



UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA

Evaluación de la capacidad inmuno-estimulante de la terapia neo-adyuvante con Doxorrubicina y Ciclofosfamida en pacientes con cáncer de mama

David Andrés Bernal Estévez

Universidad Nacional de Colombia
Facultad de Medicina
Doctorado en Ciencias Biomédicas

Bogotá – Colombia
2017



UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA

**Evaluación de la capacidad inmuno-estimulante de la terapia
neo-adyuvante con Doxorrubicina y Ciclofosfamida en
pacientes con cáncer de mama**

David Andrés Bernal Estévez, M.D.

Tesis presentada como requisito para recibir el título de
Doctor en Ciencias Biomédicas

Director

Dr. Carlos Alberto Parra López MD., PhD.

Grupo de Investigación en Inmunología y Medicina Traslacional
Facultad de Medicina – Universidad Nacional de Colombia

Universidad Nacional de Colombia
Facultad de Medicina
Doctorado en Ciencias Biomédicas

Bogotá – Colombia
2017

A mis padres Dafne y Jorge por su amor y apoyo,

A mi hermano Alejandro por su ejemplo,

Y a Diana mi amor.

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer en primer lugar a mi familia, en especial a mis padres Dafne y Jorge por su infinito apoyo y amor, a mi hermano Alejandro por su ejemplo de trabajo y una dedicación especial a mi esposa Diana con todo mi amor.

A mi profesor, maestro y guía el Dr. Carlos Parra, quien con su ejemplar dedicación y pasión por el trabajo me compartió sus conocimientos y sus enseñanzas que hicieron de este trabajo un proceso de aprendizaje constante y que va a ser mi guía en mi desempeño profesional.

A la Fundación Salud de los Andes, en especial al Dr. Fabio Méndez quien creyó en mí desde un principio y quien me ha apoyado en estos años.

A todos los co-investigadores que de alguna forma han aportado a este trabajo desde el acceso a los pacientes como en su asesoría: Hospital Occidente de Kennedy a los doctores Rafael Tejada y Mauricio García; a la Clínica del Seno Dr. Ramiro Sánchez; al Instituto Nacional de Cancerología – Servicio de mama y tejidos blando Dr. Oscar García; al Hospital el Tunal a los doctores Gustavo Márquez y Rene Bustos; Universidad Nacional de Australia – John Curtin School of Medical Research a la Dra. Carola Vinuesa; al grupo de patología de la Facultad de Medicina, en especial a mis profesores Dr. Yobany Sánchez y Dra. Jineth Acosta. A los miembros del comité tutorial por sus valiosas críticas y contribuciones, Dra. Juanita Ángel (Instituto de Genética Humana – Universidad Pontificia Javeriana) y el Dr. Luis Fernando Cadavid (Instituto de Genética – Universidad Nacional de Colombia).

A todas las pacientes quien de manera desinteresada aportaron sus muestras de sangre en medio de una situación de salud que cambia totalmente la forma de percibir y enfrentar la vida. A las mujeres sanas a quienes les agradezco igualmente por dar la oportunidad de aportar un conocimiento nuevo que puede colaborar en el gran proceso de entender y enfrentar el cáncer. También quiero agradecerles a todos mis amigos que he tenido la fortuna de conocer y en especial en poder compartir las experiencias de trabajar en equipo, a Vanessa Peñuela, Dina Lozano, Diana Tovar y Mauren Ortiz mis compañeras de la Fundación Salud de los Andes quienes compartieron el principio de esta larga travesía; a Anamaría Morales, Alejandra Infante y Paola Ortiz quienes con su alegría le dieron una luz especial al laboratorio. A Alejandra Alfaro, David Becerra y Sebastián Acebedo excelentes colegas, a Nicolás y Manuela quienes hasta ahora comienzan este largo y hermoso camino.

FINANCIACIÓN

Declaro que durante todo el desarrollo de la tesis he sido empleado de la Fundación Salud de los Andes en el área de investigación bajo el grupo de investigación en Inmunología y Oncología clínica (GIIOC).

Este trabajo fue financiado por la Fundación Salud de los Andes, bajo el convenio de cooperación con la Universidad Nacional de Colombia bajo el proyecto financiado por Colciencias, Fundación Salud de los Andes y la Universidad Nacional en la Convocatoria 502 de 2010 con el ensayo clínico titulado "*Inmunogenicidad y seguridad de células dendríticas autólogas en pacientes con cáncer de mama tratadas con quimioterapia neoadyuvante*" (contrato No. 110150227509) en el contexto del Proyecto TEBICA.

Adicionalmente fue financiado por recursos de la Universidad Nacional de Colombia por la Dirección de Investigación de Bogotá – DIB, bajo los proyectos aprobados en la plataforma HERMES número: 13245, 12543 11748, 14976, 33290, 33317, 32181, 22944, 21275, 19058 y 18458.

RESUMEN

La evidencia experimental en modelos de cáncer en animales y estudios clínicos en pacientes con cáncer, sugieren que ciertos regímenes de quimioterapia o radioterapia estimulan el sistema inmune. La Doxorrubicina es un agente quimioterapéutico ampliamente estudiado por su capacidad de inducir muerte celular inmunogénica en células tumorales, un tipo de muerte celular que probablemente favorece la presentación cruzada de antígenos tumorales por células dendríticas (DCs) necesaria para la inmunidad anti tumoral mediada por linfocitos T (LT)-CD8+. Por otra parte, varios informes indican que la Ciclofosfamida utilizada a bajas dosis en pacientes con cáncer reduce el número de LT-CD4+ supresores FoxP3+ (Tregs). A pesar de que el tratamiento con Doxorrubicina y Ciclofosfamida (esquema de quimioterapia A/C) se utiliza ampliamente en nuestro país para el tratamiento neo-adyuvante de pacientes con cáncer de mama, el efecto inmuno-estimulante del tratamiento con A/C en estas pacientes está pendiente de ser demostrado.

En un esfuerzo por revelar el efecto inmuno-estimulante de la terapia antitumoral, en esta tesis se implementó un sistema de inmuno-monitoreo de leucocitos de sangre de pacientes con cáncer de mama, que permite establecer correlación entre la respuesta clínica de las pacientes a la quimioterapia con algunos fenotipos funcionales de respuesta inmune celular evaluados *in vitro*. Para establecer este sistema de inmuno-monitoreo fue necesario optimizar en primer lugar, condiciones *in vitro* que permitiesen cotejar en sangre periférica de una paciente antes y después de la terapia antitumoral distintas funciones en LT (CD4+ y CD8+) específicos de antígenos tumorales, los cuales se encuentran habitualmente en muy bajo número en sangre de pacientes con cáncer. La etapa de implementación estuvo seguida de la validación de la utilidad del monitoreo de estas funciones celulares en células de un grupo de pacientes con cáncer de mama obtenidas antes y después de tres ciclos de quimioterapia neo-adyuvante con A/C con la capacidad de la terapia antitumoral de restablecer algunas funciones de la respuesta inmune celular.

El inmuno-monitoreo de las células de las pacientes con cáncer de mama se realizó en gran medida por el análisis manual de datos de citometría de flujo (CF) multi-paramétrica que permite cuantificar múltiples parámetros y fenotipos celulares en las poblaciones celulares analizadas. Sin embargo, la disponibilidad reciente de nuevos algoritmos bio-informáticos como SPADE, FLOCK, tSNE, y más recientemente CITRUS, que proporcionan nuevas herramientas visuales y estadísticas para el análisis automatizado multidimensional de datos obtenidos por CF los cuales han sido empleados hasta ahora para el análisis

jerárquico de la diferenciación de células derivadas de médula ósea y células inmaduras en pacientes con leucemia, fueron utilizados para el análisis multidimensional de las células de las pacientes en muestras antes y después de la quimioterapia tanto *ex vivo* como en respuesta a un estímulo *in vitro*.

Los resultados de esta tesis muestran que el sistema de inmuno-monitoreo implementado permite evidenciar una asociación entre la respuesta clínica del tumor a la quimioterapia con A/C con una recuperación de la funcionalidad de la respuesta inmune celular en pacientes con cáncer de mama en terapia neo-adyuvante. Consideramos que la restitución de algunas funciones analizadas en LT y DCs en respuesta al tratamiento podrían tener valor predictivo de la respuesta clínica del tumor previo a la aplicación de la quimioterapia neo-adyuvante con A/C.

Metodología

Para implementar el modelo de inmuno-monitoreo, fue necesario establecer diferentes condiciones de cultivo *in vitro* que permitiesen evidenciar la funcionalidad de LT y células presentadoras de antígeno (APC) en muestras de sangre periférica obtenidas de donantes sanas como de pacientes con cáncer de mama antes y posterior al tratamiento con tres ciclos de quimioterapia neo-adyuvante con A/C. Inicialmente se optimizó la generación de dos tipos diferentes de DCs maduras derivadas de monocitos en dos días (tipo estándar y tipo alfa), necesarias para activar respuestas Th1, citotóxicas y foliculares. Estas DCs se emplearon en dos sistemas de cultivo *in vitro* implementados con el fin de evaluar, el primero la respuesta de LT de memoria específicos de antígenos tumorales y el segundo para determinar la presencia de LT específicos de estos antígenos dentro del compartimento de LT vírgenes. Por otra parte, se midieron la frecuencia y estatus inmunológico de dos sub-poblaciones de DCs, de LT-CD4 FoxP3+ reguladores y Células Supresoras de Origen Mieloide (MDSCs) *ex vivo* y el grado de respuesta al estímulo de LT y de DCs *in vitro*. Los resultados de CF se analizaron tanto por la estrategia manual (software FlowJo) como con el empleo de algoritmos automatizados como FLOCK, SPADE y CITRUS con el fin de establecer correlación entre los resultados de estos análisis con la respuesta clínica del tumor a la quimioterapia.

Resultados

La implementación del sistema de inmuno-monitoreo de individuos sanos y de pacientes con cáncer de mama permitió establecer la utilidad como APCs profesionales de dos fenotipos funcionales de DCs derivadas de monocitos en dos días cuyas características fenotípicas y funcionales son indistinguibles de DCs clásicas derivadas en siete días. La evaluación de LT específicos de antígenos en una paciente “modelo” en remisión completa luego de nueve años de tratamiento antitumoral, permitió evidenciar que LT-CD8+ específicos de un antígeno tumoral que infiltraban el tumor al momento del diagnóstico experimentaron un incremento de su frecuencia en sangre varios meses después de la terapia antitumoral. El monitoreo en esta paciente evidenció un fenotipo de inmunosupresión de los componentes APCs y LT. Mientras las APCs mostraron una deficiente respuesta a estímulos pro-inflamatorios y secreción de IL-12p70, los LT respondieron de manera deficiente en respuesta a la estimulación del TCR. De manera notable, estas evidencias de la deficiente respuesta inmune celular en esta paciente se recuperaron de manera significativa luego de la terapia antitumoral. Por su parte el monitoreo de APCs y LT en el grupo de pacientes antes de tres ciclos de quimioterapia neoadyuvante con A/C reveló las mismas deficiencias funcionales en APCs y LT observadas en la paciente “modelo” previo a la terapia antitumoral. Luego de instaurada la terapia neoadyuvante con A/C la funcionalidad de estas células alcanzó niveles similares a los observados en las células de mujeres sanas, más aún, en estas pacientes la recuperación de algunos fenotipos funcionales pudo ser correlacionada de manera predictiva con la respuesta clínica del tumor a la quimioterapia con A/C. Finalmente, el análisis automatizado del inmuno-monitoreo con SPADE, FLOCK y CITRUS, permitió confirmar los resultados obtenidos con el análisis manual y además establecer el fenotipo de poblaciones complejas que diferencian el grado de respuesta inmune de personas sanas de muestras obtenidas de pacientes con cáncer de mama.

Conclusiones

Tomados en conjunto, los resultados obtenidos permiten proponer un modelo de inmuno-monitoreo como herramienta útil para evidenciar en muestras de sangre de pacientes con cáncer de mama la capacidad inmuno-estimulante de la quimioterapia con A/C. Algunos de los parámetros analizados permiten predecir con base en la respuesta funcional del sistema inmune antes de iniciado el tratamiento el grado de respuesta clínica de las pacientes al tratamiento con A/C. Los algoritmos de análisis automatizado son aplicables para los

análisis de CF complejos facilitando el procesamiento de múltiples muestras y la identificación de sub-poblaciones celulares que pudiesen ser utilizadas como posibles biomarcadores característicos del estatus de LT pre-quimioterapia. Este modelo de inmunomonitorio actualmente se utiliza para el seguimiento de la respuesta a la vacunación con DCs en el primer ensayo clínico de inmunoterapia fase I/II en nuestro medio en pacientes con cáncer de mama en terapia neo-adyuvante con A/C.

ABSTRACT

Experimental evidence in animal models of cancer and clinical studies in cancer patients suggest that certain chemotherapy or radiotherapy regimens stimulate the immune system. Doxorubicin is a chemotherapeutic agent widely studied for its ability to induce immunogenic cell death in tumor cells, a type of cell death that probably favors cross-presentation of tumor antigens by dendritic cells (DC) required for anti-tumor mediated immunity by T cells CD8+ lymphocytes. On the other hand, several reports indicate that Cyclophosphamide used low doses in cancer patients reduced the number of CD4+ T regulatory cells FoxP3+ (Tregs). Although the treatment with Doxorubicin and Cyclophosphamide (A/C chemotherapy regimen) is widely used in our country for the neoadjuvant treatment of breast cancer patients, the immunostimulating effect of A/C treatment in these patients is pending.

In an effort to reveal the immunostimulating effect of antitumor therapy, this thesis was implemented a system of immuno-monitoring of blood leukocytes of patients with breast cancer, which allows establishing a correlation between the clinical response of the patients to the Chemotherapy with some functional cellular immune response phenotypes evaluated *in vitro*. In order to develop this immuno-monitoring system, it was necessary to optimize, in the first place, *in vitro* conditions that allowed to check in a patient's peripheral blood before and after the anti-tumor therapy different functions in T cells (CD4+ and CD8+) specific of tumor antigens, which are usually in very small numbers in the blood of patients with cancer. The implementation phase was followed by validation of the usefulness of the monitoring of these cellular functions in cells of a group of patients with breast cancer obtained before and after three cycles of neoadjuvant chemotherapy with A/C with the capacity of the Antitumor therapy to restore some functions of the cellular immune response.

Immuno-monitoring of the cells of patients with breast cancer was performed primarily by manual analysis of multi-parametric flow cytometry (FC) data that allows quantifying multiple cell parameters and phenotypes in the cell populations analyzed. However, the recent availability of new bioinformatics algorithms such as SPADE, FLOCK, tSNE, and more recently CITRUS, provide new visual and statistical tools for the multidimensional automated analysis of FC data that have been used so far for the hierarchical analysis of the differentiation of bone marrow and immature cells derived from leukemia patients were used by us for the multidimensional analysis of patient cells in samples before and after chemotherapy both *ex vivo* and in response to a stimulus *In vitro*.

The results of this thesis show that the immuno-monitoring system implemented allows to evidence an association between the clinical response of the tumor to the chemotherapy with A/C with a recovery of the functionality of the cellular immune response in patients with breast cancer in therapy Neo-adjuvant. We considered that the restitution of some functions analyzed in T cells and DCs in response to treatment could have a predictive value of the clinical response of the tumor to the application of neoadjuvant chemotherapy with A/C.

Methodology

To implement the immuno-monitoring model, it was necessary to establish different *in vitro* culture conditions that would demonstrate the functionality of T cells and antigen-presenting cells (APCs) in peripheral blood samples obtained from healthy donors such as patients with breast cancer before and post-treatment with three cycles of neoadjuvant chemotherapy with A/C. Initially the generation of two different types of mature DCs derived from monocytes in two days (standard type and alpha type), necessary to activate Th1, cytotoxic and follicular responses were optimized. These DCs were used in two *in vitro* culture systems implemented to initially evaluate the T cell memory response specific to tumor antigens and the second to determine the presence of specific T cells for these antigens within the T naive compartment. On the other hand, we measured the frequency and immunological status of two sub-populations of DCs, regulatory CD4+ FoxP3+ T cells and Myeloid Derived Suppressor Cells (MDSCs) *ex vivo* and the degree of response to T and DCs stimulation *in vitro*. The FC results were analyzed by both manual strategy (FlowJo software) and with the use of automated algorithms such as FLOCK, SPADE, and CITRUS to correlate the results of these analyses with the clinical response of the tumor to chemotherapy.

Results

The implementation of the immuno-monitoring system of healthy individuals and patients with breast cancer allowed to establish the utility as professional APCs of two functional phenotypes of monocyte-derived DCs in two days whose phenotypic and functional characteristics are indistinguishable from classical DCs derived in seven days. The evaluation of antigen-specific T cell in a model patient in complete remission after nine years of anti-tumor treatment showed that LT-CD8+ specific to a tumor antigen that infiltrated the tumor at the time of diagnosis experienced an increase in its Frequency in blood several

months after anti-tumor therapy. Monitoring in this patient evidenced an immunosuppressive phenotype of the APCs and T components. While APCs showed poor response to pro-inflammatory stimuli and secretion of IL-12p70, T responded poorly in response to TCR stimulation. Notably, these evidences of the poor cellular immune response in this patient recovered significantly after anti-tumor therapy. Monitoring of APCs and T in the patient group before three cycles of neoadjuvant chemotherapy with A/C revealed the same functional deficiencies in APCs and T cells observed in the model patient before anti-tumor therapy. After initiation of neoadjuvant therapy with A/C, the functionality of these cells reached levels like those observed in cells of healthy women; moreover, in these patients the recovery of some functional phenotypes could be predictably correlated with Clinical response of the tumor to chemotherapy with A/C. Finally, automated immuno-monitoring with SPADE, FLOCK and CITRUS allowed us to confirm the results obtained with manual analysis and to establish the phenotype of complex populations that differentiate the degree of immune response of healthy individuals from samples obtained from patients with breast cancer.

Conclusions

Taken together, the results obtained allow us to propose an immuno-monitoring model as a useful tool to evidence the immuno-stimulating capacity of A/C chemotherapy in blood samples from patients with breast cancer. Some of the parameters analyzed allow to predict, based on the functional response of the immune system before treatment, the degree of clinical response of the patients to the A/C treatment. Automated analysis algorithms are applicable for complex FC analyzes facilitating the processing of multiple samples and the identification of cell subpopulations that could be used as a potential biomarkers characteristic of pre-chemotherapy T cell status. This immuno-monitoring model is currently used to monitor the response to DC vaccination in the first clinical phase I/II immunotherapy trial in our setting in patients with neoadjuvant A/C therapy.

