



TESIS DE DOCTORADO EN CIENCIAS QUÍMICAS

# “ESTUDIO Y CARACTERIZACIÓN DE CÉLULAS T CD8<sup>+</sup> INNATAS COMO POSIBLES MEDIADORES TERAPÉUTICOS EN CÁNCER”

**Bioq. Constanza Savid-Frontera**

**Directora: Dra. María Cecilia Rodríguez-Galán**

Universidad Nacional de Córdoba

Departamento de Bioquímica Clínica, Facultad de Ciencias Químicas

Centro de Investigaciones en Bioquímica Clínica e Inmunología, CONICET

Córdoba, Argentina

**2020**

**DIRECTORA DE TESIS:**

*Dra. María Cecilia Rodríguez-Galán*

**COMISIÓN ASESORA:**

*Dra. Cinthia Stempin*

*Dra. Cristina Maldonado*

*Dr. Germán Gil*

**EVALUADORA EXTERNA:**

*Dra. Mercedes Fuertes*

El presente trabajo de tesis fue realizado gracias al apoyo económico del Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica (ANPCyT-FONCyT), la Fundación para el Progreso de la Medicina (FPM), y la Secretaría de Ciencia y Tecnología de la Universidad Nacional de Córdoba (SECyT-UNC).

*A mis papas, que me apoyaron en cada etapa  
de mi vida, por su cariño y su confianza.*

# ÍNDICE

---

## Contenido

<b>ABREVIATURAS</b> .....	<b>1</b>
<b>RESUMEN</b> .....	<b>5</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>8</b>
<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>11</b>
SISTEMA INMUNE Y CÁNCER.....	12
RESPUESTA INMUNE Y CITOQUINAS: GENERALIDADES Y USO DE IL-12 EN EL TRATAMIENTO DEL CÁNCER.....	14
RESPUESTA ADAPTATIVA: _LINFOCITOS T CD8 <sup>+</sup> .....	18
<b>HIPÓTESIS Y OBJETIVOS</b> .....	<b>26</b>
<b>RESULTADOS</b> .....	<b>29</b>
<b>CAPÍTULO I: EFECTO DE LA TERAPIA GÉNICA DE DOSIS ÚNICA DE IL-12 COMO     MONOTERAPIA EN LA RESPUESTA ANTITUMORAL</b> .....	<b>30</b>
CONCLUSIONES CAPÍTULO I .....	42
<b>CAPÍTULO II: EFECTO DE LA CO-EXPRESIÓN SISTÉMICA DE IL-12 E IL-18 EN LA     RESPUESTA ANTITUMORAL Y EN LA INDUCCIÓN DE CÉLULAS T CD8<sup>+</sup> INNATAS EN     PERIFERIA</b> .....	<b>43</b>
CONCLUSIONES CAPÍTULO II .....	55
<b>CAPÍTULO III: ROL DE LAS CITOQUINAS IL-4, IFNs TIPO-I, E IFN<math>\gamma</math> EN LA GENERACIÓN DE     CÉLULAS T CD8<sup>+</sup> INNATAS EN PERIFERIA Y EN LA RESPUESTA ANTITUMORAL</b> .....	<b>56</b>
CONCLUSIONES CAPÍTULO III .....	71
<b>CAPÍTULO IV: EFECTO DE LA CO-EXPRESIÓN SISTÉMICA DE IL-12 E IL-18 EN LA     INDUCCIÓN DE CÉLULAS T CD8<sup>+</sup> INNATAS EN PERIFERIA EN UN CONTEXTO     ENRIQUECIDO EN CÉLULAS T CD8<sup>+</sup> INESPECÍFICAS DE ANTÍGENO.</b> .....	<b>74</b>
CONCLUSIONES CAPÍTULO IV .....	90
<b>DISCUSIÓN</b> .....	<b>92</b>
<b>CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS</b> .....	<b>105</b>
CONCLUSIONES.....	106
PERSPECTIVAS.....	110
<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	<b>111</b>
ANIMALES.....	112
LÍNEAS CELULARES.....	112

REACTIVOS QUÍMICOS.....	113
MODELO TUMORAL IN VIVO.....	114
INYECCIÓN HIDRODINÁMICA DE PLASMIDOS CODIFICANTES PARA IL-12 E IL-18.....	115
PROCESAMIENTO DE TEJIDOS Y OBTENCIÓN DE SUSPENSIONES CELULARES.....	116
TÉCNICAS GENERALES .....	117
PURIFICACIÓN DE PLÁSMIDOS LIBRES DE ENDOTOXINA .....	117
CITOMETRIA DE FLUJO .....	117
DETERMINACIÓN DE CÉLULAS T ESPECÍFICAS PARA OVOALBÚMINA (OVA) EN ANIMALES OT-I .....	120
ELISA .....	121
CULTIVO CELULAR .....	122
MICROSCOPIA.....	123
ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	127
<b>REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>129</b>
<b>PRODUCCIÓN CIENTÍFICA .....</b>	<b>153</b>
PUBLICACIONES EN REVISTAS CON REFERATO .....	154
PARTICIPACIÓN EN CONGRESOS .....	155
<b>AGRADECIMIENTOS.....</b>	<b>157</b>

## ABREVIATURAS

**Ac:** Anticuerpo monoclonal.  
**ACK:** solución tampón o buffer de lisis “cloruro de amonio – potasio” (“*Ammonium-Chloride-Potassium*”)  
**ADN:** Ácido desoxirribonucleico.  
**ADNc:** Ácido desoxirribonucleico complementario.  
**Ag:** Antígeno.  
**ANOVA:** Análisis de la varianza.  
**Anti-CD3:** Anticuerpo que reconoce a la molécula CD3  
**APC:** Aloficocianina  
**APC-Cy7:** Aloficocianina -cianina 7  
**B16:** línea celular tumoral de melanoma singénica con C57BL/6  
**BATF3:** factor de transcripción tipo-ATF cierre de leucina básico, *Basic Leucine Zipper ATF-Like Transcription Factor 3*  
**BCR:** receptor de células B  
**Ca<sup>2+</sup>:** Calcio iónico  
**CCR5:** Receptor de quimiocina tipo C-C 5.  
**CD:** aglomerado o *cluster* de diferenciación  
**CD11b:** Cadena alfa de integrina M.  
**CD49d:** alfa-4 integrina  
**CD122:** Cadena beta del receptor de IL-2 e IL-15  
**CI:** control de isotipo  
**CM:** células T de memoria central  
**CPA:** Célula presentadora de antígeno  
**CQ:** citoquina  
**CTL:** Linfocito T citotóxico  
**CXC:** Quimiocina que presenta dos cisteínas (C) unidas por otro aminoácido (X).  
**CXCL9:** o MIG, quimiocina o monoquina inducida por IFN $\gamma$   
**CXCL10:** o IP-10, proteína inducida por IFN $\gamma$ -10  
**DCs:** Células dendríticas, (*Dendritic cells*)  
**EL4:** línea celular tumoral de linfoma (timoma) singénica con C57BL/6  
**EM:** células T de memoria efectora  
**EMT:** transición epitelio-mesenquimal, *epithelial-mesenquimal transition*  
**Eomes:** Eomesodermina  
**FoxP3:** factor de transcripción Ecurfina o *forkhead box P3*  
**FoxP3-GFP:** animales transgénicos que presentan la proteína fluorescente verde (GFP) asociada al gen codificante para el factor de transcripción FoxP3  
**FT:** factor de transcripción  
**Fura-2/AM:** molécula apolar compuesta de Fura-2 (ácido aminopolicarboxílico) y Acetoximetil ester  
**GD:** Ganglios drenantes de tumor  
**GM-CSF:** factor estimulante de colonias granulocítico-macrofágico  
**GnD:** Ganglios no drenantes de tumor  
**Gr1:** antígeno de diferenciación mieloide  
**HP:** células T inducidas por proliferación homeostática

**IFM:** intensidad de fluorescencia media  
**IFN:** interferón  
**IFN $\alpha$ RKO:** animales deficientes en el receptor alfa de IFNs tipo-I  
**IFN $\gamma$ KO:** animales deficientes en IFN $\gamma$   
**IH:** inyección hidrodinámica  
**IL:** interleuquina  
**IL-12r:** proteína IL-12 recombinante  
**IL-12R:** Receptor de IL-12  
**IL-15R:** receptor de IL-15  
**IL-18R:** receptor de IL-18  
**IL4KO:** animales deficientes en IL-4  
**IM:** células T CD8<sup>+</sup> de memoria innata  
**iNKT:** células NK T invariantes, *invariant Natural Killer T cells*  
**ITK:** quinasa inducible por IL-2 de células T  
**Iv:** inyección o inoculación intravenosa  
**JAK:** quinasa Janus  
**kDa:** kilo-daltons  
**KIRs:** receptores tipo inmunoglobulinas de células asesinas, *Killer-cell immunoglobulin-like receptors*  
**KLF2:** factor de transcripción tipo Krüpel 2  
**KO:** *knock out*, para referirnos a animales transgénicos deficientes en alguna proteína  
**KPC:** línea celular tumoral de adenocarcinoma ductal pancreático singénica con C57BL/6, derivado del modelo murino KPC (Kras, p53, Cre)  
**LCK:** proteín-tirosin quinasa específica de leucocitos  
**LIM:** células T de memoria inducidas por linfopenia  
**LIP:** proliferación inducida por linfopenia  
**MAT:** Microambiente tumoral  
**MDSC:** célula mielóide supresora (*Myeloid-derived supressor cell*)  
**MHC:** Complejo mayor de histocompatibilidad, (*Major histocompatibilty complex*)  
**MP:** células T CD8<sup>+</sup> con fenotipo de memoria  
**NK:** células asesinas naturales (*Natural Killer*)  
**NKG2D:** receptor tipo lectina tipo-C, *Natural Killer Group 2D*  
**NL:** Nódulo linfático  
**OLP:** Órgano linfático primario  
**OLS:** Órgano linfático secundario  
**OT-I:** animales transgénicos con células T CD8<sup>+</sup> específicas para OVA  
**OVA:** ovalbúmina  
**PE:** ficoeritrina  
**PLZF:** proteína promielocítica de leucemia dedos de zinc  
**PBS:** Tampón fosfato salino  
**piH:** post-inyección hidrodinámica  
**RLK:** quinasa de arresto de linfocitos  
**RM:** células T de memoria residentes

**Rpm:** revoluciones por minuto  
**SEM:** Error estándar de la media  
**Sc:** inyección o inoculación subcutánea  
**SI:** Sistema inmune  
**SP:** timocitos simples positivos  
**STAT:** Transductor de señal y activador de la transcripción  
**TAM:** Macrófago asociado a tumor, *Tumor associated macrophage*  
**TCR:** receptor de células T  
**TGF- $\beta$ :** factor de crecimiento transformante beta  
**Th:** T cooperadora (*T "helper"*)  
**TLR7:** receptor tipo toll-7, *Toll like receptor-7*  
**TM:** células T de memoria convencional  
**TN:** células T *Naive* o vírgenes  
**TNF:** factor de necrosis tumoral  
**Treg:** Linfocito T regulatorio  
**VM:** células T CD8<sup>+</sup> de memoria virtual

## RESUMEN

El sistema inmune adaptativo es un componente esencial del sistema inmunológico que permite la inducción de una respuesta específica y de memoria contra antígenos determinados. Entre los principales actores que median este tipo de respuesta se encuentran los linfocitos T CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup>, los cuales se desarrollan y diferencian en tимо, y se activan en periferia al contactar a través de su receptor de células T (TCR) a su antígeno (Ag) específico en el contexto de una molécula del Complejo Mayor de Histocompatibilidad (MHC), adquiriendo marcadores de activación y memoria, y generando una respuesta efectora con la finalidad de eliminar el agente extraño. Sin embargo, hace algunos años se describió que en órganos linfáticos secundarios (OLS) de animales WT no expuestos a antígenos, existía entre un 10-15% de células T CD8<sup>+</sup> que presentaban un fenotipo similar al de memoria (CD44<sup>hi</sup> CD122<sup>+</sup>) con capacidad de producir interferón gamma (IFN $\gamma$ ) de manera rápida frente a estímulos innatos, independientemente de la señalización del TCR. En base a estas características y a su similitud con células de memoria convencional dependientes de antígeno, estas células fueron designadas originalmente como: “células T CD8<sup>+</sup> innatas”, “células con fenotipo de memoria”, “células de memoria innata” (IM, por *Innate memory cells*) a las presentes en tимо o “células de memoria virtual” (VM, por *virtual memory cells*) a las presentes en periferia.

Inicialmente, las células T CD8<sup>+</sup> innatas fueron identificadas en tимо de animales transgénicos que carecían de la expresión de distintas moléculas involucradas en la señalización a través del TCR. Desde entonces, muchos autores se han abocado a su estudio y a determinar diversas señales que pudieran ser importantes en la inducción de esta población, principalmente en tимо (células IM, por *innate memory cells*). Hoy se sabe que estas células también pueden originarse en OLS, sin embargo, su origen y desarrollo en periferia (células VM) aún es controversial.

En este trabajo de tesis aportamos evidencias de la distribución diferencial de las células VM en distintos OLS de animales WT portadores de tumor en condiciones normales y evaluamos además las alteraciones que esta población sufre en un contexto inflamatorio sistémico tipo T cooperador o “*helper*” (Th)-1 mediado por la expresión de interleuquina (IL-12 e IL-18). Observamos en animales, que la inyección hidrodinámica (IH) de los plásmidos de expresión de IL-12 e IL-18, logra incrementar la población VM CD122<sup>+</sup> en ambos OLS (bazo y ganglio drenante de tumor) y más aún, dentro del tumor, siendo la población CD8<sup>+</sup> de memoria preponderante en este tejido, comparado a lo observado en animales libres de estímulo (controles no estimulados con IL-12 e IL-18). Este resultado, a su vez, estuvo correlacionado con un efectivo control del crecimiento del tejido neoplásico, sugiriendo un posible rol de las células T CD8<sup>+</sup> innatas en la respuesta antitumoral.

Utilizando modelos de animales transgénicos determinamos el aporte de citoquinas como IL-4 e IFNs tipo-I en la adquisición del fenotipo innato en periferia (expresión de Eomesodermina (Eomes) y CD122) y un posible rol de IFN $\gamma$  en la expansión de las células VM en OLS y dentro del tumor, principalmente en el contexto de una respuesta pro-inflamatoria.

Nuestros datos en animales enriquecidos en células T CD8<sup>+</sup> Ag-independientes (animales con células T CD8<sup>+</sup> portadoras de TCRs transgénicos para el Ag OVA), demuestran que en un contexto donde prima la respuesta de células T CD8<sup>+</sup> no específica del TCR, un proceso pro-inflamatorio es capaz de inducir una respuesta antitumoral eficaz al igual que en un sistema policlonal (animales WT). Más aun, el estímulo con IL-12 e IL-18 en estos animales favorecería el establecimiento de una interacción entre estas células y las células tumorales e incrementaría la respuesta funcional de las células innatas, la cual podría estar siendo mediada por receptores de muerte, como NKG2D, de manera independiente al reconocimiento de un antígeno vía TCR.

Los resultados obtenidos en esta tesis doctoral aportan evidencias en la inducción y distribución de las células T CD8<sup>+</sup> innatas en periferia, de las alteraciones que estos parámetros sufren durante respuestas inflamatorias sistémicas de tipo Th1 y del posible rol de las células de memoria virtual en la respuesta antitumoral.

**Palabras claves:** Células T CD8<sup>+</sup> innatas, Células de Memoria Virtual (VM), IL-12 más IL-18, animales OT-I, cancer

**ABSTRACT**

---

The adaptive immune system is an essential component of the immune system that enables the induction of a specific and a memory response against different antigens. Among the main actors that mediate this type of response are CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T lymphocytes, which develop in the thymus. They are activated in the periphery by the recognition of their cognate antigen (Ag) in the context of a Major Histocompatibility Complex molecule through their T cell receptor (TCR), acquiring activation and memory markers, and developing an effector immune response in order to eliminate and control the pathogen. In the last few years, it has been described the existence in secondary lymphoid organs (SLO) of a CD8<sup>+</sup> T cell subtype that carry a memory-like phenotype (CD44<sup>hi</sup> CD122<sup>+</sup>) and the ability to produce interferon gamma (IFN $\gamma$ ) rapidly against innate stimuli in spite of have never been exposed to antigens. Based on these characteristics and their similarity to conventional antigen-dependent memory T cells, these cells were originally named as: “innate CD8<sup>+</sup> T cells”, “memory-phenotype cells” or “virtual memory cells” (VM).

Initially, innate CD8<sup>+</sup> T cells were identified in the thymus of transgenic animals that lacked the expression of different molecules involved in the signaling through the TCR. Since then, many authors have focused on their study and determining various signals that could be important in the induction of this population, mainly in the thymus (IM cells), while its origin and development in the periphery (VM cells) is still controversial.

In this thesis work we provide evidence of the differential distribution of VM cells in SLO of WT animals under normal conditions and evaluated the alterations that this population may suffer in a Th1-type systemic inflammatory context mediated by the expression of interleukin (IL-) 12 and IL-18. In tumor-bearing animals we observed that the hydrodynamic injection of the IL-12 and IL-18-expression plasmids managed to increase the VM CD122<sup>+</sup> population in both SLO (spleen and tumor-draining lymph nodes) and even more, within the tumor, being the preponderant CD8<sup>+</sup> memory population in this tissue, compared to what was observed in control animals. This result, in turn, was correlated with an effective control of tumor growth, suggesting a possible role for innate CD8<sup>+</sup> T cells in the antitumor response.

Using transgenic animal models, we determined the contribution of cytokines such as IL-4 and type-I IFNs in the acquisition of the innate phenotype in the periphery (expression of Eomes and CD122) and a possible role of IFN $\gamma$  in the expansion of VM cells in SLO and within the tumor, primarily in the context of a pro-inflammatory response.

Our data in animals enriched in Ag-independent CD8<sup>+</sup> T cells (animals with CD8<sup>+</sup> T cells carrying transgenic OVA-specific TCRs) demonstrated that in a context where the non TCR-specific CD8<sup>+</sup> T cell response prevails; a pro-inflammatory process is capable of inducing an effective antitumor response similar to what was observed in a polyclonal system (WT animals). Furthermore, stimulation with IL-12 and IL-18 in these animals would favor the establishment of an interaction between these cells and tumor cells and would increase the

functional response of innate cells, which could be mediated by death receptors, as NKG2D, independently of the recognition of an antigen via TCR.

The results obtained in this doctoral thesis provide evidence of the induction and distribution of innate CD8<sup>+</sup> T cells in the periphery, the alterations that these parameters undergo during systemic Th1-type inflammatory responses and of the possible role that virtual memory cells could have in cancer response.

**Key words:** Innate CD8<sup>+</sup> T cells, Virtual Memory (VM) cells, IL-12 plus IL-18, OT-I animals, cancer

# INTRODUCCIÓN

El Sistema Inmune (SI) es un conjunto de estructuras y procesos biológicos que tienen como objetivo el reconocimiento y control de agentes patógenos y células transformadas, además de la inducción de una respuesta tolerogénica contra Ags propios.

Dentro del SI, la inmunidad innata conforma la primera línea de defensa frente a una noxa. Se caracteriza por una respuesta inicial rápida y un sistema de reconocimiento que involucra receptores dirigidos contra estructuras conservadas entre distintos agentes infecciosos. Por otro lado, la inmunidad adaptativa requiere un tiempo de inducción e incluye un sistema de reconocimiento que involucra receptores antigénicos altamente específicos dirigidos contra estructuras particulares, lo que le permitirá desarrollar una respuesta de memoria contra un Ag determinado, favoreciendo su rápida eliminación frente a posteriores encuentros. Ambos tipos de inmunidad involucran la interacción de diferentes componentes humorales y celulares permitiendo mantener o restablecer la homeostasis del organismo. La falla en la inducción de una respuesta inmune eficaz, necesaria para mantener el equilibrio interno, o desregulaciones en el sistema inmunológico del individuo dan lugar al desarrollo de patologías, desde el progreso de una infección al desarrollo de enfermedades autoinmunes, inmunodeficiencias y cáncer.

### SISTEMA INMUNE Y CÁNCER

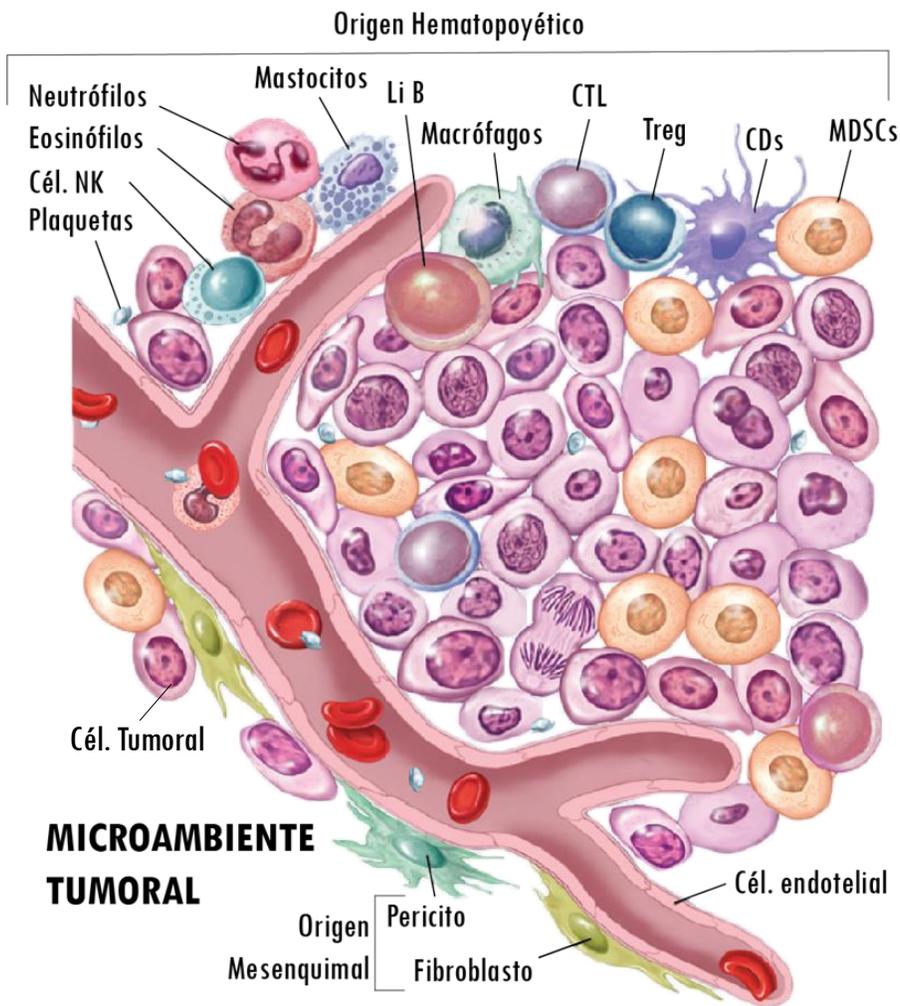
El cáncer es una patología causada por el crecimiento progresivo y desregulado de una progenie de células propias transformadas, es decir, que han adquirido sucesivas mutaciones y cambios epigenéticos que alteran el crecimiento celular normal y las vías de supervivencia celular<sup>(1,2)</sup>. Estas modificaciones originan cambios en la expresión de proteínas en la célula transformada, lo que se manifiesta en la represión y/o sobreexpresión de algunos genes o en su activación en tejidos normales, en los que comúnmente no son expresados, dando lugar a proteínas “aberrantes”. La relevancia del SI radica no solo en su capacidad de discriminar entre aquellos elementos propios o ajenos al individuo, sino en su habilidad para detectar señales de peligro, independientemente de su origen<sup>(3)</sup>. El reconocimiento por parte de elementos del SI a estas proteínas alteradas permite el desarrollo de una respuesta inmune antitumoral.

La teoría de Inmunoedición tumoral predice que los eventos patogénicos originados de forma temprana por células precancerosas pueden ser controlados o eliminados por el SI, a menos que las células transformadas adquieran mutaciones sucesivas que alteren su inmunogenicidad, permitiéndoles evadir la respuesta inmunológica<sup>(4, 5)</sup>. Esta teoría contempla 3 etapas: (1) “Eliminación” o “Inmunovigilancia”, que consiste en la capacidad de distintos componentes del SI, tanto innato como adaptativo, de detectar y eliminar a las células transformadas en cualquier etapa del proceso de carcinogénesis, evitando su aparición clínica; (2) “Equilibrio”, es el proceso por el cual el SI repetitivamente selecciona y

promueve la generación de variantes del tumor que pueden resistir a la respuesta inmunológica; y (3) el “Escape”, es un proceso caracterizado por la proliferación descontrolada de las células cancerígenas inducidas durante el proceso de equilibrio, que al disminuir su inmunogenicidad logran evadir la respuesta inmune antitumoral<sup>(6-9)</sup>.

Similar a la mayoría de los tejidos, los tumores sólidos están compuestos por dos compartimentos: parénquima y estroma. El parénquima es representativo de las células tumorales propiamente dichas, mientras que células de diversos orígenes, no malignas y otros componentes del tejido conectivo conforman el estroma<sup>(10)</sup>. Éste último supone un medio muy heterogéneo, dificultando muchas veces la distinción entre ambas regiones, por lo que es conveniente entender el microambiente tumoral (MAT) como una red compleja de células residentes y no-residentes, interconectada a través de mediadores solubles. El compartimento de células residentes está formado principalmente por células neoplásicas, células madre mesenquimales y cancerígenas, células mesenquimales, fibroblastos, pericitos y células endoteliales. Por otro lado, el compartimento no-residente está compuesto por células derivadas del tumor (células metastásicas y células madre cancerígenas) y por leucocitos infiltrantes, como linfocitos T (CD4<sup>+</sup> convencionales o regulatorios (Treg), CD8<sup>+</sup> citotóxicos (CTL)), linfocitos B, células asesinas naturales (NK por *Natural Killer*), monocitos, macrófagos, células dendríticas (DCs), células mieloides supresoras (MDSC), neutrófilos, eosinófilos, entre otras (Figura 1) <sup>(11, 12)</sup>. La interacción entre estas células y las células tumorales dentro del MAT determina de manera crucial el destino de la progresión tumoral. El sistema inmune desempeña un rol dual en esta patología: no sólo puede inhibir el crecimiento tumoral, eliminando las células transformadas o inhibiendo su crecimiento, sino que también puede promover la progresión del mismo, ya sea seleccionando las células neoplásicas más aptas a sobrevivir en un huésped inmunocompetente o favoreciendo el desarrollo de un microambiente tumoral inmunosupresor o regulatorio, caracterizado por infiltrados principalmente de MDSC, Macrófagos activados alternativamente (perfil M2), Tregs y citoquinas clásicas de estos perfiles como son TGF- $\beta$ , IL-10, entre otras (Figura 1)<sup>(13)</sup>.

El entendimiento del mecanismo de Inmunoedición, de la estrecha relación entre los componentes del SI y el MAT, y las diversas formas en que este último puede condicionar la respuesta inmune, permitió el desarrollo de múltiples tratamientos inmunoterapéuticos, que continúan en estudio hasta el día de hoy, buscando revertir el MAT supresor y favorecer una respuesta efectora inflamatoria capaz de controlar y eliminar a la célula tumoral<sup>(13)</sup>.



**Figura 1.** *Infiltrados celulares que componen el MAT.* Los tumores establecidos consisten en una amplia gama de células inmunes que contribuyen al estroma tumoral de una neoplasia maligna en crecimiento. Los tumores poseen células infiltrantes del SI, tanto innato como adaptativo: MDSC, macrófagos, DCs, mastocitos, eosinófilos, células NK y linfocitos. Estas células forman de manera coordinada una compleja red reguladora que fomenta el crecimiento tumoral al crear un entorno que permite que el tumor evada la vigilancia y destrucción inmunitarias. Adaptado de Kerkar SP, Restifo NP. Cellular constituents of immune escape within the tumor microenvironment. *Cancer Res.* 2012;72(13):3125-3130. doi:10.1158/0008-5472.CAN-11-4094

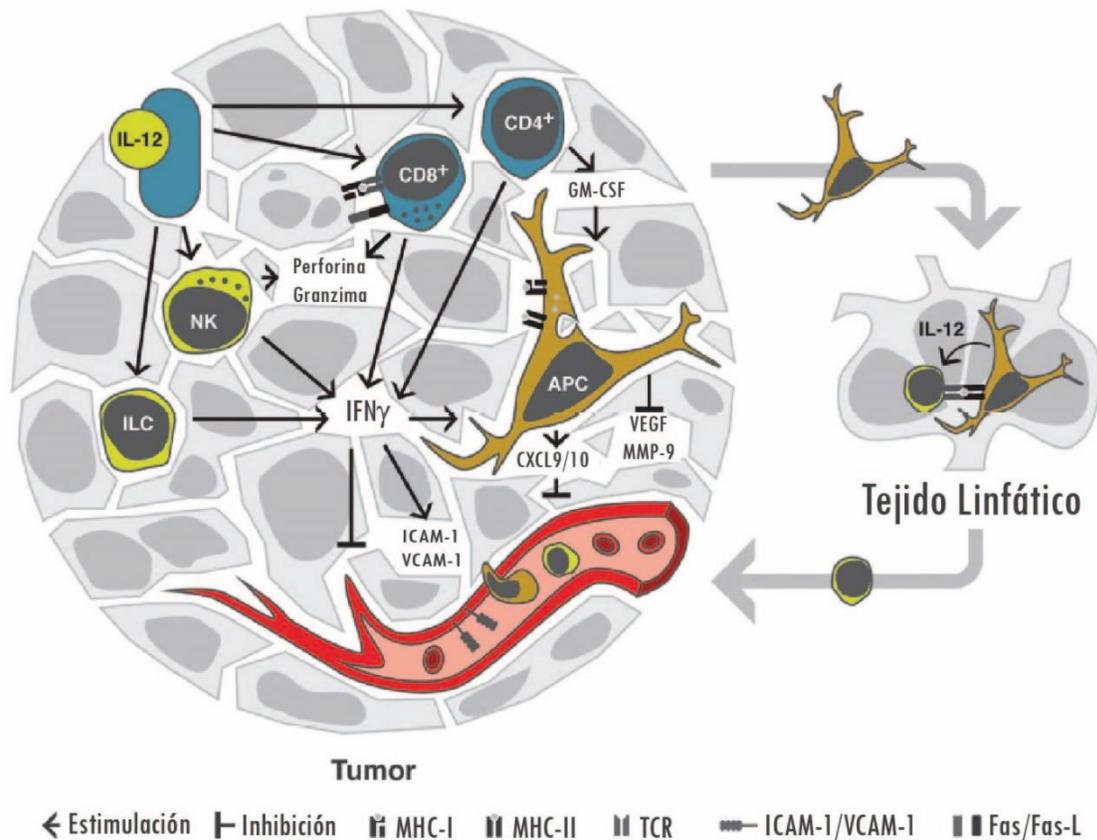
### RESPUESTA INMUNE Y CITOQUINAS: GENERALIDADES Y USO DE IL-12 EN EL TRATAMIENTO DEL CÁNCER

Las citoquinas (CQs) son un conjunto de proteínas de bajo peso molecular, secretadas por diferentes tipos de células, que modulan la respuesta inmunológica. Su función en el organismo es coordinar la respuesta del SI y lo hacen a través de diversos mecanismos: reclutando o inhibiendo las funciones de diferentes subtipos celulares, regulando la proliferación y diferenciación celular, activando o inhibiendo la expresión de algunos genes, entre otros. Junto a la respuesta celular y a otros componentes humorales, el perfil de citoquinas generado definirá el destino de la respuesta inmunológica.

Debido al potencial de las citoquinas en el control de las respuestas inmunitarias, algunas de ellas han sido aplicadas en la terapia contra el cáncer de diversas maneras. En ese

sentido, la IL-12, un miembro clave de la familia de citoquinas de IL-12, surgió como un potente inductor de la inmunidad antitumoral.

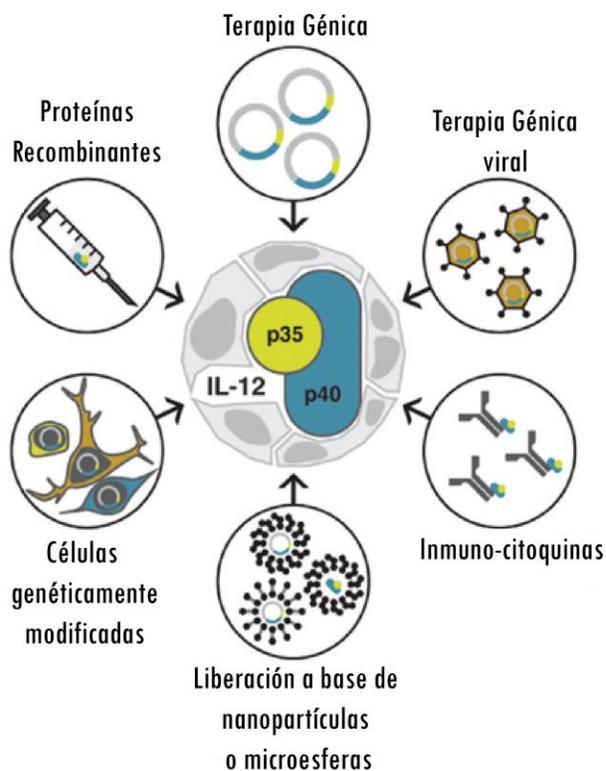
La IL-12 es una CQ pro-inflamatoria secretada de manera temprana frente a infecciones, producida principalmente por células presentadoras de antígenos (CPAs), como DCs, monocitos, macrófagos y células B, luego de su activación<sup>(14, 15)</sup>. Es una proteína heterodimérica con un peso molecular de 70 kDa, formada por una subunidad de cadena pesada (p40) y una de cadena ligera (p35), unidas covalentemente por enlaces disulfuro<sup>(16, 17)</sup>. La detección de esta CQ está mediada por el receptor heterodimérico de IL-12 (IL-12R) compuesto por IL-12R $\beta$ 1 e IL-12R $\beta$ 2<sup>(18)</sup>. El IL-12R es expresado principalmente en las células NK, NK T, en células T<sup>(19)</sup>, y puede estar presente en células de origen mieloide<sup>(20)</sup> y algunas células B<sup>(21)</sup>. La activación del receptor estimula la vía de señalización Janus quinasa (JAK)–STAT (transductor de señal y activador de transcripción), que conduce predominantemente a la fosforilación de STAT4, dando lugar a diversos efectos<sup>(22, 23)</sup>. Esta CQ estimula la activación y proliferación de células NK y linfocitos T, promoviendo sus funciones efectoras al inducir la transcripción de CQs pro-inflamatorias y factores citolíticos (como perforina y granzima B)<sup>(24-26)</sup>. Además, polariza la respuesta de células T CD4<sup>+</sup> cooperadoras a un perfil inflamatorio Th1<sup>(27, 28)</sup>; el cual se ve favorecido por la inhibición del desarrollo de las células Th2<sup>(29)</sup> y la interferencia con la diferenciación de linfocitos Tregs y Th17<sup>(30)</sup>. Más aun, la IL-12 actúa sobre las CPAs aumentando su capacidad de presentar péptidos, incluso algunos péptidos tumorales poco inmunogénicos<sup>(31, 32)</sup>. Además, favorece la remodelación de la matriz extracelular peritumoral y el estroma tumoral<sup>(33)</sup>, la reprogramación de las células MDSC<sup>(34)</sup> y la re-educación de macrófagos infiltrantes de tumor a un fenotipo M1<sup>(35)</sup>. La estimulación vía IL-12 desencadena la producción y liberación de una serie de factores dentro del tumor, incluyendo IFN $\gamma$ , factor de necrosis tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ), factor estimulante de colonias de granulocitos-macrófagos (GM-CSF) e IL-2 por diferentes subtipos celulares<sup>(36)</sup>. Interferón  $\gamma$  es otra CQ clásica de una respuesta Th1, y supone un mediador central de las respuestas inducidas por IL-12. La misma, es secretada por la estimulación con IL-12 sola o sumada a factores sinérgicos como IL-2 e IL-18<sup>(37, 38)</sup> y, a su vez, actúa sobre las CPAs para iniciar o aumentar la secreción de IL-12 en un circuito de retroalimentación positiva<sup>(39)</sup>. Más aun, ha sido reportado que IL-12 tendría efectos regulatorios sobre la vasculatura tumoral: incrementando la expresión de moléculas de adhesión (facilitando así el reclutamiento leucocitario)<sup>(40)</sup> e inhibiendo la angiogénesis de manera dependiente de IFN- $\gamma$  (a través de la inducción de la proteína inducida por IFN $\gamma$ -10 (IP-10 o CXCL10) y la monoquina inducida por IFN $\gamma$  (MIG o CXCL9))<sup>(41-43)</sup>. Los efectos antes mencionados le confieren a la IL-12 una alta capacidad antitumoral (Figura 2), lo que le permitió ser blanco de estudio para diversas estrategias terapéuticas en el tratamiento del cáncer en modelos preclínicos.



**Figura 2.** *Respuestas celulares a la estimulación de IL-12 en el tejido tumoral.* La IL-12 actúa principalmente sobre las células linfoides, como las células NK, las células T y las células linfoides innatas (ILC). Todos estos subconjuntos aumentan la secreción de IFN $\gamma$  tras la estimulación y, por lo tanto, inducen la mayoría de las vías de supresión tumoral observadas durante el tratamiento con IL-12. Además, IL-12 e IFN $\gamma$  potencian las respuestas citotóxicas de las células NK y las células T CD8<sup>+</sup>, que implican la producción de perforinas, granzimas y el ligando Fas (Fas-L). El IFN $\gamma$  secretado está involucrado en respuestas vasculares tumorales directas, como la regulación positiva de ICAM-1 y VCAM-1 y la inhibición de la angiogénesis. Se cree que la regulación positiva de las moléculas de adhesión facilita el reclutamiento de leucocitos al tejido tumoral. Además, IFN $\gamma$  estimula las células mieloides, induciendo la secreción de CXCL9 y CXCL10 y suprimiendo la producción de VEGF y MMP-9, inhibiendo de esta manera la angiogénesis. Además, la IL-12 estimula la presentación antigénica, por lo tanto, promueve aún más la actividad citotóxica de las células T CD8<sup>+</sup> y la respuesta de citoquinas de las células T CD4<sup>+</sup>. VEGF: Factor de crecimiento endotelial vascular, MMP-9: Metaloproteína 9 de la matriz. APC: célula presentadora de antígeno (CPA). Adaptado de Tugues S, Burkhard SH, Ohs I, et al. *New insights into IL-12-mediated tumor suppression.* *Cell Death Differ.* 2015;22(2):237-246. doi:10.1038/cdd.2014.134

Ha sido demostrado que la administración de IL-12 recombinante (IL-12r), tanto sistémica como local, induce una reducción o retraso del crecimiento del tumor, además de una mayor supervivencia, en distintos tipos de tumores en modelos murinos, tales como tumores mamarios, carcinomas de colon, melanoma, entre otros<sup>(44-46)</sup>. Hasta ahora, la administración de esta CQ con fines terapéuticos se ha logrado mediante diversas técnicas: (1) inyección de la proteína recombinante, (2) terapia génica utilizando vectores virales y (3) no virales<sup>(47, 48)</sup>, (4) electroporación<sup>(49)</sup>, (5) a través del uso de microesferas y nanopartículas

que contienen IL-12<sup>(50, 51)</sup> o (6) transferencia de células estromales, células T o DCs transformadas genéticamente para expresar IL-12<sup>(52-57)</sup> (Figura 3). Las modalidades de tratamiento sistémico con esta CQ lograron, además de controlar el crecimiento del tumor, reducir eficazmente los focos metastásicos<sup>(58-60)</sup>, pero en muchos casos han presentado efectos adversos, mediados principalmente por altos niveles de IFN $\gamma$  o TNF $\alpha$ <sup>(61, 62)</sup>. En este sentido, la administración local de IL-12, su utilización en terapias dirigidas específicamente contra el tumor o el uso de terapias combinadas de IL-12 con otras citoquinas<sup>(60, 63)</sup>, agentes quimioterapéuticos<sup>(64-66)</sup>, vacunas mltipeptídicas<sup>(67, 68)</sup> o anticuerpos monoclonales<sup>(69, 70)</sup> permitirían reducir los riesgos de toxicidad que pueden inducirse luego del tratamiento sistémico con IL-12 sola, sin afectar su actividad antitumoral.



**Figura 3.** *Diversas estrategias utilizadas para la administración de IL-12 en tumores.* Ha sido demostrado que la inyección de proteína recombinante de IL-12 (IL-12r), tanto sistémica como local, induce una respuesta antitumoral eficaz. Diferentes herramientas han sido utilizadas para lograr este objetivo. Para lograr que la terapia sea dirigida específicamente al tejido tumoral, pueden utilizarse “inmuno-citoquinas”, donde la IL-12r se fusiona a anticuerpos específicos contra Ags de las células tumorales. Además, diversas técnicas de terapia génica, como la electroporación y la inyección hidrodinámica, permiten administrar un plásmido codificante para IL-12 al sitio del tumor logrando inducir la producción de la citoquina por un período de tiempo determinado, a partir de una única administración. El gen de IL-12 también puede transferirse a través de vectores virales, principalmente utilizando adenovirus. Otras técnicas de terapia génica están basadas en la utilización de microesferas y nanopartículas conteniendo el plásmido codificante o la molécula IL-12r. Además, las células del estroma, las células T específicas del tumor y las DCs pueden ser transformadas genéticamente para liberar IL-12 una vez transferidas al tumor. Adaptado de Tugues S, Burkhard SH, Ohs I, et al. *New insights into IL-12-mediated tumor suppression.* *Cell Death Differ.* 2015;22(2):237-246. doi:10.1038/cdd.2014.134

Los potentes efectos antitumorales de IL-12 en modelos preclínicos justificaron el traslado de este tipo de terapias a un entorno clínico. Los primeros estudios evaluaron la seguridad de IL-12 inyectada de manera intravenosa (i.v.) o subcutánea (s.c.) en pacientes con carcinoma renal metastásico, melanoma, carcinoma de colon, cáncer de ovario recurrente y carcinoma de cabeza y cuello<sup>(71-75)</sup>. El objetivo era administrar IL-12 en un esquema que lograra minimizar las toxicidades comunes asociadas con la terapia con citoquinas. Aunque estos ensayos establecieron dosis máximas toleradas de IL-12 para los

distintos estudios, las tasas de respuesta al tratamiento no fueron muy prometedoras, presentando solo unos pocos casos de pacientes con respuestas parciales o completas<sup>(71-73, 76, 77)</sup>. Desafortunadamente, la administración sistémica de IL-12 recombinante no solo demostró una eficacia deficiente en la mayoría de los casos, sino que también causó efectos adversos graves, que limitaron posteriormente su uso clínico.

Sin embargo, múltiples grupos de investigación continuaron explorando alternativas para su utilización a fin de disminuir su toxicidad sin alterar su potencial antitumoral. En este sentido, se evaluaron tratamientos utilizando la IL-12 como co-adyuvante de otros inmunoterapéuticos en estudios de fase I y II en pacientes con distintos tipos de cáncer en los cuales se obtuvieron resultados alentadores<sup>(78-81)</sup>. Más aun, otra alternativa basada en la administración intratumoral de la CQ (por electroporación de plásmidos codificantes para IL-12) fue utilizada en ensayos de fase I en pacientes con melanoma maligno, presentando efectos clínicos beneficiosos en el sitio del tumor, e incluso en lesiones no tratadas<sup>(82-84)</sup>.

Otros estudios que apuntaron a minimizar la toxicidad de IL-12, se basaron en el uso de IL-12 fusionada con el anticuerpo humanizado dirigido a antígenos tumorales (conocidas como “inmuno-citoquinas”). Este tipo de tratamientos condujeron a una enfermedad estable, asociada a una toxicidad moderada en la mitad de los pacientes con melanoma maligno<sup>(85)</sup>, similar a lo observado utilizando formulaciones de IL-12 con lipopolímeros sintéticos administradas a pacientes con cáncer de ovario<sup>(86, 87)</sup>. La mayoría de los estudios en curso están dirigidos a mejorar la eficacia terapéutica de IL-12 y la limitación de su toxicidad, principalmente a través de administraciones locales de la CQ. Teniendo en cuenta que la mayoría de los tumores están localizados en sitios de difícil acceso a este tipo de terapias, el tratamiento sistémico con IL-12 continúa siendo un campo de alta relevancia en oncología clínica especialmente en pacientes avanzados con múltiples focos metastásicos. Las investigaciones actuales están en constante desarrollo buscando continuamente nuevas estrategias, como inmuno-citoquinas con IL-12 para el tratamiento dirigido de distintos tipos de cáncer y terapias combinadas de esta CQ con otros inmunomoduladores o quimioterapéuticos que puedan reducir sus efectos secundarios, sin afectar o mejorando su capacidad antitumoral.

#### RESPUESTA ADAPTATIVA: LINFOCITOS T CD8<sup>+</sup>

Entre los actores principales mediadores de la respuesta inmune adaptativa se encuentran, además de anticuerpos y otros componentes humorales, principalmente dos tipos de células: linfocitos B y linfocitos T (CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup>), caracterizados por presentar en su membrana receptores altamente específicos (BCR y TCR respectivamente) dirigidos contra Ags extraños. Estos receptores se expresan durante la ontogenia en los órganos linfáticos

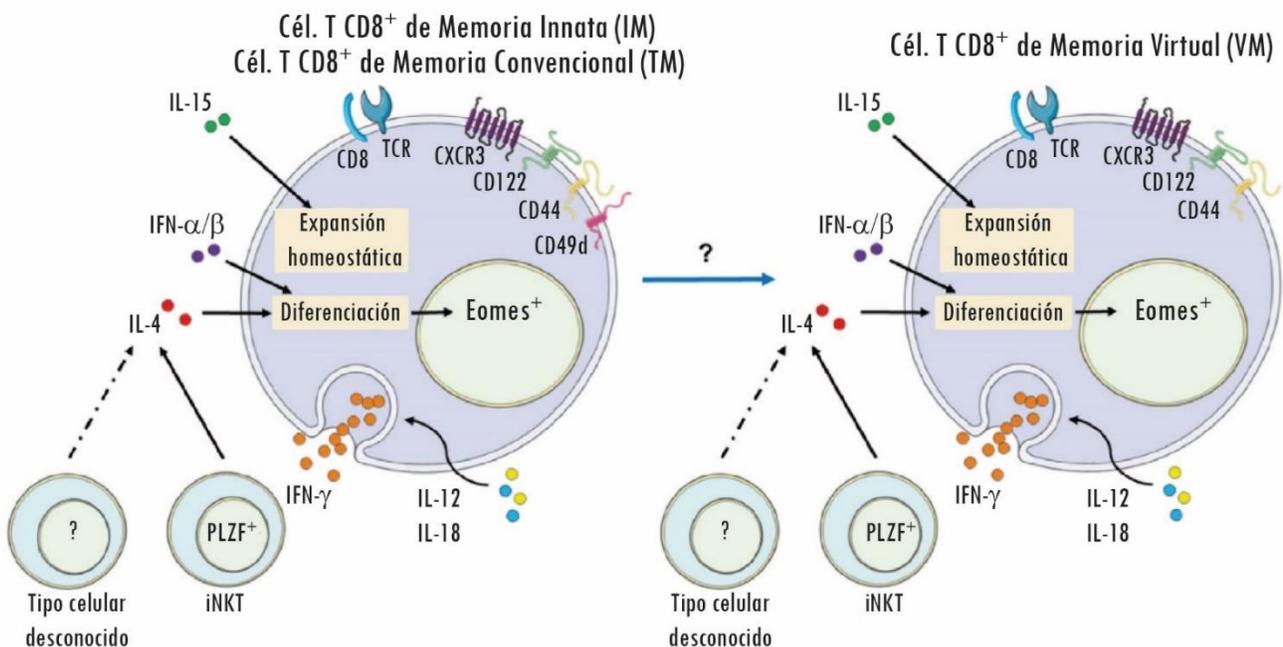
primarios (OLP): la médula ósea en el caso de los linfocitos B y el timo en el caso de los linfocitos T.

Durante la ontogenia de linfocitos T, los precursores linfoides generados en médula ósea ingresan al timo, donde atraviesan un proceso de desarrollo que involucra distintos estadios. A lo largo del mismo, los linfocitos T inmaduros (timocitos) adquieren distintos marcadores y los co-receptores CD4 o CD8, además de realizar los rearrreglos necesarios para la expresión del TCR, dando lugar a un repertorio amplio y altamente específico de linfocitos T. Además de promover su desarrollo, el timo es el órgano encargado del proceso de selección del repertorio de células T tolerantes a Ag propios y capaces de interactuar con moléculas del MHC, con una afinidad óptima, lo que les permitirá reconocer y activarse frente a Ags extraños en periferia<sup>(88, 89)</sup>.

El desarrollo tímico produce una amplia variedad de subtipos de células T que varían en el rol que desempeñan en la respuesta inmunológica. La activación de los linfocitos T convencionales CD8<sup>+</sup> o CD4<sup>+</sup> ocurre en OLS y requiere el reconocimiento por parte de su TCR, del péptido para el cual dicho receptor es específico, quien será presentado en el contexto del MHC (clase I o clase II, respectivamente), además de otras señales que favorecerán la activación y diferenciación de los linfocitos<sup>(90-96)</sup>. Durante el curso de una infección o una inflamación de tipo Th1 distintas células de la inmunidad innata (como macrófagos o DCs) liberan citoquinas (CQs) pro-inflamatorias, principalmente IL-12 e IL-18, favoreciendo sinérgicamente la activación de los linfocitos T (que expresan IL-12R e IL-18R) y la producción de IFN $\gamma$  por parte de los mismos. A su vez, la IL-18 es capaz de incrementar la acción citotóxica de los linfocitos T CD8<sup>+</sup> y las células NK, colaborando en la inducción de una respuesta inmune eficaz contra patógenos intracelulares o células transformadas principalmente<sup>(97, 98)</sup>. Una vez activados los linfocitos T, sufren un proceso de expansión clonal que favorece el control y la eliminación de patógenos, seguido de un proceso de contracción que limita la respuesta inflamatoria, en el que muchas de estas células mueren y otras quedan conformando la respuesta de memoria. Los linfocitos T de memoria se caracterizan por presentar alta expresión del marcador CD44 (CD44<sup>hi</sup>) y de la cadena  $\beta$  del receptor de IL-15 e IL-2 (CD122), entre otros marcadores<sup>(99, 100)</sup>. La generación de estas células T de memoria, junto a otros componentes del SI adaptativo, permite la inducción de una respuesta inmune específica más rápida y eficaz frente a futuros desafíos con el mismo Ag. Sin embargo, en OLS de individuos sin previa exposición a Ag extraños (no inmunizados y neonatos) ha sido reportada la existencia de linfocitos T CD8<sup>+</sup> que presentan un fenotipo de memoria (CD44<sup>hi</sup> CD122<sup>+</sup>) y la capacidad de producir IFN $\gamma$  de manera rápida frente a estímulos innatos (con CQ), independientemente de la señalización del TCR<sup>(101-103)</sup>. En base a estas características y a su similitud con células de memoria convencional Ag-dependientes, estas células fueron originalmente designadas como células T CD8<sup>+</sup> innatas, células con fenotipo de memoria o células de memoria virtual<sup>(104, 105)</sup>.

Inicialmente, las células T CD8<sup>+</sup> innatas fueron identificadas en timo de animales transgénicos que carecían de la expresión de distintas moléculas involucradas en la señalización a través del TCR como Itk (quinasa inducible por IL-2 de células T), Rlk (quinasa de arresto de linfocitos), KLF2 (factor de transcripción tipo Krüpel 2), entre otras<sup>(106-110)</sup>. Estos animales presentan una frecuencia elevada de células NKT invariantes (iNKT) PLZF<sup>+</sup> en timo, altamente productoras de IL-4, que inducirían el incremento de linfocitos T CD8<sup>+</sup> innatos en este tejido<sup>(111)</sup>. Además, las células T CD8<sup>+</sup> Ag-independientes mostraron una alta expresión del factor de transcripción Eomes, que regula diversos mecanismos efectores, incluyendo la expresión de CD122 y la secreción de citoquinas como IFN $\gamma$ <sup>(108, 112)</sup>. En concordancia con estos datos, antecedentes de nuestro grupo de investigación demostraron que en condiciones inflamatorias e infecciosas (de tipo Th1), la producción local de IL-4 e IL-15 en timo favorece la desviación en la ontogenia de los linfocitos T CD8<sup>+</sup> convencionales hacia este linaje “innato”<sup>(113)</sup>. Las células generadas en dichas condiciones presentan un fenotipo similar al fenotipo de memoria, además de una elevada capacidad citotóxica mediada principalmente por NKG2D, gran producción de IFN $\gamma$  frente a estimulación con IL-12+IL-18 y protección frente al parásito *Trypanosoma cruzi* (agente causal de la Enfermedad de Chagas) de manera Ag independiente<sup>(113)</sup>.

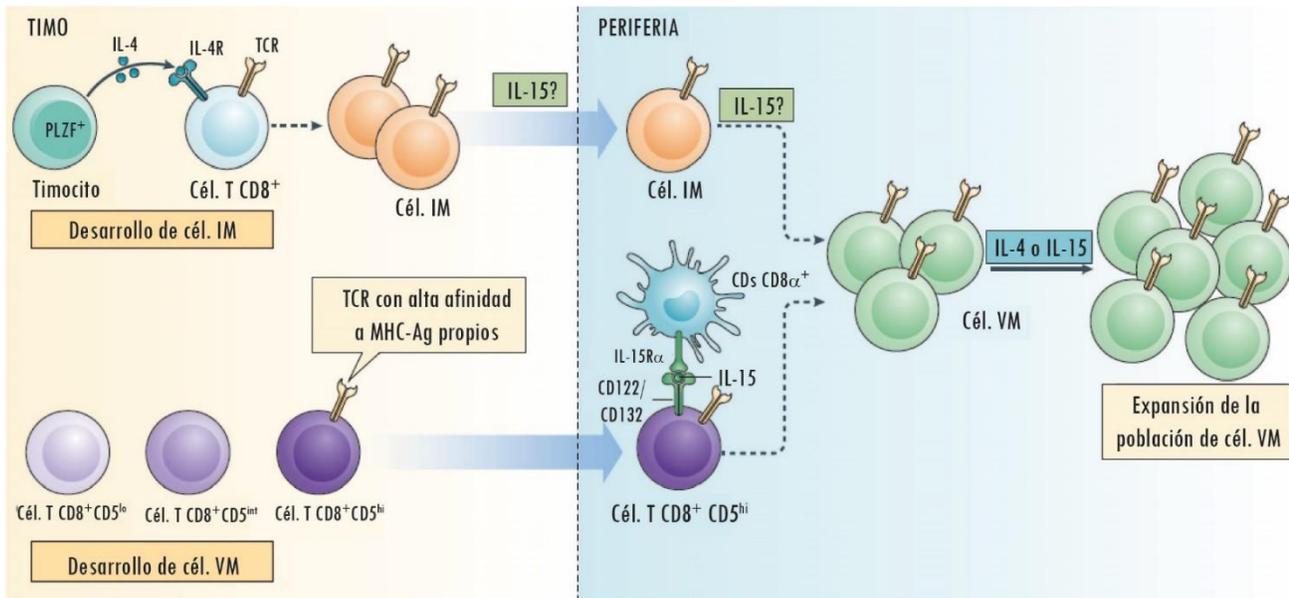
Las células T CD8<sup>+</sup> de memoria Ag-independientes fueron clasificadas en dos grupos: (1) células de memoria innata (IM) y (2) células de memoria virtual (VM) (Figura 4).



**Figura 4. Células T CD8<sup>+</sup> de memoria (IM, TM y VM) en ratones.** Esquema representativo de las células T CD8<sup>+</sup> IM/TM y VM en ratones. La expresión de distintos marcadores, principalmente CD122, CD44 y Eomes caracteriza a las células IM y VM, los cuales pueden diferenciarse por la expresión diferencial de CD49d y su localización (las IM en timo y las VM en periferia). Ambos subconjuntos tienen la capacidad de responder a la estimulación innata con IL-12 + IL-18, y su desarrollo y homeostasis están regulados por IL-4 (producida principalmente por células NKTi PLZF<sup>+</sup>), IL-15 e IFNs tipo-I. Posiblemente, una vez exportadas las células IM de timo, puedan integrar la población VM en OLS. Adaptado de Barbarin A, Cayssials E, Jacomet F, et al. Phenotype of NK-Like CD8(+) T Cells with Innate Features in Humans and Their Relevance in Cancer Diseases. *Front Immunol.* 2017;8:316. Published 2017 Mar 27. doi:10.3389/fimmu.2017.00316

Las IM son generadas en timo y presentan un fenotipo análogo al de las células T CD8<sup>+</sup> de memoria convencional (TM) que se generan en periferia en respuesta a un Ag específico. Ambas poblaciones expresan un amplio repertorio de TCRs de tipo alfa beta, un co-receptor CD8, altos niveles del marcador de memoria CD44, y además expresan CD122, y CD49d, este último una alfa integrina que le permitirá a la célula migrar a diferentes tejidos<sup>(100, 114, 115)</sup>. La diferenciación de las células IM es dependiente de las citoquinas IL-4 e IFNs tipo I (alfa y beta), quienes inducen la expresión de Eomes, un factor de transcripción clave para la adquisición de este fenotipo<sup>(114, 116-121)</sup>, y requieren de la citoquina IL-15 para su expansión y mantenimiento homeostático. Las células T CD8<sup>+</sup> innatas (tanto IM como VM) son capaces de producir grandes cantidades de IFN $\gamma$  en respuesta a las citoquinas IL-12 e IL-18, independientemente del reconocimiento de un Ag por el TCR, debido a que poseen expresión constitutiva de los receptores para ambas CQs (figura 4)<sup>(100, 101, 114, 122)</sup>.

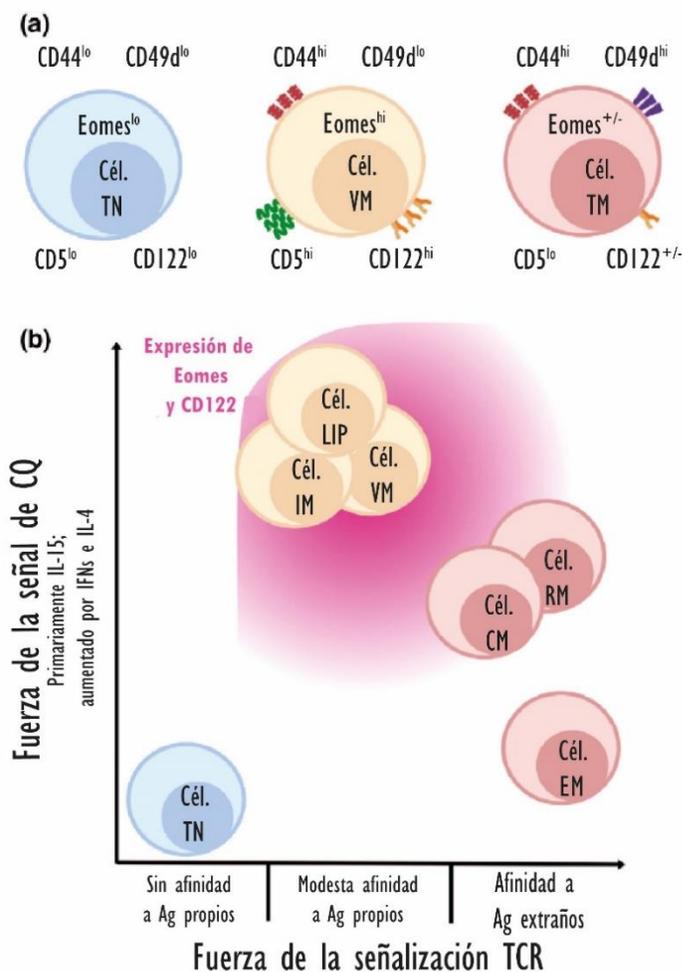
Las células VM se encuentran en OLS y su origen es controversial. Inicialmente se consideraba que esta población estaba compuesta por (1) células de memoria que podían generarse frente a Ags de la dieta o la microflora normal, (2) células IM que se exportaban del timo y (3) células T vírgenes que adquirirían este fenotipo frente a señales determinadas<sup>(123, 124)</sup>. Respecto a las células IM, se cree que una vez exportadas del timo, señales como IL-15 en OLS podrían inducir la pérdida en la expresión de CD49d, permitiéndoles integrar el compartimento de células VM residentes haciéndose indiferenciables entre ellas (Figura 5)<sup>(104, 117)</sup>. Las células VM presentan un fenotipo similar al descrito para las células IM y TM, pero a diferencia de las mismas carecen de la integrina CD49d en su membrana. Como la expresión de este marcador es dependiente de una señalización sostenida y prolongada a través del TCR, la ausencia del mismo confirma el origen innato característico de esta población<sup>(124)</sup>. Es por ello que consideramos a la molécula CD49d como un marcador clave para la correcta identificación de las células VM en periferia.



