada disminución en los pesos tumorales al día final respecto al grupo control PBS (Figura II 1B). Estos experimentos validan resultados previos de nuestro grupo donde se había determinado la eficacia terapéutica de la administración peritumoral de poli A:U (Nocera et al., 2016).

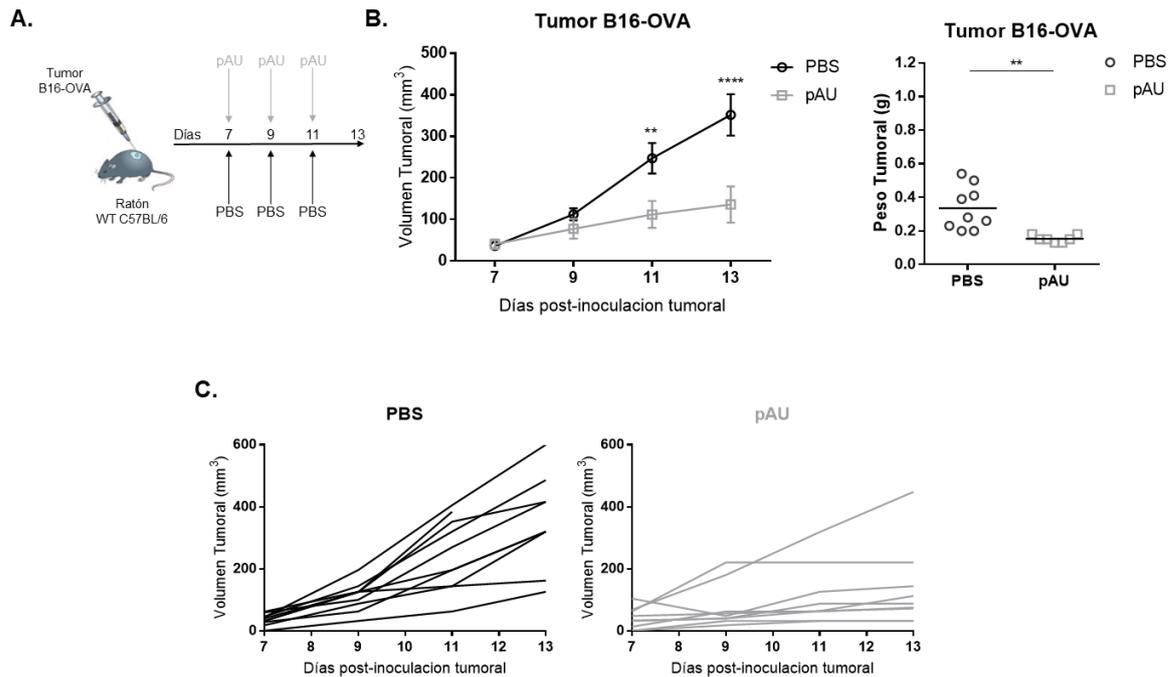
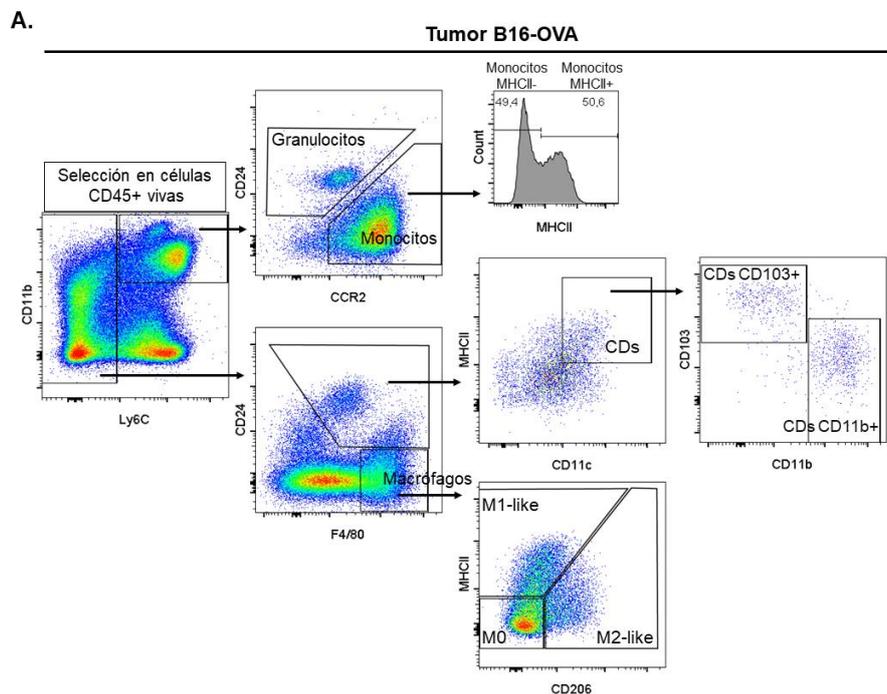


Figura II-1. **El tratamiento con poli A:U presenta una buena eficacia terapéutica.** **A)** Esquema de administración de pAU al día 7, 9 y 11 luego de la inoculación del tumor B16-OVA, grupo control recibió vehículo (PBS). **B)** Monitoreo de la cinética de crecimiento tumoral a través del volumen tumoral. Se grafica media±SEM. Análisis por ANOVA de dos vías post-test de Sidak. **p<0,01; ***p<0,001; ****p<0,0001. Determinación del peso tumoral al día de sacrificio. Se grafica media. t-test de Student *p<0,05; **p<0,01. **C)** Representación de la cinética de crecimiento tumoral para cada animal graficado individualmente. N=9/grupo.

Se procesaron los tumores de ambos grupos de ratones y fueron analizados por citometría de flujo (detallado en Materiales y Métodos) con el objetivo de analizar las distintas poblaciones celulares inmunes formando parte del microambiente tumoral. La determinación de distintos marcadores específicos de linaje celular nos permitió discriminar entre distintas poblaciones de células mieloides infiltrando los tumores B16-OVA. Las células mieloides son un grupo de células que pertenecen a la rama de la inmunidad innata y se caracterizan por ser la primera línea de defensa ante distintas noxas. Para clasificarlas correctamente nos basamos en estrategias de selección o *gate* validadas previamente por distintos grupos de investigación, y utilizando distintas metodologías (Miranda L. Broz et al., 2014; Salmon et al., 2016). A partir de esto se identificaron células granulocíticas (CD45+; CD11b+, Ly6C^{int}; CD24+; CCR2^{int}), monocitos (CD45+; CD11b+, Ly6C+; CD24-; CCR2+) que a su vez fueron subclasificados dependiendo de la expresión de MHCII en monocitos MHCII+ y monocitos MHCII-. Dado que los monocitos circulan en sangre y al extravasarse a los tejidos se convierten en macrófagos o CDs, a las células con marcadores de monocitos (CD45+; CD11b+, Ly6C+; CD24-; CCR2+) que se encuentran infiltrando un tejido se las suele denominar “células derivadas de monocitos” (*monocyte-derived cells*). En este

trabajo de tesis, nos hemos basado en la nomenclatura utilizada en Salmon et al., 2016 y nos referimos a las células CD45+; CD11b+, Ly6C+; CD24-; CCR2+ que infiltran tumor simplemente como monocitos. Además, identificamos dos subpoblaciones de células dendríticas convencionales CDs CD11b+ (CD45+; CD11b+, Ly6C-; CD24+; MHCII+, CD11c+) y CDs CD103+ (CD45+; CD11b-, Ly6C-; CD24+; MHCII+, CD11c+, CD103+), y finalmente tres subpoblaciones de macrófagos M0 (CD45+; CD11b+, Ly6C-; CD24-; F4/80+; MHCII-; CD206-), M1-like (CD45+; CD11b+, Ly6C-; CD24-; F4/80+; MHCII+; CD206-) y M2-like (CD45+; CD11b+, Ly6C-; CD24-; F4/80+; MHCII-; CD206+); esta estrategia de selección se encuentra detallada en la figura II 2A. Además, para completar la caracterización de dichas poblaciones, determinamos la expresión de distintas moléculas dentro de cada una de estas poblaciones de células mieloides. En macrófagos se observó expresión del marcador CD11c, anteriormente utilizado para definir células dendríticas (corroborando la importancia de utilizar un panel más extensivo de marcadores para definir las poblaciones celulares intratumorales), junto con una mayor expresión del marcador de activación CD86 en macrófagos M1-like respecto a las otras subpoblaciones M0 y M2-like consistente con un perfil pro-inflamatorio (Figura II 2B).



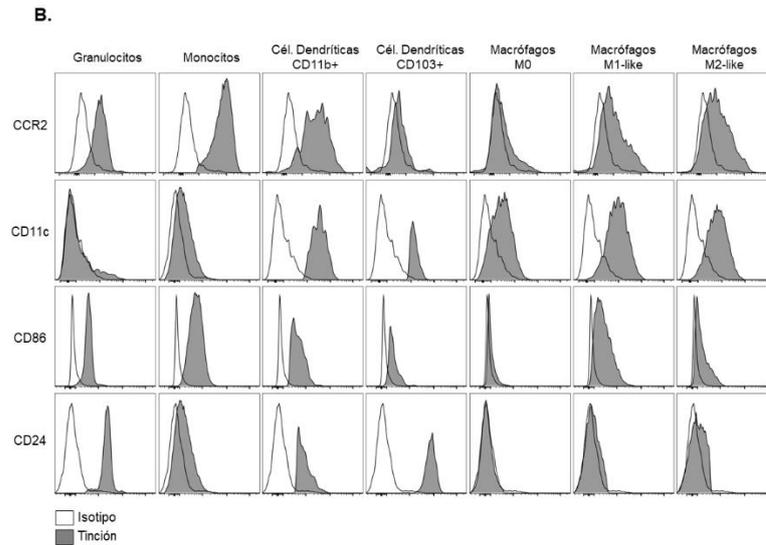


Figura II-2. Caracterización de las poblaciones mieloides infiltrando tumores no tratados.
A) Estrategia de selección o *gate* de las distintas células mieloides infiltrando tumores murinos B16-OVA por citometría de flujo. **B)** Expresión de distintos marcadores dentro de las poblaciones caracterizadas como se mostró en A.

Además, se determinó que dentro del total de leucocitos infiltrando un tumor los macrófagos representan alrededor de un 15% (en iguales proporciones las tres subpoblaciones descritas), los monocitos MHCII- un 13%, los monocitos MHCII+ un 15% y cada subtipo de célula dendrítica conforman un 2% del total de células CD45+ (Figura II 3). Es decir que el compartimiento mieloides dentro de un tumor B16-OVA, comprende aproximadamente un 50% del total de leucocitos infiltrantes (cabe aclarar que, si bien se detecta presencia de granulocitos por citometría de flujo, no fue cuantificado ya que utilizamos la técnica de enriquecimiento/purificación con Percoll donde se pierden la mayoría de estas células – Materiales y Métodos). Una vez caracterizadas las células mieloides infiltrantes de tumor, se observó que el tratamiento con poli A:U modifica de manera significativa tanto el porcentaje de algunas poblaciones como el número absoluto de las mismas. Como se describió anteriormente, dependiendo del estado de polarización de dichos macrófagos se tiene un efecto anti-tumoral en los M1-like y un efecto pro-tumoral en los M2-like. Asimismo, se observó que luego de la administración de tres dosis de poli A:U hubo una disminución significativa en la frecuencia de macrófagos totales que estuvo dada por una disminución en las subpoblaciones de macrófagos M1-like y M2-like, no observándose cambios en la subpoblación de M0 respecto al grupo control PBS. A su vez, determinamos una disminución significativa en la frecuencia de ambos subtipos de células dendríticas tanto CD11b+ residentes como CD103+ migratorias; cabe destacar que las células dendríticas infiltrando tumor son una proporción muy pequeña del total, representando

un 1-3% de todos los leucocitos infiltrantes de tumor (células CD45+). Por otra parte, no se percibieron cambios significativos en la frecuencia de monocitos, tanto MHCII+ como MHCII-, luego del tratamiento con poli A:U (Figura II 3).

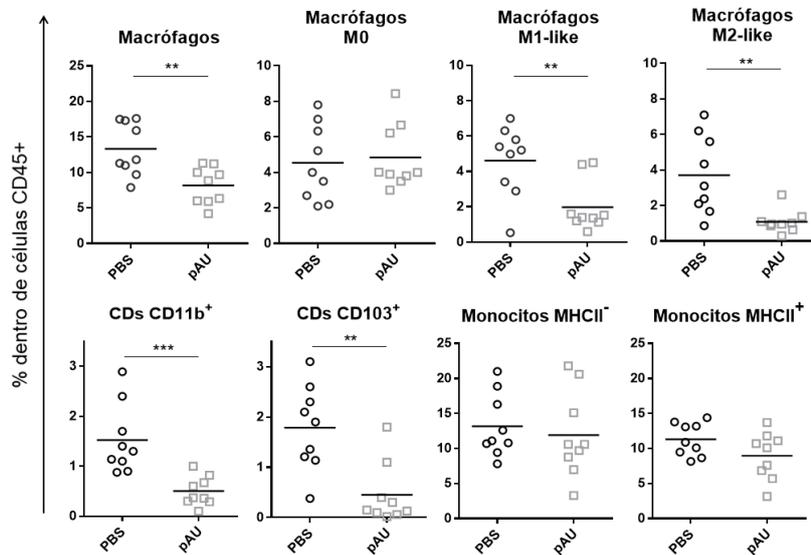


Figura II-3. **Efecto del tratamiento con poli A:U sobre la composición del compartimiento mielóide infiltrando tumor.** Frecuencia dentro de leucocitos (CD45+) de las distintas poblaciones mieloides dentro de tumores B16-OVA, caracterizadas como se detalló en la Figura II-2. Cada punto corresponde a un animal. Se grafica media. t-test de Student *p<0,05; **p<0,01;

Teniendo en cuenta que el tratamiento disminuye el tamaño tumoral, y con el objetivo de estandarizar los resultados obtenidos y poder comparar más estrictamente el grupo poli A:U con el grupo PBS, se determinó el número absoluto de células por gramo de tumor de cada una de las poblaciones mieloides ya descritas. A partir de esto, se confirmó el resultado obtenido anteriormente ya que se observó una disminución significativa en el número de macrófagos M1-like y M2-like, junto a una disminución en el número tanto de células dendríticas CD11b+ como CD103+. Nuevamente, no se observaron cambios significativos en el número absoluto de monocitos MHCII+ o MHCII-, ni en el número de macrófagos M0 luego del tratamiento con poli A:U (Figura II 4).

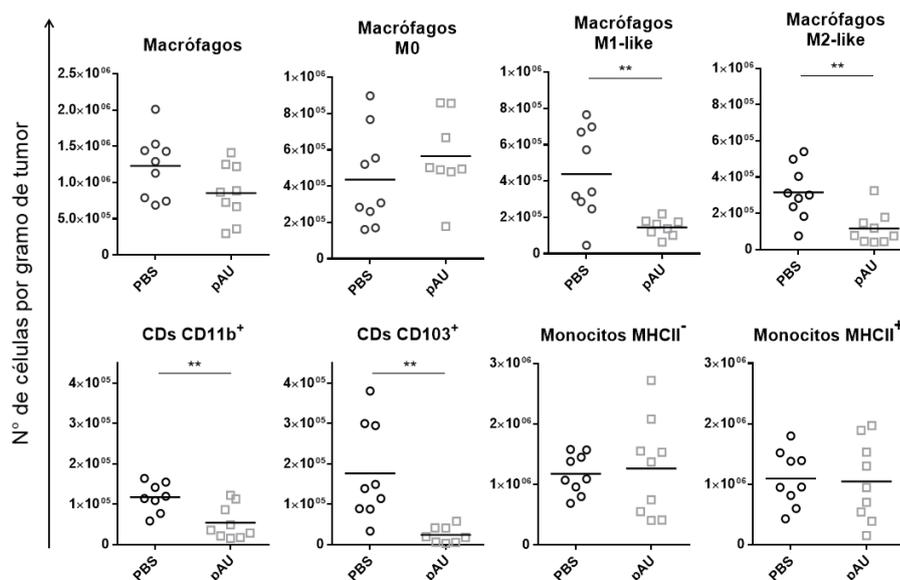


Figura II-4. **Efecto del tratamiento con poli A:U sobre la composición del compartimento mielóide infiltrando tumor.** Número absoluto de las distintas poblaciones mieloides dentro de tumores B16-OVA, caracterizadas como se detalló en la Figura II-2. Cada punto corresponde a un animal. Se grafica media. t-test de Student * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$.

Determinación de macrófagos protumorales M2-like como fuente de IL10 en el microambiente tumoral

La naturaleza protumoral de los macrófagos polarizados a un perfil M2-like se basa en distintas propiedades que tienen los mismos para facilitar el crecimiento de la masa tumoral. En este trabajo pudimos determinar a esta población mielóide como la principal fuente productora de la citocina inmunomoduladora IL10. Esta citocina tiene múltiples efectos protumorales, siendo el principal la inhibición de la presentación antigénica por parte de células dendríticas y macrófagos (Mosser & Zhang, 2008). Utilizando citometría de flujo intracelular se determinó que el tratamiento con poli A:U disminuye significativamente el número absoluto de macrófagos M2-like productores de IL10 (Figura II 5). En este mismo ensayo se evaluó la capacidad de los macrófagos provenientes de animales tratados con poli A:U de producir IL10 midiendo la intensidad de fluorescencia media (IFM). Como resultado se observaron iguales cantidades de IL10 por célula al no modificarse dicha IFM (Figura II 5). Por ende, el tratamiento con poli A:U no modifica la capacidad de estos macrófagos M2-like para producir IL10, pero al disminuir el número de éstas células infiltrando el tumor reduce la cantidad de esta citocina protumoral en el microambiente tumoral.

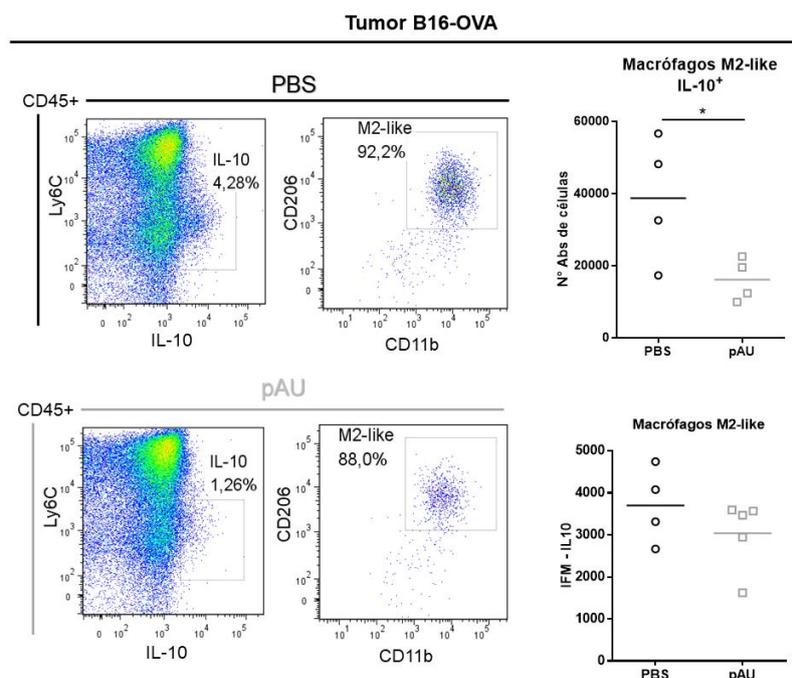


Figura II-5. **Disminución de macrófagos M2-like como fuente de IL-10 en tumor luego de poli A:U.** Determinación por citometría de flujo intracelular de la producción de la citocina inmunoregulatoria IL-10 por células caracterizadas como macrófagos M2-like (CD11b+; F4/80+; CD206+). Número absoluto de macrófagos M2-like e IFM para IL-10 en dichas células. Se grafica media. t-test de Student * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$.

Estado de activación de células dendríticas convencionales infiltrando tumor luego del tratamiento con poli A:U

Las células dendríticas son las células presentadoras de antígeno por excelencia, pudiendo presentar antígenos a células T vírgenes y producir su activación en órganos linfáticos, habiendo reportes que demuestran la capacidad de activar linfocitos T también en el sitio del tumor (Goc et al., 2014). A diferencia de los macrófagos, estas células se encuentran en muy baja cantidad infiltrando el microambiente tumoral, pero deben ser consideradas ya que logran activar a los verdaderos efectores de la inmunidad antitumoral, los linfocitos T CD8+ citotóxicos (M. L. Broz & Krummel, 2015). En este trabajo de tesis ya hemos descrito una disminución tanto en la frecuencia como en el número absoluto de ambos subtipos de células dendríticas (CDs CD11b+ y CDs CD103+) infiltrando tumor luego del tratamiento con poli A:U. A continuación, nos planteamos evaluar el estado de activación de estas células una vez recibido el esquema terapéutico, a través de la medición del marcador de activación CD86. En ratones del grupo control (PBS) observamos alrededor de un 50% de CDs CD86+, correspondiente a un fenotipo activado, el cual aumentó muy significativamente en el grupo de animales tratados con poli A:U a un 90% de CDs

CD86+. Este aumento en el estado de activación se observó tanto en CDs CD11b+ como en CDs CD103+ (Figura II 6). Estos resultados nos sugieren que al tiempo experimental evaluado estamos observando una disminución en el número de CDs infiltrando tumores B16-OVA, acompañado por un aumento en el estado de activación de las mismas en ratones tratados con poli A:U. La activación de CDs suele asociarse a un aumento en la capacidad de las mismas de presentar antígenos a linfocitos T, por lo que nos planteamos también evaluar el compartimiento linfoide luego del tratamiento con poli A:U.

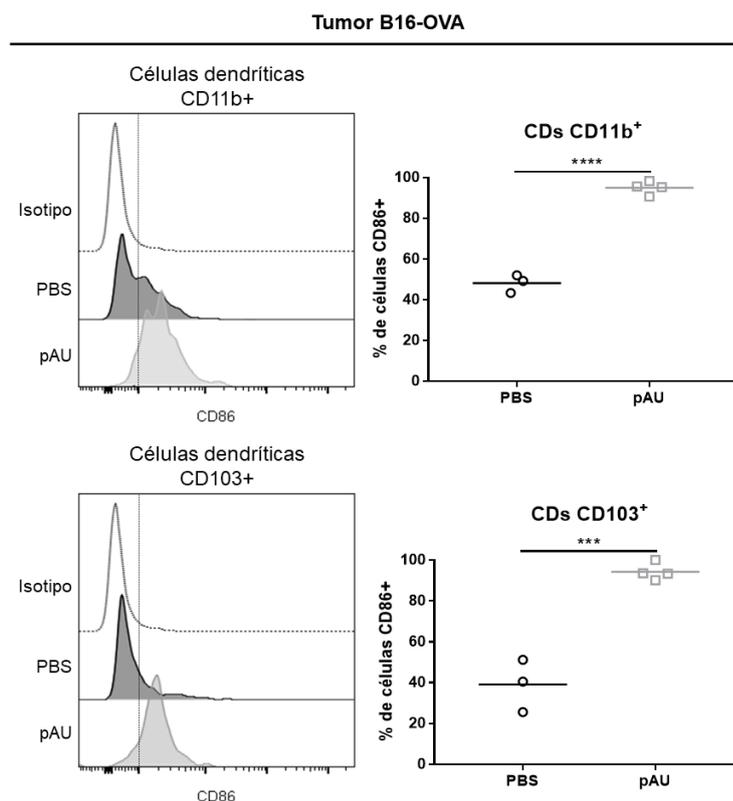


Figura II-6. **Mayor estado de activación de CDs infiltrando tumor luego del tratamiento con poli A:U.** Niveles de expresión de la molécula coestimuladora CD86 (izq) en CDs CD11b+ y CDs CD103+. Frecuencia de cada una de las subpoblaciones de CDs positivas para CD86 infiltrando tumores tratados o no con pAU (der). Se grafica media. t-test de Student *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001; ****p<0,0001.