TABLA DE CONTENIDOS

AGRADECIMIENTOS.....	4
FINANCIACIÓN.....	5
RESUMEN.....	6
Metodología.....	7
Resultados.....	8
Conclusiones.....	8
ABSTRACT.....	10
Methodology.....	11
Results.....	11
Conclusions.....	12
TABLA DE CONTENIDOS.....	13
ABREVIATURAS UTILIZADAS.....	20
LISTADO DE FIGURAS.....	22
LISTADO DE FIGURAS SUPLEMENTARIAS.....	26
LISTADO DE TABLAS.....	28
LISTADO DE ARTÍCULOS Y TRABAJOS PUBLICADOS.....	29
INTRODUCCIÓN.....	30
FORMULACIÓN DEL PROBLEMA.....	34
JUSTIFICACIÓN.....	35
OBJETIVOS.....	36
Objetivo general:.....	36
Objetivos específicos:.....	36
HIPÓTESIS.....	37
CAPITULO 1. Implementación de ensayos in vitro para el monitoreo de LT en pacientes con cáncer de mama en terapia antitumoral.....	38
Resumen.....	38

Marco teórico	40
Células dendríticas como células presentadoras de antígenos profesionales	40
Modelos in vitro para la evaluación de la respuesta del sistema inmune	41
Activación, fenotipo y diferenciación in vitro de linfocitos T	42
Generación de sub-poblaciones de linfocitos T	43
Fenotipos funcionales de LT ayudadores “helpers”	45
Diversidad del receptor de células T	46
Cuantificación del repertorio de linfocitos T	47
Receptores inhibitorios	48
Diseño experimental y metodología	49
Vinculación de pacientes con cáncer; de voluntarias sanas y aislamiento de PBMCs	49
Diferenciación de células dendríticas (DCs) a partir de monocitos	50
Diferenciación de monocitos o PBMCs a células dendríticas inmaduras (iDCs)	50
Maduración de DCs	50
Evaluación del rendimiento y fenotipo de DCs derivadas de monocitos enriquecidos por adherencia o inducidas en PBMCs	52
Evaluación funcional de DCs y estimulación in vitro de LT	52
Purificación de células T	53
Reacción mixta de leucocitos (MLR)	53
Evaluación de la capacidad de 2d-DCs para estimular LT-CD4+ específicos de antígeno utilizando toxoide tetánico (TT) como antígeno modelo	54
Expansión in vitro de LT-CD8 específicos de antígenos asociados a tumor TAAs en donantes sanas	54
Medición de CD107a y CD107b en superficie como medida de la actividad citolítica de LT-CD8+ anti-TAAs	54
Análisis de LT-CD8+ multifuncionales productores de IFN- γ , TNF- α e IL-2 específicos de TAAs	55
Análisis del fenotipo de sub-poblaciones de LT-CD4+ en respuesta a la estimulación con DCs pulsadas con antígeno	56
Fluorescencia menos uno	56

Análisis de la expansión de sub-poblaciones de linfocitos T foliculares (Tfh) presentes en sangre periférica	58
Evaluación y caracterización del repertorio de LT vírgenes y de memoria específicos de antígeno.....	58
Marcación de LT-CD8+ con tetrámeros específicos para antígenos tumorales y virales	60
Medición del repertorio de LT-CD8+ específicos para Her2/neu ₃₆₉ circulantes e infiltrantes de tumor	60
Evaluación de la funcionalidad del compartimiento de LT	61
Resultados	61
Caracterización fenotípica y funcional de células dendríticas estándar obtenidas de monocitos en dos días.	61
Caracterización fenotípica y funcional de 2d-aDC tipo I obtenidas de monocitos en dos días.....	69
Evaluación in vitro de la capacidad funcional de DCs	73
2d-aDCs estimulan eficientemente la expansión de LT-CD4+ con fenotipo “stem” productoras de IFN- γ que circulan en sangre	73
2d-aDCs inducen la secreción de IFN- γ en LT CD4 + con fenotipo “stem” de memoria.....	74
Las 2d-aDCs favorecen la expansión de LT CD4+ “helper” foliculares (Tfh) presentes en sangre	75
2d-stDCs y 2d-aDCs inducen in vitro la expansión y activación de LT vírgenes y de memoria específicas para un antígeno tumoral en una paciente con cáncer de mama.	79
La terapia antitumoral restituye la inmuno-vigilancia del tumor en LT antitumorales. 81	
Resumen datos clínicos de la paciente MCC-002.....	82
Determinación del grado de funcionalidad de respuesta inmune.....	84
Conclusiones.....	98
CAPITULO 2. Utilidad del monitoreo de los compartimentos T y APC para predecir la respuesta clínica del tumor a la quimioterapia con A/C en pacientes con cáncer de mama.	99
Resumen.....	99

Racional	100
Marco teórico	101
Perfil inmunológico del paciente con cáncer	101
Efecto de la quimioterapia neo-adyuvante (NAC) en las células tumorales y micro-ambiente tumoral	102
Monitoreo de compartimentos de LT y células presentadoras de antígeno (APC) en sangre de pacientes con cáncer de mama en NAC	107
Diseño experimental y metodología	108
Vinculación de pacientes, donantes sanas y obtención de muestras de sangre	108
Citometría de Flujo	110
Evaluación funcional de la respuesta de APCs y LT	110
Resultados	111
Caracterización fenotípica de Tregs, MDSCs y DCs ex vivo	111
Monitoreo del porcentaje de Linfocitos T reguladores (Tregs) ex vivo	113
Células supresoras de origen Mieloide (MDSCs).....	114
Cuantificación de células dendríticas mieloides y plasmacitoides.....	115
Análisis funcional del compartimiento de células presentadoras de antígeno (APC).....	115
Análisis funcional del compartimiento de LT en pacientes con cáncer de mama	119
Correlación entre el inmuno-monitoreo y la respuesta clínica	121
Conclusiones.....	127
CAPITULO 3. Aplicación de algoritmos automatizados para análisis multidimensional de la respuesta inmune	128
Resumen.....	128
Racional	129
Diseño experimental y metodología	130
Manejo de datos	130
Programas y paquetes empleados.....	131
Análisis por componentes principales - PCA.....	131

Algoritmo “FLOw Clustering without K” - FLOCK	132
Algoritmo SPAnning tree progression of Density normalized Events - SPADE	132
CITRUS	133
Resultados	136
La funcionalidad de los compartimientos APCs y de LT están correlacionados	136
Análisis multivariado por componentes principales separa la respuesta inmune de pacientes con cáncer de mujeres sanas	139
Análisis automatizado por FLOCK confirma la capacidad de respuesta de LT	142
Análisis de la respuesta de LT por SPADE confirma deficiencia en pacientes con cáncer de mama.....	146
Análisis de organización jerárquica no supervisada - HCL	151
CITRUS permitió detectar nuevas sub-poblaciones celulares capaces de diferenciar pacientes de mujeres sanas	154
Validación de los modelos predictivos para poblaciones analizadas por FC ex vivo	156
Análisis automatizado de datos de FC para el monitoreo en sangre de LT-CD4+ Tfh	159
Evaluación de expresión de receptores inhibitorios, Tregs e Il-17 in vitro	164
Conclusiones.....	169
DISCUSION.....	170
CONCLUSIONES GENERALES	185
PERSPECTIVAS	186
CONSIDERACIONES ÉTICAS	187
Consideraciones ambientales	187
BIBLIOGRAFÍA.....	188
ANEXOS.....	205
Anexo 1. Rendimiento de cultivos de DCs a partir de células adherentes y PBMCs totales	205
Anexo 2. Modelo in vitro para la evaluación del papel “helper” de Tfh en la producción de anticuerpos por LB	206
Evaluación de TFH de centro germinal	207

Anexo 3. Evaluación de linfocitos T foliculares (Tfh) en sangre periférica de pacientes con cáncer de mama	211
Anexo 4. Lista de péptidos y tetrámeros empleados	212
Anexo 5. Caracterización de V β por citometría de flujo y por secuenciación del CDR3	214
Anexo 6. Caracterización fenotípica de LT-CD8+ específicos de TAAs A2	217
Anexo 7. Análisis multidimensionales.....	222
Código procesamiento PCA en SPSS	222
Tabla de centroides por FLOCK	222
Anexo 8. Caracterización del microambiente tumoral asociado a la quimioterapia con A/C	223
Resumen	223
Introducción	224
Racional	224
Marco teórico.....	225
Muerte celular inmunogénica	225
Caracterización del Infiltrado tumoral en pacientes con cáncer de mama	229
Efecto de la quimioterapia neo-adyuvante en el microambiente tumoral	230
Evaluación del infiltrado tumoral como factor predictivo	232
Diseño experimental	233
Resultados.....	234
Obtención de muestras.....	234
Marcación con Hematoxilina y Eosina	235
Creación de bloques con arreglo de tejidos.....	235
Marcación por IHQ.....	237
Cuantificación sistematizada.....	238
Expresión de marcadores de muerte celular inmunogénica	240
Anexo 9. Lista de variables monitoreadas de pacientes antes y después de la quimioterapia y donantes sanas.....	243
Anexo 10. Premios recibidos.....	244

2015 - Immunocolombia 2015 The AAI Young Investigator Award, Medellin, Colombia	244
2016 – V Jornadas de Investigación en Cáncer Cali, Colombia	244
Anexo 11. Publicaciones realizadas	245

ABREVIATURAS UTILIZADAS

5FU	5-Fluorouracilo
A/C	Antraciclina Ciclofosfamida
aDCs	Células dendríticas Tipo I alfa
APC	Célula presentadora de antígeno
AINEs	Antiinflamatorios no esteroideos
ANAs	Anticuerpos antinucleares
Anti-TTx	Terapia antitumoral
BFA	Brefeldina A
CD	Clúster de diferenciación
CF	Citometría de flujo
CRT	Calreticulina
CTA	Del inglés Cancer testis antigens
CTL	Linfocitos T citotóxicos
DC	Célula dendrítica
DMSO	Dimetil sulfóxido
FFPE	Del inglés Formalin-Fixed-Paraffin-Embedded
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
FMO	Fluorescencia menos uno
GM-CSF	Factor estimulante de colonia granulocito macrófago
HCL	HCL del inglés hierarchical clustering
HER2/neu	Human epidermal grow factor receptor 2
HLA	Antígeno leucocitario humano
HMGB-1	High mobility group box 1
HSP	Proteína de choque térmico
iDCs	Células dendríticas inmaduras
IDO	indolamina 2,3-dioxigenasa
IFN	Interferón
IHQ	Inmunohistoquímica
IL	Interleuquina
LT	Linfocito T
LT-CD4+	Linfocito T CD4+
LT-CD8+	Linfocito T CD8+
LTBI	Del inglés <i>Latent tuberculosis infection</i>
M-CSF	Factor estimulador de colonia de monocitos
Melan-A	Antígeno de diferenciación de melanocitos Melan-A/MART-1 ²⁶⁻³⁵
MFI	Intensidad de Fluorescencia media (del inglés, mean fluorescence intensity)
MHC	Complejo Mayor de Histocompatibilidad
NF- κ β	Factor Nuclear Kappa beta
NK	Linfocitos asesinos naturales
PBMC	<i>Peripheral Blood Mononuclear Cells</i> (Células mononucleares de sangre periférica)
PCR-SSP	PCR con iniciadores específicos de secuencias
PE	Ficoeritrina
pMHC	Complejo MHC – péptido

RCB	Del inglés <i>Residual Cancer Burden</i>
SEB	Súper antígeno de <i>Staphylococcus sp.</i>
SFB	Suero fetal bovino
STAT-3	Signal Transducer and Activator of Transcription-3
stDCs	Células Dendríticas estándar
TAA	<i>Tumor Associated Antigens</i> (Antígenos asociados a tumor)
TCM	Linfocito T de memoria central
TCR	Receptor de células T
TEF	Linfocito T efector
TEM	Linfocito T de memoria efectora
TEMRA	Linfocito T de memoria efectora CD45RA+
TIL	Linfocitos infiltrantes de tumor
TLR	Receptor tipo Toll
TN	Linfocito T virgen
TNF- α	Factor de necrosis tumoral alfa
Treg	Linfocito T regulador
Tscm	Linfocitos T de memoria tipo stem cell
Tym	Del inglés T Young memory cell
VEGF	Factor de crecimiento de vénulas y endotelio

LISTADO DE FIGURAS

<i>Figura 1. Esquema de inducción de DCs a partir de PBMCs o monocitos purificados.</i>	<i>51</i>
<i>Figura 2. Fluorescencia Menos Uno (FMO) de un panel de anticuerpos utilizado para el análisis de PBMCs teñidos ex vivo.</i>	<i>57</i>
<i>Figura 3. Diagrama de flujo de la metodología de cultivo in vitro de LT.</i>	<i>59</i>
<i>Figura 4. Morfología de DCs estándar generadas en dos y siete días a partir de monocitos purificados por adherencia o selección negativa.....</i>	<i>62</i>
<i>Figura 5. Inmuno-fenotipo de maduración de DCs estándar obtenidas en siete días vs. dos días evaluado por citometría de flujo.</i>	<i>63</i>
<i>Figura 6. Evaluación multiparamétrica del patrón de expresión de marcadores de maduración en DCs estándar obtenidas en siete y dos días.</i>	<i>64</i>
<i>Figura 7. Producción de IFN-γ después de la estimulación de LT CD4+ con 2d-stDCs.</i>	<i>65</i>
<i>Figura 8. Actividad linfo-proliferativa de LT CD4+ en respuesta a 2d-stDCs pulsadas con Toxoide Tetánico (TT) y PHA-M.....</i>	<i>66</i>
<i>Figura 9. 2d-stDCs promueven el estímulo primario y expansión in vitro de LT CD8+ antitumorales específicos para TAAAs en individuos sanos.</i>	<i>68</i>
<i>Figura 10. Evaluación de morfología de DCs estándar y alfa de dos días.</i>	<i>70</i>
<i>Figura 11. Fenotipo de células dendríticas generadas en dos días.....</i>	<i>70</i>
<i>Figura 12. Cuantificación de IL-12p70 en el sobrenadante de cultivo de aDCs producidas en dos días.</i>	<i>71</i>
<i>Figura 13. Análisis del fenotipo de DCs en la fracción adherente y no adherente de PBMCs totales incubados por 48 horas con citoquinas utilizadas para la obtención de 2d-stDCs y 2d-aDCs. (....</i>	<i>72</i>
<i>Figura 14. Nivel de activación de LT-CD4+ en respuesta a estimulación con DCs derivadas en dos días.</i>	<i>74</i>
<i>Figura 15. Fenotipo de linfocitos T CD4+ en respuesta a activación con DCs.</i>	<i>75</i>
<i>Figura 16. Estrategia de análisis mediante CF de Tfh en sangre periférica de un individuo sano.</i>	<i>77</i>
<i>Figura 17. Expansión de Tfh presentes en sangre de donantes sanas inducida por el estímulo con dos tipos de DCs.....</i>	<i>77</i>
<i>Figura 18. Fenotipo de activación de Tfh (ICOS+ e IL-21+) presentes en PBMCs en respuesta a 2d-DCs inducidas “in situ” en la presencia de perlas antiCD3/CD28/CD2.</i>	<i>78</i>
<i>Figura 19. Evaluación de LT específicos de HER2/neu en una paciente con cáncer de mama antes del tratamiento.</i>	<i>81</i>
<i>Figura 20. Diagrama de historia clínica y tratamientos de la paciente MCC-002.</i>	<i>83</i>
<i>Figura 21. Análisis de la funcionalidad de LT en donantes sanas y de la paciente con cáncer de mama MCC-002 antes y después de Anti-TTx.</i>	<i>85</i>
<i>Figura 22. Veces de incremento de la expresión de CD25 y CD154 en LT en respuesta al estímulo con perlas antiCD3/CD28/CD2.....</i>	<i>86</i>

<i>Figura 23. Expansión de LT-CD8+ específicos para las epítopes HER2/neu₃₆₉₋₃₇₇ y NY-ESO 1157–165 a partir del repertorio de LT virgen y de memoria en sangre de la paciente MC-002.</i>	<i>87</i>
<i>Figura 24. Mayor secreción de IFN-γ y TNF-α por LT CD8+ y CD4+ después de la terapia antitumoral es inducida por la estimulación de LT vírgenes con 2d-aDCs.</i>	<i>89</i>
<i>Figura 25. Evaluación del efecto del tratamiento antitumoral en la diferenciación de células efectoras y la expresión de receptores inhibitorios en LT anti-virales y anti-TAAs.</i>	<i>91</i>
<i>Figura 26. La terapia antitumoral induce expansión de LT CD8+ efectores específicos para cuatro TAAs-A2 y expresión de CTLA-4 en LT específicos de Her2/neu₃₆₉₋₃₇₇.</i>	<i>95</i>
<i>Figura 27. Incremento en la correlación entre las familias de TCR Vβ infiltrantes de tumor con LT CD8+ específicos de HER2/neu después de la terapia antitumoral.</i>	<i>97</i>
<i>Figura 28. Estrategia y cuantificación ex vivo por CF de sub-poblaciones celulares en PBMCs.</i>	<i>112</i>
<i>Figura 29. Cuantificación ex vivo del porcentaje de LT CD4+ supresores.</i>	<i>113</i>
<i>Figura 30. Cuantificación ex vivo del porcentaje de MDSCs.</i>	<i>114</i>
<i>Figura 31. Cuantificación ex vivo del porcentaje de células dendríticas en sangre.</i>	<i>115</i>
<i>Figura 32. Estrategia de análisis del grado de maduración de 2d-aDCs primarias y derivadas in situ a partir de monocitos presentes en PBMCs.</i>	<i>116</i>
<i>Figura 33. APCs de pacientes con cáncer de mama antes de la quimioterapia exhiben una limitada capacidad de maduración en respuesta a un estímulo pro-inflamatorio.</i>	<i>117</i>
<i>Figura 34. La deficiente producción de IL-12p70 detectada en DCs de pacientes con cáncer de mama al momento del diagnóstico se restablece luego de tres ciclos de quimioterapia.</i>	<i>118</i>
<i>Figura 35. Estimulación in vitro de PBMCs evidencia una baja capacidad de internalización del TCR en las pacientes con cáncer de mama.</i>	<i>119</i>
<i>Figura 36. La limitada capacidad funcional de LT-CD3+ en pacientes con cáncer de mama se recupera luego de tres ciclos de quimioterapia neo-adyuvante con A/C.</i>	<i>120</i>
<i>Figura 37. Respuesta clínica es evidente luego de tres ciclos de quimioterapia neo-adyuvante con A/C.</i>	<i>121</i>
<i>Figura 38. Curvas ROC de Internalización de TCR para diferenciar personas sanas de pacientes con cáncer de mama.</i>	<i>122</i>
<i>Figura 39. Relación entre grado de internalización del TCR en LT-CD3 en respuesta a la estimulación del TCR y expresión de CD83 en DCs plasmacitoides en respuesta a un estímulo pro-inflamatorio y su relación con la respuesta clínica del tumor al tratamiento.</i>	<i>124</i>
<i>Figura 40. Capacidad de predicción de la respuesta clínica del inmunomonitorio de pacientes previo al tratamiento y su respuesta clínica después de tres ciclos de quimioterapia con A/C.</i>	<i>126</i>
<i>Figura 41. Modelo esquemático del análisis multivariado de los datos de citometría de flujo.</i>	<i>131</i>
<i>Figura 42. Estructura de resultados del análisis CITRUS.</i>	<i>135</i>

<i>Figura 43. Pérdida de la correlación entre la funcionalidad de los compartimientos APC y LT en pacientes antes de la quimioterapia con A/C.</i>	137
<i>Figura 44. La respuesta del compartimiento APC se correlaciona con la respuesta del compartimiento de LT.</i>	138
<i>Figura 45. Salida de variables rotadas en SPSS posterior al PCA.</i>	140
<i>Figura 46. El análisis por componentes principales permite diferenciar donantes sanas de pacientes con cáncer.</i>	141
<i>Figura 47. Análisis por FLOCK del comportamiento de las células en respuesta al estímulo de LT en PBMCs de donantes sanas.</i>	142
<i>Figura 48. Análisis comparativo de las unidades relativas (UR) en cada marcador obtenido de los centroides.</i>	143
<i>Figura 49. Análisis por FLOCK en la muestra de una paciente antes y después de quimioterapia luego de ser estimuladas o no in vitro.</i>	144
<i>Figura 50. Comparación del fenotipo de centroides en respuesta a estímulo in vitro de PBMCs de pacientes pre y pos-quimioterapia.</i>	145
<i>Figura 51. Interfaz de propiedades y salida de SPADE en MATLAB.</i>	146
<i>Figura 52. Árbol de SPADE representativo de la respuesta de PBMCs al estímulo in vitro.</i>	147
<i>Figura 53. Árbol de SPADE de los datos concatenados de 10 donantes sanas y una paciente pre y pos quimioterapia evidencia la recuperación de la respuesta al estímulo in vitro de las células en la muestra pos-quimioterapia.</i>	148
<i>Figura 54. Evaluación por SPADE del patrón jerárquico de expresión de marcadores característicos de Tregs, MDSCs y DCs primarias.</i>	150
<i>Figura 55. Representación en mapa de calor del análisis por HCL de las agrupaciones de 10 donantes sanas.</i>	152
<i>Figura 56. Mapa de calor del análisis por HCL de una paciente antes y después de quimioterapia en respuesta a la estimulación in vitro.</i>	153
<i>Figura 57. Mapa de calor del análisis por HCL de distintas sub-poblaciones celulares analizadas ex vivo por FC en sangre de donantes sanas y pacientes antes y posterior a la quimioterapia.</i>	154
<i>Figura 58. Perfil de abundancia y expresión de marcadores en árbol jerárquico generado por CITRUS con el fin de analizar ex vivo fenotipo y frecuencia de MDSCs, DCs y Tregs en sangre.</i>	156
<i>Figura 59. Gráfica de validación del modelo predictivo.</i>	157
<i>Figura 60. Distribución jerárquica y caracterización del clúster 219901 en el análisis ex vivo.</i>	158
<i>Figura 61. Mapa de calor (HCL) de la expresión del fenotipo Tfh en mujeres sanas y pacientes con cáncer de mama antes del tratamiento.</i>	160
<i>Figura 62. Árbol de expresión de los marcadores y abundancias de las poblaciones Tfh de donantes sanas.</i>	161

<i>Figura 63. Fenotipo y abundancia de clúster que diferencian Tfh en donantes sanas.</i>	<i>162</i>
<i>Figura 64. Fenotipo de Tfh de los clústers por análisis Citrus en muestras de donantes sanas y pacientes pre- quimioterapia.</i>	<i>163</i>
<i>Figura 65. Frecuencia relativa de cuatro clústers diferenciales con fenotipo Tfh entre donantes sanas y pacientes.</i>	<i>163</i>
<i>Figura 66. Análisis HCL de la expresión de receptores inhibitorios, sub-poblaciones de memoria, Tregs e IL-17.</i>	<i>165</i>
<i>Figura 67. Evaluación de expresión por CITRUS de marcadores de receptores inhibitorios, memoria, Tregs e IL-17 en donantes sanas.</i>	<i>166</i>
<i>Figura 68. Fenotipo y abundancia de clúster asociados a perfil Tregs y Tc17 en donantes sanas.</i>	<i>167</i>
<i>Figura 69. Fenotipo y cuantificación de clúster diferencial entre donantes sanas y pacientes.</i>	<i>168</i>
<i>Figura 70. Modelo propuesto del efecto inmuno-estimulador de la quimioterapia A/C en pacientes con cáncer de mama.....</i>	<i>184</i>