**Figura 5.** Modelo del desarrollo de las células T CD8<sup>+</sup> de memoria innata y memoria virtual. Desarrollo de células IM: en el timo, las células T CD8<sup>+</sup> vírgenes en respuesta a IL-4 (derivada de timocitos PLZF<sup>+</sup>) adquieren el fenotipo IM. En la periferia, la presencia de células IM depende de IL-15, ya sea porque es necesario para que las células IM sean exportadas del timo o para su supervivencia en fuera de este OLP. En ausencia de Ag, en periferia, las células T CD8<sup>+</sup> de memoria "innatas" presentan un único fenotipo (CD44<sup>hi</sup>, CD122<sup>+</sup>, Eomes<sup>+</sup> y CD49d<sup>+</sup>), lo que sugiere que la mayoría de las células IM que salen a periferia podrían diferenciarse a células VM, posiblemente mediado por IL-15. Desarrollo de células VM: las células T CD8<sup>+</sup> vírgenes que expresan TCRs con una fuerte afinidad por péptidos propios-MHC expresan altos niveles de CD5, salen del timo y adquieren el fenotipo de células VM gracias a la interacción con IL-15 que es trans-presentado por las DCs CD8α<sup>+</sup> residentes en nódulos linfáticos (NL). La IL-4 puede actuar sobre las células VM existentes para expandir aún más la población VM, la cual depende de IL-15 para su supervivencia. Las flechas punteadas indican diferenciación. Adaptado de White JT, Cross EW, Kedl RM. Antigen-inexperienced memory CD8<sup>+</sup> T cells: where they come from and why we need them. *Nat Rev Immunol.* 2017;17(6):391-400. doi:10.1038/nri.2017.34

Recientemente ha sido demostrado que la población de células VM existe en la misma proporción en animales libres de patógenos y sometidos a una dieta elemental que en animales WT, indicativo de que estas células no estarían generándose en respuesta a Ag de la microflora o provenientes de la dieta como se especulaba<sup>(125)</sup>. Se cree que los linfocitos T CD8<sup>+</sup> vírgenes con una señalización del TCR modestamente elevada son más propensos a diferenciarse a células VM. En relación a esto, ha sido demostrado que la población VM deriva primordialmente de células T naïve que (1) poseen acoplado al co-receptor CD8 la tirosin-quinasa específica de linfocitos (Lck), lo que potencia la señal del TCR<sup>(126)</sup> y de aquellas células vírgenes que (2) expresan marcadores indicativos de una alta afinidad del TCR a ligandos propios durante procesos de selección tímicos (pero no lo suficientemente elevada para ser eliminados por delección clonal), como CD5 (Figuras 5 y 6)<sup>(123, 127, 128)</sup>. Un trabajo recientemente publicado demuestra que ciertas secuencias de TCR específicas predisponen a timocitos CD8<sup>+</sup> Simples Positivos (SP) a diferenciarse al linaje innato: adquiriendo el factor de transcripción Eomes durante su maduración en timo y el fenotipo de memoria (CD44<sup>hi</sup> CD122<sup>+</sup>) en periferia<sup>(129)</sup>. Los TCR expresados por las células VM son altamente recurrentes y

distintos de los TCR expresados por las células T CD8<sup>+</sup> vírgenes que darán origen a células de memoria convencional. Los TCRs presentes en células VM exhiben una mayor afinidad contra Ag propios respecto a los TCR presentes en células vírgenes convencionales. Los autores postulan que la diferenciación de células VM es un proceso instruido por TCR que se desencadena por el reconocimiento de autoAgs en el timo, ocurre de manera óptima a bajas frecuencias clonales e implica un proceso de dos etapas marcado por un paso de activación inicial dependiente de TCR seguido por una segunda fase de consolidación en periferia<sup>(129)</sup>. Aunque las células VM posean un repertorio de TCRs con una afinidad incrementada a ligandos propios, ha sido demostrado que no participan de la generación de respuestas autoinmunes o patologías asociadas a este tipo de desregulaciones del SI<sup>(126)</sup>. Teniendo en cuenta lo antes mencionado, se considera actualmente que la diferenciación a células VM en periferia es dependiente de una combinación de señales: por un lado, una moderada/alta afinidad del TCR por complejos MHC-ligandos propios, y por otro, una intensa señal de CQs como IL-4 e IL-15, que son importantes para la inducción y mantenimiento de este subtipo celular (Figura 6).



**Figura 6. Células VM y el impacto propuesto de las señales de citoquinas y la fuerza de señalización del TCR en su generación.** (a) Las células VM en la periferia exhiben marcadores de memoria tradicionales, como CD44, pero no CD49d, que las distinguen de las células TN (T naïve o vírgenes) y TM (de memoria convencional). Las células VM expresan altos niveles de Eomes y CD122, reflejando su capacidad de respuesta a IL-15. Además, son CD5<sup>hi</sup>, que refleja la modesta afinidad de su TCR por complejos MHC-Ag propios. (b) En este modelo, los efectos combinados de las citoquinas y la fuerza de señalización del TCR conducen a tres resultados principales: (1) Si la señalización de CQs es baja y las células T CD8<sup>+</sup> tienen TCRs no afines a ligandos endógenos, permanecen como células TN. (2) Si la señalización de CQs es alta y las células T CD8<sup>+</sup> tienen TCR moderadamente "autorreactivos", la expresión de Eomes y CD122 incrementa. El aumento de CD122 permitiría a las células volverse receptivas a IL-15 y permitir su diferenciación impulsada por las CQs. Mientras que CQs como IL-15, IFN tipo I e IL-4 aumentan la expresión de Eomes para potenciar la señalización y diferenciación de IL-15, cada citocina puede comprometer vías adicionales para producir perfiles fenotípicos sutilmente distintos de VM (IL-15, IFNs tipo-I), células IM (IL-4) y LIM (IL-7). (3) Si las células T CD8<sup>+</sup> encuentran su Ag específico junto con un cierto grado de señalización de CQs, pueden diferenciarse en una variedad de subconjuntos de memoria convencionales. LIP: células generadas por proliferación inducida por linfopenia (LIM), RM: células de memoria residentes, CM: células de memoria central, EM: células de memoria efectora. Adaptado de Hussain T, Quinn KM. Similar but different: virtual memory CD8 T cells as a memory-like cell population. *Immunol Cell Biol.* 2019;97(7):675-684. doi:10.1111/imcb.12277

Inicialmente la población T CD8<sup>+</sup> Ag-independiente fue descrita en periferia en animales neonatos. Estos, presentan un contexto intensamente linfopénico que conlleva (en ausencia de Ag) a una proliferación celular incrementada y a la adquisición de marcadores de memoria, similar a lo que ocurre en animales linfopénicos que son transferidos adoptivamente con células T CD8<sup>+</sup> y CD4<sup>+</sup> maduras, efecto que se conoce como proliferación inducida por linfopenia (LIP por sus siglas en inglés) y que es estimulada en periferia por citoquinas como IL-15 e IL-7<sup>(100, 114, 130, 131)</sup>. Las células con fenotipo de memoria generadas en este contexto son conocidas como células LIM (por células de Memoria Inducidas por Linfopenia) o HP (por Proliferación Homeostática). Ha sido propuesto que las células VM serían equivalentes a las células LIM, que adquieren el fenotipo de memoria por señales independientes del reconocimiento de un Ag por parte del TCR, siendo estimulado principalmente por CQs<sup>(132)</sup>. Las células VM, entonces, podrían funcionar como un nexo entre la inmunidad innata y la adaptativa en la etapa neonatal, un período de alta vulnerabilidad inmunológica, proveyendo protección contra potenciales patógenos. Sin embargo, el trabajo recientemente publicado por el grupo de Miller y colaboradores postula que, si bien fenotípica y funcionalmente las células VM y LIM son similares, los factores que fuerzan la diferenciación de ambas son diferentes, por lo que sugieren el estudio de las mismas de manera independiente<sup>(129)</sup>.

La importancia de las células T CD8<sup>+</sup> con fenotipo de memoria cobra mayor relevancia en el año 2015 cuando *Jacomet et al*, describen por primera vez la presencia de células con características similares a las innatas de ratón en muestras de sangre humana. Los autores aportan evidencia de una población de células CD8<sup>+</sup> KIR/NKG2A<sup>+</sup> (receptores de "killing" o muerte clásicos de células NK) en adultos humanos sanos, con alta expresión de Eomes, producción rápida de IFN $\gamma$  frente a la estimulación innata con IL-12 e IL-18 y una potente actividad citotóxica independiente del reconocimiento de Ag por sus TCR<sup>(133)</sup>. La presencia

de estas células en sangre de cordón umbilical sugiere que su fenotipo innato fue adquirido previamente al contacto con algún Ag en OLS, sugiriendo que las células T CD8<sup>+</sup> innatas pueden ser resultado de la maduración en timo, como ocurre en ratones<sup>(133)</sup>.

Estas células T CD8<sup>+</sup> de memoria Ag-independientes han presentado, en diversos modelos murinos de infección, protección contra diversos patógenos de manera innata<sup>(101, 102, 113, 121)</sup>. Actualmente, pocos reportes vinculan a las células T CD8<sup>+</sup> innatas, o a células fenotípica y funcionalmente compatibles con las mismas, con la respuesta antitumoral. En relación a lo mencionado, ha sido demostrado en ratón que células T CD8<sup>+</sup> con fenotipo de memoria (CD44<sup>hi</sup>) que han sido activadas de manera independiente del reconocimiento de un Ag por su TCR son capaces de ejercer su actividad citotóxica mediante receptores de muerte como NKG2D, logrando eliminar células tumorales que expresan ligandos para dicho receptor<sup>(134-139)</sup>. Más aun, un estudio realizado en pacientes con cáncer de mama y ovario indica que las células T CD8<sup>+</sup> innatas están presentes en nódulos linfáticos (NLs) drenantes de tumores mamarios y en tumores ováricos y carcinosis derivadas de los mismos<sup>(115)</sup>. Además, demuestran que el tratamiento quimioterapéutico estimularía el incremento en las frecuencias de las células en estudio<sup>(115)</sup>, colaborando posiblemente con la eficiencia de la terapia. Otros trabajos realizados en tumores de pacientes con melanoma tratados localmente con Imiquimod (un agonista del receptor tipo Toll-7 o TLR7) demostraron que las células T CD8<sup>+</sup> de memoria incrementaban en respuesta al estímulo no específico del TCR, comparado a tumores de pacientes que recibieron vehículo<sup>(136)</sup>. En conjunto estos datos, nos permiten hipotetizar que debido a su rápido accionar frente a estímulos con CQs (de manera independiente del reconocimiento específico de un Ag por su TCR), y su respuesta funcional citotóxica similar a la ejercida por células NK, es que consideramos que estas células podrían cumplir un rol importante en la respuesta inmune contra el cáncer.

## HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

Las células T CD8<sup>+</sup> innatas fueron descritas hace aproximadamente dos décadas atrás, como linfocitos T que presentan un fenotipo similar al de memoria (CD44<sup>hi</sup> CD122<sup>+</sup>) y la habilidad de responder de manera rápida a la estimulación innata en forma Ag-independiente, contrariamente a lo que ocurre en una respuesta clásica de un linfocito T convencional. Desde entonces, múltiples grupos de investigación se han dedicado a su estudio y a identificar su rol en la protección contra distintos tipos de infecciones<sup>(101, 102, 121)</sup>. En nuestro grupo de trabajo hemos demostrado que en condiciones inflamatorias o infecciosas de tipo Th1 la producción local de IL-4 e IL-15 en tимо favorece la desviación en la ontogenia de los linfocitos T CD8<sup>+</sup> convencionales al linaje innato. Las células generadas en dichas condiciones mostraron una elevada capacidad citotóxica mediada principalmente por NKG2D, gran producción de IFN $\gamma$  frente a estimulación con IL-12+IL-18, y protección frente al parásito *Trypanosoma cruzi* de manera Ag independiente<sup>(113)</sup>. Sin embargo, son pocos los reportes publicados hasta el momento que involucren a las células T CD8<sup>+</sup> de memoria Ag-independientes (VM e IM) en la respuesta contra el cáncer.

Previamente, nuestro grupo de investigación demostró, a través de la inyección hidrodinámica (IH) de ADNc codificante para IL-12 e IL-18, que la expresión sistémica de ambas citoquinas lograba controlar de manera satisfactoria el crecimiento de tumores, reduciendo los efectos adversos observados con la misma dosis de ADNc codificante únicamente para IL-12<sup>(60)</sup>. Teniendo en cuenta los antecedentes mencionados, y el hecho de que las células T CD8<sup>+</sup> innatas tienen la capacidad de responder de manera independiente del TCR a estímulos con citoquinas como IL-12 e IL-18 (ya que presentan una expresión constitutiva de sus receptores IL-12R e IL-18R)<sup>(100, 101, 114, 122)</sup>, es que decidimos abocarnos al estudio de este subtipo celular en periferia (células VM) y a su posible rol en la respuesta antitumoral luego de la estimulación innata con ambas citoquinas.

A partir de lo expuesto, formulamos como **hipótesis de trabajo** que:

*“La co-expresión sistémica de IL-12 + IL-18 es capaz de gatillar rápidamente un aumento en el número y función de un subtipo de células T CD8<sup>+</sup> de características innatas con un alto potencial antitumoral, pudiendo en su conjunto representar un contexto ideal para la erradicación de ciertos tipos de tumores”.*

Como **objetivo general** de este trabajo de tesis decidimos:

*“Determinar el rol de las células T CD8<sup>+</sup> Innatas que se inducen luego de la expresión sistémica de IL-12 e IL-18 en el control del crecimiento tumoral”.*

De manera de alcanzar el objetivo planteado, propusimos los siguientes **objetivos específicos**:

- ✓ *Estudiar la presencia, fenotipo y distribución de las células T CD8<sup>+</sup> Innatas en periferia (VM), y su rol en la respuesta antitumoral luego de la estimulación con IL-12 e IL-18.*
- ✓ *Evaluar el rol de diversas citoquinas en la respuesta antitumoral y en la generación de células T CD8<sup>+</sup> innatas en periferia luego de la expresión sistémica de IL-12 e IL-18.*
- ✓ *Analizar la presencia, fenotipo y comportamiento funcional de células T CD8<sup>+</sup> innatas en contextos enriquecidos en células T CD8<sup>+</sup> Ag-independientes.*

Para cumplir los objetivos propuestos en esta tesis utilizamos el modelo murino experimental de IH de plásmidos codificantes para IL-12 e IL-18, de modo de lograr la expresión sistémica elevada y sostenida en el tiempo de ambas citoquinas como ha sido previamente publicado por nuestro grupo<sup>(60, 62)</sup>, utilizando en este caso dosis reducidas de IL-12 para disminuir el riesgo de toxicidad. Este modelo fue utilizado de manera comparativa en distintas cepas de animales de base C57BL/6 WT y transgénicos (IL4KO, IFN $\alpha$ RKO, IFN $\gamma$ KO y OT-I), portadores de tumores B16 (melanoma) o KPC (adenocarcinoma ductal pancreático), lo que nos permitió evaluar el aporte de las distintas citoquinas en estudio (IL-4, IFNs tipo I e IFN $\gamma$ ) en la inducción y distribución de las células VM en periferia, y en la generación de una respuesta antitumoral, además de permitirnos analizar de qué manera estos parámetros se ven modificados en un contexto donde prima la respuesta Ag-independiente (cepa OT-I).

**RESULTADOS**

---

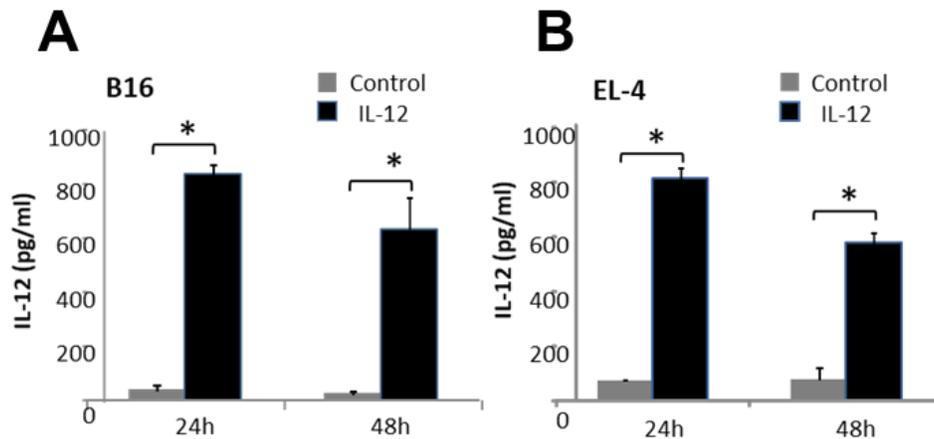
## CAPÍTULO I: EFECTO DE LA TERAPIA GÉNICA DE DOSIS ÚNICA DE IL-12 COMO MONOTERAPIA EN LA RESPUESTA ANTITUMORAL.

La IL-12 es una citoquina proinflamatoria producida por diversos tipos de células inmunes durante el curso de infecciones o inflamaciones de tipo Th1<sup>(140)</sup>. Los múltiples efectos mediados por esta CQ le han conferido a la misma una fuerte capacidad antitumoral, lo que le permitió ser utilizada en múltiples ensayos clínicos para el tratamiento de distintos tipos de cáncer<sup>(140-143)</sup>.

Previo al desarrollo de esta tesis, en nuestro grupo de trabajo, se analizaron los efectos de la expresión sistémica de IL-12 (generada por IH de 5 $\mu$ g de sus plásmidos codificantes) en la respuesta antitumoral<sup>(60, 144)</sup>. Utilizando esta técnica en distintos modelos murinos de cáncer, antecedentes de nuestro grupo mostraron resultados eficaces tanto en el control del crecimiento de tumores s.c. de melanoma murino (B16) y cáncer de pulmón (3LL) como en la reducción del número de metástasis de los mismos tumores, comparado con animales controles. Estos resultados alentadores se vieron opacados por la alta tasa de mortalidad en aquellos animales que recibieron la dosis de 5 $\mu$ g de ADNc codificante para la citoquina, respecto al grupo control<sup>(60)</sup>.

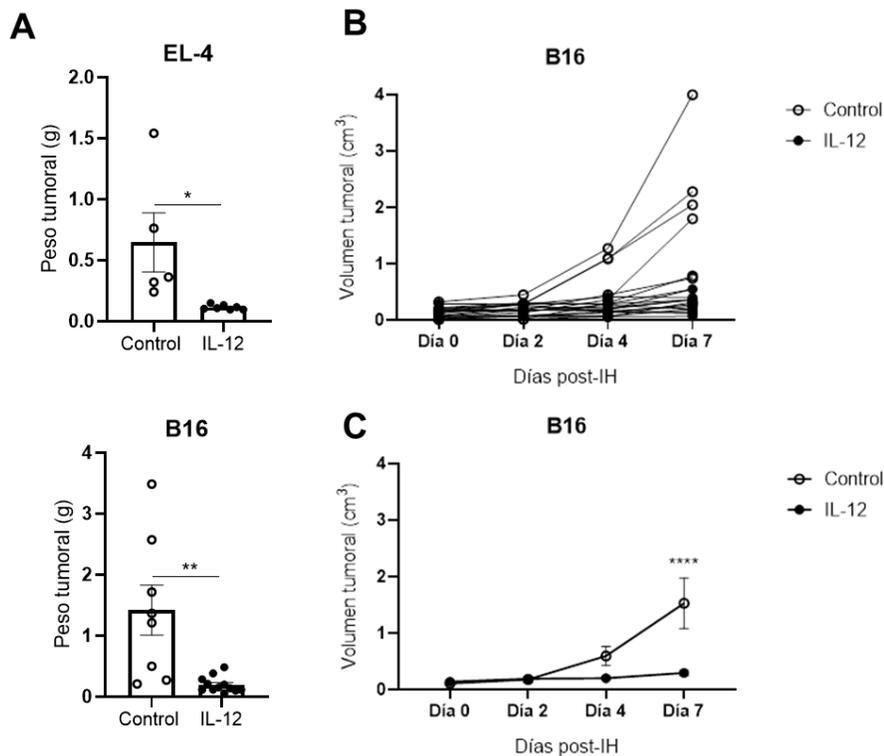
Más aún, en pacientes oncológicos la administración sistémica de IL-12 demostró severos efectos adversos en distintos ensayos clínicos, lo que limitó su uso como monoterapia<sup>(145, 146)</sup>. Teniendo en cuenta su gran potencial antitumoral, distintos laboratorios continuaron la búsqueda de alternativas para su uso clínico, ya sea administrándola como coadyuvante de otras drogas terapéuticas, como monoterapia de administración local (en lugar de sistémica), o como tratamiento sistémico a dosis reducidas<sup>(78, 82, 147-150)</sup>. La administración local de IL-12 presenta la desventaja de no poder utilizarse en aquellos tumores de difícil acceso como tampoco para focos metastásicos. Es por ello que consideramos a la administración sistémica una alternativa más versátil en el tratamiento contra el cáncer.

Teniendo en cuenta lo mencionado, en una primera etapa de esta tesis decidimos evaluar en modelos murinos de cáncer (melanoma B16 y linfoma EL-4), el impacto y la eficacia de IL-12 en la respuesta antitumoral y en la inducción de un MAT inmunocompetente, luego de la IH de plásmidos codificantes para dicha citoquina a dosis reducidas (1 $\mu$ g). Los niveles de IL-12 generados con esta dosis son equivalentes a los observados en pacientes con cáncer en distintos ensayos clínicos (Figura 7)<sup>(71, 76)</sup>. Para ello, animales C57BL/6 WT y FoxP3-GFP fueron inoculados de manera s.c. con células de linfoma EL-4 o melanoma B16 para la inducción de tumores sólidos. Una vez que dichos tumores fueron palpables, los animales fueron hidrodinámicamente inyectados con el ADNc correspondiente, y el crecimiento del tumor monitoreado hasta el día de la eutanasia (día 7 post-IH).



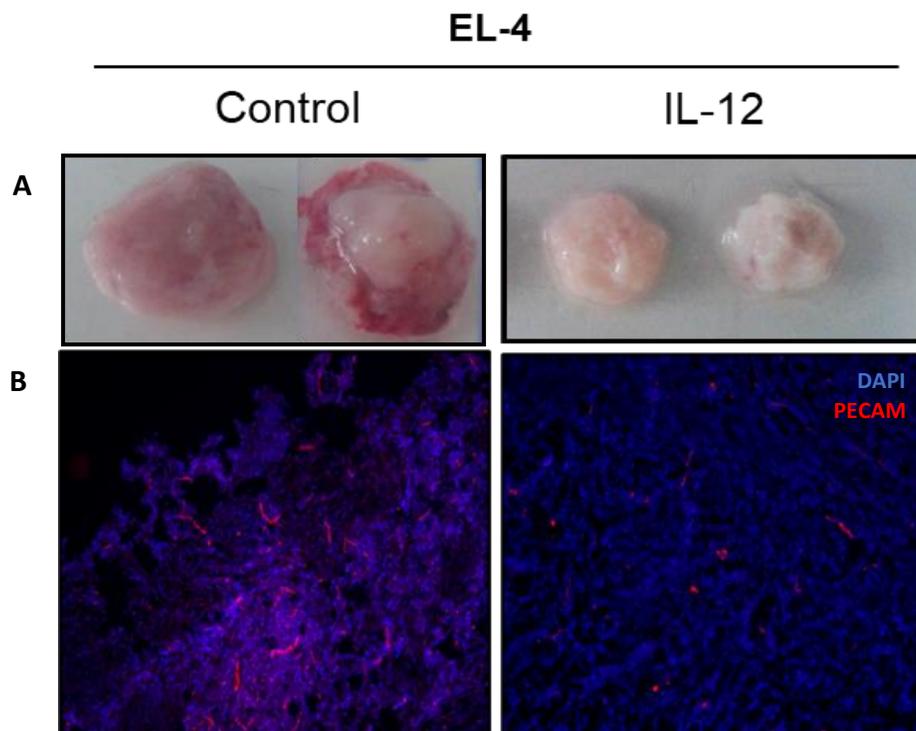
**Figura 7:** Niveles sistémicos de IL-12 generados por inyección hidrodinámica. Animales C57BL/6 WT portadores de tumores B16 (A) o EL4 (B) fueron inyectados hidrodinámicamente con 1 $\mu$ g de plásmidos de expresión para IL-12 o control. A distintos tiempos post-IH se obtuvieron muestras de plasma y se analizaron por ELISA para la detección de IL-12. Los gráficos representan las medias  $\pm$  SEM de al menos dos experimentos independientes con n=3-4 animales por grupo experimental. El análisis estadístico fue realizado utilizando el Test T de Student. Valores de \*p<0.05 fueron considerados significativos.

En primer lugar, analizamos la eficacia de la terapia con dosis bajas de IL-12, observando en ambos modelos un satisfactorio control del crecimiento de los tumores, corroborado tanto a partir del peso (Figura 8 A), como del volumen de los mismos (ver sección *Materiales y Métodos*) (Figura 8 B y C).



**Figura 8:** Efecto de la expresión sistémica de IL-12 en el crecimiento tumoral. (A) Pesos de tumores EL-4 (linfoma) y B16 (melanoma) de animales C57BL/6 inyectados hidrodinámicamente con los plásmidos de expresión para IL-12 o control al día 7 post-IH. (B y C) Curva de crecimiento representando el volumen de tumores B16 (en  $\text{cm}^3$ ), a diferentes días post-IH de animales del grupo control o IL-12. La figura (B) muestra los valores independientes de cada animal, mientras que la figura (C) representa la media  $\pm$  SEM del volumen tumoral de los animales que conforman cada grupo. Los gráficos representan resultados obtenidos de dos experimentos independientes para cada modelo con resultados reproducibles. El análisis estadístico fue realizado utilizando el Test T de Student en (A) y ANOVA de dos vías en (C). Valores de  $*p<0.05$ ,  $**p<0.01$ ,  $***p<0.001$ ,  $****p<0.0001$  fueron considerados significativos.

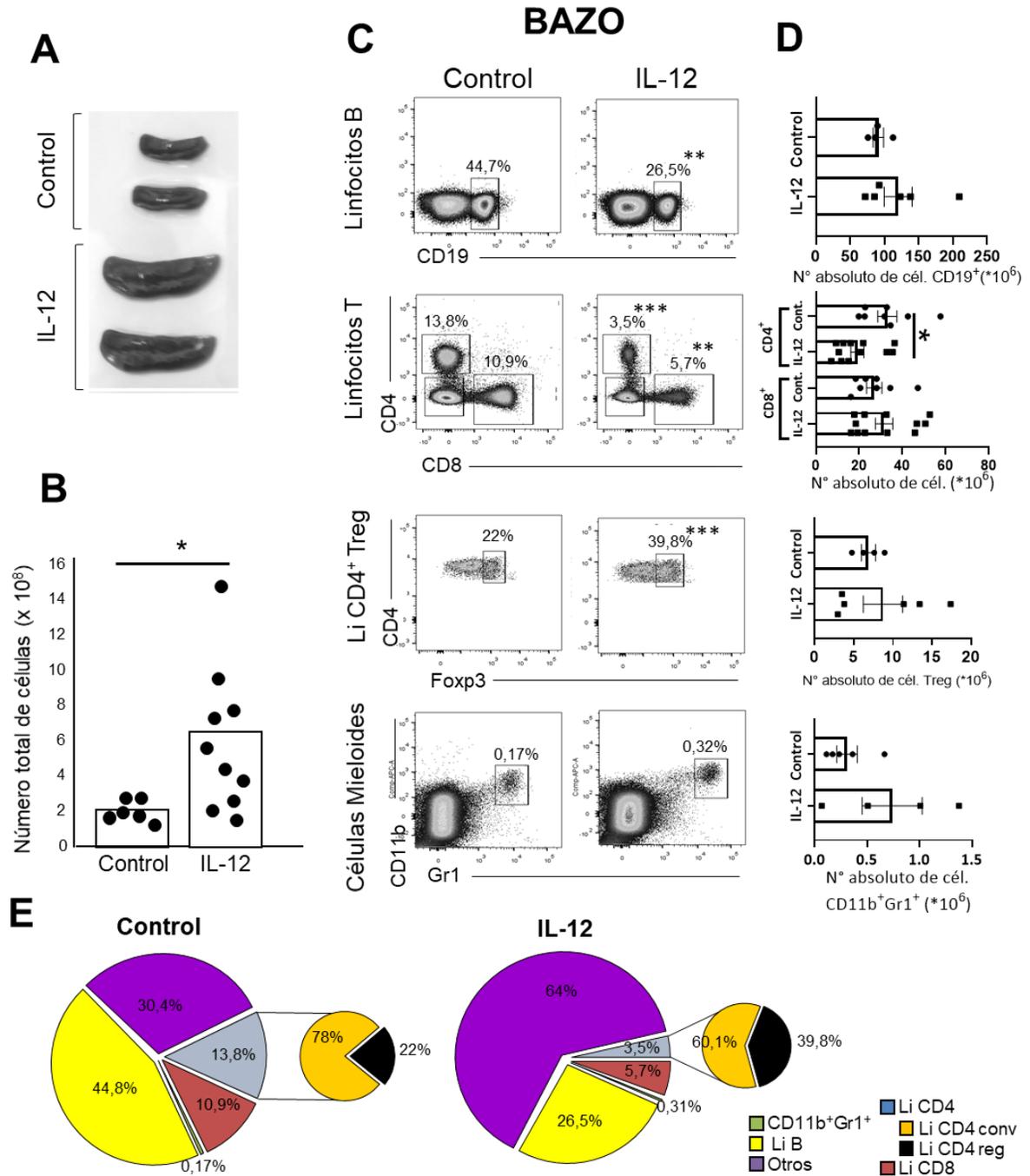
En una segunda instancia, quisimos evaluar si la disminución en la dosis de IL-12 respecto a la utilizada en nuestros trabajos anteriores<sup>(60, 62)</sup>, era eficaz en la inducción de una respuesta angiostática. Se conoce como angiostasis a la inhibición de la formación de nuevos vasos sanguíneos (o angiogénesis). Estos, cumplen un rol fundamental en la irrigación de los tumores, tanto por su aporte a la nutrición y crecimiento de los mismos, como a la extravasación de células cancerígenas y promoción de focos metastásicos. Para alcanzar este objetivo, trabajamos con el modelo murino de linfoma (EL-4), ya que, a diferencia de tumores B16 (productores de melanina), este modelo desarrolla tumores pálidos que permiten visualizar fácilmente y de manera rápida la irrigación sanguínea. De este modo, la observación macroscópica demostró tumores más claros luego del tratamiento con IL-12, comparado a animales controles (Figura 9 A). A nivel microscópico por inmunofluorescencia de cortes de tejido, se visualizó una reducción en la tinción de PECAM (CD31, marcador de células endoteliales) intratumoral en los tumores de animales del grupo IL-12 respecto a los controles (Figura 9 B).



**Figura 9:** *Efecto de la expresión sistémica de IL-12 en la respuesta angiostática. (A) Fotografías de tumores EL-4 de animales C57BL/6 hidrodinámicamente inyectados con plásmidos para IL-12 (derecha) o controles (izquierda), obtenidos al día 7 post-IH. (B) Tumores EL-4 de animales del grupo control (izquierda) o IL-12 (derecha) obtenidos al día 7 post-IH fueron fijados en una solución de Paraformaldehído al 4%, deshidratados en una solución de Sucrosa al 30% y congelados a -20°C hasta su uso. Crio secciones de 10µm de espesor fueron teñidas con un anticuerpo primario anti-PECAM y un secundario anti-IgG de conejo conjugado con Alexa Flúor 546 (rojo). La contra tinción de los núcleos fue realizada con DAPI (azul). Las imágenes fueron obtenidas con un microscopio confocal de fluorescencia Olympus FV1200 con una magnificación 10x.*

Posteriormente, analizamos los efectos de la terapia de IL-12 a dosis bajas, en la distribución leucocitaria en periferia, tanto en OLS distales (bazo y ganglios linfáticos no drenantes de tumor (GnD)) o proximales (ganglios linfáticos drenantes de tumor (GD)) al sitio del tumor, como también en el tejido neoplásico *per se*.

La expresión sistémica de IL-12 indujo una marcada esplenomegalia comparada a los bazos de animales controles (Figura 10 A), efecto que correlaciona con un incremento en el número total de esplenocitos (Figura 10 B). A continuación, analizamos por citometría de flujo en bazos de estos animales, las frecuencias de aquellas poblaciones celulares que participan en la respuesta inmunológica frente a tumores. Observamos que tanto los linfocitos B, como T CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup>, disminuyen significativamente su frecuencia luego del tratamiento con IL-12 (Figura 10 C y E), aunque sólo las células T CD4<sup>+</sup> disminuyen en números absolutos (Figura 10 D). Las frecuencias de las poblaciones celulares con potenciales efectos regulatorios (CD11b<sup>+</sup>Gr-1<sup>+</sup> y CD4<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>) se ven incrementadas en respuesta al estímulo (Figuras 10 C y E), mientras que los números absolutos de las mismas no presentaron cambios significativos (Figura 10 D).



**Figura 10:** Efecto de la terapia de inyección hidrodinámica de IL-12 sobre la distribución leucocitaria en bazo. Animales C57BL/6 FoxP3-GFP portadores de tumores B16 fueron hidrodinámicamente inyectados con 1µg de plásmidos para IL-12 o control. (A) Fotografías y (B) número total de células de bazos de animales controles o IL-12 obtenidos al día 7 post-IH. (C) Dot plots y (E) gráficos de torta representando las frecuencias y (D) gráficos de barras representando los números absolutos de las distintas poblaciones leucocitarias (linfocitos B CD19<sup>+</sup>, T CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup>, T regulatorios CD4<sup>+</sup> FoxP3<sup>+</sup>, y mieloides CD11b<sup>+</sup> Gr1<sup>+</sup>) en bazo de ambos grupos de animales al día 7 post-IH obtenidos por citometría de flujo. El análisis estadístico fue realizado utilizando el test T de Student. Valores de \*p<0.05, \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001, \*\*\*\*p<0.0001 fueron considerados significativos.

En contraste a lo observado en bazo, el porcentaje de linfocitos B incrementó en ganglios linfáticos, tanto drenantes como no drenantes de tumor, luego del estímulo con IL-12 (Figuras 11 A, B, D y E), efecto que se vio reflejado en una tendencia a incrementar los valores absolutos de dicha población (Figura 11 C). A pesar de que las frecuencias de células T CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> observadas son menores en GD comparado a GnD, este efecto solo es significativo en animales tratados con IL-12 y no en animales controles (Tabla 1). Esto sugiere que el porcentaje de células T en GD podría verse reducido debido a la migración de las mismas dentro del tumor luego del estímulo con la citoquina.



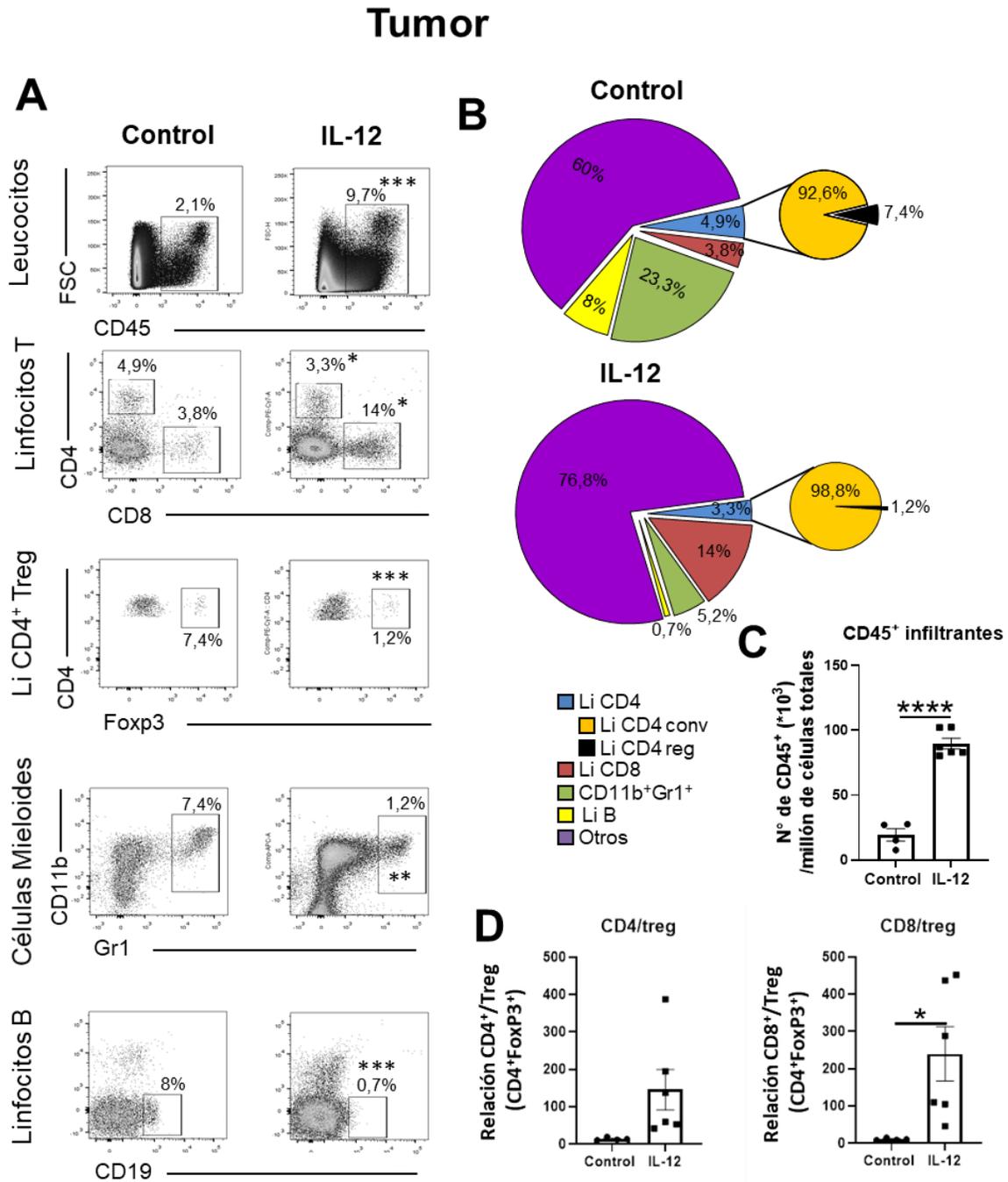
las frecuencias y (C) gráficos de barra representando los números absolutos de las distintas poblaciones leucocitarias (linfocitos B CD19<sup>+</sup>, T CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup>, T regulatorios CD4<sup>+</sup> FoxP3<sup>+</sup>, y mieloides CD11b<sup>+</sup> Gr-1<sup>+</sup>) en ganglios drenantes (A y C) y no drenantes (B y D, respectivamente) de tumor de ambos grupos de animales al día 7 post-IH obtenidos por citometría de flujo. El análisis estadístico fue realizado utilizando el test T de Student. Valores de \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ , \*\*\*\* $p < 0.0001$  fueron considerados significativos.

Control	GnD	GD	P valor
% CD4	23,89	19,45	0,14
% CD8	27,34	20,30	0,12

IL-12	GnD	GD	P valor
% CD4	16,50	10,16	0,008
% CD8	23,18	9,58	0,001

**Tabla 1:** Efecto de la terapia de inyección hidrodinámica de IL-12 sobre la distribución leucocitaria en ganglios linfáticos inguinales. Animales C57BL/6 FoxP3-GFP portadores de tumores B16 fueron hidrodinámicamente inyectados con 1  $\mu$ g de plásmidos para IL-12 o control. La tabla muestra las frecuencias de linfocitos T CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> en ganglios drenantes y no drenantes de tumor de ambos grupos de animales al día 7 post-IH obtenidos por citometría de flujo. El análisis estadístico fue realizado utilizando el test T de Student. Valores de  $p < 0.05$ ,  $p < 0.01$ ,  $p < 0.001$ ,  $p < 0.0001$  fueron considerados significativos.

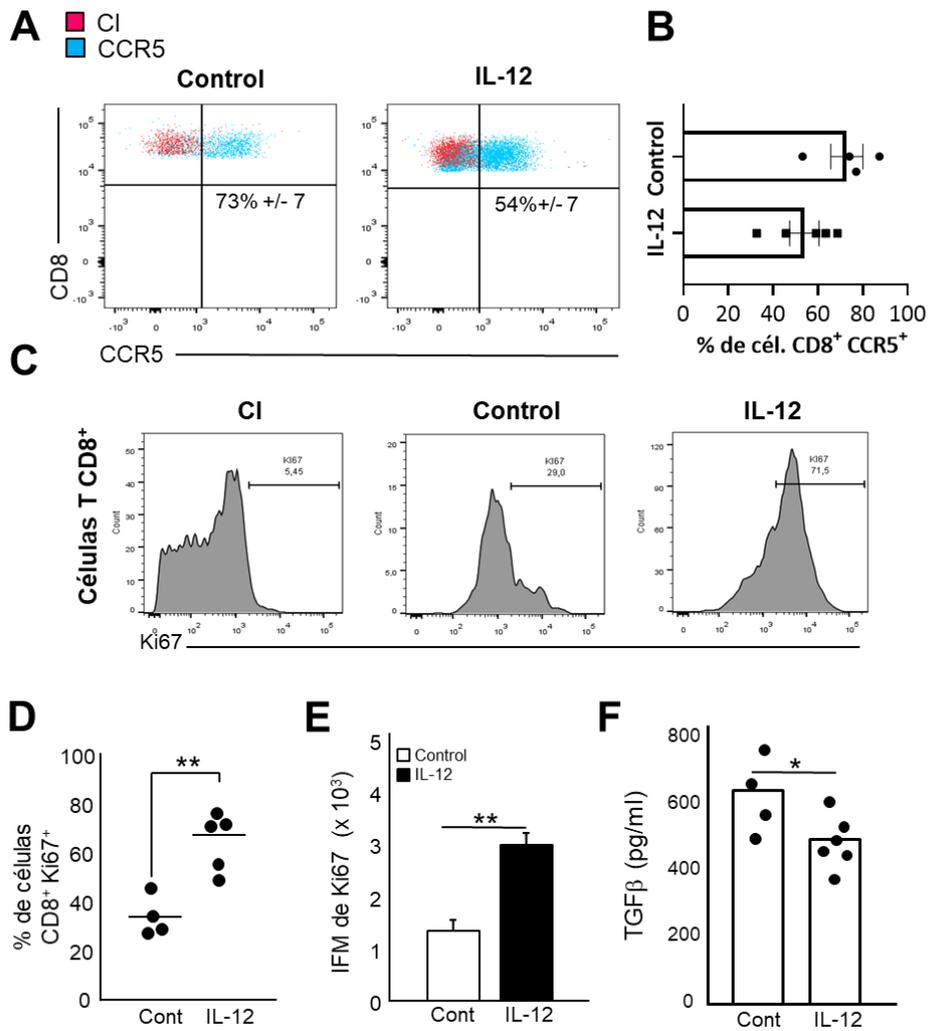
Posteriormente, decidimos evaluar las frecuencias de leucocitos (CD45<sup>+</sup>) infiltrantes de tumor. Observamos un marcado incremento (de aproximadamente 5 veces) en el porcentaje de células CD45<sup>+</sup> entre tumores provenientes de animales tratados con IL-12 comparado a animales controles (de un 2.1% a un 9.7% respectivamente) (Figura 12 A), reflejado también en el número de células CD45<sup>+</sup> infiltrantes (valor calculado sobre el total de un millón de células adquiridas de cada muestra de homogenato de tumor) (Figura 12 C). Respecto a la distribución de células T, la población de linfocitos CD4<sup>+</sup> mostró similares frecuencias entre los grupos, mientras que la población CD8<sup>+</sup> se vio significativamente enriquecida post-IL-12 comparada con tumores de animales controles (Figura 12 A y B). Este efecto estuvo acompañado por una reducción en la proporción de células mieloides CD11b<sup>+</sup>Gr-1<sup>+</sup> y células con fenotipo análogo a células regulatorias CD4<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> (“Treg”) en el grupo estimulado con la citoquina (Figura 12 A y B). Más aún, observamos que en tumores de animales tratados con IL-12, la relación entre el número de linfocitos T CD8<sup>+</sup> respecto a células “Treg” infiltrantes era significativamente mayor que la correspondiente a animales controles, indicativo de una mayor exigencia de la población regulatoria en controlar/inhibir la funcionalidad de células T CD8<sup>+</sup> citotóxicas luego de la expresión sistémica de IL-12 (Figura 12 D).



**Figura 12:** Efecto de la terapia de inyección hidrodinámica de IL-12 sobre la distribución de leucocitos infiltrantes de tumor. Animales C57BL/6 FoxP3-GFP portadores de tumores B16 fueron hidrodinámicamente inyectados con 1µg de plásmidos para IL-12 o control. Los tumores de ambos grupos de animales fueron obtenidos al día 7 post-IH, disgregados mecánicamente y alícuotas de sus homogenatos fueron marcadas con los anticuerpos correspondientes para su posterior análisis por citometría de flujo. Los (A) Dot plots y (B) gráficos de torta representan las frecuencias de las distintas poblaciones leucocitarias (leucocitos totales CD45<sup>+</sup>, linfocitos B CD19<sup>+</sup>, T CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup>, T regulatorios CD4<sup>+</sup> FoxP3<sup>+</sup>, y mieloides CD11b<sup>+</sup> Gr-1<sup>+</sup>) en tumores B16 de ambos grupos de animales al día 7 post-IH. Los gráficos representan las medias ± SEM de al menos dos experimentos

independientes con  $n=3-4$  animales por grupo experimental. El análisis estadístico fue realizado utilizando el test *T* de Student. Valores de  $*p<0.05$ ,  $**p<0.01$ ,  $***p<0.001$ ,  $****p<0.0001$  fueron considerados significativos.

A continuación, decidimos evaluar si el enriquecimiento en células T CD8<sup>+</sup> observado en tumores de animales tratados con ADNc de IL-12 era resultado de un aumento en su capacidad proliferativa en el sitio del tumor o se debía a un incremento en la capacidad de estas células de infiltrar dicho tejido. Para ello, analizamos la expresión de CCR5 en las células T CD8<sup>+</sup> infiltrantes de tumor. CCR5 es un receptor de quimiocinas que cumple un rol fundamental en el reclutamiento de este tipo celular al tejido neoplásico<sup>(151)</sup>. Los resultados arrojados por citometría de flujo de homogenatos de tumor mostraron una alta expresión de CCR5 tanto en animales controles como del grupo IL-12. Sin embargo, no se detectaron diferencias significativas en la expresión de dicho receptor entre ambos grupos experimentales (Figura 13 A).



**Figura 13:** *Efecto de la expresión sistémica de IL-12 sobre el infiltrado CD8<sup>+</sup> y el MAT. Animales C57BL/6 FoxP3-GFP portadores de tumores B16 fueron hidrodinámicamente inyectados con 1 µg de plásmidos para IL-12 o control. Los tumores de ambos grupos de animales fueron obtenidos al día 7 post-IH y disgregados mecánicamente. Alícuotas de homogenatos de tumor fueron procesados para citometría de superficie (A y B) o intracelular (C, D, E), e incubados con los anticuerpos correspondientes a cada tinción. Las figuras (A) y (B) muestran Dot plots y gráficos de barras representando las frecuencias de células CD8<sup>+</sup> infiltrantes de tumor que expresan el receptor CCR5 (celeste), comparado a la expresión de su control de isotipo (rojo), para ambos grupos de animales. En (C, los histogramas muestran dentro de la población CD8<sup>+</sup>, la expresión de Ki67 de cada grupo de animales (gráficos central y derecho), comparado a su control de isotipo (gráfico izquierdo). Las frecuencias de células CD8<sup>+</sup>Ki67<sup>+</sup> y la intensidad de expresión de Ki67 en dichas células, provenientes de tumores de cada grupo de animales fueron representados en (D) y (E) respectivamente. Alícuotas de homogenatos de tumor de ambos grupos experimentales fueron estimulados in vitro con PMA/Ionomicina y posteriormente los sobrenadantes fueron analizados por ELISA para determinar los niveles de producción de TGF-β, representados en (F). El análisis estadístico fue realizado utilizando el test T de Student. Valores de \*p<0.05, \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001, \*\*\*\*p<0.0001 fueron considerados significativos.*

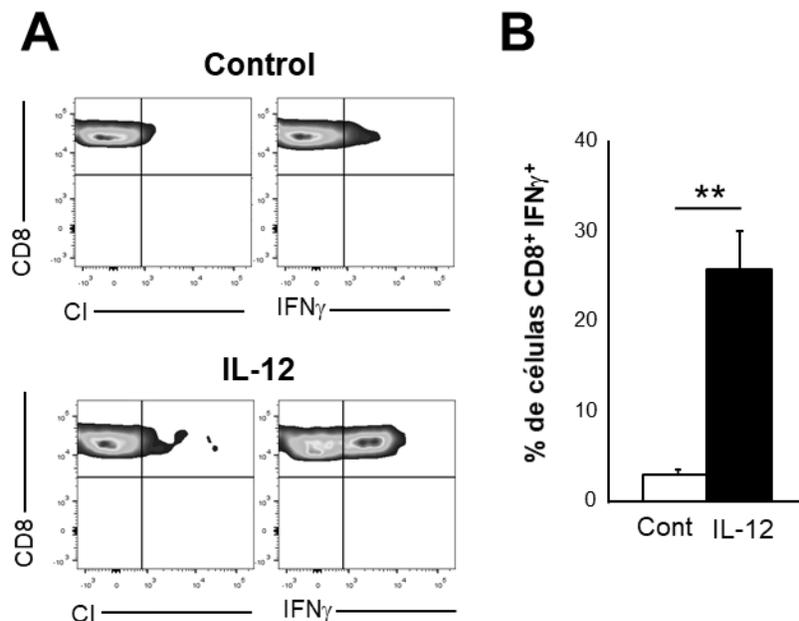
Para evaluar la respuesta proliferativa, analizamos la expresión intracelular de Ki67 en las mismas células por citometría de flujo. Éste, es un marcador de proliferación que se observa en los núcleos a lo largo de todo el ciclo celular, a excepción de la fase G0, y su intensidad de expresión es un indicador de la capacidad proliferativa de dicha célula<sup>(152)</sup>. Estos resultados, arrojaron porcentajes bajos de linfocitos T CD8<sup>+</sup> Ki67<sup>+</sup> en tumores de animales controles, valores que incrementan significativamente en animales estimulados con IL-12 (Figuras 13 B y C). Más aún, la intensidad de expresión de este marcador fue mucho mayor en células CD8<sup>+</sup> provenientes de tumores IL-12 comparado al observado en animales controles (Figura 13 D).

Estos datos indicarían, no solamente que la población T CD8<sup>+</sup> está enriquecida en tumor por un incremento en su capacidad proliferativa, sino también que en respuesta a la expresión sistémica de IL-12, podría inducirse un microambiente tumoral más permisivo, inhibiendo o disminuyendo de alguna manera la respuesta regulatoria inmunosupresora clásica del MAT observada normalmente en la progresión de la enfermedad<sup>(11, 12)</sup>.

A continuación, analizamos por ELISA en sobrenadante de cultivo de tumores estimulados *in vitro*, la producción y liberación del factor de crecimiento transformante beta (TGFβ, por sus siglas en inglés “*Transforming Growth Factor beta*”), una citoquina clásica de un perfil inmunológico antiinflamatorio o regulatorio, que se relaciona directamente a un MAT inmunosupresor, afectando negativamente la capacidad proliferativa de los leucocitos<sup>(153-155)</sup>. Estos ensayos revelaron niveles significativamente menores de TGFβ en muestras provenientes de tumores de animales estimulados con IL-12, comparado a los observados por tumores de animales controles (Figura 13 E).

Finalmente, decidimos analizar la funcionalidad de la población T CD8<sup>+</sup> a través de la producción de IFNγ post-estímulo. Ésta es una citoquina proinflamatoria de tipo Th1 involucrada en diversos mecanismos que participan de la respuesta antitumoral: tanto en la inducción de efectos anti-angiogénicos<sup>(156-158)</sup>, como en la funcionalidad de linfocitos NK y T

CD8<sup>+</sup>, células que desempeñan un rol clave en la eliminación de células cancerígenas. Como se muestra en la figura 14, se observó un incremento significativo en la frecuencia de células T CD8<sup>+</sup> IFN $\gamma$ <sup>+</sup> infiltrantes de tumores provenientes de animales IL-12 comparado a animales controles, resultados que sugieren la conversión del MAT inmunosupresor convencional a un MAT más permisivo, que podría favorecer el desarrollo de una respuesta antitumoral eficaz en respuesta al tratamiento con bajas dosis de IL-12.



**Figura 14:** Efecto de la expresión sistémica de IL-12 sobre la funcionalidad de células CD8<sup>+</sup> infiltrantes de tumor. Animales C57BL/6 FoxP3-GFP portadores de tumores B16 fueron hidrodinámicamente inyectados con la cantidad correspondiente de plásmidos para IL-12 o control. Los tumores de ambos grupos de animales fueron obtenidos al día 7 post-IH y disgregados mecánicamente. Alícuotas de homogenatos de tumor fueron estimulados in vitro con PMA/Ionomicina por 5hs y posteriormente las células fueron cosechadas y procesados para citometría de flujo intracelular, utilizando los anticuerpos correspondientes. La figura (A) muestra Dot plots representando la frecuencia de células T CD8<sup>+</sup> infiltrantes de tumor que producen IFN $\gamma$  en respuesta al estímulo, para ambos grupos de animales. En (B), los gráficos de barras muestran las frecuencias (%) de células T CD8<sup>+</sup> IFN $\gamma$ <sup>+</sup> infiltrantes de tumores controles o IL-12. Los gráficos representan las medias  $\pm$  SEM de al menos dos experimentos independientes con n=3-4 animales por grupo experimental. El análisis estadístico fue realizado utilizando el test T de Student. Valores de \*p<0.05, \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001, \*\*\*\*p<0.0001 fueron considerados significativos.

### CONCLUSIONES CAPÍTULO I

En este primer capítulo de resultados empleamos un modelo murino experimental de inyección hidrodinámica de 1 $\mu$ g de ADNc codificante para IL-12 en animales portadores de tumores, generando niveles elevados y tolerables de la citoquina. Bajo estas condiciones hemos podido determinar en respuesta a la citoquina:

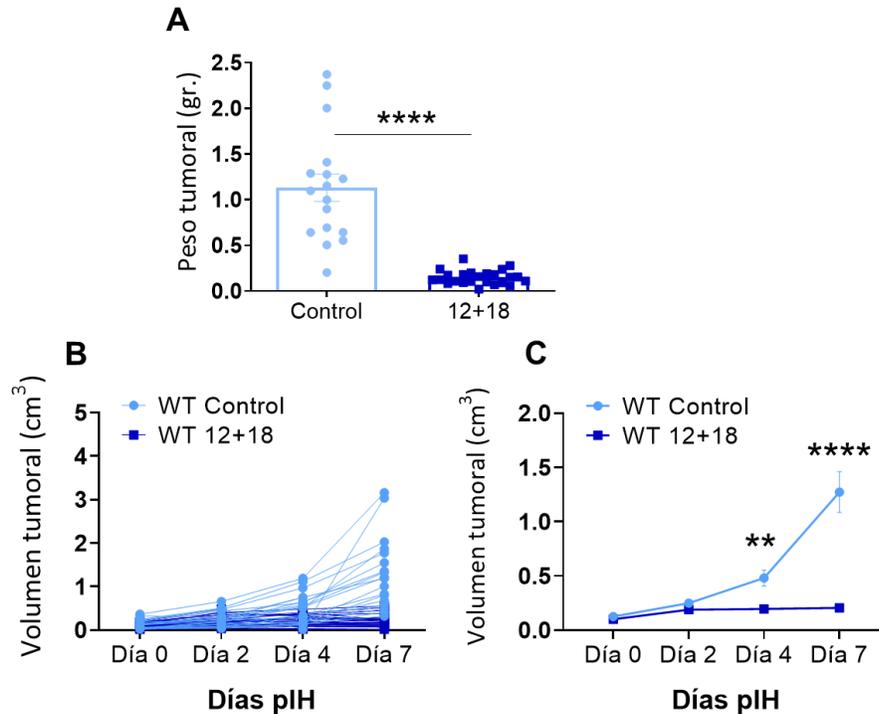
- ✓ una respuesta angiostática robusta, evidenciada tanto a nivel macroscópico (con reducción de los grandes vasos sanguíneos que irrigan) como microscópico (reflejada en una disminución de la microvasculatura (tinción PECAM) intratumoral).
- ✓ alteraciones en la distribución normal de leucocitos, tanto en OLS como dentro del tumor, favoreciendo principalmente un incremento intratumoral en la frecuencia y funcionalidad de linfocitos CD8<sup>+</sup>, junto a una disminución de la proporción de células con potencial regulatorio y de los niveles de TGF- $\beta$  intratumorales.

Estos resultados nos permiten concluir que en respuesta al tratamiento con IL-12, se ve favorecido tanto el incremento en el infiltrado leucocitario, principalmente de células CD8<sup>+</sup>, como la capacidad funcional de las mismas, indicativo de la generación de un contexto más permisivo al desarrollo de la respuesta inmune inflamatoria sistémica y local dentro del tumor. Efectos que, en conjunto, podrían explicar la eficacia en el control del crecimiento tumoral observado luego del estímulo con IL-12 en el presente modelo.

## CAPÍTULO II: EFECTO DE LA CO-EXPRESIÓN SISTÉMICA DE IL-12 E IL-18 EN LA RESPUESTA ANTITUMORAL Y EN LA INDUCCIÓN DE CÉLULAS T CD8<sup>+</sup> INNATAS EN PERIFERIA

En el primer capítulo de este trabajo de tesis demostramos que el contexto inflamatorio Th1 inducido por IH de IL-12 (1 $\mu$ g) favorecía el incremento del infiltrado de células T CD8<sup>+</sup> productoras de IFN $\gamma$  dentro del tumor y el control del crecimiento de los mismos, comparado a lo observado en animales libres de estímulo. Previamente, nuestro grupo de investigación reportó utilizando un modelo de IH de ADNc codificante para IL-12 (5 $\mu$ g) e IL-18, que la expresión sistémica de ambas citoquinas lograba controlar de manera satisfactoria el crecimiento de tumores de manera similar a lo observado con la misma dosis de ADNc codificante únicamente para IL-12, y no observado en animales inyectados con ADNc para IL-18. Además, los animales que co-expresaban ambas citoquinas mostraron un incremento en la supervivencia, lo que sugiere que la IL-18 tendría efectos paliativos a la toxicidad de IL-12, sin afectar su capacidad antitumoral<sup>(60)</sup>. Sin embargo, estos trabajos no profundizan en la caracterización de las subpoblaciones de células T CD8<sup>+</sup> infiltrantes de tumor que colaborarían en la respuesta antitumoral observada en nuestros modelos experimentales. Teniendo en cuenta estos resultados, y los reportes que demuestran la capacidad de las células T CD8<sup>+</sup> Ag-independientes de responder a estímulos innatos con CQs, consideramos que esta subpoblación linfocitaria, que expresa constitutivamente los receptores IL-12R e IL-18R, podría estar respondiendo al tratamiento con ambas citoquinas colaborando con el control de la progresión del tumor.

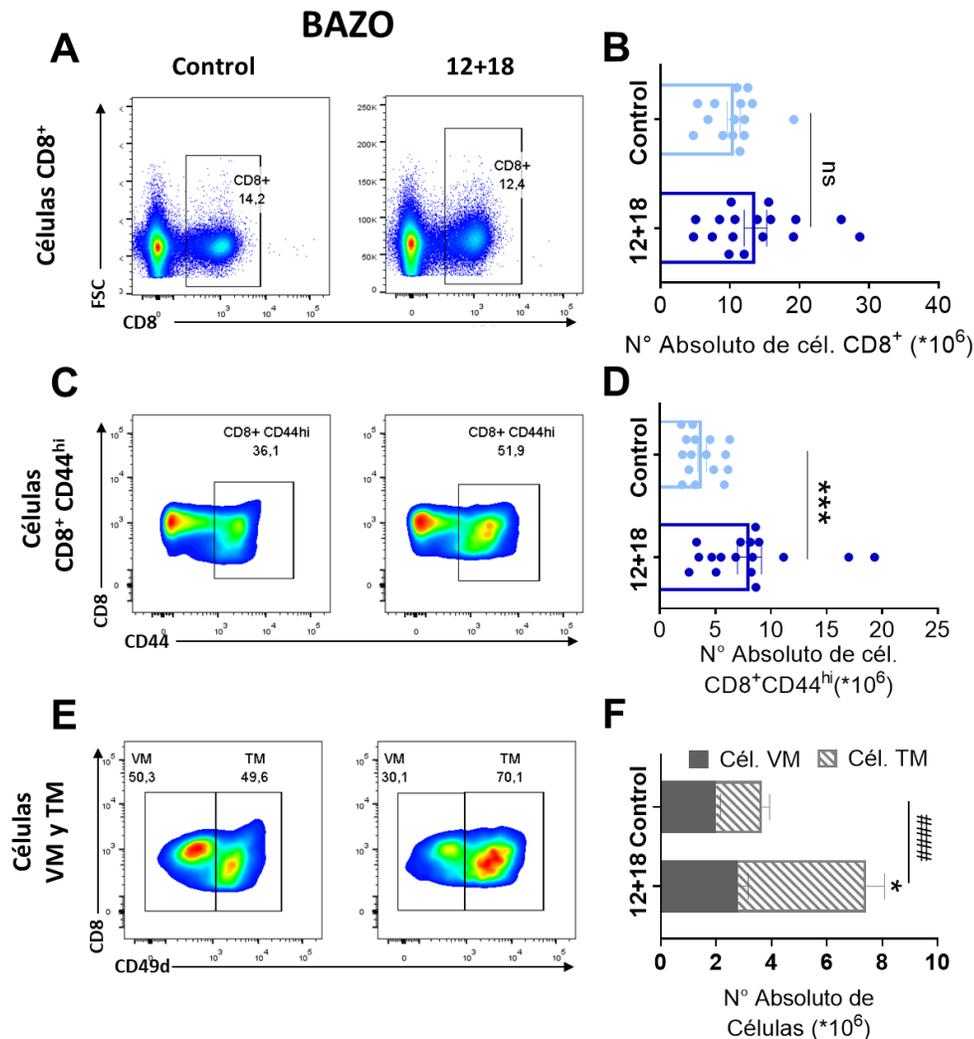
A lo largo de este trabajo de tesis decidimos abocarnos al estudio de las células T CD8<sup>+</sup> innatas en periferia y de su posible rol en la respuesta contra el cáncer. Para desarrollar este objetivo, utilizamos el modelo murino de IH del ADNc codificante para ambas citoquinas. Considerando los resultados presentados en el *Capítulo I* de esta tesis, en una primera etapa de esta sección evaluamos el efecto en la respuesta antitumoral generada por IH de ambos plásmidos (12+18) utilizando dosis reducidas de IL-12 (1 $\mu$ g). Nuestros primeros resultados demostraron que, a estas dosis de citoquinas, se observa una respuesta antitumoral eficaz, reflejada tanto en el peso (Figura 15 A) como en el volumen tumoral (Figura 15 B y C) comparado al grupo control.