IMPACTO DEL TRATAMIENTO CON POLI A:U SOBRE EL INFILTRADO TUMORAL LINFOIDE

Las células linfoides son un conjunto celular heterogéneo del sistema inmune constituido por linfocitos T y linfocitos B, de la rama de la inmunidad adaptativa, y células de la inmunidad innata como NKT (células T *natural killer*) y células linfoides innatas como NK (*natural killer*). Con el objetivo de evaluar el impacto de poli A:U sobre estas

poblaciones celulares se llevó a cabo una extensa caracterización de las poblaciones celulares linfoides infiltrando tumores B16-OVA utilizando citometría de flujo. Para esto nos basamos en estrategias de selección ampliamente utilizadas. En primer lugar, se identificaron linfocitos B (CD45+; CD19+), células NK (CD45+; NKp46+), células NKT (CD45+; NKp46+, TCRβ+) y linfocitos T (CD45+; TCRβ+), discriminando subpoblaciones de linfocitos T en citotóxicos CD8+ y cooperadores CD4+. A su vez, se identificaron subtipos dentro de los linfocitos T cooperadores CD4+ denominados linfocitos T CD4+ convencionales o Tconv (CD4+; Foxp3-) y linfocitos T regulatorios o Treg (CD4+; Foxp3+) (Figura II 7).

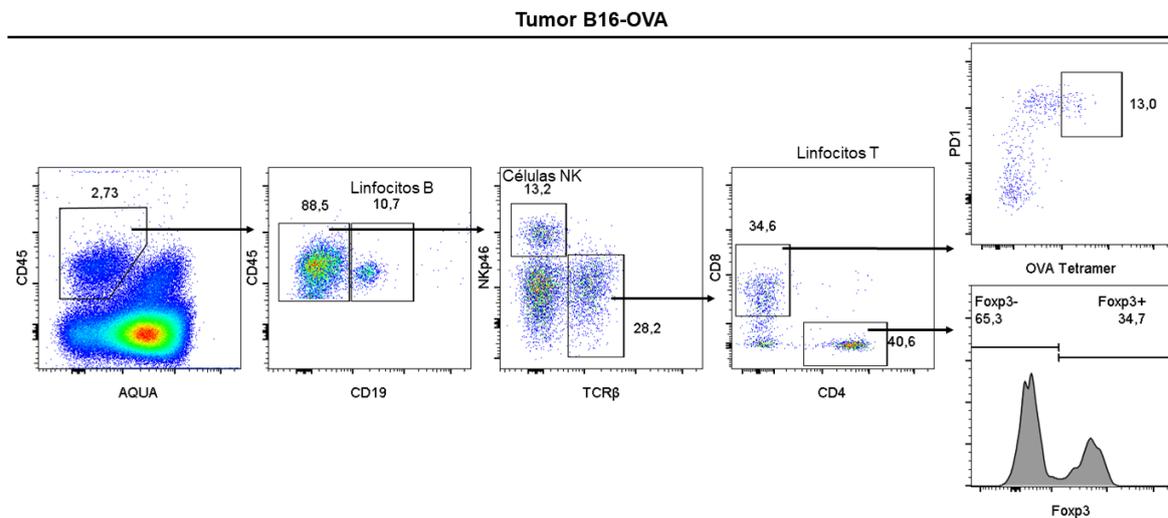


Figura II-7. Caracterización de células del linaje linfóide infiltrando tumores B16-OVA no tratados. Estrategia de selección o *gate* utilizada para identificar células linfoides dentro del microambiente tumoral por citometría de flujo.

Posteriormente, al analizar las poblaciones linfoides luego del tratamiento con poli A:U, se observó una disminución significativa en el porcentaje de linfocitos B infiltrando los tumores B16-OVA (de un 10% a un 5% dentro de todos los leucocitos) junto con un aumento significativo de linfocitos T CD8+ citotóxicos (de un 7% a un 20% dentro de todos los leucocitos). El resto de las poblaciones linfoides no sufrieron cambios significativos luego del tratamiento peritumoral con poli A:U (Figura II 8A). Nuevamente para estandarizar los resultados se obtuvo el número absoluto de células por gramo de tumor y se observaron los mismos resultados: una disminución significativa en el número de linfocitos B de 200.000 a 90.000 células/gr y un aumento significativo en el número de linfocitos T CD8+ de 150.000 a 500.000 células/gr (Figura II 8B).

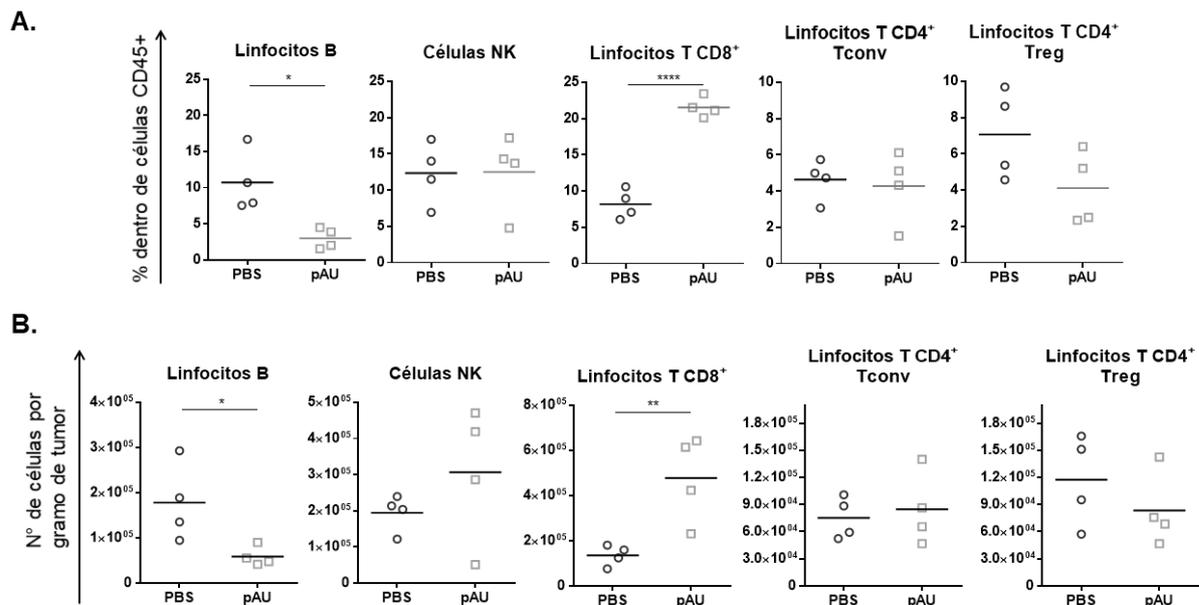


Figura II-8. **Efecto del tratamiento con poli A:U sobre la composición del compartimento linfóide infiltrando tumor. A)** Frecuencia dentro del total de leucocitos (CD45+) de las distintas poblaciones celulares linfoides dentro del tumor. **B)** Número absoluto de las distintas poblaciones linfoides infiltrando tumores B16-OVA. Cada punto corresponde a un animal. Se grafica media. t-test de Student *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001; ****p<0,0001.

Dentro del compartimento T, se incluyen linfocitos T citotóxicos CD8+ y linfocitos T cooperadores CD4+, que a su vez, como se mencionó anteriormente presentan dos subtipos con funciones efectoras muy distintas: por un lado, podemos encontrar los CD4+ convencionales con función cooperadora (Tconv) y los CD4+ reguladores con función supresora de proliferación (Treg). En nuestro análisis se observó que luego del tratamiento con poli A:U, el compartimento T se veía modificado. Se determinó un incremento marcado en linfocitos T CD8+ de un 30% a un 60%, mientras que las células Treg disminuyeron de un 25% a un 10%. Por otro lado, las células Tconv no se vieron afectadas (Figura II 9).

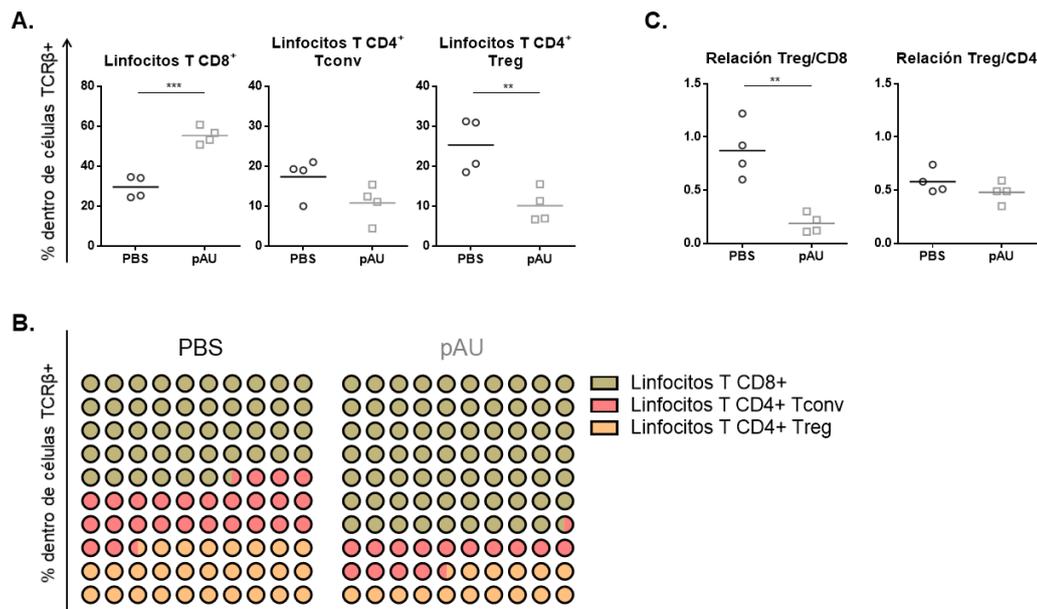


Figura II-9. **El tratamiento con poli A:U aumenta la cantidad de linfocitos T CD8+ intratumorales.** **A)** Frecuencia dentro del total de linfocitos T (TCRβ+) de las distintas subpoblaciones de éstos en tumor. **B)** Representación gráfica del porcentaje de cada una de las subpoblaciones de linfocitos T dentro del total de los mismos. Cada punto corresponde a un animal. Se grafica media. t-test de Student *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001.

Células con capacidad citotóxica presentaron mayor estado de activación en ratones tratados con poli A:U

Como se ha mencionado anteriormente, los linfocitos T CD8+ son de esencial importancia en una respuesta inmune antitumoral, ya que median la lisis de las células neoplásicas a través de la liberación de granzimas y perforinas como mecanismos efectores. Es por esto que se considera un marcador predictivo de buen pronóstico al número elevado de linfocitos T CD8+ infiltrando tumores (Galon et al., 2006). Teniendo en cuenta esto, evaluamos marcadores tales como PD1 en linfocitos T CD8+ junto con marcadores de citotoxicidad, como granzima B. Como resultado, se observó un marcado aumento en el porcentaje de linfocitos T CD8+ expresando PD1 luego del tratamiento con poli A:U, de un 50% a un 90%, lo que nos da indicio de un mayor estado de activación. Por otro lado, a partir de la IFM de este marcador se determinó que cada una de estas células expresaron la misma cantidad de PD1 (Figura II 10A). Al analizar granzima B, se determinó un aumento significativo en el porcentaje de linfocitos T CD8+ expresando dicha molécula luego del tratamiento con poli A:U, de un 20% a un 60%, lo que da indicio de un mayor número de células capaces de inducir la lisis de células tumorales. Nuevamente, no se observaron cambios en la cantidad de granzima B

expresada por cada linfocito T CD8+, medido por la IFM de dicho marcador (Figura II 10B).

Por último, nos planteamos detectar el efecto del tratamiento con poli A:U sobre los linfocitos T CD8+ específicos para un antígeno tumoral. Es por ello que utilizamos tumores B16-OVA que presentan a la ovoalbúmina (OVA) como antígeno tumoral experimental. A partir de esto, evaluamos los linfocitos T CD8+ específicos para OVA con tetrámeros conjugados a fluorocromos que permiten la detección de células T con un receptor o TCR específico para péptidos de OVA. Pudimos detectar un aumento en el porcentaje de linfocitos T CD8+ específicos para OVA en ratones que recibieron el tratamiento con poli A:U, de un 7% a un 21% del total de linfocitos T CD8+ (Figura II 10C).

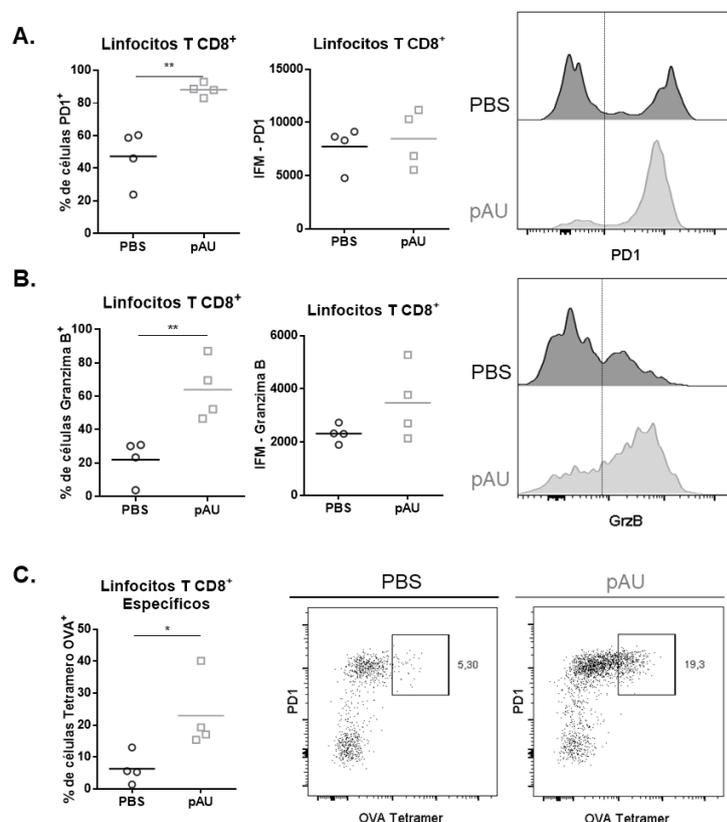


Figura II-10. **El tratamiento con poli A:U aumenta el estado de activación de linfocitos T CD8+ intratumorales.** **A)** Frecuencia de linfocitos T CD8+ positivos para PD1. IFM para PD1, con un individuo representativo. **B)** Frecuencia de linfocitos T CD8+ positivos para granzima B. IFM para granzima B, con un individuo representativo. **C)** Frecuencia de linfocitos T CD8+ positivos para tetrámero de OVA. Dot-plot de un animal representativo de grupo PBS y pAU. Cada punto corresponde a un animal. Se grafica media. t-test de Student *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001.

Como se mencionó con anterioridad, las células NK también presentan capacidad citotóxica, pero pertenecen a la rama de la inmunidad innata. Utilizan también como moléculas efectoras granzimas y perforinas para inducir muerte celular. Es por

esta capacidad citotóxica que se las ve implicada en procesos tempranos de eliminación de células tumorales controlando el crecimiento de una masa tumoral (Vivier, 2006). En nuestro modelo experimental se observó que luego del tratamiento con poli A:U, las células NK no varían en cantidad, pero presentan cambios fenotípicos. Dentro de estos cambios, se detectó un aumento en el porcentaje de células NK que expresa granzima B (de un 30% a un 60%) y además que cada célula presenta mayores niveles de dicha serin-proteasa al tener mayores niveles de IFM de granzima B (Figura II 11A). Además, se observó un aumento significativo en el porcentaje de células NK intratumorales que expresan la molécula KLRG1 (de un 20% a un 35% en animales tratados). KLRG1 (*Killer-Cell Lectin Like Receptor G1*) es un receptor de transmembrana presente en células NK y linfocitos T, que para el caso de células NK está asociado a un fenotipo de célula más madura con mayor capacidad funcional. En cáncer, a este fenotipo se lo ha asociado a una mayor capacidad de proteger del proceso de metástasis (Renner et al., 2014). A su vez, se determinó un aumento en la expresión de dicho receptor en cada una de las células NK, determinado por un aumento en la IFM de KLRG1 (Figura II 11B). Todos estos datos sugieren que luego del tratamiento con poli A:U, las células NK presentan un estado de activación que se corresponde con una actividad antitumoral aumentada, dado por un perfil más maduro con mayor capacidad citotóxica.

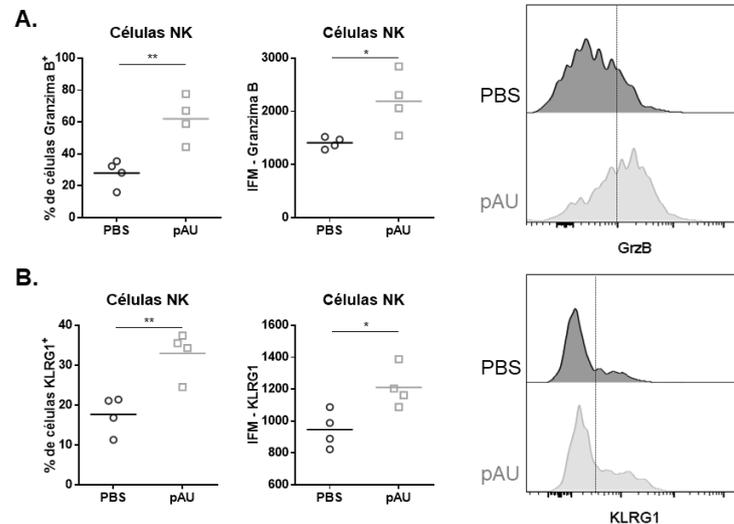


Figura II-11. **El tratamiento con poli A:U aumenta el estado de activación de células NK intratumorales.** **A)** Frecuencia de células NK positivas para granzima B. IFM para granzima B, con un individuo representativo. **B)** Frecuencia de células NK positivas para KLRG1. IFM para KLRG1, con un individuo representativo. Cada punto corresponde a un animal. Se grafica media. t-test de Student *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001.

EFFECTO DEL TRATAMIENTO PERITUMORAL CON POLI A:U SOBRE LOS GANGLIOS LINFÁTICOS

Los ganglios linfáticos son órganos linfáticos secundarios donde ocurre el proceso de presentación antigénica por parte de células dendríticas a linfocitos T, los cuales se activan y proliferan al detectar a su antígeno específico. Es por esto que la gran mayoría de las células inmunes dentro del ganglio son linfocitos con una menor cantidad de células mieloides. En nuestro modelo de terapia determinamos las células mieloides en el ganglio drenante de tumor (GD), que corresponde al ganglio inguinal derecho, ya que los tumores fueron inoculados en el flanco inferior derecho de los animales. Como control se analizó ganglio inguinal izquierdo como ganglio no drenante de tumor (GND). A partir de esto se determinó que las células mieloides formando parte de ganglios inguinales representan un 3% del total de las células CD45+, mientras que el 97% restante corresponde a linfocitos T, linfocitos B y células NK. A través de citometría de flujo se observaron las mismas poblaciones mieloides ya establecidas anteriormente utilizando la estrategia de selección definida a continuación (Figura II 12).

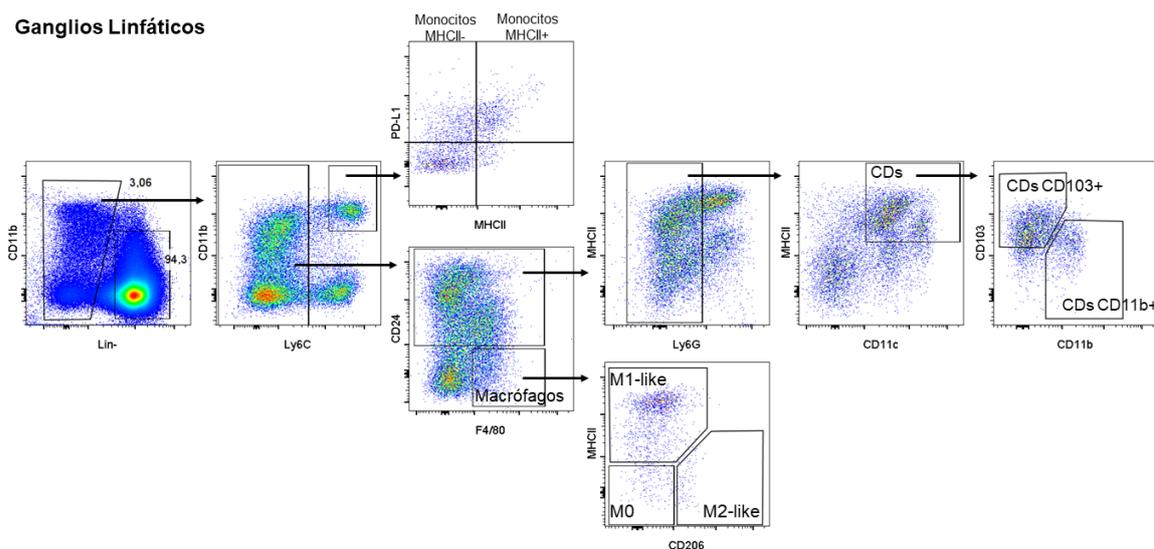


Figura II-12. **Caracterización de células mieloides presentes en ganglios linfáticos.** Estrategia de selección o *gate* para identificar CDs y sus subpoblaciones (CD103+ y CD11b+), macrófagos y sus subpoblaciones (M1-like y M2-like) y monocitos MHCII- y MHCII+.

En primera instancia se observó un mayor número de células mieloides en ganglios drenantes de tumor en relación a ganglios no drenantes por la mera presencia del tumor ya que allí se está montando la respuesta inmune antitumoral. A su vez, no se detectó ningún efecto del tratamiento con poli A:U sobre el número de células mieloides presentes en ganglios no drenantes, apoyando el efecto local del tratamiento. Por otro lado, se observó que el tratamiento con poli A:U aumenta de manera

significativa el número absoluto de monocitos MHCII⁺ en ganglio drenante mientras que las demás poblaciones del mismo ganglio no sufren cambios significativos (Figura II 13).