LISTADO DE FIGURAS SUPLEMENTARIAS

<i>Figura suplementaria 1. Evaluación de Tfh por citometría de flujo en muestra de amígdala humana.</i>	<i>208</i>
<i>Figura suplementaria 2. Análisis de poblaciones de memoria de LT y LB en PBMCs de donante sano y sorting de Monocitos CD14.....</i>	<i>208</i>
<i>Figura suplementaria 3. Esquema de purificación de LT-CD4+ Naïve CXCR5-.....</i>	<i>209</i>
<i>Figura suplementaria 4. Expansión de Tfh (CXCR5/PD1) y diferenciación de LB específicos de NANP.....</i>	<i>210</i>
<i>Figura suplementaria 5. Expansión de Tfh en pacientes con cáncer de mama posterior a la quimioterapia con A/C.....</i>	<i>211</i>
<i>Figura suplementaria 6. Evaluación y cuantificación ex vivo de células tetrámero positivas específicas para antígenos tumorales y virales en mujeres sanas HLA-A*02:01+.....</i>	<i>212</i>
<i>Figura suplementaria 7. Cuantificación del porcentaje de familias Vβ en LT CD4, CD8 y específicas de antígeno.....</i>	<i>214</i>
<i>Figura suplementaria 8. Caracterización ex vivo por CF de las familias de Vβ en LT-CD8+ y HER2/neu+ en la paciente MCC-002.....</i>	<i>215</i>
<i>Figura suplementaria 9. Expresión y caracterización de LT-CD8+ específicos de Her2/neu₃₆₉.....</i>	<i>217</i>
<i>Figura suplementaria 10. Evaluación de poblaciones de memoria y expresión de LT-CD8+ específicos de HER2 en dos pacientes antes y después de la quimioterapia con A/C.....</i>	<i>218</i>
<i>Figura suplementaria 11. Distribución de sub-poblaciones de LT-CD8+ específicos de TAAs A2 estimuladas con 2d-aDCs y con 2d-stDCs.....</i>	<i>219</i>
<i>Figura suplementaria 12. Expresión de receptores inhibitorios en una paciente (ALC) HLA-A2+ ex vivo y en respuesta a estímulo in vitro con péptidos individuales de HER2/neu.....</i>	<i>220</i>
<i>Figura suplementaria 13. Expansión pos-quimioterapia de LT-CD8 específicos de TAAs a comparación de LT-CD8+ específicos de antígenos virales posterior a la estimulación in vitro con 2d-aDCs.....</i>	<i>220</i>
<i>Figura suplementaria 14. Expresión de receptores inhibitorios en LT-CD8+ específicos para antígenos tumorales y virales.....</i>	<i>221</i>
<i>Figura suplementaria 15. Esquema representativo de la inducción de muerte celular inmunogénica por la quimioterapia.....</i>	<i>229</i>
<i>Figura suplementaria 16. Diagrama del proceso de selección, procesamiento de arreglo de tejidos, marcación por IHQ y cuantificación sistemática.....</i>	<i>234</i>
<i>Figura suplementaria 17. Definición sobre la lámina de zonas de interés en marcación por H/E de muestra quirúrgica de paciente con cáncer de mama.....</i>	<i>235</i>
<i>Figura suplementaria 18. Relación entre zona de interés definida con el bloque de parafina.....</i>	<i>236</i>
<i>Figura suplementaria 19. Distribución de arreglos de tejidos.....</i>	<i>236</i>
<i>Figura suplementaria 20. Ejemplo de tejido posterior al corte y marcación por IHQ.....</i>	<i>237</i>

Figura suplementaria 21. Evaluación de la expresión de marcadores de muerte celular inmunogénica (HMGB-1 y CRT) y CXCL13 en pacientes pos-quimioterapia..... 240

Figura suplementaria 22. Niveles de expresión de HMGB-1 en biopsias y tejido tumoral por IHQ..... 242

LISTADO DE TABLAS

<i>Tabla 1. Resumen de la expresión de RI y su relación con la producción de citoquinas en LT CD8, considerando diferenciación, activación y localización anatómica.</i>	<i>49</i>
<i>Tabla 2. Concentración de citoquinas para maduración de DCs</i>	<i>51</i>
<i>Tabla 3. Características clínico-patológicas de las pacientes</i>	<i>109</i>
<i>Tabla 4. Asociación entre lecturas inmunológicas en sangre periférica y factores clínico-patológicos en las pacientes con cáncer de mama participantes en este estudio.</i>	<i>123</i>
<i>Tabla 5. Relación de variables de cada componente resultado del análisis por PCA</i>	<i>140</i>
<i>Tabla 6. Tabla de rendimientos de obtención de DCs maduras a partir del cultivo de 9.9×10^6 PBMCs</i>	<i>205</i>
<i>Tabla 7. Péptidos restringidos HLA-A*02:01</i>	<i>213</i>
<i>Tabla 8. Secuencia de péptidos de HER2 restringidos a HLA clase II</i>	<i>213</i>
<i>Tabla 9. NY-ESO-1</i>	<i>213</i>
<i>Tabla 10. Péptidos de Mycobacterium tuberculosis presentes en la prueba de QuantiFERON TB Gold</i>	<i>213</i>
<i>Tabla 11. Familias de VB en PBMCs.....</i>	<i>215</i>
<i>Tabla 12. Frecuencia de familias de VB en tejido tumoral de la paciente MCC-002</i>	<i>216</i>
<i>Tabla 13. Resultados del análisis FLOCK de 10 donantes sanas, MFI de centroides para cada agrupación y la frecuencia (%) de eventos por agrupación.</i>	<i>222</i>

LISTADO DE ARTÍCULOS Y TRABAJOS PUBLICADOS

1. Carlos A. Parra-López, **David Bernal-Estévez**, Luis Eduardo Vargas, Carolina Pulido-Calixto, Luz Mary Salazar, J. Mauricio Calvo-Calle, Lawrence J. Stern (2014). "An unstable Th epitope of *P. falciparum* fosters central memory T cells and anti-CS antibody responses." *PLoS One* 9(7): e100639. DOI: 10.1371/journal.pone.0100639
2. **Bernal-Estévez, D. A.**, et al. "AN IMMUNE SURVEILLANCE MODEL TO MONITOR THE RESPONSE TO NEOADJUVANT CHEMOTHERAPY TREATMENT IN BREAST CANCER PATIENTS." *Frontiers in Immunology*. Event Abstract, 15 Sep 2015, DOI: 10.3389/conf.fimmu.2015.05.00285
3. **Bernal-Estévez, D. A.**, et al. "USEFULNESS OF TWO DAY TYPE I ALPHA DENDRITIC CELLS TO MONITOR T CELL IMMUNITY ELICITED BY ANTI TUMOR THERAPY." *Frontiers in Immunology*. Event Abstract, 15 Sep 2015, DOI: 10.3389/conf.fimmu.2015.05.00284
4. **Bernal-Estevez, D.**, Sánchez, R., Tejada, R. E., and Parra-López, C., et al. (2016). "Chemotherapy and radiation therapy elicits tumor specific T cell responses in a breast cancer patient." *BMC Cancer* 16: 591. DOI: 10.1186/s12885-016-2625-2
5. **David Andrés Bernal-Estévez**, Diana Rocío Tovar Murillo, and Carlos Alberto Parra-López. (2016). "Functional and phenotypic analysis of two-day monocyte-derived dendritic cells suitable for immunotherapy purposes." *SOJ immunology* 2016 Vol 4 Issue 2. DOI: 10.15226/2372-0948/4/2/00153
6. **David Bernal-Estévez**, Oscar García, Ramiro Sánchez, and Carlos A. Parra-López. (2016). "Monitoring the responsiveness of T and antigen presenting cells compartments in breast cancer patients is useful to predict clinical tumor response to neoadjuvant chemotherapy" *BMC cancer* (sometido)
7. Carlos A. Parra-López, and **David Bernal-Estévez** (2016). "Neoadjuvant chemotherapy for breast carcinomas: the chance of watching the immune system at work in the surveillance of tumors" *EMJ Reviews* (sometido).

INTRODUCCIÓN

El carcinoma de mama es una de las principales patologías tumorales en la mujer, su incidencia y mortalidad ha aumentado en las últimas décadas. En el 2012, este tumor representó un 25% de los casos de cáncer en las mujeres del mundo, por lo que se estima que se diagnostican aproximadamente un millón y medio de casos nuevos por año [1]. Estas cifras de prevalencia de países desarrollados no difieren mucho de las registradas en nuestro país; según el Anuario Estadístico del Instituto Nacional de Cancerología del año 2008 [2], el porcentaje de casos nuevos (sin discriminar los pacientes por género) de cáncer de mama en Colombia fue de 11.8%, un porcentaje similar al del cáncer de cuello uterino, siendo éste el segundo cáncer más frecuente después del cáncer de piel (16.2%) y duplicando al cáncer de estómago y de próstata (6% cada uno). La incidencia del cáncer de mama ha seguido en aumento a pesar de las campañas de prevención, como la práctica mensual del auto-examen y realización de la mamografía bianual en mujeres mayores de 50 años. Al parecer, estas medidas no han sido útiles para el diagnóstico temprano a juzgar por el hecho que la mayoría de casos continúan diagnosticándose en estadio IIIB, lo cual ensombrece el pronóstico de este tumor, especialmente en nuestro medio [3]. Lo anterior, sumado a que su diagnóstico es cada vez más frecuente en mujeres jóvenes y sin factores de riesgo asociados, hace del cáncer de mama un importante problema de salud pública en nuestro país.

La quimioterapia es la principal herramienta para el manejo del cáncer. Los agentes quimioterapéuticos como Doxorubicina y Ciclofosfamida (esquema A/C) son utilizados ampliamente en nuestro país en esquemas de terapia neo-adyuvante en pacientes con cáncer de mama y otros tumores a pesar de que actualmente existen nuevas terapias de alto costo como anticuerpos monoclonales como el trastuzumab (anticuerpo contra HER2) que a pesar de aumentar la sobrevida (incremento aproximado de 5 meses) y disminuir el riesgo de regresión tumoral en un 9%, el uso de este anticuerpo genera cardiotoxicidad en un alto porcentaje de pacientes limitando su uso [4, 5]. Aunque clásicamente se le ha atribuido a la quimioterapia un papel supresor de la respuesta inmune [6], estudios recientes en ratones sugieren que: (i) la Doxorubicina induce muerte de células tumorales con liberación de señales de peligro y antígenos tumorales que estimulan eficientemente la inmunidad adaptativa por linfocitos T (LT) CD8+ antitumorales y (ii) la Ciclofosfamida utilizada a bajas dosis inhibe selectivamente LT supresores. No obstante, la trascendencia de estos resultados, ellos no han sido demostrados en pacientes con cáncer de mama

tratados con esquema A/C. Con el fin de demostrar si existe una asociación entre el efecto inmuno-estimulador de la terapia antitumoral descrito en modelos animales con la respuesta clínica de pacientes con cáncer de mama en tratamiento neo-adyuvante con A/C, en este trabajo se estableció un modelo *in vitro* en sangre periférica que permite evaluar el efecto de la terapia sobre diferentes componentes del sistema inmune y su relación con la respuesta clínica de estas pacientes.

El modelo *in vitro* estandarizado en el presente trabajo consiste en la correlación entre la respuesta clínica y la evaluación en sangre periférica de: (i) poblaciones *ex vivo* (células supresoras y DCs primarias); (ii) capacidad funcional de linfocitos T a un estímulo policlonal; (iii) capacidad de respuesta a coctel de citoquinas para inducción de DCs; y (iv) caracterización de LT específicos de antígenos tumorales (pacientes HLA-A2+).

Los resultados y el marco teórico correspondiente se organizaron en tres capítulos que consideramos cumplen los objetivos del trabajo.

- **Capítulo 1:** se describen procedimientos de manejo e implementación de condiciones de cultivo *in vitro* de PBMCs útiles para el monitoreo durante la terapia antitumoral de LT-CD8+ que reconocen antígenos tumorales en pacientes con cáncer de mama. Tales condiciones de cultivo permiten, (i) no solo detectar LT-CD8+ específicos contra antígenos tumorales presentes en la sangre de la paciente antes del inicio de la terapia antitumoral sino además brindan la posibilidad de expandir *in vitro* LT-CD8+ que reconocen este tipo de antígenos en individuos sanos. Esto último brinda la posibilidad del uso de este tipo de cultivo para expandir LT antitumorales de personas sanas con fines de inmunoterapia [7, 8]; (ii) comparar en la sangre de la paciente la reactividad del repertorio de LT-CD8+ de memoria vs. LT-CD8+ vírgenes contra estos antígenos; (iii) evidenciar que la terapia antitumoral restituye de manera altamente específica funciones efectoras de linfocitos antitumorales y finalmente, (iv) demostrar que LT-CD8+ que infiltran el tumor (TILs) al momento del diagnóstico experimentan un alto el grado de expansión en la sangre de la paciente luego de varios meses de haber finalizado la terapia antitumoral. En conjunto estos resultados sugieren que la terapia antitumoral restituye la inmunovigilancia de los tumores por LT-CD8+ específicos contra antígenos del tumor.

- **Capítulo 2:** describe resultados acerca del monitoreo por citometría de flujo de una serie de parámetros inmunológicos en PBMCs antes y después de tres ciclos de quimioterapia neo-adyuvante con A/C en un grupo de pacientes diagnosticadas con cáncer de mama. En particular, el monitoreo de algunas funciones de los componentes de LT y APCs permitió evidenciar: (i) que el monitoreo del desempeño de una serie de parámetros fenotípicos y funcionales evaluados antes y después de tres ciclos de quimioterapia neo-adyuvante con A/C en estas células permite discriminar claramente el estatus de paciente y de mujer sana; (ii) que antes del tratamiento los LT y las APCs de las pacientes presentan un déficit funcional que se recupera luego de la quimioterapia alcanzando niveles similares a los observados en células de mujeres sanas; (iii) que existe relación entre el grado de restitución funcional de la respuesta de estos dos tipos de células y la respuesta clínica del tumor inducida por la quimioterapia y (iv) que es posible detectar inmuno-fenotipos en estas células cuyo desempeño antes del tratamiento permite predecir la respuesta clínica que experimentará el tumor al tratamiento con quimioterapia neo-adyuvante. Consideramos que en conjunto todos estos resultados representan importante evidencia en favor del role del sistema inmune en el control de los tumores y de la capacidad inmuno-estimulante de la quimioterapia neo-adyuvante.
- **Capítulo 3:** se presentan los resultados del uso de una serie de algoritmos bio-informáticos para el análisis automatizado de los datos de citometría de flujo multidimensional generados en el **Capítulo 2** con el fin de explorar la identificación de posibles marcadores asociados a la respuesta clínica observada en las pacientes luego de la quimioterapia. El uso de sistemas automatizados para el análisis de los datos de citometría confirmó los hallazgos de fenotipos funcionales encontrados en LT y APCs mediante el análisis manual. Adicionalmente, un análisis de poblaciones celulares con fenotipos complejos determinados con el uso de hasta 10 marcadores, confirmó que una población de DCs plasmacitoides detectada *ex vivo* en la sangre de las pacientes previo a la quimioterapia está asociada al estatus pre-quimioterapia y alcanzan niveles de mujeres sanas luego de tres ciclos de quimioterapia. De otra parte, el análisis multidimensional de LT de pacientes pre-quimioterapia cuyo TCR ha sido estimulado *in vitro* muestra que la expansión de dos sub-poblaciones de LT una de LT-CD4+ foliculares (Tfh) y otra de LT-CD8+ IL-17+ no se observa en

muestras de mujeres sanas y es característico de pacientes previo al inicio de la quimioterapia.

Finalmente se discute los resultados obtenidos en relación con la literatura y su aplicación actual en la clínica. Este sistema de monitoreo se está empleando en el seguimiento de un grupo de pacientes con cáncer de mama, participantes en el primer ensayo clínico fase I/II de terapia celular (inmunoterapia) en Colombia realizado por nuestro grupo de investigación con el estudio "*Inmunogenicidad y seguridad de células dendríticas autólogas en pacientes con cáncer de mama tratadas con quimioterapia neo-adyuvante*" adelantado por la Fundación Salud de los Andes y la Universidad Nacional de Colombia y patrocinado por Colciencias a través de la Convocatoria 502.

FORMULACIÓN DEL PROBLEMA

Tratamientos antitumorales como quimioterapia y radioterapia, empleados frecuentemente para el control del cáncer generan en los pacientes diferentes grados de inmunosupresión [9, 10]. La Ciclofosfamida utilizada en combinación con antraciclinas (esquema A/C) suprime la producción de interleuquina 12 (IL-12) afecta la diferenciación de los Linfocitos T a LT ayudadores (Th)-1, incrementa respuestas tipo Th-2/Th-3 (mediadas por IL-4, IL-10 y el factor de crecimiento transformante (TGF)- β) y el nivel de eosinófilos en sangre [11]. De manera similar el metotrexate empleado en el tratamiento de cáncer de mama, leucemias y otros tumores en combinación con Ciclofosfamida más 5-fluorouracilo (5FU) induce leucopenia al igual que la combinación de A/C más 5FU [12]. Adicional a la leucopenia, se ha descrito que A/C favorece el incremento de células supresoras de origen mieloide (MDSCs) en pacientes con diferentes patologías incluyendo el cáncer de mama [13].

Por su parte, ha sido reportado que la terapia adyuvante ampliamente utilizada para el tratamiento de pacientes con cáncer de mama, causa importantes trastornos al sistema inmune [14-19]. Sorprende como a pesar de toda esta evidencia en favor de la supresión inmune inducida por agentes quimioterapéuticos muy utilizados poco se investiga sobre cómo las respuestas inmunitarias alteradas se recuperan luego de instaurado el tratamiento. Este tema adquiere particular importancia, en el caso de pacientes con cáncer de mama quienes tienen una mayor depresión inmune mayor comparado con mujeres sanas [20, 21].

En contraste con lo anterior, evidencia científica reciente de modelos de cáncer de mama en animales y estudios preclínicos sugieren que fármacos como la Ciclofosfamida tiene un papel modulador de la supresión en pacientes con cáncer. De otro lado existen evidencias de que las antraciclinas inducen un tipo de muerte celular en los tumores conocido como muerte celular inmunogénica (MCI) que estimula la respuesta inmune favoreciendo el control del tumor [22-31]. No obstante, el poder adyuvante de la quimioterapia con A/C no ha sido demostrado en pacientes con cáncer de mama tratadas con A/C. En la actualidad no se ha podido esclarecer un sistema viable para ser realizado de manera sistemática en sangre periférica que permita evidenciar y determinar si los efectos inmunológicos de la MCI tienen en la práctica relevancia clínica en pacientes con cáncer de mama tratadas con A/C; y si existe marcador(es) que puedan ser empleados para predecir la respuesta clínica a la quimioterapia en pacientes con cáncer de mama.

JUSTIFICACIÓN

Existe numerosa evidencia científica de efectos desfavorables y favorables de la quimioterapia en la respuesta inmune, sin embargo, sorprende que pocos estudios se hayan ocupado de ilustrar cómo diferentes componentes del sistema inmune se ven afectados o se benefician de la terapia antitumoral. El agotamiento de las células T y disfunción de las células presentadoras de antígenos (APCs) son dos factores de reconocida importancia en la etiología del cáncer y punto de partida en cualquier paciente con cáncer al inicio del tratamiento. En el caso de pacientes con cáncer de mama en terapia neo-adyuvante con A/C, se desconoce por una parte la magnitud de la deficiencia funcional de estos dos compartimentos antes del tratamiento y por la otra, la capacidad inmunomoduladora de este régimen de quimioterapia en las pacientes tratadas. Para responder estas preguntas y para dilucidar la importancia clínica de la recuperación inmune en estas pacientes se justifica la implementación de sistemas de monitoreo de la respuesta inmune con el fin además de formular posibles intervenciones. Debido a la complejidad de la respuesta inmune y la biología de los tumores de cáncer de mama, es poco probable que un solo biomarcador sea suficiente para predecir los resultados clínicos en respuesta a la quimioterapia. Por lo tanto, la integración de múltiples factores tanto de los tumores como parámetros de respuesta inmune, como la expresión de proteínas, genómica y transcriptómica, quizás sean necesarios para la predicción precisa de beneficio clínico de la terapia antitumoral. Por lo anterior consideramos que para el estudio de la forma cómo evoluciona la inmunidad antitumoral en pacientes en quimioterapia consideramos necesario la implementación y selección de métodos que permitan la inmuno-monitorización de células T y APCs durante el tratamiento. En este trabajo se presentan algunos avances en esta dirección en pacientes con cáncer de mama en quimioterapia neo-adyuvante con A/C y evidencia preliminar de posibles bio-marcadores asociados al beneficio clínico de este tipo de quimioterapia que pueden derivarse de sistemas de monitoreo inmune de las pacientes en tratamiento.