**Figura 15:** Efecto de la co-expresión sistémica de 12+18 en el crecimiento tumoral. (A) Pesos de tumores B16 (melanoma) de animales C57BL/6 WT inyectados hidrodinámicamente con los plásmidos de expresión para IL-12(1 $\mu$ g) e IL-18 o control obtenidos al día 7 post-IH. (B y C) Curva de crecimiento de tumor representando el volumen de tumores B16 (en cm<sup>3</sup>) a diferentes días post-IH de animales del grupo control o 12+18. La figura (B) muestra los valores independientes de cada animal, mientras que la figura (C) representa la media  $\pm$  SEM del volumen tumoral de los animales que conforman cada grupo. El análisis estadístico fue realizado utilizando el Test T de Student en (A) y ANOVA de dos vías en (C). Valores de \*\*\* $p$ <0.001, \*\*\*\* $p$ <0.0001 fueron considerados significativos.

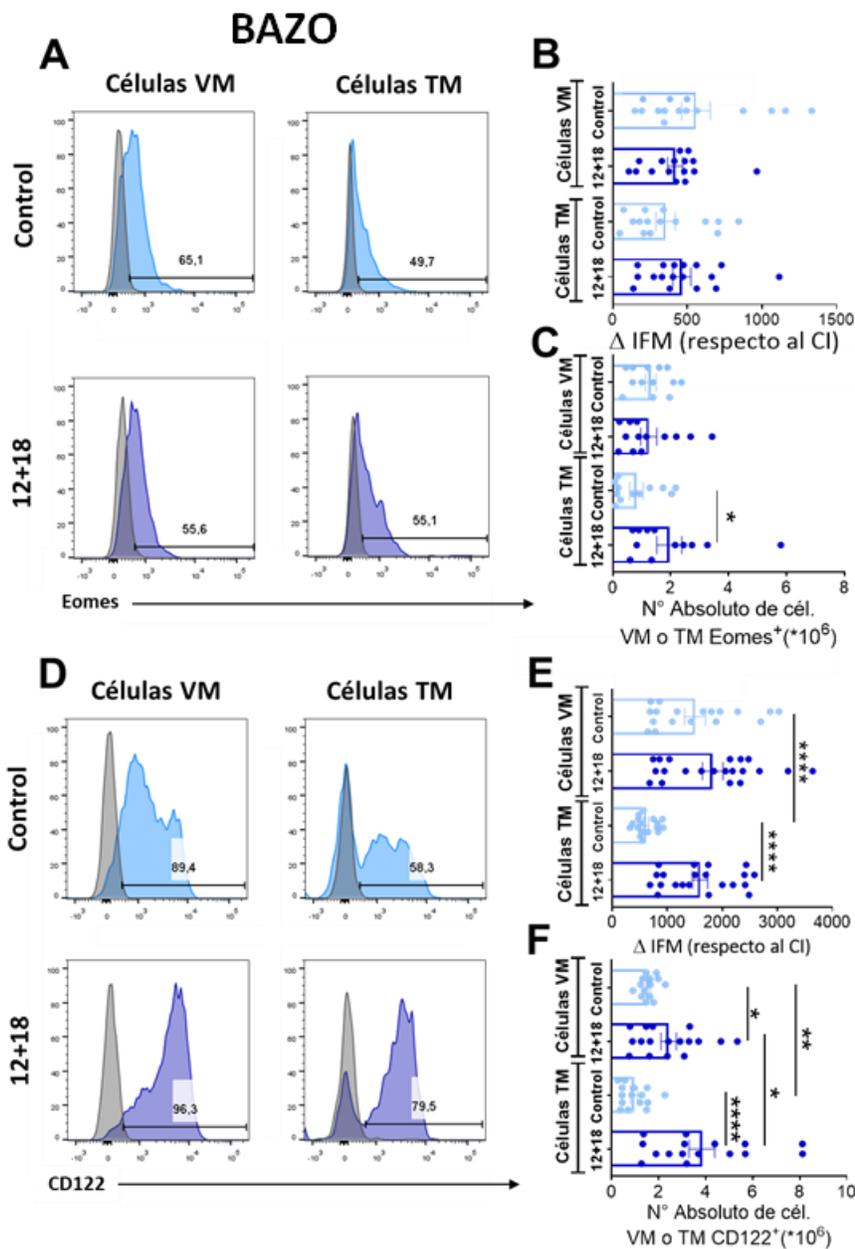
Posteriormente decidimos evaluar si la expresión sistémica de IL-12+IL-18 lograba inducir cambios en el compartimento de células T CD8<sup>+</sup> innatas en periferia que pudieran estar relacionados con la respuesta antitumoral observada. Para ello, analizamos la distribución y fenotipo de las células de memoria (CD8<sup>+</sup>CD44<sup>hi</sup>) desde un tejido periférico distal (bazo) hacia uno proximal (ganglio drenante de tumor) al sitio del tumor.

Los bazos de animales 12+18, si bien no mostraron diferencias en porcentajes o números absolutos de células T CD8<sup>+</sup> totales (Figura 16 A y B), presentaron un incremento significativo de la población de células CD8<sup>+</sup> con fenotipo de memoria CD44<sup>hi</sup> comparado a lo observado en animales controles (Figura 16 C y D). Como se mencionó anteriormente, entre las células T CD8<sup>+</sup>CD44<sup>hi</sup> en periferia podemos distinguir las poblaciones VM y TM a partir de la expresión de CD49d. Esto nos permitió identificar que el aumento en la población de células de memoria totales podía explicarse por el incremento significativo de las células TM observado en respuesta a 12+18, comparado a animales controles. (Figura 16 E y F).



**Figura 16:** Efecto de la expresión sistémica de 12+18 sobre los linfocitos T CD8<sup>+</sup> en bazo. Animales C57BL/6 WT portadores de tumores B16 fueron hidrodinámicamente inyectados con la cantidad correspondiente de plásmidos para IL-12 e IL-18 o control. A los 7 días post-IH se realizó la eutanasia de los animales y los bazos fueron colectados y procesados para su análisis por citometría de flujo. Las figuras (A, C, E) muestran Dot Plots y (B, D, F) gráficos de barras representando las poblaciones de células CD8<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup>CD44<sup>hi</sup>, y TM/VM respectivamente, para cada grupo de animales. El análisis estadístico fue realizado utilizando el test Welch en (B) y Mann-Whitney en (D) y (F). Valores de \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ , \*\*\*\* $p < 0.0001$  fueron considerados significativos. ####  $p < 0.0001$  representa la diferencia significativa entre las poblaciones TM entre 12+18 y controles.

Continuando con una caracterización más profunda de las células de interés, analizamos la expresión de Eomes y CD122, marcadores importantes para la adquisición del fenotipo innato<sup>(117, 159, 160)</sup>. Los niveles de expresión de Eomes no mostraron diferencias significativas entre las poblaciones VM o TM de ambos grupos experimentales (Figura 17 B), mientras que sólo observamos un incremento significativo de la población Eomes<sup>+</sup> en el compartimento TM en respuesta a IL-12 e IL-18 comparado a controles (Figura 17 C).



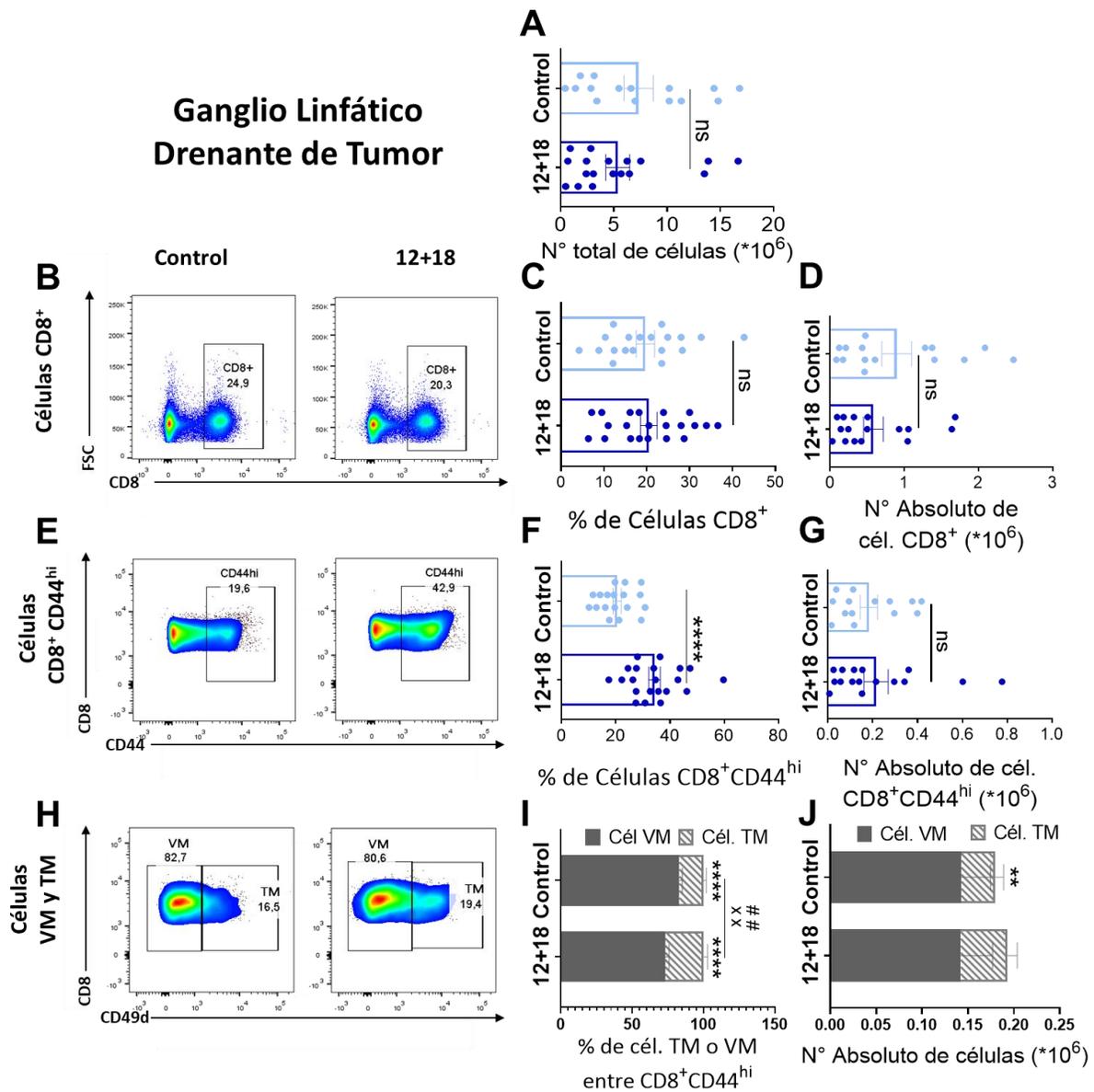
**Figura 17:** Efecto de la expresión sistémica de IL-12 e IL-18 sobre las células VM y TM en bazo. Animales C57BL/6 WT portadores de tumores B16 fueron hidrodinámicamente inyectados con la cantidad correspondiente de plásmidos para IL-12 e IL-18 o control. Los bazos de ambos grupos de animales fueron obtenidos al día 7 post-IH y procesados para su análisis por citometría de flujo. Las figuras (A) y (D) muestran histogramas representando la expresión de Eomes y CD122, respectivamente, en las células VM y TM de animales controles (celeste) o 12+18 (azul), comparada con sus respectivos controles de isotipo (gris). Las figuras (B) y (E) muestran la intensidad de fluorescencia media (IFM) de Eomes y CD122 respectivamente, en las células VM o TM para cada grupo de animales. La IFM está representada como la diferencia de la media geométrica del marcador de interés respecto a la de su control de isotipo, para cada animal. En (C) y (F) se pueden observar los números absolutos de células VM o TM Eomes<sup>+</sup> o CD122<sup>+</sup>, respectivamente, para cada grupo de animales. El análisis

*estadístico fue realizado utilizando Test T, Test de Welch o Mann-Whitney según correspondiese. Valores de \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ , \*\*\*\* $p < 0.0001$  fueron considerados significativos.*

Respecto a la expresión de CD122, las células VM presentan niveles elevados de este marcador, tanto en la condición control como en respuesta a IL-12 e IL-18, mientras que la población TM presenta una baja expresión de CD122 en condiciones basales que, luego de la estimulación con las citoquinas alcanza niveles similares a los expresados por las VM (Figura 17 E). Analizando los efectos que este tratamiento podría inducir en las poblaciones de memoria CD122<sup>+</sup> observamos que, aun cuando sólo se observó una expansión significativa de la población TM total en bazo de animales 12+18 (Figura 16 F), tanto el número de células TM CD122<sup>+</sup> como VM CD122<sup>+</sup> incrementan significativamente en respuesta a IL-12 e IL-18 respecto al grupo control (Figura 17 F). Esto indicaría que aún en un contexto donde la respuesta de células T CD8<sup>+</sup> convencional es predominante, la inducción de un entorno inflamatorio de tipo Th1 logra expandir la población “inespecífica de Ag” (VM).

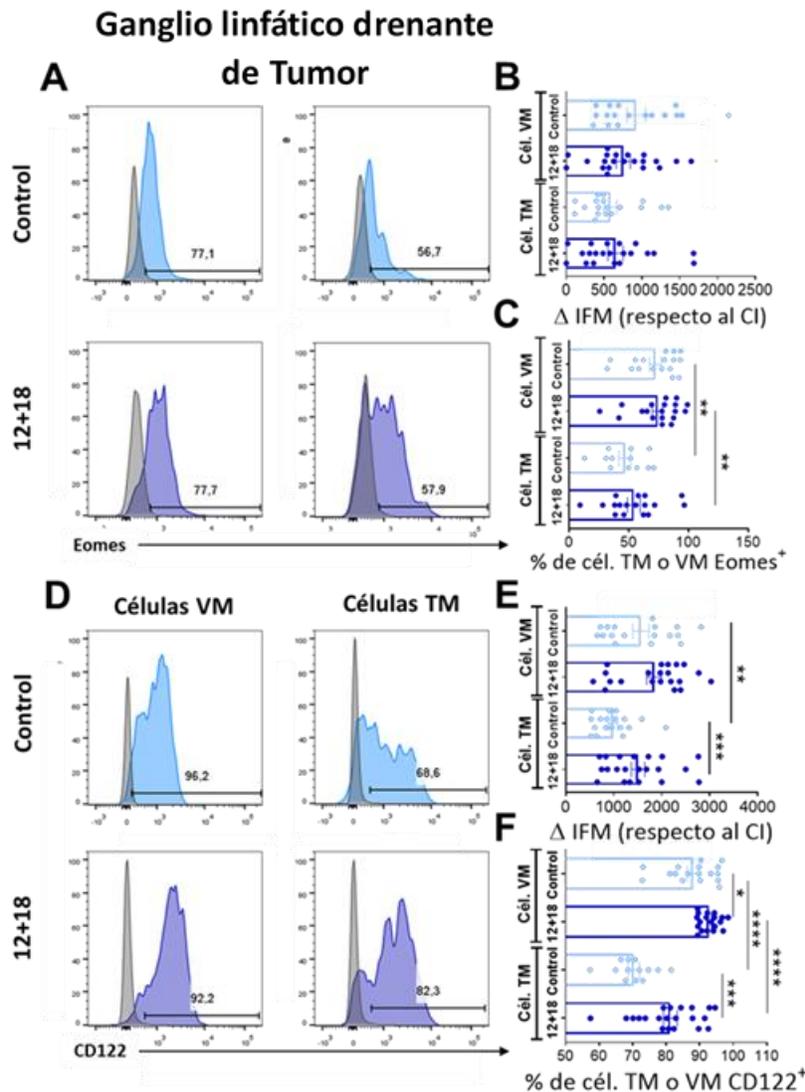
Posteriormente, quisimos evaluar si los efectos observados en las poblaciones de células de memoria en bazo en respuesta a IL-12 e IL-18 podrían ser reflejados en los GD, o si la cercanía de este tejido al sitio del tumor podría estar induciendo cambios en la composición de las poblaciones en estudio. La gran dispersión en los valores absolutos de células totales en GD para ambos grupos de animales no permitió observar diferencias significativas entre ambos grupos (Figura 18 A). Sin embargo, sí se observaron diferencias en la frecuencia de las poblaciones analizadas.

Observamos que la estimulación con IL-12 e IL-18 lograba enriquecer el porcentaje de células T CD8<sup>+</sup>CD44<sup>hi</sup> respecto al grupo control (Figura 18 F), resultado que se condice con lo observado en bazo de dichos animales (Figura 16 I). Un dato interesante para resaltar es que dentro de la población de células T CD8<sup>+</sup> de memoria en los GD de ambos grupos de animales, se observa un enriquecimiento tres veces mayor de células VM respecto a la población TM (Figuras 18 I y J).



**Figura 18:** Efecto de la expresión sistémica de IL-12 e IL-18 sobre los linfocitos T CD8<sup>+</sup> en ganglios linfáticos drenantes de tumor. Animales C57BL/6 WT portadores de tumores B16 fueron hidrodinámicamente inyectados con la cantidad correspondiente de plásmidos para IL-12 e IL-18 o control. A los 7 días post-IH se realizó la eutanasia de los animales y los GD fueron colectados y procesados para su análisis por citometría de flujo. La figura (A) muestra el recuento de células totales de GD de animales controles y 12+18. Las figuras (B, E y H) muestran Dot Plots, (C, F e I) gráficos de barras con porcentajes y (D, G y J) con números absolutos representando las poblaciones de células CD8<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup>CD44<sup>hi</sup>, y TM/VM respectivamente, para cada grupo de animales. El análisis estadístico fue realizado utilizando el test Mann-Whitney en (A, D, G, I y J) y T de Student en (C y F). Valores de \*p<0.05, \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001, \*\*\*\*p<0.0001 fueron considerados significativos. ## (p<0.01) y xx (p<0.01) representan la diferencia significativa entre las poblaciones TM (12+18 vs controles) y VM (12+18 vs controles) respectivamente.

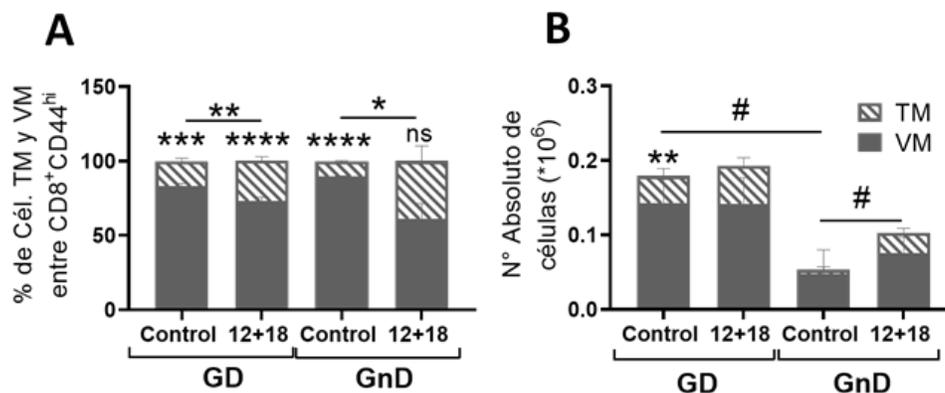
Al analizar el fenotipo de las células VM y TM observamos que si bien los patrones de expresión de Eomes (Figura 19 B) y CD122 (Figura 19 E) en este tejido son similares a los que previamente fueron encontrados en bazo, en los GD de ambos grupos experimentales casi la totalidad de las células VM expresan Eomes y CD122, mientras que dentro de la población TM solo un 50% de células expresa Eomes y un 75% CD122 (Figuras 19 C y F).



**Figura 19:** Efecto de la expresión sistémica de IL-12 e IL-18 sobre las células VM y TM en GD. Animales C57BL/6 WT portadores de tumores B16 fueron hidrodinámicamente inyectados con la cantidad correspondiente de plásmidos para IL-12 e IL-18 o control. Los ganglios drenantes de tumor (GD) de ambos grupos de animales fueron obtenidos al día 7 post-IH y procesados para su análisis por citometría de flujo. Las figuras (A) y (D) muestran histogramas representando la expresión de Eomes y CD122, respectivamente, en las células VM y TM de animales controles (celeste) o 12+18 (azul), comparada a sus controles de isotipo (gris). Las figuras (B) y (E) muestran la intensidad de fluorescencia media (IFM) de Eomes y CD122 respectivamente, en las células VM o TM para cada grupo de animales. La IFM está representada como la diferencia de la media geométrica del

marcador de interés respecto a la de su control de isotipo, para cada animal. En (C) y (F) se pueden observar los números absolutos de células VM o TM Eomes<sup>+</sup> o CD122<sup>+</sup>, respectivamente, para cada grupo de animales. El análisis estadístico fue realizado utilizando Test T, Test de Welch o Mann-Whitney según correspondiese. Valores de \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ , \*\*\*\* $p < 0.0001$  fueron considerados significativos.

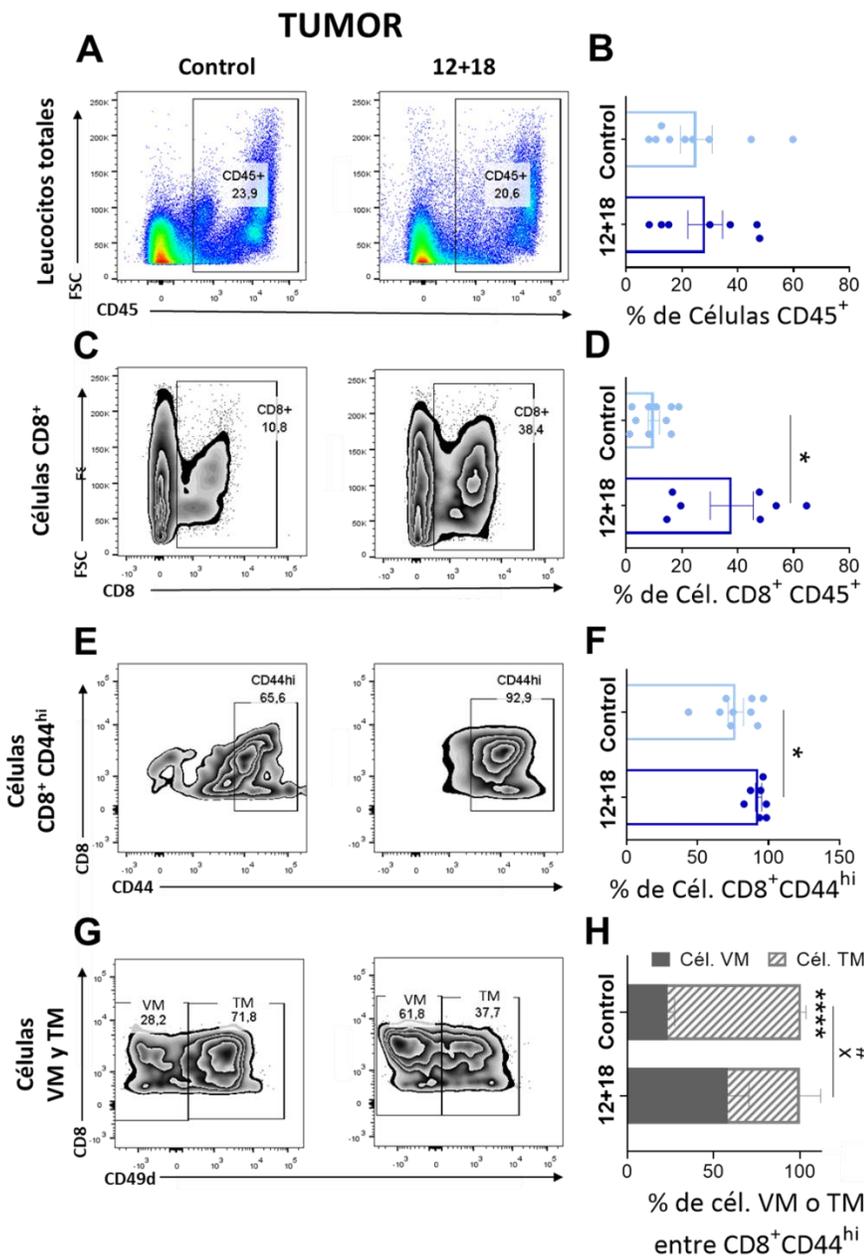
En base a estos resultados, decidimos investigar si el predominio de células VM observadas en los GD podría ser efecto de: (1) una mayor inducción de esta población en los nódulos linfáticos, (2) una presión que el MAT induce sobre el ganglio drenante o (3) podría ser el resultado de la migración preferencial de las células TM al sitio de tumor. Para ello, en primer lugar, realizamos la comparación de las poblaciones en estudio entre los ganglios inguinales drenantes (GD) y no drenantes (GnD) de tumor, observando no solo que los GD presentan una mayor celularidad que los GnD, sino que ambos tejidos presentan un enriquecimiento selectivo de la población VM respecto a TM, independiente del tratamiento con las citoquinas (Figuras 20 A y B). Esto indicaría que componentes presentes en los nódulos linfáticos estarían favoreciendo de manera preferencial e independiente de la presión que pueda ejercer el tumor, la expansión de células con fenotipo VM.



**Figura 20:** Distribución de células con fenotipo de memoria en ganglios drenantes y no drenantes de tumor. Animales C57BL/6 WT portadores de tumores B16 fueron hidrodinámicamente inyectados con la cantidad correspondiente de plásmidos para IL-12 e IL-18 o control. A los 7 días post-IH se realizó la eutanasia de los animales y los GD y GnD fueron colectados y procesados para su análisis por citometría de flujo. La figura (A) muestra gráficos de barras con porcentajes y (B) con números absolutos representando las poblaciones de células TM y VM entre las células T CD8<sup>+</sup> CD44<sup>hi</sup>, para cada grupo de animales. El análisis estadístico fue realizado utilizando Test T, Test de Welch o Mann-Whitney según correspondiese. Valores de \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ , \*\*\*\* $p < 0.0001$  fueron considerados significativos. # ( $p < 0.05$ ) representa la diferencia significativa entre las poblaciones TM de los grupos indicados.

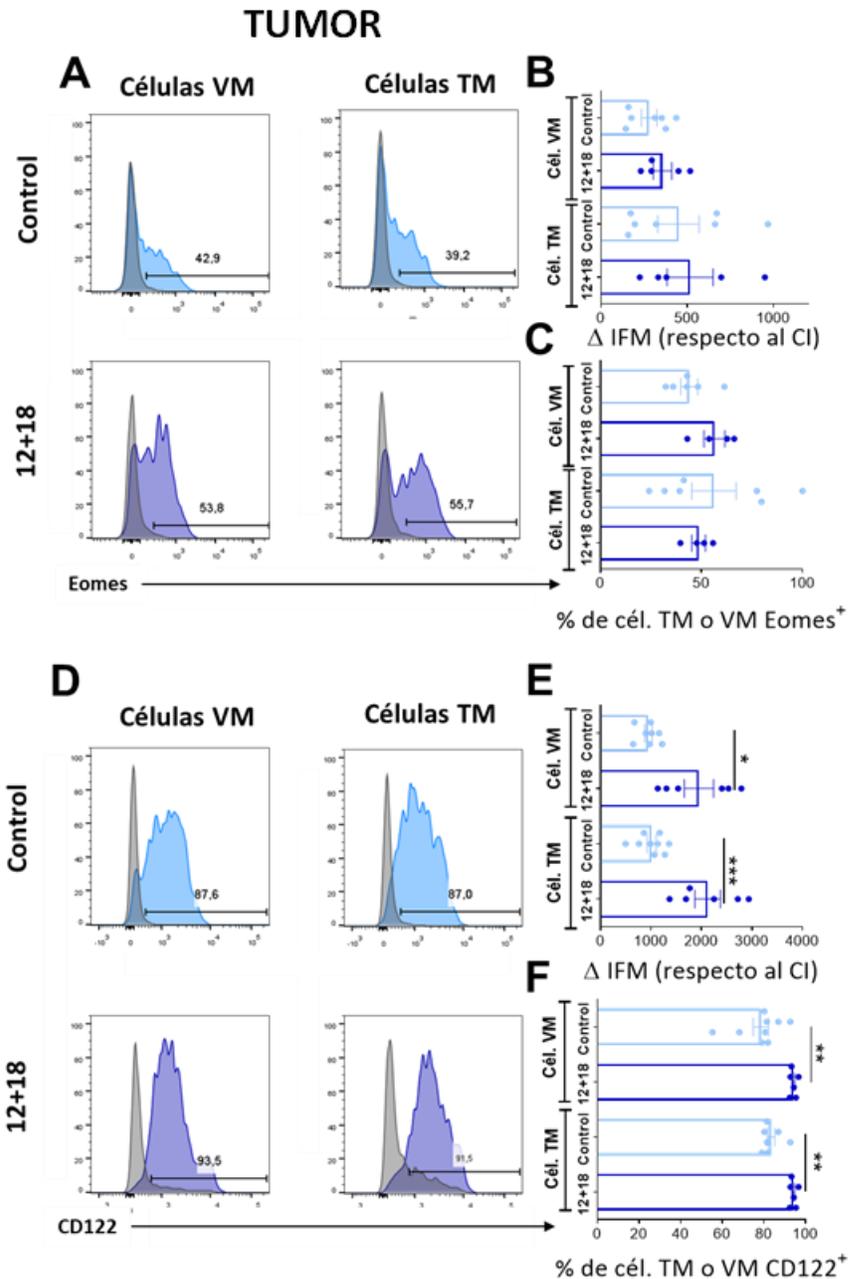
Posteriormente, evaluamos la distribución de las células con fenotipo de memoria dentro del tejido neoplásico observando que aun cuando los porcentajes de células CD45<sup>+</sup> infiltrantes de tumor son similares entre ambos grupos experimentales (Figura 21 B), los tumores de animales 12+18 presentan un enriquecimiento de la población T CD8<sup>+</sup> total, con

un mayor porcentaje de células con fenotipo de memoria ( $CD44^{hi}$ ) comparado al grupo control (Figuras 21 D y F). Cuando subclasificamos dichas células de memoria, encontramos que el tratamiento sistémico con IL-12 e IL-18 induce una mayor infiltración de células VM comparado a lo observado en el grupo control (Figura 21 H), indicando una mayor preponderancia de células Ag-independientes a infiltrar tumores en situaciones de inflamación sistémicas Th1 respecto a lo que sucede en animales controles sin ningún tratamiento. Estos resultados, aportan mayor evidencia de que el enriquecimiento en células VM en los GD no es resultado de una mayor migración de células TM al tumor, sino que es efecto del tejido linfático *per se*.



**Figura 21:** *Efecto de la expresión sistémica de IL-12 e IL-18 sobre el infiltrado de linfocitos T CD8<sup>+</sup> en tumor. Animales C57BL/6 WT portadores de tumores B16 fueron hidrodinámicamente inyectados con la cantidad correspondiente de plásmidos para IL-12 e IL-18 o control. A los 7 días post-IH se realizó la eutanasia de los animales y los tumores fueron extraídos y procesados para su análisis por citometría de flujo. Las figuras (A, C, E y G) muestran Dot Plots y (B, D, F y H) gráficos de barras representando las frecuencias de células CD45<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup>CD44<sup>hi</sup>, y TM/VM respectivamente, para cada grupo de animales. El análisis estadístico fue realizado utilizando el test T de Student en (B, D y F) y el Test T o Welch según correspondiese en (H). Valores de \*p<0.05, \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001, \*\*\*\*p<0.0001 fueron considerados significativos.*

Profundizando en la caracterización de células T CD8<sup>+</sup> con fenotipo de memoria en tumor, no observamos cambios en la expresión o frecuencias de células TM y VM Eomes<sup>+</sup> entre ambos grupos experimentales (Figuras 22 B y C). Sorpresivamente, y a diferencia de lo observado en los OLS analizados, las células VM infiltrantes de tumor en condiciones basales (controles) mostraron una baja expresión de CD122, expresión que aumenta significativamente tanto en VM como en TM luego del tratamiento sistémico con IL-12 e IL-18 (Figura 22 E y F).



**Figura 22:** Efecto de la expresión sistémica de IL-12 e IL-18 sobre las células VM y TM infiltrantes de tumor. Animales C57BL/6 WT portadores de tumores B16 fueron hidrodinámicamente inyectados con la cantidad correspondiente de plásmidos para IL-12 e IL-18 o control. Los tumores de ambos grupos de animales fueron obtenidos al día 7 post-IH y procesados para su análisis por citometría de flujo. Las figuras (A) y (D) muestran histogramas representando la expresión de Eomes y CD122, respectivamente, en las células VM y TM de animales controles (celeste) o 12+18 (azul), comparada a sus controles de isotipo (gris). Las figuras (B) y (E) muestran la intensidad de fluorescencia media (IFM) de Eomes y CD122 respectivamente, en las células VM o TM para cada grupo de animales. La IFM está representada como la diferencia de la media geométrica del marcador de interés respecto a la de su control de isotipo, para cada animal. En (C) y (F) se pueden observar los números absolutos de células VM o TM Eomes<sup>+</sup> o CD122<sup>+</sup>, respectivamente, para cada grupo de animales. El

*análisis estadístico fue realizado utilizando Test T, Test de Welch o Mann-Whitney según correspondiese. Valores de  $*p<0.05$ ,  $**p<0.01$ ,  $***p<0.001$ ,  $****p<0.0001$  fueron considerados significativos.*

## CONCLUSIONES CAPÍTULO II

En este segundo capítulo de resultados se utiliza el modelo murino experimental de inyección hidrodinámica de ADNc codificante para las citoquinas IL-12 e IL-18 en animales portadores de tumores, administrando dosis de 1 $\mu$ g del plásmido de IL-12, de modo de generar un ambiente inflamatorio sistémico con niveles elevados pero tolerables de la citoquina, libre de patógenos, sin afectar la supervivencia de los animales. Bajo estas condiciones hemos podido determinar:

- ✓ Un efectivo control del crecimiento del tumor luego de la estimulación sistémica con las citoquinas, comparable a la observada en modelos de IH utilizando solo ADNc para IL-12 (descrito en el *Capítulo I*), o modelos de co-administración de plásmidos para IL-12 e IL-18 utilizando dosis mayores de IL-12 (5 $\mu$ g).
- ✓ El tratamiento con las citoquinas induce en bazo un aumento de la población de células T CD8<sup>+</sup> de memoria convencional (TM), comparado a animales controles, y aunque la población específica de antígeno está favorecida en este contexto, también se logra expandir significativamente la población de células VM CD122<sup>+</sup> respecto al grupo control.
- ✓ En los ganglios drenantes de tumor se observan resultados similares a los presentes en bazos de animales 12+18, aunque a diferencia de los mismos, la población VM en GD se encuentra aumentada significativamente respecto a la población TM en ambos grupos experimentales, efecto reproducible a nivel de distintos nódulos linfáticos. Más aun, observamos en GD una mayor frecuencia de células VM CD122<sup>+</sup> y Eomes<sup>+</sup> respecto a su contraparte TM.
- ✓ En respuesta a IL-12 e IL-18, y a diferencia de lo observado en OLS, los tumores muestran un enriquecimiento del infiltrado de células VM totales y CD122<sup>+</sup> y un incremento en la expresión de dicho marcador, que le permitirá a las células responder más eficazmente a las citoquinas IL-2 e IL-15, importantes para la proliferación y expansión homeostática.

En su conjunto, estos datos sugieren que aun cuando en OLS la IH de IL-12 e IL-18 favorece la expansión de células T CD8<sup>+</sup> de memoria convencional (TM), dentro del tumor predomina el infiltrado de células de memoria virtual o Ag-independientes (VM), resultados que correlacionan con un satisfactorio control del crecimiento del tumor, indicativo de que estas células podrían cumplir un rol fundamental en la respuesta antitumoral.

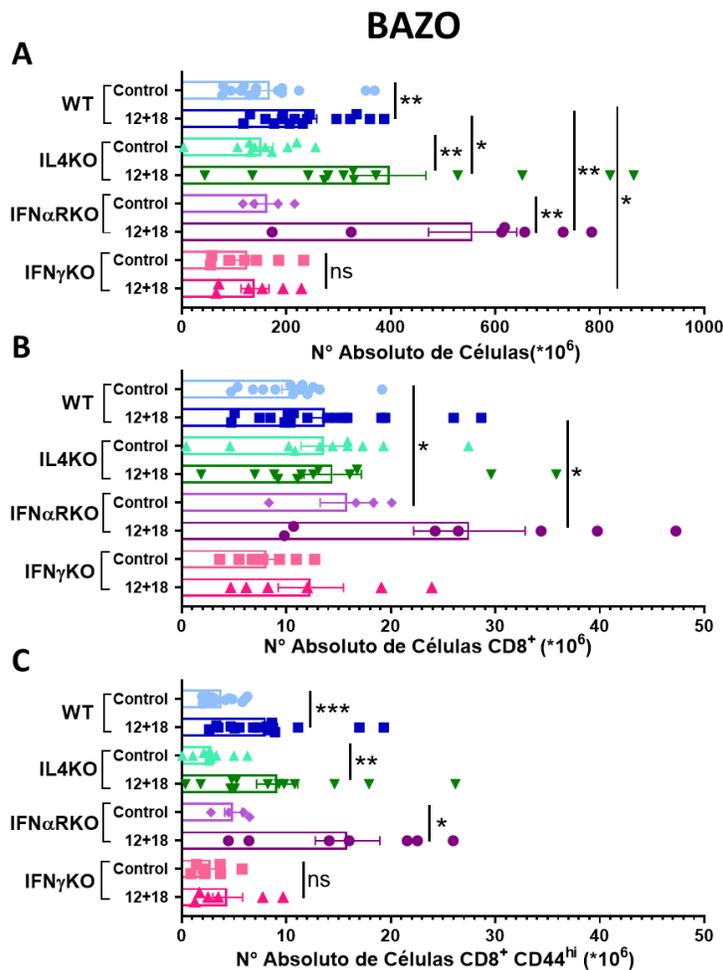
### CAPÍTULO III: ROL DE LAS CITOQUINAS IL-4, IFNs TIPO-I, E IFN $\gamma$ EN LA GENERACIÓN DE CÉLULAS T CD8<sup>+</sup> INNATAS EN PERIFERIA Y EN LA RESPUESTA ANTITUMORAL

El timo es un órgano linfático primario (OLP) en el que ocurre la selección y maduración de precursores de Linfocitos T (timocitos) a células T CD4<sup>+</sup> o CD8<sup>+</sup> principalmente. Como se describió anteriormente, el proceso de diferenciación de timocitos CD8<sup>+</sup> SP convencionales al linaje innato depende de la participación de diversas señales<sup>(113, 115, 161)</sup>. Entre ellas, el aporte de citoquinas como IL-4 e IFNs tipo-I ha sido descrito como fundamental para la adquisición del fenotipo de memoria característico de este linaje, induciendo la expresión del factor de transcripción Eomes y en consecuencia el incremento de CD122, permitiéndole a este conjunto de células responder a IL-15<sup>(108, 115, 116, 119, 162)</sup>.

Considerando el rol descrito para estas citoquinas tanto en el desarrollo de las células IM en timo como en su funcionalidad, es que decidimos evaluar el impacto de IL-4, IFNs tipo-I e IFN $\gamma$  en la generación y expansión de células VM en distintos OLS, así como su implicancia en la respuesta antitumoral.

Para desarrollar nuestro objetivo, utilizamos el modelo experimental de inyección hidrodinámica de IL-12 (1 $\mu$ g) e IL-18 en animales portadores de tumores B16 (melanoma), previamente descrito, comparando los resultados observados entre animales de la cepa salvaje (WT) y los animales transgénicos: (1) deficientes en IL-4 (IL4KO), (2) deficientes en el receptor de IFNs tipo-I (IFN $\alpha$ RKO) o (3) deficientes en IFN $\gamma$  (IFN $\gamma$ KO). Analizamos tanto la distribución y fenotipo de las células VM y TM desde un tejido periférico distal (bazo) hacia uno proximal (ganglio drenante de tumor) al sitio del tumor, como también comparamos el control del crecimiento tumoral entre las distintas cepas de animales.

En animales controles (libres de estímulo) observamos que el número de esplenocitos totales es similar entre las distintas cepas (Figura 23 A). Sin embargo, luego del tratamiento con IL-12+IL-18, se manifiesta un incremento en la celularidad en todas las cepas a excepción del grupo deficiente en IFN $\gamma$  (Figura 23 A). Los animales IFN $\alpha$ RKO e IL-4KO mostraron un número significativamente mayor de esplenocitos totales en respuesta a IL-12+IL-18 respecto al grupo WT 12+18 (Figura 23 A), sin embargo, sólo en los animales IFN $\alpha$ RKO este aumento se reflejó en un mayor número de células T CD8<sup>+</sup> (Figura 23 B). Al analizar las células que expresan el marcador de memoria CD44 dentro de las células T CD8<sup>+</sup>, observamos que la población de memoria incrementa en respuesta al tratamiento en todos los grupos salvo en los animales IFN $\gamma$ KO (Figura 23 C).

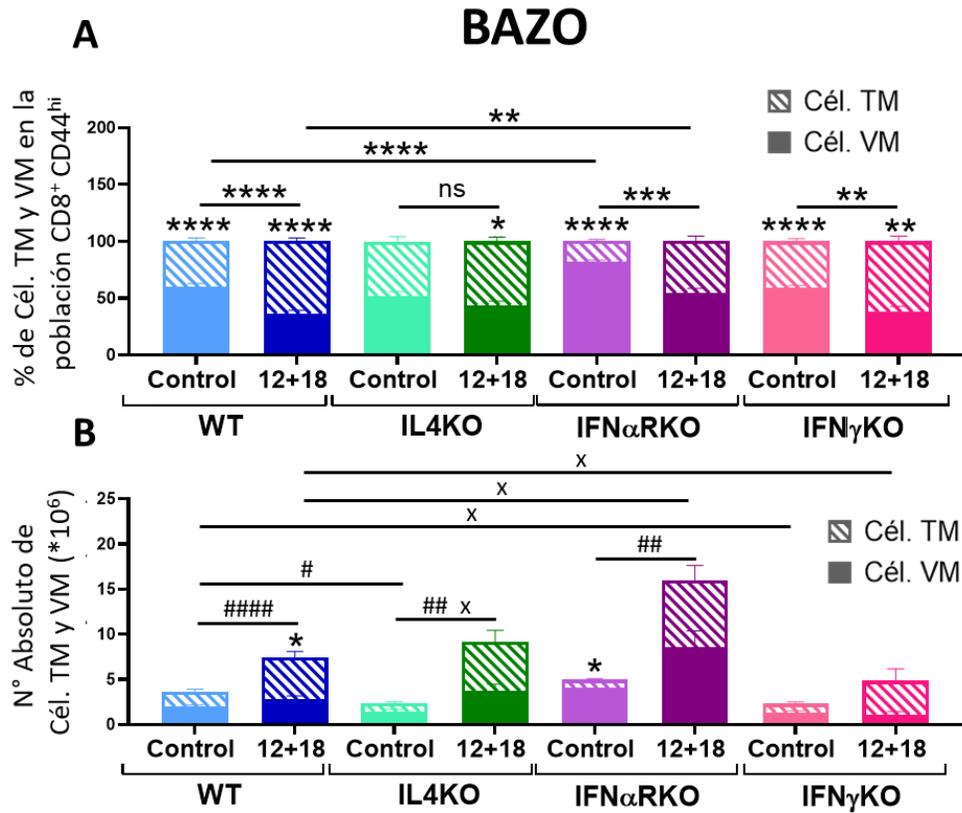


**Figura 23:** Efecto de IL-4, IFNs tipo-I e IFN $\gamma$  en la población de linfocitos T CD8<sup>+</sup> totales y de memoria (CD44<sup>hi</sup>) en bazo. Animales C57BL/6 WT, IL4KO, IFN $\alpha$ RKO e IFN $\gamma$ KO portadores de tumores B16 fueron hidrodinámicamente inyectados con la cantidad correspondiente de plásmidos para IL-12 e IL-18 o control. A los 7 días post-IH se realizó la eutanasia de los animales y los bazos fueron colectados y procesados para su análisis por citometría de flujo. Las figuras muestran gráficos de barras representando las poblaciones de células (A) totales, (B) T CD8<sup>+</sup>, (C) T CD8<sup>+</sup>CD44<sup>hi</sup> respectivamente, para cada grupo de animales. El análisis estadístico fue realizado utilizando el test T de Student, Test de Welch o Mann-Whitney según correspondiese. Valores de \* $p$ <0.05, \*\* $p$ <0.01, \*\*\* $p$ <0.001, \*\*\*\* $p$ <0.0001 fueron considerados significativos.

Profundizando en la caracterización de las células T CD8<sup>+</sup> de memoria, observamos que la proporción relativa y los números absolutos de células VM y TM en animales sin tratamiento son semejantes entre las diferentes cepas, a excepción de los animales deficientes en la señalización de IFNs tipo-I (IFN $\alpha$ RKO), los cuales mostraron un enriquecimiento selectivo de la población VM (Figura 24 A y B).

Luego de la expresión sistémica de IL-12+IL-18, se observa principalmente y en todos los casos, una expansión de la población de memoria específica de antígeno (TM) que se refleja tanto en un incremento en porcentaje como en números absolutos (Figura 24 A y B respectivamente), mientras que la población VM no manifiesta mayores cambios en los animales WT, pero si aumentan en los del grupo IL4KO e IFN $\alpha$ RKO (Figura 24 B). Un hallazgo sorprendente fue observado en la población IFN $\gamma$ KO, que presentó números absolutos significativamente menores de células VM respecto a los animales WT (Figura 24 B) tanto en condiciones basales como luego de la estimulación con las citoquinas, lo que podría por primera vez demostrar que IFN $\gamma$  no sólo estaría involucrada en respuesta funcional de las

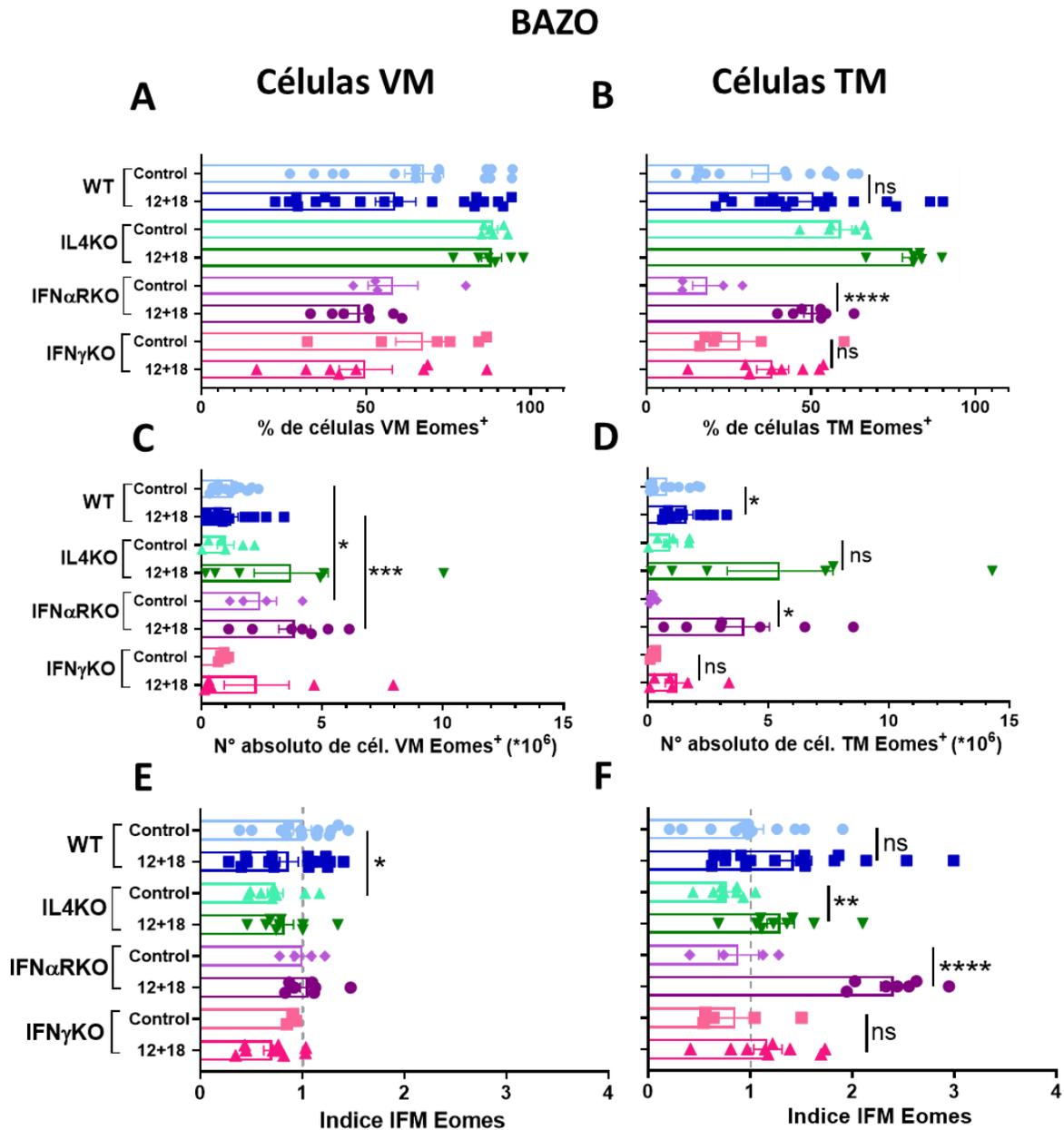
células T CD8<sup>+</sup> innatas, sino que podría cumplir un rol fundamental en la inducción de la población VM en periferia.



**Figura 24:** Efecto de IL-4, IFNs tipo-I e IFN $\gamma$  en la población de células VM y TM en bazo. Animales C57BL/6 WT, IL4KO, IFN $\alpha$ RKO e IFN $\gamma$ KO portadores de tumores B16 fueron hidrodinámicamente inyectados con la cantidad correspondiente de plásmidos para IL-12 e IL-18 o control. A los 7 días post-IH se realizó la eutanasia de los animales y los bazos fueron colectados y procesados para su análisis por citometría de flujo. Las figuras muestran gráficos de barras representando (A) los porcentajes y (B) los valores absolutos de las poblaciones de células VM y TM dentro del compartimento de células T CD8<sup>+</sup> de memoria (CD44<sup>hi</sup>). El análisis estadístico fue realizado utilizando el test T de Student, Test de Welch o Mann-Whitney según correspondiese. Valores de \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ , \*\*\*\* $p < 0.0001$  fueron considerados significativos. #  $p < 0.05$ , ##  $p < 0.01$ , ####  $p < 0.0001$ , representa la diferencia significativa entre las poblaciones TM señaladas, mientras que x  $p < 0.05$  representa la diferencia significativa entre las poblaciones VM indicadas.

A continuación, analizamos de qué manera podrían estar influyendo las distintas citoquinas en estudio en la adquisición del factor de transcripción (FT) Eomes en ambas poblaciones de células T CD8<sup>+</sup> de memoria. Observamos que, independientemente de la cepa, los animales estimulados con IL-12 e IL-18 presentan una tendencia, aunque no significativa, de las células TM a incrementar la expresión de dicho FT y a enriquecer la población TM Eomes<sup>+</sup>, reflejada en una tendencia a aumentar en números absolutos (Figuras 25 F, B y D respectivamente). Estos resultados no fueron observados en la población VM, sugiriendo que el tratamiento con IL-12 e IL-18 no tendría participación alguna en la adquisición de Eomes por parte de este subtipo celular (Figuras 25 A, C y E).

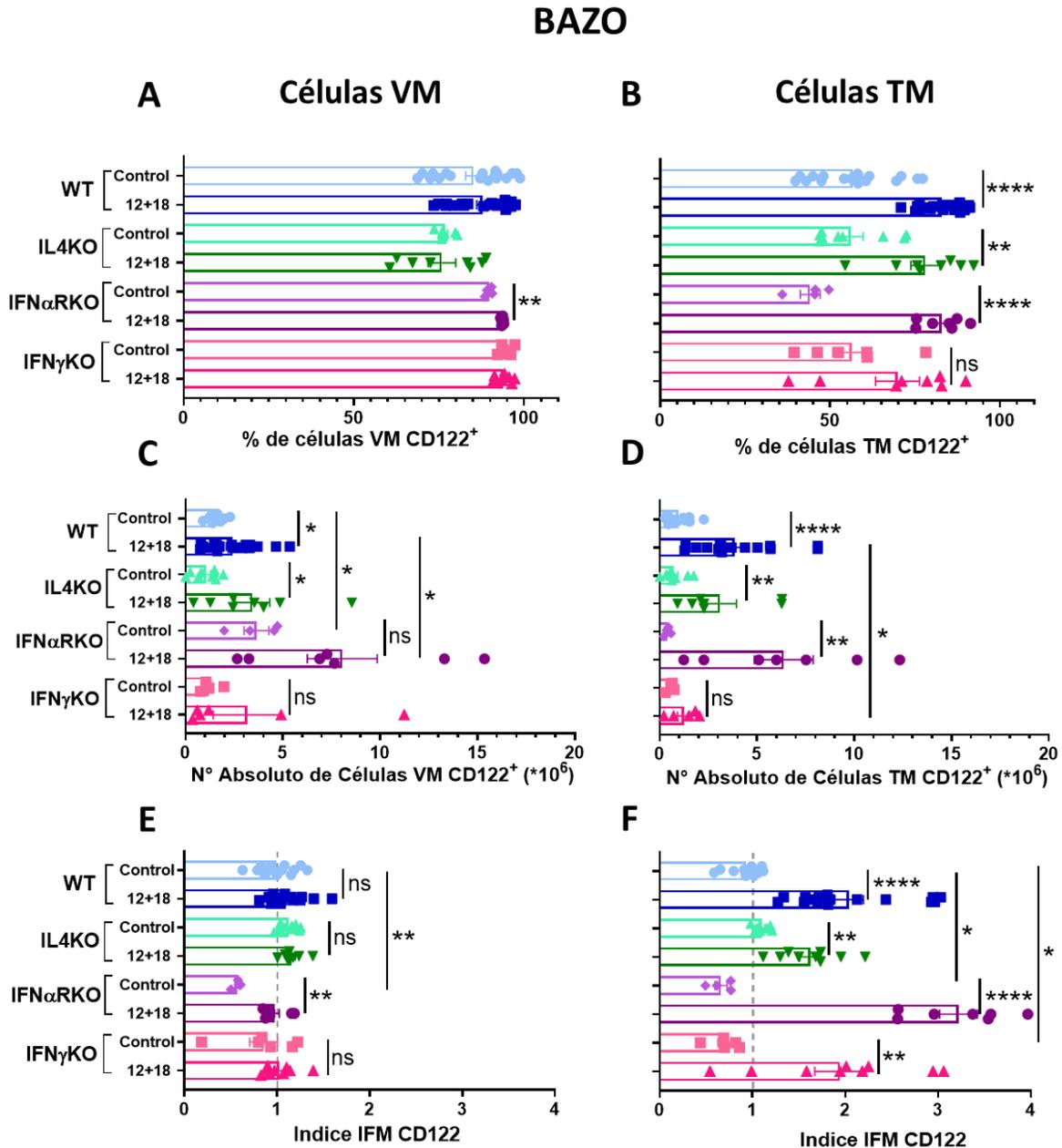
En ausencia de IL-4 se observó una menor intensidad de expresión de Eomes en la población VM en condiciones libres de tratamiento respecto a lo observado en animales WT (Figura 25 E), resaltando la importancia previamente reportada de esta citoquina en la inducción de este FT<sup>(163)</sup>.



**Figura 25:** Efecto de IL-4, IFNs tipo-I e IFN $\gamma$  en la expresión de Eomes en las células VM y TM en bazo. Animales C57BL/6 WT, IL4KO, IFN $\alpha$ RKO e IFN $\gamma$ KO portadores de tumores B16 fueron hidrodinámicamente inyectados con

la cantidad correspondiente de plásmidos para IL-12 e IL-18 o control. A los 7 días post-IH se realizó la eutanasia de los animales y los bazo fueron colectados y procesados para su análisis por citometría de flujo. Las figuras muestran gráficos de barras representando (A y B) los porcentajes, (C y D) los valores absolutos y (E y F) el índice de Eomes de las poblaciones de células Eomes<sup>+</sup> VM y TM respectivamente. El índice de Eomes fue utilizado para independizarnos de las diferencias observadas en las repeticiones de cada experimento. El mismo fue obtenido calculando (1) la diferencia de la media geométrica ( $\Delta$  de IFM) de Eomes respecto a la de su control de isotipo para cada animal, y posteriormente (2) la relación de la  $\Delta$  de IFM de cada individuo, perteneciente a cada grupo experimental, respecto al promedio de la  $\Delta$  de IFM de animales WT Controles intraexperimento. El análisis estadístico fue realizado utilizando el test T de Student, Test de Welch o Mann-Whitney según correspondiese. Valores de \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ , \*\*\*\* $p < 0.0001$  fueron considerados significativos.

Al analizar la expresión de la cadena  $\beta$  del receptor de IL-15 e IL-2 (CD122), observamos que en animales deficientes en la señalización de IFNs tipo-I (IFN $\alpha$ RKO), las células VM presentaron defectos en la expresión de CD122 comparado a animales WT controles (Figura 26 E). Este efecto no fue reflejado en animales IFN $\alpha$ RKO 12+18 (Figura 26 E), resultado que sugiere que, si bien esta citoquina sería importante para la adquisición de CD122, un contexto inflamatorio tipo Th1 logra compensar la falta de los IFNs tipo I en la inducción de este marcador. Más aun, las células TM de animales IFN $\gamma$ KO o IFN $\alpha$ RKO en condiciones normales presentaron también defectos en la expresión de CD122, los cuales fueron compensados en respuesta a IL-12+IL-18 (Figura 26 F). En el grupo IFN $\gamma$ KO 12+18, la estimulación innata con las citoquinas no logra expandir las poblaciones VM y TM CD122<sup>+</sup> comparado a lo observado en animales WT (Figuras 26 C y D). Por otro lado, en animales deficientes en IFN $\gamma$ , si bien mostraron un menor número de células VM totales respecto a los animales WT (Figura 24 B), casi la totalidad de las células VM expresan CD122 (Figura 26 A), lo que podría indicar que, pese a estar en menor número, podrían eficazmente responder a IL-15, citoquina clave en el mantenimiento homeostático de dicha población.