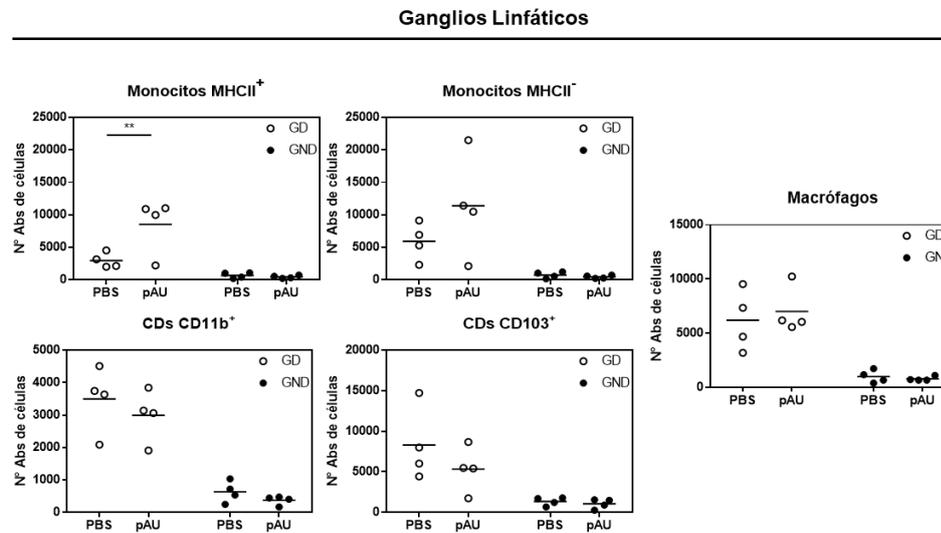


Figura II-13. Efecto de poli A:U sobre las células mieloides presentes en ganglios linfáticos. Número absoluto de las distintas poblaciones celulares mieloides presentes en ganglio drenante (GD) y ganglio no drenante (GND) en ratones tratadas con pAU o PBS. Se grafica media. t-test de Student *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001.

Al estudiar el fenotipo de estas células mieloides en ganglio, observamos que el tratamiento con poli A:U afecta exclusivamente a las células dendríticas CD103+, con un aumento en el porcentaje de las mismas expresando el marcador de activación CD86 de 54% a 63%. A su vez, se observó un aumento en la expresión de dicho marcador de activación por cada célula dendrítica CD103+ a través del aumento en la IFM de CD86 (Figura II 14A). No se detectaron cambios significativos en el estado de activación de células dendríticas CD11b+, ni en el fenotipo de las demás células mieloides presentes en ganglios. Estos resultados nos sugieren que el tratamiento local con poli A:U aumenta el estado de activación de células dendríticas CD103+ presentes en ganglios, lo que llevaría a una presentación antigénica más eficiente hacia linfocitos T CD8+, generándose CTL específicos para antígenos tumorales (OVA) que se encontraron incrementados en ratones tratados con poli A:U.

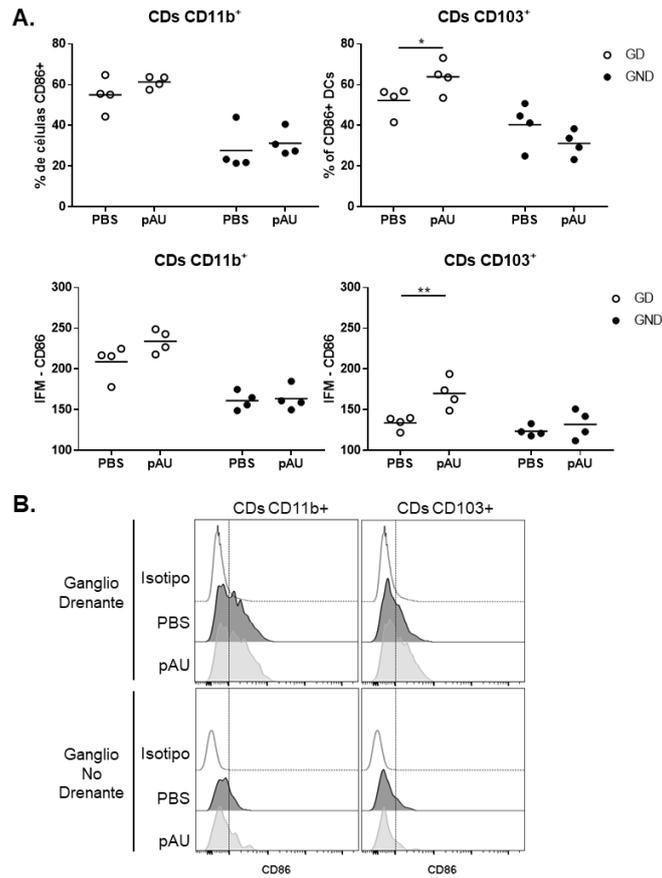


Figura II-14. **Polí A:U induce la activación de CDs CD103+ presentes en ganglios drenantes de tumor.** **A)** Frecuencia de CDs CD11b⁺ y CDs CD103⁺ positivas para CD86 en GD y GND de ratones tratados o no con pAU. IFM de CD86 para cada subpoblación de CDs en GD y GND. **B)** Histograma para CD86 en subpoblaciones de CDs presentes en GD y GND de un animal representativo de cada grupo experimental. Se grafica media. t-test de Student *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001.

Conclusiones Parciales II:

- El tratamiento peritumoral con tres dosis de poli A:U tiene un claro efecto terapéutico, disminuyendo el volumen y peso tumoral de animales tratados.
- El tratamiento con poli A:U modifica el número de algunas poblaciones mieloides infiltrando tumor. Disminuye macrófagos (M1-like y M2-like), disminuye ambas poblaciones de CDs CD103+ y CDs CD11b+, pero no modifica el número de monocitos infiltrantes de tumor.
- Los macrófagos M2-like son la principal fuente mieloides de IL-10 intratumoral.
- Tanto CDs CD103+ como CDs CD11b+ intratumorales presentan mayor estado de activación luego del tratamiento con poli A:U.
- El tratamiento induce un aumento muy marcado del número de linfocitos T CD8+ infiltrando tumor, lo cual se traduce en una relación Treg/CD8+ disminuida. Además, disminuye el número de linfocitos B intratumorales.
- poli A:U modifica el fenotipo de estos linfocitos T CD8+ intratumorales hacia un perfil más activado, con aumento en la expresión de granzima B y PD1.
- El tratamiento aumenta la frecuencia de linfocitos T CD8+ específicos para el antígeno tumoral OVA.
- En ganglio drenante el efecto del tratamiento sobre la minoritaria población mieloides es leve, induciendo solo un aumento en el número de monocitos MHCII+.
- En ganglio drenante, el tratamiento con poli A:U lleva a un estado más activado a las CDs CD103+ “migratorias”, y no a las CDs CD11b “residentes”.

OBJETIVO ESPECÍFICO III: ESTUDIAR LA FUNCIONALIDAD DEL COMPARTIMIENTO MIELOIDE LUEGO DEL TRATAMIENTO CON POLI A:U.

PARTE IIIA: Impacto de poli A:U sobre la expresión del ligando inhibitorio PD-L1. Ensayos funcionales de monocitos infiltrantes de tumor.

PARTE IIIB: Efecto de los IFN-I inducidos por poli A:U sobre el infiltrado tumoral mieloide. Rol de TNF en la eficacia del tratamiento con poli A:U.

ESTUDIO DEL EFECTO DEL TRATAMIENTO CON POLI A:U SOBRE EL EJE PD1-PDL1

Como se mencionó anteriormente, PD1 es un receptor de transmembrana presente en la superficie de células inmunes como son los linfocitos T que constituye uno de los tantos mecanismos que presenta el sistema inmune para contraer o controlar una respuesta inmune una vez que se llevó a cabo su función efectora. En el caso de linfocitos T, al activarse la vía de PD1 se induce apoptosis, anergia, agotamiento o producción de la citocina inmunoregulatoria IL10. Todos estos procesos llevan a frenar la respuesta inmune (Boussiotis, 2016). El ligando canónico de PD1 es PD-L1 (*Programmed death-ligand 1*), también una proteína de transmembrana capaz de expresarse en células presentadoras de antígeno luego de que las mismas se activan por distintos estímulos, como IFN γ e interferones tipo I. Este proceso ocurre como parte de un mecanismo de regulación para poder frenar una respuesta inmune exacerbada que pueda llevar a un proceso descontrolado dando autoinmunidad (Yamazaki et al., 2002). Teniendo en cuenta que poli A:U es capaz de inducir la producción de IFN β por parte de células mieloides en el microambiente tumoral (Nocera et al., 2016) nos propusimos evaluar la expresión de PD-L1 en el infiltrado tumoral.

En primera instancia se determinó expresión de PD-L1 en la condición control (PBS) para identificar las células expresando dicho marcador infiltrando tumores B16-OVA (Figura III 1). Se observó que el 83% de los macrófagos M1-like expresan PD-L1, el 67% de los macrófagos M2-like fueron positivos para el marcador, mientras que solo el 52% de los macrófagos M0 expresaron PD-L1. Dentro de las CDs, la subpoblación CD11b+ expresó un 72% de PD-L1, mientras que la subpoblación CD103+ un 38%. Al analizar monocitos, se apreció expresión de PD-L1 en un 75% de los monocitos MHCII+, y en sólo un 25% de los monocitos MHCII-. Por último, sólo un 9% de los linfocitos B fueron positivos para PD-L1. Estos resultados son el promedio de diez animales, provenientes de dos experimentos independientes. (Figura III-2B, datos PBS).

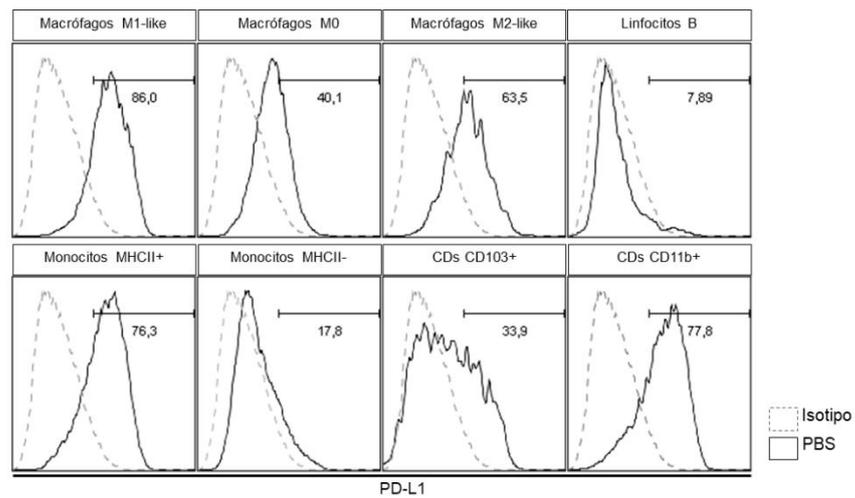
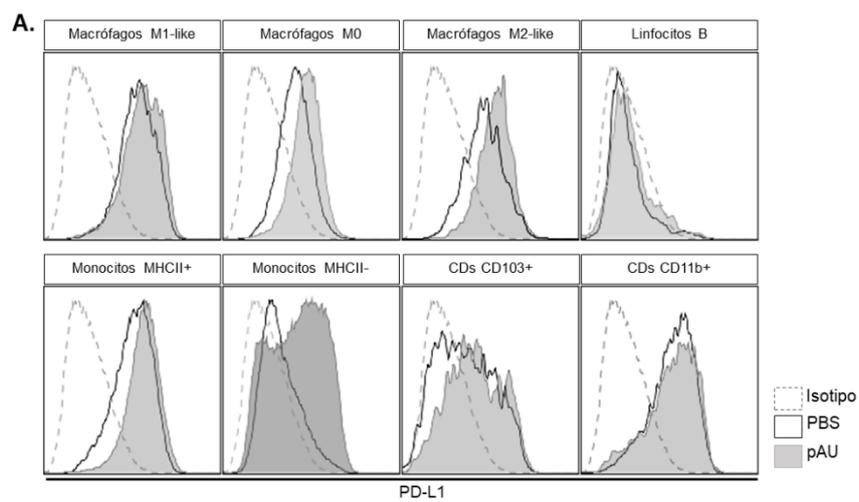


Figura III-1. **Expresión de PD-L1 en células inmunes infiltrantes de tumores no tratados.** Histograma para PD-L1 en las distintas poblaciones de células inmunes infiltrantes de tumores B16-OVA, determinado por citometría de flujo. Porcentajes correspondientes a un animal (PBS) representativo.

Luego del tratamiento con poli A:U se detectó un aumento significativo principalmente en el porcentaje de monocitos MHCII- expresando PD-L1 de un 25% a un 54%. A su vez, se apreció un incremento significativo de macrófagos M0 y M2-like positivos para PD-L1, de un 52% a 67% para los primeros y de 67% a 84% para macrófagos M2-like (Figura III 2A y 2B). Al analizar la expresión de PD-L1 por célula no se detectó aumento significativo en la IFM, por lo que las células positivas para ese marcador no aumentaron su expresión (Figura III 2C).



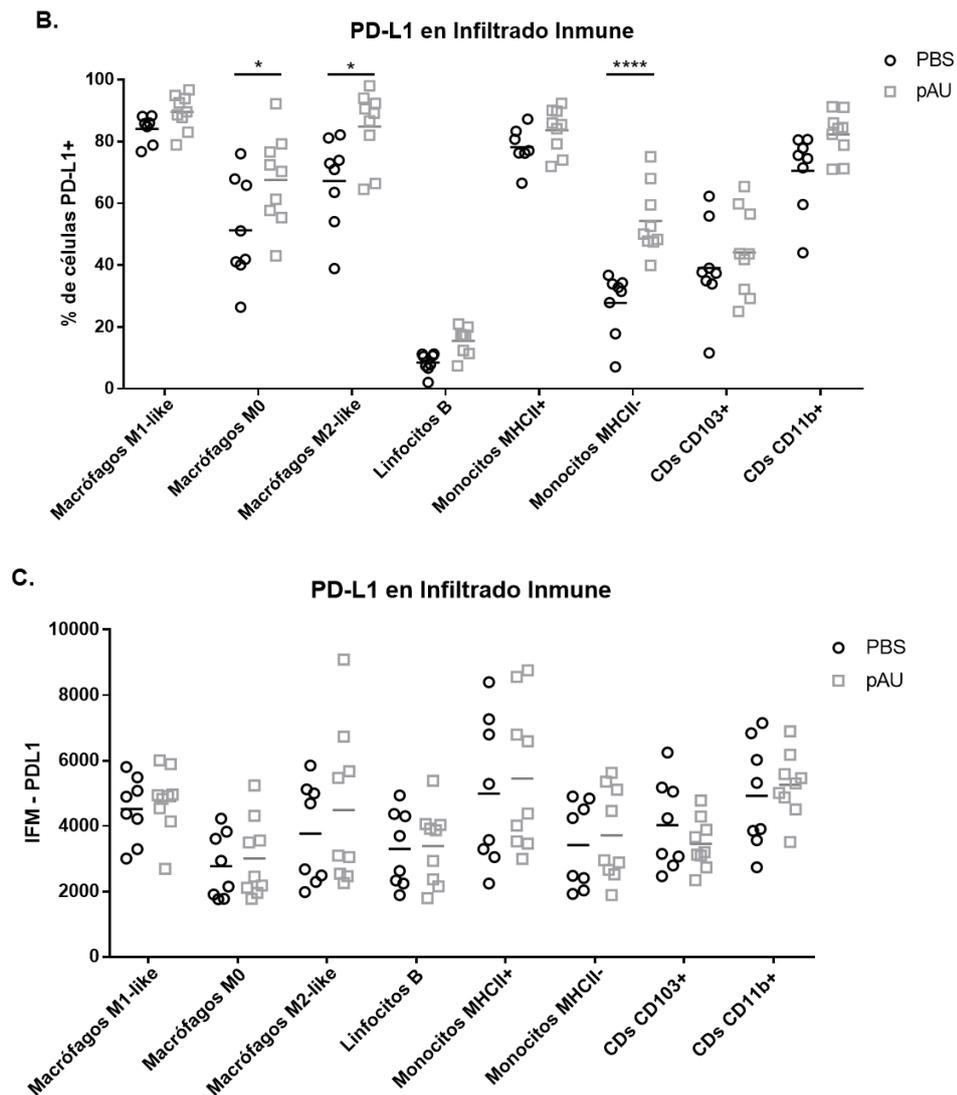


Figura III-2. **Poli A:U induce un aumento en la frecuencia de células PD-L1 positivas en tumor.** **A)** Histograma para PD-L1 en las distintas poblaciones de células inmunes infiltrantes de tumores B16-OVA en un animal tratado con pAU o PBS. **B)** Frecuencia de células positivas para PD-L1 en ratones tratados con pAU o PBS. **C)** IFM para PD-L1 dentro de cada población celular en ratones tratados con pAU o PBS. Cada punto representa un individuo. Se grafica media. t-test de Student * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

EFFECTO DE LOS IFN-I INDUCIDOS POR POLI A:U SOBRE LOS FENÓMENOS OBSERVADOS EN LAS POBLACIONES MIELOIDES INFILTRANTES DE TUMOR

Con el objetivo de estudiar el rol que cumplen los IFN-I producidos por el tratamiento con poli A:U sobre el infiltrado de linaje mieloide, nos planteamos llevar a cabo nuestro esquema terapéutico en ratones IFNAR1^{-/-}, los cuales no expresan el receptor IFNAR1 por lo que sus células son incapaces de detectar IFN-I en el medio.

Ratones IFNAR1^{-/-} fueron inoculados con 5.10⁵ células B16-OVA, recibiendo el mismo esquema de tratamiento con poli A:U que ratones WT al día 7, 9 y 11 luego de la inoculación del tumor. Al finalizar el experimento se observó que la eficacia del tratamiento se perdía en dichos ratones. Se observó una leve tendencia de disminución en la cinética de crecimiento tumoral sólo al último día en ratones IFNAR1^{-/-}, aunque sin diferencias estadísticamente significativa, sin poder conseguir la misma eficacia observada que en ratones WT. Al determinar el peso tumoral no se detectaron diferencias significativas entre el grupo control (PBS) y el grupo tratado (pAU) (Figura III-3A). Por otro lado, cuando evaluamos las distintas poblaciones mieloides infiltrando tumor en ambos grupos experimentales, no se observaron las diferencias encontradas anteriormente, sólo se encontró una pequeña diferencia en la frecuencia de macrófagos dada por un aumento en los macrófagos M1-like con muy poco significado biológico. No se detectó disminución en la frecuencia de ninguna de las subpoblaciones de CDs encontrada en ratones WT (Figura III-3B), indicando que los IFN-I inducidos por el tratamiento con poli A:U son los responsables de la disminución en CDs y subtipos de macrófagos dentro del microambiente tumoral.

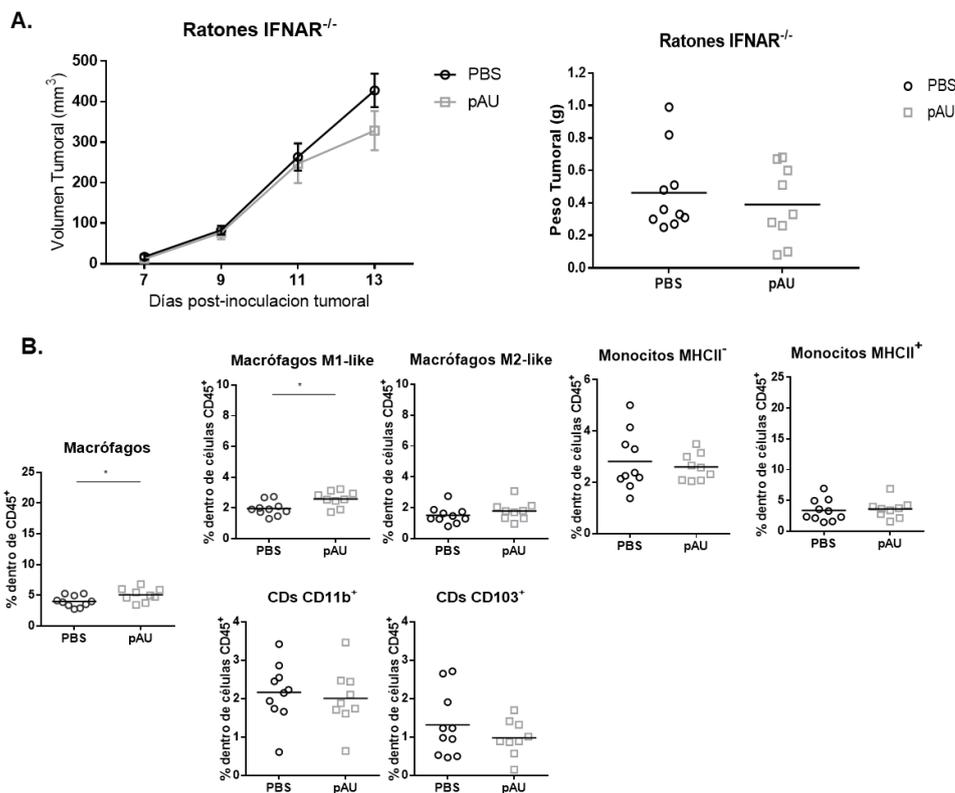


Figura III-3. La eficiencia del tratamiento con poli A:U se pierde en ratones IFNAR1^{-/-}. A) Monitoreo del volumen tumoral en ratones IFNAR1^{-/-} durante el esquema de administración de pAU al día 7, 9 y 11 luego de la inoculación del tumor B16-OVA, grupo control recibió vehículo (PBS). Se grafica media±SEM. Análisis por ANOVA de dos vías post-test de Sidak. **p<0,01; ***p<0,001; ****p<0,0001. Determinación del peso tumoral al día de sacrificio. Se grafica media. t-test de Student *p<0,05; **p<0,01. **B)** Frecuencia dentro del total de leucocitos (CD45+) de cada una de las poblaciones mieloides especificadas. N=10/grupo.

A su vez, al evaluar el fenotipo dentro de la población de monocitos, se apreció que el aumento en la frecuencia de monocitos MHCII- positivos para PD-L1 detectado luego del tratamiento con poli A:U en ratones WT se vio abolido. Lo que indicaría nuevamente que los IFN-I inducidos por el tratamiento son los responsables de este cambio fenotípico en estos monocitos (Figura III-4). Cabe destacar, que en condiciones fisiopatológicas normales (grupo PBS) la proporción de monocitos entre un animal WT y uno IFNAR1^{-/-} son diferentes. Los ratones WT presentan alrededor de un 50% de monocitos MHCII+ y el otro 50% de monocitos MHCII-, mientras que ratones IFNAR1^{-/-} presentan alrededor de un 60% de monocitos MHCII+ y el 40% restante son monocitos MHCII- (Figura III-4 PBS^{wt} vs PBS^{IFNAR1^{-/-}}).

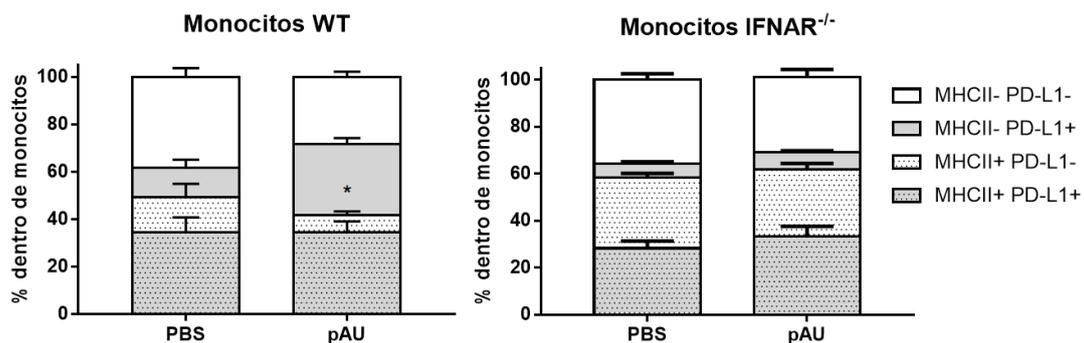


Figura III-4. El aumento en la frecuencia de monocitos MHCII- expresando PD-L1 está dada por los IFN-I inducidos por poli A:U. Distribución de las subpoblaciones de monocitos MHCII+ y MHCII- con su expresión de PD-L1 tratados o no con pAU, tanto para ratones WT como IFNAR1^{-/-}. Se grafica media±SEM. t-test de Student *p<0,05; **p<0,01. N=10/grupo.