OBJETIVOS

Objetivo general:

Evidenciar en pacientes con cáncer de mama la capacidad de la terapia antitumoral neo-adyuvante de modular la respuesta inmune.

Objetivos específicos:

- Implementar ensayos *in vitro* que permitan monitorear el efecto de la terapia antitumoral en la respuesta inmune.
- Cotejar el inmuno-fenotipo de LT antitumorales antes y después de recibir quimioterapia neo-adyuvante con Doxorrubicina y Ciclofosfamida (A/C).
- Evaluar la capacidad del tratamiento neo-adyuvante con A/C de revertir la inmunosupresión en pacientes con cáncer.
- Definir en un sistema de inmunomonitorio parámetros que permitan predecir la respuesta clínica favorable del tumor a la terapia neo-adyuvante.

HIPÓTESIS

El estatus fenotípico y funcional de células del sistema inmune de sangre periférica en pacientes con cáncer de mama es deficiente con respecto al de mujeres sanas; sin embargo, este estatus se recupera luego de tres ciclos de quimioterapia neo-adyuvante con A/C siendo la recuperación significativamente mayor en pacientes cuyo tumor experimenta una respuesta clínica favorable al tratamiento con A/C.

CAPITULO 1. Implementación de ensayos *in vitro* para el monitoreo de LT en pacientes con cáncer de mama en terapia antitumoral

Resumen

Desde el punto de vista inmunológico, la aparición de un tumor detectable clínicamente significa que las células tumorales han evadido la inmuno-vigilancia del sistema inmune. Numerosa evidencia de estudios preclínicos y de ensayos clínicos en individuos con distintos tipos de cáncer sugieren que el desarrollo del cáncer es en parte atribuible al deficiente desempeño de células presentadoras de antígeno (APC) y de linfocitos T (LT) con actividad antitumoral en estos individuos. Para monitorear la capacidad inmunomoduladora de la quimioterapia neo-adyuvante en pacientes con cáncer de mama se implementaron varios ensayos *in vitro* que permitiesen establecer el estatus fenotípico y funcional del sistema inmune en individuos sanos.

En primer lugar, se estableció un sistema de generación de células dendríticas (DCs) derivadas de monocitos, para ser empleadas como APCs para ser usadas como una herramienta para la identificación y expansión de LT-CD8+ específicos de antígenos tumorales. El fenotipo de DCs maduras derivadas de monocitos en dos días se verificó mediante citometría de flujo (CF) la expresión en superficie de CD80, CD83, CD86, CD209, HLA-DR, CCR7 y CD14 y la producción de IL-12 en muestras provenientes de individuos sanos (n= 36) cultivados con GM-CSF e IL-4 por dos o cinco días (DCs inmaduras) luego de incubación por 24 o 48 horas con las citoquinas pro-inflamatorias IL-1 β , IL-6 y TNF- α , en combinación con PGE2 (coctel estándar) o con una combinación de IFN- α , IFN- γ y Poly I:C (coctel alfa); esto con el fin de evaluar en individuos sanos la respuesta a la maduración de dos tipos de DCs: (i) DCs estándar (stDCs) producidas en dos y siete días (2d-stDCs y 7d-stDCs) y (ii) DCs Tipo I alfa (2d-aDCs) producidas en dos días. La caracterización de DCs permiten concluir: (i) dos días son suficientes para obtener tanto DCs estándar (2d-stDCs) como DCs alfa (2d-aDCs) que son fenotípica y funcionalmente indistinguibles de DCs obtenidas en siete días (7d-stDCs y 7d-aDCs); (ii) en la muestra analizada el patrón de expresión de CD80, CD83, CCR7, CD209 permite monitorear la respuesta a la maduración de DCs inmaduras y (iii) en respuesta a la maduración, 2d-aDCs producen altas concentraciones de IL-12 comparadas con 2d-stDCs.

Para evaluar la eficiencia de 2d-stDCs y 2d-aDCs como APCs, se implementaron dos tipos de cultivo *in vitro* utilizando estas células con el fin de detectar y expandir LT-CD8+ específicos contra antígenos asociados a tumor (TAAs, por sus siglas en inglés Tumor Associated Antigens) presentes en sangre de pacientes con cáncer de mama y en individuos sanos HLA-A*02:01. Los resultados obtenidos muestran que las condiciones de cultivo *in vitro* utilizadas con los dos tipos de DCs estimulan eficientemente en pacientes con cáncer LT-CD8+ específicos contra TAAs HLA-A*02:01 a partir de LT de memoria y de LT vírgenes. Finalmente, las 2d-aDCs inducen la expansión de LT-CD4+ Th1 de fenotipo “stem de memoria” y favorecen el estudio en sangre periférica de células foliculares (Tfh) productoras de IL-21 específicas de antígenos microbianos de manera más eficiente comparadas con 2d-stDCs.

Una vez implementadas las condiciones de cultivo para evaluar el desempeño de dos tipos de APCs (2d-stDCs y 2d-aDCs) en pacientes con cáncer de mama y en donantes sanas, se decidió utilizar los dos tipos de 2d-DCs como APC para analizar en una paciente con cáncer de mama (HLA-A*02:01, estadio TNM IIIb, Her2/neu +++) en remisión completa luego de 10 años de tratamiento antitumoral, el inmuno-fenotipo de LT específicos para Her2/neu y NY-ESO1 antes y un año después de la terapia antitumoral. Estos estudios permitieron evidenciar que previa a la terapia antitumoral, los LT de esta paciente exhibieron una marcada deficiencia funcional caracterizada por la ineficiente internalización del TCR, baja expresión de CD69, CD25 y CD154 y la limitada producción de citoquinas en respuesta al estímulo del TCR, fenotipos que se recuperaron de manera significativa luego de la terapia antitumoral. La recuperación funcional de los LT-CD8+ específicos para TAAs en esta paciente luego de la terapia antitumoral pudo ser evidenciada por una eficiente diferenciación hacia el fenotipo efector de LT-CD8+ específicos para Her2/neu y NY-ESO1 y una expansión significativa de LT específicos contra Her2/neu que infiltraban el tumor al momento del diagnóstico detectada en sangre periférica un año después de haber finalizado la terapia antitumoral.

Marco teórico

Células dendríticas como células presentadoras de antígenos profesionales

Las células dendríticas (DCs) juegan un papel muy importante como células presentadoras de antígenos (APC) profesionales en la respuesta inmune innata y la conexión con la respuesta inmune adaptativa. Desde la descripción inicial de las células dendríticas hace más de 40 años [32], su papel en la inmunidad antitumoral mediada por LT han sido ampliamente estudiado [33]. Sin embargo, la baja frecuencia de DCs primarias en sangre dificultó por un largo tiempo su estudio, posteriormente, la posibilidad de diferenciar grandes números de DC a partir de monocitos las convirtió en una herramienta importante en la terapia de pacientes con cáncer, demostrando ser seguras y capaces de provocar respuestas clínicas favorables [34]. Esta estrategia tiene como objetivo la recuperación de la falta de respuesta del sistema inmunológico promovido por el microambiente tumoral que termina con el restablecimiento de la capacidad antitumoral de células T citotóxicas (CTL) [35-41]. La caracterización del fenotipo de las DCs derivadas de monocitos después de la maduración continúa siendo una valiosa herramienta para examinar *in vitro* los beneficios potenciales de estas células en la generación de inmunidad protectora contra tumores en pacientes con cáncer.

En los seres humanos, hay dos grupos de DC primarios, las de origen mielóide caracterizadas por la expresión de CD11c y CD33 (se encuentran principalmente en la dermis en tejidos y circulantes en sangre), y las DC de linaje linfóide o plasmacitoides que expresan CD123 y CD45RA (circulantes en sangre) [42, 43]. En pacientes con cáncer se ha observado una reducción del número de DC mieloides en sangre periférica e infiltrantes de tumores, mientras que el número de DC plasmacitoides no se ve alterada. Adicional a la alteración en la cantidad de células, se ha descrito que en pacientes con cáncer las DC mieloides tienen un fenotipo inmaduro [44, 45] que favorece un proceso de tolerancia inmune dentro del microambiente tumoral [46, 47]. Por lo tanto, las vacunas basadas en DC se han explorado activamente durante los últimos años para superar tanto la mala presentación de los antígenos tumorales por las células tumorales, así como la baja funcionalidad de las DC primarias en los pacientes con cáncer [15].

La capacidad de DC para activar células T capaces de reconocer y destruir células tumorales de una manera antígeno específica ha sido demostrada en protocolos clínicos llevados a cabo en pacientes con cáncer en los que DCs pulsadas con antígenos tumorales se ha utilizado como vacunas [48]. Se ha observado que este tipo de vacuna es segura y

más tolerable que otros tratamientos como la quimioterapia o la radioterapia [34], con respuestas clínicas e inmunológicas variables [36, 49-51].

Debido a que las DC están en una cantidad muy baja en sangre periférica, durante la última década se han descrito varios métodos para su generación *in vitro* a partir de monocitos de sangre periférica cultivados con IL-4 y GM-CSF y madurados con diversas combinaciones de citoquinas pro-inflamatorias en combinación con agonistas de receptores tipo Toll (Toll-like Receptors - TLRs) [52]. A pesar de las múltiples opciones para la maduración de las DCs, hay una combinación ampliamente utilizada tanto a nivel experimental como en ensayos clínicos, conocida como coctel estándar, el cual consiste en una combinación de citoquinas pro-inflamatorias IL-1 β , IL-6 y TNF- α , junto con PGE2 [53]. Sin embargo en los últimos años se ha descrito otra combinación de citoquinas (IL-1 β , IL-6 y TNF- α) en combinación con IFN- α , IFN- γ y Poly I:C, conocido como DCs tipo I Alfa polarizadas (alfa DCs) que se caracteriza por inducir respuestas tipo Th1 fuertes mediante la producción de IL-12 [54]. La comparación fenotípica y funcional de las DCs obtenidas en dos días descrita por Dauer y cols [55], mostró una eficiente capacidad de las DCs derivadas en dos días a comparación con las DCs de siete días. De manera similar, las descripciones de las aDCs, se realizaron en cultivos de 5 a 7 días, sin embargo bajo la misma aproximación descrita por Dauer, pudimos evidenciar que las DCs alfa descritas previamente [54] cuando son derivadas en dos días (2d-aDCs) son igualmente funcionales [56].

Modelos *in vitro* para la evaluación de la respuesta del sistema inmune

Hay un sinnúmero de modelos para la evaluación *in vitro* de la respuesta del sistema inmune, sin embargo, no todos son igualmente eficientes para trabajar con poca cantidad de células, además debe ser eficiente para evaluar la capacidad de activación de LT mediado por DCs como APC. Modelos recientemente descritos demuestran que el cultivo de PBMCs en una alta concentración o densidad es capaz de simular una respuesta *in vitro* similar a un tejido [57], este sistema de cultivo favorece la interacción entre las células del sistema inmune, principalmente los compartimientos APC y LT, donde en los tejidos los LT-CD8+ están en un proceso de inmuno-vigilancia mediante el reconocimiento de complejos MHC/péptido ya sea en APC o en otras células, pero cuando entran a la circulación los LT pierden su estado de pre-activación. El cultivo de PBMCs en alta densidad previo al reto con un antígeno específico favorece la capacidad de detección de las respuestas de LT. En relación con el cultivo en alta densidad, el grupo de Zitvogel describe una metodología rápida para evaluar LT específicos de antígenos que normalmente se encuentran en bajas

proporciones (0.1% a 0.001% de células). Este modelo de cultivo *in vitro* se centra en la inducción de DCs en la mezcla total de PBMCs sin requerir de un proceso previo de purificación de monocitos (derivación de DCs *in situ*). Una de las ventajas de este sistema es que reduce el número de células requeridas para la evaluación funcional del LT específicos de antígenos además de ser evidenciables en periodos cortos de cultivo *in vitro* (2 a 6 días). Otro punto a favor es que los LT están en contacto durante el proceso de diferenciación, maduración y presentación de antígeno por parte de las DCs facilitando así su activación dependiente en gran medida por los LT de memoria [58].

Otra de las metodologías de cultivo evaluada, fue descrita por Moser y cols [59] se basa en la amplificación de LT-CD4+ vírgenes estimulados por DCs autólogas derivadas de monocitos purificados. A pesar de ser una metodología más exigente en el procesamiento de la muestra y en el tiempo de cultivo (14 días de activación primaria seguida de una segunda activación con DCs), facilita el estudio del repertorio de LT vírgenes contra un antígeno específico. Aunque esta metodología fue descrita para LT-CD4+, trabajos por el mismo grupo han mostrado ser igualmente eficientes para la activación de LT-CD8+. Finalmente, a comparación con otros sistemas de cultivo, la metodología propuesta por Moser tiene ciertas ventajas: (i) uso de dosis de antígeno similares a las fisiológicas, (ii) no emplea factores de crecimiento durante el cultivo (por ejemplo, no requiere del uso de IL-2) y (iii) el procesamiento del antígeno es por mecanismos propios de las DCs y no por otros sistemas como transfección.

Activación, fenotipo y diferenciación *in vitro* de linfocitos T

Una adecuada respuesta de la inmuno-vigilancia sobre las células tumorales se refleja en la capacidad citotóxica de LT-CD8+ (CTL) y la capacidad ayudadora “helper” de LT-CD4+, los cuales posterior a la presentación adecuada del antígeno por parte de las APCs, se deben diferenciar a partir de una población de LT con fenotipo de células vírgenes (también conocidas como Th0) a células efectoras que producen citoquinas como IFN- γ y TNF- α . Durante el proceso de diferenciación de vírgenes a efectoras, deben pasar por un fenotipo de células de memoria capaces de responder de manera eficiente ante un nuevo reto antigénico. La activación temprana de LT es evidenciable por varios fenómenos conocidos como el aumento en la frecuencia de recambio del TCR (internalización del TCR) [60] y expresión de moléculas como CD25, CD69 y CD154 (CD40L) [61, 62]. En primer lugar, el proceso de recambio del TCR regula el proceso de activación de las células T, este proceso de reciclaje incluye a la mayoría de elementos que hacen parte del complejo

TCR/CD3/Cadena ζ , evitando la interacción del TCR con el complejo MHC/péptido en la APC. Por otro lado, el CD25 hace parte del receptor de IL-2 (cadena α) que al ser estimulado por esta interleuquina facilita la proliferación y diferenciación de las células estimuladas mediante diferentes vías de señalización (STAT5, SOS/ERK y PI3K/AKT). La expresión de CD69 es conocida como un marcador temprano de activación en LT-CD4+ como en LT-CD8+; sin embargo, su papel principal es de inducir una supresión sobre las células activadas al unirse con el CD69L [63]. Finalmente, la expresión de CD154 (CD40L) es fundamental para activación de CD40 en las APC con el fin de inducir la producción de IL-12 necesaria para la síntesis de IFN- γ por parte de los LT [62].

Generación de sub-poblaciones de linfocitos T

Fenotípicamente se puede describir cuatro sub-poblaciones mediante la caracterización de marcadores como CD45RA y CCR7, siendo las doble positivas de fenotipo virgen (TN), las células de memoria central (TCM) se caracterizan por el cambio de la isoforma RA a RO del CD45, posteriormente pierden la capacidad de migración (CCR7 negativas) generando un fenotipo de efectoras de memoria (TEM) y finalmente vuelven a adquirir la isoforma RA del CD45, convirtiéndolas en células efectoras terminalmente diferenciadas (TEF o también conocidas como TEMRA) [64, 65]. Sin embargo, se ha discutido ampliamente la forma de cómo se genera la memoria. Actualmente se plantean dos modelos, el primero no lineal donde a partir de las células vírgenes en respuesta a un antígeno adecuado se diferencian a TEF y a partir de ahí se generan células de memoria como reserva para futuros encuentros. Sin embargo, el modelo lineal (TN – TCM – TEM y TEF) es actualmente más aceptado y comprobado por estudios basados en los sitios de integración viral en pacientes con terapia génica [66].

A nivel funcional, los LT vírgenes (TN - naïve) se caracterizan por no haber experimentado un contacto previo con el antígeno específico para esa célula. Una vez estimulados por APCs maduras cargadas con el péptido específico para la TN y bajo un ambiente pro-inflamatorio, comienza el proceso de diferenciación a LT de memoria o LT efectoras [67]. Los LT de memoria central (TCM) expresan receptores de migración a nódulos linfáticos (como CCR7) y unión a células endoteliales (como L-selectina, CD62-L). Se ha descrito que TCM poseen un telómero más largo lo cual sugiere una mayor capacidad de proliferación a diferencia de los LT de memoria efectora (TEM) [65], que además disminuyen la expresión en superficie de CD45RO, CD28 y CD27 durante su proceso de diferenciación a LT-CD8+ efectoras terminales (TEF) [68] volviendo a expresar CD45RA (también conocidos como

TEMRA). Este proceso de maduración parece ser dirigido adicionalmente por presencia del antígeno o por ciertas citoquinas como IL-7 e IL-15 para TEM, mientras que estas citoquinas no tienen tanto efecto sobre TCM y ningún efecto sobre TN [69]. Cada una de estas cuatro sub-poblaciones posee funciones particulares que las diferencian entre sí, por ejemplo TCM produce principalmente IL-2, mientras que TEM se caracteriza por la rápida expresión de funciones efectoras como la producción de citoquinas (IL-4 o IFN- γ) [64]. Los TEF migran a los tejidos donde se encuentra activo un proceso inflamatorio, expresan grandes cantidades de TNF- α , perforina y granulosinas y poseen una reducida capacidad para proliferar y producir IL-2 [65]. Recientemente se han descrito nuevas sub-poblaciones de LT y entre las más evaluadas se encuentran unas células con fenotipo de células vírgenes pero con una funcionalidad similar a células madre, conocidas como “Stem cell like memory T cell” (SCM) [70]. Como su nombre lo sugiere, estas células tienen una alta capacidad replicativa y son las responsables de diferenciarse a la sub-población TCM. Fenotípicamente, las SCM se describen como células vírgenes (CD45RA⁺ CCR7⁺), que adicionalmente expresa CD95, IL-2R, CXCR3 e IL-7R α . Estas células han mostrado ser eficientes en esquemas de transferencia adoptiva en diferentes modelos de cáncer por su alta capacidad replicativa y sobrevivida a largo plazo [71].

Con el desarrollo de diferentes ensayos clínicos con inmunoterapia, se ha analizado el papel que juegan las diferentes sub-poblaciones de LT en esquemas de transferencia adoptiva de LT para el manejo de cáncer. Estos ensayos han sido realizados tanto en modelos animales como en algunos ensayos clínicos en humanos. Inicialmente se postularía que un perfil de tipo efector proporcionaría una respuesta antitumoral eficiente, pero estudios realizados por Gattinoni y cols [72] muestra el efecto antitumoral en los diferentes niveles de diferenciación de TEF, observando que a menor diferenciación mayor actividad antitumoral. En concordancia con ello, en modelos *in vivo* de melanoma, se comparó la transferencia de TCM con la transferencia de TEM, ambas generadas de cultivo *in vitro* en medio condicionado con citoquinas, y describen como los TCM tienen una mejor capacidad para la reducción de un tumor preestablecido [73]. Por otra parte, el estudio de la diferenciación de la memoria a través de la vía de señalización Wnt, β -catenina, conocida por regular el proceso de maduración de LT post-tímicos, ha mostrado que la generación de TCM similares a células madre (inducidos por la presencia de IL-2 e IL-21) genera una mejor respuesta antitumoral de LT-CD8⁺ [74] comparado con la transferencia adoptiva de TEM o TCM.

Fenotipos funcionales de LT ayudadores “helpers”

Las células T ayudadoras (Th) CD4+ se presentan en una variedad de estados epigenéticos que determinan su función, fenotipo y capacidad de supervivencia. Estos estados de polarización incluyen las células Th1, Th2, Th17, y Foxp3+ (Tregs), así como poblaciones más recientemente descritas Th9, Th22 y T foliculares ayudadoras (Tfh) [75].

Clásicamente en 1986 se describió el paradigma Th1/Th2 como las dos opciones de la capacidad funcional de los LT-CD4+, los cuales se definen como mutuamente excluyentes en su proceso de diferenciación [76]. Los LT Th1 se caracterizan por la producción de IFN- γ y los LT Th2 por la producción de IL-4. Las células Th1 son promovidas por la IL-12 (vía Stat4) e IFN- γ (vía Stat1), que inducen la expresión del factor de transcripción T-bet y la secreción de la citoquina IFN- γ . Las células Th2, inducidas por IL-4 a través de la señalización de Stat6 que regulan el factor de transcripción GATA3, se relacionaron con respuestas humorales a organismos extracelulares o parásitos y desarrollo de atopia y reacciones alérgicas, produciendo citoquinas que incluyen IL-4, IL-5 e IL-13 [77].