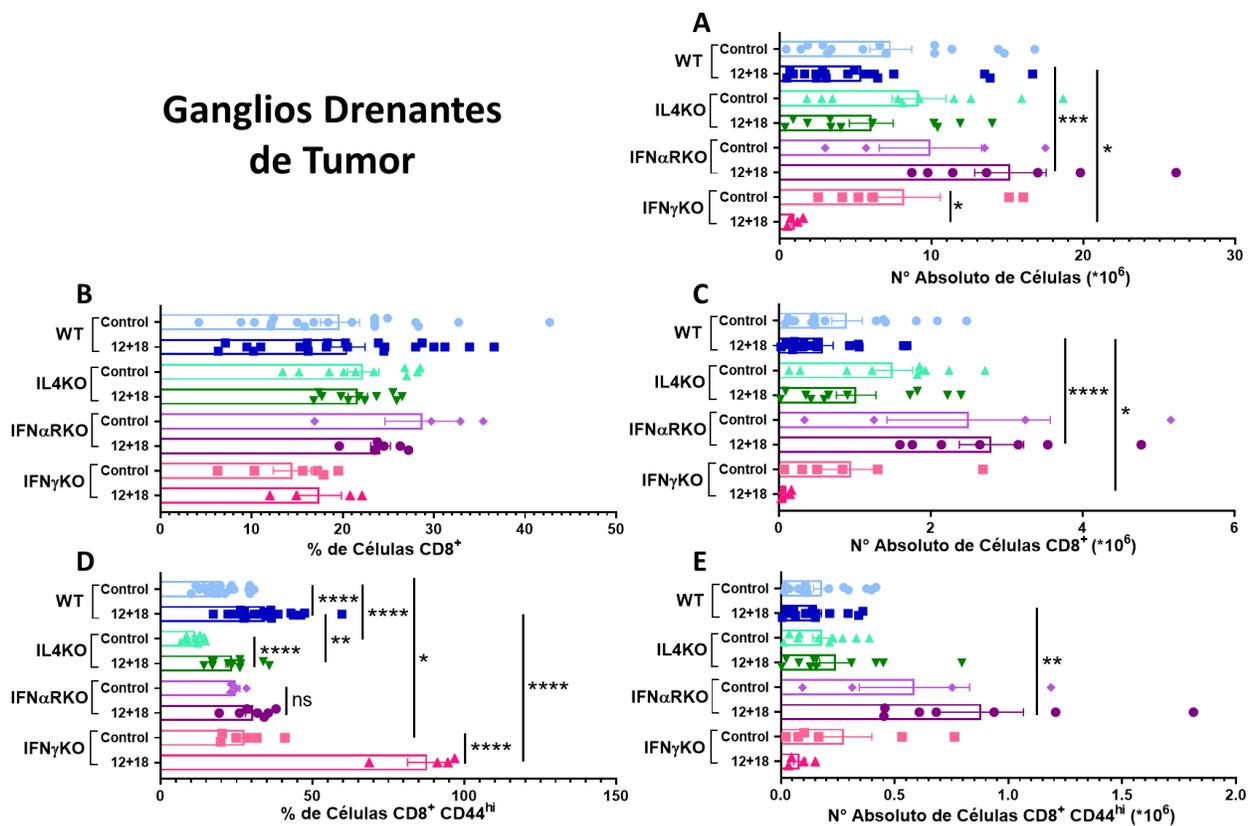


**Figura 26:** Efecto de IL-4, IFNs tipo-I e IFN $\gamma$  en la expresión de CD122 en las células VM y TM en bazo. Animales C57BL/6 WT, IL4KO, IFN $\alpha$ RKO e IFN $\gamma$ KO portadores de tumores B16 fueron hidrodinámicamente inyectados con la cantidad correspondiente de plásmidos para IL-12 e IL-18 o control. A los 7 días post-IH se realizó la eutanasia de los animales y los bazos fueron colectados y procesados para su análisis por citometría de flujo. Las figuras muestran gráficos de barras representando (A y B) los porcentajes, (C y D) los valores absolutos y (E y F) el índice de CD122 de las poblaciones de células CD122<sup>+</sup> VM y TM respectivamente. El índice de CD122 fue utilizado para independizarnos de las diferencias observadas en las repeticiones de cada experimento. El mismo fue obtenido calculando (1) la diferencia de la media geométrica ( $\Delta$  de IFM) de CD122 respecto a la de su control de isotipo para cada animal, y posteriormente (2) la relación de la  $\Delta$  de IFM de cada individuo, perteneciente a cada grupo experimental, respecto al promedio de la  $\Delta$  de IFM de animales WT Controles intraexperimento. El análisis

estadístico fue realizado utilizando el test T de Student, Test de Welch o Mann-Whitney según correspondiese. Valores de \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ , \*\*\*\* $p < 0.0001$  fueron considerados significativos.

El análisis en los GD reveló un incremento en la celularidad total en los animales IFN $\alpha$ RKO respecto a animales WT luego del tratamiento con IL-12 e IL-18 (Figura 27 A), efecto que puede explicar el incremento observado en el número de linfocitos T CD8<sup>+</sup> totales y de memoria en este grupo de animales (Figuras 7 C y E, respectivamente), aun cuando las frecuencias de estas poblaciones fueron comparables entre las cepas (Figuras 27 B y D).

Por otra parte, este tejido presentó una celularidad total significativamente disminuida en animales IFN $\gamma$ KO tratados con IL-12 e IL-18 (Figura 27 A), resultado no observado en el bazo de dichos animales (Figura 23 A). Un hallazgo llamativo fue que aun cuando los porcentajes de células T CD8<sup>+</sup> totales son similares entre los GD de los distintos grupos experimentales (Figura 27 B), animales controles deficientes en IFN $\gamma$  mostraron mayores frecuencias de células CD8<sup>+</sup>CD44<sup>hi</sup> comparado a animales WT. Esta frecuencia se hace aún más importante luego del tratamiento con IL-12 e IL-18 llegando incluso a presentar casi la totalidad de la población CD8<sup>+</sup> el fenotipo de memoria (Figura 27 D).

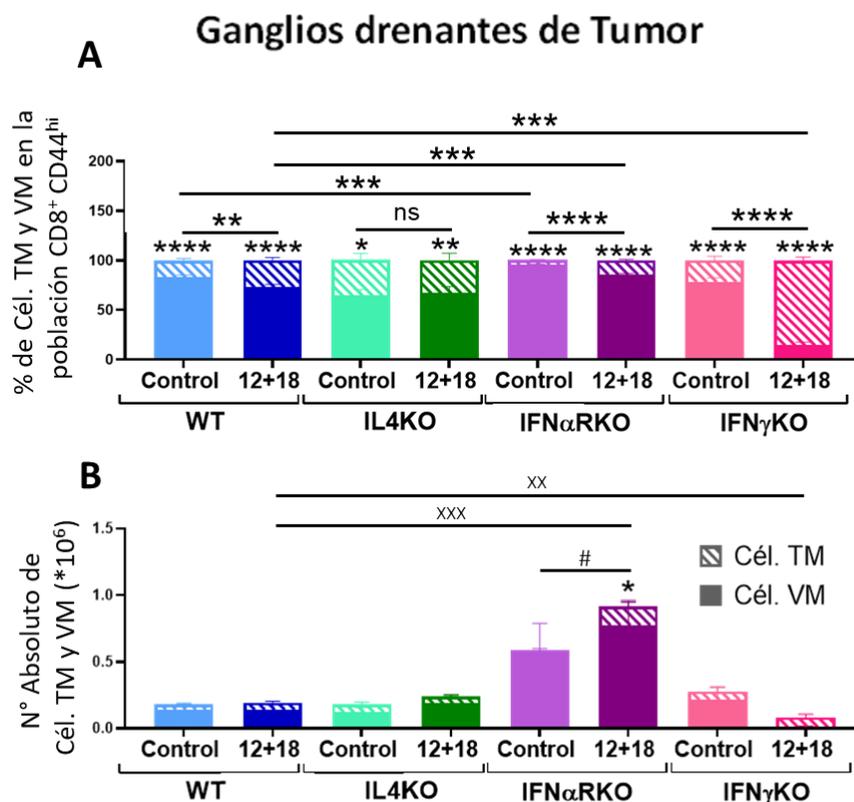


**Figura 27:** Efecto de IL-4, IFNs tipo-I e IFN $\gamma$  en la población de linfocitos T CD8<sup>+</sup> totales y de memoria (CD44<sup>hi</sup>) en ganglios drenantes de tumor. Animales C57BL/6 WT, IL4KO, IFN $\alpha$ RKO e IFN $\gamma$ KO portadores de tumores B16 fueron hidrodinámicamente inyectados con la cantidad correspondiente de plásmidos para IL-12 e IL-18 o control. A los 7 días post-IH se realizó la eutanasia de los animales y los ganglios que drenaban los tumores

fueron colectados y procesados para su análisis por citometría de flujo. Las figuras muestran gráficos de barras representando las poblaciones de células (A) totales, (B) CD8<sup>+</sup>, (C) CD8<sup>+</sup>CD44<sup>hi</sup> respectivamente, para cada grupo de animales. El análisis estadístico fue realizado utilizando el test T de Student, Test de Welch o Mann-Whitney según correspondiese. Valores de \*p<0.05, \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001, \*\*\*\*p<0.0001 fueron considerados significativos.

Respecto a la caracterización de la población T CD8<sup>+</sup> de memoria, los GD presentaron en todos los casos un enriquecimiento preferencial de células VM respecto a TM, siendo esta diferencia altamente significativa en animales IFN $\alpha$ RKO comparado a WT (Figura 28 A). En respuesta a IL-12+IL-18, en todos los casos se observa un enriquecimiento de la población TM (Figura 28 A), a excepción de los animales deficientes en IL-4 que presentan frecuencias similares entre la condición control y 12+18 (Figura 28 A).

Cabe destacar que solamente en los GD de los animales IFN $\gamma$ KO, en respuesta a IL-12 e IL-18, prevalece la población TM respecto a la VM (Figura 28 A), siendo esta última prácticamente indetectable en este tejido (Figura 28 B), remarcando la importancia que IFN $\gamma$  podría suponer en la inducción de células VM en periferia.

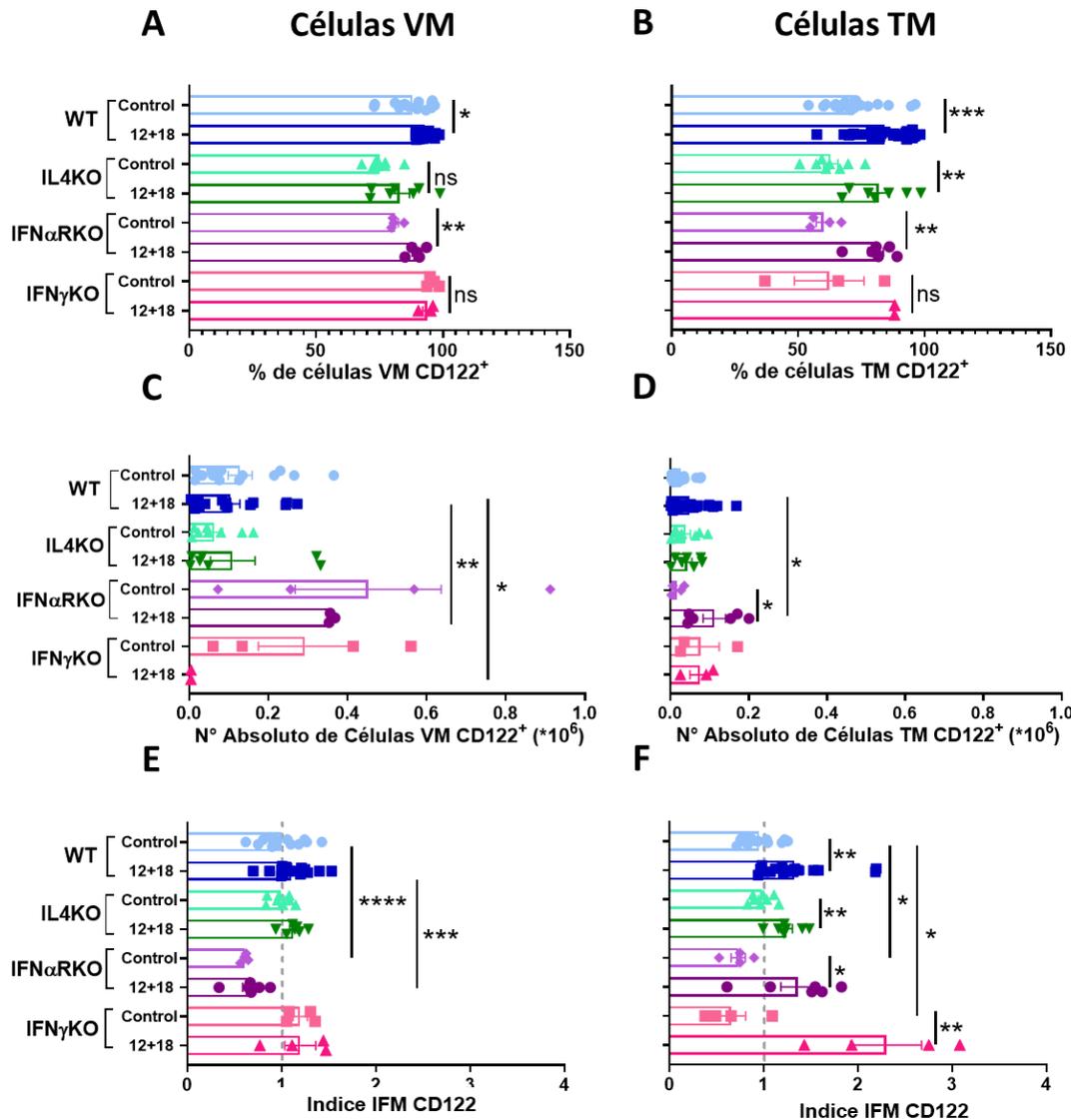


**Figura 28:** Efecto de IL-4, IFNs tipo-I e IFN $\gamma$  en la población de células VM y TM en ganglios drenantes de tumor. Animales C57BL/6 WT, IL4KO, IFN $\alpha$ RKO e IFN $\gamma$ KO portadores de tumores B16 fueron hidrodinámicamente inyectados con la cantidad correspondiente de plásmidos para IL-12 e IL-18 o control. A los 7 días post-IH se realizó la eutanasia de los animales y los ganglios que drenaban los tumores fueron colectados y procesados

para su análisis por citometría de flujo. Las figuras muestran gráficos de barras representando (A) los porcentajes y (B) los valores absolutos de las poblaciones de células VM y TM dentro del compartimento de células T CD8<sup>+</sup> de memoria (CD44<sup>hi</sup>). El análisis estadístico fue realizado utilizando el test T de Student, Test de Welch o Mann-Whitney según correspondiese. Valores de \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ , \*\*\*\* $p < 0.0001$  fueron considerados significativos. #  $p < 0.05$ , representa la diferencia significativa entre las poblaciones TM señaladas, mientras que xx  $p < 0.01$ , xxx  $p < 0.001$  representan la diferencia significativa entre las poblaciones VM indicadas.

Continuando con el análisis del aporte de las citoquinas en estudio en la adquisición del fenotipo innato, observamos que los animales IFN $\alpha$ RKO presentan una expresión de CD122 baja en la población VM en condiciones controles, pero a diferencia de lo observado en bazo de los mismos animales, no logra ser restablecida en respuesta al estímulo con IL-12 e IL-18 (Figura 29 E). Las células TM de animales IFN $\alpha$ RKO e IFN $\gamma$ KO controles también presentaron niveles de expresión de CD122 significativamente más bajos que los observados en animales WT, los cuales logran restablecerse en respuesta al tratamiento (Figura 29 F).

### Ganglios drenantes de Tumor

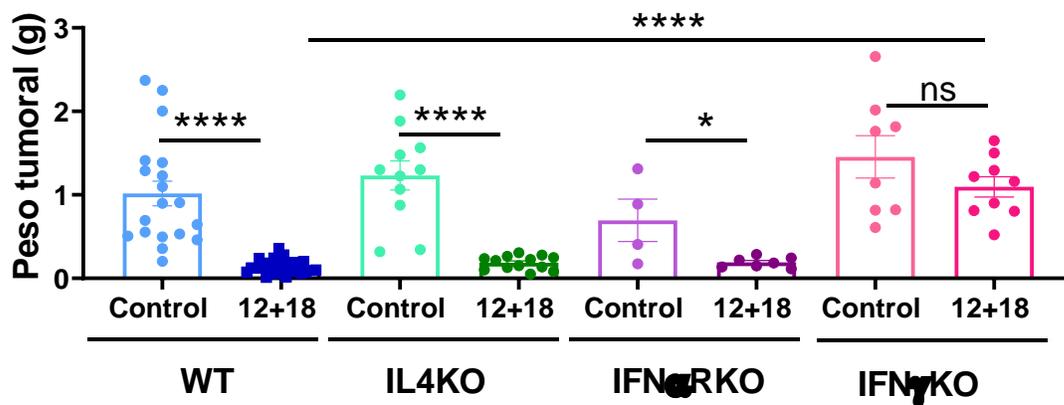


**Figura 29:** Efecto de IL-4, IFNs tipo-I e IFN $\gamma$  en la expresión de CD122 en las células VM y TM en ganglios drenantes de tumor. Animales C57BL/6 WT, IL4KO, IFN $\alpha$ RKO e IFN $\gamma$ KO portadores de tumores B16 fueron hidrodinámicamente inyectados con la cantidad correspondiente de plásmidos para IL-12 e IL-18 o control. A los 7 días post-IH se realizó la eutanasia de los animales y los ganglios inguinales que drenaban los tumores fueron colectados y procesados para su análisis por citometría de flujo. Las figuras muestran gráficos de barras representando (A y B) los porcentajes, (C y D) los valores absolutos y (E y F) el índice de CD122 de las poblaciones de células CD122<sup>+</sup> VM y TM respectivamente. El índice de CD122 fue utilizado para independizarnos de las diferencias observadas en las repeticiones de cada experimento. El mismo fue obtenido calculando (1) la diferencia de la media geométrica ( $\Delta$  de IFM) de CD122 respecto a la de su control de isotipo para cada animal, y posteriormente (2) la relación de la  $\Delta$  de IFM de cada individuo, perteneciente a cada grupo experimental, respecto al promedio de la  $\Delta$  de IFM de animales WT Controles intraexperimento. El análisis estadístico fue realizado utilizando el test T de Student, Test de Welch o Mann-Whitney según correspondiese. Valores de \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ , \*\*\*\* $p < 0.0001$  fueron considerados significativos.



**Figura 30:** Efecto de IL-4, IFNs tipo-I e IFN $\gamma$  en la expresión de Eomes en las células VM y TM en ganglios drenantes de tumor. Animales C57BL/6 WT, IL4KO, IFN $\alpha$ RKO e IFN $\gamma$ KO portadores de tumores B16 fueron hidrodinámicamente inyectados con la cantidad correspondiente de plásmidos para IL-12 e IL-18 o control. A los 7 días post-IH se realizó la eutanasia de los animales y los ganglios inguinales que drenaban los tumores fueron colectados y procesados para su análisis por citometría de flujo. Las figuras muestran gráficos de barras representando (A y B) los porcentajes, (C y D) los valores absolutos y (E y F) el índice de Eomes de las poblaciones de células Eomes<sup>+</sup> VM y TM respectivamente. El índice de Eomes fue utilizado para independizarnos de las diferencias observadas en las repeticiones de cada experimento. El mismo fue obtenido calculando (1) la diferencia de la media geométrica ( $\Delta$  de IFM) de Eomes respecto a la de su control de isotipo para cada animal, y posteriormente (2) la relación de la  $\Delta$  de IFM de cada individuo, perteneciente a cada grupo experimental, respecto al promedio de la  $\Delta$  de IFM de animales WT Controles intraexperimento. El análisis estadístico fue realizado utilizando el test T de Student, Test de Welch o Mann-Whitney según correspondiese. Valores de \* $p$ <0.05, \*\* $p$ <0.01, \*\*\* $p$ <0.001, \*\*\*\* $p$ <0.0001 fueron considerados significativos.

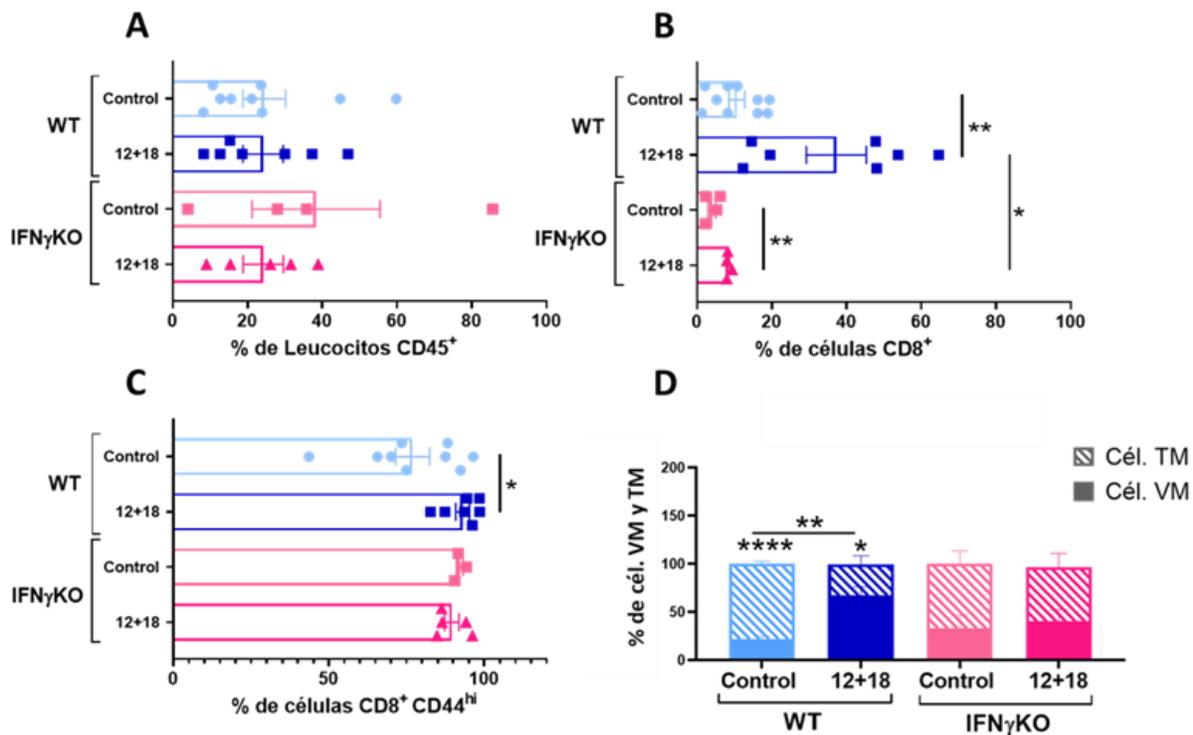
Teniendo en cuenta los cambios en número, frecuencia y distribución de células VM y TM en las distintas cepas de animales “knock out” (KO), decidimos evaluar si dichas alteraciones tenían un impacto en el control del crecimiento tumoral observado luego del tratamiento con IL-12 e IL-18 en animales WT (Figura 15). Nuestros resultados demuestran que, a pesar de las diferencias observadas en las distintas cepas, solo en ausencia de IFN $\gamma$  el tratamiento con IL-12 e IL-18 no logró controlar satisfactoriamente el crecimiento del tumor respecto a su contraparte control y al grupo WT 12+18 (Figura 31). En función de estos datos, decidimos enfocarnos en la evaluación de la composición del compartimento de células T CD8<sup>+</sup> de memoria infiltrantes de tumor entre animales WT e IFN $\gamma$ KO.



**Figura 31:** Efecto de IL-4, IFNs tipo-I e IFN $\gamma$  en la respuesta antitumoral. Animales C57BL/6 WT, IL4KO, IFN $\alpha$ RKO e IFN $\gamma$ KO portadores de tumores B16 fueron inyectados hidrodinámicamente con los plásmidos de expresión para IL-12(1 $\mu$ g) e IL-18 o control. Los animales fueron sacrificados al día 7 post-IH y los tumores obtenidos y pesados en una balanza analítica. El análisis estadístico fue realizado utilizando el Test T de Student, Test de Welch o Test de Mann-Whitney según correspondiese. Valores de \* $p$ <0.05 y \*\*\*\* $p$ <0.0001 fueron considerados significativos.

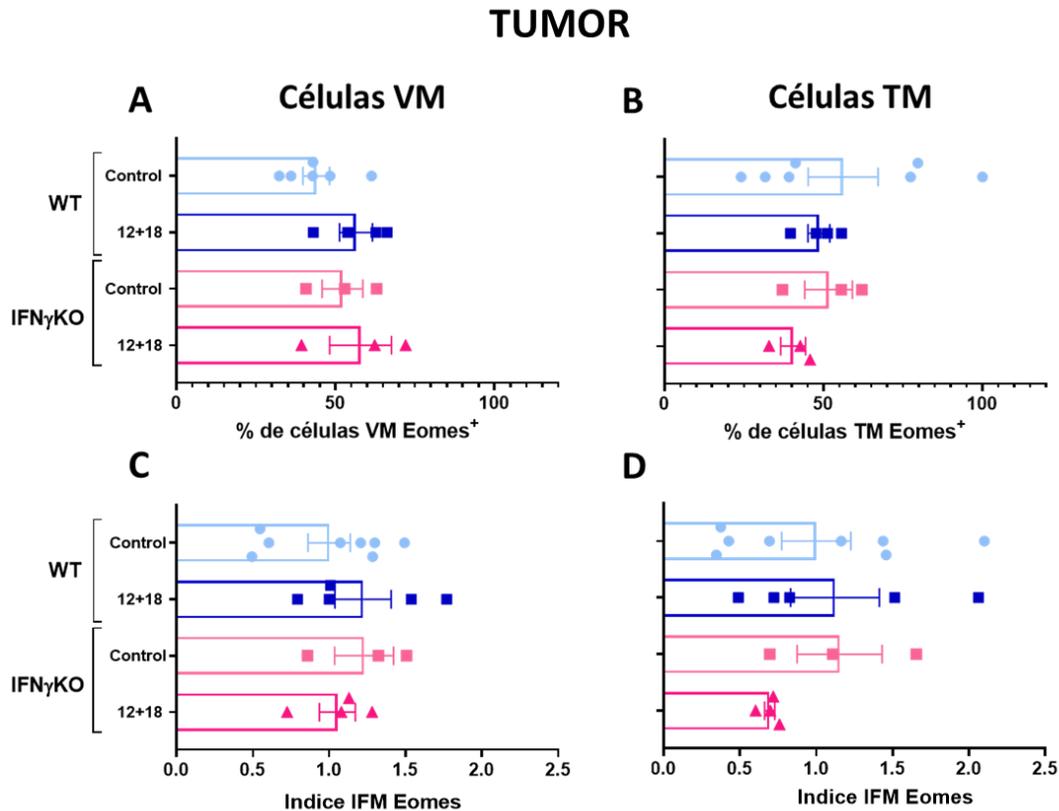
Al analizar la distribución de las células en el tejido neoplásico encontramos que aun cuando las frecuencias de leucocitos totales  $CD45^+$  son similares entre los grupos (Figura 32 A), en ausencia de  $IFN\gamma$  no se observó el incremento de linfocitos T  $CD8^+$  en respuesta a IL-12 e IL-18 observado en animales WT (Figura 32 B). Sin embargo, los animales  $IFN\gamma KO$  presentaron casi la totalidad de sus células T  $CD8^+$  con fenotipo de memoria similar a lo observado en animales WT (Figura 32 C), pero a diferencia de los mismos, al subclasificar esta población, los animales deficientes en  $IFN\gamma$  presentaron niveles inferiores de células VM, aunque no significativos, en respuesta a IL-12 e IL-18 respecto a los animales WT (Figura 32 D). Es importante destacar en este punto que el tratamiento con IL-12 e IL-18 induce un importante control en el crecimiento tumoral que se correlaciona con una mayor proporción de células VM (Ag-independientes) más que las TM (específicas de Ag) infiltrando tumores.

### TUMOR



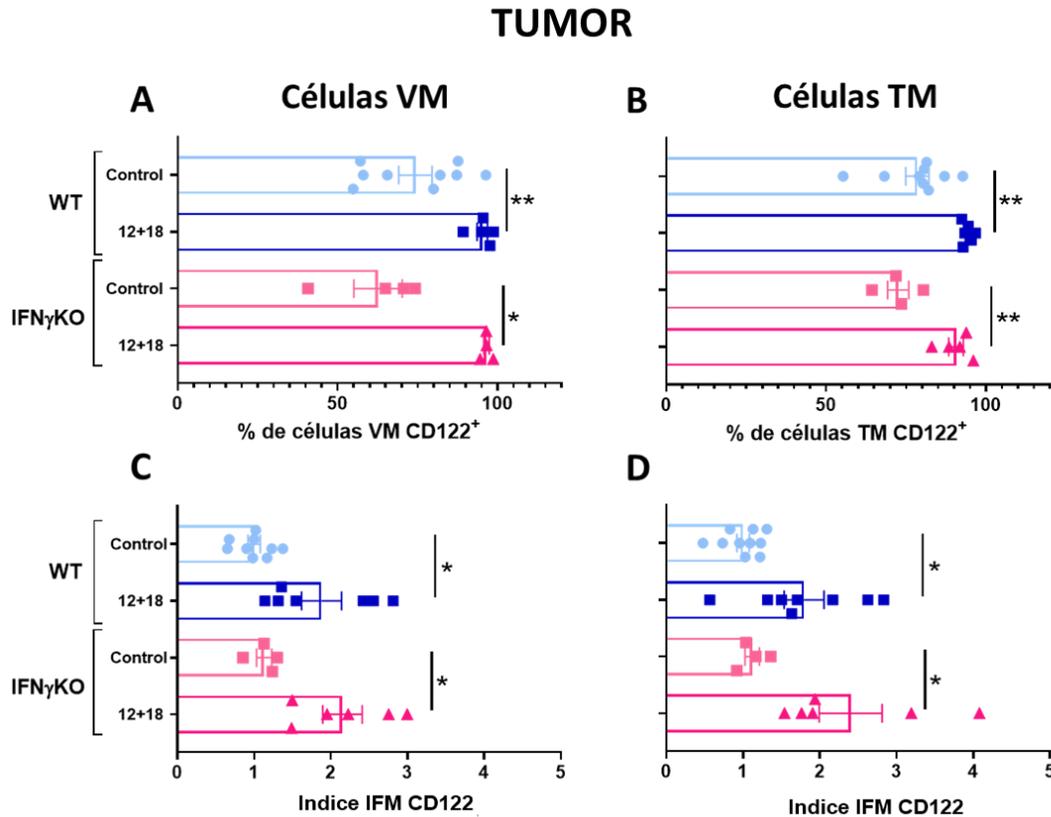
**Figura 32:** Efecto de  $IFN\gamma$  en el infiltrado leucocitario en tumores B16. Animales C57BL/6 WT o  $IFN\gamma KO$  portadores de tumores B16 fueron hidrodinámicamente inyectados con la cantidad correspondiente de plásmidos para IL-12 e IL-18 o control. A los 7 días post-IH se realizó la eutanasia de los animales y los tumores fueron extraídos y procesados para su análisis por citometría de flujo. Los gráficos de barras representan las frecuencias de células (A)  $CD45^+$ , (B)  $CD8^+$ , (C)  $CD8^+ CD44^{hi}$ , y (D) TM/VM entre el compartimento  $CD8^+ CD44^{hi}$ , respectivamente, para cada grupo de animales. El análisis estadístico fue realizado utilizando el test T de Student o Test de Welch según correspondiese. Valores de  $*p < 0.05$ ,  $**p < 0.01$ ,  $***p < 0.001$ ,  $****p < 0.0001$  fueron considerados significativos.

Profundizando en el análisis de las diferentes poblaciones de linfocitos T CD8<sup>+</sup> de memoria en estudio, no encontramos alteraciones en las frecuencias (Figuras 33 A y B) ni en la expresión de Eomes (Figuras 33 C y D) de las células VM y TM Eomes<sup>+</sup> entre los grupos experimentales, lo que podría sugerir que IFN $\gamma$  no tendría efectos sobre la expresión de este factor de transcripción en las poblaciones celulares mencionadas.



**Figura 33:** Efecto de IFN $\gamma$  en la expresión de Eomes en las células VM y TM infiltrantes de tumor. Animales C57BL/6 WT o IFN $\gamma$ KO portadores de tumores B16 fueron hidrodinámicamente inyectados con la cantidad correspondiente de plásmidos para IL-12 e IL-18 o control. A los 7 días post-IH se realizó la eutanasia de los animales y los tumores fueron extraídos y procesados para su análisis por citometría de flujo. Las figuras muestran gráficos de barras representando (A y B) los porcentajes y (C y D) el índice de Eomes de las poblaciones de células Eomes<sup>+</sup> VM y TM respectivamente. El índice de Eomes fue utilizado para independizarnos de las diferencias observadas en las repeticiones de cada experimento. El mismo fue obtenido calculando (1) la diferencia de la media geométrica ( $\Delta$  de IFM) de Eomes respecto a la de su control de isotipo para cada animal, y posteriormente (2) la relación de la  $\Delta$  de IFM de cada individuo, perteneciente a cada grupo experimental, respecto al promedio de la  $\Delta$  de IFM de animales WT Controles intraexperimento. El análisis estadístico fue realizado utilizando el test T de Student, Test de Welch o Mann-Whitney según correspondiese. Valores de \* $p$ <0.05, \*\* $p$ <0.01, \*\*\* $p$ <0.001, \*\*\*\* $p$ <0.0001 fueron considerados significativos.

Respecto al marcador CD122, las frecuencias de células VM y TM CD122<sup>+</sup> (Figuras 34 A y B) y los perfiles de expresión del mismo (Figuras 34 C y D) tampoco mostraron diferencias en ausencia de IFN $\gamma$  comparado a animales WT. Estos resultados indicarían que IFN $\gamma$  no afectaría directamente la adquisición del fenotipo VM, pero si alteraría la proporción de células VM presentes en tumores en respuesta a IL-12 e IL-18.



**Figura 34:** Efecto de IFN $\gamma$  en la expresión de CD122 en las células VM y TM infiltrantes de tumor. Animales C57BL/6 WT o IFN $\gamma$ KO portadores de tumores B16 fueron hidrodinámicamente inyectados con la cantidad correspondiente de plásmidos para IL-12 e IL-18 o control. A los 7 días post-IH se realizó la eutanasia de los animales y los tumores fueron extraídos y procesados para su análisis por citometría de flujo. Las figuras muestran gráficos de barras representando (A y B) los porcentajes y (C y D) el índice de CD122 de las poblaciones de células CD122<sup>+</sup> VM y TM respectivamente. El índice de CD122 fue utilizado para independizarnos de las diferencias observadas en las repeticiones de cada experimento. El mismo fue obtenido calculando (1) la diferencia de la media geométrica ( $\Delta$  de IFM) de CD122 respecto a la de su control de isotipo para cada animal, y posteriormente (2) la relación de la  $\Delta$  de IFM de cada individuo, perteneciente a cada grupo experimental, respecto al promedio de la  $\Delta$  de IFM de animales WT Controles intraexperimento. El análisis estadístico fue realizado utilizando el test T de Student, Test de Welch o Mann-Whitney según correspondiese. Valores de \*p<0.05, \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001, \*\*\*\*p<0.0001 fueron considerados significativos.

CONCLUSIONES CAPÍTULO III

En este capítulo de resultados se utiliza el modelo murino experimental de inyección hidrodinámica de IL-12 (1 $\mu$ g) e IL-18 previamente descrito, comparando los resultados observados entre distintas cepas de animales C57BL/6 portadores de tumores B16: (1) animales WT, (2) animales deficientes de IL4 (IL4KO), (3) animales deficientes en el receptor de IFNs tipo-I (IFN $\alpha$ RKO) y (4) deficientes en IFN $\gamma$  (IFN $\gamma$ KO). Estos ensayos nos permitieron evaluar el aporte de cada citoquina en la inducción de células VM en periferia y en la respuesta antitumoral:

IL-4

- ✓ La citoquina IL-4 no tendría un rol clave en la expansión de células VM en bazo y GD, pero si en la adquisición de Eomes por parte de este subtipo celular en condiciones controles, mientras que su ausencia no afectaría la expresión de este FT en células TM. De manera diferencial, la expresión de Eomes en células VM de bazo logra asemejarse a la de animales WT luego de la estimulación con IL-12 e IL-18, mientras que el contexto inflamatorio tipo Th1 en los GD no fue suficiente para revertir dicho efecto.
- ✓ Si bien encontramos diferencias en la caracterización de las células T CD8<sup>+</sup> de memoria en periferia en ausencia de IL-4, esta citoquina no demostró tener impacto alguno en la inducción de una respuesta antitumoral.

IFNs tipo-I

- ✓ Los animales deficientes en el receptor para IFNs tipo-I mostraron tanto en bazo como en GD un incremento de la celularidad total, y de las poblaciones de células T CD8<sup>+</sup> totales y de memoria en respuesta al estímulo con IL-12 e IL-18.
- ✓ En ambos tejidos, e independientemente del tratamiento, la población VM se encontró significativamente enriquecida respecto a la población TM. Este es un efecto sorprendente teniendo la importancia de los IFNs tipo-I en la generación de las células VM descrito previamente en la bibliografía.
- ✓ Además, tanto en bazo como en GD, los IFNs tipo-I podrían desarrollar un rol importante en la adquisición de CD122 de ambas poblaciones T CD8<sup>+</sup> de memoria; efecto que, en todos los casos a excepción de las células VM de GD, sería compensado por otras señales en un contexto inflamatorio tipo Th1.
- ✓ Solo en los GD los IFNs tipo-I serían necesarios para la expresión de Eomes por parte de las células VM, y el aporte de los mismos podría ser redundante en un

contexto inflamatorio Th1 donde otras señales favorecerían la expresión de este factor de transcripción.

- ✓ Similar a lo observado en animales IL4KO, la ausencia del receptor de IFNs tipo-I no afectó la respuesta antitumoral inducida en respuesta a la estimulación con IL-12 e IL-18 respecto a animales WT, indicativo de que dichas citoquinas no cumplirían un rol esencial en el control de la progresión del tumor.

### IFN $\gamma$

---

- ✓ En ausencia de IFN $\gamma$  observamos, tanto en bazo como en GD, una disminución en el número de células totales y de linfocitos T CD8<sup>+</sup> (solo en GD) comparado a animales WT. En respuesta a la estimulación con IL-12 e IL-18 prácticamente la totalidad de los linfocitos T CD8<sup>+</sup> en GD adquieren un fenotipo de memoria, efecto que no sería suficiente para lograr inducir una respuesta inmune antitumoral eficaz.
- ✓ Por otro lado, esta citoquina no alteraría la expresión de Eomes o CD122 de la población VM, mientras que en condiciones controles afectaría la expresión de CD122 por parte de las células TM, efecto que sería compensado por otras señales en respuesta a IL-12 e IL-18.
- ✓ La citoquina IFN $\gamma$ , si bien no participaría en la adquisición de los marcadores fenotípicos de las células VM, estaría involucrada en la expansión de las mismas en periferia, ya que, en su ausencia, los tejidos en estudio mostraron una disminución significativa de esta población de memoria comparado a animales WT, no observada en la población TM, siendo prácticamente indetectable en los GD en respuesta a IL-12 e IL-18.
- ✓ Los animales deficientes en IFN $\gamma$  presentaron un escaso infiltrado de células T CD8<sup>+</sup>, especialmente de células VM, en el sitio del tumor en un contexto inflamatorio tipo Th1 (inducido en respuesta a IL-12 e IL-18), efecto que correlaciona con las dificultades de esta cepa de animales en montar una respuesta antitumoral eficaz. Estos resultados no solo resaltarían la importancia de esta citoquina en la respuesta antitumoral, sino también el posible rol que las células VM podrían tener en la erradicación del tumor.

En su conjunto, los datos presentados en este capítulo indicarían que si bien las citoquinas IL-4 e IFNs tipo-I estarían involucradas en la generación de células VM en periferia,

no participarían en el control del crecimiento de tumores, mientras que IFN $\gamma$  podría ser importante para la expansión y respuesta funcional de la población de memoria virtual, pero no para la adquisición de este fenotipo innato.

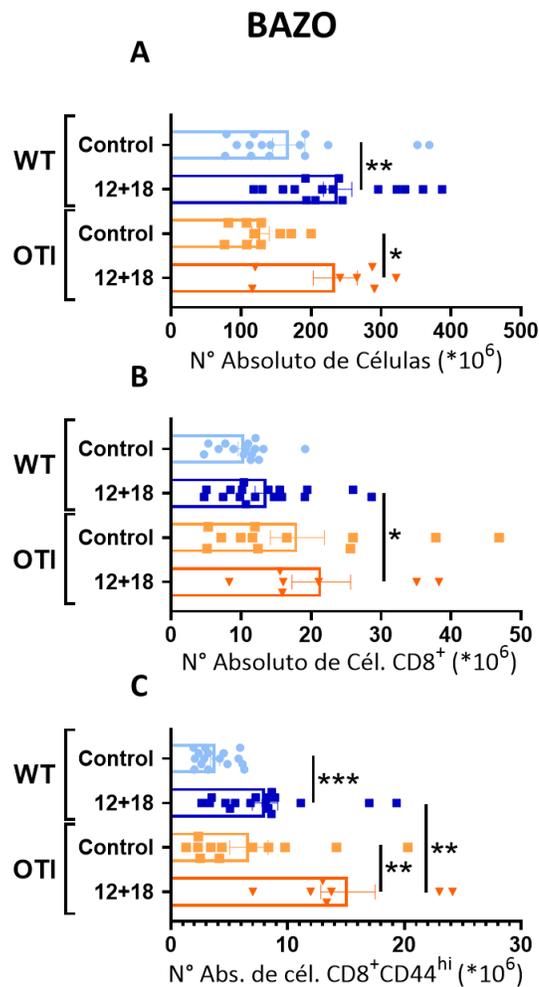
Nuestros datos demuestran importantes alteraciones en el número, distribución y función de células VM y TM en OLS, tanto en condiciones fisiológicas como luego de la generación de un ambiente inflamatorio sistémico tipo Th1, en ausencia de ciertas citoquinas claves reportadas como importantes reguladores de su generación/expansión y supervivencia. Sin embargo, para poder terminar de entender estos cambios, son necesarios estudios más profundos que evalúen un amplio perfil de citoquinas de tipo Th1 y Th2 en cada grupo de animales deficientes para comprender cuales de ellas son determinantes y cuales efectos pueden ser compensados por el incremento de otras citoquinas que puedan estar actuando en forma redundante.

*CAPÍTULO IV: EFECTO DE LA CO-EXPRESIÓN SISTÉMICA DE IL-12 E IL-18 EN LA INDUCCIÓN DE CÉLULAS T CD8<sup>+</sup> INNATAS EN PERIFERIA EN UN CONTEXTO ENRIQUECIDO EN CÉLULAS T CD8<sup>+</sup> INESPECÍFICAS DE ANTÍGENO.*

En los resultados presentados en el segundo capítulo de esta tesis observamos que la inyección hidrodinámica de IL-12 (1 $\mu$ g) e IL-18 favorecía en OLS la expansión principalmente de células T CD8<sup>+</sup> convencionales de memoria (TM). Pese a observar este efecto en periferia, tanto los GD como el infiltrado tumoral revelaban un predominio de células de memoria independientes de Ag (VM), resultados que correlacionaban con un satisfactorio control del crecimiento del tumor, sugiriendo el rol que estas células podrían cumplir en la respuesta antitumoral.

A fin de enfocar nuestros estudios al rol de las células VM en el control de la progresión del tumor, decidimos analizar el efecto de la terapia de IH de IL-12 e IL-18 en la generación de células VM y en la inducción de una respuesta antitumoral eficaz en un contexto en donde las células T CD8<sup>+</sup> Ag-independientes estuvieran enriquecidas. Para ello utilizamos animales OT-I que poseen una modificación genética que genera linfocitos T CD8<sup>+</sup> con un TCR que sólo reconoce los residuos 257-264 de Ovoalbúmina (OVA) en el contexto de H2Kb. Teniendo en cuenta que trabajamos con animales OT-I que en general poseen aproximadamente entre un 90-100% de células T CD8<sup>+</sup> OVA<sup>+</sup>, en nuestro modelo experimental de cáncer en ausencia de OVA la probabilidad de desarrollar linfocitos T CD8<sup>+</sup> específicos contra Ag tumorales está altamente reducida en estos animales.

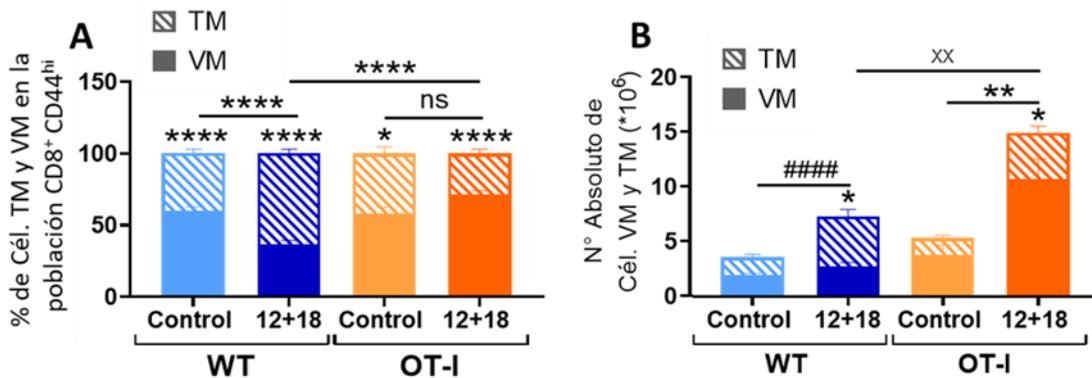
En primer lugar, analizamos la distribución y fenotipo de células T CD8<sup>+</sup> de memoria, tanto VM como TM, en OLS. Los bazos de los animales OT-I 12+18 incrementaron significativamente el número de esplenocitos totales respecto a OT-I controles, al igual que lo observado en animales WT 12+18 (Figura 35 A). A diferencia de los mismos, los bazos de animales OT-I evidenciaron un incremento significativo de células T CD8<sup>+</sup> totales y de memoria CD44<sup>hi</sup> post-IH respecto al grupo WT (Figuras 35 B y C respectivamente), resultado que sugiere que las células CD8<sup>+</sup> de memoria generadas en ausencia de Ag pueden responder eficazmente a estímulos innatos, similar a lo observado en un contexto convencional enriquecido en células Ag específicas.



**Figura 35:** Efecto de IL-12 e IL-18 en la población de linfocitos T  $CD8^+$  totales y de memoria ( $CD44^{hi}$ ) en bazo de animales WT y OT-I. Animales C57BL/6 WT y OT-I portadores de tumores B16 fueron hidrodinámicamente inyectados con la cantidad correspondiente de plásmidos para IL-12 e IL-18 o control. A los 7 días post-IH se realizó la eutanasia de los animales y los bazos fueron colectados y procesados para su análisis por citometría de flujo. Las figuras muestran gráficos de barras representando las poblaciones de células (A) totales, (B) T  $CD8^+$ , (C) T  $CD8^+CD44^{hi}$  respectivamente, para cada grupo de animales. El análisis estadístico fue realizado utilizando el test T de Student, Test de Welch o Mann-Whitney según correspondiese. Valores de  $*p < 0.05$ ,  $**p < 0.01$ ,  $***p < 0.001$ ,  $****p < 0.0001$  fueron considerados significativos.

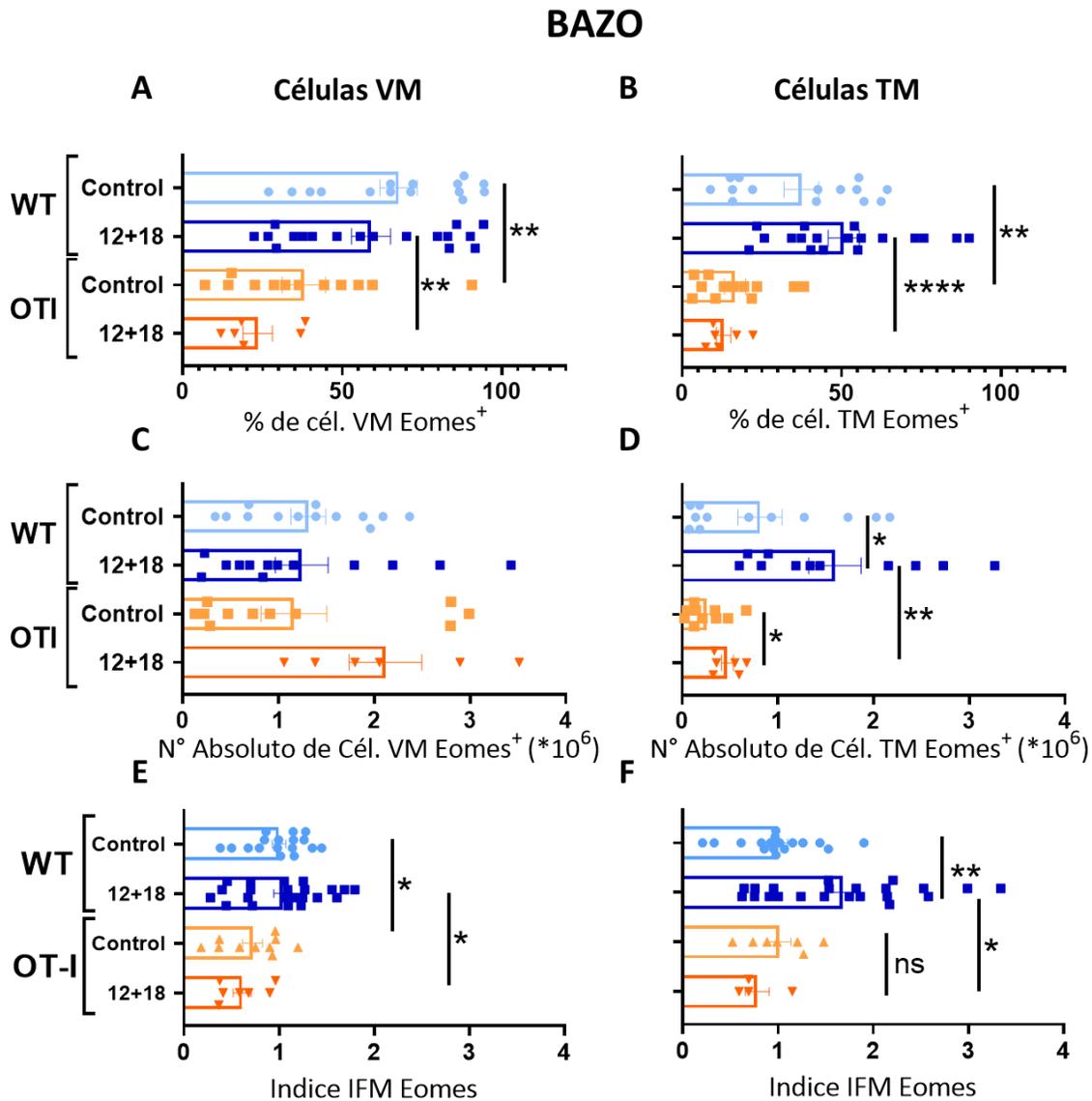
El análisis de las subpoblaciones de células T  $CD8^+$  de memoria en bazo reveló que, si bien la respuesta al estímulo con las citoquinas induce la expansión de células TM en ambas cepas (Figura 36 B), los animales OT-I 12+18 presentan un enriquecimiento significativo en células VM respecto a TM al comparar con los animales WT (Figura 36 A). Dicho efecto se vio reflejado en un incremento significativo de aproximadamente 4 veces en el número de células VM de animales OT-I 12+18 comparado a animales WT en la misma condición (Figura 36 B).

## BAZO



**Figura 36:** Efecto de IL-12 e IL-18 en la población de células VM y TM en bazo de animales WT y OT-I. Animales C57BL/6 WT y OT-I portadores de tumores B16 fueron hidrodinámicamente inyectados con la cantidad correspondiente de plásmidos para IL-12 e IL-18 o control. A los 7 días post-IH se realizó la eutanasia de los animales y los bazos fueron colectados y procesados para su análisis por citometría de flujo. Las figuras muestran gráficos de barras representando (A) los porcentajes y (B) los valores absolutos de las poblaciones de células VM y TM dentro del compartimento de células T CD8<sup>+</sup> de memoria (CD44<sup>hi</sup>). El análisis estadístico fue realizado utilizando el test T de Student, Test de Welch o Mann-Whitney según correspondiese. Valores de \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ , \*\*\*\* $p < 0.0001$  fueron considerados significativos. ####  $p < 0.0001$ , representa la diferencia significativa entre las poblaciones TM señaladas, mientras que xx  $p < 0.01$  representa la diferencia significativa entre las poblaciones VM indicadas.

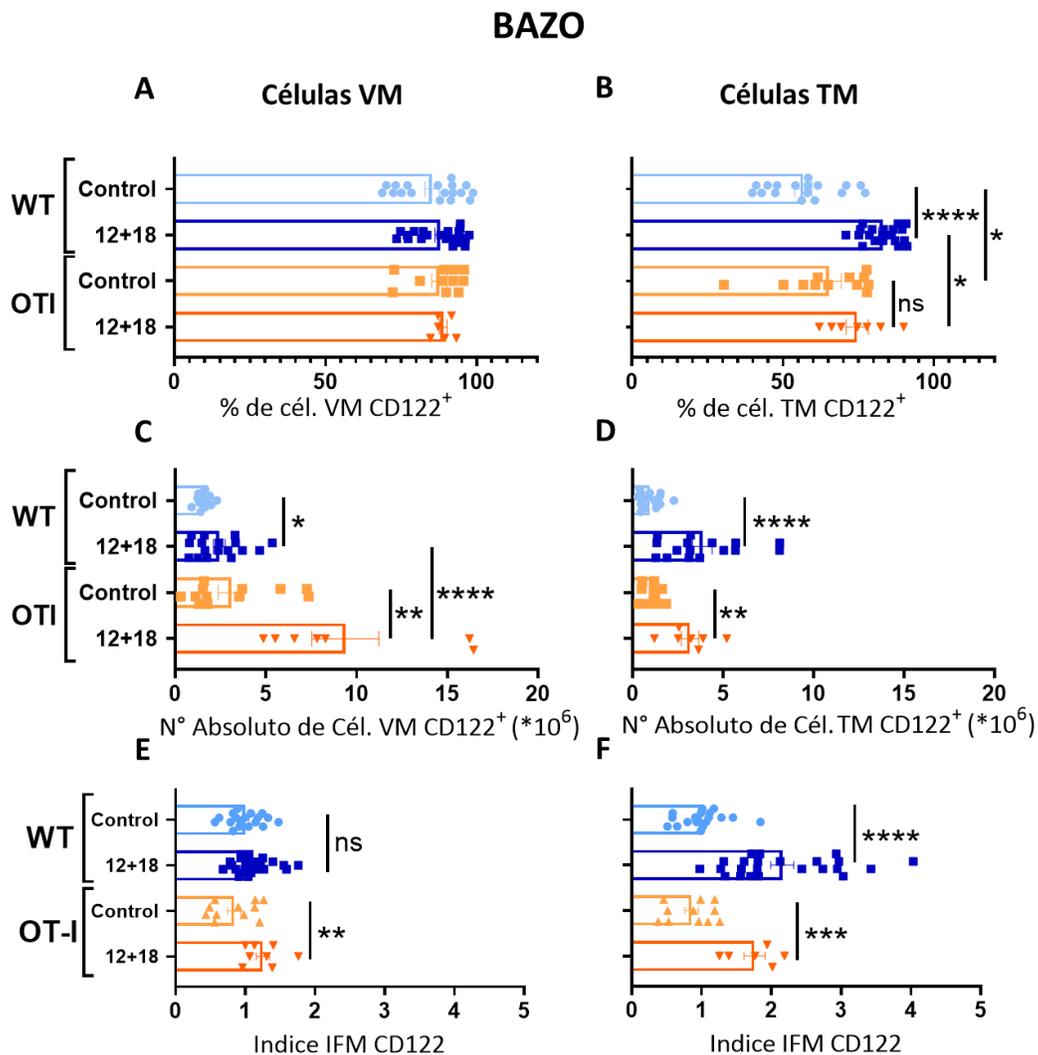
Profundizando en la caracterización de las células VM y TM en animales OT-I, analizamos la expresión de Eomes entre las subpoblaciones en estudio. Observamos que, independientemente de la condición experimental, las frecuencias y la expresión de Eomes de células VM y TM Eomes<sup>+</sup> se encontraron significativamente reducidas en animales OT-I respecto a animales WT (Figuras 37 A, B, E y F respectivamente). Este efecto fue reflejado en los números absolutos de células TM Eomes<sup>+</sup>, pero no en la subpoblación VM Eomes<sup>+</sup> (Figuras 37 D y C respectivamente). Más aun, en respuesta a IL-12+IL-18 los animales OT-I mostraron una tendencia a incrementar en el número de células VM Eomes<sup>+</sup> comparado a los otros grupos experimentales (Figura 37 C), reflejando un enriquecimiento de la población T CD8<sup>+</sup> Ag-inespecífica en estos animales.



**Figura 37:** Efecto de IL-12 e IL-18 en la expresión de Eomes en células VM y TM en bazo de animales WT y OT-I. Animales C57BL/6 WT y OT-I portadores de tumores B16 fueron hidrodinámicamente inyectados con la cantidad correspondiente de plásmidos para IL-12 e IL-18 o control. A los 7 días post-IH se realizó la eutanasia de los animales y los bazos fueron colectados y procesados para su análisis por citometría de flujo. Las figuras muestran gráficos de barras representando (A y B) los porcentajes, (C y D) los valores absolutos y (E y F) el índice de Eomes de las poblaciones de células Eomes<sup>+</sup> VM y TM respectivamente. El índice de Eomes fue utilizado para independizarnos de las diferencias observadas en las repeticiones de cada experimento. El mismo fue obtenido calculando (1) la diferencia de la media geométrica ( $\Delta$  de IFM) de Eomes respecto a la de su control de isotipo para cada animal, y posteriormente (2) la relación de la  $\Delta$  de IFM de cada individuo, perteneciente a cada grupo experimental, respecto al promedio de la  $\Delta$  de IFM de animales WT Controles intraexperimento. El análisis estadístico fue realizado utilizando el test T de Student, Test de Welch o Mann-Whitney según correspondiese. Valores de \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ , \*\*\*\* $p < 0.0001$  fueron considerados significativos.

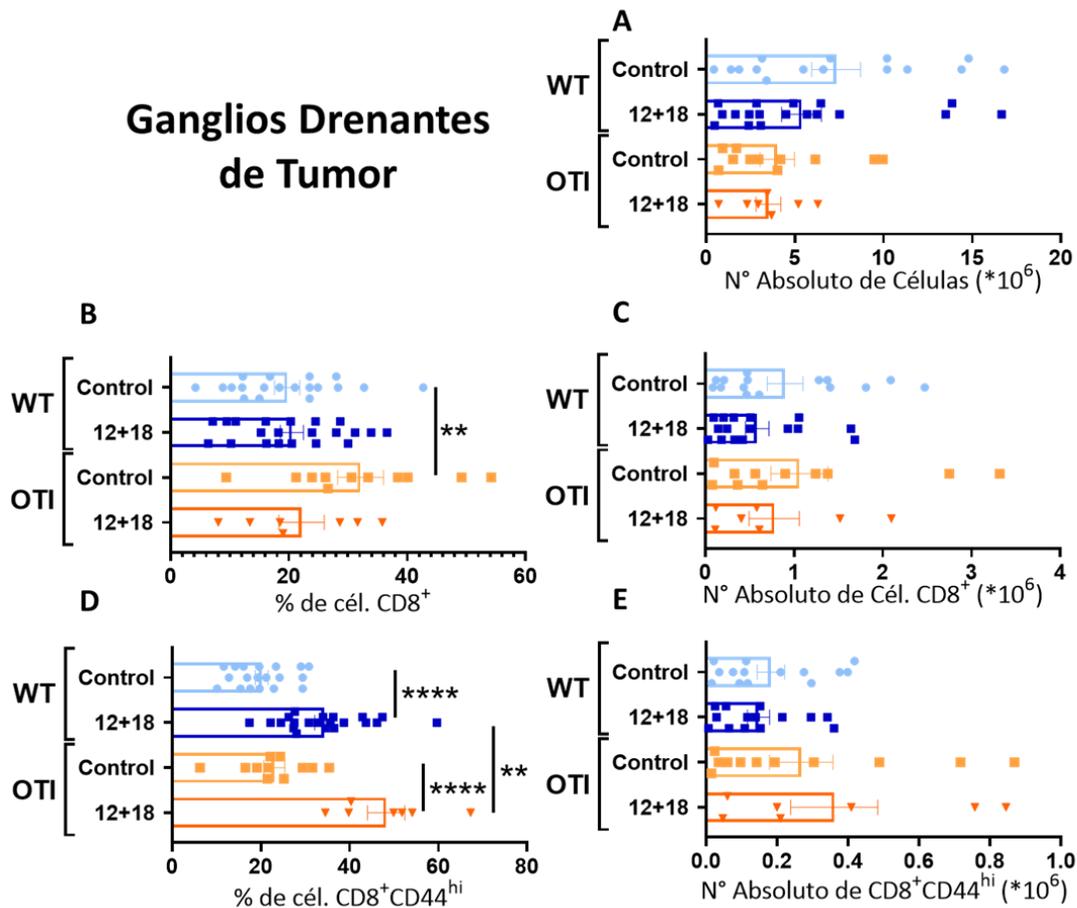
A continuación, analizamos el marcador CD122 en ambas poblaciones de memoria entre los distintos grupos experimentales. Los niveles de expresión de este marcador revelaron un incremento significativo en ambas poblaciones de memoria de animales OT-I en respuesta al tratamiento con IL-12 e IL-18, comparado a la condición libre de estímulo (Figuras 38 E y F). Además, si bien las frecuencias de las células VM CD122<sup>+</sup> fueron similares entre los grupos en estudio (Figura 38 A), los animales OT-I 12+18 presentaron un incremento casi tres veces mayor en los números absolutos de las mismas respecto a su contraparte OT-I control y al grupo WT 12+18 (Figura 38 C).

A pesar de que los animales OT-I presentan una frecuencia menor de células TM CD122<sup>+</sup> respecto a WT, los números absolutos de células TM CD122<sup>+</sup> fueron semejantes entre ambas cepas (Figura 38 B y D respectivamente). Sería importante a futuro determinar el origen de esta población "TM" en animales OT-I de modo de conocer si provienen del 5% de células no específicas para OVA o si realmente son específicas para este Ag y han adquirido el marcador CD49d por una vía alternativa al TCR no descrita hasta el momento.