Estos resultados sugieren que los efectos observados sobre las poblaciones mieloides infiltrantes de tumor luego del tratamiento con poli A:U son consecuencia de los IFN-I generados por este ligando de TLR3, que actuaría sobre CDs intratumorales las cuales liberarían IFN-I que señalarían vía el receptor IFNAR1 presente en las células mieloides.

IMPACTO DE TNF EN LA EFICACIA DEL TRATAMIENTO CON POLI A:U

Dentro de las citocinas con función antitumoral se encuentra el factor de necrosis tumoral o TNF (*Tumour Necrosis Factor*). Se ha demostrado que las principales células productoras de TNF son las células mieloides induciendo la muerte de células tumorales dando focos necróticos en modelos murinos, que pueden ser incrementadas utilizando inmunoterapia basada en CpG-ODN como ligando de TLR9 (Iida et al., 2013). En nuestro modelo experimental determinamos a macrófagos y monocitos como principales células productoras de TNF en el microambiente tumoral. Los macrófagos corresponden al 20% de las células productoras de TNF mientras que cada uno de los subtipos de monocitos corresponden al 40% de las células TNF+ (Figura III-5A). Luego del tratamiento con poli A:U se observó un aumento en el número absoluto de monocitos MHCII- productores de TNF infiltrando los tumores, mientras que no se observaron cambios significativos en la cantidad de macrófagos y monocitos MHCII+ productores de TNF luego del tratamiento (Figura III-5B). Al analizar la IFM de TNF dentro de cada una de estas tres poblaciones mieloides no se observaron cambios, indicando que la cantidad de TNF siendo producido por cada célula es la misma (Figura III-5C).

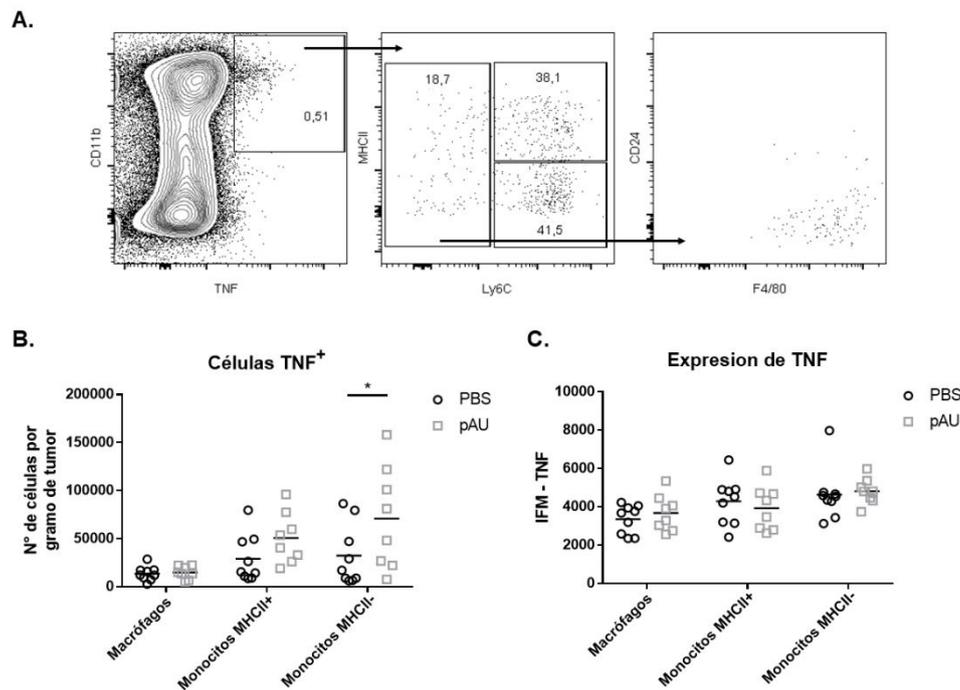


Figura III-5. **Monocitos y macrófagos como fuente de TNF intratumoral.** **A)** Representación gráfica (Dot-plot) de la producción de TNF por monocitos y macrófagos intratumorales. **B)** Número absoluto de cada una de las poblaciones productoras de TNF infiltrando tumores B16-OVA tratados con pAU o PBS como control. **C)** IFM para TNF dentro de cada población celular en ratones tratados con pAU o PBS. Cada punto representa un individuo. Se grafica media. t-test de Student *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001.

Con el objetivo de determinar el rol que está cumpliendo este aumento de monocitos MHCII- productores de TNF, llevamos a cabo el tratamiento con poli A:U en ratones deficientes para el receptor de TNF (TNFRp55^{-/-}), lo que implica que esta citocina no puede señalizar en las células de estos ratones. Estos ratones fueron generados en 1993, donde se demostró que la gran mayoría de los efectos de TNF se desencadenan luego de señalizar a través de este receptor. Cabe destacar que TNFRp75 es otro receptor de la citocina pero que media los efectos de la misma en mucha menor medida, es por esto que se generaron los ratones TNRFp55^{-/-} para estudiar el impacto de TNF en distintos modelos murinos (Pfeffer et al., 1993). Al analizar la cinética de crecimiento tumoral en estos ratones, observamos un efecto terapéutico menor al observado en ratones WT (comparar con Figura II-1), con una disminución significativa del volumen tumoral en ratones tratados con poli A:U sólo al día 13 post-inoculación tumoral (Figura III 6A-C). Al analizar el peso tumoral al día final del experimento observamos menor peso tumoral en ratones tratados con poli A:U, pero con menor diferencia que en ratones WT (Figura III-6B). Estos resultados indican que los monocitos MHCII- productores de TNF, cuyo número aumenta con el tratamiento de poli A:U, colaborarían en la eficiencia terapéutica del tratamiento, ya que los ratones incapaces de detectar esta citocina presentan un crecimiento tumoral más pronunciado que ratones WT tratados con poli A:U.

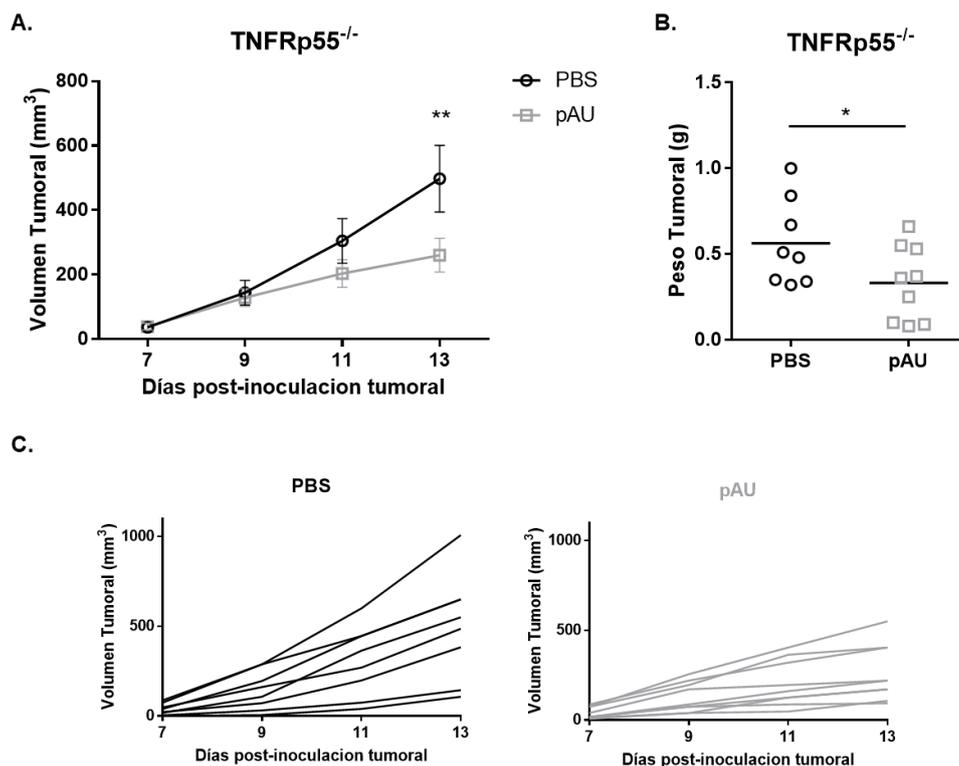


Figura III-6. **Ratones incapaces de detectar TNF presentan menor respuesta al tratamiento con poli A:U.** **A)** Monitoreo del volumen tumoral en ratones TNFRp55^{-/-} durante el esquema de administración de pAU al día 7, 9 y 11 luego de la inoculación del tumor B16-OVA, grupo control recibió vehículo (PBS). Se grafica media±SEM. Análisis por ANOVA de dos vías post-test de Sidak. **p<0,01; ***p<0,001; ****p<0,0001. **B)** Determinación del peso tumoral al día de sacrificio. Se grafica media. t-test de Student *p<0,05; **p<0,01. **C)** Representación de la cinética de crecimiento tumoral para cada animal graficado individualmente. N=8-9/grupo. Datos correspondientes a dos experimentos independientes.

ENSAYOS FUNCIONALES DE MONOCITOS INFILTRANTES DE TUMOR

Con la finalidad de entender mejor la función de los monocitos dentro del microambiente tumoral llevamos a cabo ensayos funcionales con los mismos, para ello utilizamos métodos de purificación y separación celular basados en *cell sorter* para aislar poblaciones basadas en sus marcadores celulares. En primer lugar, llevamos a cabo nuestro esquema de inmunoterapia basada en poli A:U en ratones WT portadores de tumores B16-OVA y al día final del experimento se purificaron células infiltrantes de tumor como se describió anteriormente y se las marcó utilizando anticuerpos monoclonales para marcadores de monocitos (CD45+; CD11b+; Ly6C+; Ly6G+, CCR2+). Utilizando un cell sorter pudimos purificar las dos subpoblaciones de monocitos MHCII- y MHCII+ con más de un 95% de pureza con los cuales llevamos a cabo dos ensayos funcionales. Por un lado, se realizó un ensayo de co-cultivo con esplenocitos para evaluar la capacidad que tienen de inducir proliferación/supresión de la proliferación de linfocitos T, tanto CD4+ como CD8+. Por otro lado, se realizó un ensayo

de invasión tumoral utilizando un modelo de tumores B16-OVA en tres dimensiones, donde se plantea evaluar la capacidad de estos monocitos de inducir la invasión de células tumorales.

En el ensayo de co-cultivo se sembraron células respondedoras, en nuestro caso esplenocitos totales (estimulados con anti-CD3, anti-CD28), marcadas con CFSE (Carboxyfluorescein succinimidyl ester) como indicador de seguimiento de la proliferación. A estas células respondedoras se le sumaron las células a las cuales se les quiere evaluar la capacidad de inducir proliferación/supresión de la proliferación, en este caso monocitos MHCII- y MHCII+ aislados de tumor. Como control se agregaron CPAs aisladas de bazo de un ratón no portador de tumor. Las células se sembraron en una relación 1:2, indicando una célula en estudio cada dos células respondedoras (detallado en Materiales y Métodos). Posteriormente, por citometría de flujo se evaluó la proliferación de las células T CD4+ y CD8+. En este ensayo se observó que tanto monocitos MHCII+ como MHCII- son capaces de inducir la proliferación *in vitro* tanto de linfocitos T CD4+ (de un 50% a un 90%), como de linfocitos T CD8+ (de un 55% a un 95%) (Figura III-7). Cabe destacar que son más eficientes en inducir proliferación de CD8+, observado a través de la generación filial a la cual son capaces de llevar a esta población, diluyendo más el colorante CFSE (Figura III-7A). No obstante, no se encontró un efecto de poli A:U sobre esta capacidad de inducir proliferación de estos monocitos. CPAs esplénicas de ratones no portadores de tumor, utilizadas como control, no fueron capaces de inducir proliferación de las células respondedoras, lo que indicaría que esta capacidad de aumentar la proliferación de linfocitos T es específica de estos monocitos presentes en tumor.

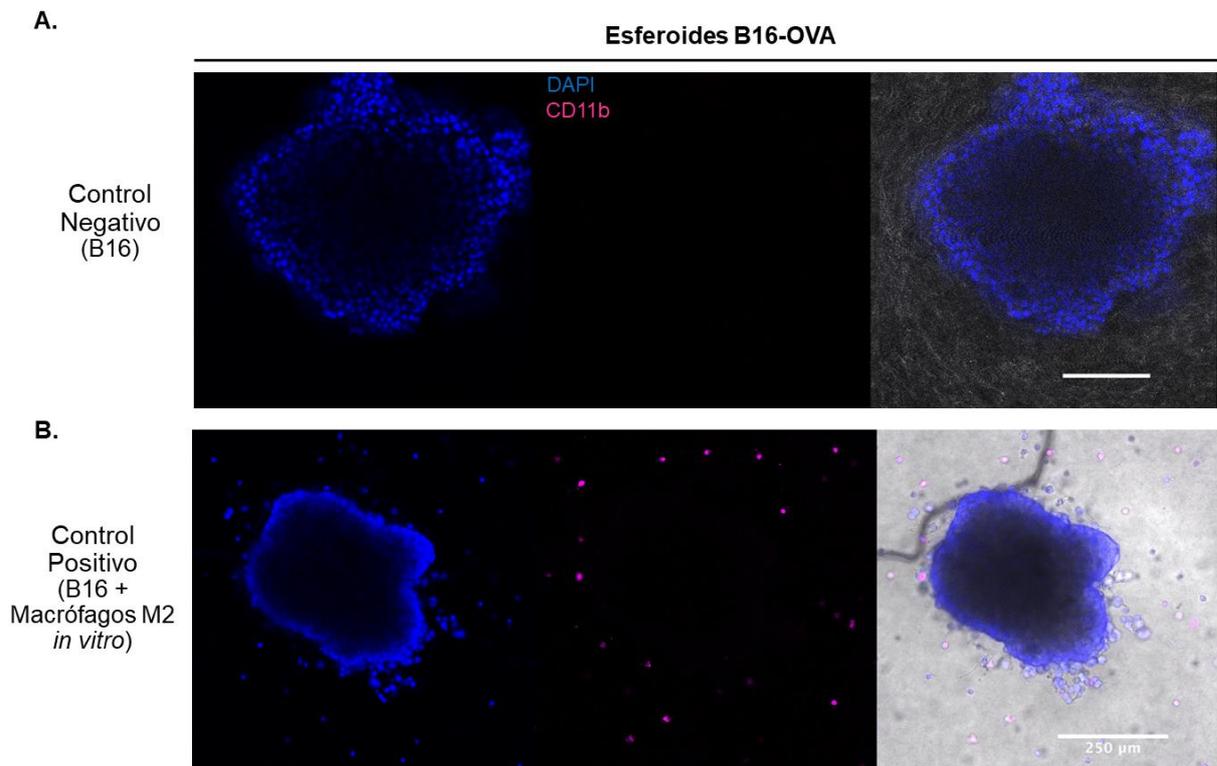


Figura III-8. **Esferoides B16-OVA sólo invaden al co-cultivarse con macrófagos M2. A)** Esferoides de B16-OVA no son capaces de invadir una matriz de colágeno en condiciones basales (medio de cultivo) luego de 7 días de cultivo. **B)** Control positivo de invasión con macrófagos M2 (CD11b+) diferenciados a partir de monocitos co-cultivados por 7 días con esferoides B16-OVA. DAPI en azul marca los núcleos, en rojo tinción para CD11b.

Por otro lado, los esferoides B16-OVA fueron cultivados con monocitos MHCII+ y MHCII- aislados por *cell sorter* a partir de tumores tratados o no con poli A:U. Luego del tiempo de co-cultivo, se fijaron las células y se las tiñó con DAPI para núcleos y CD11b para identificar los monocitos. Observamos que estos monocitos no fueron capaces de inducir invasión de las células tumorales a esa cantidad de células, independientemente de si su origen eran tumores tratados o no con poli A:U (Figura III 9A-B).

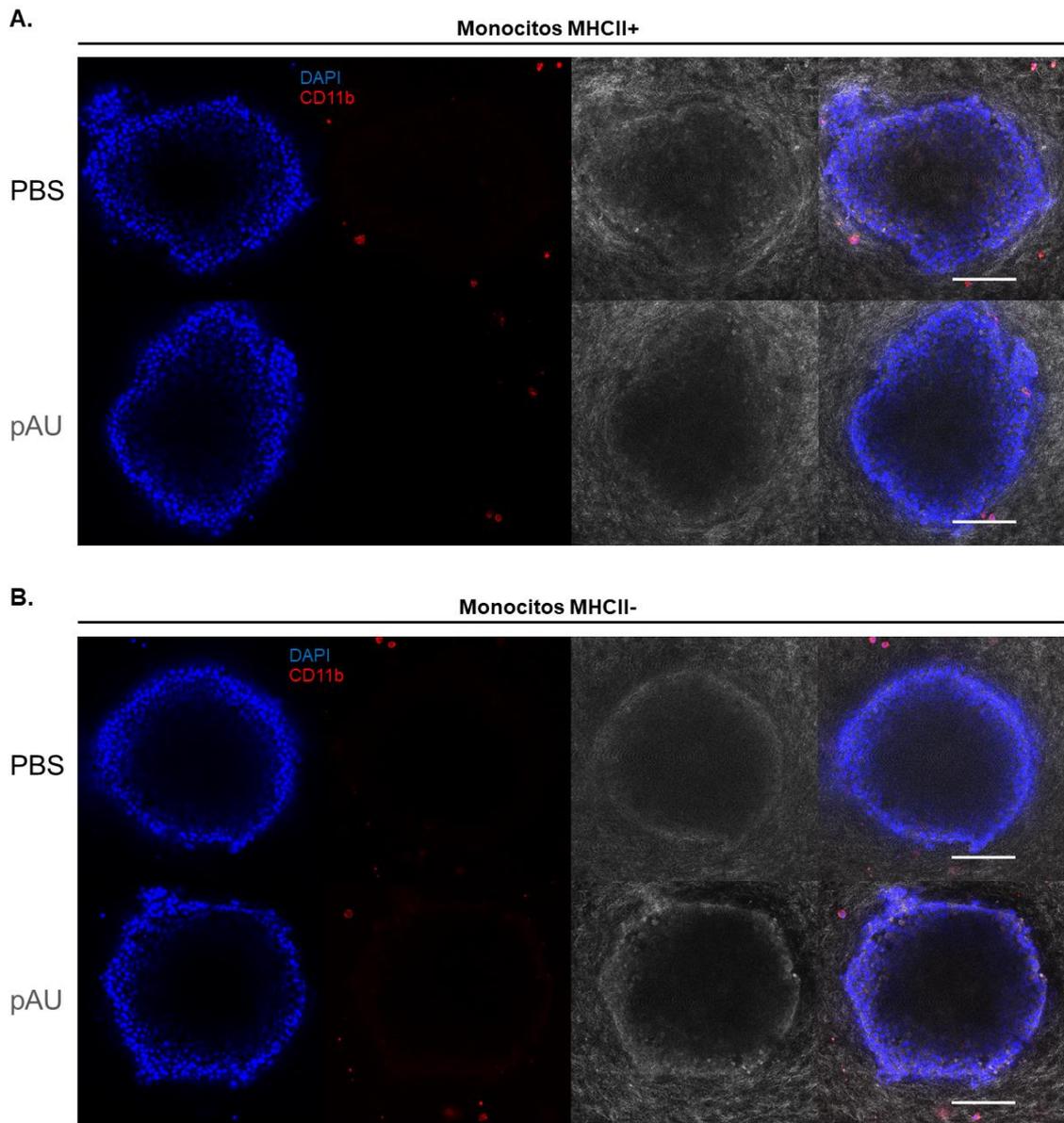


Figura III-9. **Monocitos MHCII- y MHCII+ no inducen invasión de esferoides B16-OVA. A)** Co-cultivo de monocitos MHCII+ (CD11b+) inmersos en una solución de colágeno por 7 días con esferoides B16-OVA. **B)** Co-cultivo de monocitos MHCII- (CD11b+) inmersos en una solución de colágeno por 7 días con esferoides B16-OVA. DAPI en azul marca los núcleos, en rojo tinción para CD11b.

Conclusiones Parciales III:

- Las CDs CD11b+, los macrófagos y los monocitos MCHII+ son las principales poblaciones mieloides que expresan PD-L1 en el microambiente tumoral.
- Luego del tratamiento con poli A:U hay un aumento en la frecuencia de macrófagos M0, M2-like pero principalmente de monocitos MHCII- positivos para PD-L1.
- La principal fuente mieloides de TNF intratumoral son los monocitos (tanto MHCII+ como MHCII-).
- El tratamiento con poli A:U induce un aumento en el número de monocitos MHCII- productores de TNF intratumoral.
- El efecto terapéutico de poli A:U se pierde en ratones IFNAR1-/-, lo que indica que la producción de IFN-I inducidos por el tratamiento son los responsables del efecto antitumoral de poli A:U.
- Los cambios en las poblaciones mieloides intratumorales luego del tratamiento se pierden en ratones IFNAR1-/-, indicando que los IFN-I inducidos por el tratamiento modulan a estas poblaciones a través de su receptor IFNAR1.
- El aumento en la frecuencia de monocitos MHCII- positivos para PD-L1 está dada por los IFN-I inducidos por poli A:U, al no observarse en ratones IFNAR1-/-.
- Ratones incapaces de detectar TNF (TNFRp55-/-) presentan menor respuesta terapéutica al tratamiento con poli A:U, indicando que el aumento de monocitos MHCII- productores de TNF participan parcialmente en el efecto terapéutico.
- Tanto monocitos MHCII+ como MHCII- tiene la capacidad de inducir la proliferación *in vitro* de linfocitos T CD4+ cooperadores y de CD8+ citotóxicos.
- Monocitos MHCII+ como MHCII- son incapaces de inducir invasión tumoral en ensayos de tumores 3D *in vitro*.
- El tratamiento con poli A:U modifica el infiltrado mieloides de manera tal que éste también puede contribuir positivamente al control del crecimiento tumoral e incluso abre la puerta a que este tratamiento sea utilizado con éxito o en terapias combinadas con poli A:U más anti-PDL1.

CAPÍTULO 4: DISCUSIÓN

DISCUSIÓN

GENERALIDADES DEL MODELO TERAPÉUTICO CON POLI A:U

En la actualidad se encuentran en evaluación preclínica y clínica múltiples estrategias de inmunoterapia contra el cáncer con el objetivo de mejorar la eficiencia del sistema inmune para controlar el crecimiento tumoral (Banchereau & Palucka, 2017; Brennick et al., 2017; Palomero & Ferrando, 2017; Ramello, Haura, & Abate-Daga, 2017). Algunas de ellas implican la administración de agentes inmunoestimuladores, como citocinas, con el objetivo de inducir inmunidad contra las células tumorales. Desafortunadamente, la administración sistémica de citocinas recombinantes como IFN- β e IL-12, tiene importantes limitaciones debido principalmente a su corta vida media y a la posibilidad de generar toxicidad sistémica (B. S. Parker et al., 2016; Snell, McGaha, & Brooks, 2017). Es por esto que la administración local del principio activo, podría ayudar a mejorar su efecto terapéutico al mismo tiempo que permitir emplear dosis mucho menores, limitando así efectos sistémicos y por ende potencial toxicidad.