Una de las poblaciones de Th recientemente descritas son las Th17, las cuales se caracterizan principalmente por la secreción de IL-17A e IL-17F. Las células Th17 se generan eficientemente a partir de Th0 en presencia del factor de crecimiento transformante (TGF)- β 1 e IL-6, que se señalizan a través de las proteínas de la familia Smad y Stat3, respectivamente. El factor de transcripción maestro de Th17 es Ror γ t, lo cual define a estas células como un linaje distinto a las Th1 y Th2. Estas células tienen una gran plasticidad a nivel funcional, desde la protección en mucosa de hongos y bacterias, hasta procesos autoinmunes como en el modelo animal de esclerosis múltiple (EAE – Encefalitis autoinmune experimental) [78].

En cáncer, las Th17 son frecuentemente encontradas en lesiones premalignas, principalmente en procesos crónicos de inflamación como cáncer pulmonar por tabaquismo o cáncer gástrico por la infección por *Helicobacter pylori*. Sin embargo su papel en la carcinogénesis es controversial. En pacientes con cáncer, la presencia de células Th17 es un indicador de pobre pronóstico en algunos estudios y un indicador favorable en otros informes [79, 80]. Los ratones deficientes en IL-17 son más susceptibles de presentar metástasis, además esta citoquina juega un papel importante en la ayuda a CTL antitumorales para producir IFN- γ [81]. Pese a lo anterior, se sabe que la IL-17 favorece la producción de IL-6 y activa señales mediadas por STAT3 promoviendo la proliferación

tumoral [82]. Recientemente se estableció que en LT $\gamma\delta$ la vía IL-17A / IL17R, dependiente de IL1 β y no de IL-23, es importante en el proceso de activación de CTL mediada por el tratamiento de tumores con antraciclinas y oxaliplatino [83].

En el proceso de inmuno-vigilancia de los tumores, citoquinas pro-inflamatorias como el TNF- α , la cual es producida por múltiples células del sistema inmune al igual que en fibroblastos y células tumorales, se encuentra incrementada en tejido tumoral a comparación con tejido mamario sano [84, 85]. Adicionalmente, niveles incrementados de TNF- α circulante en pacientes con cáncer de mama se correlaciona con incremento en metástasis a ganglios linfáticos y el estadio tumoral [86].

Diversidad del receptor de células T

La respuesta celular de LT (CD8 y CD4) depende en gran medida de la capacidad de estas células para diferenciar antígenos propios de antígenos provenientes de agentes infecciosos o de alteraciones de células propias como las células tumorales. La capacidad de reconocimiento de una gran variedad de antígenos es dependiente de la diversidad del receptor de células T (TCR) conformado por las cadenas α y β [87]. Cada una de estas cadenas contiene un dominio constante y uno variable y la especificidad del reconocimiento del péptido es determinado principalmente por la secuencia de aminoácidos de la región de complementariedad (CDR)-3 ubicado en el dominio variable de ambas cadenas (α y β).

El repertorio de LT vírgenes es muy diverso y luego de una estimulación adecuada entran en un proceso de expansión clonal y diferenciación a LT de memoria [65, 88], incrementando su clonalidad hasta 100 veces más a comparación de LT vírgenes [89].

El estudio del repertorio en cáncer se ha centrado en el “mutanoma” con el fin de identificar nuevas epítopes que puedan ser reconocidas por LT [90]. Esta aproximación adquiere relevancia en los nuevos ensayos clínicos que involucran la vacunación con péptidos sintéticos [91], transferencia adoptiva de clones de LT o la clonación y transfección de TCRs específicos de antígenos tumorales [92].

La diversidad de los LT depende del proceso de recombinación del TCR. Este proceso ocurre cuando las células progenitoras de la médula ósea llegan al timo (células doble negativas CD4- CD8-) e interactúan con células del epitelio tímico migrando hasta la corteza. En esta zona inicia el re-arreglo de los loci que contiene los genes *Trb*, *Trg* y *Trd*. Los LT que codifican para *Trg* y *Trd* siguen con el linaje $\gamma\delta$. La codificación de la cadena β proviene de tres regiones, una constante (C), una variable (V), una de unión (J) y una de

diversidad (D) esta última no la tiene la cadena α . La selección de la cadena β genera una exclusión alélica generando un pre-TCR y las células pasan de un estado de doble negativas hacia una etapa de células doble positivas (CD4+ y CD8+). Estas células inician el re-arreglo del gen *Tra*, para codificar la cadena α del TCR formando así un TCR completo. Posteriormente, sigue un proceso de selección positiva de los LT, que asegura la sobrevivencia de estos LT que son capaces de reconocer el complejo MCH/péptido; LT que no reconocen ningún péptido o, por el contrario, si reconocen de una manera muy fuerte este complejo, son eliminados (se elimina aproximadamente un 90% de los LT). Finalmente las células maduras CD4+ o CD8+ salen a la circulación con un fenotipo de células vírgenes (se estima que la variedad de células T es alrededor de 2×10^7) [93].

Cuantificación del repertorio de linfocitos T

La frecuencia de LT vírgenes específicas de epítopes desempeña un papel importante en la formación de la memoria y en la especificidad de la respuesta inmune contra infecciones[94]. En las últimas décadas se han realizado diferentes estudios basados en modelos de transferencia adoptiva de células T en ratones [95] o mediante la secuenciación de las regiones CDR3 de LT específicos de antígenos [96]. El desarrollo de tetrámeros proporcionó una herramienta adicional capaz de detectar células T específicas de Ag de una forma directa [97] con las limitaciones asociadas a la expresión del alelo de HLA correspondiente, principalmente la restricción de los alelos y la limitada cantidad de epítopes de cada antígeno. Las primeras descripciones de la cuantificación de LT vírgenes específicas en ratones sugirieron cantidades entre 20 a 200 LT CD4+ naïve [98] y entre 15 a 1200 en LT-CD8+ [99]. Estudios recientes en humanos han estimado rangos entre 0.6 a 500 LT CD8+ por millón de células [100] y alrededor de seis LT CD4+ por millón para el antígeno de Hemaglutinina de influenza [101], pero dada la alta exposición a este virus la generación de memoria y células efectoras pueden alterar la cuantificación del repertorio de LT CD4+ en humanos. Aproximaciones más específicas para cuantificar el repertorio de LT CD4+ se refleja en el trabajo de Kwok y cols donde emplean el antígeno protector (PA) de *Bacillus anthracis* como un modelo de estudio de la frecuencia de estas células en LT CD4+ vírgenes que fueron vacunados contra este antígeno. Los resultados presentados muestran una frecuencia de LT CD4+ específicos para este antígeno entre 0,2 a 10 células vírgenes por millón las cuales se correlaciona con las frecuencias de LT de memoria en las personas vacunadas [102].

La detección de LT específicos de antígenos (tumoraes o virales), ha sido en gran parte sesgado por el método de detección y de cultivo. La sensibilidad de los LT para reconocer antígenos depende en gran medida de la interacción cercana entre las células. Recientemente el grupo de Wegner y cols, demostró que se incrementa el reconocimiento de LT de memoria de antígenos microbianos y tumorales mediante un cultivo denominado de alta densidad con el fin de simular la interacción cercana célula a célula de los tejidos [57]. Estos sistemas pueden favorecer la búsqueda de clonos de LT específicos contra antígenos tumorales con el fin de mejorar los esquemas de inmunoterapia o el monitoreo de respuesta inmune en esquemas de vacunación.

Receptores inhibitorios

Los receptores inhibidores como PD1, CD160, 2B4, CTLA-4, LAG3 y BTLA, se asocian frecuentemente con el "agotamiento de las células T" por su papel regulador de la homeostasis de la respuesta inmune en LT [103]. Por ejemplo, la expresión de PD-1 (del inglés Programmed Cell Death 1) cuando es estimulado por PDL1 o PDL2, puede iniciar procesos de bloqueo de proliferación de LT y de apoptosis, aunque no está directamente asociado a una disminución en la capacidad funcional de LT-CD8+, se correlaciona más con procesos de diferenciación a LT efectoros o de memoria [104]. Por otra parte, el CTLA-4 al tener una mayor afinidad por el CD80/CD86 a comparación del CD28, suspende la segunda señal entre la APC y el LT así terminando la activación del LT[105]. Actualmente el estudio de las vías involucradas en la señalización de los receptores inhibitorios tiene una gran importancia a nivel clínico en pacientes con cáncer, por el desarrollo de anticuerpos contra PD-1, PDL1 y CTLA-4, cuya función es evitar el "freno" inducido por el microambiente tumoral sobre las células del sistema inmune y permitir así un nivel de activación prolongado contra las células tumorales [103, 106]. La terapia con estos anticuerpos ha mostrado ser eficiente en pacientes con cáncer en estadios avanzados como melanoma. El grupo de Daniel Speiser recientemente publicaron un trabajo detallado del comportamiento de la expresión de múltiples receptores inhibitorios durante el proceso de diferenciación de LT-CD8+ y la relación de la expresión de estos receptores con la capacidad funcional de las células de donde se extrae la siguiente tabla que resume la expresión y asociación en pacientes con cáncer.

Tabla 1. Resumen de la expresión de RI y su relación con la producción de citoquinas en LT CD8, considerando diferenciación, activación y localización anatómica. Tomado de [106].

RI	Cambios en la expresión de RI				Células RI+ producen menos citoquinas que las RI- considerando:		
	Durante diferenciación	Durante activación	En ganglios linfáticos normales	En ganglios linfáticos tumorales	Células totales	Sub-poblaciones	Ubicación anatómica
PD1	Aumentada (+ en efectoras)	+++	Presencia de PD1 alto	Presencia de PD1 alto	RI+ ligero incremento en citoquinas	No	Tendencia en ganglios linfáticos
CTLA-4	Ausente en estado basal	++++	Incrementado	Incrementado	Si, ligeramente	Si en células no vírgenes	Si en PBMCs de HD, tendencia en otros lugares
TIM-3	Incrementada en naïve y e TEMRA	+++	Similar	Puede incrementar	Tendencia	No	Tendencia en sangre de pacientes y en GL tumorales
LAG-3	Ausente en estado basal	++++	Similar	Puede incrementar	NA	NA	NA
CD160	Incrementada en naïve y e TEMRA	Estable	Incrementado	Similar	Si (una pequeña porción de RI+)	Si	Si en sangre, tendencia en GL
2B4	Aumentada (progresivo+)	Estable o -	Similar	Disminuido	RI+ incremento en citoquinas	No (RI+ ligeramente más funcionales)	Similar en todas las ubicaciones
KLRG1	Aumentada (progresivo+)	Estable o -	Similar	Disminuido	RI+ incremento en citoquinas	No (RI+ ligeramente más funcionales)	Similar en todas las ubicaciones
BTLA	Disminuido (progresivo-)	Estable o +	Ligeramente incrementado	Ligeramente incrementado	Si	No	Similar en todas las ubicaciones

Diseño experimental y metodología

Vinculación de pacientes con cáncer; de voluntarias sanas y aislamiento de PBMCs

Este estudio fue aprobado por el comité de ética de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional de Colombia (CE-14, 9 de agosto de 2008, Acta 107). Las pacientes y donantes sanas firmaron un formulario de consentimiento informado antes de la toma de las muestras de sangre. Se obtuvieron muestras de sangre heparinizada de voluntarios sanos (60 mL) y de pacientes con cáncer de mama en terapia neo-adyuvante con AC que cumplieron los criterios de inclusión del estudio (20 mL). De la paciente MCC-002 se obtuvo una leuco-aféresis antes y otra después de ocho meses de haber terminado el tratamiento antitumoral (Figura 20). Las células mononucleares de sangre periférica (PBMCs) se

purificaron usando centrifugación y gradiente de densidad con Ficoll-Paque y se crio-preservaron en medio de congelación que contenía 50% de RPMI-1640 + 40% de suero bovino fetal (FBS) (Gibco-Life Technologies) + dimetil sulfóxido al 10% (DMSO) (Sigma-Aldrich) a una concentración máxima de 10^7 células/mL por crio-vial los cuales fueron almacenados en nitrógeno líquido hasta su uso. La viabilidad de las células se evaluó directamente con azul de tripano (Life Technologies) y/o con citometría de flujo (CF) utilizando un estuche comercial de tinción celular LIVE/DEAD Fixable Aqua Dead Cell Stain Kit (Life technologies).

Diferenciación de células dendríticas (DCs) a partir de monocitos

El proceso de derivación y maduración de DCs a partir de células de sangre periférica (monocitos purificados o PBMCs) se realizó como se describe a continuación.

Diferenciación de monocitos o PBMCs a células dendríticas inmaduras (iDCs)

Los monocitos utilizados para obtener DCs fueron purificados por selección negativa de sangre periférica utilizando un estuche comercial el cual remueve células blancas de la sangre mediante el uso de anticuerpos contra estas células y la formación de rosetas favorecida por la presencia de eritrocitos en la muestra (Stemcell technologies). En algunos experimentos los monocitos fueron purificados por selección positiva mediante “sorting” celular (marcaje de células CD14+) utilizando un equipo FACS Aria II – (BD). Alternativamente las DCs fueron derivadas *in situ* directamente a partir de PBMCs. Los monocitos o los PBMCs fueron cultivados en medio AIM-V en platos de 96 pozos fondo plano a una concentración de 2×10^5 células/mL para monocitos o 2×10^6 PBMCs/mL suplementados con 750U/mL de interleuquina (IL)-4 y 1000U/mL del factor estimulante de colonia granulocito macrófago (GM-CSF) (Cellgenix) a 37°C con atmosfera húmeda al 5% de CO₂ por 24 horas o por 5 días, en el caso de DCs obtenidas en dos (2d-DCs) o en siete días (7d-DCs) respectivamente [52].

Maduración de DCs

La maduración de DCs se indujo utilizando combinaciones de citoquinas pro-inflamatorias por periodos de 24 o 48 horas adicionales del cultivo de monocitos en el caso de 2d-DCs y 7d-DCs respectivamente – (Ver Figura 1). Existen varios cocteles de citoquinas descritos para la maduración de DCs; sin embargo, la combinación de citoquinas comúnmente empleada en la generación de DCs tanto en siete como en dos días se compone de: IL-6, TNF- α , IL-1 β y PGE2 (coctel denominado estándar) [107]. Recientemente Mailliard y cols.

describieron una combinación de citoquinas que induce la maduración de DCs conocidas como tipo 1 alfa polarizadas o alfa-DCs (aDCs) el cual consta de las siguientes citoquinas: IL-6, TNF- α , Poly I:C, IFN- α , IFN- γ e IL-1 β [108].

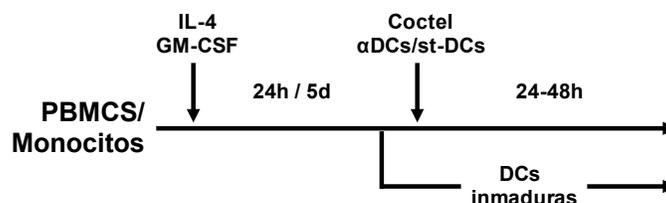


Figura 1. Esquema de inducción de DCs a partir de PBMCS o monocitos purificados. Células mononucleares o monocitos purificados fueron cultivados en AIM-V suplementado con IL-4 y GM-CSF con el fin de diferenciar los monocitos a DC inmaduras (iDCs) en un periodo de 5 días (protocolo clásico) o en 24 horas (protocolo acelerado de derivación de DCs in situ a partir de PBMCS). A continuación, se adiciona a las iDCs los cocteles de citoquinas pro-inflamatorias para inducir su maduración por 48 o 24 horas adicionales para el caso de DCs obtenidas en siete días y dos días respectivamente. Coctel estándar: TNF- α , IL-1 β , IL-6 y PGE2. Coctel alfa: TNF- α , IL-1 β , IL-6, IFN- γ , IFN- α y Poly I:C.

La concentración de citoquinas empleadas para la fase de maduración de DCs con los cocteles estándar y alfa se presenta en la Tabla 2.

Tabla 2. Concentración de citoquinas para maduración de DCs

Citoquina	Concentración final por mL
IL-1 β	10 ng
IL-6	1000 UI
TNF- α	10 ng
IFN- α	1000 UI
Poly I:C	20 μ g
IFN- γ	1000 UI
PGE2	1 μ g

Posterior a la maduración de las células se evaluó el fenotipo de DCs con el fin de determinar el grado de expresión de moléculas asociadas a su maduración como son la sobreexpresión de CD80, CD83, CCR7, HLA-DR y la expresión a la baja de CD209 (DC-SIGN). Finalmente se determinó en el sobrenadante de los cultivos de DCs la producción de citoquinas principalmente la secreción de IL-12p70 (IL-12), mediante la técnica de CBA (del inglés Cytometric Bead Array – BD), previo y posterior a la estimulación con los dos cocteles de citoquinas de maduración. Un análisis fenotípico y funcional comparativo de los dos tipos de DCs derivadas en dos vs. siete días fue recientemente publicado por nuestro grupo [56].

Evaluación del rendimiento y fenotipo de DCs derivadas de monocitos enriquecidos por adherencia o inducidas en PBMCs

A partir de PBMCs obtenidos de donantes sanas se cultivaron 2×10^5 PBMCs/mL en platos de 6 pozos con medio AIM-V. A partir de los cultivos se realizaron dos sistemas de cultivo simultáneos para la diferenciación y maduración de DCs derivadas en dos días a partir de células adherentes y en PBMCs totales (Figura 13A). Para el primer sistema se adicionó IL-4 (750UI/mL) y GM-CSF (1000UI/mL) para la inducción de iDCs (Figura 13A numeral 3). Pasadas 24 horas de incubación a 37°C con 5% CO₂ se adicionan los cocteles de citoquinas (ver Tabla 2) para la maduración 2d-stDCs y 2d-aDCs. Previo al análisis por citometría de flujo las células no adherentes se recolectan para ser evaluadas de manera independiente (Figura 13A numeral 1) a las células adherentes (Figura 13A numeral 2). En el segundo sistema las PBMCs cultivadas se incuban por 2 horas a 37°C con 5% CO₂ para permitir la adherencia de las células al plato de cultivo las células no adherentes se separan y se mantienen en condiciones de cultivo (37°C con 5% CO₂) hasta su análisis (células que nunca estuvieron en presencia de citoquinas, (Figura 13A numeral 6)), las células adheridas (enriquecidas en monocitos) se estimulan de igual manera para la diferenciación de estas células a iDCs con la adición de IL-4 y GM-CSF por 24 horas (Figura 13A numeral 5). Posteriormente a las iDCs se adicionan los cocteles de citoquinas (ver Tabla 2) como se mencionó en el párrafo anterior para generar 2d-stDCs y 2d-aDCs (Figura 13A numeral 4). Para cada una de las seis condiciones establecidas se analizó por CF con el software FlowJo, la expresión de los marcadores CD83, CD14, CCR7 y CD80 en células CD11c positivas comparando entre las células inmaduras (iDCs) y las fracciones adherentes y no adherentes en ambos sistemas de cultivo para derivación de DCs (PBMCs y sistema de adherencia) tanto maduras con el coctel de citoquinas para las DCs estándar (2d-stDCs) como para el coctel alfa (2d-aDCs).

*Evaluación funcional de DCs y estimulación *in vitro* de LT*

Una vez establecidas las condiciones requeridas para la obtención de DCs maduras en dos días, se procedió a evaluar la capacidad funcional de estas células para activar y expandir LT totales o LT vírgenes. Para evaluar la capacidad de activación de LT inducido por las DCs, se emplearon diferentes ensayos *in vitro* los cuales se describen a continuación:

Purificación de células T

Se purificaron células T naïve CD4+ y CD8+ utilizando el kit de aislamiento de células CD4+ y CD8+ Naïve (MACS Miltenyi Biotec) con anticuerpos marcados con perla magnéticas siguiendo el protocolo del fabricante. Los PBMCs se marcaron con el correspondiente cóctel de anticuerpos y se incubaron por 20 minutos a 4°C, se lavaron y las células se resuspendieron en solución de separación (RPMI + EDTA 0,5 mM + SFB al 1%), se pasaron a través de una columna humedecida (tipo-MS Miltenyi Biotec). Las células seleccionadas positivamente se lavaron dos veces y la pureza se verificó por citometría de flujo lo cual reveló en promedio un porcentaje de pureza mayor al 95%.

En ciertos experimentos se requirió, la purificación simultánea de LT-CD4+, LT-CD8+ y monocitos (células CD14+) a partir de una muestra de PBMCs crio-preservados los cuales luego de ser descongelados fueron marcaron con anticuerpos fluoro-marcados específicos para las moléculas CD3, CD4, CD8 y CD14. Posterior a la incubación con anticuerpos por un periodo de 20 minutos a 4°C y dos lavados con medio AIM-V cada una de estas poblaciones celulares fueron purificadas utilizando un equipo FACS Aria II (BD) mediante la técnica de “cell sorting”. La pureza de cada población fue >90%.