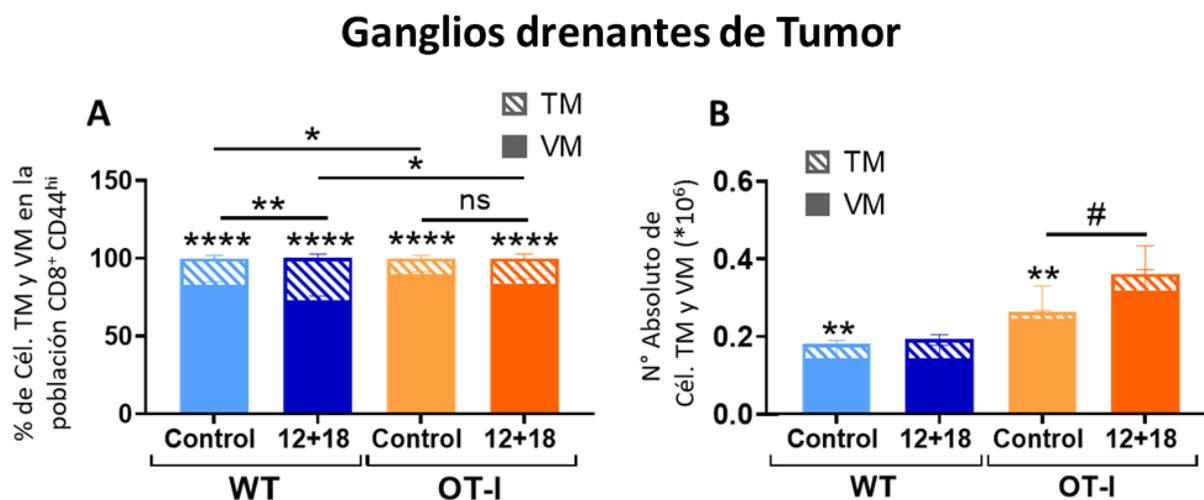
**Figura 38:** Efecto de IL-12 e IL-18 en la expresión de CD122 en células VM y TM en bazo de animales WT y OT-I. Animales C57BL/6 WT y OT-I portadores de tumores B16 fueron hidrodinámicamente inyectados con la cantidad correspondiente de plásmidos para IL-12 e IL-18 o control. A los 7 días post-IH se realizó la eutanasia de los animales y los bazos fueron colectados y procesados para su análisis por citometría de flujo. Las figuras muestran gráficos de barras representando (A y B) los porcentajes, (C y D) los valores absolutos y (E y F) el índice de CD122 de las poblaciones de células CD122<sup>+</sup> VM y TM respectivamente. El índice de CD122 fue utilizado para independizarnos de las diferencias observadas en las repeticiones de cada experimento. El mismo fue obtenido calculando (1) la diferencia de la media geométrica ( $\Delta$  de IFM) de CD122 respecto a la de su control de isotipo para cada animal, y posteriormente (2) la relación de la  $\Delta$  de IFM de cada individuo, perteneciente a cada grupo experimental, respecto al promedio de la  $\Delta$  de IFM de animales WT Controles intraexperimento. El análisis estadístico fue realizado utilizando el test T de Student, Test de Welch o Mann-Whitney según correspondiese. Valores de \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ , \*\*\*\* $p < 0.0001$  fueron considerados significativos.

El análisis de los GD no reveló diferencias en cuanto a la celularidad, o al número absoluto de linfocitos T CD8<sup>+</sup> (totales o de memoria) entre los grupos experimentales (Figuras 39 A, C y E respectivamente). Las frecuencias de células T CD8<sup>+</sup> CD44<sup>hi</sup> fueron significativamente mayores en los animales OT-I 12+18 comparado a animales WT 12+18 (Figura 39 D), resultado que podría sugerir que en animales enriquecidos en células inespecíficas de Ag el contexto inflamatorio es más eficiente en expandir esta población T CD8<sup>+</sup> de memoria.



**Figura 39:** Efecto de IL-12 e IL-18 en la población de linfocitos T CD8<sup>+</sup> totales y de memoria (CD44<sup>hi</sup>) en GD de animales WT y OT-I. Animales C57BL/6 WT y OT-I portadores de tumores B16 fueron hidrodinámicamente inyectados con la cantidad correspondiente de plásmidos para IL-12 e IL-18 o control. A los 7 días post-IH se realizó la eutanasia de los animales y los ganglios drenantes de tumor fueron colectados y procesados para su análisis por citometría de flujo. Las figuras muestran gráficos de barras representando las poblaciones de células (A) totales, (B) CD8<sup>+</sup>, (C) CD8<sup>+</sup>CD44<sup>hi</sup> respectivamente, para cada grupo de animales. El análisis estadístico fue realizado utilizando el test T de Student, Test de Welch o Mann-Whitney según correspondiese. Valores de \*p<0.05, \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001, \*\*\*\*p<0.0001 fueron considerados significativos.

El estudio comparativo de las subpoblaciones de células T CD8<sup>+</sup> de memoria presentó un mayor enriquecimiento de células VM en GD de animales OT-I, en ambas condiciones, comparado a animales WT (Figura 40 A), siendo los GD de animales OT-I 12+18 los que presentaron el mayor número de VM respecto a todos los otros grupos experimentales. (Figura 40 B).

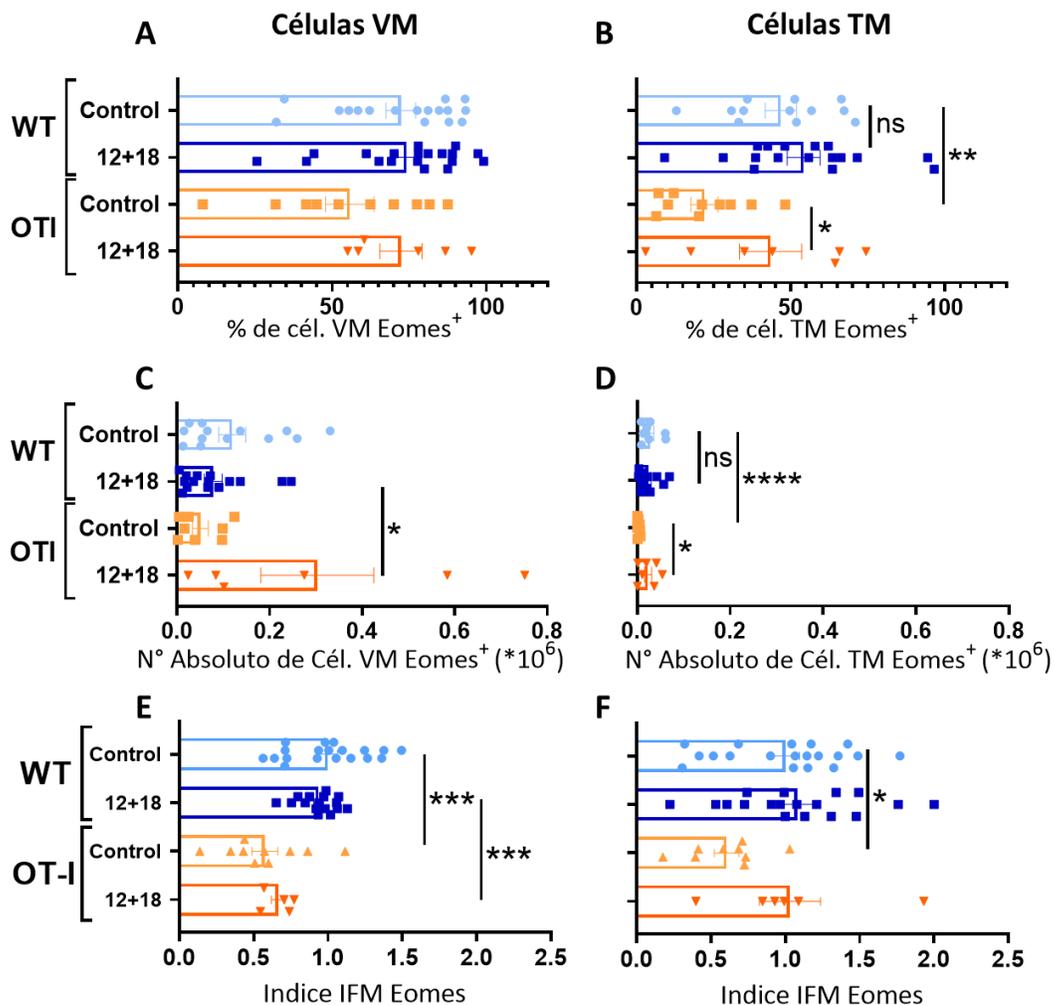


**Figura 40:** Efecto de IL-12 e IL-18 en la población de células VM y TM en GD de animales WT y OT-I. Animales C57BL/6 WT y OT-I portadores de tumores B16 fueron hidrodinámicamente inyectados con la cantidad correspondiente de plásmidos para IL-12 e IL-18 o control. A los 7 días post-IH se realizó la eutanasia de los animales y los bazoos fueron colectados y procesados para su análisis por citometría de flujo. Las figuras muestran gráficos de barras representando (A) los porcentajes y (B) los valores absolutos de las poblaciones de células VM y TM dentro del compartimento de células T CD8<sup>+</sup> de memoria (CD44<sup>hi</sup>). El análisis estadístico fue realizado utilizando el test T de Student, Test de Welch o Mann-Whitney según correspondiese. Valores de \*p<0.05, \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001, \*\*\*\*p<0.0001 fueron considerados significativos. # p<0.05, representa la diferencia significativa entre las poblaciones TM señaladas.

Entre las poblaciones de memoria presentes en los GD de animales OT-I controles, la expresión de Eomes por parte de las células VM y TM se encontró disminuida respecto a animales WT controles (Figuras 41 E y F).

En animales OT-I libres de estímulo, la frecuencia de la población TM Eomes<sup>+</sup> fue significativamente menor a la de animales WT controles, la cual se reestablece luego del tratamiento con IL-12 e IL-18 (Figura 41 B). Dicho efecto se vio reflejado en los números absolutos de células TM Eomes<sup>+</sup> (Figura 41 D), mientras que los valores de células VM Eomes<sup>+</sup> son semejantes entre animales controles OT-I y WT, e incrementan significativamente en respuesta al estímulo con las citoquinas en animales OT-I (Figuras 41 C), aun cuando sus frecuencias de células VM CD122<sup>+</sup> son similares entre los grupos (Figura 41 A).

### Ganglios drenantes de Tumor



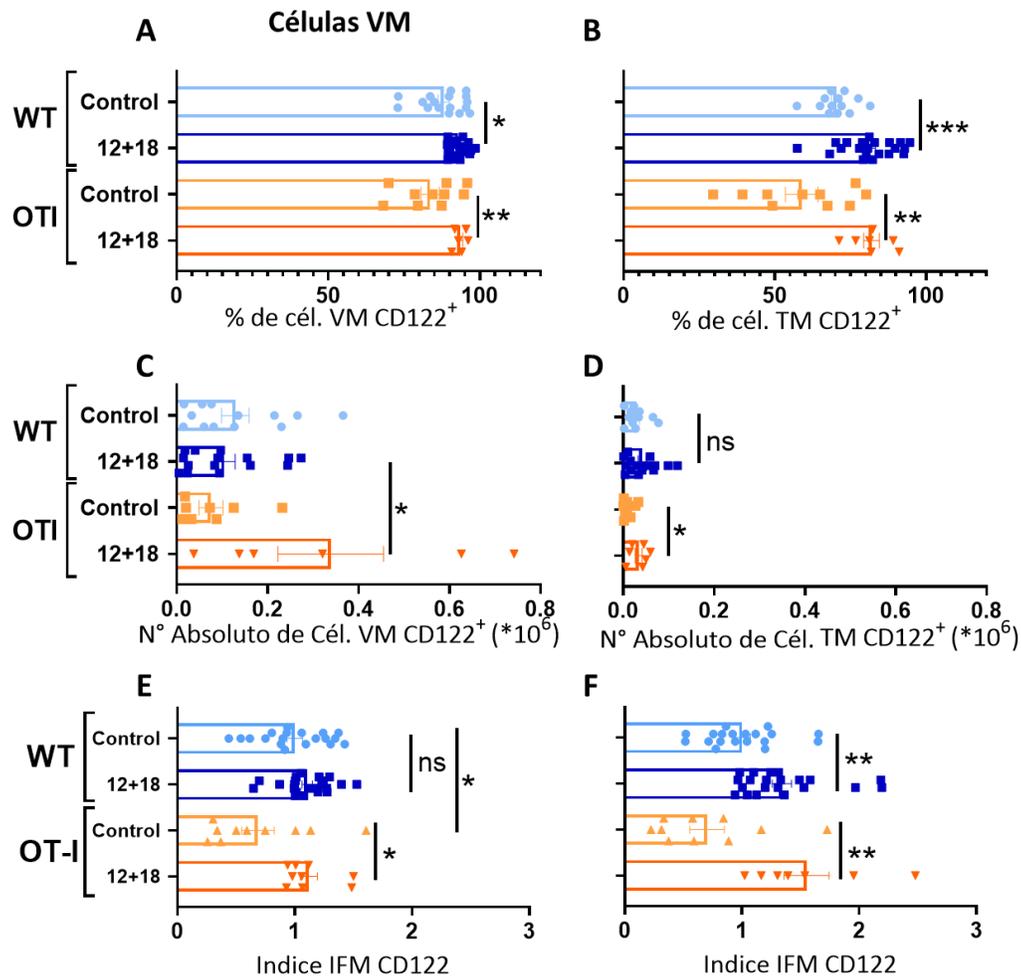
**Figura 41:** Efecto de IL-12 e IL-18 en la expresión de Eomes en células VM y TM en GD de animales WT y OT-I. Animales C57BL/6 WT y OT-I portadores de tumores B16 fueron hidrodinámicamente inyectados con la cantidad correspondiente de plásmidos para IL-12 e IL-18 o control. A los 7 días post-IH se realizó la eutanasia de los animales y los ganglios drenantes de tumor fueron colectados y procesados para su análisis por citometría de flujo. Las figuras muestran gráficos de barras representando (A y B) los porcentajes, (C y D) los valores absolutos y (E y F) el índice de Eomes de las poblaciones de células Eomes<sup>+</sup> VM y TM respectivamente. El índice de Eomes fue utilizado para independizarnos de las diferencias observadas en las repeticiones de cada experimento. El mismo fue obtenido calculando (1) la diferencia de la media geométrica ( $\Delta$  de IFM) de Eomes respecto a la de su control de isotipo para cada animal, y posteriormente (2) la relación de la  $\Delta$  de IFM de cada individuo,

pertenciente a cada grupo experimental, respecto al promedio de la  $\Delta$  de IFM de animales WT Controles intraexperimento. El análisis estadístico fue realizado utilizando el test T de Student, Test de Welch o Mann-Whitney según correspondiese. Valores de \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ , \*\*\*\* $p < 0.0001$  fueron considerados significativos.

Las células VM y TM CD122<sup>+</sup> en los GD animales OT-I no presentaron diferencias significativas en sus frecuencias comparado a animales WT (Figuras 42 A y B). El análisis de los valores absolutos reveló que solo los animales OT-I 12+18 lograron incrementar de manera significativa las células VM CD122<sup>+</sup> respecto a los animales WT de la misma condición (Figura 42 C), mientras que las células TM que expresaban dicho marcador presentaron valores semejantes a los observados en animales WT (Figura 42 D).

A diferencia de lo observado en animales WT, la población VM presentó una baja expresión de CD122 en animales OT-I controles, la cual incrementó en respuesta al tratamiento con las citoquinas (Figura 42 E), similar a lo que ocurre con las células TM en ambas cepas de animales (Figura 42 F).

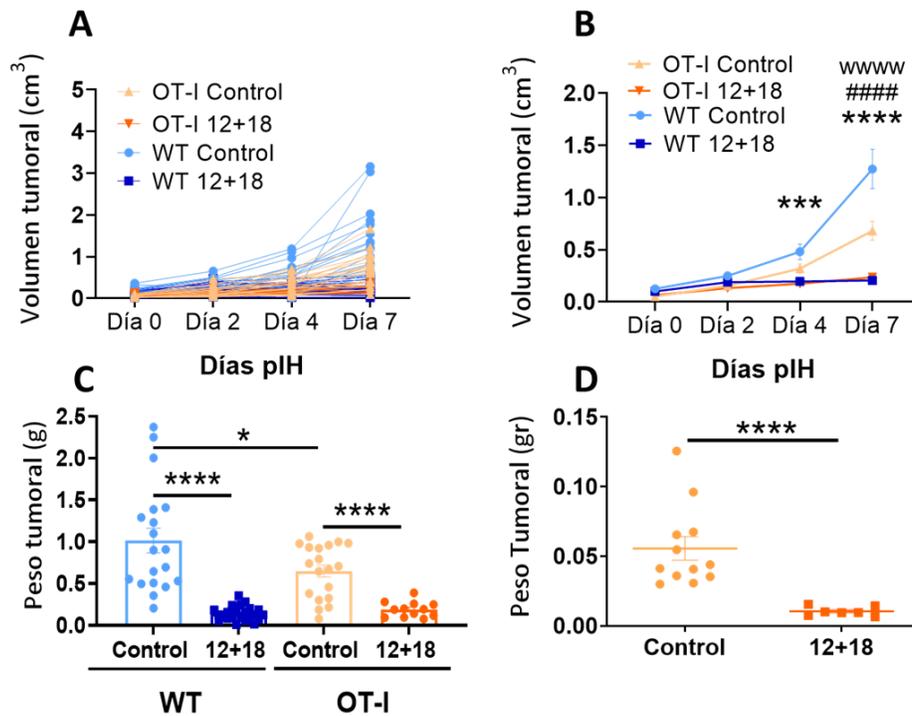
### Ganglios drenantes de Tumor



**Figura 42:** *Efecto de IL-12 e IL-18 en la expresión de CD122 en células VM y TM en GD de animales WT y OT-I. Animales C57BL/6 WT y OT-I portadores de tumores B16 fueron hidrodinámicamente inyectados con la cantidad correspondiente de plásmidos para IL-12 e IL-18 o control. A los 7 días post-IH se realizó la eutanasia de los animales y los ganglios drenantes de tumor fueron colectados y procesados para su análisis por citometría de flujo. Las figuras muestran gráficos de barras representando (A y B) los porcentajes, (C y D) los valores absolutos y (E y F) el índice de CD122 de las poblaciones de células CD122<sup>+</sup> VM y TM respectivamente. El índice de CD122 fue utilizado para independizarnos de las diferencias observadas en las repeticiones de cada experimento. El mismo fue obtenido calculando (1) la diferencia de la media geométrica ( $\Delta$  de IFM) de CD122 respecto a la de su control de isotipo para cada animal, y posteriormente (2) la relación de la  $\Delta$  de IFM de cada individuo, perteneciente a cada grupo experimental, respecto al promedio de la  $\Delta$  de IFM de animales WT Controles intraexperimento. El análisis estadístico fue realizado utilizando el test T de Student, Test de Welch o Mann-Whitney según correspondiese. Valores de \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ , \*\*\*\* $p < 0.0001$  fueron considerados significativos.*

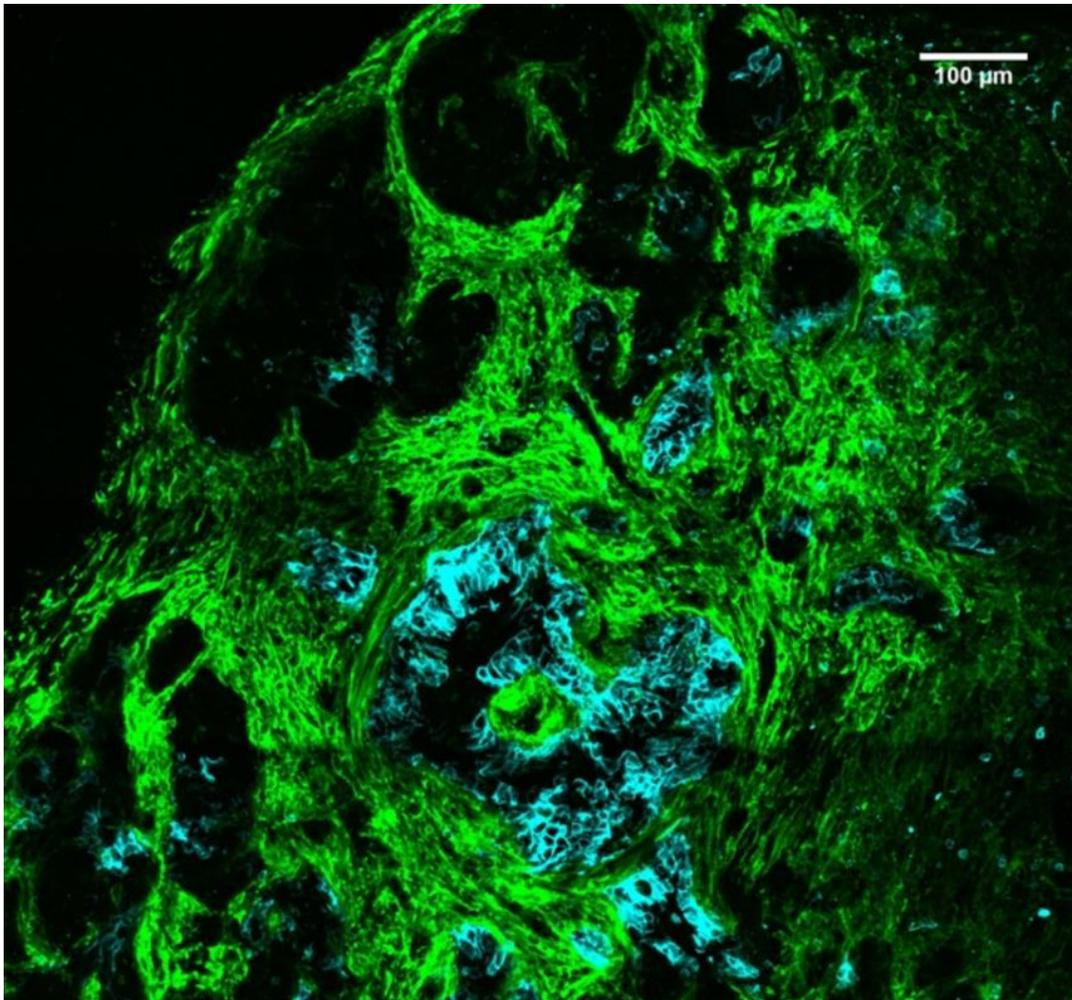
A continuación, analizamos el efecto de la estimulación con IL-12 e IL-18 en la inducción de la respuesta antitumoral en animales OT-I, observando un eficaz control del crecimiento del tumor respecto a animales OT-I controles (Figuras 43 A, B y C), similar a lo previamente expuesto por animales WT. Más aun, estos resultados reflejan que, en condiciones libres de tratamiento, los animales OT-I logran controlar con mayor eficacia la progresión del tejido neoplásico respecto a animales WT controles (Figuras 43 B y C), datos que indicarían que en un contexto donde prima la respuesta de células T CD8<sup>+</sup> Ag-independientes (VM) se logra desarrollar una respuesta antitumoral más eficiente que la generada en un contexto policlonal (WT).

Efectos similares en la inducción de la respuesta antitumoral fueron también observados utilizando nuestro modelo experimental de IH de IL-12 (1 $\mu$ g) e IL-18 en animales OT-I portadores de tumores pancreáticos KPC (adenocarcinoma ductal pancreático) como muestra la figura 43 D.



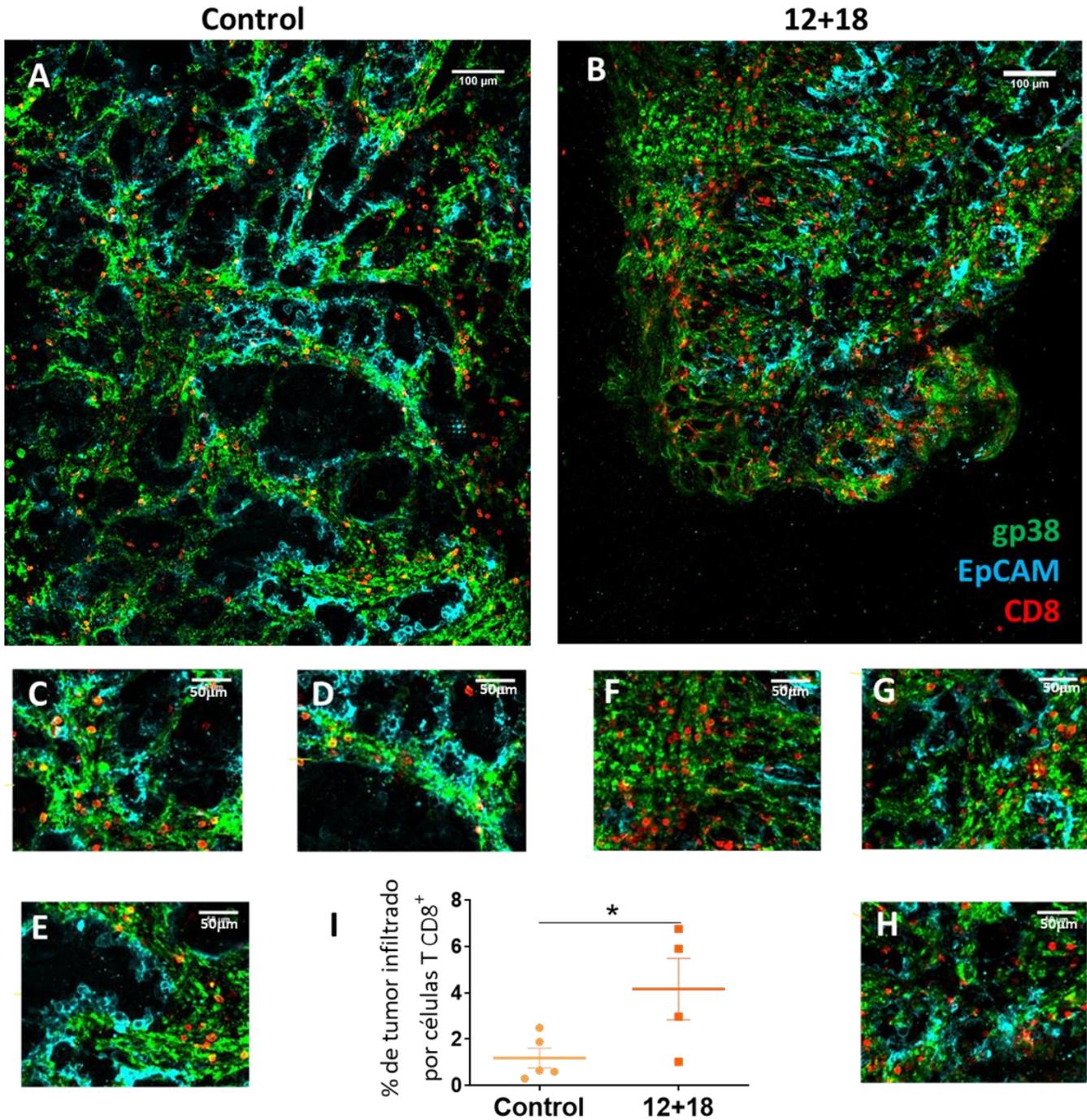
**Figura 43:** Efecto de la co-expresión sistémica de 12+18 en el crecimiento tumoral en animales OT-I. Animales C57BL/6 WT y OT-I portadores de tumores B16 (A, B y C) o animales OT-I portadores de tumores KPC (D) fueron inyectados hidrodinámicamente con los plásmidos de expresión para IL-12 (1µg) e IL-18 o control, y los respectivos tumores fueron obtenidos al día 7 post-IH. Las figuras muestran en (A y B) las curvas de crecimiento de tumor representando el volumen de tumores B16 (en cm<sup>3</sup>) a diferentes días post-IH de animales del grupo control o 12+18. La figura (A) muestra los valores independientes de cada animal, mientras que la figura (B) representa la media ± SEM del volumen tumoral de los animales que conforman cada grupo. Las figuras (C y D) representan los pesos de tumores (C) B16 (melanoma) y (D) KPC (adenocarcinoma ductal pancreático) de animales controles o 12+18 obtenidos al día 7 post-IH. El análisis estadístico fue realizado utilizando el Test ANOVA de dos vías en (B) y Test T de Student, Test de Welch o Test de Mann-Whitney según correspondiese en (C y D). Valores de \*p<0.05, \*\*\*p<0.001, \*\*\*\*p<0.0001 fueron considerados significativos. Los valores de wwwww p<0.0001 y #####p<0.0001 en el gráfico B representan las diferencias significativas entre animales OT-I (controles y 12+18) o animales libres de estímulo (WT vs OT-I) respectivamente.

Ahondando en la caracterización y localización de células T CD8<sup>+</sup> capaces de infiltrar tumores en el modelo con animales OT-I, probamos distintas líneas celulares tumorales singénicas con animales C57BL/6 hasta encontrar una línea celular que no sufriera el proceso de transición epitelio-mesenquimal (EMT por sus siglas en inglés). Este fue el caso de las células KPC, que desarrollan tumores con una estructura análoga a la de tumores humanos: caracterizadas por islotes de células tumorales propiamente dichas, rodeadas de estroma (Figura 44). Este tipo de estructura nos permite diferenciar no solo la localización, sino también el comportamiento o patrón migratorio de las células que infiltran el tumor.



**Figura 44:** *Estructura microscópica de tumores pancreáticos KPC.* Animales C57BL/6 OT-I fueron inoculados con  $10 \times 10^6$  células KPC de manera subcutánea. Los respectivos tumores fueron obtenidos 14 días luego de la inoculación y fueron fijados e incluidos en agarosa. Los cortes de  $200 \mu\text{m}$  del tejido se realizaron con un Vibrotomo VT 1000S Leica y se tiñeron con anticuerpos específicos contra gp38 (verde) para identificar el estroma y EpCAM (azul) para identificar a las células epiteliales y en este caso tumorales. Las imágenes fueron tomadas utilizando un microscopio confocal vertical DM500B equipado con un cabezal confocal SP5 "Spinning

En primer lugar, analizamos el infiltrado de células T CD8<sup>+</sup> en tumores de ambos grupos experimentales, observando en animales 12+18 que el área del tumor infiltrado por linfocitos T CD8<sup>+</sup> era significativamente mayor que lo observado en tumores de animales sin tratamiento (Figura 45).

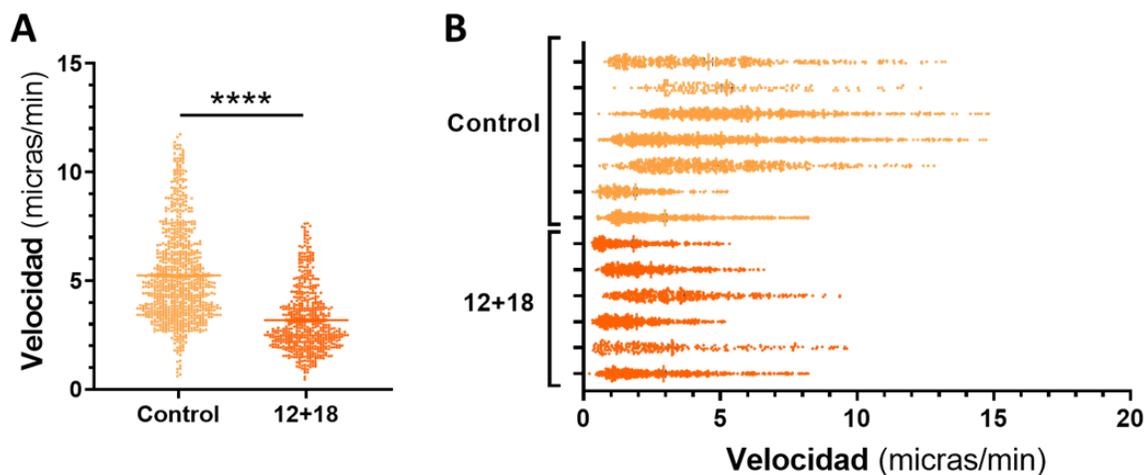


**Figura 45:** Efecto de la estimulación con IL-12 e IL-18 en el infiltrado de células T CD8<sup>+</sup> en tumores KPC. Animales C57BL/6 OT-I portadores de tumores KPC fueron hidrodinámicamente inyectados con la cantidad correspondiente de plásmidos para IL-12 e IL-18 o control. A los 7 días post-IH se realizó la eutanasia de los animales y los tumores fueron obtenidos, fijados e incluidos en agarosa. Se realizaron cortes de 200  $\mu$ m del tejido con un Vibrotomo VT 1000S Leica, los cuales fueron teñidos con anticuerpos específicos contra gp38 (verde) delimitando el estroma, anti-EpCAM (azul) para identificar a las células tumorales y anti-CD8 (rojo) para identificar las células T CD8<sup>+</sup> infiltrantes del tejido. Las figuras representan los tumores de animales (A, C, D y E) controles o (B, F, G y H) 12+18, reconstruyendo grandes secciones del tejido (A y B), o ampliando regiones determinadas (C-H). El gráfico (I) representa en porcentajes el área de tumor infiltrado por células T CD8<sup>+</sup> en

cada grupo experimental. Las imágenes fueron tomadas utilizando un microscopio confocal vertical DM500B equipado con un cabezal confocal SP5 "Spinning Disk" (Leica) y utilizado una magnificación 25x. Las reconstrucciones y el análisis de las imágenes fueron realizado utilizando el software FIJI ImageJ. El análisis estadístico fue realizado utilizando GraphPad Prism Versión 8.0, aplicando un test T de Student (I). Valores de  $*p<0.05$ ,  $**p<0.01$ ,  $***p<0.001$ ,  $****p<0.0001$  fueron considerados significativos.

Para poder analizar si las células T CD8<sup>+</sup> que infiltraban los tumores quedaban retenidas en el estroma o eran capaces de acceder a los focos tumorales y contactar las células neoplásicas, analizamos por la técnica "Live-Imaging" el comportamiento de estos linfocitos dentro del tumor (para poder visualizar las películas representativas del grupo control o del grupo 12+18 ingresar a: <https://drive.google.com/drive/folders/1XEehCAKoGbW2fZfSN4DXVqfQ6wvcocWN?usp=sharing>).

Nuestros resultados revelaron que las células T CD8<sup>+</sup> de ambos grupos experimentales fueron capaces de ingresar a los islotes de células tumorales, pero que en condiciones libres de tratamiento (controles), estas células se desplazarían a una velocidad significativamente mayor respecto a las células infiltrantes de tumores 12+18 (Figura 46 A). Estos datos podrían indicar que luego de la expresión sistémica de IL-12 e IL-18, los linfocitos T CD8<sup>+</sup>, que están más estáticos, podrían estar generando interacciones de manera más estable y eficiente con la célula blanco, favoreciendo su eliminación. Este efecto, podría en parte explicar el satisfactorio control en el crecimiento del tumor previamente observado en el grupo de animales OT-I 12+18, respecto a animales controles.



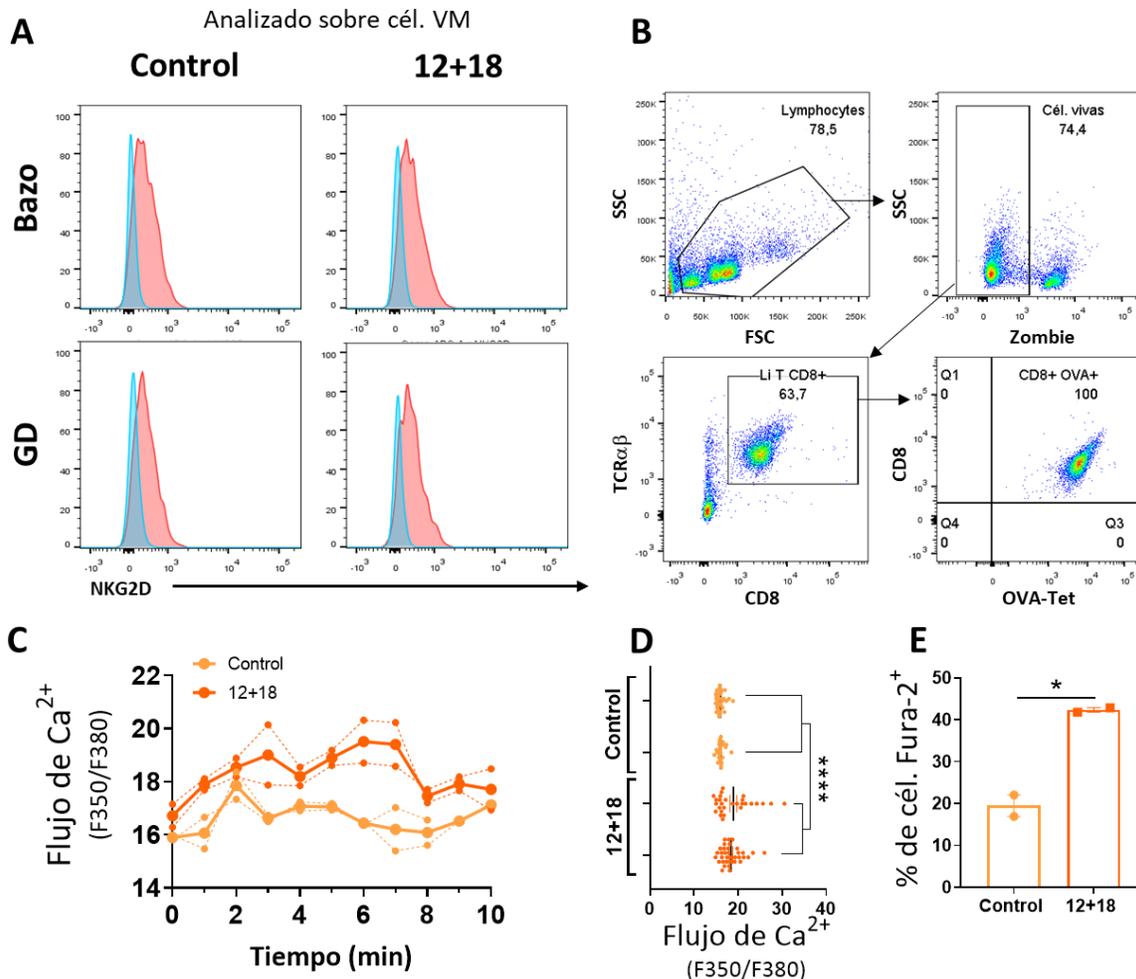
**Figura 46:** Efecto de la estimulación con IL-12 e IL-18 en el comportamiento de células T CD8<sup>+</sup> infiltrantes de tumores KPC. Animales C57BL/6 OT-I portadores de tumores KPC fueron hidrodinámicamente inyectados con la cantidad correspondiente de plásmidos para IL-12 e IL-18 o control. A los 7 días post-IH se realizó la eutanasia de los animales y los tumores fueron obtenidos e inmediatamente incluidos en agarosa. Se realizaron cortes de 200  $\mu$ m del tejido con un Vibrotomo VT 1000S Leica, los cuales fueron teñidos con anticuerpos específicos contra gp38 (verde) delimitando el estroma, anti-EpCAM (azul) para identificar a las células tumorales y anti-CD8 (rojo) para identificar las células T CD8<sup>+</sup> infiltrantes del tejido. Las figuras representan (A) el promedio de la velocidad media de cada célula T CD8<sup>+</sup> presente en los tumores de cada grupo experimental y (B) la velocidad media de

cada célula T CD8<sup>+</sup> infiltrantes de tumor para cada muestra por separado. Las imágenes fueron tomadas utilizando un microscopio confocal vertical DM500B equipado con un cabezal confocal SP5 “Spinning Disk” (Leica) y cámara termostata a 37°C. Se utilizó objetivo de inmersión en agua con una magnificación 25x, adquiriendo imágenes cada 30 segundos durante 20 minutos, llegando a una profundidad de 80 μm del tejido. El análisis de las imágenes fue realizado utilizando los softwares IMARIS 7.4 y FIJI ImageJ. El análisis estadístico fue realizado utilizando GraphPad Prism Versión 8.0, aplicando un test T de Student (I). Valores de \*p<0.05, \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001, \*\*\*\*p<0.0001 fueron considerados significativos.

Estos últimos resultados nos hicieron preguntarnos si la disminución en la velocidad de células T CD8<sup>+</sup> de animales OT-I 12+18 dentro del tumor podría deberse a una mayor interacción con células tumorales y si fuese así, si dicha interacción permitiría activar a las células T CD8<sup>+</sup> efectoras.

La movilización de Calcio (Ca<sup>2+</sup>) intracelular es un evento que ocurre posterior a la activación de los linfocitos T, principalmente vía TCR<sup>(164, 165)</sup>. Teniendo en cuenta que los tumores KPC no expresan el Ag OVA, quisimos evaluar si las células T CD8<sup>+</sup> presentes en los animales OT-I eran capaces de activarse al contactar con células tumorales vía receptores de “killing”. Por ejemplo, ha sido reportado que la señalización a través de otros receptores presentes en las células T CD8<sup>+</sup>, como NKG2D, puede también inducir el movimiento de Ca<sup>2+</sup> intracelular<sup>(166, 167)</sup>.

Considerando los reportes que demuestran que las células innatas (IM y VM) expresan el receptor de muerte NKG2D<sup>(123, 168, 169)</sup>, y nuestros resultados preliminares que refuerzan este hecho en células VM presentes en OLS (Figura 47 A), realizamos ensayos de movilización de calcio “ex-vivo” analizando el perfil de activación de las células en estudio al entrar en contacto con las células blanco (KPC). Utilizamos como muestras GD de animales OT-I los cuales estaban enriquecidos en células T CD8<sup>+</sup> “Ag-independientes” (OVA<sup>+</sup>) (Figura 47 B). Estos ensayos revelaron un mayor perfil de activación de las células efectoras de animales 12+18 al interactuar con las células tumorales, reflejado en el incremento en el flujo de Ca<sup>2+</sup> de las mismas (Figuras 47 C y D). Este efecto, estuvo acompañado de un mayor número de células activadas al contactar de manera “inespecífica de Ag” a las células neoplásicas en respuesta a IL-12 e IL-18 (Figura 47 E).



**Figura 47:** Efecto de la estimulación con IL-12 e IL-18 en el perfil de activación de células T CD8<sup>+</sup> de manera “inespecífica de Ag”. Animales C57BL/6 WT u OT-I portadores de tumores B16 y KPC respectivamente fueron hidrodinámicamente inyectados con la cantidad correspondiente de plásmidos para IL-12 e IL-18 o control. Al día 7 post-IH se realiza la eutanasia de los animales y se obtuvieron y procesaron los tejidos correspondientes. La figura (A) muestra histogramas representativos de la expresión de NKG2D (rojo) y su respectivo control de isotipo (azul) en las células VM (CD8<sup>+</sup> CD44<sup>hi</sup> CD49d<sup>-</sup>) analizadas por citometría de flujo en bazo y GD de animales WT controles o 12+18. En (B) se muestran Dot Plots representativos del enriquecimiento de GD de animales OT-I en células T CD8<sup>+</sup> específicas para OVA analizado por citometría de Flujo utilizadas en el experimento de Fura-2. Las figuras (C y D) muestran (C) el flujo de Ca<sup>2+</sup> en el tiempo, y (D) su promedio, de células efectoras provenientes de GD de animales OT-I controles y 12+18 al entrar en contacto con las células target KPC, representado como la relación de la intensidad de fluorescencia de Fura2-AM a 350nm/intensidad de fluorescencia a 380nm. Las líneas punteadas en (C) representan dos muestras representativas independientes, y la línea continua la media de las muestras correspondientes a cada grupo. El gráfico (E) representa el promedio del porcentaje de células efectoras activadas al entrar en contacto con las células target en cada grupo de animales. Las imágenes se adquirieron con un microscopio TE2000 (Nikon). Las células fueron excitadas alternativamente a 350nm y 380nm y la emisión a 510nm fue utilizada para medir las variaciones de Ca<sup>2+</sup> con el software MetaFluor. El análisis estadístico fue realizado utilizando Test T, Test de Welch o Mann-Whitney según correspondiese. Valores de \*p<0.05, \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001, \*\*\*\*p<0.0001 fueron considerados significativos.

### CONCLUSIONES CAPÍTULO IV

Este último capítulo de resultados se enfoca en el análisis comparativo de la respuesta antitumoral y la inducción de células VM en OLS entre animales WT y animales enriquecidos en células T CD8<sup>+</sup> no específicas de Ag (OT-I). Durante el desarrollo del mismo hemos podido determinar que:

- ✓ El tratamiento con IL-12 e IL-18 induce tanto en bazo como en GD de animales OT-I un incremento significativo en la población de células VM respecto a animales WT, indicativo de que en animales enriquecidos en células inespecíficas de Ag el contexto inflamatorio es más eficiente en expandir esta población de células T CD8<sup>+</sup> innatas comparado a animales WT.
- ✓ En los OLS de animales OT-I las células T CD8<sup>+</sup> de memoria, si bien expresan Eomes, presentan menores niveles de expresión de este marcador que animales WT. En ambos tejidos analizados, las células VM de animales OT-I presentan niveles relativamente bajos de CD122 en condiciones libres de estímulo, los cuales incrementan en respuesta a IL-12 e IL-18, similar a lo observado en las células TM de ambas cepas. Además, solo las células VM CD122<sup>+</sup> de animales OT-I 12+18 aumentan significativamente respecto al grupo WT, mientras que la población TM CD122<sup>+</sup> no presenta variaciones entre las cepas.
- ✓ Los tumores de animales OT-I 12+18 mostraron un mayor infiltrado de células T CD8<sup>+</sup> respecto a OT-I controles. Estas células se desplazan con una velocidad media significativamente menor a la observada en tumores OT-I controles, resultado que sugiere que podrían estar interaccionando con las células tumorales de modo de poder eliminarlas. Este resultado, podría explicar el mayor control en el crecimiento del tumor observado en este grupo de animales (OT-I 12+18).
- ✓ Finalmente, observamos que las células provenientes de GD de animales OT-I 12+18 enriquecidos en células VM presentaban un mayor perfil de activación respecto a animales controles al contactar con las células tumorales. Teniendo en cuenta que las células blanco no expresan el Ag OVA, especulamos que esta interacción podría darse de manera inespecífica a través del receptor NKG2D expresado en la población efectora, sin descartar que pueda ser mediado por otro mecanismo.

A partir de estos resultados, hipotetizamos que en un contexto donde predomina una respuesta de células T CD8<sup>+</sup> Ag-independientes, el tratamiento con IL-12 e IL-18 favorece tanto la expansión de células VM en periferia como su capacidad de interaccionar con la

célula tumoral y activarse de manera independiente de la señalización del TCR, efectos que pueden estar involucrados en el satisfactorio control del crecimiento del tumor observado en este grupo de animales.

## DISCUSIÓN

Las células T CD8<sup>+</sup> innatas fueron descritas por primera vez hace aproximadamente dos décadas, pero su estudio cobra más relevancia en 2015 con el primer reporte que demuestra su presencia en humanos. Desde el comienzo, muchos autores se han abocado a su estudio y a determinar diversas señales que pudieran ser importantes en la inducción de esta población, principalmente en timo (células IM), mientras que su origen y desarrollo en periferia (células VM) aún es controversial.

En este trabajo de tesis nos enfocamos en el estudio de la distribución de las células VM en OLS en animales WT en condiciones normales y las alteraciones que esta pueda sufrir en un contexto inflamatorio sistémico tipo Th1. Además, evaluamos el aporte de determinadas citoquinas en su generación y expansión en periferia, y su posible rol en la respuesta antitumoral.

En condiciones normales (animales WT controles), nuestros resultados indican que los ganglios inguinales drenantes de tumor presentan un enriquecimiento significativo de células VM comparado con las frecuencias observadas en bazo, donde la población predominante es la de memoria Ag-específica (TM). Este efecto presente en los GD no sería influenciado por señales del tumor, ya que también fue observado en los GnD, resultado que sugiere que podría tratarse de un efecto característico del tejido en estudio.

Un reporte publicado por Sosinowski *et al* sostiene que la citoquina IL-15 tiene un rol fundamental en la inducción de células VM en periferia<sup>(117)</sup>. La estimulación por parte de la IL-15 es bastante peculiar y diferente al resto de las citoquinas. Las células dendríticas, macrófagos, monocitos y algunas células epiteliales expresan la cadena alfa del receptor de IL-15 (IL15R $\alpha$ ) unida a la IL-15 con altísima afinidad. Luego, estas células son capaces de realizar una trans-presentación a células respondedoras CD122<sup>+</sup> (IL15R $\beta$ <sup>+</sup>) para mediar su acción biológica<sup>(170-174)</sup>, como en el caso de las células VM, IM y TM que requieren de esta señalización para su diferenciación y supervivencia<sup>(108, 112, 117, 173, 175)</sup>.

Ha sido reportado que las frecuencias de células productoras de IL-15 (células IL-15<sup>+</sup>) difieren entre los diversos OLS<sup>(176)</sup>. En bazo de animales WT de un mes de edad estas células son prácticamente indetectables, a los tres meses son escasas, y se encuentran considerablemente incrementadas a los diez meses; mientras que los NLS presentan una gran cantidad de células IL-15<sup>+</sup>, independientemente de la edad analizada<sup>(176)</sup>. Teniendo en cuenta que para el desarrollo de esta tesis trabajamos con animales de experimentación de 6-8 semanas de edad, hipotetizamos que los NLS de estos ratones podrían estar más enriquecidos en células IL-15<sup>+</sup> que los bazos, lo que podría explicar las diferentes frecuencias de la población VM observadas entre los distintos tejidos analizados. Más aun, un trabajo publicado en el año 2000, previo al primer reporte de las células T CD8<sup>+</sup> innatas, postula la presencia de una población de células T CD8<sup>+</sup> CD122<sup>+</sup> en periferia de animales WT no inmunizados, que son grandes productoras de IFN $\gamma$  de manera temprana ante estimulación con anticuerpos anti-CD3, e incrementan en el bazo con la edad<sup>(177)</sup>. El concepto de células

IM, VM y TM fue surgiendo a lo largo del tiempo gracias al aporte de múltiples trabajos de investigación, por lo que el reporte de Takayama y colaboradores, pese a que carezca de algunos marcadores fenotípicos actualmente utilizados para la identificación de la población T CD8<sup>+</sup> Ag-independientes, podría considerarse como una primera aproximación a la disposición en OLS, dependiente de la edad, de lo que hoy llamamos células de memoria virtual (VM). En conjunto, estos resultados complementarían los presentados por el grupo de Sosinowski, aportando evidencias de la distribución diferencial de la población VM en distintos OLS, posiblemente dependiente de la disponibilidad de IL-15 en los mismos.

En animales WT controles, nuestros datos demuestran que, tanto en bazo como en GD, las células VM presentan una expresión basal significativamente mayor de CD122 que las células de memoria específicas de Ag (TM). Este efecto resaltaría la importancia que podría tener la citoquina IL-15, que señala vía CD122, en la inducción de la población VM en periferia. Observamos que un contexto inflamatorio Th1 favorece en ambos OLS analizados la expansión de la población TM, a la vez que duplica en estas células los niveles de expresión de CD122, logrando de esta manera alcanzar la expresión observada en la población VM. De manera sorprendente, nuestros resultados indican que las células VM, a diferencia de las TM, no aumentan este marcador en respuesta a IL-12+IL-18, por lo que hipotetizamos que la población de memoria VM Ag-independiente presentaría en condiciones basales un nivel de expresión máximo de dicho receptor, el cual sería alcanzado por las células TM luego de la expresión sistémica de IL-12 e IL-18.

Independientemente del OLS en estudio, nuestros resultados demuestran que la estimulación innata (con IL-12 e IL-18), si bien no modifica los números absolutos de células VM totales respecto a animales WT controles, incrementa significativamente la población de células VM CD122<sup>+</sup>, representando prácticamente el 100% de la población VM total. En su conjunto, estos resultados aportarían evidencia de que IL-12 e IL-18, aunque no inducirían cambios en los niveles de expresión de CD122 por parte de las células VM que lo expresan, podrían colaborar en la conversión de células VM CD122<sup>-</sup> a CD122<sup>+</sup> en periferia, permitiéndole a esta población tener casi la totalidad de sus células con capacidad de responder a IL-15 para su mantenimiento y sobrevivencia.

Las células T CD8<sup>+</sup> innatas (IM) fueron identificadas inicialmente en animales transgénicos que carecían de la expresión de distintas moléculas involucradas en la señalización a través del TCR como ITK, RLK, KLF2, entre otras<sup>(106-109)</sup>. Estos animales presentan un marcado incremento de células iNKT PLZF<sup>+</sup> en timo, altamente productoras de IL-4, que inducirían el incremento de células IM en este tejido<sup>(111)</sup>. Este, junto a otros reportes, demuestran un rol clave de IL-4 y otras citoquinas, como IFNs tipo-I, en la generación de células IM<sup>(114, 115, 119, 159)</sup>. Los autores remarcan la importancia de estas citoquinas en la diferenciación al linaje innato, principalmente mediando el incremento de Eomes, un FT clave en la inducción de este subtipo celular<sup>(111, 159, 163, 178)</sup>.

Los trabajos publicados hasta el momento en el estudio de la implicancia de IL-4 en la población T CD8<sup>+</sup> de memoria Ag-independiente o innata en periferia (VM), indican que la ausencia de IL-4 produce una pequeña, aunque reproducible disminución en las frecuencias de células VM<sup>(103, 117, 179)</sup>. Los autores argumentan que la ausencia de IL-4 afectaría principalmente la generación de células IM en timo. Teniendo en cuenta que éstas, al egresar de este OLP, conforman una parte del “pool” de células VM, los autores sugieren que la disminución observada en las frecuencias de la población VM provendría de un menor número de células IM que estarían exportándose a periferia, y no que IL-4 tuviese un aporte directo en la generación de las células T CD8<sup>+</sup> de memoria innata fuera del timo (VM). En concordancia con dichos autores, nuestros datos en ratones IL4KO indican que los OLS analizados de estos animales presentan una tendencia a disminuir las frecuencias de células VM totales comparado a animales WT, sin embargo, los números absolutos de tres experimentos independientes realizados en nuestro grupo indican que no hay diferencias significativas en esta población entre animales deficientes de IL-4 y animales WT, ni en condiciones controles ni post-estímulo con IL-12 e IL-18, por lo que consideramos que dicha tendencia no supondría una disminución real en nuestro modelo.

Conforme a los primeros reportes publicados en timo, observamos que la ausencia de IL-4 en condiciones libres de inflamación afectaría la expresión de Eomes selectivamente en la población VM presente en ambos OLS analizados, comparado a animales WT, mientras que la población TM no se encontraría afectada. Estos datos nos permiten hipotetizar que, en nuestro modelo, la disminución en la expresión de Eomes en las células VM de OLS pueda deberse a la exportación de células IM Eomes<sup>lo</sup> a periferia desde el timo en los animales IL4KO. Sin embargo, estos datos no descartarían que en OLS pueda existir un porcentaje de células VM también dependiente de esta citoquina. Un dato interesante es que el estímulo con IL-12 e IL-18 induce una expresión de Eomes similar entre las células VM de bazo de animales IL4KO y WT, mientras que la población VM presente en GD en este contexto (IL4KO 12+18) no logra incrementar los niveles de este FT. Esto sugeriría que un contexto pro-inflamatorio podría ser capaz de (1) inducir en forma diferencial en los distintos OLS determinadas señales que favorezcan la expresión de Eomes en las células VM, o bien (2) favorecer la redistribución de células VM Eomes<sup>lo</sup> preferencialmente en GD y Eomes<sup>hi</sup> en bazo.

Algunos autores reportan que la expresión de Eomes en las células T CD8<sup>+</sup> con fenotipo de memoria favorecería la expresión de CD122, permitiéndole a estas células responder a IL-15<sup>(108, 112)</sup> Nuestros resultados en animales deficientes en IL-4, si bien mostraron defectos en la expresión de Eomes, no presentaron cambio alguno en la expresión o frecuencias de células VM CD122<sup>+</sup> en condiciones controles o estimulados con IL-12 e IL-18, indicativo de que en un contexto donde IL-4 está ausente, aun en condiciones basales, podrían existir mecanismos alternativos a los descritos capaces de regular la expresión de CD122.

Como se mencionó previamente, existen otras citoquinas que fueron reportadas como importantes inductoras de las células T CD8<sup>+</sup> innatas de memoria como son los IFNs tipo-I<sup>(119)</sup>. Estos interferones serían capaces de estimular la expresión de Eomes y serían importantes inductores de la producción y trans-presentación de la citoquina IL-15 por las DCs<sup>(180-183)</sup>. Teniendo en cuenta lo mencionado, especulamos que en un contexto carente de la señalización de IFNs tipo-I, la población VM se encontraría disminuida respecto a animales WT, o bien presentaría defectos en la adquisición de este fenotipo (expresión de Eomes o CD122). Concordantemente, nuestro análisis del fenotipo de células VM presentes en bazo y GD de animales IFN $\alpha$ RKO reveló que, en ambos OLS, esta población presenta defectos en la expresión de CD122 en condiciones controles. A diferencia de lo reportado por Martinet y colaboradores, la ausencia de señalización de los IFNs tipo-I en nuestro modelo solo afectó la expresión de Eomes de la población VM presente en GD, mientras que los bazos de estos animales no presentaron diferencias respecto a animales WT. Un reporte publicado por Gill y colaboradores demuestra que los IFNs tipo-I no estarían involucrados en la inducción de CD122 en células NK<sup>(184)</sup>. Sin embargo, nuestros datos podrían dar indicios de que la población VM sería dependiente, a diferencia de las NK, de IFNs tipo-I para la adquisición de CD122 en OLS, y subsecuentemente, para responder a IL-15; mientras que la inducción de Eomes en la población VM no dependería de este tipo de citoquinas en bazo, pero si en los GD. Estos datos, junto a los observados en animales IL4KO, resaltarían la redundancia que Eomes podría tener en la inducción de CD122 en la población VM. Observamos, además, que la inducción de una respuesta inflamatoria Th1 con IL-12 e IL-18, lograría revertir el defecto de CD122 en las células VM en bazo, mientras que en los GD dicho estímulo no fue suficiente, aun cuando la expresión de Eomes fue restablecida en este tejido post-IH.

De manera sorprendente, nuestro análisis de las frecuencias y los números absolutos de la población T CD8<sup>+</sup> de memoria en OLS de animales IFN $\alpha$ RKO mostró en ambos tejidos analizados un predominio de la población VM, sobre la TM, comparado a lo observado en animales WT. Estos datos podrían sugerir que en ausencia de IFNs tipo-I, otra citoquina/factor podría inducir la producción de IL-15, tal vez de manera exacerbada, respecto a animales WT. En este sentido, el reporte publicado por Gill y colaboradores, demuestra que animales IFN $\alpha$ RKO infectados con HSV-2 presentan mayores niveles de células productoras de IL-15 que animales WT<sup>(184)</sup>. Estos datos nos permiten hipotetizar que, en ausencia del receptor de IFNs tipo-I, podría existir una producción desregulada de IL-15 en OLS que favorezca el enriquecimiento de la población VM respecto a la población TM, comparado a animales WT, observado en nuestro modelo.

En su conjunto, estos resultados podrían sugerir que los IFNs tipo-I cumplirían un rol importante en la adquisición del fenotipo innato en periferia (células VM), tanto en la adquisición del marcador CD122 en ambos OLS, como en la expresión de Eomes en las células VM de GD, pero que, en su ausencia, algún mecanismo alternativo, tal vez mediado por un incremento en la producción de IL-15, favorecería la expansión de las células VM totales en

bazo y GD. Más aun, en respuesta al estímulo con IL-12 e IL-18 las células VM presentes en los bazos de animales deficientes en la señalización de IFNs alfa y beta, y de animales IL4KO, presentan expresión de CD122 y Eomes semejante a la observada en animales WT, lo cual podría deberse a que el tratamiento con IL-12 e IL-18 logra: (1) estimular mecanismos alternativos a los descritos en la inducción de estos marcadores, o (2) favorecer la recirculación diferencial entre los distintos OLS luego del estímulo.

Un trabajo recientemente publicado postula que determinadas secuencias de cadenas alfa (y posiblemente beta) del TCR de células T CD8<sup>+</sup> de memoria Ag-independientes (CD8-MP TCR, donde “CD8-MP” proviene de “*memory phenotype CD8<sup>+</sup> T cells*”, otra nomenclatura que reciben las células VM e IM) predisponen a la diferenciación de precursores de células T CD8<sup>+</sup> al linaje innato, pero que estos CD8-MP TCRs solo serían expresados por aproximadamente el 65% de las células VM (o MP) encontradas en periferia<sup>(129)</sup>. Utilizando un sistema de ratones transgénicos que expresan distintos CD8-MP TCRs o CD8-Naive TCRs (TCRs que predisponen al fenotipo “naïve” o virgen en periferia), los autores realizan un estudio comparativo donde determinan que existiría una alta afinidad de los CD8-MP TCRs a ligandos propios (sin embargo, no suficiente para que las células sean eliminadas por delección clonal) que les permitiría interactuar con células dendríticas tanto tímicas como esplénicas. Estos tipos de TCR serían distintos a los de los clones con CD8-Naive TCRs que presentan una baja afinidad por los MCH propios como ha sido postulado previamente<sup>(123, 129, 185, 186)</sup>. Este sistema, les permite a los autores demostrar que los timocitos CD8 simples positivos que presentan CD8-MP TCRs adquieren el FT Eomes en timo, mientras que aquellos que contienen CD8-Naive TCRs no lo hacen<sup>(129)</sup>.