La inyección intratumoral directa de agentes contra el cáncer se ha evaluado extensamente en las últimas décadas. Sin embargo, hasta el momento no ha logrado establecerse como una vía alternativa de administración en la práctica clínica habitual (Marabelle, Kohrt, Caux, & Levy, 2014).

Hasta el momento, la mayoría de los esquemas terapéuticos que emplean ligandos de TLR3 han utilizado otras vías de administración o han acomplejado el mimético de ARNdc viral a un agente de transfección que facilite su entrada en la célula para poder desarrollar una respuesta antitumoral efectiva. En estudios previos basados en la administración de poli A:U, se ha demostrado una generación de linfocitos T CD8+ específicos para OVA pero sólo luego de la vacunación con CpG-OVA previa al tratamiento y en combinación con quimioterapia (oxaliplatino) (Conforti et al., 2010). En este trabajo de tesis hemos demostrado que la monoterapia con poli A:U es capaz de inducir clones de linfocitos T CD8+ específicos para OVA sin la necesidad de vacunar previamente con la proteína, es decir, logramos expandir clones específicos ya presentes en el repertorio propio del huésped. Esto es particularmente importante ya que en muchos casos es muy difícil conocer los neoantígenos expresados en el tumor, y es por ello que se torna dificultoso establecer un protocolo terapéutico que incluya la inyección del neoantígeno tumoral adicionado al adyuvante. Nuestra estrategia experimental es capaz de sortear este punto, generando inmunidad específica para un antígeno tumoral sin administrarlo terapéuticamente.

En nuestro caso, la administración de poli A:U desnudo, sin ningún acomplejante, tiene las siguientes razones: a) direccionar el reconocimiento del mismo por células inmunes con capacidad fagocítica, ya que se ha demostrado que la endocitosis y pinocitosis son los principales mecanismos que operan en la internalización de ácidos nucleicos (Yuhua Wang, Miao, Satterlee, & Huang, 2015). b) nos permitió un claro abordaje de los efectos del tratamiento en sí mismo, evitando otras variables que pudieran influenciar/complejizar nuestro estudio como serían acomplejantes como nanopartículas, lípidos, carrier. En tesis y trabajos científicos previos del grupo se estableció el modelo experimental terapéutico con poli A:U como ligando de TLR3, optando por la administración local, con la idea de poder focalizar nuestro estudio al sitio del tumor, minimizando la posibilidad de tener efectos sistémicos no deseados. Los resultados del grupo soportan ampliamente el uso de poli A:U desnudo para inmunoterapia contra el cáncer, promoviendo una importante inducción de IFN- β , una buena respuesta de los ratones al tratamiento asociada con una fuerte inmunidad antitumoral, traduciéndose en una marcada disminución en el crecimiento del tumor y en un considerable aumento de la sobrevida (Nocera et al., 2016).

En este trabajo de tesis nos hemos enfocado en el estudio de células inmunes infiltrantes de tumor luego del tratamiento con poli A:U, ya que estas células están involucradas tanto en procesos tempranos de la tumorigénesis como en procesos tardíos tales como la metástasis (Engblom et al., 2016). Nos hemos focalizado en la identificación de las células que expresan TLR3 en el microambiente tumoral, pudiendo determinar las células capaces de detectar este ARNdc y desencadenar sus funciones efectoras.

TLR3 EN EL MICROAMBIENTE TUMORAL: CÉLULAS DENDRÍTICAS

La expresión de los distintos TLRs se ha estudiado en un amplio espectro de células, siendo detectados tanto en células inmunes como en otros tipos celulares tales como células estromales, fibroblastos y células endoteliales (Takeuchi & Akira, 2010). Para el caso específico de TLR3, los anticuerpos disponibles comercialmente para su detección no han tenido tan buenos resultados, es por esto que la gran mayoría de los trabajos lo detectan a nivel de ARNm o detectan la inducción de citocinas utilizando ligandos sintéticos capaces de activar TLR3 (Leonard et al., 2008; Nishimura et al., 2005).

En este trabajo de tesis describimos el primer ratón reportero para TLR3; la inserción del gen de GFP bajo el promotor de TLR3 nos permitió estudiar sin necesidad de utilizar anticuerpos monoclonales dicho receptor. El empleo de citometría de flujo

para estudiar un gran número de marcadores de linajes específicos nos permitió evaluar la expresión de GFP en distintas poblaciones celulares presentes en tumor, bazo y ganglios linfáticos. En línea con la bibliografía y bases de datos, pudimos determinar principalmente TLR3-GFP en la subpoblación de CD8 α + de bazo, capaces de presentar antígenos de manera cruzada (Shortman & Heath, 2010); y en una subpoblación minoritaria de linfocitos B esplénicos, que pueden corresponder a los presentes en zona marginal de bazo (Rawlings, Schwartz, Jackson, & Meyer-Bahlburg, 2012).

Además, al evaluar expresión de TLR3-GFP en células infiltrantes de tumor observamos que todas las CDs CD103+ fueron positivas, mientras que sólo la mitad de las CDs CD11b+ expresaban TLR3-GFP. Las CDs CD103+ comparten un progenitor común con las CDs CD8 α + de bazo y el desarrollo de ambas es dependiente del factor de transcripción BATF3 (*Basic leucine zipper transcriptional factor ATF-like 3*) (Ginhoux et al., 2009), aportando nuestros resultados más evidencia de esta estrecha relación entre ambas subpoblaciones de CDs. Por otro lado, las CDs CD11b+ intratumorales son un grupo más heterogéneo de células, cuyo desarrollo es dependiente principalmente del factor de transcripción IRF4 (*Interferon regulatory factor 4*), aunque en ratones deficientes para IRF4 se pueden detectar algunas CDs CD11b+ aportando evidencia de la heterogeneidad de esta población. Recientemente, se ha demostrado que dentro de esta población de CDs CD11b+ existe una proporción de células con capacidad migratoria (Roberts et al., 2016), a partir de nuestros resultados podría resultar interesante estudiar una posible asociación entre la expresión de TLR3 en esta población y su capacidad migratoria. A su vez, hemos observado expresión de TLR3-GFP en células presentes en ganglios linfáticos con el mismo fenotipo que el observado en el tumor (CDs CD103+), que como se mencionó anteriormente tienen la capacidad de presentar antígenos a linfocitos T vírgenes en este sitio anatómico. Por último, cabe destacar que, a diferencia de lo observado en bazo, no se observó expresión de TLR3-GFP en linfocitos B intratumorales, ni tampoco en los presentes en ganglios linfáticos.

En conclusión, pudimos determinar que la construcción génica del ratón fue satisfactoria al expresar GFP en poblaciones celulares esperadas por bibliografía. Por otro lado, observamos que los ratones KI no fueron capaces de responder de la forma esperada a ligandos de TLR3, ya que los simple KI (TLR3-KI^{gfp/wt}) responden parcialmente mientras que los doble KI (TLR3-KI^{gfp/gfp}) pierden completamente la capacidad de responder tanto *in vivo* a pIC, como *in vitro* a pIC y poli A:U (evaluado a través del aumento de moléculas asociadas a activación como CD80, CD86 y PD-L1). Esto puede deberse tanto a una incorrecta capacidad de reconocer al ligando como a

una incapacidad del mismo de gatillar la cascada de señalización. Es por esto que al realizar los experimento *in vivo* empleamos ratones TLR3-KI^{gfp/wt} que presentan un alelo de TLR3 WT funcional y el otro GFP capaz de reportar la activación del gen de TLR3.

EL TRATAMIENTO CON POLI A:U MODULA EL NÚMERO Y LA ACTIVACIÓN DE CÉLULAS MIELOIDES

Una vez identificadas las CDs como la célula blanco para poli A:U, nos centramos en estudiar el efecto directo de este ligando sobre las mismas, y efectos indirectos que pueda tener sobre otras poblaciones celulares infiltrando tumores. Pudimos a su vez determinar, como ya se ha demostrado en numerosos estudios, que éstas células representan una minoría en las células infiltrantes de tumor (1-3% del total de leucocitos). De cualquier manera, las CDs son de gran importancia al ser capaces de presentar antígenos tumorales a linfocitos T. Además, es la población mieloides a la que se le ha adjudicado tanta complicidad en el desarrollo y crecimiento de la neoplasia. Esta minúscula población mieloides es la única que juega un rol antitumoral crucial e indiscutible.

En primera instancia, pudimos determinar que al recibir el tratamiento con poli A:U, las CDs presentaban un mayor estado de activación (CDs CD86+) en relación al grupo sin tratar, este fenómeno se observó tanto para CDs CD11b+ como para CDs CD103+. Esto puede estar dado tanto por el efecto directo de poli A:U a través de TLR3, lo cual lleva a la maduración y activación de CDs, como a través de mediadores solubles inducidos (IFN-I, citocinas proinflamatorias) actuando de forma autocrina/paracrina (Ramnath, Powell, Scholz, & Sweet, 2017). Por otra parte, el número de ambas subpoblaciones de CDs intratumorales se vio disminuido al día final del tratamiento, lo cual no se observó en CDs IFNAR1^{-/-} incapaces de detectar IFN-I. Estos resultados sugieren que, al tiempo evaluado en nuestro modelo, los propios IFN-I inducidos por el tratamiento u otros factores presentes en el microambiente tumoral podrían llevar a la muerte celular de CDs intratumorales. Dicho fenómeno se ha reportado ya para modelos de estimulación con pIC donde CDs entran en apoptosis (Fuentes Marraco et al., 2011).

Cabe destacar, que a pesar de ser una de las poblaciones más minoritarias en el microambiente tumoral, las CDs CD103+ tienen la capacidad de migrar a órganos linfáticos. Una vez captados los antígenos tumorales en el propio sitio del tumor pueden dirigirse a ganglios linfáticos drenantes donde son capaces de presentar antígenos a linfocitos T CD8+ citotóxicos vírgenes, pudiendo éstos dirigirse al tumor y llevar a cabo su función efectora de lisis. Se ha demostrado que, en el contexto de tumores, las CDs

CD103+ presentes en la periferia de la masa tumoral son capaces de re-estimular a linfocitos T CD8+ efectores o CTL. Esta doble función tanto en ganglio, activando linfocitos T CD8+ vírgenes; como en tumor, re-estimulando CTL le otorgan una clara función anti-tumoral a esta población (M. L. Broz & Krummel, 2015).

Como se ha mencionado anteriormente, los monocitos son las células precursoras de macrófagos tisulares tales como los encontrados en tumores (Pittet et al., 2014) y en menor medida de CDs, ya que estas últimas provienen en su gran mayoría de precursores denominados pre-CDs (Diao, Zhao, Winter, & Cattral, 2010). En nuestro modelo, pudimos discriminar células Ly6C+, CCR2+ como células derivadas de monocitos infiltrando tumor, que posiblemente darán lugar a las poblaciones maduras de macrófagos, por los marcadores ya mencionados, y CDs.

Al analizar el efecto del tratamiento con poli A:U sobre la población de monocitos observamos que no se ve afectado el número de los mismos dentro del tumor, pero sí el fenotipo. Detectamos un aumento en el número de monocitos MHCII- productores de TNF, citocina efectora antitumoral que participa en el efecto terapéutico de poli A:U, como hemos demostrado utilizando ratones TNFRp55^{-/-} incapaces de detectar TNF. Como se ha mencionado anteriormente, es el receptor que media la gran mayoría de los efectos de esta citocina proinflamatoria. En un estudio donde se utiliza un esquema de inmunoterapia combinada basada en un ligando de TLR9 y un anticuerpo bloqueante del receptor de IL-10 (CpG-antiIL10R) se observa aumento de la producción de TNF por parte de monocitos infiltrantes de tumor (*monocyte-derived cells*) luego del tratamiento. En dicho estudio, estos monocitos infiltrantes de tumor también son caracterizados de la misma manera que en esta tesis, como células Ly6C+, MHCII+ (Iida et al., 2013). En este modelo, éstas células juegan un rol fundamental en el efecto terapéutico. A su vez, un fenómeno similar se describe en un estudio basado en la administración intraperitoneal de pIC, donde se observa necrosis hemorrágica en tumores murinos luego del tratamiento, que es mediado por la inducción de TNF en macrófagos (F4/80+) infiltrantes de tumor (Shime et al., 2012). En nuestro modelo, no observamos esas zonas de necrosis características de la acción de TNF, sosteniendo nuestra hipótesis de que son las células CTL el principal inductor de muerte antitumoral. Sin embargo, el control del crecimiento tumoral en ratones TNFRp55^{-/-}, no es tan eficiente como el observado en ratones WT, argumentando a favor del rol antitumoral de esta citocina y/o de las células que la producen actuando en conjunto con las células CTL citotóxicas.

Por otro lado, observamos un aumento en la frecuencia de monocitos MHCII- expresando el ligando PD-L1 que fue dependiente de los IFN-I inducidos por poli A:U,

al perderse este aumento en ratones IFNAR^{-/-}. Dicho efecto es consistente con datos obtenidos en el contexto de pacientes con esclerosis múltiple, donde la estimulación *in vitro* de monocitos con IFN β induce aumento en expresión de PD-L1, sumado a datos clínicos que demuestran que luego de 6 meses de tratamiento con IFN β de estos pacientes se observa un aumento en los niveles de ARNm para PD-L1 en monocitos circulantes (Schreiner et al., 2004). Estos efectos no se observaron en la subpoblación de monocitos MHCII⁺, los mismos presentan un fenotipo de célula más activada, con mayores niveles de CD86 y MHCII. En relación a la expresión de PD-L1 en estos monocitos MHCII⁺, este subtipo celular ya en condiciones control (grupo PBS) expresa niveles elevados de PD-L1 por lo que luego del tratamiento no se encontraron cambios en dicho marcador. Todo lo anterior sugiere que el tratamiento con poli A:U está llevando el subtipo más inmaduro de monocito MHCII⁻ a uno más maduro y activado.

Es interesante recalcar que al aislar ambas poblaciones de monocitos encontramos que al ser co-cultivados con esplenocitos totales, fueron capaces de inducir la proliferación tanto de linfocitos T CD4⁺ cooperadores como de linfocitos T CD8⁺ citotóxicos. Estos resultados son provocadores y necesitan ser explorados más exhaustivamente, por lo cual constituyen una perspectiva interesante a continuar en el futuro. ¿Es la población de monocitos MHCII^{+/-} homogénea? ¿Cómo llevan a cabo su función de estimular la proliferación de esplenocitos normales? ¿Hay citocinas involucradas, IL-2 quizás? Dado que las células respondedoras son esplenocitos totales, ¿estarán estos monocitos actuando directamente sobre la población de CPAs presentes en el cultivo, y de forma indirecta afectan la proliferación de las células T? No abundan en la bibliografía ensayos de este tipo y es necesario profundizar en muchos aspectos técnicos y conceptuales para entender este fenómeno. A su vez, al ensayar la capacidad de inducir invasión tumoral de estos monocitos observamos que no son capaces de hacerlo, independientemente del tratamiento con poli A:U.

Al enfocar nuestro estudio sobre macrófagos, describimos la presencia de tres subtipos M1-like, M2-like y M0 basados en marcadores clásicos. Determinamos una disminución en el número de macrófagos M1-like (MHCII⁺) y M2-like (CD206⁺) luego del tratamiento con poli A:U dependiente nuevamente de los IFN-I generados. Este mismo fenómeno ha sido descrito en caso de infecciones, donde los IFN-I generados por la infección con *Salmonella enterica* inducen muerte por necroptosis de macrófagos totales (CD11b⁺, F4/80⁺) (Robinson et al., 2012). En la infección con *Tropheryma whipplei*, los IFN-I generados inducen apoptosis en macrófagos M2-like de una manera dependiente de quinasas c-Jun N-terminal (JNK) (Al Moussawi et al., 2010).

En nuestro modelo, observamos que los macrófagos fueron capaces de producir la citocina antitumoral TNF, aunque en menor medida que los monocitos. A pesar de que el tratamiento con poli A:U disminuyó el número de M1-like y M2-like, el número de macrófagos productores de TNF no se vio modificado luego del tratamiento. A su vez, al analizar PD-L1, observamos un aumento de la frecuencia de macrófagos M2-like y M0 positivos para dicho ligando luego del tratamiento con poli A:U, dando indicio de un mayor estado de activación de los mismos. Dicho efecto no se observó en M1-like, ya que al igual que en monocitos, un alto porcentaje de esta población ya expresa PD-L1. Tanto estos resultados en macrófagos, como los obtenidos en monocitos indican que el tratamiento con poli A:U afecta la expresión de PD-L1 en dichas poblaciones mieloides, lo que podría explotarse en terapias combinadas. Como se mencionó anteriormente PD-L1 es un punto de control inmune contra el cual se han desarrollado terapias con anticuerpos monoclonales con resultados muy alentadores para el tratamiento contra el cáncer. Cabe recordar que la cantidad de pacientes con una buena respuesta terapéutica aún sigue siendo baja (20-30% de los pacientes tratados). En este sentido, se ha correlacionado expresión de PD-L1 con una mejor respuesta a anti-PD1 y anti-PDL1 (Teng, Ngiow, Ribas, & Smyth, 2015; Topalian et al., 2012), por lo que una terapia combinada de poli A:U con anti-PD-L1 podría aumentar el porcentaje de pacientes con una respuesta eficiente al tratamiento aumentando la expresión de PD-L1 intratumoral. En otras palabras, el tratamiento con poli A:U aumentaría la expresión de PD-L1 en las células mieloides y el tratamiento con anti-PDL1 bloquearía uno de los miembros de la dupla PD1-PDL1, dejando libre para actuar a los linfocitos T CTL. Esta hipótesis abre nuevas perspectivas de análisis con implicancias clínicas concretas a tener en cuenta en el futuro.

El estado de polarización M2-like está asociado a un perfil protumoral, en este trabajo de tesis detectamos que dichos macrófagos son la principal fuente de IL-10 intratumoral. IL-10 tiene funciones inmunosupresoras que van desde la inhibición de citocinas proinflamatorias (IFN γ , IL-17), con disminución en la expresión de moléculas del MHCII hasta el sostenimiento de la expresión de Foxp3 en células Treg (Saraiva & O'Garra, 2010). A su vez, como luego del tratamiento con poli A:U existe una disminución de este subtipo de macrófago hay una menor cantidad de esta citocina inmunorregulatoria con efectos protumorales. Se ha descrito que macrófagos productores de IL-10 intratumorales suprimen la respuesta de linfocitos T CD8+ al inhibir la producción de IL-12 antitumoral por parte de CD8 (Ruffell et al., 2014).

Al analizar ganglio drenante de tumor observamos que el número de células mieloides es extremadamente bajo, solo un 3% del total de leucocitos corresponde a

células de este linaje mientras que el 97% está constituido por células linfoides. A pesar de estar presentes en un número tan bajo tienen funciones claves, como la presentación antigénica a linfocitos T específicos para antígenos tumorales. Al analizar el número de las distintas poblaciones en GD observamos un aumento significativo de monocitos MHCII+ luego del tratamiento con poli A:U, mientras que no observamos cambios en CDs o macrófagos. Cabe destacar que estos monocitos pueden ser los precursores de macrófagos o CDs, CPAs capaces de iniciar una respuesta antitumoral T. Es interesante recalcar que al analizar el estado de activación de ambos subtipos de CDs en GD observamos un aumento en la expresión de CD86 exclusivamente en CDs CD103+ migratorias luego del tratamiento. Probablemente estas células, al ser blanco de poli A:U, estén siendo activadas en el sitio del tumor, ya que nuestro tratamiento es peritumoral, y de allí migren a GD para presentar antígenos tumorales a linfocitos T específicos de manera más eficiente montando una respuesta inmune adaptativa antitumoral. Esto se condice con resultados anteriores del grupo, en donde utilizando ratones IL12p40^{-/-}, se pierde totalmente el efecto terapéutico de poli A:U. La subunidad p40 de IL12 está compartida entre IL23 e IL12, por lo tanto, ratones IL12p40^{-/-} carecen de ambas citocinas. IL12 es una citocina crucial en la inducción de una respuesta antitumoral efectiva (Nocera et al., 2016).

EL TRATAMIENTO CON POLI A:U MODIFICA EL INFILTRADO INMUNE LINFOIDE HACIA UN PERFIL ANTITUMORAL

Al centrar nuestro estudio en las células inmunes de linaje linfóide observamos un claro efecto antitumoral de poli A:U. El tratamiento resultó en un marcado aumento en el número de linfocitos T CD8+ modulando su fenotipo hacia un perfil más activado, disminuyó el número de linfocitos B intratumorales e indujo activación de células NK.

El tratamiento con poli A:U modificó al compartimento de linfocitos T, con un aumento en linfocitos T CD8+ citotóxicos y una disminución en la frecuencia de linfocitos T CD4+ Foxp3+ regulatorios. Los primeros tienen una clara función antitumoral al inducir la lisis de células tumorales (a través de granzimas y perforinas), mientras que los linfocitos Treg tienen la capacidad de suprimir la respuesta inmune antitumoral inhibiendo la proliferación de CTLs y Tconv (Tanaka & Sakaguchi, 2017). Además, al estudiar el fenotipo de estos linfocitos T CD8+ luego del tratamiento observamos un aumento en la frecuencia de células positivas para la molécula efectora granzima B, enzima proteolítica capaz de inducir la lisis de la célula tumoral. Asimismo, la frecuencia de linfocitos T CD8+ positivos para PD1 también se vio aumentada luego del

tratamiento, indicando un estado más activado. Nuevamente, este aumento podría volver más eficiente las inmunoterapias dirigidas contra esta molécula en esquemas de terapia combinada de poli A:U con anticuerpos bloqueantes de PD1/PDL1. Recientemente se ha demostrado que linfocitos T CD8+ positivos para PD1, en sangre periférica de pacientes con melanoma, tienen mayor capacidad proliferativa (Ki67+) que la contraparte de linfocitos T CD8+ negativos para PD1 y que los mismos son “revitalizados” luego del tratamiento con pembrolizumab (anti-PD1) volviéndose más eficientes (Huang et al., 2017). A su vez, luego del tratamiento no sólo detectamos un aumento en el número de linfocitos T CD8+ totales, sino también de específicos para el antígeno tumoral modelo OVA, lo que sugiere que se ha llevado a cabo una mejor presentación antigénica por parte de CPAs, que llevan a la expansión de clones de linfocitos T específicos de antígeno. Estos resultados indican que el tratamiento con poli A:U está modulando linfocitos T CD8+ hacia un perfil más activado y más citotóxico con mejor respuesta antitumoral. Sería interesante evaluar si el tratamiento con poli A:U es lo suficientemente potente como para inducir la expansión de clones específicos para antígenos tumorales propios naturales del modelo (melanoma murino B16), ya que OVA no deja de ser una proteína extraña otorgándole mayor inmunogenicidad a la línea B16-OVA.