Reacción mixta de leucocitos (MLR)

2d-stDCs maduras fueron co-cultivadas en fosos de cajas de 96 pozos fondo redondo (BD) en 200 µL de medio AIM-V + Suero AB Humano 10% con LT-CD4+ singenéticos o alogénicos purificados por selección positiva (separación por columnas - Miltenyi Biotec) que habían sido previamente marcados con 2 µM de CFSE. Como control positivo de proliferación, se colocaron 2d-stDCs + LT-CD4+ singenéticos + Fitohemaglutinina M (PHA-M - SIGMA) 2% v/v. Al cabo de 5 días, las células fueron recolectadas y marcadas con anti-CD4-PE y anti-CD69 APC-Cy7 (BD) y la expresión de estos marcadores en la población de linfocitos seleccionada con base en los parámetros SSC-A vs. FSC-A fue analizada por CF. El grado de proliferación se determinó como el porcentaje de LT-CD4+ obtenidos de cada donador que experimentó pérdida en la fluorescencia del CFSE en cultivos individuales en respuesta a su estimulación con 2d-stDCs maduras alogénicas obtenidas de al menos tres individuos distintos. El grado de proliferación obtenido fue comparado con el porcentaje de proliferación de células en el cultivo control negativo (2d-stDCs maduras + LT-CD4+ del mismo individuo). Adicionalmente a la evaluación de la proliferación en los sobrenadantes de cada cultivo se cuantificó la liberación de IFN- γ mediante la técnica de ELISA.

Evaluación de la capacidad de 2d-DCs para estimular LT-CD4+ específicos de antígeno utilizando toxoide tetánico (TT) como antígeno modelo

Ocho horas antes de adicionar el coctel de citoquinas pro-inflamatorias para inducir su maduración, 2d-stDCs fueron pulsadas con 10 µg/mL de TT. Luego de 24 horas de maduración con el coctel, las DCs fueron co-cultivadas en 200µL de medio AIM-V + Suero AB Humano (10%) en pozos de cajas de 96 pozos fondo redondo con LT-CD4+ (singénicos) – que habían sido marcados previamente con CFSE (2µM) – los cuales fueron obtenidos de individuos sanos que recibieron 15 días antes una dosis de refuerzo de TT [109]. Las células se recolectaron en el día 5, se marcaron con anti-CD4 PE-Texas Red y anti-CD69 APC-Cy7 para ser analizadas por CF. Un resultado positivo se determinó como el porcentaje de LT-CD4+ que proliferaron (pérdida en la fluorescencia del CFSE) en respuesta a su estimulación con 2d-stDCs pulsadas con TT, este porcentaje fue comparado con el grado de proliferación alcanzado en el cultivo control negativo (2d-stDCs maduras sin pulsar con TT + LT-CD4+ autólogos). Como control positivo de proliferación, se cultivaron 2d-stDCs + LT-CD4+ + 2% v/v PHA-M (SIGMA).

Expansión in vitro de LT-CD8 específicos de antígenos asociados a tumor TAAs en donantes sanas

2d-stDCs maduras de individuos sanos HLA-A*02:01 positivo fueron pulsadas con cada uno de los TAAs-A2: Melan-A, NY-ESO-1 (Ver Tabla 7) utilizados a una concentración 10µM por 2 a 4 horas a 37°C en atmosfera de CO₂ al 5% en cajas de 96 pozos fondo plano (BD) en medio AIM-V + Suero AB Humano 10% (Gibco). Los cultivos de 2d-stDCs pulsadas con péptido fueron co-cultivadas con LT-CD8+ autólogos purificados. Al cabo de dos días, se adicionaron al cultivo IL-2 (300UI/mL) e IL-7 (10ng/mL) recombinantes humanas (R&D Systems). Diez días después, los LT-CD8+ fueron re-estimulados con 2d-stDCs maduras del mismo individuo pulsadas con el péptido correspondiente (10µM) y después de 72 horas, los LT-CD8+ fueron cosechados, marcados con anti-CD8 Alexa 750 APC (Caltag Lab), tetrámero control (Dako Cytomation), o específicos para Melan-A₂₆₋₃₅ PE (Dako Cytomation) o para NY-ESO1₁₅₇₋₁₆₅ PE (Proimmune) y se analizaron por CF con el fin de determinar grado de expansión de poblaciones de LT-CD8+ tetrámero positivos.

Medición de CD107a y CD107b en superficie como medida de la actividad citolítica de LT-CD8+ anti-TAAs

Al cabo de diez días, LT CD8+ específicos de TAAs-A2 (HER-2/neu, NY-ESO 1, telomerasa y Melan-A), generados de manera individual como se explicó en el párrafo anterior fueron utilizadas como células efectoras en co-cultivo con 2d-stDCs maduras sin pulsar (control

negativo) o pulsadas con péptido Melan A, péptido de *L. major* (control negativo) o con un pool de los cuatro péptidos y utilizadas como células blanco en una relación efector blanco 10:1 en un volumen de cultivo final de 200 μ L en medio AIM-V en tubos de citometría. Con el propósito de inhibir el transporte de las glicoproteínas de membrana y de las proteínas de secreción a partir del aparato de Golgi, se adicionó 1 μ L de monensina (GolgiStop – BD) a cada tubo; adicionalmente, se agregaron 5 μ L de anti-CD107a PE solo o en combinación con 5 μ L de anti-CD107b FITC (BD) a cada tubo. Los cultivos se incubaron durante 5 horas a 37°C en atmosfera al 5% de CO₂. Después de centrifugación, los conjugados celulares fueron disgregados y los detritus fueron removidos mediante lavados con PBS + EDTA 0.5mM como se describe en [110]. Finalmente, las células fueron teñidas con anti-CD8 PerCP durante 20 minutos a 4°C; luego de lavado el pellet este fue re-suspendido en paraformaldehído al 1% en PBS y las células analizadas por CF. El análisis se realizó en células CD8+ localizadas en la región de linfocitos delimitada por complejidad utilizando los parámetros FSC-A y SSC-A en un citómetro FACS-Aria II.

Análisis de LT-CD8+ multifuncionales productores de IFN- γ , TNF- α e IL-2 específicos de TAAs

A partir PBMCs obtenidos de donantes sanas HLA*A-02:01 positivos fueron estimulados *in vitro* como se mencionó en el párrafo anterior con un pool de cuatro péptidos Her2/neu₃₆₉, NY-ESO 1, telomerasa y Melan-A (ver Tabla 7) por un periodo de diez días, se caracterizó por CF la producción de tres citoquinas (IFN- γ , TNF- α e IL-2) a nivel intracelular. Los cultivos de LT-CD8+ purificados previamente estimulados por diez días, fueron re-estimulados con 2d-stDCs pulsadas con el pool de péptidos o sin pulsar (control negativo) durante 20 horas, seis horas antes se adicionó brefeldina A (10 μ g/mL). Las células fueron recolectadas y marcadas con anti-CD8-PE Texas Red por 20 minutos a 4°C en oscuridad. Posteriormente se procedió a la marcación intracelular empleando el Kit CytoFix/CytoPerm (BD). Brevemente se lavan las células con solución de lavado 1X (Perm Wash) una vez resuspendidas se incuban con solución de permeabilización (200 μ L/tubo) por 20 minutos a temperatura ambiente en oscuridad. Posterior a un nuevo lavado se marcan con la mezcla de anticuerpos fluoromarcados contra IFN- γ PE, TNF- α APC e IL-2 PerCP y se incuban por 30 minutos a 4°C en oscuridad. Finalmente se lavan las células con solución de lavado y se adquieren los datos en el citómetro de flujo FACS Aria II (BD). Los datos obtenidos se analizaron por FlowJo (Tree Star) y se determinaron la frecuencia de LT-CD8+ que producían una, dos o tres citoquinas.

Análisis del fenotipo de sub-poblaciones de LT-CD4+ en respuesta a la estimulación con DCs pulsadas con antígeno

PBMCs fueron obtenidos de dos tipos de individuos: (i) donantes sanas (HD, del inglés healthy donors) o (ii) individuos con infección latente por *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb) (LTBI del inglés Latent tuberculosis infection). El estatus de HD vs. LTBI fue establecido midiendo niveles de IFN- γ producidos por LT-CD4+ en respuesta a su estimulación *in vitro* por 16 horas con una serie de péptidos exclusivos de Mtb y los cuales fueron medidos utilizando la prueba comercial conocida como QuantiFERON TB Gold en tubo [111, 112] cuyo resultado positivo depende de la presencia en sangre de poblaciones de LT-CD4+ de memoria específicos para estos péptidos. Con el fin de comparar la capacidad de dos tipos de DCs (2d-aDCs y 2d-stDCs) maduras y pulsadas con antígenos de Mtb de activar LT-CD4+ de memoria y de tratar establecer el fenotipo de la sub-población de LT-CD4+ de memoria responsable de la producción de IFN- γ en individuos LTBI, dos tipos de 2d-DCs (2d-aDCs y 2d-stDCs) fueron utilizadas como APCs tanto frescas como descongeladas (luego de crio-preservación en nitrógeno líquido), para presentar antígenos de las proteínas ESAT-6 (2 péptidos) y CFP-10 (4 péptidos) codificados en las regiones de diferenciación (RD) 1 y 11 (respectivamente) y un péptido (p4) de la proteína TB7.7 (Tabla 10). representativos de los antígenos de la prueba de QuantiFERON TB Gold, a LT-CD4+ de individuos HD y LTBI. Posterior al pulso con los péptidos las DCs pulsadas y maduras se co-cultivaron en una proporción 20:1 (LT:DCs) en 200 μ L de medio AIM-V con LT-CD4+ autólogos purificados mediante separación magnética (Milteny Biotech) de sangre periférica de estos individuos. Posterior a 6 días de cultivo se recolectaron los sobrenadantes con el fin de evaluar por CBA (BD) la concentración de una serie de citoquinas Th1/Th2 y se determinó por CF dentro de sub-poblaciones de LT-CD4+ definidas mediante la marcación de las células con anticuerpos fluoromarcados contra CD3-PE Cy7, CD4-PB, CD45RA-PE Cy5, CCR7-FITC y CD95-APC, seguida de la marcación intracelular con un anticuerpo anti-IFN- γ -PE como se describió anteriormente.

Fluorescencia menos uno

Para optimizar la muestra de 20 mL de sangre de cada paciente, y con el fin de analizar múltiples parámetros necesarios para cuantificar poblaciones celulares con inmunofenotipos definidos por 12 parámetros distintos, fue necesario estandarizar el proceso de procesamiento y análisis por citometría de flujo de las células luego de ser marcadas con paneles de anticuerpos marcados con fluorocromos que utilizaron hasta 12 canales de

fluorescencia en un equipo FACS Aria II. La especificidad de marcación de cada fluorocromo se hizo mediante la técnica de Fluorescencia Menos Uno (FMO, por sus siglas en inglés, Fluorescence Minus One). Este control se hizo con el fin de corregir la fluorescencia no específica que se introduce en cada canal analizado la cual es emitida por cada uno de los demás fluorocromos que hacen parte de la mezcla. De esta manera se determina para cada anticuerpo entre la muestra sin marcar (blanco) y el control positivo de tinción para cada canal el punto de corte con el fin de establecer la magnitud de la fluorescencia de la señal positiva de cada fluorocromo. En la Figura 2 se muestra (en los recuadros rojos), el resultado luego de que de cada uno de los canales de fluorescencia se sustrajo la fluorescencia no específica emitida por los otros fluorocromos presentes en la mezcla. Esto permite discriminar entre una señal negativa y una positiva emitida por cada anticuerpo fluoromarcado con el que se tiñe la muestra.

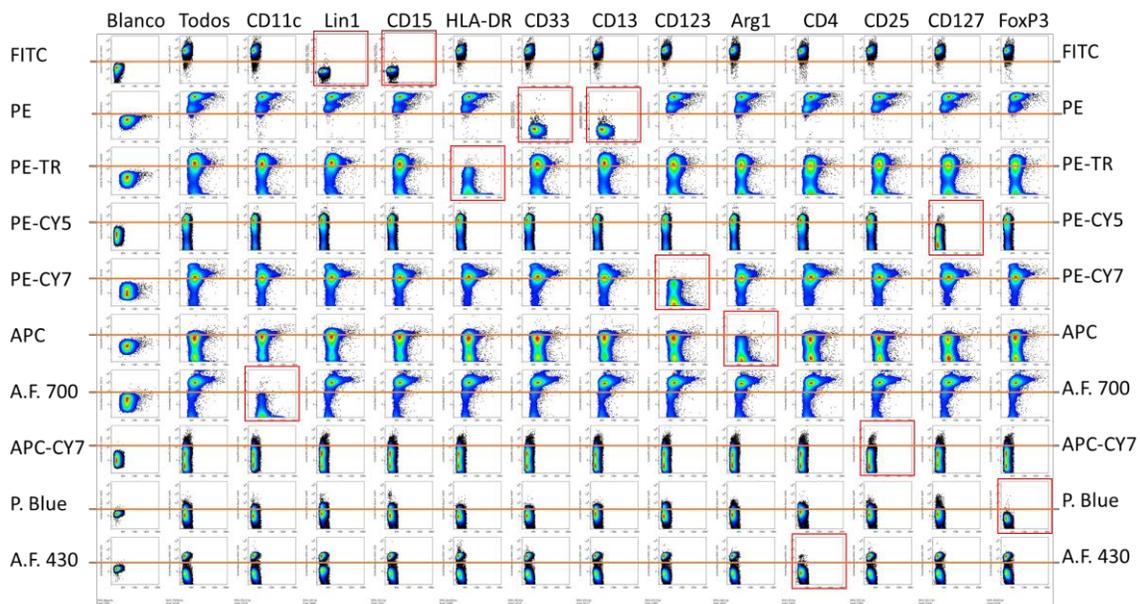


Figura 2. Fluorescencia Menos Uno (FMO) de un panel de anticuerpos utilizado para el análisis de PBMCs teñidos ex vivo. Esquema de control de FMO realizado con el fin de controlar la especificidad de la marcación de las células con 10 anticuerpos diferentes que hacen parte del coctel de anticuerpo de marcaje. Se observa que a pesar de que los anticuerpos de la mezcla están marcados con una gama de fluorocromos distintos, cada fluorocromo que hace parte de la mezcla tiñe las células de manera altamente específica sin que los demás fluorocromos interfieran con el patrón de marcación de cada fluorocromo.

Como se muestra en la Figura 2, la presencia de los fluorocromos empleados no afecta la señal determinada en las muestras en cada uno de los respectivos marcadores no empleados, lo que confirma que la combinación de anticuerpos es adecuada y el solapamiento

de las fluorescencias es bajo permitiendo así determinar la especificidad de la tinción de las poblaciones a ser analizadas en los diferentes ensayos.

Análisis de la expansión de sub-poblaciones de linfocitos T foliculares (Tfh) presentes en sangre periférica

Una característica poco estudiada de las aDCs es la capacidad de estimular Tfh gracias a la producción de IL-12 [113]. Esta posibilidad fue explorada *in vitro* estimulando PBMCs con 2d-aDCs como fuente de IL-12p70 en combinación con el estímulo del TCR. Para la caracterización por CF de diferentes sub-poblaciones de Tfh circulantes en PBMCs de donantes sanas, se estableció un coctel de anticuerpos basado en trabajos recientes donde se describen varias sub-poblaciones de Tfh (Tfh1, Tfh2, Tfh17) mediante la expresión de CCR6 y CXCR3 en linfocitos T CD4+ CXCR5+ y poder establecer su estado de activación o de memoria mediante la expresión de marcadores como PD1 y CCR7 [114]. El nivel basal de las diferentes sub-poblaciones de Tfh se estableció cuantificando en PBMCs de donantes sanas marcados *ex vivo* con el siguiente coctel de anticuerpos: CD4 FITC, CXCR5 PE Cy7, PD1 APC, CCR6 PE, CCR7 Alexa Fluor 430 y CXCR3 Pacific Blue, estableciendo el fenotipo de las sub-poblaciones de la siguiente forma: Tfh1 CXCR3+ CCR6-; Tfh17 CXCR3- CCR6+ y Tfh2 CXCR3- CCR6-. Para la evaluación de la expansión y activación *in vitro* se comparó entre los dos tipos de 2d-DCs derivadas *in situ* en presencia de perlas acopladas a anti-CD3/CD28/CD2 con el fin de analizar el grado de expansión y activación de las Tfh mediante la siguiente combinación de los siguientes anticuerpos: CD4 BV510, CXCR5 PE-Cy7, PD1 APC, ICOS PE, CD45RA APC-Cy7, CCR7-FITC e IL-21-PE Cy5.

Evaluación y caracterización del repertorio de LT vírgenes y de memoria específicos de antígeno

La expansión *in vitro* del repertorio de LT se puede abordar mediante dos aproximaciones: (i) el análisis del repertorio de células vírgenes como fuente de células para montar una respuesta inmune, (ii) el repertorio de células de memoria contra antígenos específicos de tumor. En pacientes con cáncer, el problema puede estar a nivel de las células vírgenes que no son capaces de diferenciarse a células de memoria posiblemente por una falla en la activación mediada por DCs, o en las células T de memoria existentes que pueden estar en un estado de agotamiento o anergia inducido por el microambiente tumoral.

Posterior a la evaluación de diferentes metodologías útiles para estimar el repertorio mediante sistemas como el uso de células irradiadas y dilución de pocos LT en platos con

el fin de expandir y cuantificar las células específicas [115], no fue posible reproducir los resultados mostrados por los diferentes grupos (datos no mostrados). Por lo anterior, la caracterización de linfocitos T específicos de antígeno se evaluó mediante citometría de flujo en células de sangre periférica provenientes de personas sanas como de pacientes con cáncer en dos condiciones *in vitro*, basados principalmente en las metodologías descritas por Martinuzzi [58] y Moser [59] resumidas en la Figura 3. Estas metodologías son empleadas para la evaluación del repertorio de LT a un antígeno específico, sin embargo, ambas condiciones de cultivo fueron ajustadas para el uso de 2d-aDCs y 2d-stDCs. La primera metodología (Figura 3A) consiste en inducir la diferenciación y maduración de DCs en PBMCs en condiciones de cultivo de alta densidad [57] con la adición de péptidos (concentración de cada péptido 5µM) para así determinar de una manera rápida la expansión de LT de memoria a los antígenos evaluados; la segunda metodología consiste en la amplificación de LT vírgenes previamente purificados y estimulados por un periodo de 14 días con DCs purificadas y pulsadas con los respectivos péptidos sin adición de citoquinas y un re-estimulo con DCs por 6 días adicionales. Finalmente, las células obtenidas en ambos sistemas de cultivo fueron recolectadas para ser analizadas por CF con el fin de determinar la especificidad de la estimulación mediante la tinción con tetrámeros HLA-A*02:01 acoplados a péptidos tumorales y virales (ver adelante) en pacientes que expresen dicho alelo. Adicional a la marcación con tetrámeros, las células se marcaron con el siguiente coctel de anticuerpos: CD8 PE-Texas Red, CD4 BV510, CCR7 FITC, CD45RO PE-Cy5, CD95 APC.

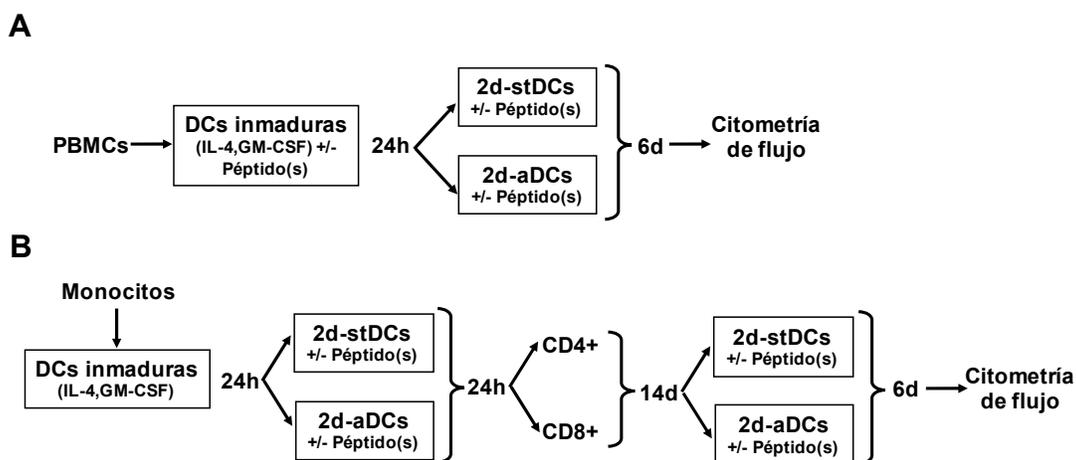


Figura 3. Diagrama de flujo de la metodología de cultivo *in vitro* de LT. (A) Esquema de estimulación de células mononucleares con el uso de DCs y péptidos para la evaluación de LT de memoria basado en [58]. (B) Esquema de cultivo empleando DCs derivadas de monocitos en co-cultivo con LT CD4 o CD8 vírgenes y un re-estimulo a los 14 días con el fin de evaluar el repertorio virgen, basado en [59].