Los datos que hemos presentado hasta el momento, dan indicios de la distribución diferencial de células VM en OLS y los efectos que un ambiente pro-inflamatorio tendrían en su generación y expansión en periferia en un contexto de células T CD8<sup>+</sup> policlonal. Sin embargo, nuestro análisis en animales OT-I, enriquecidos en células T CD8<sup>+</sup> Ag-independientes, mostró un incremento significativo en la población VM en bazo y GD en respuesta a IL-12 e IL-18 comparado a lo observado en animales WT, indicando que la respuesta pro-inflamatoria en un contexto Ag-independiente sería más eficiente en expandir la población de células VM que en un sistema policlonal. Ambas subpoblaciones de células T CD8<sup>+</sup> de memoria (VM y TM) presentes en los OLS de animales OT-I expresan Eomes, pero a diferencia de lo observado en animales WT, los niveles de expresión de este FT son notoriamente más bajos. Estos resultados, por un lado, nos permiten hipotetizar, sumados al reporte previamente mencionado de Miller y colaboradores, que existiría un rol parcial del TCR, no mediado por el reconocimiento de un Ag-específico, en la adquisición de Eomes<sup>(129)</sup>, y que tal vez el TCR del clon de células T CD8<sup>+</sup> presentes en animales OT-I no sería reactivo a ligandos endógenos, dificultando la expresión de dicho FT. Los niveles de Eomes presentes en estas células podrían, en ausencia de señales vía TCR, ser sólo inducidos por señales como IL-4 en timo y tal vez en periferia.

Diversos trabajos publicados, demuestran que las células T CD8<sup>+</sup> con fenotipo de memoria (IM y VM) tienen la particularidad de responder en forma constitutiva a estímulos innatos, como IL-12 e IL-18, de manera independiente al reconocimiento de un Ag por el TCR<sup>(101, 102, 113, 168, 187)</sup>. Los mismos trabajos plantean que la respuesta funcional de estas células podría estar mediada a través de receptores de muerte que comparten con las células NK (NKG2D), de la producción de granzimas y perforinas y de la liberación de grandes cantidades de IFN $\gamma$  de manera rápida, en respuesta al estímulo mencionado<sup>(101, 102, 113, 168, 187)</sup>. En este trabajo de tesis, decidimos determinar si la citoquina IFN $\gamma$  podría estar también involucrada en la adquisición del fenotipo innato o en la expansión de las células VM en periferia. Nuestros resultados indican que en ausencia de la misma (animales IFN $\gamma$ KO) se observa en bazo y GD una marcada disminución en la celularidad total respecto a animales WT, la cual ocurriría a expensas de una menor cantidad de células T CD8<sup>+</sup> en los GD. La estimulación con IL-12 e IL-18 indujo la adquisición de un fenotipo de memoria (CD44<sup>hi</sup>) prácticamente en la totalidad de los linfocitos T CD8<sup>+</sup> en GD en los animales IFN $\gamma$ KO, aunque los mismos seguirían representando una población considerablemente menor a la observada en animales WT. Respecto a la inducción de Eomes y CD122, la ausencia de esta citoquina no tendría efectos aparentes sobre la población VM. Los datos presentados nos permitirían hipotetizar que la citoquina IFN $\gamma$ , si bien no participaría en la adquisición de los marcadores fenotípicos Eomes y CD122 de las células VM, podría estar involucrada en la expansión de las mismas en periferia, ya que, en su ausencia, los bazos de estos animales mostraron una disminución significativa de esta población de memoria Ag-independiente comparado a animales WT, mientras que la población TM no se vio afectada. En respuesta a IL-12 e IL-18 la población TM incrementa, mientras que la población de células de memoria virtual demostró ser significativamente menor en ambos OLS analizados comparado a animales WT, siendo prácticamente indetectable en los GD en esta condición, sugestivo de que un contexto inflamatorio Th1 carente de IFN $\gamma$  afectaría la inducción o expansión de las células VM en periferia. Acorde a lo observado, ha sido demostrado que en ausencia de IFN $\gamma$  (animales IFN $\gamma$ KO BALB/c) la respuesta inflamatoria luego de la administración oral de una droga terapéutica inmuno-estimuladora se ve comprometida, observando una disminución significativa en la celularidad total en OLS, afectando principalmente la proporción de células T CD8<sup>+</sup> y NKT<sup>(188)</sup>. Si bien el "*background*" genético de estos animales y los OLS en estudio son diferentes a los utilizados en nuestro modelo, y pese a que los autores no caracterizan las subpoblaciones de células T CD8<sup>+</sup> que están siendo afectadas, este reporte sumado a nuestras observaciones serviría como una primera aproximación de que IFN $\gamma$  podría estar favoreciendo de alguna manera la proliferación de células VM. Nuestros resultados sugieren que IFN $\gamma$  no solo estaría involucrada en la respuesta funcional de las células VM como reporta la bibliografía, sino que, además, podría estar participando en la expansión de estas células en OLS, principalmente en el contexto de una respuesta pro-inflamatoria, sin tener efectos directos en la inducción de CD122 o Eomes en esta población. Si bien hasta el momento no hay trabajos publicados que relacionen directamente a IFN $\gamma$  en la inducción de células IM o

VM, ha sido reportado que esta citoquina favorecería la inducción de IL-15<sup>(189)</sup>, y que el tratamiento con un agonista de IL-15 logra inducir la expansión de células T CD8<sup>+</sup> CD44<sup>hi</sup> “Ag-independientes” (CD25<sup>-</sup> PD-1<sup>-</sup>, indicativo de la falta de señalización del TCR) tanto en animales WT como IFN $\gamma$ KO<sup>(136)</sup>. A pesar de que este último trabajo no utiliza los mismos marcadores fenotípicos con los que actualmente se identifican las células VM, teniendo en cuenta la expresión de CD44 y su respuesta a estímulos independientes de TCR, consideramos que posiblemente se trate de la misma población. En conjunto, estos datos nos permiten proponer que en un contexto donde IFN $\gamma$  está ausente, los niveles de IL-15 podrían también estar afectados en OLS, dificultando la expansión de las células VM.

Desde el descubrimiento de las células T CD8<sup>+</sup> de memoria Ag-independientes, muchos autores han reportado el importante rol que estas células cumplirían en el control de diferentes tipos de infecciones<sup>(102, 168, 190-192)</sup>, sin embargo, su participación en la respuesta anti tumoral ha sido un campo poco abordado hasta el momento. El último trabajo publicado por Miller y colaboradores demuestra que las células MP (VM en nuestro modelo) logran infiltrar tumores prostáticos en un modelo animal y formarían gran parte de la población T CD8<sup>+</sup> total infiltrante. Además, los autores observan que algunas de ellas expresarían altos niveles de PD-1, pudiendo ser blanco directo de terapias que están en uso actualmente con anticuerpos bloqueantes del eje PD-1/PDL1<sup>(129)</sup>. En este trabajo de tesis observamos que el contexto inflamatorio generado por la IH de IL-12 e IL-18 en animales WT, logra inducir un enriquecimiento significativo en el infiltrado tumoral de células VM siendo la población T CD8<sup>+</sup> predominante en este tejido, comparado a lo que ocurre en animales WT controles. Este efecto indicaría que el tratamiento con las citoquinas, no solo estimularía la funcionalidad de este subtipo celular como fue reportado, sino que, además, favorecería (1) su migración al tumor, o (2) la expansión de las células presentes en el mismo. Los resultados observados en el Capítulo I de esta tesis y reportes previamente publicados nos permiten suponer que la capacidad de las células VM de infiltrar tumores no incrementaría luego del tratamiento pero posiblemente, el estímulo con IL-12 e IL-18 lograría generar un MAT más permisivo al desarrollo de una respuesta inmune inflamatoria, permitiendo su proliferación o expansión en dicho tejido<sup>(193-195)</sup>. Aún quedaría por responder qué ventaja tendrían las células VM sobre las TM para expandirse más libremente dentro del tumor en respuesta al tratamiento evaluado en nuestro modelo. En relación a esto, un trabajo publicado por Watkins *et al.* demuestra que un paso crítico en la eficacia de la respuesta antitumoral de la terapia con IL-12 es la liberación temprana de IL-15 por los macrófagos asociados al tumor (TAMs) dentro del tejido<sup>(196)</sup>. Además, ha sido descrito que las DCs BATF3<sup>+</sup> son importantes productoras de IL-15<sup>(117)</sup>, y serían necesarias dentro del tumor para inducir el tráfico de células T al tejido neoplásico<sup>(197)</sup>. En base a estos reportes, especulamos que quizás luego de la expresión sistémica de IL-12 e IL-18 en nuestro modelo, estos subtipos celulares pudieran ser responsables de la producción y trans-presentación de IL-15 dentro de tumor lo que explicaría la expansión selectiva de células VM infiltrantes que observamos en los modelos tumorales utilizados en nuestro grupo. Más aun, Smeltz y colaboradores han presentado

evidencias de que la citoquina IL-15 induciría la expresión de los receptores de IL-12 e IL-18 (IL-12R e IL-18R, respectivamente) en células T CD8<sup>+</sup> de memoria<sup>(198)</sup>. El aumento del IL-12R y del IL-18R podría favorecer la respuesta funcional y producción de IFN $\gamma$  por parte de las células VM en respuesta a estímulos innatos con citoquinas pro-inflamatorias, participando de manera eficiente en el control de la progresión del tumor como lo demuestran nuestros resultados. En relación a lo mencionado, animales deficientes en IFN $\gamma$  fallaron en inducir una respuesta eficaz contra el tumor luego del estímulo con IL-12 e IL-18. Al mismo tiempo, presentaron frecuencias de células T CD8<sup>+</sup> infiltrantes de tumor significativamente menores que animales WT, caracterizadas particularmente, por un escaso porcentaje de células VM en comparación a lo observado en animales WT 12+18. Múltiples autores han reportado un rol esencial de IFN $\gamma$  en la eliminación de tumores<sup>(199-202)</sup>, pero hasta el momento no existen reportes que asocien directamente el posible aporte de células VM a la inmunidad antitumoral dependiente de IFN $\gamma$ . Algunos trabajos publicados demuestran que la citoquina IFN $\gamma$  induce un incremento de la producción de IL-15 en respuesta a infecciones virales respiratorias y en modelos *in vitro* y *ex vivo* con líneas celulares o células epiteliales de pacientes con cáncer de pulmón tratadas con dicha citoquina pro-inflamatoria<sup>(189, 203, 204)</sup>. En conjunto, estos trabajos y nuestros datos, nos permitirían hipotetizar que tal vez el tratamiento con IL-12 e IL-18 induce la producción y liberación de IL-15 intratumoral, indirectamente a través de IFN $\gamma$  o de manera directa y siendo potenciada por esta última, por lo que, en ausencia de IFN $\gamma$ , el tratamiento con IL-12 e IL-18 utilizado en nuestro modelo no lograría expandir la población de células VM dentro del tumor ni controlar el crecimiento del mismo. Los datos mencionados, resaltarían la importancia de IFN $\gamma$  no solo en la respuesta funcional de las células VM, sino también en la expansión de esta población tanto en OLS (como se mencionó previamente), como dentro del tumor, logrando así un satisfactorio control y eliminación del tejido neoplásico.

Otro mecanismo de las células T CD8<sup>+</sup> de memoria Ag-independientes que podría estar involucrado en la respuesta antitumoral observada es la citotoxicidad mediada por NKG2D u otros receptores de lisis o muerte<sup>(168)</sup>. Nuestro grupo, junto a otros autores, ha demostrado que las células VM expresan NKG2D en condiciones controles, y aún luego de la inducción de una respuesta inflamatoria Th1<sup>(168)</sup>. Acorde a esto, un trabajo con animales transgénicos que poseen células T CD8<sup>+</sup> con TCRs específicos para un auto-Ag (Ag H-Y presente en machos), ha demostrado que las células T CD8<sup>+</sup> que pasan la selección positiva y se encuentran en OLS presentan un fenotipo de memoria activado (CD44<sup>hi</sup> CD122<sup>+</sup>), responden a estímulos innatos con citoquinas como IL-15 para su expansión, y pueden ejercer su actividad citotóxica vía NKG2D u otros receptores de muerte de manera independiente del TCR<sup>(134)</sup>. Ellos reportan que a diferencia de la población T CD8<sup>+</sup> de memoria convencional, estas células expresan DAP12, una molécula adaptadora que señala en las células NK a través de NKG2D, lo que podría darles la particularidad de activarse a través de este receptor independientemente del TCR. Estos autores han descrito en animales WT una población fenotípica y funcionalmente similar a la de los animales

transgénicos, lo que podría sugerir que estas células de memoria-“like” formarían parte de la población T CD8<sup>+</sup> policlonal en condiciones normales<sup>(135)</sup>.

En humanos, la población análoga a las células murinas T CD8<sup>+</sup> de memoria no específicas de Ag, presenta como marcadores fenotípicos característicos en su superficie NKG2A y KIRs, receptores que comparten con las células NK<sup>(115, 133)</sup>. Por otro lado, diversos autores han demostrado que las células que sufren transformación neoplásica, al igual que las células infectadas, expresan ligandos de estrés, los cuales serían reconocidos por los receptores de muerte presentes en las células T CD8<sup>+</sup> de memoria Ag-independientes, como el NKG2D<sup>(123, 133, 168, 205-207)</sup>. Esto remarcaría la importancia que las células VM podrían tener en la respuesta inmune, no solo en un contexto de infección, sino también en la erradicación de tumores.

Actualmente se encuentran en estudio distintos tipos de terapias que buscan favorecer la respuesta citotóxica incrementando la expresión de ligandos del receptor NKG2D en las células blanco a través de vacunas o utilizando células “CAR-T” (células T con receptores antigénicos quiméricos) que tengan incrementada expresión de NKG2D<sup>(208-213)</sup>. Tietze y colaboradores han reportado que distintas inmunoterapias no específicas de Ag (IL-2+IL-12 o IL-2+anticuerpo agonista anti-CD40) inducen una expansión selectiva de células T CD8<sup>+</sup> CD44<sup>hi</sup> CD122<sup>+</sup>, incrementando en las mismas la expresión de NKG2D, y no de CD25 o PD-1<sup>(136)</sup>. Además, utilizando un modelo de carcinoma de riñón Renca (que expresan distintos ligandos de NKG2D), los autores demuestran una capacidad lítica incrementada luego del tratamiento en las células T CD8<sup>+</sup> innatas CD25<sup>-</sup> respecto a las específicas de Ag (CD25<sup>+</sup>). Más aun, dicha citotoxicidad, que es dependiente de NKG2D (e independientes del TCR) estuvo directamente relacionada a un eficaz control en la progresión del tumor<sup>(136, 137)</sup>. Un trabajo basado en la terapia antitumoral con un agonista de IL-15 (ALT-803) demuestra que este tratamiento induce selectivamente una expansión de células T CD8<sup>+</sup> de memoria (CD44<sup>hi</sup>), CD122<sup>+</sup>, incrementando la expresión de NKG2D en las mismas (y no de CD25 o PD1) y favoreciendo su respuesta funcional tanto a través de la producción de IFN $\gamma$  como de la lisis de células tumorales vía NKG2D de manera Ag-independiente<sup>(139)</sup>. Los autores sostienen que la satisfactoria respuesta antitumoral observada en su modelo experimental es mediada por células T CD8<sup>+</sup> innatas y no por células NK. Más aun, indican que la única dosis de ALT-803 provee protección frente a futuros desafíos con células tumorales *in vivo* (recaídas) de manera dependiente de células T CD8<sup>+</sup><sup>(139)</sup>. Estos datos remarcarían la importancia de la citoquina IL-15 en la expansión de células T CD8<sup>+</sup> de memoria no específicas de Ag, aportando evidencias de su rol en la inducción de la expresión de NKG2D en las mismas, y favoreciendo la respuesta inmune antitumoral, estimulando tanto la respuesta funcional de esta población de células vía la producción de IFN $\gamma$ , como la citotoxicidad mediada a través de este receptor de “killing”. Acorde a lo mencionado, nuestros estudios funcionales *ex vivo* realizados con animales OT-I demuestran que una respuesta inflamatoria de tipo Th1, inducida a través de

la IH de los ADNc de IL-12 e IL-18, favorece la activación de células de GD (enriquecidos en la población T CD8<sup>+</sup> Ag-independiente) al entrar en contacto con células tumorales. Teniendo en cuenta que las células blanco no expresan el Ag OVA y el 100% de las células T CD8<sup>+</sup> presentes en las muestras eran OVA-específicas (OVA<sup>+</sup>), especulamos que esta interacción podría darse de manera inespecífica a través del receptor NKG2D expresado en la población efectora. A su vez, los tumores de animales OT-I 12+18 presentaron un mayor infiltrado de células T CD8<sup>+</sup>, con una velocidad media significativamente menor a la observada en tumores OT-I controles, resultado que sugiere que estas células presentan un comportamiento más estático dentro del tejido, lo que les permitiría establecer una interacción estable o duradera con las células tumorales y así poder eliminarlas. A partir de estos resultados, especulamos que en un contexto donde predomina una respuesta de células T CD8<sup>+</sup> Ag-independientes, el tratamiento con IL-12 e IL-18 favorece tanto la expansión de células VM en periferia como su capacidad de interactuar con la célula tumoral y activarse de manera independiente de la señalización del TCR, efectos que pueden estar involucrados en el satisfactorio control del crecimiento del tumor observado en este grupo de animales.

Un trabajo recientemente publicado demuestra que la actividad citotóxica de células T CD8<sup>+</sup> sería estimulada por IFNs tipo-I, ya que la deficiencia del receptor de este tipo de citoquinas específicamente en la población T CD8<sup>+</sup> afectaría la inducción de una respuesta antitumoral eficaz en un modelo de sarcoma inducido por metilcolantreno<sup>(214)</sup>. Contrariamente a este reporte, nuestros datos en animales IFN $\alpha$ RKO, utilizando un modelo de melanoma, no presentan diferencias en la progresión del tumor en condiciones controles, ni en la inducción de una respuesta antitumoral eficaz luego del tratamiento con IL-12 e IL-18 respecto a animales WT, sugiriendo que, posiblemente, la actividad citotóxica en ausencia de IFNs tipo-I pueda ser inducida por otras señales, o que otro tipo de mecanismos antitumorales podrían estar involucrados en este contexto. En relación a lo mencionado, Meresse y colaboradores han reportado que un importante inductor de la respuesta citotóxica TCR-independiente de células T CD8<sup>+</sup> (vía NKG2D), es la citoquina IL-15<sup>(215)</sup>. Teniendo en cuenta lo reportado por Watkins *et al* que sostienen que la liberación temprana de IL-15 inducida por IL-12 es un paso crítico en la eficacia de este tipo de terapias<sup>(196)</sup>, pensamos que, en nuestro modelo, luego de la IH de IL-12 e IL-18 se estimularía la producción de IL-15 intratumoral, favoreciendo la actividad citotóxica de las células VM (que representan el infiltrado T CD8<sup>+</sup> predominante) de manera independiente del TCR posiblemente mediada por NKG2D. El incremento observado en el perfil de activación de las células, sumado a la predominancia de las células VM infiltrantes de tumores 12+18 y la disminución significativa de la velocidad media de las mismas en nuestro modelo, podría explicar la eficaz respuesta antitumoral que presentaron los animales OT-I 12+18 en comparación a los OT-I sin estimular, similar a la observada en animales WT 12+18. Más aun, animales OT-I libres de estímulo lograron controlar más eficazmente la progresión del tumor respecto a animales WT, sugestivo de que las células T CD8<sup>+</sup> de memoria independientes de

Ag podrían estar más involucradas que las Ag-específicas (TM) en el control del crecimiento del tumor.

Algunos trabajos publicados demuestran que las células cancerígenas de diversos tipos de tumores disminuyen por presión selectiva la expresión de antígenos específicos del tumor y de moléculas del MHC clase I, evadiendo la respuesta inmune de células T CD8<sup>+</sup> específicas<sup>(216, 217)</sup>. Ciertos autores demuestran que existe una correlación positiva entre el infiltrado de células T CD8<sup>+</sup> en el sitio del tumor y un mejor pronóstico del paciente, y proponen el uso del análisis de este tipo de infiltrado como un marcador de buen pronóstico de la enfermedad, lo que se conoce como “*immunoscore*”<sup>(218-220)</sup>. Estudios publicados en los últimos años, indicarían que sólo una mínima fracción de células T CD8<sup>+</sup> infiltrantes en pacientes serían específicas a Ag presentados por el tumor<sup>(221, 222)</sup>. Acorde a los reportes mencionados, y teniendo en cuenta los resultados presentados en nuestro trabajo, consideramos que la población T CD8<sup>+</sup> de memoria Ag-independiente podría representar una importante línea de defensa contra el cáncer a través de sus receptores de muerte. La respuesta T CD8<sup>+</sup> Ag-independiente cobraría suma importancia en este tipo de patologías frente a la respuesta específica de Ag que podría quedar desmantelada por la ausencia de MHC-I y la pérdida de expresión de Ag tumorales en algunos tejidos neoplásicos. En relación a esto, estudios preliminares de nuestro grupo de investigación revelan menores frecuencias de células T CD8<sup>+</sup> innatas en sangre periférica de pacientes oncológicos en estadios avanzados de la enfermedad, comparado a las presentes en donantes sanos. Más aun, estudios publicados por el grupo de Barbarin y colaboradores, indican que las células T CD8<sup>+</sup> con fenotipo de memoria están presentes en tumores ováricos y en fluidos derivados del mismo. También demuestran que estarían presentes en NLs drenantes de tumores de mama, y que el tratamiento quimioterapéutico en estas pacientes estimularía el incremento en las frecuencias de las células en estudio (resultados preliminares)<sup>(115)</sup>, colaborando posiblemente con la eficiencia de la terapia. El grupo de investigación de Tietze y colaboradores demostró por inmunohistoquímica en biopsias de tumores (melanoma) de pacientes que recibieron terapia local con Imiquimod (agonista del receptor tipo *Toll-7*, o “TLR7”) o vehículo, que la estimulación no específica de Ag (Imiquimod) indujo un incremento en el infiltrado de células con características fenotípicas similares a T CD8<sup>+</sup> de memoria Ag-independientes observadas en ratones (CD8<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>) respecto a lo observado en tumores de pacientes tratados con vehículo<sup>(136)</sup>. Más aun, demuestran que células de sangre periférica con este fenotipo, tienen una ventaja funcional frente a estímulos “innatos” con citoquinas observados *in vitro* respecto a células T CD8<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup>, y teniendo en cuenta que en humanos las células T CD8<sup>+</sup> expresan constitutivamente el NKG2D, los autores plantean que, similar a lo que ocurre en ratones, la citotoxicidad mediada por este receptor podría favorecer a la eficacia de la terapia antitumoral<sup>(136)</sup>.

La leucemia mieloide crónica (LMC) es un desorden mieloproliferativo que presenta células iNKT defectuosas en la producción de IL-4<sup>(223, 224)</sup>. Un trabajo publicado por Jacomet y colaboradores reportan en sangre periférica de pacientes con LMC, al momento del

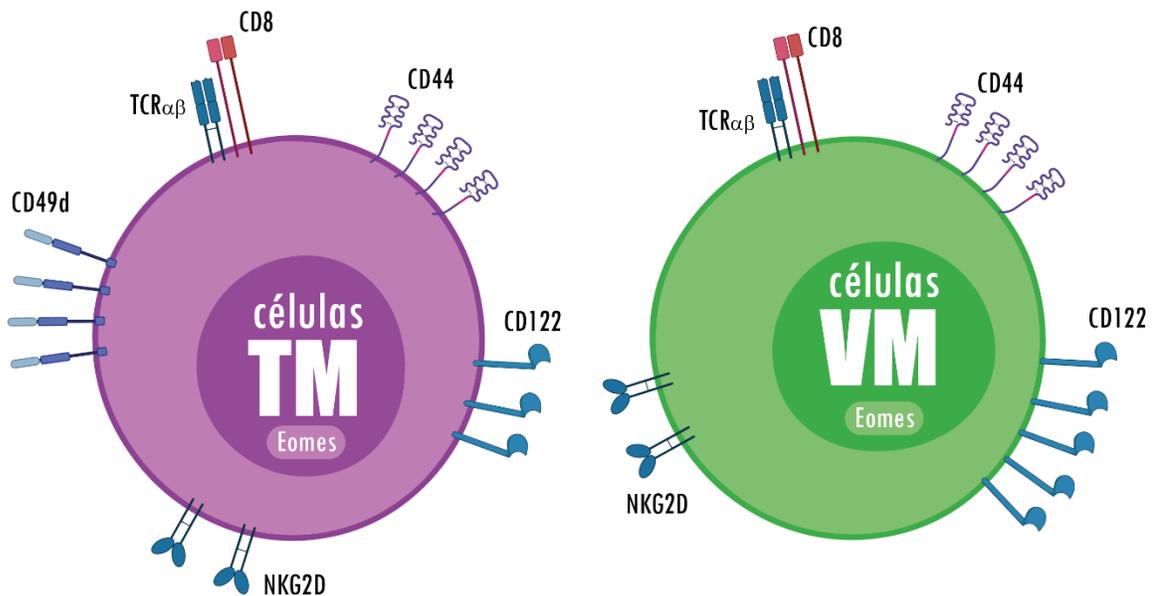
diagnóstico, una disminución significativa en el “pool” de células T CD8<sup>+</sup> innatas y en su capacidad funcional, en comparación a lo observado en donantes sanos<sup>(225)</sup>. La disminución de células T CD8<sup>+</sup> Ag-independientes en pacientes con defectos en la producción de IL-4, sumado a los reportes previamente mencionados, resaltarían la importancia que IL-4 tendría en la generación de estas células, tanto en ratones como en humanos. Por otro lado, los autores demuestran que, luego del tratamiento, pacientes con LMC en remisión completa reestablecen la población T CD8<sup>+</sup> innata y su capacidad funcional, además de recuperar la actividad de células iNKT en producir IL-4<sup>(225)</sup>. Estos datos en conjunto resaltarían el posible rol que las células T CD8<sup>+</sup> Ag-independientes podrían tener en el control de la patología.

Teniendo en cuenta los resultados presentados, hipotetizamos que, similar a lo observado en nuestro modelo experimental, un contexto pro-inflamatorio, como el que se utiliza en la mayoría de las inmunoterapias oncológicas actuales, podría favorecer el infiltrado de células VM (o análogas en humanos) dentro del tumor, posiblemente ligado a la liberación temprana de IL-15 dentro del mismo en respuesta a IL-12. Además, consideramos que estas células tendrían un elevado potencial antitumoral debido a que: (1) expresan constitutivamente los receptores para IL-12 e IL-18, importantes promotores de la producción temprana de IFN $\gamma$  y (2) presentan altos niveles de expresión de CD122, que les aportarían a las mismas la sensibilidad a IL-15, favoreciendo, no solo su expansión, sino también la actividad citotóxica vía NKG2D y posterior eliminación de células tumorales de manera independiente de Ag. Estos resultados, alentarían a la búsqueda de inmunoterapias oncológicas que favorezcan la liberación intratumoral de citoquinas como IL-12, IL-15 e IFN $\gamma$ , que favorezcan la expansión y respuesta funcional de células análogas a las VM murinas en humanos, pudiendo representar una alternativa prometedora principalmente para aquellos tumores que evaden la respuesta inmune adaptativa, como es el caso de pacientes que han sido sometidos a sucesivas rondas de quimioterapia.

## CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

## CONCLUSIONES

El trabajo realizado en esta tesis estuvo abocado al estudio y a la caracterización de células T CD8<sup>+</sup> innatas en periferia (células VM), a determinar su posible participación en la respuesta antitumoral y a analizar las alteraciones que esta población Ag-independiente puede sufrir en diferentes contextos y/o condiciones. Fenotípicamente, las poblaciones de células T CD8<sup>+</sup> de memoria son muy similares, y para su correcta identificación en periferia se utiliza el análisis de la integrina CD49d, ausente en las células VM, pero presentes en las células TM (Figura 48). En este trabajo de tesis, determinamos que las células VM presentan en condiciones libres de estímulo una expresión de CD122 significativamente mayor que la población de memoria convencional (TM) (Figura 48), resaltando la importancia que la citoquina IL-15, que señala vía dicho marcador, tiene en la inducción de la población innata en periferia.

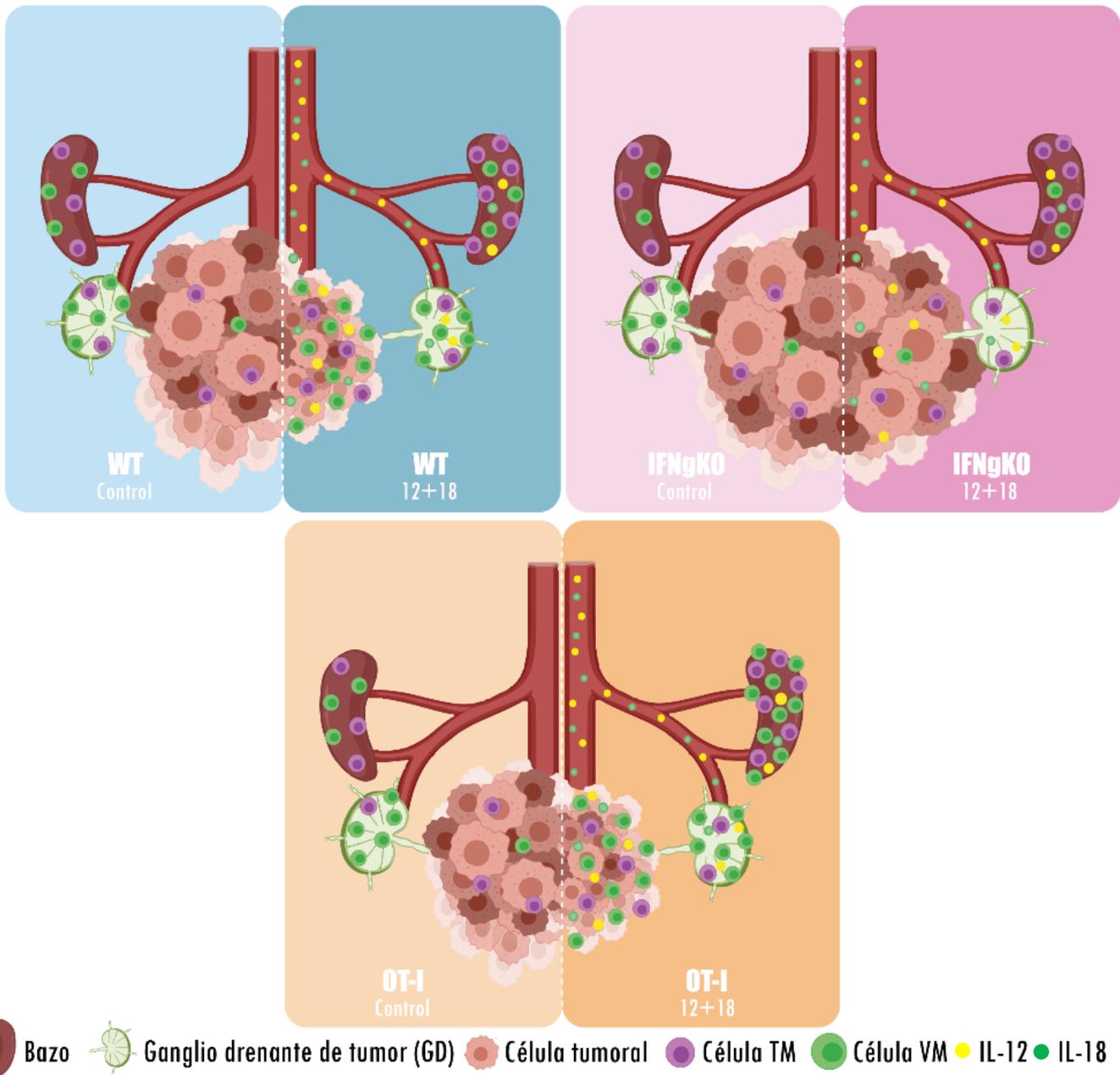


**Figura 48:** Esquema representativo de las características fenotípicas de células T CD8<sup>+</sup> de memoria convencional (TM) y virtual (VM). Las células T CD8<sup>+</sup> se diferencian a TM en OLS luego de la activación mediada por el encuentro del TCR con su Ag específico, en presencia de otras señales. Además de presentar un TCR de cadenas alfa y beta (TCR $\alpha\beta$ ) y un co-receptor CD8, las células TM se caracterizan por presentar una alta expresión del marcador de memoria CD44, acompañado por la expresión de CD122, NKG2D, el factor de transcripción Eomesodermina (Eomes) y CD49d, una alfa-integrina expresada luego de una señalización robusta y sostenida vía TCR. Por otro lado, las células VM son generadas de manera independiente a la activación a través del TCR y presentan un fenotipo similar al observado en la población TM. A diferencia de estas últimas, las células VM carecen de CD49d, reforzando su origen "innato", y presentan una mayor expresión de CD122, resaltando la importancia que IL-15 podría tener en la inducción de este subtipo celular.

A lo largo de este trabajo, identificamos una distribución diferencial de la población T CD8<sup>+</sup> de memoria en OLS, siendo las células VM predominantes en nódulos linfáticos, mientras que en bazo prima la población específica de Ag o TM, posiblemente ligado a la

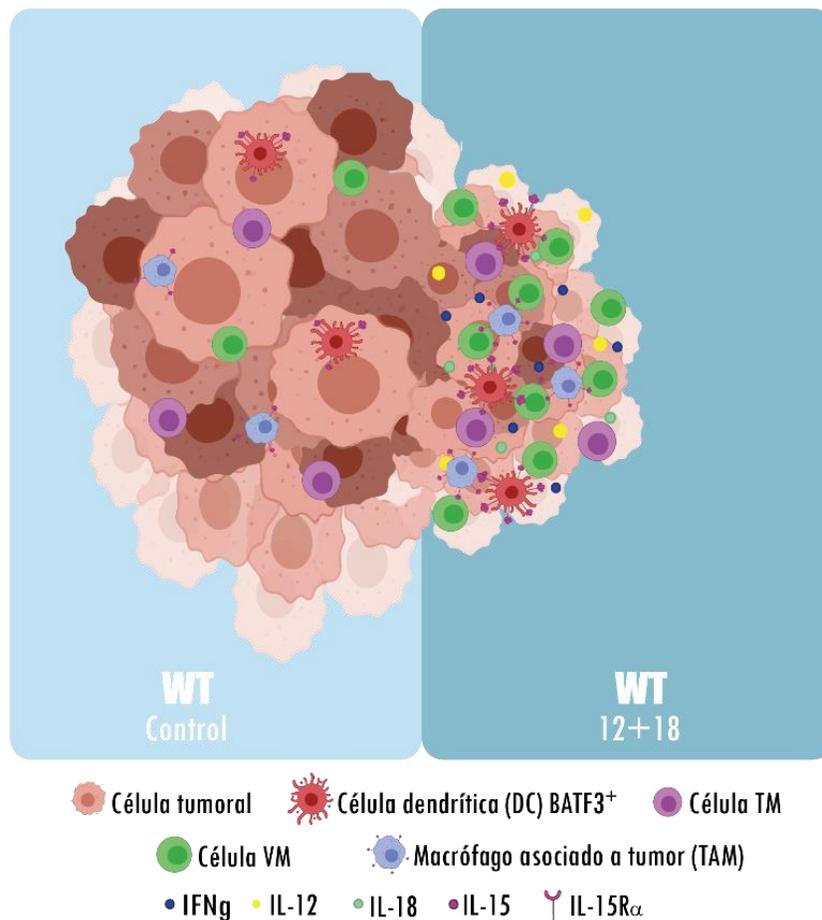
disposición de IL-15 y células IL-15R $\alpha^+$  que difiere entre los distintos tejidos. Además, determinamos que la inducción de un contexto inflamatorio tipo Th1 altera esta distribución, favoreciendo la expansión de la población TM total (sin modificar la VM), e incrementando las frecuencias de la población VM CD122 $^+$  en ambos OLS. Más aún, favorece el enriquecimiento de las células VM totales y CD122 $^+$  dentro del tumor, resultando la población CD8 $^+$  de memoria preponderante en este tejido. El aumento en la población VM intratumoral se asoció a un efectivo control del crecimiento del tejido neoplásico, sugiriendo que las células T CD8 $^+$  innatas podrían estar participando en la respuesta anti tumoral (Figura 49 A) a través de la producción de IFN $\gamma$  y/o de mecanismos citotóxicos, posiblemente mediados por NKG2D. En un contexto donde IFN $\gamma$  está ausente, nuestros resultados revelaron defectos en la inducción/expansión de la población VM en periferia, sugiriendo que esta citoquina no solo estaría involucrada en la respuesta funcional de este subtipo celular como reporta la bibliografía, sino que, además, podría estar participando en su generación o proliferación en OLS, principalmente en un ambiente pro-inflamatorio. Las bajas frecuencias de células VM en OLS e infiltrantes de tumor en estos animales (IFN $\gamma$ KO) estuvo correlacionada a la falla en la inducción de una respuesta antitumoral eficaz en respuesta a IL-12 e IL-18, comparada a la observada en animales WT (Figura 49 B).

El análisis realizado en animales enriquecidos en células T CD8 $^+$  Ag-independientes (OT-I), demostró que en estos ratones donde prima la respuesta de células T CD8 $^+$  no dependiente del TCR, un contexto pro-inflamatorio genera, por un lado, una expansión de las células VM en OLS en mayor medida que lo que ocurre en animales WT, y por otro, un eficaz control del crecimiento del tumor, al igual que en un sistema policlonal (animales WT) (Figura 49 C). Más aun, el estímulo con IL-12 e IL-18 en este contexto favorecería el establecimiento de una interacción entre estas células y las células tumorales e incrementaría la respuesta funcional de las células innatas, la cual podría ser mediada por receptores como NKG2D, de manera independiente a la activación vía TCR.



**Figura 49:** Esquema representativo del efecto de la terapia con IL-12 e IL-18 en la población de linfocitos T CD8<sup>+</sup> de memoria en periferia. Animales C57BL/6 WT, IFN $\gamma$ KO y OT-I portadores de tumores B16 fueron hidrodinámicamente inyectados con la cantidad correspondiente de plásmidos para IL-12 e IL-18 o control, y 7 días posteriores los bazos, ganglios drenantes de tumor y los tumores fueron colectados y procesados para su estudio. Este esquema representa la distribución diferencial de las poblaciones T CD8<sup>+</sup> de memoria convencional (TM: CD8<sup>+</sup> CD44<sup>hi</sup> CD49d<sup>+</sup>) y memoria virtual (VM: CD8<sup>+</sup> CD44<sup>hi</sup> CD49d<sup>lo</sup>) entre los distintos OLS y dentro del tejido neoplásico en condiciones libres de estímulo (paneles de la izquierda) y en respuesta a IL-12 e IL-18 (paneles de la derecha), además del efecto de este tratamiento en la respuesta antitumoral en animales (A) WT, (B) IFN $\gamma$ KO y (C) OT-I.

Los resultados de este trabajo de tesis sumados a los reportes bibliográficos nos permiten hipotetizar que el tratamiento con IL-12 e IL-18 podría inducir la producción y liberación de IL-15 por TAMs y/o DCs BATF3<sup>+</sup> dentro del tejido neoplásico (de manera directa a través de IFN $\gamma$ , o indirectamente y siendo potenciada por esta CQ), favoreciendo preferencialmente el reclutamiento, inducción o expansión de células sensibles a IL-15 (CD122<sup>+</sup>) dentro del tumor, como es el caso de la población VM, y que éstas, a través de mecanismos citotóxicos (mediados por NKG2D u otros receptores de *killing*) o vía la producción de IFN $\gamma$  colaborarían en el control del crecimiento del tumor (Figura 50).



**Figura 50:** Mecanismo propuesto para la respuesta antitumoral mediada por células VM inducida en respuesta a IL-12 e IL-18. Arriba: tumor de animales WT libres de estímulo, debajo: tumor de animales WT inyectados hidrodinámicamente con IL-12 e IL-18.

### PERSPECTIVAS

A partir de los resultados obtenidos en este trabajo de tesis se pretende continuar con un estudio exhaustivo de la expresión de un panel completo de citoquinas en OLS y dentro del tumor, en condiciones libres de estímulo y en respuesta a IL-12 e IL-18, que permitan comprender las diferencias en las frecuencias de la población VM entre los distintos tejidos. Estos estudios podrían aportar evidencia de otras señales, no reportadas hasta el momento, involucradas en la inducción de las células T CD8<sup>+</sup> Ag-independientes en periferia. Además, pueden realizarse estudios complementarios *ex vivo* e *in vitro* a fin de determinar la capacidad citotóxica de las células VM mediada por receptores de muerte, al reconocer y eliminar células blanco que expresen ligandos de estrés, permitiendo reflejar el rol que la población innata podría desempeñar en la respuesta antitumoral.

Por otro lado, se continuará trabajando en un proyecto de colaboración con oncólogos de la Clínica Reina Fabiola en el estudio de las células T CD8<sup>+</sup> innatas en muestras de pacientes con cáncer de mama y colon, que cursan diferentes estadios de la enfermedad y que están siendo sometidos, o no, a diversos tratamientos quimioterapéuticos. Este análisis comparativo permitirá realizar una correlación entre la terapia recibida, el infiltrado de células T CD8<sup>+</sup> Ag-independientes y el pronóstico de la enfermedad.

El entendimiento de los mecanismos involucrados en la generación, expansión y activación de este subtipo celular permitiría a futuro el diseño de inmunoterapias oncológicas que puedan favorecer la proliferación y respuesta funcional de las células T CD8<sup>+</sup> innatas dentro del tumor, colaborando en el control de la progresión de la patología. Consideramos que esta población celular puede ser una herramienta inmunológica o mediador terapéutico importante, principalmente en aquellos pacientes con cánceres avanzados, cuyos tumores disminuyen la expresión de Ag específicos del tumor luego de sucesivas rondas de quimioterapia, evadiendo la respuesta T convencional.

# MATERIALES Y MÉTODOS

## ANIMALES

Para la realización de los distintos experimentos, se utilizaron animales C57BL/6 cepa salvaje (“*Wild Type*” (WT)) o genéticamente modificados, de 6 a 7 semanas de edad, endocriados en el Bioterio del CIBICI-CONICET (Centro de Investigaciones en Bioquímica Clínica e Inmunología, CONICET).

Los animales C57BL/6 genéticamente modificados utilizados en este trabajo se detallan a continuación: Ratones deficientes en receptores de Interferones tipo-I alfa (IFN $\alpha$ R KO, *lfnar1tm1Ag*), provistos generosamente por el Instituto Pasteur. Animales IL4KO, deficientes en la citoquina Interleuquina (IL)-4 (C57BL/6J-IL-4tm1Nnt) provistos por el laboratorio de la Dra. Silvia Digenaro (Originalmente provenientes de The Jackson Laboratory (Bar Harbor, EE.UU.)). Ratones deficientes en la citoquina Interferón gamma (IFN $\gamma$ KO, B6.129S7-*lfnngtm1Ts/J*), ratones reporteros FoxP3-EGFP (B6.Cg-Foxp3tm2Tch/J, donde las células que expresan el factor de transcripción FoxP3 adquieren fluorescencia verde por expresión de la proteína fluorescente verde mejorada EGFP) y ratones OT-I (C57BL/6-Tg (*TcraTcrb*) 1100Mjb/J) fueron provistos por The Jackson Laboratory. En los ratones OT-I el receptor de las células T (TCR) reconoce los residuos 257-264 de Ovoalbúmina (OVA) en el contexto de H2Kb. Para los experimentos de esta tesis fueron seleccionados aquellos animales OT-I que presentaban entre un 90-100% de células T con la cadena V $\beta$ 5 del TCR (la cual reconoce específicamente los residuos mencionados del antígeno OVA).

El cuidado de los animales fue llevado a cabo según los procedimientos descriptos en la “Guía para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio” (NIH National Institute of Health – EEUU. Publicación N $^{\circ}$  86-23, 1985) en las siguientes condiciones: 22 $^{\circ}$ C de temperatura ambiente, ciclos de 12hs de luz/oscuridad (comenzando a las 7am) en condiciones libres de patógenos, contando con acceso *ad libitum* a alimento balanceado comercial y agua potable estéril. El bioterio de CIBICI-CONICET recibió la aprobación de los Institutos Nacionales de Salud de los EEUU (NIH) (número de certificación A5802-01, OLAW, NIH, EE. UU).

Los procedimientos experimentales desarrollados en este trabajo fueron aprobados por el Comité Institucional de Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Nacional de Córdoba (CICUAL-FCQ) (Resoluciones del Honorable Consejo Directivo: 249/16 y 843/18)

## LÍNEAS CELULARES

Para el desarrollo de esta tesis se utilizaron diversas líneas celulares tumorales murinas singénicas con ratones de la cepa C57BL/6. Las líneas celulares B16-F10 (B16, melanoma) y EL4 (linfoma) fueron obtenidas de ATCC (“American Type Culture Collection”, Manassas, Virginia, EE.UU.). La línea celular KPC (Adenocarcinoma ductal pancreático) fue utilizada en el laboratorio del Dr. Emmanuel Donnadieu (INSERM U1016, Institut Cochin,

Paris, Francia), proveniente del aislamiento e inmortalización de células partir de un tumor pancreático de animales de la cepa C57BL/6 KPC. Todas las líneas fueron expandidas y mantenidas en el laboratorio de cultivo celular del CIBICI-CONICET, en estufas a 37°C y 5% CO<sub>2</sub>.

Las líneas celulares adherentes B16 y KPC se mantuvieron en cultivo utilizando el medio de cultivo DMEM o DMEM/F12, respectivamente, completos (es decir: complementado con 10 % de Suero fetal bovino (SFB), L-Glutamina (2mM), Gentamicina (40µg/mL), mientras que las células EL4 se mantuvieron en RPMI completo.

En todos los casos, las líneas celulares utilizadas fueron negativas para infección con Mycoplasma, testado por PCR cada 12 meses (Realizado por la Dra. Laura Gatica del Stan de Cultivo Celular del CIBICI).

### REACTIVOS QUÍMICOS

Los reactivos químicos utilizados para esta tesis se encuentran detallados en la Tabla 1.

REACTIVO QUÍMICO	COMPANÍA
2-PROPANOL	Sintorgan (Argentina)
4',6-DIAMIDINO-2-PHENYLINDOLE DIHYDROCHLORIDE" (DAPI)	
ACETATO DE FORBOL MIRISTRATO (PMA)	Sigma-Aldrich Chemical Co (EEUU)
ÁCIDO SULFÚRICO	Cicarelli (Argentina)
AGAROSA DE BAJA TEMPERATURA DE GELIFICACIÓN	Sigma-Aldrich Chemical Co (EEUU)
ALBÚMINA SÉRICA BOVINA (BSA)	Sigma-Aldrich Chemical Co (EEUU)
AZUL DE TRIPÁN	Sigma-Aldrich Chemical Co (EEUU)
BREFELDINA	eBioscience (EEUU)
BUFFER CYTOFIX/CYTOPERM	BD Bioscience
BUFFER DE LISIS ACK	
BUFFER FOSFATO SALINO (PBS)	
CARBONATO DE POTASIO	Cicarelli (Argentina)
CARBONATO DE SODIO	Anedra (Nueva Zelanda)
CLORURO DE AMONIO	Taurus (Argentina)
CLORURO DE SODIO	Anedra (Nueva Zelanda)
DMEM	GIBCO/Stan CIBICI
DMEM/F12	GIBCO
ENDOFREE PLASMID MAXI KIT	QIAGEN (Países Bajos)
ETANOL	Dorwill (Argentina)

EXTRACTO DE LEVADURA	Britania (Argentina).
FOXP3 STAINING BUFFER SET	eBioscience (EEUU)
GENTAMICINA	Schering-Plough
GLUTAMINA (GLUTAMAX)	GIBCO
HBSS	GIBCO
HEPARINA LIBRE DE ADITIVOS DE 5.000 U/ML	Fada Pharma
IONOMICINA	Sigma-Aldrich Chemical Co (EEUU)
ISOFLUORANO	Abbott (EEUU)
LÍQUIDO DE MONTAJE "FLUOR SAVE TM"	Sigma-Aldrich Chemical Co (EEUU)
MONENSINA	eBioscience (EEUU)
PARAFORMALDEHÍDO (PFA)	
RESINA DE INCLUSIÓN OCT	Sakura (Holanda)
RPMI 1640	GIBCO/Stan CIBICI
SACAROSA	Taurus (Argentina)
SOLUCIÓN FISIOLÓGICA	Roux-Ocefa S.A.
SOLUCIÓN TAMPÓN (BUFFER) PARA LISAR GLÓBULOS ROJOS (TRIS-CLORURO DE AMONIO)	Sigma-Aldrich Chemical Co (EEUU)
SOLUCIONES PERM/WASH	eBioscience (EEUU)
SUERO FETAL BOVINO (SFB)	NATOCOR (Argentina)
TMB	BD Opteia (EEUU)
TRIPSINA	Sigma-Aldrich Chemical Co (EEUU)

**Tabla 1:** Reactivos químicos utilizados en el desarrollo de esta tesis, y empresa de la cual fueron obtenidos.

#### MODELO TUMORAL IN VIVO.

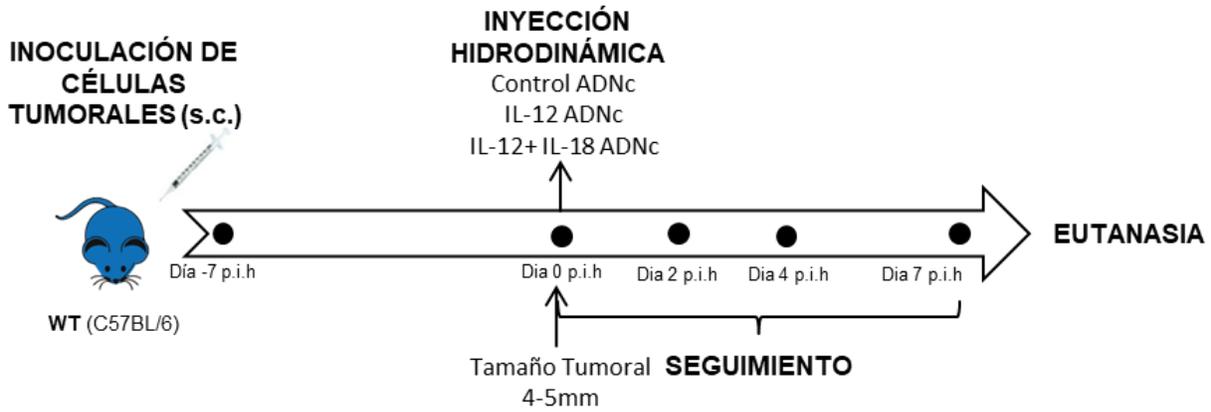
Las líneas celulares tumorales singénicas con animales de la cepa C57BL/6 fueron crecidas y expandidas en cultivo como se describió anteriormente, hasta alcanzar el número de células necesarias para realizar el experimento. Los animales de 5 a 7 semanas de edad fueron anestesiados con 35  $\mu$ L de Isoflurano y rápidamente rasurados en el flanco izquierdo con ayuda de una máquina de afeitar e inoculados de forma subcutánea con 100  $\mu$ L de suspensiones de solución fisiológica estéril conteniendo  $1 \times 10^6$  células (B16 o EL4) o  $10 \times 10^6$  células (KPC) utilizando jeringas descartables de 1mL 25G "BD Ultrafine".

Los tumores fueron medidos al día 0, 2, 4 y 7 post-inyección hidrodinámica (pIH) utilizando un calibre, y los volúmenes correspondientes a cada uno calculados de la siguiente manera:

$$\text{Volumen tumoral} = (d^2 \times D)/2,$$

donde "d" corresponde al diámetro menor y "D" al diámetro mayor del tumor.

Al día 7 pIH luego de realizar la eutanasia de los animales, los tumores fueron cuidadosamente extraídos y pesados en una balanza analítica, previo a su procesamiento.



**Figura 51: Modelo murino experimental.** Brevemente, animales de la cepa C57BL/6 salvajes y/o transgénicos fueron afeitados e inoculados subcutáneamente en el flanco izquierdo con una suspensión de la línea celular tumoral correspondiente (B16, EL4 o KPC). Una vez que los tumores alcanzaron un diámetro entre 4-5mm, realizamos la inyección hidrodinámica de plásmidos vacíos (grupo control), codificantes para IL-12 (grupo IL-12) o codificantes para IL-12 e IL-18 (grupo 12+18). Se realiza el seguimiento del crecimiento tumoral midiendo los diámetros mayor y menor del mismo hasta el día 7 post-inyección hidrodinámica, día en que se realiza la eutanasia de los animales.

### INYECCIÓN HIDRODINÁMICA DE PLASMIDOS CODIFICANTES PARA IL-12 E IL-18

La expresión sistémica de las citoquinas IL-12 e IL-18 se indujo utilizando un protocolo de transfección génica transitoria por inyección hidrodinámica endovenosa de vectores de expresión (ADNc desnudo) que codifican para las citoquinas IL-12 e IL-18 reportado previamente por Rodríguez-Galán y colaboradores a ratones C57BL/6 WT de 6 a 8 semanas de edad<sup>(60, 62, 226, 227)</sup>.

La transferencia génica mediante inyección hidrodinámica fue realizada cuando los tumores alcanzaron 4-5mm de diámetro (considerado como día 0). Para ello, los plásmidos de expresión para las citoquinas de interés fueron inyectados en la vena de la cola del animal en un volumen de 1,6 ml de solución de cloruro de sodio 0,9% estéril y apirógena (solución fisiológica) en 8 segundos. De esta manera, se genera la saturación del gasto cardíaco en el animal, favoreciendo la acumulación de la solución en la vena cava inferior e induciendo la circulación retrógrada de la misma. La alta presión hidrostática del líquido facilita la incorporación del plásmido en distintos tejidos, principalmente en hígado debido a su estructura expandible y a sus capilares fenestrados. Una vez integrados en los hepatocitos

los plásmidos serán transcritos, induciendo niveles sistémicos elevados y sostenidos en el tiempo de dichas proteínas, por aproximadamente una semana<sup>(144)</sup>.

Se trabajó con tres grupos experimentales: (1) grupo control: inyectado con solución fisiológica, (2) grupo IL-12: tratado con 1 µg de ADNc de IL-12 (este plásmido es una fusión de las secuencias que codifican para la subunidad p40 y p35, permitiendo la producción de IL-12 con actividad biológica, conocida como subunidad IL-12 p70) o (3) grupo 12+18: tratado con 1 µg de ADNc de IL-12 más 10 µg de ADNc de IL-18 (pDEF pro-IL-18). Los bazo, ganglios drenantes y no drenantes de tumor y tumores fueron colectados 7 días pIH para su estudio. Para monitorear la efectividad de la inyección se evaluaron 2 parámetros: 1) los niveles séricos de IL-12 por la técnica de ELISA a las 24hs pIH; y 2) el tamaño de los bazo al día 7pIH, teniendo en cuenta que la expresión sistémica de IL-12 induce esplenomegalia, según fue reportado previamente en trabajos del grupo<sup>(228)</sup>.

### PROCESAMIENTO DE TEJIDOS Y OBTENCIÓN DE SUSPENSIONES CELULARES

Al día 7pIH se realizó la eutanasia de los animales y se obtuvieron los diferentes tejidos (bazo, ganglios drenantes y no drenantes de tumor, y tumores) según correspondiese. Los mismos fueron disgregados mecánicamente de manera individual utilizando mallas estériles descartables “Filtrabag”, resuspendidos en solución tampón PBS, PBS + 2% SFB o RPMI completo y mantenidos en hielo hasta su uso.

Los ganglios linfáticos (drenantes o no drenantes de tumor) fueron resuspendidos en 2mL de solución PBS + 2% SFB y mantenidos en hielo hasta su utilización. Los bazo fueron resuspendidos en 5mL de PBS y centrifugados durante 5 minutos a 1800rpm. Los sobrenadantes fueron descartados y los esplenocitos resuspendidos en 5mL de buffer de lisis ACK durante 5-7 minutos. Posteriormente la lisis fue interrumpida con PBS y las muestras centrifugadas nuevamente (5 minutos a 1800rpm). Finalizado el lavado, los sobrenadantes fueron descartados, las células resuspendidas en 5mL de PBS + 2% SFB y mantenidas en hielo hasta su uso.

Para conocer la concentración de células viables en las suspensiones obtenidas se realizaron diluciones 1/20 (ganglios linfáticos) y 1/200 (bazo) de las mismas con azul de tripán y fueron contadas utilizando Cámaras de Neubauer en un microscopio óptico con objetivo 10x. Los protocolos de citometría de flujo de superficie se realizaron marcando  $1 \times 10^6$  células de cada muestra según correspondiese, mientras que para la citometría de flujo intracelular/intranuclear se utilizaron  $3 \times 10^6$  células/muestra.

Los tumores una vez obtenidos fueron pesados utilizando una balanza analítica y disgregados como se mencionó previamente. Para los ensayos de cultivo celular fueron resuspendidos en una relación 0.2g tumor/5mL en RPMI completo. Para llevar a cabo los protocolos de citometría de flujo, las muestras de tumor fueron resuspendidas en una

relación de 1g de tumor/7mL de PBS + 2% SFB. En todos los casos las muestras fueron mantenidas en hielo hasta su uso.

## TÉCNICAS GENERALES

### PURIFICACIÓN DE PLÁSMIDOS LIBRES DE ENDOTOXINA

Las bacterias *Escherichia coli* (*E. coli*) transformadas con los plásmidos conteniendo las secuencias de interés fueron expandidas en medio Luria Bertani (LB) utilizando para su selección el antibiótico ampicilina. Para purificar el ADNc se utilizó el kit comercial “*Endofree Plasmid Maxi Kit*” (Qiagen, Limburgo, Países Bajos) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Este kit permite obtener plásmidos libres de endotoxina en caso de que hubiese una posible contaminación con lipopolisacáridos (LPS).

El procedimiento de purificación fue monitoreado a partir de alícuotas tomadas de los distintos pasos de lavado y fracciones de elución a lo largo del mismo. El ácido nucleico fue precipitado con isopropanol y la calidad del producto obtenido fue controlada mediante electroforesis en gel de agarosa. Por último, la concentración de ADNc fue medida por espectrofotometría utilizando el equipo “Bio-tek Synergy™HT Multi-Detection” (BioTek Instruments, EEUU).

### CITOMETRIA DE FLUJO

Para el desarrollo de esta tesis se llevaron a cabo diversos protocolos de citometría de flujo, descriptos a continuación. Los anticuerpos utilizados se detallan en la Tabla 2 al final de esta sección.

### **CITOMETRIA DE FLUJO DE SUPERFICIE**

Para el estudio de la expresión de marcadores de superficie de leucocitos, se utilizaron anticuerpos monoclonales marcados con diferentes fluorocromos (ver Tabla 2), provenientes de las empresas BD, eBioscience, Invitrogen, Proimmune, Molecular Probes o Biolegend. En todos los casos la suspensión de células obtenidas de bazo (libre de glóbulos rojos), ganglios drenantes o no drenantes de tumor y/o tumores fue incubada por 30 minutos a 4°C en oscuridad con una mezcla de los diferentes anticuerpos en buffer para citometría (FACS Flow Buffer), previa marcación con la sonda de viabilidad *Zombie Aqua* (Biolegend) en PBS, por 15 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente las células fueron lavadas con PBS, centrifugadas por 5 minutos a 1800rpm y resuspendidas en buffer FACS. Las muestras fueron adquiridas en un citómetro de flujo FacsCanto II BD o BD LSR Fortessa (BD

Becton Dickinson) y los análisis se realizaron utilizando el programa FlowJo VX (Tree Star, Inc.).

### **CITOMETRIA DE FLUJO INTRACELULAR**

Para la detección intracelular de citoquinas, las células fueron estimuladas en cultivo como se describe en “ENSAYO DE FUNCIONALIDAD DE CÉLULAS CD8<sup>+</sup> INFILTRANTES DE TUMOR”. Las células fueron recolectadas e incubadas con la sonda de viabilidad, y posteriormente, con anticuerpos para marcas de superficie como se mencionó anteriormente. Luego fueron fijadas y permeabilizadas con el buffer *Cytofix/Cytoperm* (catálogo 554722, BD Biosciences) y teñidas con los anticuerpos correspondientes (anti-IFN $\gamma$ ).

Para análisis del receptor de quimiocinas CCR5 se utilizó el mismo protocolo, pero en células sin estimular (*ex vivo*), las cuales fueron incubadas con anticuerpos anti-CCR5 PE (BD) en buffer FACS.

Luego de la incubación, todas las células fueron lavadas y resuspendidas en buffer FACS. Las muestras fueron adquiridas en un citómetro FACS Canto II BD o BD LSR Fortessa y los análisis se realizaron utilizando el programa FlowJo VX (Tree Star, Inc.).