Por otro lado, al evaluar células NK luego del tratamiento, observamos que, si bien el número de las mismas no se veía afectado, sí se afectaba su fenotipo. Estas células de la inmunidad innata tienen capacidad citotóxica y pueden inducir la lisis de las células tumorales mediante mecanismos similares a los linfocitos T CD8+, pero reconociendo a su célula blanco de manera diferente (Morvan & Lanier, 2016). Pudimos determinar tanto un aumento en la frecuencia de células NK positivas para granzima B como un aumento en la expresión de esta enzima luego del tratamiento con poli A:U, indicando, nuevamente, una mayor capacidad citotóxica de estas células (Voskoboinik, Whisstock, & Trapani, 2015). También observamos un aumento en la frecuencia de células NK positivas para KLRG1 luego del tratamiento, con mayor expresión del receptor en dichas células. Este fenotipo está asociado a un estado más maduro de la célula con aumentada capacidad antimetastásica: en un estudio donde animales portadores de tumor reciben un tratamiento *in vivo* con IL-15, las células NK aumentan en número e incrementan la expresión KLRG1, que se traduce en un cambio fenotípico que protege al animal de la generación de focos metastásicos en pulmón (Renner et al., 2014). Nuestros resultados demuestran cómo el tratamiento con poli A:U modula a las células NK hacia un estadio más maduro y activo con mayor capacidad antitumoral. Este efecto puede estar mediado por IFN- γ generados, ya que los mismos afectan la

maduración y el efecto antitumoral de células NK en modelos tumorales murinos. Se ha demostrado que ratones IFNAR^{-/-} son más susceptibles al desarrollo de tumores RMA-S (variante de linfoma sensible al rechazo mediado por células NK) al presentar células NK con un fenotipo más inmaduro con menor capacidad citotóxica *in vitro* mediada por los IFN- γ endógenos (Hertzog et al., 2007). Existe numerosa evidencia del rol beneficioso que cumplen estas células en la defensa contra el cáncer. En un estudio se determinó la capacidad citotóxica a células NK de 3625 individuos, y al realizar un análisis retrospectivo 11 años después, se observó una mayor incidencia de cáncer en pacientes con menor capacidad citotóxica en estas células (Imai, Matsuyama, Miyake, Suga, & Nakachi, 2000). Es por esto, que implementar tratamientos que mejoren la funcionalidad de las mismas puede tener efectos beneficiosos en distintos abordajes terapéuticos (Morvan & Lanier, 2016).

Los linfocitos B son ampliamente conocidos por su capacidad de sintetizar y secretar inmunoglobulinas específicas para un epítipo generando una respuesta inmune de tipo humoral, muy estudiado en caso de infecciones y patologías de tipo autoinmunes mediadas por complejos inmunes (Cooper, 2015). El estudio de linfocitos B en cáncer ha tomado relevancia en los últimos años, tanto por la generación de autoanticuerpos, responsables de síndromes paraneoplásicos, como por la capacidad que presentan de regular una respuesta inmune a través de la liberación de citocinas (Tsou, Katayama, Ostrin, & Hanash, 2016). Se ha descrito una población de linfocitos B reguladores (Breg) con capacidad de secretar IL-10 que lleva a un ambiente inmunosupresor, lo que le otorga un rol protumoral a esta población (Mauri & Bosma, 2012). En modelos tumorales se han identificado linfocitos B productores de IL-10 y de la enzima IDO (indolamina 2,3-dioxigenasa) asociados al desarrollo de células Treg (Rosser & Mauri, 2015). En nuestro modelo experimental hemos descrito una disminución en el número de linfocitos B intratumorales luego del tratamiento con poli A:U, sin tener evidencia sobre su rol funcional, que podrían estar asociado a un fenotipo de Bregs. Debido a nuestro abordaje experimental empleado para medir IL-10 por citometría de flujo, no podemos descartar fuentes linfoides de IL10 (como Bregs o Tregs) ya que nosotros utilizamos un protocolo donde no se evalúan dichas poblaciones. Por otro lado, no pudimos detectar expresión de TLR3-GFP en linfocitos B intratumorales utilizando los ratones reporteros. Como nuestro objetivo primordial excluyó el análisis del compartimento de linfocitos B, queda como idea a futuro profundizar en el estudio de esta población de linfocitos B intratumorales en el contexto del tratamiento con poli A:U.

OBSERVACIONES FINALES

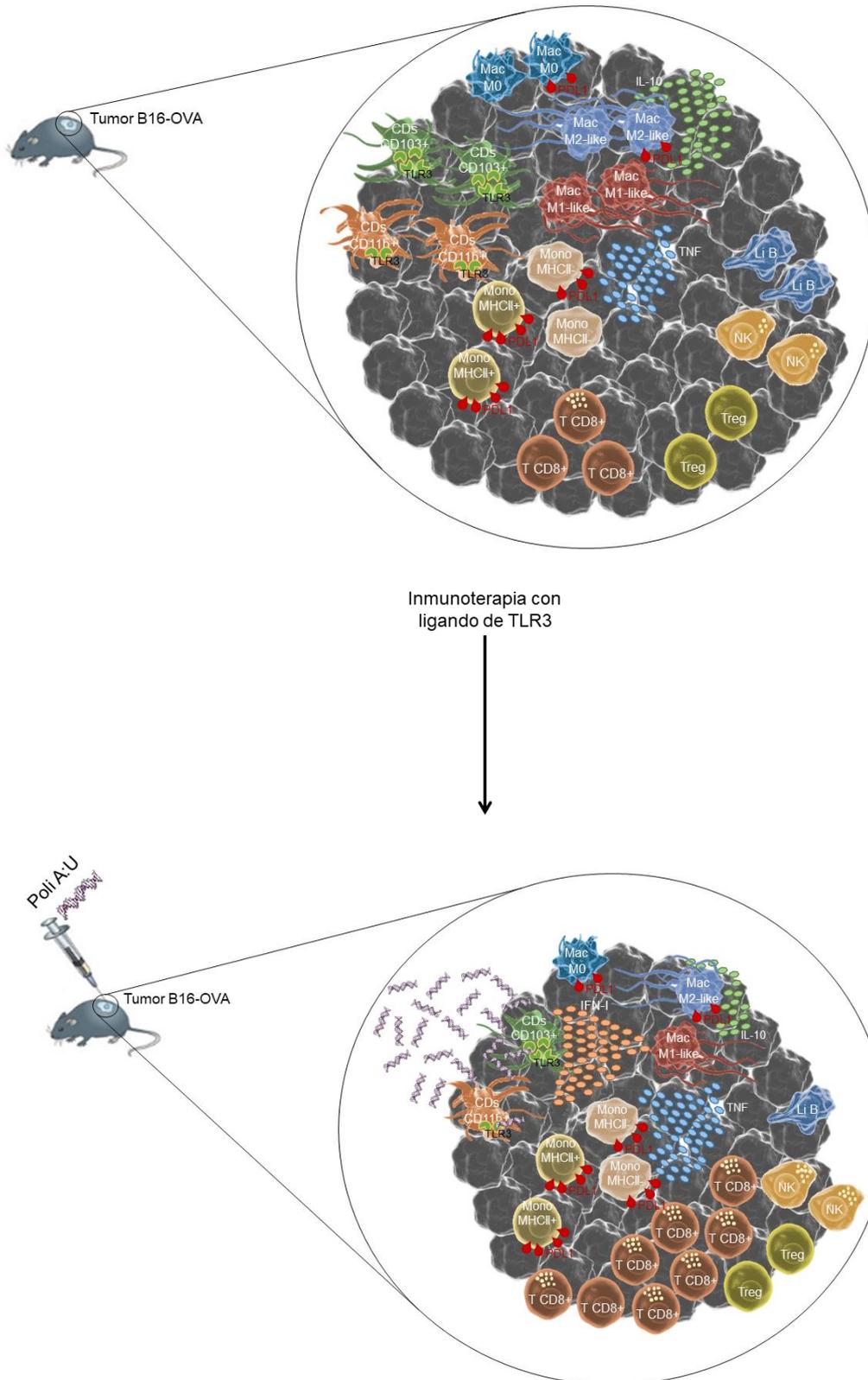
En este trabajo de tesis hemos descripto los efectos del tratamiento con un ligando específico de TLR3 sobre la respuesta inmune antitumoral (ver Resumen Gráfico). Hemos identificado a las CD⁺ CD103⁺ como la principal célula capaz de detectar este ARNdc, al expresar TLR3 en el microambiente tumoral, y desencadenar los efectos antitumorales del tratamiento, actuando como célula clave para obtener una buena respuesta a tratamientos basados en ligandos de TLR3. Es por esto, que aumentando el número de estas células a través de nuevas terapias podría llevar a una mejor respuesta terapéutica de nuestro tratamiento.

Una vez reconocido poli A:U por parte de CD⁺ intratumorales, hay mayor número de CD⁺ activadas las cuales producirían IFN-I, que actúan como mediadores de muchos de los efectos observados. Actuando sobre monocitos infiltrantes llevándolos hacia un fenotipo más activado con aumento de PD-L1 y mayor cantidad de monocitos productores de TNF, mediando así parcialmente el efecto antitumoral del tratamiento. Por otra parte, estos IFN-I impactan sobre macrófagos asociados a tumor modulando su número y fenotipo con un neto efecto antitumoral, disminuyendo M2-like productores de IL-10.

Por otro lado, estas CD⁺ con fenotipo más activado son capaces de montar una respuesta inmune adaptativa más robusta. Sobre el compartimento T impacta aumentando número de linfocitos T CD8⁺ que presentan función citotóxica aumentada con mayores niveles de granzima B y PD1, con una disminución asociada de Tregs. El tratamiento también impacta sobre otra población con capacidad citotóxica como son las células NK, con mayores niveles de granzima B y KLRG1 asociado a un fenotipo más citotóxico.

Por lo tanto, podemos concluir que la administración de poli A:U como ligando de TLR3 tiene un claro efecto terapéutico, mediado principalmente por los IFN-I generados que impactan sobre las distintas poblaciones celulares inmunes presentes tanto en tumor como en ganglio. Nuestros hallazgos aportan conocimientos acerca del impacto de TLR3 sobre el desarrollo tumoral y la utilización de sus ligandos como terapia, con la descripción de los efectos sobre las distintas poblaciones que pueden ser tomadas en cuenta a la hora de diseñar terapias combinadas con otros principios activos, para poder potenciar aún más los enfoques inmunoterapéuticos contra el cáncer.

RESUMEN GRÁFICO



Resumen gráfico. **Impacto de la terapia con un agonista de toll like receptor 3 sobre el infiltrado inmunológico en un modelo murino de cáncer.** Panorama del infiltrado inmunológico en tumores B16-OVA antes y después del tratamiento con poli A:U, traducido en una disminución del tamaño tumoral.

CAPÍTULO 5: MATERIALES Y MÉTODOS

MATERIALES Y MÉTODOS

Análisis Estadístico

El manejo de datos, análisis y representación gráfica se realizó con Prism 7.0 (GraphPad Software). La significancia estadística se calculó con análisis de 2 colas utilizando el post test de Bonferroni o Tukey según corresponda para 1 o 2 vías ANOVA y Test T de Student, y un valor de p menor de 0,05 fue considerado estadísticamente significativo (* p <0,05; ** p <0,01; *** P <0.001).

Reactivos

Para estimular distintas poblaciones celulares se utilizaron distintos compuestos como LPS , poli I:C de bajo peso molecular (Poly I:C LMW – InvivoGen), rmlFN β , poli A:U (Poly A:U – InvivoGen), rmlFN γ

Líneas Celulares

Las líneas celulares murinas B16-F0 (melanoma), B16-OVA (melanoma que expresa establemente ovoalbúmina), fueron adquiridas en la Colección Americana de Cultivo Tipo (ATCC). Todas las líneas celulares se cultivaron en placas de cultivo de 100 cm² con medio DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium*) o en flask T75 de cultivo de 75 cm² con medio RPMI 1640 (*Roswell Park Memorial Institute*). Ambos medios se suplementaron con suero fetal bovino SFB (Natocor) al 10% y gentamicina. Para el mantenimiento de la expresión constitutiva de ovoalbúmina, las células B16-OVA fueron cultivadas por al menos 4 días en presencia del antibiótico de selección G418 (geneticina, Invivogen). Las células se cultivaron a 37°C en atmósfera húmeda con tensión de CO₂ al 5%.

Animales

Los ratones C57BL/6 fueron adquiridos de la Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional de la Plata, Argentina. Los animales de la cepa C57BL/6 y derivados genéticamente modificados IFNAR1^{-/-} fueron adquiridos en los Laboratorios Jackson. Los ratones TLR3-GFP “*knock-in*” fueron desarrollados por el Dr. Philippe Benaroch del Institut Curie en Paris, Francia y constan de animales C57BL/6 con la inserción del gen de GFP bajo el promotor de TLR3. Los animales fueron mantenidos en el Bioterio del CIBICI-CONICET (Centro de Investigaciones en Bioquímica Clínica e Inmunología, CONICET) de acuerdo con los requisitos experimentales del comité ético de dicho instituto.

Inducción de tumores *in vivo*: modelo terapéutico con poli A:U

Los tumores se indujeron en huéspedes singénicos [ratones C57BL/6, IFNAR1^{-/-}, TNFRp55^{-/-}] mediante la inyección s.c. de 1×10^6 o 5×10^5 de células B16/B16-OVA según el diseño experimental. Las líneas celulares fueron resuspendidas en 100 μ l de PBS estéril e inoculadas en el flanco derecho de cada animal. El desarrollo tumoral fue monitoreado día de por medio, midiendo los diámetros perpendiculares del tumor con un calibre métrico. El volumen del tumor fue estimado como $(d^2 \times D)/2$, donde d y D corresponden a los diámetros menor y mayor respectivamente. Tras la aparición del tumor (día 7 p.i., volumen tumoral ≥ 18 mm³), los mismos fueron tratados i.t. con 3 dosis (cada dos días) de 100 μ g de poli A:U (Invivogen) en 100 μ l de PBS (grupo pAU) o 100 μ l de PBS (grupo PBS).

Preparación / Empleo de poli A:U

La resuspensión, almacenamiento y utilización de “poli A:U” *polyadenylic-polyuridylic acid* (Invivogen) se hizo siguiendo estrictamente las recomendaciones del fabricante. Brevemente, para la resuspensión se añadieron (con jeringa estéril apirógena en cabina de flujo laminar) 10 ml de agua libre de endotoxina estéril (suministrados en el kit) al vial que contenía 10 mg de poli A:U liofilizado (concentración final 1mg/ml). Se procedió a agitar la solución vigorosamente mediante Vortex hasta lograr su completa solubilización (3 ciclos de 30 segundos). Luego, se procedió al alicuotado en tubos de 1.5 ml tipo eppendorf calidad “RNAase/DNAse free” 3 veces autoclavados y se llevaron inmediatamente a freezer -20°C para su almacenamiento hasta el momento de su uso. Cada vez que se empleó poli A:U para el tratamiento *in vivo*, se procedió a descongelar y mantener la solución en hielo hasta la inoculación en el ratón.

Obtención de células mononucleares infiltrantes de tumor

Una vez obtenidos los tumores se los cortó en pequeños fragmentos y se los incubó en 2mL de RMPI + 30 μ L de DNAsa DN25-100MG (10mg/mL - Sigma) + 60 μ L de Liberasa LT (5 mg/mL - Roche) dejándolos 20min a 37°C en agitación. Luego se disgregaron mecánicamente los tumores a través de filtros de 70 μ m (BD *Cell Strainer*) lavando inmediatamente con PBS-2%SFB para diluir las enzimas. Posteriormente se purificaron las células mononucleares por gradiente de densidad utilizando Percoll GE, a tal fin se obtuvieron tres soluciones de distinta concentración de percoll: una solución de percoll al 100% (9 partes de percoll puro + 1 parte de PBS 10x), una solución de percoll 70% (7 partes de percoll 100% + 3 partes de PBS 1x) y una solución de percoll 40% (4 partes de percoll 100% + 6 partes de PBS 1x). Las células provenientes de la disgregación del tumor fueron resuspendidas en 3-4mL de solución de percoll 40% que

luego fueron colocados muy cuidadosamente sobre 5mL de percoll 70% en tubos falcon de 15mL sin mezclar las dos fases de percoll. Luego se procedió a centrifugar los tubos a 2000rpm durante 20min. Una vez pasado este tiempo se obtuvieron las células mononucleares presentes en la hemicapa celular que queda entre las dos soluciones de percoll con un posterior lavado con 10mL de PBS y posterior centrifugación a 1700rpm para eliminar el percoll remanente. De esta manera se purifican las células mononucleares infiltrantes de tumor resuspendiéndolas en PBS-2%SFB.

Citometría de Flujo

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

Los siguientes anticuerpos son de BioLegend: anti-CD45-APC-Cy7 (30-F11), anti-CD8b-PE (H35-17.2), anti-CD4-APC (GK1.5), anti-CD3-PE (145-2C11), anti-CD4-PECy7 (RMA4-5), CD4-PerCP (GK1.5), anti-CD25-PECy5 (PC61), anti-CD152 (CTLA-4) APC (UC10-4B9), anti-CD44-APC (IM7), anti-CD62L-PE (MEL-14), anti-CD223 (LAG-3) PE (C9B7W), anti-CD279 (PD-1) APC (RMP1-30), anti-CD11b FITC, anti-CD103 PE, anti-Ly6C APC.

Las células fueron incubadas con los respectivos anticuerpos a sus respectivas diluciones durante 30 minutos a 4°C en buffer de citometría. Posteriormente las células fueron lavadas y resuspendidas en buffer de citometría. Las muestras se adquirieron en un Citómetro BD FACSCanto II, BD LSR Fortessa x20 (capaz de detectar 2 parámetros ópticos y 18 parámetros de fluorescencia) y los posteriores análisis se realizaron utilizando el programa FlowJo X (TreeStar, Inc.).

Citometría de Flujo Intracelular

Para la tinción de citocinas, proteínas intracelulares y factores de transcripción en células mieloides, se dejaron las células purificadas como se describió anteriormente en placas de 96 pocillos en medio RPMI completo con Brefeldina A (BD GolgiPlug) y Monensina (BD GolgiStop) ambos a una dilución 1/1000 por 3h. Luego de esta incubación las células fueron lavadas en PBS-2%SFB y teñidas para citometría de flujo de superficie como se describió anteriormente. Luego las células fueron fijadas en 50µL de buffer de fijación 1x (eBioscience Fixation/Permeabilization buffer) durante 1h a 4°C. Posteriormente fueron lavadas e incubadas en 50µL de buffer de permeabilización 1x (eBioscience Permeabilization buffer) conteniendo los anticuerpos de marca intracelular por 30min a 4°C. Por último, las células fueron lavadas y resuspendidas en buffer de citometría para su adquisición en el citómetro.

Western Blot

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

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

Ensayo de proliferación *in vitro*

Como células respondedoras se utilizaron esplenocitos totales teñidos con CFSE. Se sortearon monocitos según la siguiente estrategia: CD45+, CD11b+, Gr1+, Ly6C+, CCR2+ y dependiendo de la expresión de MHCII se los aislaron en MHCII+ y MHCII-. Como control se sortearon células presentadoras de antígeno de bazo de un ratón portador de tumor según los siguientes marcadores de linaje: CD45+, CD4-, CD8-, que corresponden a células B, células dendríticas y monocitos/macrófagos. Para el ensayo de proliferación se tiñeron 5×10^6 de esplenocitos en 500 μ L de CFSE 5 μ M-PBS durante 8 minutos a 37°C con 2-3 lavados posteriores con PBS. Solución madre de CFSE a 5mM. Luego se sembraron 2×10^4 células respondedoras teñidas junto con 2×10^4 de cada una de las subpoblaciones de monocitos infiltrantes de tumor sorteadas sumado a perlas anti-CD3/anti-CD28 (Dynabeads® Mouse T-Activator CD3/CD28 – Life Technologies) a una relación de 12.5 beads cada 20 células respondedoras según correspondiera y se dejaron 96h.

Ensayo de invasión *in vitro*: Esferoides en 3D

Para obtener tumores en tres dimensiones se sembraron 1×10^4 células B16-OVA en placas de ultra-baja adherencia y se deja formar el esferoide por 72h. Una vez obtenidos los esferoides pueden ser pipeteados bajo cabina utilizando un microscopio,

de esta forma se puede manipular un esferoide por condición experimental. Las células mieloides, monocitos MHCII+ y MHCII- son resuspendidos en una solución de colágeno de 1mg/ml y colocados en pocillos de doble fondo (μ -slide angiogénesis – ibidi) donde se deja gelificar en el pocillo inferior. Luego se colocaron los esferoides de B16-OVA sobre el colágeno conteniendo las células mieloides agregando medio de cultivo RPMI completo. Se evaluó inducción de invasión en el esferoide a los 7 y 10 días luego del co-cultivo del mismo junto a las células mieloides. Posteriormente las células fueron fijadas y teñidas con un anticuerpo anti-CD11b-APC y DAPI para su observación al microscopio de fluorescencia.

Macrófagos derivados de médula ósea (BMDMs)

Los macrófagos fueron diferenciados a partir de células de médula ósea (BMDMs) de distintas cepas de ratones sembrando 10×10^6 de células provenientes de fémur y tibia previamente procesados en flasks T75 de 75cm^2 con medio DMEM completo (DMEM+10% SFB) suplementado al 20% con M-CSF/CSF-1 aportado como medio condicionado de células L929. Se cambió la mitad del medio de cultivo al día 3-4 y se obtuvieron macrófagos ya diferenciados al día 7. El medio de L929 conteniendo M-CSF/CSF-1 se obtuvo sembrando 5×10^5 células L929 en un flask de 75cm^2 con 50mL de DMEM completo (DMEM+10% SFB) y se recolectó el medio al día 7, posteriormente este medio fue filtrado a través de un filtro de $22 \mu\text{m}$, se distribuyó en tubos y almacenó a -20°C .