Marcación de LT-CD8+ con tetrámeros específicos para antígenos tumorales y virales

Los tetrámeros HLA-A*02:01 biotinados fueron sintetizados por el Dr. Carlos Parra en el Laboratorio del profesor Lawrence Stern de la Facultad de Medicina de la Universidad de Massachusetts. Los tetrámeros se marcaron con estreptavidina-PE o estreptavidina Alexa fluor 700 (Invitrogen) a una relación molar 4:1 en un proceso de marcación escalonada (tres incubaciones del tetrámero con la estreptavidina) antes del uso. Para el proceso de tinción con tetrámero, posterior a la estimulación correspondiente de las células, los LT CD8+ se marcaron con 2µg/mL de los tetrámeros correspondientes al empleado *in vitro* para pulsar las DCs antígenos TAAs o virales de Influenza (FLU), citomegalovirus (CMV) y Epstein-Barr virus (EBV) como control (Anexo 4. Lista de péptidos y tetrámeros empleados). La marcación con tetrámeros se realizó durante 2h a 37°C, seguido por la adición del correspondiente coctel de anticuerpos para marcadores de superficie explicados anteriormente para la determinación de las sub-poblaciones de LT (vírgenes, memoria y efectoras) tanto en LT-CD8+ totales como en LT-CD8+ específicos de antígenos (tetrámero positivo). Como control de la marcación con tetrámero se empleó un tetrámero “scramble” con una secuencia no relacionada o con la marcación con solo estreptavidina. En la Figura 19, los LT CD8+ se marcaron con el dextrámero HER2/neu₃₆₉₋₃₇₇ APC amablemente donado por Immudex (Copenhague - Dinamarca).

Medición del repertorio de LT-CD8+ específicos para Her2/neu₃₆₉ circulantes e infiltrantes de tumor

Para comparar las 24 familias del repertorio Vβ de TCR en células T CD8+ positivas y negativas de tetrámero, las PBMCs *ex vivo* se tiñeron con tetrámero HLA-A*02:01 de HER2/neu₃₆₉₋₃₇₇ biotinado y marcado con estreptavidina acoplado a Alexa fluor 700 como se describió anteriormente en 8 tubos diferentes, seguido por la marcación de 24 familias de TCR Vβ (Beckman Coulter) separados en 8 cocteles (identificación de 3 familias por cada tubo) y finalmente marcación con anti-CD8 PE-Texas Red (eBiosciences, San Diego, Estados Unidos). Se adquirió un mínimo de 5x10⁴ células T CD8+ y se analizó el porcentaje de cada familia en células T CD8 + específicas de HER2/neu con el software FlowJo (Treestar).

Para las secuencias de CDR3, se usaron 2×10^7 PBMCs obtenidas antes y después de anti-TTx para obtener ADN genómico usando el Kit de Purificación de ADN Genómico Wizard® (Promega Corp.) siguiendo el protocolo del fabricante. Para la secuenciación CDR3 de TILs, se obtuvieron dos cortes del tejido tumoral de la mastectomía (3 μm de espesor cada uno) de la resección tumoral por cirugía del paciente MCC-002 fijado en formalina y embebida en parafina (FFPE de sus siglas en inglés Formalin-Fixed-Paraffin-Embedded). La muestra de FFPE y el ADN obtenido de las dos muestras de PBMCs (antes y posterior a la terapia antitumoral) fueron enviadas a la empresa Adaptive Biotechnologies quienes ofrecen el servicio denominado ImmunoSEQ para la secuenciación del CDR3 como se describe en Robins y cols. [116, 117]. Los datos obtenidos a partir de la secuenciación fueron analizados para determinar el número de copias de cada CDR3 de las cadenas β en la región variable (V) organizado por familias y genes. Un resumen de estos datos se encuentra en el Anexo 5. Caracterización de $V\beta$ por citometría de flujo y por secuenciación del CDR3.

Evaluación de la funcionalidad del compartimiento de LT

Para la determinación del grado de respuesta de LT se estimularon 5×10^6 PBMCs/mL por 24 horas con una mezcla de perlas acopladas a anticuerpos contra CD3, CD28 y CD2 (Miltenyi Biotec) en una proporción 2:1 (PBMCs:perlas) cultivadas en medio AIM-V (Thermo Fisher Scientific). Posterior a la estimulación se evaluó la internalización del TCR cuantificado por la disminución de la intensidad de fluorescencia media (MFI - del inglés Mean Fluorescence Intensity) del CD3. Simultáneamente se determinó en LT (CD3+) la expresión de CD69. A partir de los sobrenadantes de los cultivos posterior a la estimulación se cuantificó por CBA (BD) la secreción de citoquinas Th1/Th2.

Resultados

Caracterización fenotípica y funcional de células dendríticas estándar obtenidas de monocitos en dos días.

En busca de producción más rápida de DCs competentes para el estudio de la respuesta de LT a antígenos tumorales nosotros implementamos la obtención de DCs a partir de monocitos en dos días. El proceso de generación en dos días de estas células fue estandarizado utilizando monocitos purificados por adherencia o selección negativa. Como se muestra en la Figura 4, inicialmente se comparó por microscopía (panel A) y por citometría de flujo utilizando los parámetros tamaño y complejidad (SSC-A vs FSC-A) (Panel B), la morfología de DCs estándar maduras obtenidas en 2 días (2d-stDCs) y en 7

días (7d-stDCs), estas últimas utilizadas como control. Como se observa en la figura 6B, las 7d-stDCs se caracterizan por tener una mayor complejidad y tamaño comparadas con los monocitos o con 2d-stDCs (ver morfología de 2d-stDCs y 7d-stDCs en la figura 7) [56].

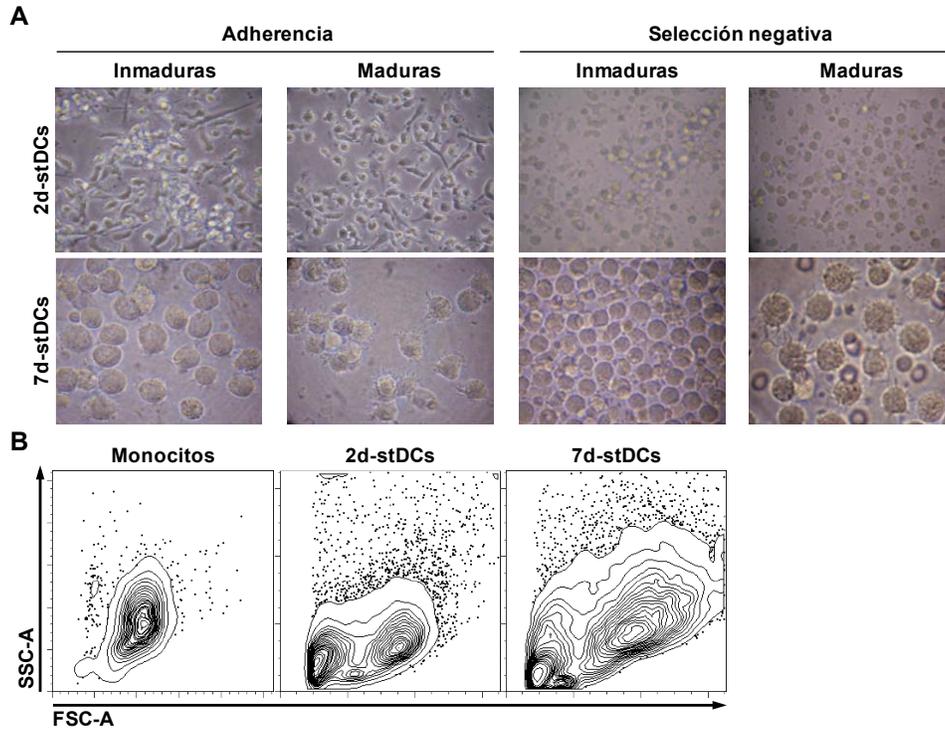


Figura 4. Morfología de DCs estándar generadas en dos y siete días a partir de monocitos purificados por adherencia o selección negativa. (A) Fotografías de DCs maduras e inmaduras obtenidas de monocitos purificados por adherencia o selección negativa y que fueron generadas luego de dos y siete días en cultivo. (B) Gráficas de contornos utilizadas para analizar por citometría de flujo el tamaño y la complejidad (SSC-A vs FSC-A) de monocitos y DCs derivadas in vitro en dos y siete días de cultivo a partir de monocitos purificados como se describe en Materiales y Métodos.

DCs estándar generadas de monocitos en dos días (2d-stDCs) tienen un inmuno-fenotipo similar al de DCs estándar generadas en siete días (7d-stDCs)

El incremento en la expresión de CD83, CCR7, CD80 y HLA-DR asociado a la disminución de la expresión de DC-SIGN (CD209) y CD14 es característico de una adecuada maduración de DCs obtenidas de monocitos en siete días. Este patrón de expresión de marcadores fue empleado como referencia para evaluar en 2d-stDCs la respuesta al estímulo de maduración. En la Figura 5 se presenta el patrón de expresión de estos marcadores en células dendríticas inmaduras (iDCs), 2d-stDCs y 7d-stDCs. Estos resultados muestran un claro incremento de la expresión de CD83, CCR7, CD80, HLA-DR

y una disminución de CD209 en 2d-stDCs en un patrón de expresión muy similar al observado en 7d-stDCs a comparación con iDCs.

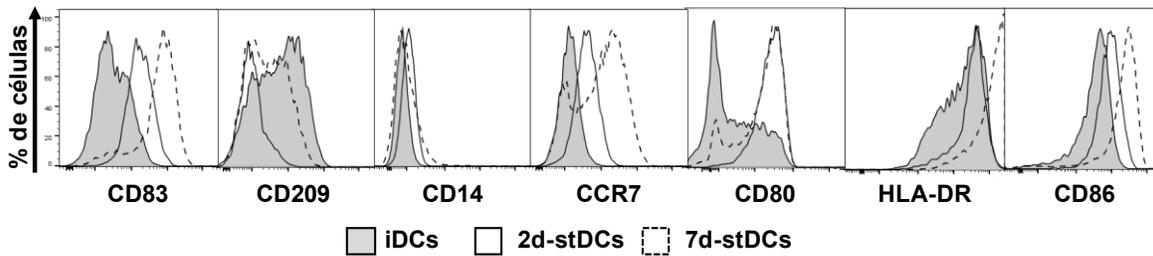


Figura 5. Inmuno-fenotipo de maduración de DCs estándar obtenidas en siete días vs. dos días evaluado por citometría de flujo. Histogramas en que se muestra el patrón de expresión de los marcadores: CD83, CD209, CD14, CCR7, CD80, HLA-DR y CD86 en DCs inmaduras (histograma gris); DCs maduras obtenidas en 2 días (2d-stDCs) (histogramas vacíos) y 7 días (7d-stDCs) (histogramas punteados).

El fenotipo de superficie de DC maduras en este estudio comprendió la expresión diferencial de moléculas de co-estimulación (CD83, CD80, CD86), MHC (HLA-DR), receptores de quemoquinas (CCR7) y una lectina (CD209) cuya expresión es modulada de manera diferente lo cual genera variabilidad en las mediciones y hace difícil comparar entre estudios la influencia que en la maduración tiene la variable tiempo de duración del cultivo (dos vs. siete días). Con el fin de indagar en esto, se realizó un análisis multivariado del grado de co-expresión de dos o más parámetros de maduración en 2d-stDC y 7d-stDC. Inicialmente, se comparó el fenotipo entre iDCs y 7d-stDCs con el fin de analizar combinaciones de marcadores cuya expresión fuese significativamente diferente entre iDCs y 7d-stDCs. Este análisis mostró en particular que, las combinaciones de tres parámetros que incluye la expresión de CD80 y HLA-DR junto con la disminución de CD209; o combinaciones de dos parámetros: CCR7 y CD83 o CD83 y CD86, mostraron las diferencias más significativas (Figura 6A). El mismo análisis también se hizo con 2d-stDCs. En este caso, la mayoría de las combinaciones de marcadores incluyendo dos o cuatro marcadores medidos simultáneamente mostraron diferencias significativas entre iDCs y 2d-stDCs (Figura 6B). Por último, cuando se comparó el patrón de co-expresión de dos o más marcadores entre 2d-stDCs y 7d-stDCs, se evidenció que la expresión combinada de la mayoría marcadores (excepto el fenotipo CD80+/CD209-) no fue estadísticamente diferente entre estos dos tipos de DC al igual que con el análisis individual [56]. En conjunto estos resultados permiten concluir que el tiempo no es un factor que afecte la maduración de DC estándar derivadas de monocitos en dos o siete días ya que ellas exhiben un fenotipo de maduración muy similar (Figura 6C).

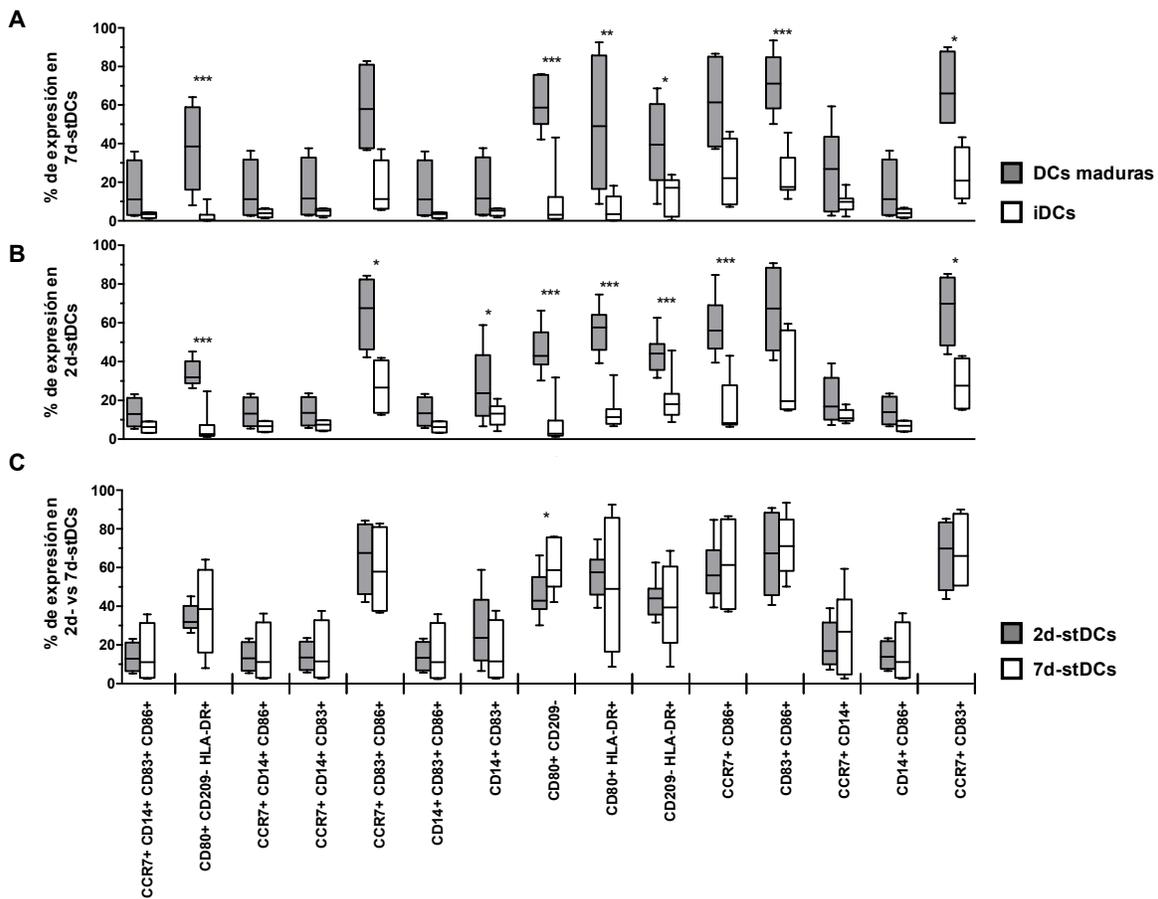


Figura 6. Evaluación multiparamétrica del patrón de expresión de marcadores de maduración en DCs estándar obtenidas en siete y dos días. Análisis booleano en el que se compara la expresión de marcadores de maduración en DCs maduras e inmaduras (cajas grises vs blancas, respectivamente) en 7d-stDCs (A) y 2d-stDCs (B), el cual fue seguido del análisis comparativo de la expresión de los marcadores en DCs maduras obtenidas en 2d-stDCs y 7d-stDCs (cajas grises vs blancas, respectivamente) (C). (n=36) análisis no paramétrico con test de Mann-Whitney, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

2d-stDC inducen eficientemente la activación y proliferación de células T CD4+ y CD8+ específicas de antígeno en individuos sanos

Una vez confirmado el fenotipo de maduración de 2d-stDCs se evaluó su desempeño como APCs para inducir respuesta antígeno específica en LT. Para evaluar esto, 2d-stDCs de individuos sanos que recibieron un refuerzo de toxoide tetánico (TT) dos semanas antes, fueron pulsadas con TT recombinante y co-cultivadas con LT CD4+ purificados autólogos marcados con CFSE. Luego de seis días de co-cultivo la proliferación y expresión de CD69 por LT fueron medidas por CF y la producción de IFN- γ fue cuantificada en sobrenadantes de cultivo por ELISA. Los resultados que se presentan en la Figura 7, muestran que 2d-

stDC indujeron la proliferación de LT CD4+ específicos para TT. En la Figura 8 se muestra que el 50% de las células T proliferan en respuesta al estímulo en comparación con los 2d-stDC no pulsadas con TT. Como control positivo se muestra que las 2d-stDC pulsadas con PHA-M activaron eficientemente las células CD4+ (92,9% en la proliferación celular). Mientras un ligero aumento en la expresión de CD69 en células T CD4+ estimuladas por 2d-stDC pulsadas con TT fue observado con respecto al inducido por 2d-stDC no pulsadas con TT (control negativo) (13,4 vs. 8,29% respectivamente), un mayor aumento en la expresión de CD69 (43,5%) fue observado cuando las células CD4+ fueron estimuladas con PHA-M. Por su parte, las células T CD4+ específicas de TT produjeron más IFN- γ comparado con el cultivo control (93 y 10 pg/mL, respectivamente, Figura 7A). Las células T CD4+ estimuladas con 2d-stDCs pulsadas con PHA-M mostraron una producción de IFN- γ quinientas veces mayor que el control (5400 pg/mL, Figura 7A). Estos resultados demuestran la capacidad de 2d-stDC para activar e inducir la proliferación de células T CD4+ específicas de antígeno.

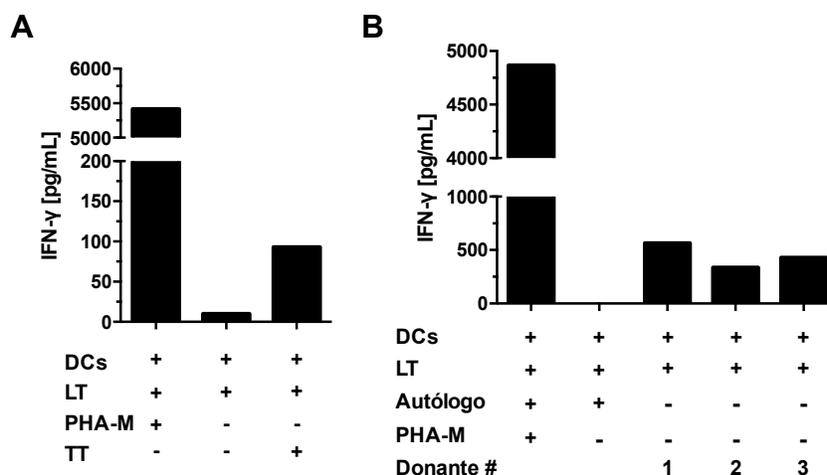


Figura 7. Producción de IFN- γ después de la estimulación de LT CD4+ con 2d-stDCs. La producción de IFN- γ se determinó mediante ELISA a partir de sobrenadantes de los cultivos después de 40 horas de cultivo celular *in vitro*. (A) El cultivo de LT CD4+ estimuladas con 2d-stDCs solas o pulsadas con PHA-M (5 μ M) o con TT (10 μ g/mL). (B) Reacción Mixta de Leucocitos (MLR) con 2d-stDCs en co-cultivo con LT CD4+ purificados a partir de muestras de sangre de 3 individuos sanos diferentes (donante # 1 a 3). Como control positivo se co-cultivaron LT CD4+ autólogas estimuladas con PHA-L (5 μ M) o sin PHA-M como control negativo.

Del mismo modo, además del ensayo con células T específicas para TT, se evaluó la capacidad de 2d-stDCs en una reacción mixta de leucocitos (MLR) de inducir la proliferación y expresión de CD69 en células T CD4+ T alogénicas en un ensayo en el que se utilizaron 2d-stDC co-cultivadas con células T CD4+ singénicas (control negativo) y alogénicas

(MLR1, MLR2 y MLR3 Figura 8) marcadas con CFSE previamente al cultivo. Como se muestra en la Figura 8B, alrededor del 30% de las células T CD4+ alogénicas proliferaron en respuesta a la estimulación en comparación con el cultivo control de células singenéticas que mostró sólo un 0,7% de proliferación. De igual forma, el porcentaje de células CD69 positivas fue mayor en los cultivos alogénicos (6%-9%), en comparación con 2,7% observado en el cultivo de control (Figura 8B). En los co-cultivos de 2d-stDCs con células T CD4+ alogénicas se detectó una cantidad substancialmente mayor de IFN- γ (566, 338 y 430 pg/mL de esta citoquina) en cada uno de los individuos sometidos a prueba) (Figura 7B) comparado con cantidades indetectables de esta citoquina producida por células T CD4+ autólogas. En conjunto, los resultados de la proliferación, la expresión de marcadores de activación y la secreción de citoquinas en las células estimuladas con 2d-stDC nos permiten argumentar en favor de una alta capacidad de estas células para estimular las células T CD4+.