### **CITOMETRIA DE FLUJO INTRANUCLEAR**

Para la citometría de flujo intranuclear se utilizaron los reactivos del set de marcación intranuclear de FOXP3 de eBiosciences. En primer lugar, se realizó la marcación de viabilidad y superficie de las células como fue descrito anteriormente. Luego fueron fijadas y permeabilizadas siguiendo el protocolo de citometría de flujo intranuclear de eBiosciences y posteriormente incubadas por 45 minutos a 4°C en oscuridad con los anticuerpos de interés (anti-Eomes o anti-Ki67) resuspendidos en el reactivo *Perm Buffer* incluido en el kit. Luego de la incubación las células fueron lavadas y resuspendidas en buffer FACS. Las muestras fueron adquiridas en un citómetro FACS Canto II BD o BD LSR Fortessa, y los análisis fueron realizados utilizando el programa FlowJo VX (Tree Star, Inc.).

Marca	Conjugado	Clon	Aplicación	N° Catalogo	Empresa
CCR5	PE	C34-3448	CF		eBioscience
CD4	APC	RM4-5	CF	553729	BD Bioscience
	FITC	RM4-5	CF	553051	BD Bioscience
CD8	AlexaFluor700	53-6.7	CF	100730	Biolegend
	PerCP-eFluor710	53-6.7	IF	46-0081-82	eBioscience

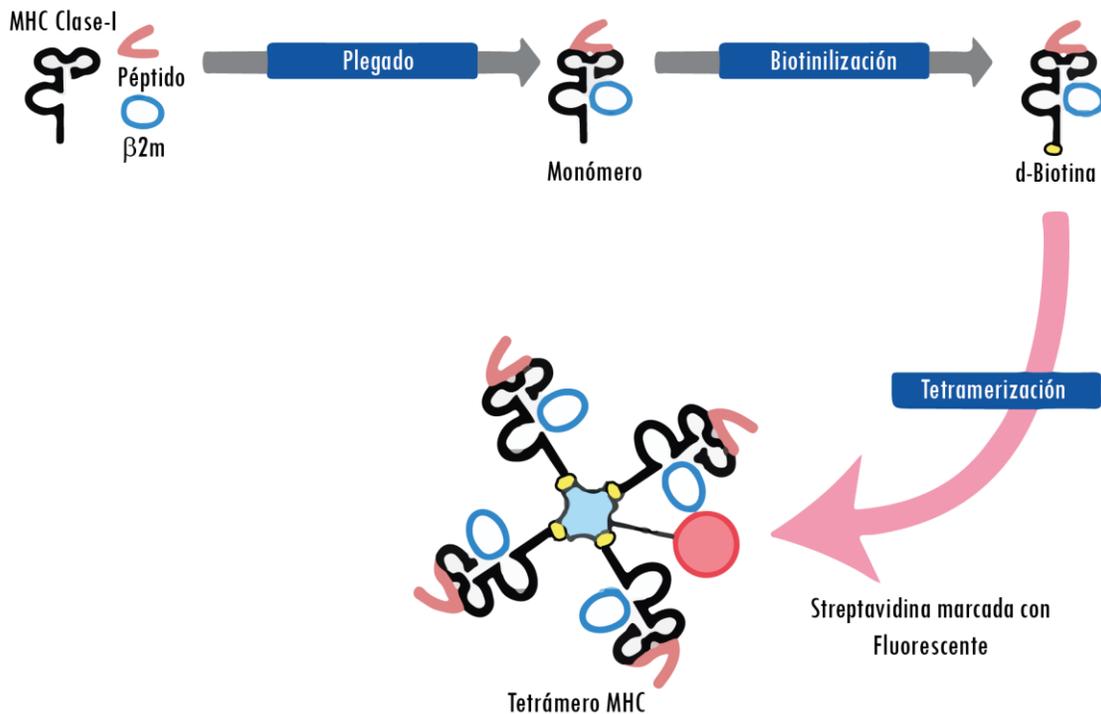
CD11b	APC	M1/70	CF	553312	BD Bioscience
CD19	PE	1D3	CF	09655A	BD
CD31 (PECAM)	Purificado	M-20	IF		Santa Cruz
CD44	FITC	IM7	CF	0441-84	eBioscience
CD45	APC-Cy7	30-F11	CF	103116	Biolegend
CD49d	PE-Cy7	R1-2	CF	103618	Biolegend
CD122	PE-Cy5	TM- $\beta$ 1	CF	123220	Biolegend
Eomes	PE	Dan11mag	CF	12-4875-82	eBioscience
EpCAM	BV421	G8.8	IF	563214	BD Horizon
Fura2/AM	-	-	IF	F1221	Molecular Probes
gp38	eFluor660	8.1.1	IF	50-5381-82	eBioscience
Gr-1	PE	RB6-8C5	CF	553128	BD Bioscience
IFN $\gamma$	APC	XMG1.2	CF	17-7311-eB	eBioscience
IgG1k	AlexaFluor 546	A11030	CF	833292	Invitrogen
Ki67 (Isotipo IgG1k)	Purificado	B56	CF	550609	BD Bioscience
NKG2D	APC		CF		
TCRvb5.1, 5.2	PE	MR9-4	CF	553190	BD Bioscience
Tetrámero OVA	APC		CF	HP/1436-06	ProlImmune
	BV421		CF		NIH
Zombie Aqua	BV510	-	CF	423102	Biolegend

**Tabla 2:** Anticuerpos y sondas utilizadas a lo largo de esta tesis doctoral para ensayos de Citometría de Flujo (CF) e Inmunofluorescencia (IF).

### DETERMINACIÓN DE CÉLULAS T ESPECÍFICAS PARA OVOALBÚMINA (OVA) EN ANIMALES OT-I

Para la determinación de células T CD8<sup>+</sup> con un TCR específico para el antígeno SIINFEKL (257-264) de la Ovoalbúmina (OVA) de animales OT-I, se realizaron ensayos de citometría de flujo de superficie siguiendo los pasos anteriormente descritos, pero marcando previo a la tinción de superficie el tetrámero de H-2kb (CMH-I de la cepa C57BL/6) conjugado con el péptido SIINFEKL y el fluorocromo APC o BV421. Luego de la incubación las células fueron lavadas, marcadas para antígenos de superficie (y antígenos intranucleares si correspondiese) y resuspendidas en buffer FACS. Las muestras fueron adquiridas en un citómetro FACS Canto II BD o BD LSR-Fortessa y los análisis realizados utilizando el programa FlowJo VX (Tree Star, Inc.).

Previo a la realización del experimento, para corroborar la pureza de animales OT-I, a las 4 o 5 semanas de edad se obtuvieron muestras de 0.1mL de sangre en tubos cónicos conteniendo 5 $\mu$ L de heparina sódica 5000UI/ml. Las muestras fueron centrifugadas a 2000rpm durante 5 minutos, el sobrenadante fue descartado y las células incubadas durante 5-7 minutos con buffer de lisis para eliminar los glóbulos rojos. Finalizada dicha incubación, las células fueron lavadas con buffer PBS, centrifugadas durante 5 minutos a 2000rpm e incubadas con anticuerpos marcados con diferentes fluorocromos dirigidos contra las moléculas CD8, CD4 y TCR $\nu\beta$  5.1/5.2 (que reconoce la porción del TCR específica para OVA). Se eliminaron los anticuerpos remanentes (no unidos a células) mediante un lavado con buffer FACS y centrifugado a 2000rpm durante 5 minutos. Posteriormente las células fueron resuspendidas en buffer FACS y adquiridas en un citómetro FACS Canto II BD. Los análisis se realizaron utilizando el programa FlowJo VX (Tree Star, Inc.). Para la realización de los experimentos, fueron seleccionados animales OT-I con un porcentaje de células T CD8<sup>+</sup> V $\beta$ 5<sup>+</sup> de entre un 90-100%.



<http://www.mblintl.com/tetramer/classITetramers.aspx>

**Figura 52:** *Diagrama de la generación de los tetrámeros.* Se purifican las proteínas de las cadenas MHC-I, la β2-microglobulina (β2m), y el péptido de interés. Los mismos son plegados para generar monómeros del complejo MHC-I/péptido. Se acopla el sistema de detección (biotina) a la cadena pesada de los monómeros y los mismos son purificados en columnas cromatográficas. Posteriormente se genera la tetramerización de los monómeros MHC/péptidos a partir de la unión de las biotinas a moléculas de estreptavidina conjugadas a un fluorocromo.

## ELISA

### **OBTENCIÓN DE MUESTRAS DE PLASMA PARA LA MEDICIÓN DE CITOQUINAS**

Para determinar los niveles plasmáticos de IL-12 luego de la inyección hidrodinámica del ADNc codificante para la misma, se extrajeron aproximadamente 0,2ml de sangre de la cola de los animales en tubos cónicos "Eppendorf" con 5 μl de anticoagulante Heparina sódica 5000UI/ml (FADA PHARMA, Argentina) a las 24hs post inyección. Las muestras fueron centrifugadas 5 minutos a 5000 rpm y el plasma fue separado en tubos cónicos de 0,5ml y almacenado a -80 °C hasta su análisis por ELISA.

### ***OBTENCIÓN DE SOBRENADANTES DE CULTIVO PARA LA MEDICIÓN DE CITOQUINAS***

Los sobrenadantes de los diferentes cultivos estudiados se extrajeron luego de centrifugar la placa de cultivo por 5 minutos a 1800 rpm, se colocaron en tubos cónicos de 2ml y se guardaron a -80°C hasta el momento del análisis.

#### ***ELISA***

Para la detección de citoquinas IL-12 (BioLegend, San Diego, CA, EEUU) y TGF- $\beta$  (RyD System) en muestras de plasma o sobrenadantes de cultivo (respectivamente), se utilizaron kits de ELISA comerciales de acuerdo a las instrucciones del fabricante.

En primer lugar, se sensibilizaron placas de 96 pocillos de medio volumen con el anticuerpo de captura específico para cada citoquina, diluido en buffer de sensibilización (buffer carbonato pH 9,6, o fosfato pH 7,2 según indicación del fabricante) y se incubaron toda la noche a 4° C. En ambos casos, luego de lavar 3 veces con buffer de lavado (PBS-0,05% Tween-20), las placas fueron incubadas con buffer de bloqueo (PBS-10% SFB) durante 1 h en cámara húmeda a temperatura ambiente.

Las muestras y la curva estándar, fueron incubadas por duplicado, durante 2 horas a temperatura ambiente o toda la noche a 4°C en cámara húmeda. Finalizada la incubación, las placas fueron lavadas 4 veces y fue adicionado el anticuerpo secundario biotinilado por 1h a temperatura ambiente. Posteriormente, se eliminó el exceso de anticuerpo mediante un lavado y las muestras fueron incubadas con estreptavidina-HRP durante 30 minutos. Se realizaron 7 lavados y la reacción se reveló agregando peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) y sustrato 3,3',5,5'-tetramethylbenzidina (TMB) (BD OptEIA™, EEUU). La reacción se detuvo con H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2N y se determinó la absorbancia a una longitud de onda de 450 nm en el lector de placas Microplate Reader 450 (BioRad, EEUU). La determinación de la concentración de las muestras fue realizada utilizando el programa GraphPad Prism8 (GraphPad Software, San Diego, EE.UU.)

#### **CULTIVO CELULAR**

Ratones C57BL/6 Foxp3-EGFP portadores de tumores B16, de grupos controles o IL-12 fueron sacrificados a los 7 dpiH. Los tumores fueron extraídos, pesados en una balanza analítica, disgregados utilizando mallas descartables estériles “Filtrabag” y resuspendidos en una relación 0.2g tumor/5mL en RPMI (suplementado como se describió previamente).

### ***ENSAYO DE LA SUPRESIÓN INMUNE INDUCIDA POR EL TUMOR***

Para el análisis de la capacidad proliferativa de las células, se tomaron alícuotas de 600 $\mu$ L de las suspensiones celulares. Las mismas fueron lavadas con PBS para eliminar el SFB contenido en el medio de cultivo (el cual interfiere con la sonda de viabilidad “*Zombie Aqua*”), y sometidas al protocolo de marcación por citometría de flujo intranuclear previamente descrito, utilizando un anticuerpo primario purificado IgG1K anti-Ki67 y un anticuerpo secundario anti-IgG1k Alexa Fluor 546 (Invitrogen).

Para el análisis de la producción de TGF- $\beta$ , se tomaron alícuotas de 50 $\mu$ L de las suspensiones celulares y se colocaron en placas de cultivo de 96 pocillos en presencia de PMA (50ng/ml) e Ionomicina (1  $\mu$ g/ml) durante 5 horas en RPMI completo, en estufas de cultivo a una atmósfera constante de 5% de CO<sub>2</sub> y 37 °C. Finalizadas las horas de cultivo se centrifugaron las placas a 2000rpm durante 5 minutos. Los sobrenadantes fueron recolectados y almacenados en tubos cónicos a -80°C hasta el momento de su análisis por ELISA para la determinación de las citoquinas de interés (IL-12 y TGF $\beta$ ).

### ***ENSAYO DE FUNCIONALIDAD DE CÉLULAS CD8<sup>+</sup> INFILTRANTES DE TUMOR***

Alícuotas de 600 $\mu$ L de las suspensiones celulares (homogenatos de 0.2g tumor/5mL de RPMI completo) se colocaron en placas de cultivo de 96 pocillos en presencia de PMA (50ng/ml) e Ionomicina (1  $\mu$ g/ml) durante 5 horas en estufas de cultivo a una atmósfera constante de 5% de CO<sub>2</sub> y 37 °C. En las últimas 4 horas de cultivo se añadieron 5 $\mu$ g/ml de Brefeldina A y 1 $\mu$ M Monensina. Finalizado el tiempo del cultivo, las células fueron recolectadas en tubos fondo en U y sometidas al protocolo de marcación para citometría de flujo intracelular para la detección de IFN $\gamma$ .

Para análisis del receptor de quimiocinas CCR5 las células sin estimular fueron sometidas al protocolo de marcación de citometría de flujo intracelular, incubadas con anticuerpos anti-CCR5 PE (BD).

## **MICROSCOPIA**

### ***PREPARACIÓN DEL TEJIDO PARA INMUNOFLUORESCENCIA***

Siete días posteriores a la inyección hidrodinámica, los ratones C57BL/6 WT portadores de tumor de grupos control o IL-12 fueron sacrificados. Los tumores EL4 o B16 fueron cuidadosamente extraídos con un escalpelo y sumergidos en Paraformaldehído (PFA) al 4% a 4°C durante toda la noche para su fijación. Posteriormente fueron deshidratados en

una solución de Sucrosa (Sigma-Aldrich) al 30% a 4°C durante 48hs, lavados con PBS e incluidos en la resina OCT (Sakura, Holanda) hasta su uso (mantenidos a -20°C). Los cortes de tumor fueron realizados en el criostato Shandom Cryotomo E (Thermo Fisher Scientific) con un espesor de 10µm, montados sobre portaobjetos silenizados (StarFrost®, Alemania). Los mismos se dejaron secar a temperatura ambiente por una hora y luego fueron almacenados a -20°C hasta su uso.

Los tumores KPC fueron cuidadosamente extraídos de animales OT-I de grupos control o 12+18 al día 7 post- inyección hidrodinámica.

Para estudiar el infiltrado y localización de células CD8<sup>+</sup> dentro de los tumores KPC, los mismos fueron fijados con una solución PLP (PFA 1%, Lisina, Periodato de sodio (NaIO<sub>4</sub>) en PBS) durante 2hs a temperatura ambiente, lavados con PBS e incluidos en agarosa de bajo punto de gelificación (Tipo VII-A, Sigma Aldrich) al 5% en PBS.

Para estudios del comportamiento del infiltrado tumoral de células CD8<sup>+</sup> *ex vivo* los tumores KPC fueron incluidos en fresco en agarosa de bajo punto de gelificación al 5% en PBS y mantenidos en RPMI sin rojo fenol, suplementado con 10% SFB, en hielo.

En ambos casos, los cortes de 200µm del tumor se realizaron utilizando un Vibrotomo VT 1000S (Leica) en baño PBS a 4°C. Los cortes de tumores KPC fijados se mantuvieron en una solución de PBS y Azida sódica 0.01% a 4°C hasta su uso. Los cortes de tumores KPC frescos se mantuvieron en RPMI suplementado, en hielo hasta su uso, dentro de las 4hs de extraídos del animal.

#### ***INMUNOFLUORESCENCIA DE TUMORES B16 Y EL4***

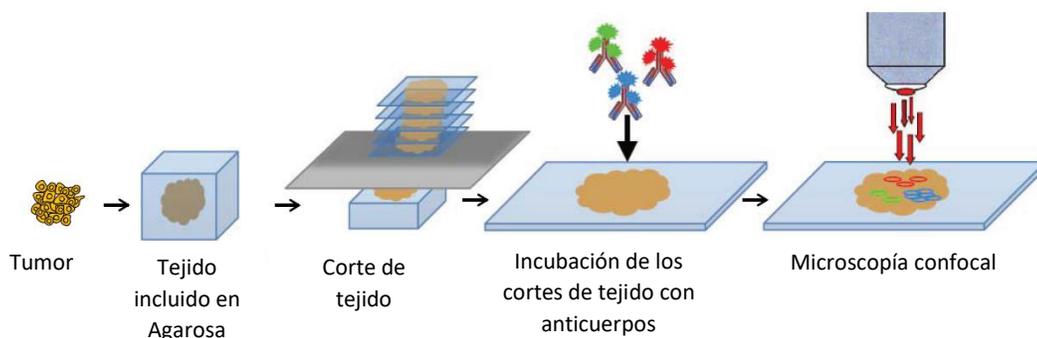
Crio secciones de 10 µm de tumores B16 o EL4 se equilibraron a temperatura ambiente, se lavaron 2 veces con PBS y se bloquearon con buffer de bloqueo (10% BSA, 0.3% Tritón en PBS) por 1h en cámara húmeda. Los cortes fueron incubados con los Acs primarios anti-CD45 y anti-CD31 (PECAM) durante 1h 30 minutos en cámara húmeda a temperatura ambiente. Luego, las muestras se lavaron 3 veces con PBS y posteriormente, fueron incubadas con los anticuerpos secundarios conjugados a fluorocromos por 1 h a temperatura ambiente. Por último, los preparados fueron lavados y los núcleos celulares teñidos con 4',6-diamino-2-fenilindol (DAPI). Finalmente, los vidrios fueron montados en *FluorSave<sup>TM</sup>* (Calbiochem®-Merck KGaA, Darmstadt, Alemania). Las imágenes de los distintos estudios histológicos realizados se capturaron usando un microscopio confocal laser-scanning (Olympus FV1200, Tokyo, Japón). Las imágenes fueron analizadas utilizando el programa FIJI ImageJ.

#### ***INMUNOFLUORESCENCIA DE TUMORES KPC Y ENSAYOS DE MIGRACIÓN DE CD8<sup>+</sup> EX-VIVO***

Las secciones de 200 $\mu$ m de tumores KPC fueron colocados sobre filtros organotípicos de 0.4 $\mu$ m (Millicel, Millipore) para su marcación con anticuerpos. Para ello, se posa cuidadosamente un anillo metálico rodeando el tejido (formando un pocillo) y en el centro del mismo se coloca la solución conteniendo los anticuerpos de interés en las diluciones correspondientes. Se realiza la incubación durante 15 minutos en estufa a 37°C, luego se lava con PBS para retirar el excedente de anticuerpos y se posan sobre portaobjetos para su análisis por microscopía.

Para los tumores fijados utilizamos anticuerpos dirigidos contra las moléculas CD8, gp38 (marcador de fibroblastos, delimitando el estroma del tejido) y EpCAM (marcador de células tumorales); los mismos se encuentran detallados en la *Tabla 2*). Las muestras fueron adquiridas en un microscopio confocal vertical DM500B equipado con un cabezal confocal SP5 “Spinning Disk” (Leica) y una cámara termostata a 37°C. Las imágenes fueron obtenidas utilizando una magnificación 25x y la herramienta “Scan Slide” para obtener una imagen completa de distintas secciones del tumor. Las mismas fueron reconstruidas y analizadas con el programa FIJI ImageJ. Para el análisis se calculó el área de tumor total, y el ocupado por cada tipo celular. A partir de ellos se determinó el porcentaje del área tumoral infiltrado por células T CD8<sup>+</sup> en cada una de las secciones analizadas.

Para el análisis de la migración de células CD8<sup>+</sup> residentes de tumor los anticuerpos utilizados fueron: anti-CD8, anti-EpCAM y anti-gp38 (ver detalles en *Tabla 2*). Posterior a la tinción y el lavado, los cortes se situaron cuidadosamente sobre placas de Petri de 6cm, fueron asegurados con un ancla de corte de acero inoxidable (Warner Instruments) y se perfundieron a una velocidad de 1ml/min con una solución de RPMI sin rojo fenol, burbujeado con 95% de O<sub>2</sub> y 5% de CO<sub>2</sub>. Diez minutos después, imágenes de un primer campo microscópico fueron adquiridas con un objetivo de inmersión en agua con una magnificación 25x (Olympus, 20x/0.95 NA). Se capturaron planos de 6-10 secciones (z= 5-7  $\mu$ m) adquiriendo imágenes cada 30 segundos durante 20–40 min, llegando a profundidades de hasta 80  $\mu$ m dentro del corte de tumor. Las regiones de tumor fueron seleccionados para la toma de imágenes cuando el parénquima tumoral, estroma y las células CD8<sup>+</sup> estaban presentes simultáneamente en el mismo campo. El análisis de las imágenes obtenidas se realizó en el Centro de Imagen Cochin (Institut Cochin, París) a partir de un análisis de imagen 3D en planos x, y z usando la plataforma Imaris 7.4 (Bitplane AG).



**Figura 53:** *Diagrama de la generación de cortes de tumor para análisis de la migración del infiltrado tumoral ex vivo. Las muestras de tumor son incluidas en Agarosa 5% en PBS para la obtención de los tacos. Los mismos son cortados en Vibrotomo con un espesor de 200 $\mu$ m. Dichos cortes se incuban con los anticuerpos de interés durante 15 minutos a 37°C. Posteriormente son lavados para extraer el exceso de anticuerpos y se posan sobre un portaobjetos para su análisis utilizando un microscopio confocal vertical DM500B equipado con un cabezal confocal SP5 “Spinning Disk” (Leica) y una cámara termostatzada a 37°C.*

### ENSAYO DE MOVILIDAD DE CALCIO

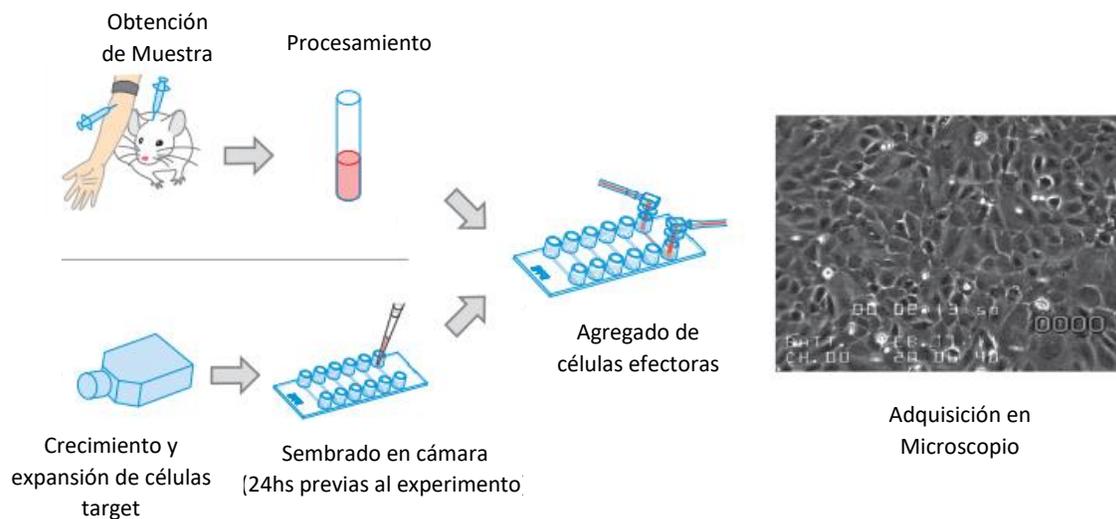
Para realizar el ensayo de movilidad de calcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ), 24 horas previo a la realización del experimento, células KPC (target) fueron sembradas en cámaras “IBIDI  $\mu$ -Slide VI 0.1” (IBIDI, Gräfelfing, Alemania) en una relación de  $0.05 \times 10^6$  células/ $25 \mu\text{L}$  RPMI sin rojo fenol por línea, para obtener al momento del ensayo una confluencia del 60%. Cada línea de la cámara se completó a  $100 \mu\text{L}$  y se mantuvieron en estufa a  $37^\circ\text{C}$  y 5%  $\text{CO}_2$ .

Luego de 7 días de la inyección hidrodinámica, los ratones OT-I de grupos controles o 12+18 fueron sacrificados y los ganglios drenantes de tumor extraídos. Los mismos fueron disgregados en PBS con 5% SFB y mantenidos en hielo. Las células fueron contadas con azul de Tripán en una dilución  $\frac{1}{2}$ , y cargadas con la sonda Fura-2/Acetoximetil ester (AM) (Fura-2) (Molecular Probes)  $2 \mu\text{M}$  (2x) en HBSS (Gibco) a una concentración final de  $1 \times 10^6$  células/mL. Se incubaron durante 30 minutos en un baño a  $37^\circ\text{C}$  y luego se lavaron con una solución de HBSS y 10% BSA. Las células fueron contadas nuevamente con azul de Tripán  $\frac{1}{2}$ , resuspendidas en RPMI sin rojo fenol de manera de obtener  $0.5 \times 10^6$  células cada  $100 \mu\text{L}$ , y fueron mantenidas en hielo y oscuridad hasta su uso.

Para realizar el ensayo de medición de calcio se agregaron  $100 \mu\text{L}$  de células de ganglio (efectoras) por línea y se realizó inmediatamente la adquisición en un microscopio TE2000 (Nikon) a  $37^\circ\text{C}$  con una magnificación 25x, utilizando el software MetaFluor Imaging System (Universal Imaging). Se seleccionaron campos representados por “islotos” o aglomeraciones de células tumorales separados por “canales” o zonas libres de células target, y sobre ellas se realizaron 80 capturas cada 10 segundos por línea, excitando la muestra a 350 y 380nm y adquiriendo las imágenes de emisiones a 510nm (longitud de onda de emisión de la sonda unida a calcio) y el espectro visible (para obtener el contraste de células blanco). La relación de las intensidades de fluorescencia emitidas a 510nm luego de las excitaciones a 350 y 380nm fueron utilizadas para medir la variación en el flujo de calcio intracelular utilizando herramientas del programa MetaFluor Analyst, y correlacionadas a la concentración de calcio dentro de las mismas.

La unión del calcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ) a la sonda está acompañada por una variación en su intensidad de fluorescencia y un desplazamiento en el espectro de excitación de la misma.

Esta unión induce un incremento en la fluorescencia emitida a 510nm por excitaciones a 360nm que correlacionan con una disminución en la fluorescencia luego de la excitación a longitudes de onda mayores a 360nm. Cuando los linfocitos se activan, la concentración intracelular de calcio y su intensidad de fluorescencia por excitaciones a longitudes de onda cercanas a 360nm incrementa. La medición de la intensidad de fluorescencia a 510nm luego de la excitación a ambas longitudes de onda permite determinar la concentración absoluta de calcio, independientemente de la concentración de la sonda en la célula, como la intensidad de fluorescencia a 350nm/ intensidad de fluorescencia a 380nm.



**Figura 54:** *Diagrama del ensayo de migración de Calcio con Fura-2/AM. Se siembran las células blanco (KPC) 24 horas previo a la realización del experimento en las líneas de cámaras IBIDI. Se obtienen las muestras de interés (células efectoras) luego de 7 días de la inyección hidrodinámica, se procesan y las células se cuentan y se cargan con la sonda Fura-2/AM (Molecular Probes). Posteriormente, las células fueron contadas nuevamente, resuspendidas en RPMI sin rojo fenol y adicionadas por línea. Inmediatamente se realiza la adquisición en un microscopio TE2000 (Nikon) a 37°C, utilizando el programa "MetaFluor Software".*

## ANÁLISIS ESTADÍSTICO

El análisis estadístico se realizó utilizando el software GraphPad Prism (versión 8.00). En todos los casos, los datos obtenidos de los distintos grupos fueron sometidos al Test de ROUT ( $Q=1$ ) y Test de Grubbs ( $\alpha=0.05$ ) para detección de valores atípicos ("outliers"). Posteriormente se analizó la distribución normal de los datos con el Test de Normalidad de Shapiro Wilk, y la homogeneidad de las varianzas correspondiente a cada grupo según el Test

F. Teniendo en cuenta los resultados arrojados por estos Tests, se utilizó el Test T de Student (cuando ambos supuestos se cumplen), Test de Welch (para datos con distribución normal cuyas varianzas no son homogéneas) o Test de Mann-Whitney (cuando dichos supuestos no se cumplen) para el análisis estadístico del peso tumoral, y de los distintos parámetros analizados por citometría de flujo entre los grupos en estudio. El análisis del crecimiento tumoral a distintos tiempos pIH fue realizado utilizando el Test ANOVA de dos vías. Los resultados se presentaron como media  $\pm$  error estándar de la media (SEM). Valores de \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$ , \*\*\*\*  $p < 0,0001$  fueron considerados estadísticamente significativos.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell*. 2000 Jan 7;100(1):57-70. PubMed PMID: 10647931.
2. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*. 2011 Mar 4;144(5):646-74. PubMed PMID: 21376230.
3. Gallucci S, Matzinger P. Danger signals: SOS to the immune system. *Current opinion in immunology*. 2001 Feb;13(1):114-9. PubMed PMID: 11154927.
4. Dunn GP, Bruce AT, Ikeda H, Old LJ, Schreiber RD. Cancer immunoediting: from immunosurveillance to tumor escape. *Nat Immunol*. 2002 Nov;3(11):991-8. PubMed PMID: 12407406.
5. Dunn GP, Old LJ, Schreiber RD. The immunobiology of cancer immunosurveillance and immunoediting. *Immunity*. 2004 Aug;21(2):137-48. PubMed PMID: 15308095.
6. Dunn GP, Old LJ, Schreiber RD. The three Es of cancer immunoediting. *Annual review of immunology*. 2004;22:329-60. PubMed PMID: 15032581.
7. Khong HT, Restifo NP. Natural selection of tumor variants in the generation of "tumor escape" phenotypes. *Nat Immunol*. 2002 Nov;3(11):999-1005. PubMed PMID: 12407407. Pubmed Central PMCID: 1508168.
8. Vesely MD, Kershaw MH, Schreiber RD, Smyth MJ. Natural innate and adaptive immunity to cancer. *Annual review of immunology*. 2011;29:235-71. PubMed PMID: 21219185.
9. Greaves M, Maley CC. Clonal evolution in cancer. *Nature*. 2012 Jan 18;481(7381):306-13. PubMed PMID: 22258609. Pubmed Central PMCID: 3367003.
10. Dvorak HF, Weaver VM, Tlsty TD, Bergers G. Tumor microenvironment and progression. *Journal of surgical oncology*. 2011 May 1;103(6):468-74. PubMed PMID: 21480238. Pubmed Central PMCID: 3277953.
11. Schiavoni G, Gabriele L, Mattei F. The tumor microenvironment: a pitch for multiple players. *Frontiers in oncology*. 2013;3:90. PubMed PMID: 23616948. Pubmed Central PMCID: 3628362.
12. Kerkar SP, Restifo NP. Cellular constituents of immune escape within the tumor microenvironment. *Cancer Res*. 2012 Jul 1;72(13):3125-30. PubMed PMID: 22721837. Pubmed Central PMCID: 6327310.
13. Schreiber RD, Old LJ, Smyth MJ. Cancer immunoediting: integrating immunity's roles in cancer suppression and promotion. *Science*. 2011 Mar 25;331(6024):1565-70. PubMed PMID: 21436444.

14. Trinchieri G, Rengaraju M, D'Andrea A, Valiante NM, Kubin M, Aste M, et al. Producer cells of interleukin-12. *Immunology today*. 1993 May;14(5):237-8. PubMed PMID: 8100137.
15. Medzhitov R. Toll-like receptors and innate immunity. *Nature reviews Immunology*. 2001 Nov;1(2):135-45. PubMed PMID: 11905821.
16. Gately MK, Desai BB, Wolitzky AG, Quinn PM, Dwyer CM, Podlaski FJ, et al. Regulation of human lymphocyte proliferation by a heterodimeric cytokine, IL-12 (cytotoxic lymphocyte maturation factor). *Journal of immunology*. 1991 Aug 1;147(3):874-82. PubMed PMID: 1713608.
17. Schoenhaut DS, Chua AO, Wolitzky AG, Quinn PM, Dwyer CM, McComas W, et al. Cloning and expression of murine IL-12. *Journal of immunology*. 1992 Jun 1;148(11):3433-40. PubMed PMID: 1350290.
18. Rogge L, Papi A, Presky DH, Biffi M, Minetti LJ, Miotto D, et al. Antibodies to the IL-12 receptor beta 2 chain mark human Th1 but not Th2 cells in vitro and in vivo. *Journal of immunology*. 1999 Apr 1;162(7):3926-32. PubMed PMID: 10201911.
19. Presky DH, Yang H, Minetti LJ, Chua AO, Nabavi N, Wu CY, et al. A functional interleukin 12 receptor complex is composed of two beta-type cytokine receptor subunits. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1996 Nov 26;93(24):14002-7. PubMed PMID: 8943050. Pubmed Central PMCID: 19484.
20. Grohmann U, Belladonna ML, Bianchi R, Orabona C, Ayroldi E, Fioretti MC, et al. IL-12 acts directly on DC to promote nuclear localization of NF-kappaB and primes DC for IL-12 production. *Immunity*. 1998 Sep;9(3):315-23. PubMed PMID: 9768751.
21. Airoidi I, Gri G, Marshall JD, Corcione A, Facchetti P, Guglielmino R, et al. Expression and function of IL-12 and IL-18 receptors on human tonsillar B cells. *Journal of immunology*. 2000 Dec 15;165(12):6880-8. PubMed PMID: 11120812.
22. Bacon CM, McVicar DW, Ortaldo JR, Rees RC, O'Shea JJ, Johnston JA. Interleukin 12 (IL-12) induces tyrosine phosphorylation of JAK2 and TYK2: differential use of Janus family tyrosine kinases by IL-2 and IL-12. *The Journal of experimental medicine*. 1995 Jan 1;181(1):399-404. PubMed PMID: 7528775. Pubmed Central PMCID: 2191828.
23. Bacon CM, Petricoin EF, 3rd, Ortaldo JR, Rees RC, Larner AC, Johnston JA, et al. Interleukin 12 induces tyrosine phosphorylation and activation of STAT4 in human lymphocytes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1995 Aug 1;92(16):7307-11. PubMed PMID: 7638186. Pubmed Central PMCID: 41328.
24. Aste-Amezaga M, D'Andrea A, Kubin M, Trinchieri G. Cooperation of natural killer cell stimulatory factor/interleukin-12 with other stimuli in the induction of cytokines and

cytotoxic cell-associated molecules in human T and NK cells. *Cellular immunology*. 1994 Jul;156(2):480-92. PubMed PMID: 7912999.

25. Perussia B, Chan SH, D'Andrea A, Tsuji K, Santoli D, Pospisil M, et al. Natural killer (NK) cell stimulatory factor or IL-12 has differential effects on the proliferation of TCR-alpha beta+, TCR-gamma delta+ T lymphocytes, and NK cells. *Journal of immunology*. 1992 Dec 1;149(11):3495-502. PubMed PMID: 1358972.

26. Salcedo TW, Azzoni L, Wolf SF, Perussia B. Modulation of perforin and granzyme messenger RNA expression in human natural killer cells. *Journal of immunology*. 1993 Sep 1;151(5):2511-20. PubMed PMID: 8103068.

27. Manetti R, Parronchi P, Giudizi MG, Piccinni MP, Maggi E, Trinchieri G, et al. Natural killer cell stimulatory factor (interleukin 12 [IL-12]) induces T helper type 1 (Th1)-specific immune responses and inhibits the development of IL-4-producing Th cells. *The Journal of experimental medicine*. 1993 Apr 1;177(4):1199-204. PubMed PMID: 8096238. Pubmed Central PMCID: 2190961.

28. Micallef MJ, Ohtsuki T, Kohno K, Tanabe F, Ushio S, Namba M, et al. Interferon-gamma-inducing factor enhances T helper 1 cytokine production by stimulated human T cells: synergism with interleukin-12 for interferon-gamma production. *Eur J Immunol*. 1996 Jul;26(7):1647-51. PubMed PMID: 8766574.

29. Djuretic IM, Levanon D, Negreanu V, Groner Y, Rao A, Ansel KM. Transcription factors T-bet and Runx3 cooperate to activate Ifng and silence Il4 in T helper type 1 cells. *Nat Immunol*. 2007 Feb;8(2):145-53. PubMed PMID: 17195845.

30. Prochazkova J, Pokorna K, Holan V. IL-12 inhibits the TGF-beta-dependent T cell developmental programs and skews the TGF-beta-induced differentiation into a Th1-like direction. *Immunobiology*. 2012 Jan;217(1):74-82. PubMed PMID: 21903294.

31. Bianchi R, Grohmann U, Vacca C, Belladonna ML, Fioretti MC, Puccetti P. Autocrine IL-12 is involved in dendritic cell modulation via CD40 ligation. *Journal of immunology*. 1999 Sep 1;163(5):2517-21. PubMed PMID: 10452988.

32. Grohmann U, Bianchi R, Ayroldi E, Belladonna ML, Surace D, Fioretti MC, et al. A tumor-associated and self antigen peptide presented by dendritic cells may induce T cell anergy in vivo, but IL-12 can prevent or revert the anergic state. *Journal of immunology*. 1997 Apr 15;158(8):3593-602. PubMed PMID: 9103420.

33. Kerkar SP, Leonardi AJ, van Panhuys N, Zhang L, Yu Z, Crompton JG, et al. Collapse of the tumor stroma is triggered by IL-12 induction of Fas. *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy*. 2013 Jul;21(7):1369-77. PubMed PMID: 23568260. Pubmed Central PMCID: 3702103.

34. Kerkar SP, Goldszmid RS, Muranski P, Chinnasamy D, Yu Z, Reger RN, et al. IL-12 triggers a programmatic change in dysfunctional myeloid-derived cells within mouse tumors. *The Journal of clinical investigation*. 2011 Dec;121(12):4746-57. PubMed PMID: 22056381. Pubmed Central PMCID: 3226001.
35. Chmielewski M, Kopecky C, Hombach AA, Abken H. IL-12 Release by Engineered T Cells Expressing Chimeric Antigen Receptors Can Effectively Muster an Antigen-Independent Macrophage Response on Tumor Cells That Have Shut Down Tumor Antigen Expression. *Cancer Research*. 2011;71(17):5697-706.
36. Trinchieri G. Interleukin-12 and the regulation of innate resistance and adaptive immunity. *Nature reviews Immunology*. 2003 Feb;3(2):133-46. PubMed PMID: 12563297.
37. Chan SH, Perussia B, Gupta JW, Kobayashi M, Pospisil M, Young HA, et al. Induction of interferon gamma production by natural killer cell stimulatory factor: characterization of the responder cells and synergy with other inducers. *The Journal of experimental medicine*. 1991 Apr 1;173(4):869-79. PubMed PMID: 1672545. Pubmed Central PMCID: 2190821.
38. Okamura H, Tsutsui H, Kashiwamura S, Yoshimoto T, Nakanishi K. Interleukin-18: a novel cytokine that augments both innate and acquired immunity. *Advances in immunology*. 1998;70:281-312. PubMed PMID: 9755340.
39. Grohmann U, Belladonna ML, Vacca C, Bianchi R, Fallarino F, Orabona C, et al. Positive regulatory role of IL-12 in macrophages and modulation by IFN-gamma. *Journal of immunology*. 2001 Jul 1;167(1):221-7. PubMed PMID: 11418652.
40. Eisenring M, vom Berg J, Kristiansen G, Saller E, Becher B. IL-12 initiates tumor rejection via lymphoid tissue-inducer cells bearing the natural cytotoxicity receptor NKp46. *Nat Immunol*. 2010 Nov;11(11):1030-8. PubMed PMID: 20935648.
41. Gerber SA, Moran JP, Frelinger JG, Frelinger JA, Fenton BM, Lord EM. Mechanism of IL-12 mediated alterations in tumour blood vessel morphology: analysis using whole-tissue mounts. *British journal of cancer*. 2003 May 6;88(9):1453-61. PubMed PMID: 12778077. Pubmed Central PMCID: 2741041.
42. Sorensen EW, Gerber SA, Frelinger JG, Lord EM. IL-12 suppresses vascular endothelial growth factor receptor 3 expression on tumor vessels by two distinct IFN-gamma-dependent mechanisms. *Journal of immunology*. 2010 Feb 15;184(4):1858-66. PubMed PMID: 20061409. Pubmed Central PMCID: 3070472.
43. Li S, Xia X, Mellieon FM, Liu J, Steele S. Candidate genes associated with tumor regression mediated by intratumoral IL-12 electroporation gene therapy. *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy*. 2004 Mar;9(3):347-54. PubMed PMID: 15006601.

44. Vizler C, Rosato A, Calderazzo F, Quintieri L, Fruscella P, Wainstok de Calmanovici R, et al. Therapeutic effect of interleukin 12 on mouse haemangiosarcomas is not associated with an increased anti-tumour cytotoxic T-lymphocyte activity. *British journal of cancer*. 1998 Feb;77(4):656-62. PubMed PMID: 9484826. Pubmed Central PMCID: 2149920.
45. Colombo MP, Trinchieri G. Interleukin-12 in anti-tumor immunity and immunotherapy. *Cytokine & growth factor reviews*. 2002 Apr;13(2):155-68. PubMed PMID: 11900991.
46. Noguchi Y, Jungbluth A, Richards EC, Old LJ. Effect of interleukin 12 on tumor induction by 3-methylcholanthrene. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1996 Oct 15;93(21):11798-801. PubMed PMID: 8876217. Pubmed Central PMCID: 38138.
47. Faggioli F, Soldati S, Scanziani E, Cato EM, Adorni F, Vezzoni P, et al. Effects of IL-12 gene therapy on spontaneous transgenic and transplanted breast tumors. *Breast cancer research and treatment*. 2008 Jul;110(2):223-6. PubMed PMID: 17687642.
48. Parker JN, Gillespie GY, Love CE, Randall S, Whitley RJ, Markert JM. Engineered herpes simplex virus expressing IL-12 in the treatment of experimental murine brain tumors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2000 Feb 29;97(5):2208-13. PubMed PMID: 10681459. Pubmed Central PMCID: 15779.
49. Lucas ML, Heller L, Coppola D, Heller R. IL-12 plasmid delivery by in vivo electroporation for the successful treatment of established subcutaneous B16.F10 melanoma. *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy*. 2002 Jun;5(6):668-75. PubMed PMID: 12027550.
50. Egilmez NK, Jong YS, Sabel MS, Jacob JS, Mathiowitz E, Bankert RB. In situ tumor vaccination with interleukin-12-encapsulated biodegradable microspheres: induction of tumor regression and potent antitumor immunity. *Cancer Res*. 2000 Jul 15;60(14):3832-7. PubMed PMID: 10919657.
51. Sabel MS, Su G, Griffith KA, Chang AE. Intratumoral delivery of encapsulated IL-12, IL-18 and TNF-alpha in a model of metastatic breast cancer. *Breast cancer research and treatment*. 2010 Jul;122(2):325-36. PubMed PMID: 19802695.
52. Tahara H, Zeh HJ, 3rd, Storkus WJ, Pappo I, Watkins SC, Gubler U, et al. Fibroblasts genetically engineered to secrete interleukin 12 can suppress tumor growth and induce antitumor immunity to a murine melanoma in vivo. *Cancer Res*. 1994 Jan 1;54(1):182-9. PubMed PMID: 7903204.
53. Seo SH, Kim KS, Park SH, Suh YS, Kim SJ, Jeun SS, et al. The effects of mesenchymal stem cells injected via different routes on modified IL-12-mediated antitumor activity. *Gene*

therapy. 2011 May;18(5):488-95. PubMed PMID: 21228885. Pubmed Central PMCID: 3125103.

54. Pegram HJ, Lee JC, Hayman EG, Imperato GH, Tedder TF, Sadelain M, et al. Tumor-targeted T cells modified to secrete IL-12 eradicate systemic tumors without need for prior conditioning. *Blood*. 2012 May 3;119(18):4133-41. PubMed PMID: 22354001. Pubmed Central PMCID: 3359735.

55. Zhang L, Kerkar SP, Yu Z, Zheng Z, Yang S, Restifo NP, et al. Improving adoptive T cell therapy by targeting and controlling IL-12 expression to the tumor environment. *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy*. 2011 Apr;19(4):751-9. PubMed PMID: 21285960. Pubmed Central PMCID: 3070103.

56. Okada N, Iiyama S, Okada Y, Mizuguchi H, Hayakawa T, Nakagawa S, et al. Immunological properties and vaccine efficacy of murine dendritic cells simultaneously expressing melanoma-associated antigen and interleukin-12. *Cancer gene therapy*. 2005 Jan;12(1):72-83. PubMed PMID: 15389286.

57. Furumoto K, Arai S, Yamasaki S, Mizumoto M, Mori A, Inoue N, et al. Spleen-derived dendritic cells engineered to enhance interleukin-12 production elicit therapeutic antitumor immune responses. *International journal of cancer*. 2000 Sep 1;87(5):665-72. PubMed PMID: 10925360.

58. Shi X, Cao S, Mitsushashi M, Xiang Z, Ma X. Genome-wide analysis of molecular changes in IL-12-induced control of mammary carcinoma via IFN-gamma-independent mechanisms. *Journal of immunology*. 2004 Apr 1;172(7):4111-22. PubMed PMID: 15034023. Pubmed Central PMCID: 2956987.

59. Rakhmievich AL, Janssen K, Hao Z, Sondel PM, Yang NS. Interleukin-12 gene therapy of a weakly immunogenic mouse mammary carcinoma results in reduction of spontaneous lung metastases via a T-cell-independent mechanism. *Cancer gene therapy*. 2000 Jun;7(6):826-38. PubMed PMID: 10880012.

60. Rodriguez-Galan MC, Reynolds D, Correa SG, Iribarren P, Watanabe M, Young HA. Coexpression of IL-18 strongly attenuates IL-12-induced systemic toxicity through a rapid induction of IL-10 without affecting its antitumor capacity. *Journal of immunology*. 2009 Jul 1;183(1):740-8. PubMed PMID: 19535628. Pubmed Central PMCID: 2789653.

61. Weiss JM, Subleski JJ, Wigginton JM, Wiltrott RH. Immunotherapy of cancer by IL-12-based cytokine combinations. *Expert opinion on biological therapy*. 2007 Nov;7(11):1705-21. PubMed PMID: 17961093. Pubmed Central PMCID: 2430051.

62. Barrios B, Baez NS, Reynolds D, Iribarren P, Cejas H, Young HA, et al. Abrogation of TNFalpha production during cancer immunotherapy is crucial for suppressing side effects

due to the systemic expression of IL-12. *PloS one*. 2014;9(2):e90116. PubMed PMID: 24587231. Pubmed Central PMCID: 3938584.

63. Lasek W, Golab J, Maslinski W, Switaj T, Balkowiec EZ, Stoklosa T, et al. Subtherapeutic doses of interleukin-15 augment the antitumor effect of interleukin-12 in a B16F10 melanoma model in mice. *European cytokine network*. 1999 Sep;10(3):345-56. PubMed PMID: 10477391.

64. Malvicini M, Rizzo M, Alaniz L, Pinero F, Garcia M, Atorrasagasti C, et al. A novel synergistic combination of cyclophosphamide and gene transfer of interleukin-12 eradicates colorectal carcinoma in mice. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2009 Dec 1;15(23):7256-65. PubMed PMID: 19920110.

65. Passer BJ, Cheema T, Wu S, Wu CL, Rabkin SD, Martuza RL. Combination of vinblastine and oncolytic herpes simplex virus vector expressing IL-12 therapy increases antitumor and antiangiogenic effects in prostate cancer models. *Cancer gene therapy*. 2013 Jan;20(1):17-24. PubMed PMID: 23138870. Pubmed Central PMCID: 3810211.

66. Cao L, Zeng Q, Xu C, Shi S, Zhang Z, Sun X. Enhanced antitumor response mediated by the codelivery of paclitaxel and adenoviral vector expressing IL-12. *Molecular pharmaceutics*. 2013 May 6;10(5):1804-14. PubMed PMID: 23534449.

67. Nanni P, Nicoletti G, De Giovanni C, Landuzzi L, Di Carlo E, Cavallo F, et al. Combined allogeneic tumor cell vaccination and systemic interleukin 12 prevents mammary carcinogenesis in HER-2/neu transgenic mice. *The Journal of experimental medicine*. 2001 Nov 5;194(9):1195-205. PubMed PMID: 11696586. Pubmed Central PMCID: 2195980.

68. Nanni P, Nicoletti G, De Giovanni C, Landuzzi L, Di Carlo E, Iezzi M, et al. Prevention of HER-2/neu transgenic mammary carcinoma by tamoxifen plus interleukin 12. *International journal of cancer*. 2003 Jun 20;105(3):384-9. PubMed PMID: 12704673.

69. Jaime-Ramirez AC, Mundy-Bosse BL, Kondadasula S, Jones NB, Roda JM, Mani A, et al. IL-12 enhances the antitumor actions of trastuzumab via NK cell IFN-gamma production. *Journal of immunology*. 2011 Mar 15;186(6):3401-9. PubMed PMID: 21321106. Pubmed Central PMCID: 3593307.

70. Rakhmilevich AL, Hooper AT, Hicklin DJ, Sondel PM. Treatment of experimental breast cancer using interleukin-12 gene therapy combined with anti-vascular endothelial growth factor receptor-2 antibody. *Molecular cancer therapeutics*. 2004 Aug;3(8):969-76. PubMed PMID: 15299079.

71. Atkins MB, Robertson MJ, Gordon M, Lotze MT, DeCoste M, DuBois JS, et al. Phase I evaluation of intravenous recombinant human interleukin 12 in patients with advanced malignancies. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 1997 Mar;3(3):409-17. PubMed PMID: 9815699. Epub 1997/03/01. eng.

72. Hurteau JA, Blessing JA, DeCesare SL, Creasman WT. Evaluation of recombinant human interleukin-12 in patients with recurrent or refractory ovarian cancer: a gynecologic oncology group study. *Gynecologic oncology*. 2001 Jul;82(1):7-10. PubMed PMID: 11426954.
73. Lacy MQ, Jacobus S, Blood EA, Kay NE, Rajkumar SV, Greipp PR. Phase II study of interleukin-12 for treatment of plateau phase multiple myeloma (E1A96): a trial of the Eastern Cooperative Oncology Group. *Leukemia research*. 2009 Nov;33(11):1485-9. PubMed PMID: 19243818. Pubmed Central PMCID: 4070590.
74. Motzer RJ, Rakhit A, Thompson JA, Nemunaitis J, Murphy BA, Ellerhorst J, et al. Randomized multicenter phase II trial of subcutaneous recombinant human interleukin-12 versus interferon-alpha 2a for patients with advanced renal cell carcinoma. *Journal of interferon & cytokine research : the official journal of the International Society for Interferon and Cytokine Research*. 2001 Apr;21(4):257-63. PubMed PMID: 11359657.
75. van Herpen CM, Looman M, Zonneveld M, Scharenborg N, de Wilde PC, van de Locht L, et al. Intratumoral administration of recombinant human interleukin 12 in head and neck squamous cell carcinoma patients elicits a T-helper 1 profile in the locoregional lymph nodes. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2004 Apr 15;10(8):2626-35. PubMed PMID: 15102664.
76. Leonard JP, Sherman ML, Fisher GL, Buchanan LJ, Larsen G, Atkins MB, et al. Effects of single-dose interleukin-12 exposure on interleukin-12-associated toxicity and interferon-gamma production. *Blood*. 1997 Oct 1;90(7):2541-8. PubMed PMID: 9326219. Epub 1997/11/05. eng.
77. Gollob JA, Mier JW, Veenstra K, McDermott DF, Clancy D, Clancy M, et al. Phase I trial of twice-weekly intravenous interleukin 12 in patients with metastatic renal cell cancer or malignant melanoma: ability to maintain IFN-gamma induction is associated with clinical response. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2000 May;6(5):1678-92. PubMed PMID: 10815886.
78. Bekaii-Saab TS, Roda JM, Guenterberg KD, Ramaswamy B, Young DC, Ferketich AK, et al. A phase I trial of paclitaxel and trastuzumab in combination with interleukin-12 in patients with HER2/neu-expressing malignancies. *Molecular cancer therapeutics*. 2009 Nov;8(11):2983-91. PubMed PMID: 19887543. Pubmed Central PMCID: 2996611.
79. Rook AH, Wood GS, Yoo EK, Elenitsas R, Kao DM, Sherman ML, et al. Interleukin-12 therapy of cutaneous T-cell lymphoma induces lesion regression and cytotoxic T-cell responses. *Blood*. 1999 Aug 1;94(3):902-8. PubMed PMID: 10419880.
80. Younes A, Pro B, Robertson MJ, Flinn IW, Romaguera JE, Hagemester F, et al. Phase II clinical trial of interleukin-12 in patients with relapsed and refractory non-Hodgkin's lymphoma and Hodgkin's disease. *Clinical cancer research : an official journal of the*

American Association for Cancer Research. 2004 Aug 15;10(16):5432-8. PubMed PMID: 15328181.

81. Ansell SM, Witzig TE, Kurtin PJ, Sloan JA, Jelinek DF, Howell KG, et al. Phase 1 study of interleukin-12 in combination with rituximab in patients with B-cell non-Hodgkin lymphoma. *Blood*. 2002 Jan 1;99(1):67-74. PubMed PMID: 11756154.

82. Daud AI, DeConti RC, Andrews S, Urbas P, Riker AI, Sondak VK, et al. Phase I trial of interleukin-12 plasmid electroporation in patients with metastatic melanoma. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2008 Dec 20;26(36):5896-903. PubMed PMID: 19029422. Pubmed Central PMCID: 2645111.

83. Heinzerling L, Burg G, Dummer R, Maier T, Oberholzer PA, Schultz J, et al. Intratumoral injection of DNA encoding human interleukin 12 into patients with metastatic melanoma: clinical efficacy. *Human gene therapy*. 2005 Jan;16(1):35-48. PubMed PMID: 15703487.

84. Mahvi DM, Henry MB, Albertini MR, Weber S, Meredith K, Schalch H, et al. Intratumoral injection of IL-12 plasmid DNA--results of a phase I/IB clinical trial. *Cancer gene therapy*. 2007 Aug;14(8):717-23. PubMed PMID: 17557109.

85. Rudman SM, Jameson MB, McKeage MJ, Savage P, Jodrell DI, Harries M, et al. A phase 1 study of AS1409, a novel antibody-cytokine fusion protein, in patients with malignant melanoma or renal cell carcinoma. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2011 Apr 1;17(7):1998-2005. PubMed PMID: 21447719. Pubmed Central PMCID: 3071333.

86. Anwer K, Barnes MN, Fewell J, Lewis DH, Alvarez RD. Phase-I clinical trial of IL-12 plasmid/lipopolymer complexes for the treatment of recurrent ovarian cancer. *Gene therapy*. 2010 Mar;17(3):360-9. PubMed PMID: 20033066.

87. Alvarez RD, Sill MW, Davidson SA, Muller CY, Bender DP, DeBernardo RL, et al. A phase II trial of intraperitoneal EGEN-001, an IL-12 plasmid formulated with PEG-PEI-cholesterol lipopolymer in the treatment of persistent or recurrent epithelial ovarian, fallopian tube or primary peritoneal cancer: a gynecologic oncology group study. *Gynecologic oncology*. 2014 Jun;133(3):433-8. PubMed PMID: 24708919. Pubmed Central PMCID: 4057915.

88. Boehm T. Thymus development and function. *Current opinion in immunology*. 2008 Apr;20(2):178-84. PubMed PMID: 18403191.

89. Ohigashi I, Kozai M, Takahama Y. Development and developmental potential of cortical thymic epithelial cells. *Immunological reviews*. 2016 May;271(1):10-22. PubMed PMID: 27088904.

90. Neefjes J, Jongstra ML, Paul P, Bakke O. Towards a systems understanding of MHC class I and MHC class II antigen presentation. *Nature reviews Immunology*. 2011 Nov 11;11(12):823-36. PubMed PMID: 22076556.
91. Sharpe AH, Abbas AK. T-cell costimulation--biology, therapeutic potential, and challenges. *The New England journal of medicine*. 2006 Sep 7;355(10):973-5. PubMed PMID: 16908487.
92. Rudd CE. The reverse stop-signal model for CTLA4 function. *Nature reviews Immunology*. 2008 Feb;8(2):153-60. PubMed PMID: 18219311.
93. Luckheeram RV, Zhou R, Verma AD, Xia B. CD4(+)T cells: differentiation and functions. *Clinical & developmental immunology*. 2012;2012:925135. PubMed PMID: 22474485. Pubmed Central PMCID: 3312336.
94. den Haan JM, Arens R, van Zelm MC. The activation of the adaptive immune system: cross-talk between antigen-presenting cells, T cells and B cells. *Immunology letters*. 2014 Dec;162(2 Pt B):103-12. PubMed PMID: 25455596.
95. Halle S, Halle O, Forster R. Mechanisms and Dynamics of T Cell-Mediated Cytotoxicity In Vivo. *Trends in immunology*. 2017 Jun;38(6):432-43. PubMed PMID: 28499492.
96. Leitner J, Kuschei W, Grabmeier-Pfistershammer K, Woitek R, Kriehuber E, Majdic O, et al. T cell stimulator cells, an efficient and versatile cellular system to assess the role of costimulatory ligands in the activation of human T cells. *Journal of immunological methods*. 2010 Oct 31;362(1-2):131-41. PubMed PMID: 20858499. Pubmed Central PMCID: 2975062.
97. Bou Ghanem EN, Nelson CC, D'Orazio SE. T cell-intrinsic factors contribute to the differential ability of CD8+ T cells to rapidly secrete IFN-gamma in the absence of antigen. *Journal of immunology*. 2011 Feb 1;186(3):1703-12. PubMed PMID: 21191063.
98. Nakanishi K, Yoshimoto T, Tsutsui H, Okamura H. Interleukin-18 is a unique cytokine that stimulates both Th1 and Th2 responses depending on its cytokine milieu. *Cytokine & growth factor reviews*. 2001 Mar;12(1):53-72. PubMed PMID: 11312119.
99. Boyman O, Letourneau S, Krieg C, Sprent J. Homeostatic proliferation and survival of naive and memory T cells. *Eur J Immunol*. 2009 Aug;39(8):2088-94. PubMed PMID: 19637200.
100. Cheung KP, Yang E, Goldrath AW. Memory-like CD8+ T cells generated during homeostatic proliferation defer to antigen-experienced memory cells. *The Journal of Immunology*. 2009;183(5):3364-72.
101. Berg RE, Cordes CJ, Forman J. Contribution of CD8+ T cells to innate immunity: IFN- $\gamma$  secretion induced by IL-12 and IL-18. *European journal of immunology*. 2002;32(10):2807-16.

102. Berg RE, Crossley E, Murray S, Forman J. Memory CD8+ T cells provide innate immune protection against *Listeria monocytogenes* in the absence of cognate antigen. *The Journal of experimental medicine*. 2003 Nov 17;198(10):1583-93. PubMed PMID: 14623912. Pubmed Central PMCID: 1592647.
103. Akue AD, Lee JY, Jameson SC. Derivation and maintenance of virtual memory CD8 T cells. *Journal of immunology*. 2012 Mar 15;188(6):2516-23. PubMed PMID: 22308307. Pubmed Central PMCID: 3294185.
104. White JT, Cross EW, Kedl RM. Antigen-inexperienced memory CD8(+) T cells: where they come from and why we need them. *Nature reviews Immunology*. 2017 Jun;17(6):391-400. PubMed PMID: 28480897. Pubmed Central PMCID: 5569888.
105. Hussain T, Quinn KM. Similar but different: virtual memory CD8 T cells as a memory-like cell population. *Immunology and cell biology*. 2019 Aug;97(7):675-84. PubMed PMID: 31140625. Epub 2019/05/30. eng.
106. Berg LJ. Signalling through TEC kinases regulates conventional versus innate CD8+ T-cell development. *Nature Reviews Immunology*. 2007;7(6):479-85.
107. Hogquist KA. Tec kinases in T cell development: a clue behind the mask? *Immunity*. 2006 Jul;25(1):9-11. PubMed PMID: 16860750.
108. Prince AL, Kraus Z, Carty SA, Ng C, Yin CC, Jordan MS, et al. Development of innate CD4+ and CD8+ T cells in *Itk*-deficient mice is regulated by distinct pathways. *Journal of immunology*. 2014 Jul 15;193(2):688-99. PubMed PMID: 24943215. Pubmed Central PMCID: 4114307.
109. Broussard C, Fleischacker C, Horai R, Chetana M, Venegas AM, Sharp LL, et al. Altered development of CD8+ T cell lineages in mice deficient for the Tec kinases *Itk* and *Rlk*. *Immunity*. 2006 Jul;25(1):93-104. PubMed PMID: 16860760.
110. Fukuyama T, Kasper LH, Boussovar F, Jeevan T, van Deursen J, Brindle PK. Histone acetyltransferase CBP is vital to demarcate conventional and innate CD8+ T-cell development. *Molecular and cellular biology*. 2009 Jul;29(14):3894-904. PubMed PMID: 19433445. Pubmed Central PMCID: 2704754.
111. Weinreich MA, Odumade OA, Jameson SC, Hogquist KA. T cells expressing the transcription factor PLZF regulate the development of memory-like CD8+ T cells. *Nature immunology*. 2010;11(8):709.
112. Atherly LO, Lucas JA, Felices M, Yin CC, Reiner SL, Berg LJ. The Tec family tyrosine kinases *Itk* and *Rlk* regulate the development of conventional CD8+ T cells. *Immunity*. 2006 Jul;25(1):79-91. PubMed PMID: 16860759.