CAPÍTULO 6: BIBLIOGRAFÍA

- Al Moussawi, K., Ghigo, E., Kalinke, U., Alexopoulou, L., Mege, J. L., & Desnues, B. (2010). Type I interferon induction is detrimental during infection with the Whipple's disease bacterium, *Tropheryma whipplei*. *PLoS Pathogens*, 6(1). <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000722>
- Aranda, F., Vacchelli, E., Obrist, F., Eggermont, A., Galon, J., Sautès-Fridman, C., ... Galluzzi, L. (2014). Trial Watch: Toll-like receptor agonists in oncological indications. *Oncotarget*, 3(6), e29179. <https://doi.org/10.4161/onci.29179>
- Arandjelovic, S., & Ravichandran, K. S. (2015). Phagocytosis of apoptotic cells in homeostasis. *Nature Immunology*, 16(9), 907–917. <https://doi.org/10.1038/ni.3253>
- Aubin, E., Belmant, C., Gauthier, L., Morel, Y., Paturel, C., & Bregeon, D. (2009). (19) United States (12) Patent Application Publication (10) Pub . No . : US 2009 / 0323203 A1 If / I ; , 1(19). <https://doi.org/10.1021/n10602701>.
- Balkwill, F., Watling, D., & Taylor-Papadimitriou, J. (1978). Inhibition by lymphoblastoid interferon of growth of cells derived from the human breast. *International Journal of Cancer*, 22(3), 258–265. <https://doi.org/10.1002/ijc.2910220307>
- Banchereau, J., & Palucka, K. (2017). Immunotherapy: Cancer vaccines on the move. *Nature Reviews Clinical Oncology*. <https://doi.org/10.1038/nrclinonc.2017.149>
- Barr, T. A., Brown, S., Ryan, G., Zhao, J., & Gray, D. (2007). TLR-mediated stimulation of APC: Distinct cytokine responses of B cells and dendritic cells. *European Journal of Immunology*, 37(11), 3040–3053. <https://doi.org/10.1002/eji.200636483>
- Basith, S., Manavalan, B., Yoo, T. H., Kim, S. G., & Choi, S. (2012). Roles of toll-like receptors in cancer: A double-edged sword for defense and offense. *Archives of Pharmacal Research*, 35(8), 1297–1316. <https://doi.org/10.1007/s12272-012-0802-7>
- Bernardo, A. R., Cosgaya, J. M., Aranda, A., & Jiménez-Lara, A. M. (2013). Synergy between RA and TLR3 promotes type I IFN-dependent apoptosis through upregulation of TRAIL pathway in breast cancer cells. *Cell Death & Disease*, 4, 1–10. <https://doi.org/10.1038/cddis.2013.5>
- Bevan, M. J. (2006). Cross-priming. *Nature Immunology*, 7(4), 363–365. <https://doi.org/10.1038/ni0406-363>
- Biswas, S. K., & Mantovani, A. (2010). Macrophage plasticity and interaction with lymphocyte subsets: cancer as a paradigm. *Nature Immunology*, 11(10), 889–896. <https://doi.org/10.1038/ni.1937>
- Boussiotis, V. A. (2016). Molecular and Biochemical Aspects of the PD-1 Checkpoint Pathway. *New England Journal of Medicine*, 375(18), 1767–1778. <https://doi.org/10.1056/NEJMra1514296>
- Brennick, C. A., Corwin, W. L., Srivastava, P. K., & Ebrahimi-nik, H. (2017). Neoepitopes as cancer immunotherapy targets: key challenges and opportunities. *Immunotherapy*, 9(4), 361–371. <https://doi.org/10.2217/imt-2016-0146>
- Broz, M. L., Binnewies, M., Boldajipour, B., Nelson, A. E., Pollack, J. L., Erle, D. J., ... Krummel, M. F. (2014). Dissecting the Tumor Myeloid Compartment Reveals Rare Activating Antigen-Presenting Cells Critical for T Cell Immunity. *Cancer Cell*, 26(5), 638–652. <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2014.09.007>
- Broz, M. L., & Krummel, M. F. (2015). The Emerging Understanding of Myeloid Cells as Partners and Targets in Tumor Rejection. *Cancer Immunology Research*, 3(4), 313–319. <https://doi.org/10.1158/2326-6066.CIR-15-0041>

- Chattopadhyay, S., & Sen, G. C. (2014). dsRNA-Activation of TLR3 and RLR Signaling: Gene Induction-Dependent and Independent Effects. *Journal of Interferon & Cytokine Research*, 34(6), 427–436. <https://doi.org/10.1089/jir.2014.0034>
- Chen, K., Liu, J., & Cao, X. (2017). Regulation of type I interferon signaling in immunity and inflammation: A comprehensive review. *Journal of Autoimmunity*, 83, 1–11. <https://doi.org/10.1016/j.jaut.2017.03.008>
- Chew, V., & Abastado, J.-P. (2013). Immunomodulation of the tumor microenvironment by Toll-like receptor-3 (TLR3) ligands. *Oncoimmunology*, 2(4), e23493. <https://doi.org/10.4161/onci.23493>
- Cimino-Mathews, A., Thompson, E., Taube, J. M., Ye, X., Lu, Y., Meeker, A., ... Emens, L. A. (2016). PD-L1 (B7-H1) expression and the immune tumor microenvironment in primary and metastatic breast carcinomas. *Human Pathology*, 47(1), 52–63. <https://doi.org/10.1016/j.humpath.2015.09.003>
- Conforti, R., Ma, Y., Morel, Y., Paturel, C., Terme, M., Viaud, S., ... Zitvogel, L. (2010). Opposing effects of toll-like receptor (TLR3) signaling in tumors can be therapeutically uncoupled to optimize the anticancer efficacy of TLR3 ligands. *Cancer Research*, 70(2), 490–500. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-09-1890>
- Cooper, M. D. (2015). The early history of B cells. *Nature Reviews Immunology*, 15(3), 191–197. <https://doi.org/10.1038/nri3801>
- Coussens, L. M., Zitvogel, L., & Palucka, A. K. (2013). Neutralizing tumor-promoting chronic inflammation: A magic bullet? *Science*, 339(6117), 286–291. <https://doi.org/10.1126/science.1232227>
- Cristina Gauzzi, M., Del Cornò, M., & Gessani, S. (2010). Dissecting TLR3 signalling in dendritic cells. *Immunobiology*, 215(9–10), 713–723. <https://doi.org/10.1016/j.imbio.2010.05.008>
- Diamond, M. S., Kinder, M., Matsushita, H., Mashayekhi, M., Dunn, G. P., Archambault, J. M., ... Schreiber, R. D. (2011). Type I interferon is selectively required by dendritic cells for immune rejection of tumors. *The Journal of Experimental Medicine*, 208(10), 1989–2003. <https://doi.org/10.1084/jem.20101158>
- Diao, J., Zhao, J., Winter, E., & Cattral, M. S. (2010). Recruitment and Differentiation of Conventional Dendritic Cell Precursors in Tumors. *The Journal of Immunology*, 184(3), 1261–1267. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.0903050>
- Dieu-Nosjean, M.-C., Antoine, M., Danel, C., Heudes, D., Wislez, M., Poulot, V., ... Cadranel, J. (2008). Long-Term Survival for Patients With Non-Small-Cell Lung Cancer With Intratumoral Lymphoid Structures. *Journal of Clinical Oncology*, 26(27), 4410–4417. <https://doi.org/10.1200/JCO.2007.15.0284>
- Dixit, E., & Kagan, J. C. (2013). *Intracellular Pathogen Detection by RIG-I-Like Receptors*. *Advances in Immunology* (1st ed., Vol. 117). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-410524-9.00004-9>
- Dong, H., Strome, S. E., Salomao, D. R., Tamura, H., Hirano, F., Flies, D. B., ... Chen, L. (2002). Tumor-associated B7-H1 promotes T-cell apoptosis: A potential mechanism of immune evasion. *Nature Medicine*, 4(4), 793–800. <https://doi.org/10.1038/nm730>
- Ducret, J. P., Caille, P., Sancho Garnier, H., Amiel, J. L., Michelson, M., Hovanessian, A. G., ... Lacour, F. (1985). A phase I clinical tolerance study of polyadenylic-polyuridylic acid in cancer patients. *Journal of Biological Response Modifiers*, 4(2),

- 129–133.
- Dunn, G. P., Bruce, A. T., Sheehan, K. C. F., Shankaran, V., Uppaluri, R., Bui, J. D., ... Schreiber, R. D. (2005). A critical function for type I interferons in cancer immunoediting. *Nature Immunology*, *6*(7), 722–729. <https://doi.org/10.1038/ni1213>
- Engblom, C., Pfirschke, C., & Pittet, M. J. (2016). The role of myeloid cells in cancer therapies. *Nature Reviews Cancer*, *16*(7), 447–462. <https://doi.org/10.1038/nrc.2016.54>
- Finisguerra, V., Di Conza, G., Di Matteo, M., Serneels, J., Costa, S., Thompson, A. A. R., ... Mazzone, M. (2015). MET is required for the recruitment of anti-tumoural neutrophils. *Nature*, *522*(7556), 349–353. <https://doi.org/10.1038/nature14407>
- Forssell, J., Öberg, Å., Henriksson, M. L., Stenling, R., Jung, A., & Palmqvist, R. (2007). High macrophage infiltration along the tumor front correlates with improved survival in colon cancer. *Clinical Cancer Research*, *13*(5), 1472–1479. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-06-2073>
- Fuertes, M. B., Kacha, A. K., Kline, J., Woo, S.-R., Kranz, D. M., Murphy, K. M., & Gajewski, T. F. (2011). Host type I IFN signals are required for antitumor CD8⁺ T cell responses through CD8α⁺ dendritic cells. *The Journal of Experimental Medicine*, *208*(10), 2005–2016. <https://doi.org/10.1084/jem.20101159>
- Fuertes Marraco, S. A., Scott, C. L., Bouillet, P., Ives, A., Masina, S., Vremec, D., ... Acha-Orbea, H. (2011). Type I interferon drives dendritic cell apoptosis via multiple BH3-only proteins following activation by polyI:C in vivo. *PLoS ONE*, *6*(6). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0020189>
- Gabrilovich, D. I., Ostrand-Rosenberg, S., & Bronte, V. (2012). Coordinated regulation of myeloid cells by tumours. *Nature Reviews Immunology*, *12*(4), 253–268. <https://doi.org/10.1038/nri3175>
- Galli, S. J., Borregaard, N., & Wynn, T. A. (2011). Phenotypic and functional plasticity of cells of innate immunity: Macrophages, mast cells and neutrophils. *Nature Immunology*, *12*(11), 1035–1044. <https://doi.org/10.1038/ni.2109>
- Galon, J., Costes, A., Sanchez-Cabo, F., Kirilovsky, A., Mlecnik, B., Lagorce-Pagès, C., ... Pagès, F. (2006). Type, density, and location of immune cells within human colorectal tumors predict clinical outcome. *Science*, *313*(5795), 1960–1964. <https://doi.org/10.1126/science.1129139>
- Gatti, G., Nuñez, N. G., Nocera, D. A., Dejager, L., Libert, C., Giraudo, C., & Maccioni, M. (2013). Direct effect of dsRNA mimetics on cancer cells induces endogenous IFN-β production capable of improving dendritic cell function. *European Journal of Immunology*, *43*(7), 1849–1861. <https://doi.org/10.1002/eji.201242902>
- Gelman, A. E., Zhang, J., Choi, Y., & Turka, L. A. (2004). Toll-Like Receptor Ligands Directly Promote Activated CD4⁺ T Cell Survival. *The Journal of Immunology*, *172*(10), 6065–6073. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.172.10.6065>
- Gentles, A. J., Newman, A. M., Liu, C. L., Bratman, S. V., Feng, W., Kim, D., ... Alizadeh, A. A. (2015). The prognostic landscape of genes and infiltrating immune cells across human cancers. *Nature Medicine*, *21*(8), 938–945. <https://doi.org/10.1038/nm.3909>
- Ginhoux, F., Liu, K., Helft, J., Bogunovic, M., Greter, M., Hashimoto, D., ... Merad, M. (2009). The origin and development of nonlymphoid tissue CD103⁺ DCs. *The Journal of Experimental Medicine*, *206*(13), 3115–3130. <https://doi.org/10.1084/jem.20091756>

- Goc, J., Germain, C., Vo-Bourgais, T. K. D., Lupo, A., Klein, C., Knockaert, S., ... Dieu-Nosjean, M. C. (2014). Dendritic cells in tumor-associated tertiary lymphoid structures signal a th1 cytotoxic immune contexture and license the positive prognostic value of infiltrating CD8+t cells. *Cancer Research*, *74*(3), 705–715. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-13-1342>
- Gosu, V., Basith, S., Kwon, O. P., & Choi, S. (2012). Therapeutic applications of nucleic acids and their analogues in toll-like receptor signaling. *Molecules*, *17*(11), 13503–13529. <https://doi.org/10.3390/molecules171113503>
- Granot, Z., Henke, E., Comen, E. A., King, T. A., Norton, L., & Benezra, R. (2011). Tumor entrained neutrophils inhibit seeding in the premetastatic lung. *Cancer Cell*, *20*(3), 300–314. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2011.08.012>
- Grosso, J., Horak, C. E., Inzunza, D., Cardona, D. M., Simon, J. S., Gupta, A. K., ... Cogswell, J. (2013). Association of tumor PD-L1 expression and immune biomarkers with clinical activity in patients (pts) with advanced solid tumors treated with nivolumab (anti-PD-1; BMS-936558; ONO-4538). *Journal of Clinical Oncology*, *31*(15_suppl), 3016. https://doi.org/10.1200/jco.2013.31.15_suppl.3016
- Harney, A. S., Arwert, E. N., Entenberg, D., Wang, Y., Guo, P., Qian, B. Z., ... Condeelis, J. S. (2015). Real-time imaging reveals local, transient vascular permeability, and tumor cell intravasation stimulated by TIE2hi macrophage-derived VEGFA. *Cancer Discovery*, *5*(9), 932–943. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-15-0012>
- He, S., Mao, X., Sun, H., Shirakawa, T., Zhang, H., & Wang, X. (2015). Potential therapeutic targets in the process of nucleic acid recognition: Opportunities and challenges. *Trends in Pharmacological Sciences*, *36*(1), 51–64. <https://doi.org/10.1016/j.tips.2014.10.013>
- Hertzog, P., Smyth Kathleen C F Sheehan, M. J., Scott, B., Jeremy B Swann, R. D., Hayakawa, Y., Zerafa, N., ... Smyth, M. J. (2007). Function Homeostasis, Activation, and Antitumor Type I IFN Contributes to NK Cell Type I IFN Contributes to NK Cell Homeostasis, Activation, and Antitumor Function. *J Immunol*, *178*, 7540–7549. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.178.12.7540>
- Hobeika, a C., Subramaniam, P. S., & Johnson, H. M. (1997). IFNalpha induces the expression of the cyclin-dependent kinase inhibitor p21 in human prostate cancer cells. *Oncogene*, *14*(10), 1165–70. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1200939>
- Huang, A. C., Postow, M. A., Orlowski, R. J., Mick, R., Bengsch, B., Manne, S., ... Wherry, E. J. (2017). T-cell invigoration to tumour burden ratio associated with anti-PD-1 response. *Nature*, *545*(7652), 60–65. <https://doi.org/10.1038/nature22079>
- Iida, N., Dzutsev, A., Stewart, C. A., Smith, L., Bouladoux, N., Weingarten, R. A., ... Goldszmid, R. S. (2013). Commensal Bacteria Control Cancer Response to Therapy by Modulating the Tumor Microenvironment. *Science*, *342*(6161), 967–970. <https://doi.org/10.1126/science.1240527>
- Imai, K., Matsuyama, S., Miyake, S., Suga, K., & Nakachi, K. (2000). Natural cytotoxic activity of peripheral-blood lymphocytes and cancer incidence: an 11-year follow-up study of a general population. *Lancet*, *356*(9244), 1795–1799. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(00\)03231-1](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(00)03231-1)
- Jelinek, I., Leonard, J. N., Price, G. E., Brown, K. N., Meyer-Manlapat, A., Goldsmith, P. K., ... Segal, D. M. (2011). TLR3-Specific Double-Stranded RNA Oligonucleotide Adjuvants Induce Dendritic Cell Cross-Presentation, CTL Responses, and Antiviral Protection. *The Journal of Immunology*, *186*(4), 2422–2429. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1002845>

- Kaisho, T. (2012). Pathogen sensors and chemokine receptors in dendritic cell subsets. *Vaccine*, *30*(52), 7652–7657. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2012.10.043>
- Kawai, T., & Akira, S. (2010). The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors. *Nature Immunology*, *11*(5), 373–384. <https://doi.org/10.1038/ni.1863>
- Keir, M. E., Butte, M. J., Freeman, G. J., & Sharpe, A. H. (2008). PD-1 and Its Ligands in Tolerance and Immunity. *Annual Review of Immunology*, *26*(1), 677–704. <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.26.021607.090331>
- Kessenbrock, K., Plaks, V., & Werb, Z. (2010). Matrix Metalloproteinases: Regulators of the Tumor Microenvironment. *Cell*, *141*(1), 52–67. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.03.015>
- Kranz, L. M., Diken, M., Haas, H., Kreiter, S., Loquai, C., Reuter, K. C., ... Sahin, U. (2016). Systemic RNA delivery to dendritic cells exploits antiviral defence for cancer immunotherapy. *Nature*, *534*(7607), 396–401. <https://doi.org/10.1038/nature18300>
- Krishnan, J., Selvarajoo, K., Tsuchiya, M., Lee, G., & Choi, S. (2007). Toll-like receptor signal transduction. *Experimental & Molecular Medicine*, *39*(4), 421–438. <https://doi.org/10.1038/emm.2007.47>
- Kuang, D.-M., Zhao, Q., Peng, C., Xu, J., Zhang, J.-P., Wu, C., & Zheng, L. (2009). Activated monocytes in peritumoral stroma of hepatocellular carcinoma foster immune privilege and disease progression through PD-L1. *The Journal of Experimental Medicine*, *206*(6), 1327–1337. <https://doi.org/10.1084/jem.20082173>
- Kumar, V., Patel, S., Tcyganov, E., & Gabrilovich, D. I. (2016). The Nature of Myeloid-Derived Suppressor Cells in the Tumor Microenvironment. *Trends in Immunology*, *37*(3), 208–220. <https://doi.org/10.1016/j.it.2016.01.004>
- Laplanche, A., Alzieu, L., Delozier, T., Berlie, J., Veyret, C., Fargeot, P., ... Lacour, J. (2000). Polyadenylic – polyuridylic acid plus locoregional radiotherapy versus chemotherapy with CMF in operable breast cancer : a 14 year follow-up analysis of a randomized trial of the Fédération Nationale des Centres de Lutte Contre le Cancer (FNCLCC), *87*(Table 1), 189–191.
- Larkin, J., Chiarion-Sileni, V., Gonzalez, R., Grob, J. J., Cowey, C. L., Lao, C. D., ... Wolchok, J. D. (2015). Combined Nivolumab and Ipilimumab or Monotherapy in Untreated Melanoma. *New England Journal of Medicine*, *373*(1), 23–34. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1504030>
- Latchman, Y., Wood, C. R., Chernova, T., Chaudhary, D., Borde, M., Chernova, I., ... Freeman, G. J. (2001). PD-L2 is a second ligand for PD-1 and inhibits T cell activation. *Nature Immunology*, *2*(3), 261–268. <https://doi.org/10.1038/85330>
- Lavin, Y., Mortha, A., Rahman, A., & Merad, M. (2015). Regulation of macrophage development and function in peripheral tissues. *Nature Reviews Immunology*, *15*(12), 731–744. <https://doi.org/10.1038/nri3920>
- Leonard, J. N., Ghirlando, R., Askins, J., Bell, J. K., Margulies, D. H., Davies, D. R., & Segal, D. M. (2008). The TLR3 signaling complex forms by cooperative receptor dimerization. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *105*(1), 258–263. <https://doi.org/10.1073/pnas.0710779105>
- Lesokhin, A. M., Callahan, M. K., Postow, M. A., & Wolchok, J. D. (2015). On being less tolerant: Enhanced cancer immunosurveillance enabled by targeting checkpoints and agonists of T cell activation. *Science Translational Medicine*, *7*(280), 280sr1–280sr1. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3010274>

- Liu, C., Lou, Y., Lizee, G., Qin, H., Liu, S., Rabinovich, B., ... Hwu, P. (2008). Plasmacytoid dendritic cells induce NK cell-dependent, tumor antigen-specific T cell cross-priming and tumor regression in mice. *The Journal of Clinical Investigation*, 118(3), 1165–1175. <https://doi.org/10.1172/JCI33583>
- Liu, L., Botos, I., Wang, Y., Leonard, J. N., Shiloach, J., Segal, D. M., & Davies, D. R. (2008). Structural Basis of Toll-Like Receptor 3 Signaling with Double-Stranded RNA. *Science*, 320(5874), 379–381. <https://doi.org/10.1126/science.1155406>
- Llosa, N. J., Cruise, M., Tam, A., Wicks, E. C., Hechenbleikner, E. M., Taube, J. M., ... Housseau, F. (2015). The vigorous immune microenvironment of microsatellite instable colon cancer is balanced by multiple counter-inhibitory checkpoints. *Cancer Discovery*, 5(1), 43–51. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-14-0863>
- Mahmoud, S. M. A., Paish, E. C., Powe, D. G., Macmillan, R. D., Grainge, M. J., Lee, A. H. S., ... Green, A. R. (2011). Tumor-infiltrating CD8+ lymphocytes predict clinical outcome in breast cancer. *Journal of Clinical Oncology*, 29(15), 1949–1955. <https://doi.org/10.1200/JCO.2010.30.5037>
- Marabelle, A., Kohrt, H., Caux, C., & Levy, R. (2014). Intratumoral immunization: A new paradigm for cancer therapy. *Clinical Cancer Research*, 20(7), 1747–1756. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-13-2116>
- Marvel, D., & Gabrilovich, D. I. (2015). Myeloid-derived suppressor cells in the tumor microenvironment: expect the unexpected. *The Journal Clinical Investigation*, 125(9), 3356–3364. <https://doi.org/10.1172/JCI80005.Definition>
- Matsumoto, M., Tatematsu, M., Nishikawa, F., Azuma, M., Ishii, N., Morii-Sakai, A., ... Seya, T. (2015). Defined TLR3-specific adjuvant that induces NK and CTL activation without significant cytokine production in vivo. *Nature Communications*, 6, 1–12. <https://doi.org/10.1038/ncomms7280>
- Mauri, C., & Bosma, A. (2012). Immune Regulatory Function of B Cells. *Annual Review of Immunology*, 30(1), 221–241. <https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-020711-074934>
- Merad, M., Sathe, P., Helft, J., Miller, J., & Mortha, A. (2013). The Dendritic Cell Lineage: Ontogeny and Function of Dendritic Cells and Their Subsets in the Steady State and the Inflamed Setting. *Annual Review of Immunology*, 31(1), 563–604. <https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-020711-074950>
- Morvan, M. G., & Lanier, L. L. (2016). NK cells and cancer: You can teach innate cells new tricks. *Nature Reviews Cancer*, 16(1), 7–19. <https://doi.org/10.1038/nrc.2015.5>
- Mosser, D. M., & Zhang, X. (2008). Interleukin-10: New perspectives on an old cytokine. *Immunological Reviews*, 226(1), 205–218. <https://doi.org/10.1111/j.1600-065X.2008.00706.x>
- Murray, P. J., & Wynn, T. A. (2011). Protective and pathogenic functions of macrophage subsets. *Nature Reviews Immunology*, 11(11), 723–737. <https://doi.org/10.1038/nri3073>
- Muzio, M., Bosisio, D., Polentarutti, N., D'amico, G., Stoppacciaro, A., Mancinelli, R., ... Mantovani, A. (2000). Differential Expression and Regulation of Toll-Like Receptors (TLR) in Human Leukocytes: Selective Expression of TLR3 in Dendritic Cells. *The Journal of Immunology*, 164(11), 5998–6004. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.164.11.5998>
- Navabi, H., Jasani, B., Reece, A., Clayton, A., Tabi, Z., Donniger, C., ... Adams, M. (2009). A clinical grade poly I:C-analogue (Ampligen®) promotes optimal DC