113. Baez NS, Cerban F, Savid-Frontera C, Hodge DL, Tosello J, Acosta-Rodriguez E, et al. Thymic expression of IL-4 and IL-15 after systemic inflammatory or infectious Th1 disease processes induce the acquisition of "innate" characteristics during CD8+ T cell development. *PLoS Pathog.* 2019 Jan;15(1):e1007456. PubMed PMID: 30608984. Pubmed Central PMCID: 6319713.
114. Jameson SC, Lee YJ, Hogquist KA. Innate memory T cells. *Advances in immunology.* 126: Elsevier; 2015. p. 173-213.
115. Barbarin A, Cayssials E, Jacomet F, Nunez NG, Basbous S, Lefèvre L, et al. Phenotype of NK-like CD8 (+) T cells with innate features in humans and their relevance in cancer diseases. *Frontiers in immunology.* 2017;8:316.
116. Renkema KR, Lee J-Y, Lee YJ, Hamilton SE, Hogquist KA, Jameson SC. IL-4 sensitivity shapes the peripheral CD8+ T cell pool and response to infection. *Journal of Experimental Medicine.* 2016;213(7):1319-29.
117. Sosinowski T, White JT, Cross EW, Haluszczak C, Marrack P, Gapin L, et al. CD8alpha+ dendritic cell trans presentation of IL-15 to naive CD8+ T cells produces antigen-inexperienced T cells in the periphery with memory phenotype and function. *Journal of immunology.* 2013 Mar 1;190(5):1936-47. PubMed PMID: 23355737. Pubmed Central PMCID: 3578102.
118. Mbitikon-Kobo FM, Vocanson M, Michallet MC, Tomkowiak M, Cottalorda A, Angelov GS, et al. Characterization of a CD44/CD122int memory CD8 T cell subset generated under sterile inflammatory conditions. *Journal of immunology.* 2009 Mar 15;182(6):3846-54. PubMed PMID: 19265164.
119. Martinet V, Tonon S, Torres D, Azouz A, Nguyen M, Kohler A, et al. Type I interferons regulate eomesodermin expression and the development of unconventional memory CD8(+) T cells. *Nature communications.* 2015 May 8;6:7089. PubMed PMID: 25953241. Pubmed Central PMCID: 4432629.
120. Rolot M, Dougall AM, Chetty A, Javaux J, Chen T, Xiao X, et al. Helminth-induced IL-4 expands bystander memory CD8(+) T cells for early control of viral infection. *Nature communications.* 2018 Oct 30;9(1):4516. PubMed PMID: 30375396. Pubmed Central PMCID: 6207712.
121. Lin JS, Mohrs K, Szaba FM, Kummer LW, Leadbetter EA, Mohrs M. Virtual memory CD8 T cells expanded by helminth infection confer broad protection against bacterial infection. *Mucosal immunology.* 2019 Jan;12(1):258-64. PubMed PMID: 30361537. Pubmed Central PMCID: 6301144.

122. Rafei M, Hardy M-P, Williams P, Vanegas JR, Forner K-A, Dulude G, et al. Development and function of innate polyclonal TCR $\alpha\beta$ + CD8+ thymocytes. *The Journal of Immunology*. 2011;187(6):3133-44.
123. White JT, Cross EW, Burchill MA, Danhorn T, McCarter MD, Rosen HR, et al. Virtual memory T cells develop and mediate bystander protective immunity in an IL-15-dependent manner. *Nature communications*. 2016 Apr 21;7:11291. PubMed PMID: 27097762. Pubmed Central PMCID: 4844673.
124. Haluszczak C, Akue AD, Hamilton SE, Johnson LD, Pujanauski L, Teodorovic L, et al. The antigen-specific CD8+ T cell repertoire in unimmunized mice includes memory phenotype cells bearing markers of homeostatic expansion. *The Journal of experimental medicine*. 2009 Feb 16;206(2):435-48. PubMed PMID: 19188498. Pubmed Central PMCID: 2646575.
125. Wyss L, Stadinski BD, King CG, Schallenberg S, McCarthy NI, Lee JY, et al. Affinity for self antigen selects Treg cells with distinct functional properties. *Nat Immunol*. 2016 Sep;17(9):1093-101. PubMed PMID: 27478940. Pubmed Central PMCID: 4994872.
126. Drobek A, Moudra A, Mueller D, Huranova M, Horkova V, Pribikova M, et al. Strong homeostatic TCR signals induce formation of self-tolerant virtual memory CD8 T cells. *The EMBO journal*. 2018 Jul 13;37(14). PubMed PMID: 29752423. Pubmed Central PMCID: 6043851.
127. Quinn KM, Fox A, Harland KL, Russ BE, Li J, Nguyen THO, et al. Age-Related Decline in Primary CD8(+) T Cell Responses Is Associated with the Development of Senescence in Virtual Memory CD8(+) T Cells. *Cell reports*. 2018 Jun 19;23(12):3512-24. PubMed PMID: 29924995.
128. Rudd BD, Venturi V, Li G, Samadder P, Ertelt JM, Way SS, et al. Nonrandom attrition of the naive CD8+ T-cell pool with aging governed by T-cell receptor:pMHC interactions. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2011 Aug 16;108(33):13694-9. PubMed PMID: 21813761. Pubmed Central PMCID: 3158207.
129. Miller CH, Klawon DEJ, Zeng S, Lee V, Socci ND, Savage PA. Eomes identifies thymic precursors of self-specific memory-phenotype CD8(+) T cells. *Nat Immunol*. 2020 May;21(5):567-77. PubMed PMID: 32284593. Pubmed Central PMCID: 7193531.
130. Min B, McHugh R, Sempowski GD, Mackall C, Foucras G, Paul WE. Neonates support lymphopenia-induced proliferation. *Immunity*. 2003 Jan;18(1):131-40. PubMed PMID: 12530982.
131. Hamilton SE, Jameson SC. The nature of the lymphopenic environment dictates protective function of homeostatic-memory CD8+ T cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2008 Nov 25;105(47):18484-9. PubMed PMID: 19020089. Pubmed Central PMCID: 2587628.

132. Pribikova M, Moudra A, Stepanek O. Opinion: Virtual memory CD8 T cells and lymphopenia-induced memory CD8 T cells represent a single subset: Homeostatic memory T cells. *Immunology letters*. 2018 Nov;203:57-61. PubMed PMID: 30243945.
133. Jacomet F, Cayssials E, Basbous S, Levescot A, Piccirilli N, Desmier D, et al. Evidence for eomesodermin-expressing innate-like CD8+ KIR/NKG2A+ T cells in human adults and cord blood samples. *European journal of immunology*. 2015;45(7):1926-33.
134. Dhanji S, Teh SJ, Oble D, Priatel JJ, Teh HS. Self-reactive memory-phenotype CD8 T cells exhibit both MHC-restricted and non-MHC-restricted cytotoxicity: a role for the T-cell receptor and natural killer cell receptors. *Blood*. 2004 Oct 1;104(7):2116-23. PubMed PMID: 15178577.
135. Dhanji S, Teh HS. IL-2-activated CD8+CD44high cells express both adaptive and innate immune system receptors and demonstrate specificity for syngeneic tumor cells. *Journal of immunology*. 2003 Oct 1;171(7):3442-50. PubMed PMID: 14500639.
136. Tietze JK, Wilkins DE, Sckisel GD, Bouchlaka MN, Alderson KL, Weiss JM, et al. Delineation of antigen-specific and antigen-nonspecific CD8(+) memory T-cell responses after cytokine-based cancer immunotherapy. *Blood*. 2012 Mar 29;119(13):3073-83. PubMed PMID: 22251483. Pubmed Central PMCID: 3321869.
137. Abdool K, Cretney E, Brooks AD, Kelly JM, Swann J, Shanker A, et al. NK cells use NKG2D to recognize a mouse renal cancer (Renca), yet require intercellular adhesion molecule-1 expression on the tumor cells for optimal perforin-dependent effector function. *Journal of immunology*. 2006 Aug 15;177(4):2575-83. PubMed PMID: 16888019.
138. Wong HC, Jeng EK, Rhode PR. The IL-15-based superagonist ALT-803 promotes the antigen-independent conversion of memory CD8(+) T cells into innate-like effector cells with antitumor activity. *Oncoimmunology*. 2013 Nov 1;2(11):e26442. PubMed PMID: 24404427. Pubmed Central PMCID: 3881336.
139. Xu W, Jones M, Liu B, Zhu X, Johnson CB, Edwards AC, et al. Efficacy and mechanism-of-action of a novel superagonist interleukin-15: interleukin-15 receptor alphaSu/Fc fusion complex in syngeneic murine models of multiple myeloma. *Cancer Res*. 2013 May 15;73(10):3075-86. PubMed PMID: 23644531. Pubmed Central PMCID: 3914673.
140. Trinchieri G. Interleukin-12: a cytokine at the interface of inflammation and immunity. *Advances in immunology*. 1998;70:83-243. PubMed PMID: 9755338.
141. Palmer K, Hitt M, Emtage PC, Gyorffy S, Gauldie J. Combined CXC chemokine and interleukin-12 gene transfer enhances antitumor immunity. *Gene therapy*. 2001 Feb;8(4):282-90. PubMed PMID: 11313802.

142. Brunda MJ, Luistro L, Warriar RR, Wright RB, Hubbard BR, Murphy M, et al. Antitumor and antimetastatic activity of interleukin 12 against murine tumors. *The Journal of experimental medicine*. 1993 Oct 1;178(4):1223-30. PubMed PMID: 8104230. Pubmed Central PMCID: 2191194.
143. Bramson JL, Hitt M, Addison CL, Muller WJ, Gauldie J, Graham FL. Direct intratumoral injection of an adenovirus expressing interleukin-12 induces regression and long-lasting immunity that is associated with highly localized expression of interleukin-12. *Human gene therapy*. 1996 Oct 20;7(16):1995-2002. PubMed PMID: 8930660.
144. Liu F, Song Y, Liu D. Hydrodynamics-based transfection in animals by systemic administration of plasmid DNA. *Gene therapy*. 1999 Jul;6(7):1258-66. PubMed PMID: 10455434.
145. Lasek W, Zagodzón R, Jakobisiak M. Interleukin 12: still a promising candidate for tumor immunotherapy? *Cancer immunology, immunotherapy : CII*. 2014 May;63(5):419-35. PubMed PMID: 24514955. Pubmed Central PMCID: 3994286.
146. Tugues S, Burkhard SH, Ohs I, Vrohings M, Nussbaum K, Vom Berg J, et al. New insights into IL-12-mediated tumor suppression. *Cell death and differentiation*. 2015 Feb;22(2):237-46. PubMed PMID: 25190142. Pubmed Central PMCID: 4291488.
147. Motzer RJ, Rakhit A, Schwartz LH, Olencki T, Malone TM, Sandstrom K, et al. Phase I trial of subcutaneous recombinant human interleukin-12 in patients with advanced renal cell carcinoma. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 1998 May;4(5):1183-91. PubMed PMID: 9607576.
148. Lenzi R, Edwards R, June C, Seiden MV, Garcia ME, Rosenblum M, et al. Phase II study of intraperitoneal recombinant interleukin-12 (rhIL-12) in patients with peritoneal carcinomatosis (residual disease < 1 cm) associated with ovarian cancer or primary peritoneal carcinoma. *Journal of translational medicine*. 2007 Dec 12;5:66. PubMed PMID: 18076766. Pubmed Central PMCID: 2248163.
149. Hamid O, Solomon JC, Scotland R, Garcia M, Sian S, Ye W, et al. Alum with interleukin-12 augments immunity to a melanoma peptide vaccine: correlation with time to relapse in patients with resected high-risk disease. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2007 Jan 1;13(1):215-22. PubMed PMID: 17200357.
150. Portielje JE, Kruit WH, Schuler M, Beck J, Lamers CH, Stoter G, et al. Phase I study of subcutaneously administered recombinant human interleukin 12 in patients with advanced renal cell cancer. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 1999 Dec;5(12):3983-9. PubMed PMID: 10632329.

151. Johrer K, Pleyer L, Olivier A, Maizner E, Zelle-Rieser C, Greil R. Tumour-immune cell interactions modulated by chemokines. *Expert opinion on biological therapy*. 2008 Mar;8(3):269-90. PubMed PMID: 18294099.
152. Graefe C, Eichhorn L, Wurst P, Kleiner J, Heine A, Panetas I, et al. Optimized Ki-67 staining in murine cells: a tool to determine cell proliferation. *Molecular biology reports*. 2019 Aug;46(4):4631-43. PubMed PMID: 31093875.
153. Gao J, Ye J, Ying Y, Lin H, Luo Z. Negative regulation of TGF-beta by AMPK and implications in the treatment of associated disorders. *Acta biochimica et biophysica Sinica*. 2018 Jun 1;50(6):523-31. PubMed PMID: 29873702.
154. Morikawa M, Derynck R, Miyazono K. TGF-beta and the TGF-beta Family: Context-Dependent Roles in Cell and Tissue Physiology. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*. 2016 May 2;8(5). PubMed PMID: 27141051. Pubmed Central PMCID: 4852809.
155. Katsuno Y, Lamouille S, Derynck R. TGF-beta signaling and epithelial-mesenchymal transition in cancer progression. *Current opinion in oncology*. 2013 Jan;25(1):76-84. PubMed PMID: 23197193.
156. Duda DG, Sunamura M, Lozonschi L, Kodama T, Egawa S, Matsumoto G, et al. Direct in vitro evidence and in vivo analysis of the antiangiogenesis effects of interleukin 12. *Cancer Res*. 2000 Feb 15;60(4):1111-6. PubMed PMID: 10706132.
157. Dias S, Boyd R, Balkwill F. IL-12 regulates VEGF and MMPs in a murine breast cancer model. *International journal of cancer*. 1998 Oct 29;78(3):361-5. PubMed PMID: 9766572.
158. Voest EE, Kenyon BM, O'Reilly MS, Truitt G, D'Amato RJ, Folkman J. Inhibition of angiogenesis in vivo by interleukin 12. *Journal of the National Cancer Institute*. 1995 Apr 19;87(8):581-6. PubMed PMID: 7538593.
159. Gordon SM, Carty SA, Kim JS, Zou T, Smith-Garvin J, Alonzo ES, et al. Requirements for eomesodermin and promyelocytic leukemia zinc finger in the development of innate-like CD8+ T cells. *Journal of immunology*. 2011 Apr 15;186(8):4573-8. PubMed PMID: 21383242. Pubmed Central PMCID: 3085897.
160. Intlekofer AM, Takemoto N, Wherry EJ, Longworth SA, Northrup JT, Palanivel VR, et al. Effector and memory CD8+ T cell fate coupled by T-bet and eomesodermin. *Nat Immunol*. 2005 Dec;6(12):1236-44. PubMed PMID: 16273099.
161. Jameson SC, Lee YJ, Hogquist KA. Innate memory T cells. *Advances in immunology*. 2015;126:173-213. PubMed PMID: 25727290. Pubmed Central PMCID: 4670568.
162. Atherly LO, Brehm MA, Welsh RM, Berg LJ. Tec kinases Itk and Rlk are required for CD8+ T cell responses to virus infection independent of their role in CD4+ T cell help. *Journal of immunology*. 2006 Feb 1;176(3):1571-81. PubMed PMID: 16424186.

163. Carty SA, Koretzky GA, Jordan MS. Interleukin-4 regulates eomesodermin in CD8+ T cell development and differentiation. *PloS one*. 2014;9(9):e106659. PubMed PMID: 25207963. Pubmed Central PMCID: 4160212.
164. Fracchia KM, Pai CY, Walsh CM. Modulation of T Cell Metabolism and Function through Calcium Signaling. *Front Immunol*. 2013 Oct 11;4:324. PubMed PMID: 24133495. Pubmed Central PMCID: 3795426.
165. Joseph N, Reicher B, Barda-Saad M. The calcium feedback loop and T cell activation: how cytoskeleton networks control intracellular calcium flux. *Biochimica et biophysica acta*. 2014 Feb;1838(2):557-68. PubMed PMID: 23860253.
166. Upshaw JL, Arneson LN, Schoon RA, Dick CJ, Billadeau DD, Leibson PJ. NKG2D-mediated signaling requires a DAP10-bound Grb2-Vav1 intermediate and phosphatidylinositol-3-kinase in human natural killer cells. *Nat Immunol*. 2006 May;7(5):524-32. PubMed PMID: 16582911.
167. Upshaw JL, Leibson PJ. NKG2D-mediated activation of cytotoxic lymphocytes: unique signaling pathways and distinct functional outcomes. *Seminars in immunology*. 2006 Jun;18(3):167-75. PubMed PMID: 16723257.
168. Chu T, Tyznik AJ, Roepke S, Berkley AM, Woodward-Davis A, Pattacini L, et al. Bystander-activated memory CD8 T cells control early pathogen load in an innate-like, NKG2D-dependent manner. *Cell reports*. 2013 Mar 28;3(3):701-8. PubMed PMID: 23523350. Pubmed Central PMCID: 3628815.
169. Baez NS, Cerbán F, Savid-Frontera C, Hodge DL, Tosello J, Acosta-Rodriguez E, et al. Thymic expression of IL-4 and IL-15 after systemic inflammatory or infectious Th1 disease processes induce the acquisition of "innate" characteristics during CD8+ T cell development. *PLOS Pathogens*. 2019;15(1):e1007456.
170. Castillo EF, Schluns KS. Regulating the immune system via IL-15 transpresentation. *Cytokine*. 2012 Sep;59(3):479-90. PubMed PMID: 22795955. Pubmed Central PMCID: 3422378.
171. Stonier SW, Ma LJ, Castillo EF, Schluns KS. Dendritic cells drive memory CD8 T-cell homeostasis via IL-15 transpresentation. *Blood*. 2008 Dec 1;112(12):4546-54. PubMed PMID: 18812469. Pubmed Central PMCID: 2597127.
172. Musso T, Calosso L, Zucca M, Millesimo M, Ravarino D, Giovarelli M, et al. Human monocytes constitutively express membrane-bound, biologically active, and interferon-gamma-upregulated interleukin-15. *Blood*. 1999 May 15;93(10):3531-9. PubMed PMID: 10233906.

173. Dubois S, Mariner J, Waldmann TA, Tagaya Y. IL-15R $\alpha$  recycles and presents IL-15 in trans to neighboring cells. *Immunity*. 2002 Nov;17(5):537-47. PubMed PMID: 12433361.
174. Sandau MM, Schluns KS, Lefrancois L, Jameson SC. Cutting edge: transpresentation of IL-15 by bone marrow-derived cells necessitates expression of IL-15 and IL-15R  $\alpha$  by the same cells. *Journal of immunology*. 2004 Dec 1;173(11):6537-41. PubMed PMID: 15557143.
175. Ku CC, Murakami M, Sakamoto A, Kappler J, Marrack P. Control of homeostasis of CD8+ memory T cells by opposing cytokines. *Science*. 2000 Apr 28;288(5466):675-8. PubMed PMID: 10784451.
176. Cui G, Hara T, Simmons S, Wagatsuma K, Abe A, Miyachi H, et al. Characterization of the IL-15 niche in primary and secondary lymphoid organs in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2014 Feb 4;111(5):1915-20. PubMed PMID: 24449915. Pubmed Central PMCID: 3918838.
177. Takayama E, Seki S, Ohkawa T, Ami K, Habu Y, Yamaguchi T, et al. Mouse CD8+ CD122+ T cells with intermediate TCR increasing with age provide a source of early IFN- $\gamma$  production. *Journal of immunology*. 2000 Jun 1;164(11):5652-8. PubMed PMID: 10820240.
178. Lai D, Zhu J, Wang T, Hu-Li J, Terabe M, Berzofsky JA, et al. KLF13 sustains thymic memory-like CD8(+) T cells in BALB/c mice by regulating IL-4-generating invariant natural killer T cells. *The Journal of experimental medicine*. 2011 May 9;208(5):1093-103. PubMed PMID: 21482696. Pubmed Central PMCID: 3092346.
179. Kurzweil V, LaRoche A, Oliver PM. Increased peripheral IL-4 leads to an expanded virtual memory CD8+ population. *Journal of immunology*. 2014 Jun 15;192(12):5643-51. PubMed PMID: 24795452. Pubmed Central PMCID: 4097049.
180. Lucas M, Schachterle W, Oberle K, Aichele P, Diefenbach A. Dendritic cells prime natural killer cells by trans-presenting interleukin 15. *Immunity*. 2007 Apr;26(4):503-17. PubMed PMID: 17398124. Pubmed Central PMCID: 2084390.
181. Baranek T, Manh TP, Alexandre Y, Maqbool MA, Cabeza JZ, Tomasello E, et al. Differential responses of immune cells to type I interferon contribute to host resistance to viral infection. *Cell host & microbe*. 2012 Oct 18;12(4):571-84. PubMed PMID: 23084923.
182. Colpitts SL, Stoklasek TA, Plumlee CR, Obar JJ, Guo C, Lefrancois L. Cutting edge: the role of IFN- $\alpha$  receptor and MyD88 signaling in induction of IL-15 expression in vivo. *Journal of immunology*. 2012 Mar 15;188(6):2483-7. PubMed PMID: 22327071. Pubmed Central PMCID: 3294000.

183. Martinet C, Kassir-Bodon A, Deschamps T, Cornet A, Le Floch S, Martinez V, et al. Permanently densified SiO<sub>2</sub> glasses: a structural approach. *Journal of physics Condensed matter : an Institute of Physics journal*. 2015 Aug 19;27(32):325401. PubMed PMID: 26214078.
184. Gill N, Chenoweth MJ, Verdu EF, Ashkar AA. NK cells require type I IFN receptor for antiviral responses during genital HSV-2 infection. *Cellular immunology*. 2011;269(1):29-37. PubMed PMID: 21477795.
185. Tanchot C, Lemonnier FA, Perarnau B, Freitas AA, Rocha B. Differential requirements for survival and proliferation of CD8 naive or memory T cells. *Science*. 1997 Jun 27;276(5321):2057-62. PubMed PMID: 9197272.
186. Kieper WC, Burghardt JT, Surh CD. A role for TCR affinity in regulating naive T cell homeostasis. *Journal of immunology*. 2004 Jan 1;172(1):40-4. PubMed PMID: 14688307.
187. Kambayashi T, Assarsson E, Lukacher AE, Ljunggren HG, Jensen PE. Memory CD8+ T cells provide an early source of IFN-gamma. *Journal of immunology*. 2003 Mar 1;170(5):2399-408. PubMed PMID: 12594263.
188. Spadaro M, Curcio C, Varadhachary A, Cavallo F, Engelmayer J, Blezinger P, et al. Requirement for IFN-gamma, CD8+ T lymphocytes, and NKT cells in talactoferrin-induced inhibition of neu+ tumors. *Cancer Res*. 2007 Jul 1;67(13):6425-32. PubMed PMID: 17616703.
189. Zdrengeha MT, Telcian AG, Laza-Stanca V, Bellettato CM, Edwards MR, Nikonova A, et al. RSV infection modulates IL-15 production and MICA levels in respiratory epithelial cells. *The European respiratory journal*. 2012 Mar;39(3):712-20. PubMed PMID: 21852331.
190. Lee A, Park SP, Park CH, Kang BH, Park SH, Ha SJ, et al. IL-4 Induced Innate CD8+ T Cells Control Persistent Viral Infection. *PLoS Pathog*. 2015 Oct;11(10):e1005193. PubMed PMID: 26452143. Pubmed Central PMCID: 4599894.
191. Berg RE, Forman J. The role of CD8 T cells in innate immunity and in antigen non-specific protection. *Current opinion in immunology*. 2006 Jun;18(3):338-43. PubMed PMID: 16616476.
192. Lertmemongkolchai G, Cai G, Hunter CA, Bancroft GJ. Bystander activation of CD8+ T cells contributes to the rapid production of IFN-gamma in response to bacterial pathogens. *Journal of immunology*. 2001 Jan 15;166(2):1097-105. PubMed PMID: 11145690.
193. Kilinc MO, Aulakh KS, Nair RE, Jones SA, Alard P, Kosiewicz MM, et al. Reversing tumor immune suppression with intratumoral IL-12: activation of tumor-associated T effector/memory cells, induction of T suppressor apoptosis, and infiltration of CD8+ T effectors. *Journal of immunology*. 2006 Nov 15;177(10):6962-73. PubMed PMID: 17082611.

194. Jarosz-Biej M, Smolarczyk R, Cichon T, Kulach N, Czapla J, Matuszczak S, et al. Combined Tumor Cell-Based Vaccination and Interleukin-12 Gene Therapy Polarizes the Tumor Microenvironment in Mice. *Archivum immunologiae et therapiae experimentalis*. 2015 Dec;63(6):451-64. PubMed PMID: 25801067. Pubmed Central PMCID: 4633448.
195. Jarosz-Biej M, Kaminska N, Matuszczak S, Cichon T, Pamula-Pilat J, Czapla J, et al. M1-like macrophages change tumor blood vessels and microenvironment in murine melanoma. *PloS one*. 2018;13(1):e0191012. PubMed PMID: 29320562. Pubmed Central PMCID: 5761928.
196. Watkins SK, Li B, Richardson KS, Head K, Egilmez NK, Zeng Q, et al. Rapid release of cytoplasmic IL-15 from tumor-associated macrophages is an initial and critical event in IL-12-initiated tumor regression. *Eur J Immunol*. 2009 Aug;39(8):2126-35. PubMed PMID: 19609975. Pubmed Central PMCID: 2841431.
197. Spranger S, Dai D, Horton B, Gajewski TF. Tumor-Residing Batf3 Dendritic Cells Are Required for Effector T Cell Trafficking and Adoptive T Cell Therapy. *Cancer cell*. 2017 May 8;31(5):711-23 e4. PubMed PMID: 28486109. Pubmed Central PMCID: 5650691.
198. Smeltz RB. Profound enhancement of the IL-12/IL-18 pathway of IFN-gamma secretion in human CD8+ memory T cell subsets via IL-15. *Journal of immunology*. 2007 Apr 15;178(8):4786-92. PubMed PMID: 17404259.
199. Dighe AS, Richards E, Old LJ, Schreiber RD. Enhanced in vivo growth and resistance to rejection of tumor cells expressing dominant negative IFN gamma receptors. *Immunity*. 1994 Sep;1(6):447-56. PubMed PMID: 7895156.
200. Kaplan DH, Shankaran V, Dighe AS, Stockert E, Aguet M, Old LJ, et al. Demonstration of an interferon gamma-dependent tumor surveillance system in immunocompetent mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1998 Jun 23;95(13):7556-61. PubMed PMID: 9636188. Pubmed Central PMCID: 22681.
201. Street SE, Cretney E, Smyth MJ. Perforin and interferon-gamma activities independently control tumor initiation, growth, and metastasis. *Blood*. 2001 Jan 1;97(1):192-7. PubMed PMID: 11133760.
202. Street SE, Trapani JA, MacGregor D, Smyth MJ. Suppression of lymphoma and epithelial malignancies effected by interferon gamma. *The Journal of experimental medicine*. 2002 Jul 1;196(1):129-34. PubMed PMID: 12093877. Pubmed Central PMCID: 2194011.
203. Stoeck M, Kromer W, Gekeler V. Induction of IL-15 mRNA and protein in A549 cells by pro-inflammatory cytokines. *Immunobiology*. 1998 Jul;199(1):14-22. PubMed PMID: 9717664.

204. Ge N, Nishioka Y, Nakamura Y, Okano Y, Yoneda K, Ogawa H, et al. Synthesis and secretion of interleukin-15 by freshly isolated human bronchial epithelial cells. *International archives of allergy and immunology*. 2004 Nov;135(3):235-42. PubMed PMID: 15467375.
205. Raulet DH. Roles of the NKG2D immunoreceptor and its ligands. *Nature reviews Immunology*. 2003 Oct;3(10):781-90. PubMed PMID: 14523385.
206. Diefenbach A, Jensen ER, Jamieson AM, Raulet DH. Rae1 and H60 ligands of the NKG2D receptor stimulate tumour immunity. *Nature*. 2001 Sep 13;413(6852):165-71. PubMed PMID: 11557981. Pubmed Central PMCID: 3900321.
207. Guerra N, Tan YX, Joncker NT, Choy A, Gallardo F, Xiong N, et al. NKG2D-deficient mice are defective in tumor surveillance in models of spontaneous malignancy. *Immunity*. 2008 Apr;28(4):571-80. PubMed PMID: 18394936. Pubmed Central PMCID: 3528789.
208. Zloza A, Lyons GE, Chlewicki LK, Kohlhapp FJ, O'Sullivan JA, Lacek AT, et al. Engagement of NK receptor NKG2D, but not 2B4, results in self-reactive CD8+ T cells and autoimmune vitiligo. *Autoimmunity*. 2011 Dec;44(8):599-606. PubMed PMID: 21913803.
209. Barber A, Meehan KR, Sentman CL. Treatment of multiple myeloma with adoptively transferred chimeric NKG2D receptor-expressing T cells. *Gene therapy*. 2011 May;18(5):509-16. PubMed PMID: 21209626. Pubmed Central PMCID: 3095961.
210. Barber A, Sentman CL. NKG2D receptor regulates human effector T-cell cytokine production. *Blood*. 2011 Jun 16;117(24):6571-81. PubMed PMID: 21518928. Pubmed Central PMCID: 3123023.
211. Barber A, Zhang T, DeMars LR, Conejo-Garcia J, Roby KF, Sentman CL. Chimeric NKG2D receptor-bearing T cells as immunotherapy for ovarian cancer. *Cancer Res*. 2007 May 15;67(10):5003-8. PubMed PMID: 17510432.
212. Barber A, Zhang T, Megli CJ, Wu J, Meehan KR, Sentman CL. Chimeric NKG2D receptor-expressing T cells as an immunotherapy for multiple myeloma. *Experimental hematology*. 2008 Oct;36(10):1318-28. PubMed PMID: 18599182. Pubmed Central PMCID: 2638591.
213. Barber A, Zhang T, Sentman CL. Immunotherapy with chimeric NKG2D receptors leads to long-term tumor-free survival and development of host antitumor immunity in murine ovarian cancer. *Journal of immunology*. 2008 Jan 1;180(1):72-8. PubMed PMID: 18097006.
214. Lu C, Klement JD, Ibrahim ML, Xiao W, Redd PS, Nayak-Kapoor A, et al. Type I interferon suppresses tumor growth through activating the STAT3-granzyme B pathway in tumor-infiltrating cytotoxic T lymphocytes. *Journal for immunotherapy of cancer*. 2019 Jun 22;7(1):157. PubMed PMID: 31228946. Pubmed Central PMCID: 6589175.

215. Meresse B, Chen Z, Ciszewski C, Tretiakova M, Bhagat G, Krausz TN, et al. Coordinated induction by IL15 of a TCR-independent NKG2D signaling pathway converts CTL into lymphokine-activated killer cells in celiac disease. *Immunity*. 2004 Sep;21(3):357-66. PubMed PMID: 15357947.
216. Perea F, Bernal M, Sanchez-Palencia A, Carretero J, Torres C, Bayarri C, et al. The absence of HLA class I expression in non-small cell lung cancer correlates with the tumor tissue structure and the pattern of T cell infiltration. *International journal of cancer*. 2017 Feb 15;140(4):888-99. PubMed PMID: 27785783.
217. Al-Sukaini A, Hornicek FJ, Peacock ZS, Kaban LB, Ferrone S, Schwab JH. Immune Surveillance Plays a Role in Locally Aggressive Giant Cell Lesions of Bone. *Clinical orthopaedics and related research*. 2017 Dec;475(12):3071-81. PubMed PMID: 28725958. Pubmed Central PMCID: 5670060.
218. Kirilovsky A, Marliot F, El Sissy C, Haicheur N, Galon J, Pages F. Rational bases for the use of the Immunoscore in routine clinical settings as a prognostic and predictive biomarker in cancer patients. *International immunology*. 2016 Aug;28(8):373-82. PubMed PMID: 27121213. Pubmed Central PMCID: 4986234.
219. Ali HR, Provenzano E, Dawson SJ, Blows FM, Liu B, Shah M, et al. Association between CD8+ T-cell infiltration and breast cancer survival in 12,439 patients. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology*. 2014 Aug;25(8):1536-43. PubMed PMID: 24915873.
220. Liu S, Lachapelle J, Leung S, Gao D, Foulkes WD, Nielsen TO. CD8+ lymphocyte infiltration is an independent favorable prognostic indicator in basal-like breast cancer. *Breast cancer research : BCR*. 2012 Mar 15;14(2):R48. PubMed PMID: 22420471. Pubmed Central PMCID: 3446382.
221. Scheper W, Kelderman S, Fanchi LF, Linnemann C, Bendle G, de Rooij MAJ, et al. Low and variable tumor reactivity of the intratumoral TCR repertoire in human cancers. *Nature medicine*. 2019 Jan;25(1):89-94. PubMed PMID: 30510250.
222. Simoni Y, Becht E, Fehlings M, Loh CY, Koo SL, Teng KWW, et al. Bystander CD8(+) T cells are abundant and phenotypically distinct in human tumour infiltrates. *Nature*. 2018 May;557(7706):575-9. PubMed PMID: 29769722.
223. Rossignol A, Levescot A, Jacomet F, Robin A, Basbous S, Giraud C, et al. Evidence for BCR-ABL-dependent dysfunctions of iNKT cells from chronic myeloid leukemia patients. *Eur J Immunol*. 2012 Jul;42(7):1870-5. PubMed PMID: 22585600.
224. Basbous S, Levescot A, Piccirilli N, Brizard F, Guilhot F, Roy L, et al. The Rho-ROCK pathway as a new pathological mechanism of innate immune subversion in chronic myeloid leukaemia. *The Journal of pathology*. 2016 Nov;240(3):262-8. PubMed PMID: 27513300.

225. Jacomet F, Cayssials E, Barbarin A, Desmier D, Basbous S, Lefevre L, et al. The Hypothesis of the Human iNKT/Innate CD8(+) T-Cell Axis Applied to Cancer: Evidence for a Deficiency in Chronic Myeloid Leukemia. *Front Immunol.* 2016;7:688. PubMed PMID: 28138330. Pubmed Central PMCID: 5237805.
226. Hodge DL, Reynolds D, Cerban FM, Correa SG, Baez NS, Young HA, et al. MCP-1/CCR2 interactions direct migration of peripheral B and T lymphocytes to the thymus during acute infectious/inflammatory processes. *Eur J Immunol.* 2012 Oct;42(10):2644-54. PubMed PMID: 22740067. Pubmed Central PMCID: 3781587.
227. Rodriguez-Galan MC, Bream JH, Farr A, Young HA. Synergistic effect of IL-2, IL-12, and IL-18 on thymocyte apoptosis and Th1/Th2 cytokine expression. *Journal of immunology.* 2005 Mar 1;174(5):2796-804. PubMed PMID: 15728489.
228. Pedrotti LP, Barrios BE, Maccio-Maretto L, Bento AF, Sena AA, Rodriguez-Galan MC, et al. Systemic IL-12 burst expands intestinal T-lymphocyte subsets bearing the alpha(4) beta(7) integrin in mice. *Eur J Immunol.* 2016 Jan;46(1):70-80. PubMed PMID: 26464149.

# PRODUCCIÓN CIENTÍFICA

PUBLICACIONES EN REVISTAS CON REFERATO

- **Savid-Frontera C**, Viano ME, Baez NS, Reynolds D, Young HA, Rodriguez-Galan MC. *“Tolerable systemic levels of Interleukin-12 induced by a single gene-derived treatment is able to efficiently control tumor growth by inhibiting tumor angiogenesis and reverting an immune suppressive tumor microenvironment”*. J Immunother. **En revisión** (2019)
- Baez NS, Cerbán F, **Savid-Frontera C**, Hodge DL, Tosello J, Acosta-Rodriguez E, Almada L, Gruppi A, Viano ME, Young HA, Rodriguez-Galan MC. *Thymic expression of IL-4 and IL-15 after systemic inflammatory or infectious Th1 disease processes induce the acquisition of "innate" characteristics during CD8+ T cell development*. PLoS Pathog. 2019 Jan 4;15(1):e1007456. doi: 10.1371/journal.ppat.1007456. eCollection 2019 Jan.

PARTICIPACIÓN EN CONGRESOS

- ***"New insights in the generation and antitumoral effects of Innate CD8+ T cells"***.  
SAVID FRONTERA, C.; VIANO, M.E.; BAEZ, N.S.; RODRIGUEZ-GALAN, M.C.- LXVII Reunión Anual de la Sociedad Argentina de Inmunología (SAI). Octubre 9-11, 2019, San Miguel de Tucuman, Tucuman, Argentina.
  
- ***"Thymic maturation and exportation to secondary lymphoid organs (SLO)"***.  
VIANO, M.E.; BAEZ, N.S.; SAVID FRONTERA, C.; CERBÁN, Fabio; RODRIGUEZ-GALAN, M.C.- LXVII Reunión Anual de la Sociedad Argentina de Inmunología (SAI). Octubre 9-11, 2019, San Miguel de Tucuman, Tucuman, Argentina.
  
- ***"Role of Innate CD8+ T cells in cancer"***.  
CONSTANZA SAVID FRONTERA; NATALIA BAEZ; M CECILIA RODRIGUEZ GALAN. REUNIÓN CONJUNTA SAIC SAI SAFIS 2018. LXVI Reunión Anual de la Sociedad Argentina de Inmunología (SAI). 16-19 de Noviembre de 2018, Mar del Plata.
  
- ***"The canonical Wnt/ $\beta$ -catenin signaling pathway is involved in the development of innate T cells in the thymus under infectious/inflammatory systemic conditions"***.  
NATALIA BAEZ; XIMENA VOLPINI; CONSTANZA SAVID FRONTERA; CRISTINA MOTRAN; M CECILIA RODRIGUEZ GALAN. REUNIÓN CONJUNTA SAIC SAI SAFIS 2018. LXVI Reunión Anual de la Sociedad Argentina de Inmunología (SAI). 16-19 de Noviembre de 2018, Mar del Plata.
  
- ***"Role of Innate CD8+ T cells in cancer"***.  
CONSTANZA SAVID FRONTERA; NATALIA BAEZ; M CECILIA RODRIGUEZ GALAN. REUNIÓN CONJUNTA SAIC SAI SAFIS 2018. REUNIÓN CONJUNTA DE SOCIEDADES DE BIOCIENCIAS. 13-17 de Noviembre de 2017, Ciudad Autónoma de Buenos Aires.
  
- ***"Development of Innate T cells in the thymus under infectious/inflammatory systemic conditions."***  
NATALIA BAEZ; CONSTANZA SAVID FRONTERA; FABIO CERBAN; XIMENA VOLPINI; CRISTINA MOTRAN; M CECILIA RODRIGUEZ GALAN. REUNIÓN CONJUNTA DE SOCIEDADES DE BIOCIENCIAS. 13-17 de Noviembre de 2017, Ciudad Autónoma de Buenos Aires.

- *“Innate CD8 T cells: an unexplored line of defense of the immune system in cancer?”*

CONSTANZA SAVID FRONTERA; NATALIA BAEZ; M CECILIA RODRIGUEZ GALAN. LXI REUNIÓN CIENTÍFICA ANUAL DE LA SOCIEDAD ARGENTINA DE INVESTIGACIÓN CLÍNICA Y LXIV REUNIÓN CIENTÍFICA ANUAL DE LA SOCIEDAD ARGENTINA DE INMUNOLOGÍA. 16-19 de Noviembre de 2016, Mar del Plata.

- *“Desarrollo de células T innatas en timo bajo condiciones infecciosas/inflamatorias sistémicas”.*

NATALIA BAEZ; FABIO CERBAN; CONSTANZA SAVID FRONTERA; M CECILIA RODRIGUEZ GALAN. LXI REUNIÓN CIENTÍFICA ANUAL DE LA SOCIEDAD ARGENTINA DE INVESTIGACIÓN CLÍNICA Y LXIV REUNIÓN CIENTÍFICA ANUAL DE LA SOCIEDAD ARGENTINA DE INMUNOLOGÍA. Trabajo galardonado con el Premio “Dr. Leonardo Satz” al MEJOR TRABAJO EN INMUNOLOGÍA 2016. 16-19 de Noviembre de 2016, Mar del Plata.

- *“Systemic IL-12 as an antitumor agent in cancer therapy”.*

CONSTANZA SAVID FRONTERA; NATALIA BAEZ; M CECILIA RODRIGUEZ GALAN. LXIII Annual Meeting of the Argentinean Society for Immunology. 18-21 de Noviembre de 2015, Buenos Aires.

- *“Appearance of innate T cells in thymus in infectious/inflammatory conditions”.*

NATALIA BAEZ; FABIO CERBAN; CONSTANZA SAVID FRONTERA; M CECILIA RODRIGUEZ GALAN. LXIII Annual Meeting of the Argentinean Society for Immunology. 18-21 de Noviembre de 2015, Buenos Aires.

- *“Alterations in thymocytes populations during infectious/inflammatory conditions”.*

NATALIA BAEZ; FABIO CERBAN; CONSTANZA SAVID FRONTERA; M CECILIA RODRIGUEZ GALAN. LIX REUNIÓN CIENTÍFICA ANUAL DE LA SOCIEDAD ARGENTINA DE INVESTIGACIÓN CLÍNICA Y LXII REUNIÓN CIENTÍFICA ANUAL DE LA SOCIEDAD ARGENTINA DE INMUNOLOGÍA. 19-23 de Noviembre de 2014, Mar del Plata.

# AGRADECIMIENTOS

La vida nos enfrenta constantemente a nuevos desafíos. Independientemente de la magnitud de los mismos el apoyo, la confianza y el cariño de la gente que nos acompaña en cada momento es el motor que nos impulsa a transitarlos.

El camino a lo largo de estos últimos cinco años no fue fácil: colmado de incertidumbres, de preguntas, de ilusiones y desilusiones, de esperanzas y desesperanzas, de frustraciones y de éxitos, de risas y de llantos, de ansiedad (puffffffff), de viajes, de abrazos, de nuevas experiencias. Mirando atrás, me acuerdo de la Coni que empezó el doctorado: recién recibida, llena de miedos, dudas e inseguridades. Veo la Coni que termina hoy, que capaz no tenga todas las certezas o respuestas que busca, pero tiene más confianza en sí misma, se siente más preparada para largarse al mundo, y lo más importante: no está sola, se lleva en la valija recuerdos, aprendizajes y el amor y apoyo de toda la gente que la rodea.

En primer lugar, quiero agradecer al *Rodriguez Team*. Gracias **Ceci** por abrirme las puertas de tu equipo, por confiarme esta tarea y este proyecto que hoy, después de tanto tiempo, están llegando a la recta final. Gracias por tu calidez y tu flexibilidad, por entender que la familia va primero y no dudar en dejarme tomarme unos días cuando lo necesitaba para ir a ver mis papás. Gracias, sobre todo, por el apoyo este último tiempo. Las dos sabemos lo difícil y desgastante que fue trabajar a contrarreloj, con todas las trabas habidas y por haber, con más incertidumbres que certezas, y más difícil aun estando aislados, y lejos de los afectos. Gracias por escucharme, dejarme desahogar, contenerme y no dejarme bajar los brazos. Gracias por cargarte esta “batalla” al hombro y permitirnos haber llegado hoy hasta acá. Gracias **Nati** por tu ayuda, tu compañía, y tu santa paciencia para enseñarme todo lo que sabías. Gracias por transmitirme tu TOC por la organización, el uso de los fibrones de colores y las agendas (aunque no lo creas Aguacate no existiría de no ser por vos). Gracias por tu buena predisposición para darme una mano siempre que lo necesitara (incluso en tu casamiento :p jajajaja) y por abrirte conmigo, me llevo una excelente amiga. Le toca el turno a la “nueva incorporación del grupo” (ya no tan nueva jaja): **Tefi**, te nos uniste hace dos años y en ese tiempo estuve más ausente que presente. Nos cruzamos unos días antes de mi primera pasantía, al año siguiente me fui de nuevo, y cuando estabas enfocada y decidida a exprimirme a mi regreso: llego la pandemia (otra anécdota que se suma a tu historial de “*siempre triunfando*”). Se lo importante que es (o por lo menos lo fue para mí) tener un compañero que te guíe y ayude, y las circunstancias no me dejaron estar para vos, te pido perdón por eso. Gracias Tefi, porque a pesar de todo siempre estuviste dispuesta a darme una mano, te hice madrugar y trasnochar como nunca con mis experimentos, y te cargaste aquel experimento al hombro como una campeona el día que no aparecí jaja, nunca me voy a olvidar y te voy a estar siempre agradecida.

A mi queridísimo laboratorio 104, que me regaló no solamente excelentes compañeras sino también excelentes amigas. Gracias por todos los momentos que compartimos dentro y fuera del lab, por haberme ayudado en algún experimentazo (dudo

que alguna se haya salvado jaja), por los seminarios frustrados SoCoRro MaRi que nunca hicimos, por ablandar mi corazón de aluminio jajaja, por estar cuando más las necesité, por darse cuenta cuando necesitaba un abrazo sin tener que preguntarme nada, por no decir ni una palabra, pero estar siempre al pie del cañón. A la **Chole**, esa amiga que no necesita que le pidas nada, va a estar ahí ayudando y bancando los trapos siempre. Gracias Sole por tu amistad, por tu buena onda y por todo tu veneno jajaja. A **Bibita**, gracias por ser tan transparente, tan cariñosa y tan colgada, tan Bibiiiiiiii jajaja, gracias por tus consejos (científicos y personales) y por tu ayuda en los experimentos. A **Ivi**, la mamá del grupo, la propietaria de la sede oficial de la juntadas 104, nuestra proveedora de cervezas, gracias por compartirnos a tu hermosa familia, gracias por las tardes y consejos compartidos, y por las noches del Cluc que tanto se extrañan ♡. A la **Pauli**, la mamu de las mamuuuuuuuuuus, you know!! Jajaja Gracias Pauli por ser tan auténtica, por tus ocurrencias, tu chispa y por divertirnos tanto con tus bailecitos y boludeces, se te extraña un montón!!! A **Emi** ♂, nuestro macho alfa, gracias por proteger al harém, gracias por tus tips y consejos científicos, por ser junto a Pauli mis mentores en el mundo de los modelos murinos de cáncer, y por confiar en mi para ser tu nueva compañerita de grupo!! (en breve me tenés por allá para darte un abrazooooooooo jajaja). A **Leo**, no compartimos mucho tiempo juntos, pero si lo suficiente para conocer lo excelente persona que sos, gracias por la buena onda y por compartir con nosotros a Juli y sus ocurrencias. A la **Ceci**, por divertirnos con tu colgadez, por estar siempre disponible para ir de after lab, por los mates y birras compartidas. A **Janechi**, mi compañera de demanda, de las primeras salidas y locuras, por las tardes/noches de burako y fichinis con el perri. A **Liletta**, porque te gusta pelear tanto como a mi jajajaja somos tan distintas y tan parecidas a la vez. Gracias Li por tu hermosa amistad, por escucharme siempre que lo necesité y aconsejarme, por tus abrazos que reconfortan y llenan de pilas, por tus buenas vibras y tu energía, por las tardes y mates compartidos. A **Emi** ♀, tan callada, tranquila, gracias por tu paz y calidez, gracias por bancarme tanto, por las catársis, por no decir nada o por decir lo suficiente en el momento justo. Gracias por estar siempre y por ser incondicional, me llevo una amiga de oro. A **Carito**, gracias por tus locuras, por tu passssssta para la vida, por divertirnos taaaaaaantoooo con tus historias, por tu chispa de todos los días. A la **Dani**, mi compa de inglés, la loca del orden. Gracias Dani por tu sencillez, por ser siempre tan honesta y directa, por tus abrazos y tus consejos, por tener siempre disponible el oído y el hombro para tus amigas. A la nueva camada 104, que cuando nos estábamos vaciando nos llenaron el rancho de repente: Gracias **Sile, Jere, Sofi, Vir** y **Clari** por la buena onda de todos los días. No tuvimos la suerte de compartir tanto tiempo juntos, y quizás no llegue a conocerlos como me gustaría, pero fue suficiente para ver lo buenas personas que son, se ganaron un lugarcito en mi ♡. **Lu**, tuve la suerte de compartir un poco más con vos y llegar a conocerte mejor, y debajo de esa coraza encontré una excelente persona y amiga, directa, honesta, atenta; gracias por tus consejos y tu ayuda este último tiempo.

Muchas gracias a todos los integrantes del laboratorio 104 y nuevo lab de la torre: **Silvia, Claudia, Vicky, Dra. Riera, Rubén, Mariana, Pablo** y **Paula**, por haberme hecho sentir

parte desde el minuto cero. Muchas gracias en especial a Pauletta, con quien comparti mates, charlas y risas. Gracias por tus cafés y tus consejos! A la tía Clau, por su cariño, afecto y calidez, y por ser la clienta más fiel de Aguacate jaja. Gracias también a Silvia por su cariño, por estar dispuesta a ayudarme siempre que lo necesité, con cartas de recomendación, y sobre todo en este último tiempo. Gracias Pablo por toda tu ayuda y consejos para los últimos análisis de la tesis y por permitirnos compartir con ustedes sus seminarios.

Este laboratorio me dio innumerables herramientas a lo largo de mi carrera doctoral, y muchas más aún que me ayudan a formarme como persona. No me llevo solo protocolos y técnicas aprendidas, me llevo valores, colegas y amigos. No importa a donde nos muden, cuanto nos dividan, o por donde estemos desparramados: siempre vamos a ser la gran FAMILIA 104 ♡.

Gracias a todos los miembros del **Departamento de Bioquímica Clínica- CIBICI** por cada préstamo, ayuda, preguntas, conocimientos y tiempo compartido todos estos años. Gracias a **Nico, Nadia y Paulo** por tooooooooooda la ayuda y por la buena onda cada vez que necesite un consejo o una mano. Gracias a **Emi Gavilgio** por su ayuda y su paciencia con la inyección hidrodinámica al inicio de mi tesis. Gracias **Clau** por la ayuda, cartas y consejos para los pedidos de becas sin los que no hubiese ido ni a la esquina jaja. Gracias a todo el grupo de becarios y becarias, e investigadores siempre predispuestos a ayudar en lo que hiciera falta. Gracias a todo el **personal de apoyo**, que son un pilar fundamental de la institución y nos ayudan a llevar nuestros proyectos adelante. En especial quiero agradecer a **Paula y Pili, Lau y Gabi, y Vicky** que siempre han estado dispuestas a ayudarme y a tomarse el tiempo necesario para escucharnos y explicarnos lo que hiciera falta. Este es un trabajo en equipo, y sin la colaboración y el aporte de todos no sería posible.

Gracias al **grupo del Dr. Donnadieu**: en especial a Emmanuel, Lene, Sarah, Vincent, Marion, Clara, Nadege, Alan, Rachida, Morgan y Jerome, gracias por recibirme, por toda su ayuda y sus consejos, por su paciencia y por todo el tiempo compartido. Gracias al **IRATI Team**, referentes en el estudio de las células T CD8<sup>+</sup> innatas, por compartir sus conocimientos con nosotras. Gracias Jean-Marc, André, Alice, Lucie, Lauren, Aurelie, Nathalie y Adriana por recibirme tan cálidamente, gracias por enseñarme tan pacientemente y con tanto amor y pasión lo que hacen. Gracias por las reuniones y enseñanzas de los viernes, por tomarse la molestia de hablar en inglés siempre que estuviese presente, por coparse tomando mates o comiendo empanadas, por malcriarme con raclettes y panadería francesa, por llevarme de paseo los fines de semana (o de joda Lucie jaja), por las cervezas y vinos compartidos. Durante toda la estadía se han preocupado por hacerme sentir acompañada y como en casa y les voy a estar siempre agradecida. Merci pour tout ♡

Gracias a los miembros de mi Comisión de Tesis: **Cinthia, Cristina y Germán**. Gracias por acompañarnos todos estos años, por sus consejos y recomendaciones. Gracias en particular por toda su ayuda y apoyo brindado en estos últimos meses. Gracias a la **Dra.**

**Mercedes Fuertes** por aceptar recibir y evaluar la tesis, sobre todo por haberlo hecho tan rápidamente. Gracias a la **Escuela de Posgrado** de la Facultad, en particular a la **Dra. Canavoso** y a **Betina**, por su preocupación, ayuda y apoyo en esta última etapa.

Gracias a toda la comunidad de la **Facultad de Ciencias Químicas de la UNC**, que me permitió no solo doctorarme hoy, sino también formarme durante mi carrera de grado. Gracias a este país donde nací y crecí, que me dio la posibilidad de realizar mis estudios universitarios de calidad y de manera gratuita.

Quiero agradecer a los amigos que me llevo de la Facultad y de la vida. Gracias en especial a **Bacon** y **Mili**, mis amigas de la Facu, que me acompañan desde hace 10 años. Mis amigas que me aturden cada vez que hablan, pero vale totalmente la pena la pérdida de audición cada segundo que estas con ellas. Gracias a **Maxo**, a quien prácticamente le debo mi título de Bioquímica. Gracias por ayudarme y compartirme todos tus conocimientos, y por tu paciencia para explicarme mil veces las cosas mientras me quedaba dormida. Gracias a **Vale** y a **Anita**, y a todo el grupo de **Emi y la plebe** por las tardes de estudio, clases, salidas y birras compartidas. Gracias a **Tomi**, **Diego** y **Nahue**, mis amigos que me llevo de mi carrera frustrada de farmacia jajaja. Gracias **Fedi**, **Gordo** y **Eve** por los asados, las salidas, los findes en Quillinzo o Salsi y por todas las charlas que compartimos, gracias por todos estos años de amistad. Gracias a todo el grupo de **Universitarios en Acción** por el tiempo que pasamos juntos, por permitirme ayudarlos a ayudar, y devolver a la sociedad un poco de todo lo que nos da. Gracias en especial a **Belu**, **Javi**, **Solciño**, **Gasti**, **Emi** y **Marite** grandes amigos que me dejó el voluntariado.

Gracias a **Flor** y **Cele**, mis piernas para las salidas, amigas desde no hace tanto, pero incondicionales. Amigas que no hace mucho forman parte de mi vida, pero desde entonces siempre han estado para escucharme y bancarme (¿inestable quién? jaja), han llorado y reído conmigo, y me han aconsejado un montón. En tan poco tiempo se volvieron super importantes para mí, y a donde sea que vaya las llevo en mi cora ♡. Gracias a **Jules**, **Cedric**, **Marc** y **Morgan**, que, junto con Cele, son de lo mejor que me llevo de Paris. Gracias a **Diego**, **Lucie**, **Alice** y **Lauren**, los amigos que me regalo Poitiers.

Esta amiga se merece una tesis entera para agradecerle, y seguro me quedo corta. Gracias **Piluqui**: por ser tan incondicional y auténtica, por estar siempre ahí bancando los trapos desde el día cero, por estar siempre al pie del cañón y sorprenderme con mil regalos para sacarme una sonrisa o acompañarme cuando más lo necesito. Gracias por hacerte presente en cada momento, como sea, pese a la distancia. Una amistad que empezó hace 28 años y sigue sumando, y que no cambio por nada. *Aprovecho este espacio para agradecer a toda la familia Marín del Boca que siempre me ha recibido como una hija/hermana más (no suficiente para que me cambie el nombre a Coni Marín jaja).*

Quiero agradecer también a **Sof**, otra amiga incondicional. Callada, reservada, pero la mejor a la hora de poner el oído y tirarte la posta. Gracias Sofi por bancarme todos estos

años, por todas las salidas y las charlas y momentos compartidos en Córdoba, por sumarte como una más de la flia desde el primer depto en Pueyrredón. Gracias por subirme a un avión ni bien llegué a Francia para visitarme, por escucharme y apoyarme cuando más lo necesité. Hoy estamos lejos y la comunicación no es nuestro fuerte jaja, pero sé que ni la distancia ni el tiempo van a cambiar esta amistad. Es el turno de **Vicky**, mi gorda de mierda favorita ♡ jajajaja Amiga, gracias por ser como sos, por estar siempre, por tus consejos tan sabios. Gracias por ser tan sensible y enamoradiza, por entretenernos con tus historias, por ser tan honesta y transparente. Te extraño todos los días roomie!! A **Chiru**, mi amiga desde los 4, gracias por esta larga amistad. Por más viajes como el de este último verano (próximamente por USA ;). Gracias a **Magdi, Meri y Carito**, por los tours y las salidas porteñas; a **Sofi** por la buena onda y por compartirnos su sabiduría del mundo del vino; y a **Cata** por hacerme siempre el aguante, y por regalarnos a nuestros sobris tan lindos ♡ Gracias a todas: **Agus, Rola, Valen, Lola, Tati, Neo**, y **Eri** por las juntadas, salidas y todo el tiempo compartido. A mi magistral grupo de estudio del cole: **Fede, Tecla y Emi** jajaja, cada uno siguió caminos diferentes, pero es bueno saber que seguimos en contacto y que siguen siendo igual de inmaduros que hace 10 años jajajaja.

No quiero dejar de agradecer a mi familia: sin la que hoy no hubiese llegado hasta acá, sin la que no hubiese llegado a ser la persona que soy.

Gracias **Mamá**. Gracias por tu paciencia, por estar siempre para escucharme, por tus consejos y por tus abrazos. Gracias por las charlas tiradas en tu cama, por los mimos y tu compañía. Gracias por conocerme tanto. Gracias por tu apoyo todos estos años, en lo que sea, con quién sea, donde sea. Gracias por tu amor incondicional.

Gracias **pa**. Gracias por ser “todólogo” y resolver siempre nuestros problemas. Gracias por ser nuestro abogado y no cobrarnos honorarios. Gracias (o no) por tu capacidad de discutir por lo que sea con quien sea, que lamento informarte que se hereda!!!! Jajajajaja. Gracias por ablandarte este último tiempo y por abrirte más conmigo. Gracias por estar siempre dispuesto a escucharme, y por intentar calmarme o desestresarme siempre que hizo falta (últimamente muy seguido jaja). Gracias por apoyarme en cada paso que doy y por confiar en mí.

A mis hermanos: **Agus, Paco, Valen, Tute, Cande** y **Feli**. Somos tantos, tan distintos, unos estamos más cerca, otros más lejos, capaz con algunos tenemos más contacto que con otros... sin importar donde estemos o cuanto tiempo pase, sé que siempre voy a ser la preferida de mamá jajajajajajaja na, sé que nuestra relación no va a cambiar y que cuando nos reencontremos todo va a ser como siempre ♡. Gracias flaco por las birras y charlas compartidas, gracias por ser tan cariñoso siempre. A Paco y Mili, que nos regalaron a la sobrina mas linda del mundooooo ♡. Gracias Paco por tu humor, tu espontaneidad, por tus boludeces para hacernos llorar de risa. Por transmitirme tu amor por el vino, y por todas las charlas y consejos. Gracias Valen, madrina, por tus tips de moda y por compartirme la ropa

jaja gracias por estar siempre que lo necesité. A pesar de que estemos lejos, de la diferencia horaria y que quizá no hablemos tan seguido sé que siempre vas a estar ahí para mí. A Zulo, por pelearme, robarme los chupetes (no recomendado por el COE), por quemarme el pelo y cualquier otra maldad que me hayas hecho: lo que no te mata te fortalece jajajaja gracias por las guerras con perfumes de mamá, por los juegos, por cubrirme de las cagadas, y por ser mi compinche siempre (PD: yo soy kiko). Gracias Candula por volverte tan incondicional, por escucharme y aconsejarme tanto, por volverte tan compañera y amiga. Gracias al anexo o combo: **Lucas**, por estar tan presente, por ayudar siempre que pudiste dar una mano, por las cenas, mates y birras compartidas. A Feli: enano, te tocó ser hijo único. Te tocó tener a mamá y a papá solo para vos, la envidia de los otros 6 jaja. Gracias por ser tan compañero de mamá, gracias por tu espontaneidad y por ser tan transparente. Lamento que no hayamos compartido tanto tiempo juntos, soy consciente de la excelente persona que sos hoy y que vas a ser mañana. Sos super aplicado, responsable, dedicado e inteligente, asique no tengo dudas de que también vas a ser un excelente profesional: seguí así enano que vas a llegar muy lejos!!

A mi abuela Abi, que tenemos la suerte de tener hoy con nosotros, y a mis abuelos que me cuidan desde arriba ♡. A todos mis tíos y tías, primos, primas y anexos: por el cariño y el apoyo de siempre.

Ojalá todos tengan la suerte de tener las amigas y amigos que tengo, de tener una familia tan auténtica y divertida como la mía. Ojalá todos tengan la suerte de tener cerca afectos como los que me acompañan y acompañaron.

Gracias a todos. A los que nombré, y de los que seguro me olvidé. Gracias a quienes están hoy conmigo, a quienes ya no están, y a quienes, si bien hoy no forman parte de mi vida, han sido un pilar fundamental en algún punto de este largo camino.

Con todo el amor del mundo,

Los quiere,

Coni ♡