- maturation and Th1-type T cell responses of healthy donors and cancer patients in vitro. *Vaccine*, 27(1), 107–115. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2008.10.024>
- Nielsen, A. E., Hantho, J. D., & Mancini, R. J. (2017). Synthetic agonists of NOD-like, RIG-I-like, and C-type lectin receptors for probing the inflammatory immune response. *Future Medicinal Chemistry*, 9(12), 1345–1360. <https://doi.org/10.4155/fmc-2017-0101>
- Nishimura, M., Naito, S., Ishimura, M. N., Aito, S. N., Nishimura, M., & Naito, S. (2005). Tissue-specific mRNA expression profiles of human toll-like receptors and related genes. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, 28(5), 886–892. <https://doi.org/10.1248/bpb.28.886>
- Nocera, D. A., Roselli, E., Araya, P., Nuñez, N. G., Lienenklaus, S., Jablonska, J., ... Maccioni, M. (2016). In vivo visualizing the IFN- β response required for tumor growth control in a therapeutic model of polyadenylic-polyuridylic acid administration. *Journal of Immunology*, 196(6). <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1501044>
- Núñez, N. G., Andreani, V., Crespo, M. I., Nocera, D. A., Breser, M. L., Morón, G., ... Maccioni, M. (2012). IFN β produced by TLR4-activated tumor cells is involved in improving the antitumoral immune response. *Cancer Research*, 72(3), 592–603. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-11-0534>
- Ohno, S., Inagawa, H., Dhar, D. K., Fujii, T., Ueda, S., Tachibana, M., ... Nagasue, N. (2002). The degree of macrophage infiltration into the cancer cell nest is a significant predictor of survival in gastric cancer patients. *Anticancer Research*, 23(6D), 5015–5022.
- Ohno, S., Ohno, Y., Suzuki, N., Kamei, T., Koike, K., Inagawa, H., ... Inoue, M. (2004). Correlation of histological localization of tumor-associated macrophages with clinicopathological features in endometrial cancer. *Anticancer Research*, 24(5 C), 3335–3342.
- Orange, J. S. (2013). Natural killer cell deficiency. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 132(3), 515–525. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2013.07.020>
- Ott, P. A., Hu, Z., Keskin, D. B., Shukla, S. A., Sun, J., Bozym, D. J., ... Wu, C. J. (2017). An immunogenic personal neoantigen vaccine for patients with melanoma. *Nature*, 547(7662), 217–221. <https://doi.org/10.1038/nature22991>
- Palomero, T., & Ferrando, A. (2017). Targeted cellular immunotherapy for T cell malignancies. *Nature Medicine*, 23, 1402. Retrieved from <http://dx.doi.org/10.1038/nm.4458>
- Palucka, K., & Banchereau, J. (2012). Cancer immunotherapy via dendritic cells. *Nature Reviews Cancer*, 12(4), 265–277. <https://doi.org/10.1038/nrc3258>
- Pandey, S., Kawai, T., & Akira, S. (2014). Microbial Sensing by Toll-Like Receptors and Intracellular Nucleic Acid Sensors. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 7(1), a016246.
- Paone, A., Galli, R., Gabellini, C., Lukashev, D., Starace, D., Gorch, A., ... Riccioli, A. (2010). Toll-like Receptor 3 Regulates Angiogenesis and Apoptosis in Prostate Cancer Cell Lines through Hypoxia-Inducible Factor 1 α . *Neoplasia*, 12(7), 539–549. <https://doi.org/10.1593/neo.92106>
- Pardoll, D. M. (2012). The blockade of immune checkpoints in cancer immunotherapy. *Nature Reviews Cancer*, 12(4), 252–264. <https://doi.org/10.1038/nrc3239>
- Parker, B. S., Rautela, J., & Hertzog, P. J. (2016). Antitumour actions of interferons:

- implications for cancer therapy. *Nature Publishing Group*, 16(3), 131–144. <https://doi.org/10.1038/nrc.2016.14>
- Parker, K. H., Beury, D. W., & Ostrand-Rosenberg, S. (2015). *Myeloid-Derived Suppressor Cells: Critical Cells Driving Immune Suppression in the Tumor Microenvironment*. *Advances in Cancer Research* (1st ed., Vol. 128). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/bs.acr.2015.04.002>
- Perrot, I., Deauvieu, F., Massacrier, C., Hughes, N., Garrone, P., Durand, I., ... Caux, C. (2010). TLR3 and Rig-Like Receptor on Myeloid Dendritic Cells and Rig-Like Receptor on Human NK Cells Are Both Mandatory for Production of IFN- in Response to Double-Stranded RNA. *The Journal of Immunology*, 185(4), 2080–2088. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1000532>
- Petit, J., Sarrazin, L. E., & Lacour, F. (1980). ADJUVANT TREATMENT WITH POLYADENYLIC-POLYURIDYLIC ACID (POLYA.POLYU) IN OPERABLE BREAST CANCER, (July), 3–6.
- Pfeffer, K., Matsuyama, T., Kundig, T. M., Wakeham, A., Kishihara, K., Shahinian, A., ... Mak, T. W. (1993). Mice deficient for the 55kd tumor necrosis factor receptor are resistant to endotoxic shock yet succumb to L. monocytogenes infection. *Cell*, 73, 457–467.
- Pirher, N., Ivičak, K., Pohar, J., Benčina, M., & Jerala, R. (2008). A second binding site for double-stranded RNA in TLR3 and consequences for interferon activation. *Nature Structural and Molecular Biology*, 15(7), 761–763. <https://doi.org/10.1038/nsmb.1453>
- Pittet, M. J., Nahrendorf, M., & Swirski, F. K. (2014). The journey from stem cell to macrophage. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1319(1), 1–18. <https://doi.org/10.1111/nyas.12393>
- Pothlichet, J., Meunier, I., Davis, B. K., Ting, J. P. Y., Skamene, E., von Messling, V., & Vidal, S. M. (2013). Type I IFN Triggers RIG-I/TLR3/NLRP3-dependent Inflammasome Activation in Influenza A Virus Infected Cells. *PLoS Pathogens*, 9(4). <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003256>
- Pulendran, B. (2015). The Varieties of Immunological Experience: Of Pathogens, Stress, and Dendritic Cells. *Annual Review of Immunology*, 33(1), 563–606. <https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-020711-075049>
- Qi, R., Singh, D., & Kao, C. C. (2012). Proteolytic processing regulates toll-like receptor 3 stability and endosomal localization. *Journal of Biological Chemistry*, 287(39), 32617–32629. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.387803>
- Ramello, M. C., Haura, E. B., & Abate-Daga, D. (2017). CAR-T cells and combination therapies: What's next in the immunotherapy revolution? *Pharmacological Research*. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2017.11.035>
- Ramnath, D., Powell, E. E., Scholz, G. M., & Sweet, M. J. (2017). The toll-like receptor 3 pathway in homeostasis, responses to injury and wound repair. *Seminars in Cell and Developmental Biology*, 61, 22–30. <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2016.08.014>
- Rawlings, D. J., Schwartz, M. A., Jackson, S. W., & Meyer-Bahlburg, A. (2012). Integration of B cell responses through Toll-like receptors and antigen receptors. *Nature Reviews Immunology*, 12(4), 282–294. <https://doi.org/10.1038/nri3190>
- Renner, P., Rovira, J., Klein, C., Schlitt, H.-J., Geissler, E. K., & Kroemer, A. (2014). KLRG1 + natural killer cells protect against pulmonary metastatic disease by

- immunosurveillance. *Oncol Immunology*, 3(4), e28328. <https://doi.org/10.4161/onci.28328>
- Reynolds, J. M., & Dong, C. (2013). Toll-like receptor regulation of effector T lymphocyte function. *Trends in Immunology*, 34(10), 511–519. <https://doi.org/10.1016/j.it.2013.06.003>
- Roberts, E. W., Broz, M. L., Binnewies, M., Headley, M. B., Nelson, A. E., Wolf, D. M., ... Krummel, M. F. (2016). Critical Role for CD103 + /CD141 + Dendritic Cells Bearing CCR7 for Tumor Antigen Trafficking and Priming of T Cell Immunity in Melanoma. *Cancer Cell*, 30(2), 324–336. <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2016.06.003>
- Robinson, N., McComb, S., Mulligan, R., Dudani, R., Krishnan, L., & Sad, S. (2012). Type I interferon induces necroptosis in macrophages during infection with *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Nature Immunology*, 13(10), 954–962. <https://doi.org/10.1038/ni.2397>
- Rosser, E. C., & Mauri, C. (2015). Regulatory B Cells: Origin, Phenotype, and Function. *Immunity*, 42(4), 607–612. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2015.04.005>
- Ruffell, B., Chang-Strachan, D., Chan, V., Rosenbusch, A., Ho, C. M. T., Pryer, N., ... Coussens, L. M. (2014). Macrophage IL-10 Blocks CD8+ T Cell-Dependent Responses to Chemotherapy by Suppressing IL-12 Expression in Intratumoral Dendritic Cells. *Cancer Cell*, 26(5), 623–637. <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2014.09.006>
- Ruffell, B., & Coussens, L. M. (2015). Macrophages and therapeutic resistance in cancer. *Cancer Cell*, 27(4), 462–472. <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2015.02.015>
- Sahin, U., Derhovanessian, E., Miller, M., Kloke, B.-P., Simon, P., Löwer, M., ... Türeci, Ö. (2017). Personalized RNA mutanome vaccines mobilize poly-specific therapeutic immunity against cancer. *Nature*, 547(7662), 222–226. <https://doi.org/10.1038/nature23003>
- Salaun, B., Zitvogel, L., Asselin-Paturel, C., Morel, Y., Chemin, K., Dubois, C., ... Andre, F. (2011). TLR3 as a biomarker for the therapeutic efficacy of double-stranded RNA in breast cancer. *Cancer Research*, 71(5), 1607–1614. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-10-3490>
- Salem, M. L., Diaz-Montero, C. M., EL-Naggar, S. A., Chen, Y., Moussa, O., & Cole, D. J. (2009). The TLR3 agonist poly(I:C) targets CD8+ T cells and augments their antigen-specific responses upon their adoptive transfer into naive recipient mice. *Vaccine*, 27(4), 549–557. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2008.11.013>
- Salmon, H., Idoyaga, J., Rahman, A., Leboeuf, M., Remark, R., Jordan, S., ... Merad, M. (2016). Expansion and Activation of CD103+ Dendritic Cell Progenitors at the Tumor Site Enhances Tumor Responses to Therapeutic PD-L1 and BRAF Inhibition. *Immunity*, 44(4), 924–938. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2016.03.012>
- Samarajiwa, S. A., Forster, S., Auchettl, K., & Hertzog, P. J. (2009). INTERFEROME: The database of interferon regulated genes. *Nucleic Acids Research*, 37(SUPPL. 1), 852–857. <https://doi.org/10.1093/nar/gkn732>
- Saraiva, M., & O'Garra, A. (2010). The regulation of IL-10 production by immune cells. *Nature Reviews Immunology*, 10(3), 170–181. <https://doi.org/10.1038/nri2711>
- Schadendorf, D., Hodi, F. S., Robert, C., Weber, J. S., Margolin, K., Hamid, O., ... Wolchok, J. D. (2015). Pooled Analysis of Long-Term Survival Data From Phase II and Phase III Trials of Ipilimumab in Unresectable or Metastatic Melanoma. *Journal*

- of *Clinical Oncology*, 33(17), 1889–1894. <https://doi.org/10.1200/JCO.2014.56.2736>
- Schmidt, K. N., Leung, B., Kwong, M., Zarembler, K. A., Satyal, S., Navas, T. A., ... Godowski, P. J. (2004). APC-Independent Activation of NK Cells by the Toll-Like Receptor 3 Agonist Double-Stranded RNA. *The Journal of Immunology*, 172(1), 138–143. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.172.1.138>
- Schreiner, B., Mitsdoerffer, M., Kieseier, B. C., Chen, L., Hartung, H. P., Weller, M., & Wiendl, H. (2004). Interferon- β enhances monocyte and dendritic cell expression of B7-H1 (PD-L1), a strong inhibitor of autologous T-cell activation: Relevance for the immune modulatory effect in multiple sclerosis. *Journal of Neuroimmunology*, 155(1–2), 172–182. <https://doi.org/10.1016/j.jneuroim.2004.06.013>
- Sharma, P., & Allison, J. P. (2015). The future of immune checkpoint therapy. *Science*, 348(6230), 56–61. <https://doi.org/10.1126/science.aaa8172>
- Sharma, P., Hu-Lieskovan, S., Wargo, J. A., & Ribas, A. (2017). Primary, Adaptive, and Acquired Resistance to Cancer Immunotherapy. *Cell*, 168(4), 707–723. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.01.017>
- Sharpe, A. H., & Pauken, K. E. (2017). The diverse functions of the PD1 inhibitory pathway. *Nature Reviews Immunology*. <https://doi.org/10.1038/nri.2017.108>
- Shime, H., Matsumoto, M., Oshiumi, H., Tanaka, S., Nakane, A., Iwakura, Y., ... Seya, T. (2012). Toll-like receptor 3 signaling converts tumor-supporting myeloid cells to tumoricidal effectors. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(6), 2066–2071. <https://doi.org/10.1073/pnas.1113099109>
- Shortman, K., & Heath, W. R. (2010). The CD8+ dendritic cell subset. *Immunological Reviews*, 234(1), 18–31. <https://doi.org/10.1111/j.0105-2896.2009.00870.x>
- Sistigu, A., Yamazaki, T., Vacchelli, E., Chaba, K., Enot, D. P., Adam, J., ... Zitvogel, L. (2014). Cancer cell–autonomous contribution of type I interferon signaling to the efficacy of chemotherapy. *Nature Medicine*, 20(11), 1301–1309. <https://doi.org/10.1038/nm.3708>
- Snell, L. M., McGaha, T. L., & Brooks, D. G. (2017). Type I Interferon in Chronic Virus Infection and Cancer. *Trends in Immunology*, 38(8), 542–557. <https://doi.org/10.1016/j.it.2017.05.005>
- Spiller, K. L., Anfang, R. R., Spiller, K. J., Ng, J., Nakazawa, K. R., Daulton, J. W., & Vunjak-Novakovic, G. (2014). The role of macrophage phenotype in vascularization of tissue engineering scaffolds. *Biomaterials*, 35(15), 4477–4488. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2014.02.012>
- Srivastava, S., Koch, M. A., Pepper, M., & Campbell, D. J. (2014). Type I interferons directly inhibit regulatory T cells to allow optimal antiviral T cell responses during acute LCMV infection. *The Journal of Experimental Medicine*, 211(5), 961–974. <https://doi.org/10.1084/jem.20131556>
- Steinman, R. M. (2012). Decisions About Dendritic Cells: Past, Present, and Future. *Annual Review of Immunology*, 30(1), 1–22. <https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-100311-102839>
- Swiecki, M., & Colonna, M. (2015). The multifaceted biology of plasmacytoid dendritic cells. *Nature Reviews Immunology*, 15(8), 471–485. <https://doi.org/10.1038/nri3865>
- Széles, L., Meissner, F., Dunand-Sauthier, I., Thelemann, C., Hersch, M., Singovski, S., ... Reith, W. (2015). TLR3-Mediated CD8⁺ Dendritic Cell Activation Is Coupled with

- Establishment of a Cell-Intrinsic Antiviral State. *The Journal of Immunology*, 195(3), 1025–1033. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1402033>
- Tabeta, K., Hoebe, K., Janssen, E. M., Du, X., Georgel, P., Crozat, K., ... Beutler, B. (2006). The Unc93b1 mutation 3d disrupts exogenous antigen presentation and signaling via Toll-like receptors 3, 7 and 9. *Nature Immunology*, 7(2), 156–164. <https://doi.org/10.1038/ni1297>
- Tabiasco, J., Devedre, E., Rufer, N., Salaun, B., Cerottini, J.-C., Speiser, D., & Romero, P. (2006). Human Effector CD8+ T Lymphocytes Express TLR3 as a Functional Coreceptor. *The Journal of Immunology*, 177(12), 8708–8713. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.177.12.8708>
- Takeuchi, O., & Akira, S. (2010). Pattern Recognition Receptors and Inflammation. *Cell*, 140(6), 805–820. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.01.022>
- Tanaka, A., & Sakaguchi, S. (2017). Regulatory T cells in cancer immunotherapy. *Cell Research*, 27(1), 109–118. <https://doi.org/10.1038/cr.2016.151>
- Taube, J. M., Young, G. D., McMiller, T. L., Chen, S., Salas, J. T., Pritchard, T. S., ... Topalian, S. L. (2015). Differential expression of immune-regulatory genes associated with PD-L1 display in melanoma: Implications for PD-1 pathway blockade. *Clinical Cancer Research*, 21(17), 3969–3976. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-15-0244>
- Teng, M. W. L., Ngiow, S. F., Ribas, A., & Smyth, M. J. (2015). Classifying cancers based on T-cell infiltration and PD-L1. *Cancer Research*, 75(11), 2139–2145. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-15-0255>
- Thompson, E. D., Zahurak, M., Murphy, A., Cornish, T., Cuka, N., Abdelfatah, E., ... Kelly, R. J. (2017). Patterns of PD-L1 expression and CD8 T cell infiltration in gastric adenocarcinomas and associated immune stroma. *Gut*, 66(5), 794–801. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2015-310839>
- Topalian, S. L., Hodi, F. S., Brahmer, J. R., Gettinger, S. N., Smith, D. C., McDermott, D. F., ... Sznol, M. (2012). Safety, Activity, and Immune Correlates of Anti-PD-1 Antibody in Cancer. *New England Journal of Medicine*, 366(26), 2443–2454. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1200690>
- Topalian, S. L., Taube, J. M., Anders, R. A., & Pardoll, D. M. (2016). Mechanism-driven biomarkers to guide immune checkpoint blockade in cancer therapy. *Nature Reviews Cancer*, 16(5), 275–287. <https://doi.org/10.1038/nrc.2016.36>
- Tsou, P., Katayama, H., Ostrin, E. J., & Hanash, S. M. (2016). The emerging role of b cells in tumor immunity. *Cancer Research*, 76(19), 5591–5601. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-16-0431>
- U'Ren, L., Guth, A., Kamstock, D., & Dow, S. (2010). Type I interferons inhibit the generation of tumor-associated macrophages. *Cancer Immunology, Immunotherapy*, 59(4), 587–598. <https://doi.org/10.1007/s00262-009-0776-6>
- Vivier, E. (2006). What is natural in natural killer cells? *Immunology Letters*, 107(1), 1–7. <https://doi.org/10.1016/j.imlet.2006.07.004>
- Voskoboinik, I., Whisstock, J. C., & Trapani, J. A. (2015). Perforin and granzymes: Function, dysfunction and human pathology. *Nature Reviews Immunology*, 15(6), 388–400. <https://doi.org/10.1038/nri3839>
- Wang, B. X., Rahbar, R., & Fish, E. N. (2011). Interferon: Current Status and Future Prospects in Cancer Therapy. *Journal of Interferon & Cytokine Research*, 31(7),

- 545–552. <https://doi.org/10.1089/jir.2010.0158>
- Wang, Y., Liu, L., Davies, D. R., & Segal, D. M. (2010). Dimerization of Toll-like receptor 3 (TLR3) is required for ligand binding. *Journal of Biological Chemistry*, *285*(47), 36836–36841. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.167973>
- Wang, Y., Miao, L., Satterlee, A., & Huang, L. (2015). Delivery of oligonucleotides with lipid nanoparticles. *Advanced Drug Delivery Reviews*. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2015.02.007>
- Worbs, T., Hammerschmidt, S. I., & Förster, R. (2016). Dendritic cell migration in health and disease. *Nature Reviews Immunology*, *17*(1), 30–48. <https://doi.org/10.1038/nri.2016.116>
- Wu, C. F., Andzinski, L., Kasnitz, N., Kröger, A., Klawonn, F., Lienenklaus, S., ... Jablonska, J. (2015). The lack of type I interferon induces neutrophil-mediated pre-metastatic niche formation in the mouse lung. *International Journal of Cancer*, *137*(4), 837–847. <https://doi.org/10.1002/ijc.29444>
- Xagorari, A., & Chlichlia, K. (2008). Toll-Like Receptors and Viruses: Induction of Innate Antiviral Immune Responses. *The Open Microbiology Journal*, *2*(1), 49–59. <https://doi.org/10.2174/1874285800802010049>
- Yamazaki, T., Akiba, H., Iwai, H., Matsuda, H., Aoki, M., Tanno, Y., ... Yagita, H. (2002). Expression of Programmed Death 1 Ligands by Murine T Cells and APC. *The Journal of Immunology*, *169*(10), 5538–5545. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.169.10.5538>
- Zhang, N., & Bevan, M. J. (2011). CD8+ T Cells: Foot Soldiers of the Immune System. *Immunity*, *35*(2), 161–168. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2011.07.010>
- Zitvogel, L., Galluzzi, L., Kepp, O., Smyth, M. J., & Kroemer, G. (2015). Type I interferons in anticancer immunity. *Nature Reviews Immunology*, *15*(7), 405–414. <https://doi.org/10.1038/nri3845>
- Zoglmeier, C., Bauer, H., Nörenberg, D., Wedekind, G., Bittner, P., Sandholzer, N., ... Bourquin, C. (2011). CpG blocks immunosuppression by myeloid-derived suppressor cells in tumor-bearing mice. *Clinical Cancer Research*, *17*(7), 1765–1775. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-10-2672>

CAPÍTULO 7: PRODUCCIÓN CIENTÍFICA

PUBLICACIONES CIENTÍFICAS:

-Aging Impairs the Ability of Conventional Dendritic Cells to Cross-Prime CD8+ T Cells upon Stimulation with a TLR7 Ligand.

Zacca ER, Crespo MI, Acland RP, Roselli E, Núñez NG, Maccioni M, Maletto BA, Pistoresi-Palencia MC, Morón G.

PLoS One. 2015 Oct 16;10(10):e0140672. doi: 10.1371/journal.pone.0140672. eCollection 2015.

-In Vivo Visualizing the IFN- β Response Required for Tumor Growth Control in a Therapeutic Model of Polyadenylic-Polyuridylic Acid Administration.

Nocera DA, Roselli E, Araya P, Nuñez NG, Lienenklaus S, Jablonska J, Weiss S, Gatti G, Brinkmann MM, Kröger A, Morón G, Maccioni M

J Immunol. 2016 Mar 15;196(6):2860-9. doi: 10.4049/jimmunol.1501044. Epub 2016 Feb 15.

-Downregulation of Adaptor Protein Myd88 Compromises the Angiogenic Potential of B16 Murine Melanoma.

Lucas Daniel Trucco, Emiliano Roselli, Paula Araya, Nicolas Gonzalo Nuñez, Hebe Agustina Mena, Jose Luis Bocco, Soledad Negrotto, Mariana Maccioni

PLoS One. 2017 Jun 29;12(6):e0179897. doi: 10.1371/journal.pone.0179897. eCollection 2017.

PRESENTACIONES EN CONGRESOS:

-Doxorubicin-treated cancer cells release HMGB1 that can modify the expression of VEGF and Angiopoietin I in an autocrine way via MyD88 Presentación: poster

E.Roselli, D.A.Nocera, G.Gatti, N.G.Nuñez, P.Araya, M.Maccioni

LXI REUNION ANUAL DE LA SOCIEDAD ARGENTINA DE IMMUNOLOGIA (2013)

-Doxorubicin-treated cancer cells release HMGB1 when dying that can modify the expression of angiogenic factors in a MyD88 dependant and independent way. Presentación: poster

E.Roselli, P.Araya, D.A.Nocera, G.Gatti, N.G.Nuñez, M.Maccioni

LXII REUNION ANUAL DE LA SOCIEDAD ARGENTINA DE IMMUNOLOGIA (2014)

-TLR3 ligand poly A:U modifies the composition of the tumour-infiltrating myeloid compartment towards an anti-tumour phenotype. Presentación: poster.

E.Roselli, P.Araya, D.A.Nocera, N.Nuñez, L.Trucco, M.Maccioni

LXIII REUNION ANUAL DE LA SOCIEDAD ARGENTINA DE IMMUNOLOGIA (2015)

-Immunotherapy based on the TLR3 ligand poly A:U modifies the tumour-associated myeloid compartment upregulating PD-L1 specifically on MHCII-monocytes on a type I IFN-dependant manner. Presentación: oral.

E.Roselli, P.Araya, N.G.Nuñez, C.Stempin, J.Nokolic, P.Benaroch, E.Piaggio, M.Maccioni.

LXIV REUNION ANUAL DE LA SOCIEDAD ARGENTINA DE IMMUNOLOGIA (2017)

-Characterization of the newly developed TLR3-GFP mice: novel reporter mice for studying the expression of TLR3. Presentación: oral.

E.Roselli, P.Araya, N.G.Nuñez, F.Graziano, C.Sedlik, P.Benaroch, E.Piaggio, M.Maccioni.

LXIV REUNION ANUAL DE LA SOCIEDAD ARGENTINA DE IMMUNOLOGIA (2017)