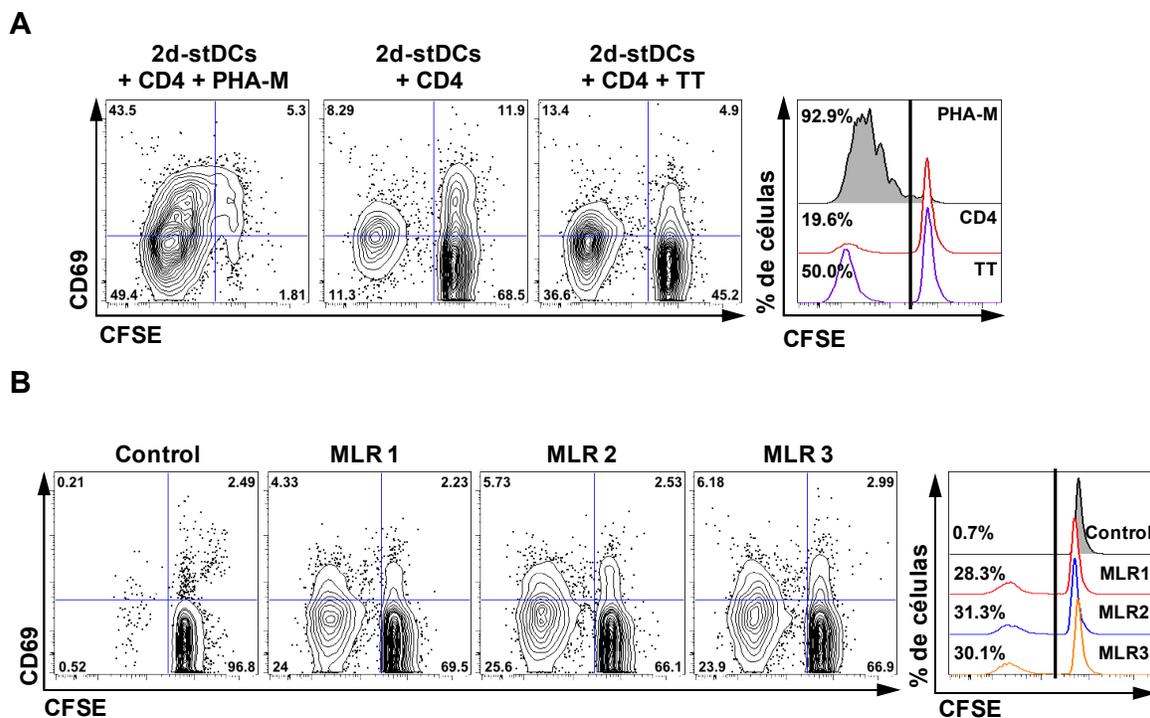


Figura 8. Actividad linfo-proliferativa de LT CD4+ en respuesta a 2d-stDCs pulsadas con Toxide Tetánico (TT) y PHA-M. (A) Diagramas de contornos en que se evalúa la proliferación y activación de células T CD4+ purificadas de un individuo que había recibió una dosis de refuerzo de TT dos semanas antes; que fueron marcadas con CFSE y cultivadas con 2d-stDCs pulsadas con PHA-M (control positivo); con 2d-stDCs (control negativo) y con 2d-stDCs pulsadas con TT (analito). Luego de seis días las células fueron cosechadas y marcadas con CD69 previo a su procesamiento por CF. Los números corresponden a porcentajes que reflejan la distribución diferencial de células marcadas con CFSE, CD69 en cada cuadrante luego de seis días del cultivo. El histograma de la derecha registra la pérdida de la fluorescencia de linfocitos T CD4+ marcados con CFSE como consecuencia de su proliferación en respuesta al estímulo en cada cultivo. Los números de la región a la

izquierda corresponden al porcentaje de células que han experimentado uno o más ciclos de división celular. (B) Proliferación de LT CD4+ purificados de tres individuos que fueron marcados con CFSE y co-cultivados por seis días con 2d-stDCs algenéicas en sendos cultivos MLR (MLR1, MLR2 y MLR3), o co-cultivados con 2d-stDCs del mismo individuo (control). Luego de seis días las células fueron cosechadas y marcadas con CD69 previo a su procesamiento por CF. Los números son porcentajes que reflejan la distribución diferencial de células marcadas con CFSE, CD69 en cada cuadrante luego de seis días del cultivo. Los histogramas de la derecha reflejan la pérdida de la fluorescencia del CFSE debido a la proliferación celular de LT CD4+ co-cultivados con 2d-stDCs del mismo individuo (control) o con 2d-stDCs heterólogas (MLR1 a 3). Los números de la región de la izquierda corresponden a los porcentajes de células con uno o más ciclos de división luego de cada cultivo.

En el caso de LT-CD8+, se evaluó la capacidad de 2d-stDC para inducir LT-CD8+ específicos para antígenos asociados a tumores (TAA por sus siglas en inglés Tumor Associated Antigens) en individuos sanos. Para esto, se evaluó la expansión de precursores de LT-CD8+ marcados positivamente con tetrámeros fluorescentes en donantes sanos que expresan el alelo HLA-A*02:01 (determinado por SSP-PCR, Tesis de Maestría de Rosalba Alfonso y datos no mostrados). Para ello, se utilizaron en un primer experimento péptidos TAA cuya presentación es restringida por el alelo HLA-A2 (TAAs-A2) de las proteínas Melan-A y NY-ESO 1 para pulsar 2d-stDC que se co-cultivaron con LT-CD8+ autólogas de individuos sanos HLA-A2 por 10 días en presencia de IL-2 e IL-7. Después de 10 días de cultivo, los LT fueron re-estimuladas con 2d-stDC pulsadas con péptido durante 72 horas adicionales y teñidas con tetrámeros para identificar poblaciones de LT-CD8+ específicos para el TAA utilizado como antígeno. Como se muestra en la Figura 9A, los 2d-stDCs pulsados con péptidos Melan-A y NY-ESO1 fueron eficaces en la expansión de LT-CD8+ de individuos sanos específicos contra estos antígenos tumorales (11 y 5,15% respectivamente) comparado con el control (células no estimuladas teñidas con un tetrámero control 0,067%). Posteriormente, se evaluó en tres donantes sanos HLA-A2 la capacidad citotóxica de LT-CD8+ cultivados por 10 días con 2d-stDC pulsadas con el péptido de Melan-A. Para cuantificar la citotoxicidad, luego del re-estímulo los cultivos se incubaron durante 5 horas en presencia de anti-CD107a, CD107b y se analizaron por CF. Como se muestra en la Figura 9B, la respuesta citotóxica (células positivas a CD107a y CD107b) fue mayor en células específicas contra el antígeno de Melan-A (8,36%) en comparación con la observada en cultivos control de LT-CD8+ re-estimulados con 2d-stDCs no pulsadas con péptido (1,22%) o pulsadas con un péptido no relacionado de *L. mayor* (1,31%). Posteriormente, se evaluó la citotoxicidad (CD107a) de LT-CD8+ en respuesta a diferentes TAA-A2 de Her-2/neu, NY-ESO 1, telomerasa y Melan-A en donantes sanos HLA-A2. Este ensayo demostró un aumento en las células CD107a positivas en líneas de LT-CD8+ específicas contra estos péptidos (1,3; 4,4; 1,4 y 2,7%, respectivamente) en

comparación con el cultivo control de LT-CD8+ no estimulado (0,43%) (Figura 9C). Finalmente, la expresión de varias citoquinas intracelulares (IFN- γ , TNF- α e IL-2) en LT-CD8+ después de 20 horas de re-estimulación de LT-CD8+ con 2d-stDC pulsadas o no con un cóctel de los cuatro TAAs A2 (Her-2/neu, NY-ESO1, telomerasa y Melan-A) fue determinada por CF (Figura 9D). En comparación con los LT-CD8+ del cultivo control de 2d-stDCs estimuladas sin péptido (control), las 2d-stDCs estimuladas con el cóctel de péptidos mostraron una expresión de células que producen al menos una citoquina (3,5%) frente a 2,2% en el cultivo control; sin embargo, la frecuencia de LT que producen dos o más citoquinas fue mayor en LT-CD8+ estimuladas con 2d-stDCs pulsadas con péptidos en comparación con el control (Figura 9E), 3,4% vs. 2.2%, respectivamente.

En conjunto los resultados apoyan la idea de que 2d-stDCs tienen la capacidad funcional para estimular eficientemente tanto LT-CD4+ como LT-CD8+.

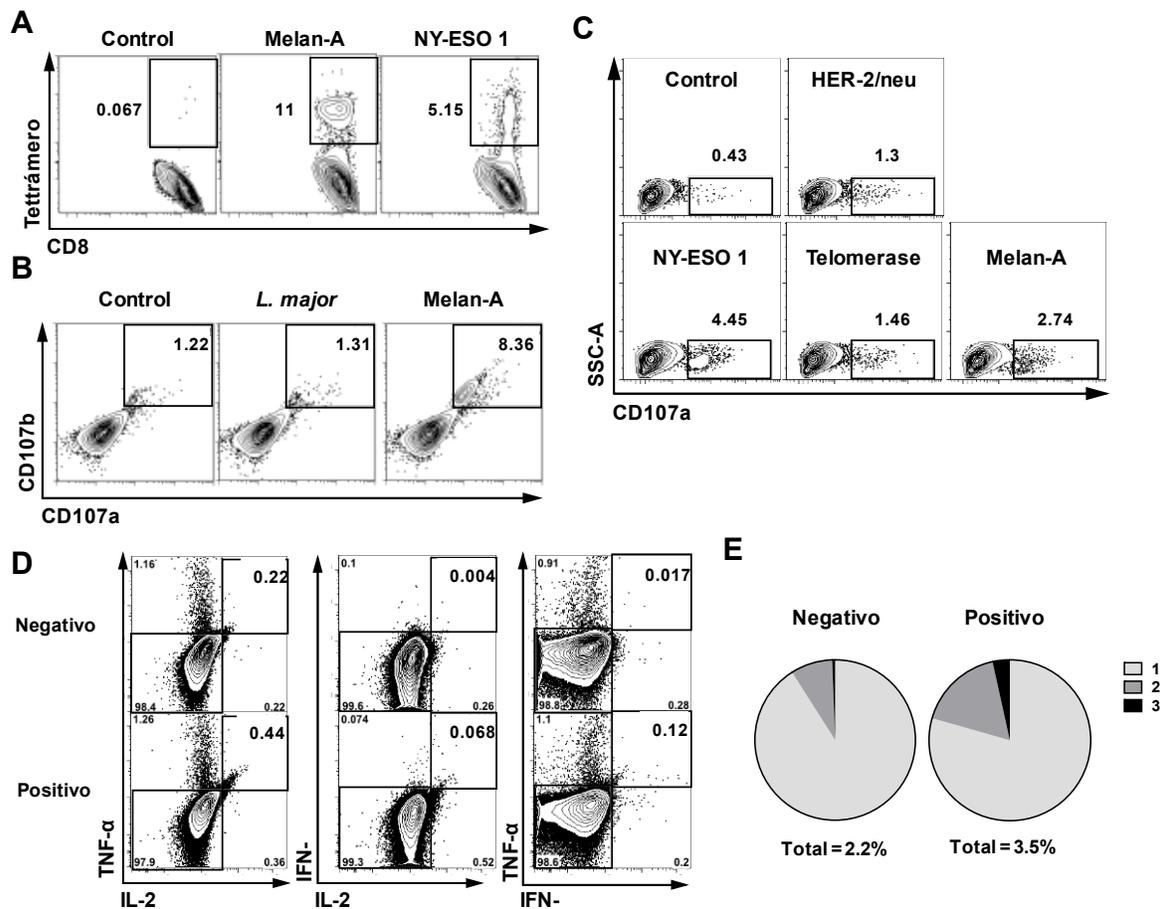


Figura 9. 2d-stDCs promueven el estímulo primario y expansión in vitro de LT CD8+ antitumorales específicos para TAAs en individuos sanos. (A) LT CD8+ purificados de individuos sanos fueron cocultivados con 2d-stDCs autólogas pulsadas sin péptido (control) o con péptidos (TAAs-A2: Melan-A; NY-ESO

1) por 10 días, re-estimulados por 72 horas con 2d-stDCs pulsadas sin o con cada péptido y luego teñidos con anti-CD8 y con tetrámero control (control) o el respectivo tetrámero y analizados por CF. Los porcentajes de LT CD8+ tetrámero positivos son mostrados. Los datos son representativos de 3 y 2 individuos que mostraron células tetrámero-positivas para los péptidos Melan-A y NY-ESO 1 respectivamente. **(B)** Determinación por CF de LT CD8+ citotóxicos (CD107a+ CD107b+) inducidos en LT CD8+ de individuos sanos HLA-A*02:01 positivos en respuesta a estimulación in vitro con péptido Melan-A. **(C)** Poblaciones CD107a positivas en líneas celulares CD8+ específicas para los TAAs-A2 Melan-A, Her-2/neu, NY-ESO1 y Telomerasa derivadas a partir de LT CD8+ purificados de un individuo sano HLA-A*02:01. Los números corresponden a los porcentajes de células positivas para CD107a en cada línea celular comparado con una línea de LT CD8+ no estimulada con péptido (control). **(D)** Tinción intracelular de IFN- γ , IL-2 y TNF- α en LT CD8+ provenientes de líneas específicas contra un pool de péptidos de cuatro TAAs-A2: Her2/neu, NY-ESO 1, telomerasa y Melan-A luego de 20 horas de re-estimulo con 2d-stDCs sin pulsar (Negativo) o pulsadas con el pool de cuatro TAAs-A2 (Positivo). **(E)** Gráfica de "pie" con la distribución del porcentaje de células multifuncionales productoras de 1 (gris claro), 2 (gris oscuro) o 3 (negro) citoquinas simultáneamente luego de estimulación con 2d-stDCs sin pulsar (Negativo) o pulsadas con el pool de péptidos (Positivo).

Caracterización fenotípica y funcional de 2d-aDC tipo I obtenidas de monocitos en dos días

Recientemente Mailliard y colaboradores [54] describieron el proceso para la diferenciación de un tipo de DCs denominadas tipo I alfa polarizadas (aDCs) que emplea como estímulo de maduración las citoquinas pro-inflamatorias IL-1 β , TNF- α e IL-6 en combinación con IFN- α , IFN- γ y Poly I:C (un ligando del TLR3), que se caracterizan por una alta producción de IL12 en respuesta a este estímulo. Al igual que las DCs estándar, se considera que aDCs eficientes para la inmunoterapia del cáncer son obtenidas a partir de monocitos luego de cinco días de cultivo en GM-CSF e IL-4 seguidos por dos días de tratamiento con el coctel de maduración (7 días) [118]. Basados en los resultados obtenidos con 2d-stDCs se evaluó el inmuno-fenotipo de maduración de aDCs producidas en dos días (2d-aDCs). Para analizar el inmuno-fenotipo de 2d-aDCs, se comparó la morfología, el fenotipo de maduración de marcadores en superficie y la capacidad funcional (producción de IL-12) de 2d-aDCs y 2d-stDCs.

Como se muestra en la Figura 10, se observaron cambios en la morfología celular y el número de dendritas en respuesta a los estímulos de maduración. De forma consistente en varios experimentos realizados, después de 24 horas de maduración las iDCs cambiaron de una forma redonda a células alargadas cuando se maduran mostrando que 2d-aDCs presentan un mayor número de dendritas que 2d-stDCs.

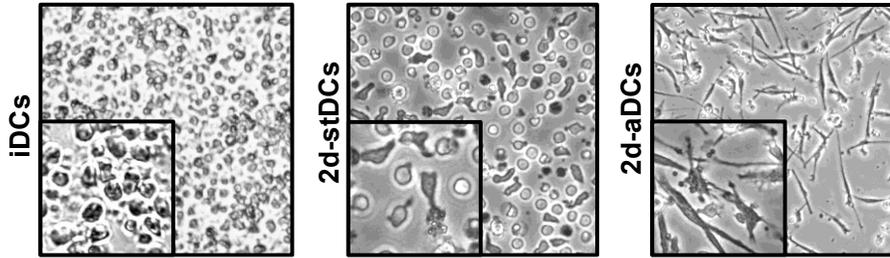


Figura 10. Evaluación de morfología de DCs estándar y alfa de dos días. Imágenes de microscopía de luz (40X) de monocitos obtenidos por selección negativa (panel izquierdo), y DCs maduras derivadas en dos días con el coctel estándar (panel central) y con el coctel alfa (panel derecho). Inserto en las imágenes corresponde a aumento digital (2x) en cada una de las fotografías.

Posteriormente, se comparó por CF la expresión de CD83, CD209, CD14, CCR7, CD80, HLA-DR y CD86 en 2d-aDCs y 2d-stDCs. Como se mostró en las figuras 6-9, el cóctel de citoquinas estándar claramente induce un fenotipo de maduración en 2d-stDC que se caracteriza por el aumento de la expresión de CD80, CD83, CD86, CCR7 y HLA-DR y la disminución de la expresión de CD209 y CD14. Este fenotipo que está acorde con el fenotipo de maduración de 7d-stDCs obtenido por nuestro grupo (Figura 5) y por otros autores [55, 119], fue muy similar al obtenido en 2d-aDCs (Figura 11).

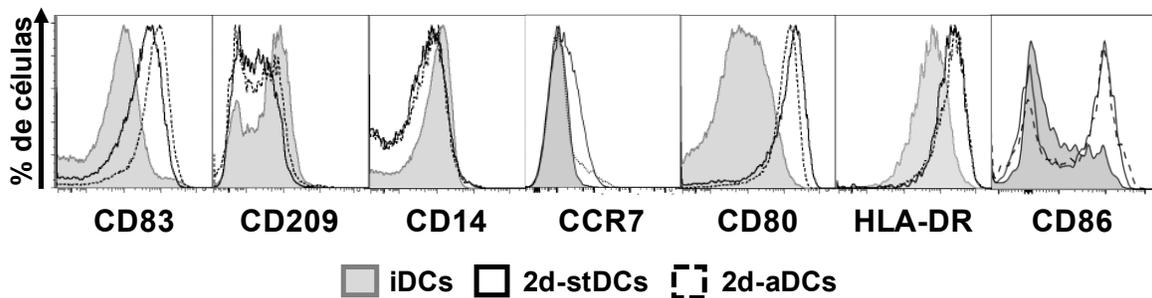


Figura 11. Fenotipo de células dendríticas generadas en dos días. Histogramas representativos de la expresión de marcadores de maduración CD83, CD209, CD14, CCR7, CD80, HLA-DR y CD86 en DCs inmaduras (iDCs histograma gris), 2d-stDCs (Histograma blanco) y en 2d-aDCs (histograma con línea punteada). DCs derivadas de monocitos purificados por selección negativa (n=10).

Una de las principales características de las DC alfa tipo I es la secreción de IL-12p70 (IL-12), una citoquina clave para la actividad antitumoral de LT [120]. Los niveles de secreción de IL-12 en los sobrenadantes de 2d-aDC revelaron una diferencia significativa en la secreción de IL-12 comparados con los bajos niveles de IL-12 producidos por iDCs y 2d-stDCs (294 vs. 34,5 y 35,1 pg/mL, respectivamente, Figura 12). En conjunto, nuestros resultados sugieren que en dos días es posible la inducción de 2d-aDCs maduras que son

fenotípicamente similares tanto a 7d-stDCs como a 2d-stDCs pero que a diferencia de las 2d-stDCs, 2d-aDCs producen concentraciones significativamente mayores de IL-12 en respuesta al estímulo de maduración.

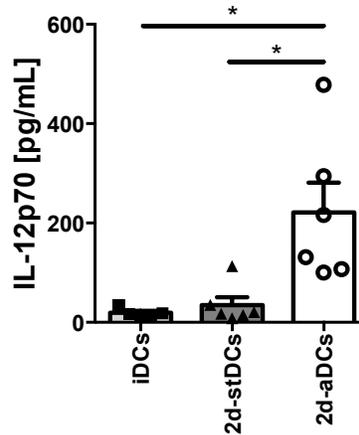


Figura 12. Cuantificación de IL-12p70 en el sobrenadante de cultivo de aDCs producidas en dos días. Cuantificación por CBA de la concentración de IL-12p70 detectada en el sobrenadante de cultivos de 2d-iDCs, 2d-stDCs, and 2d-aDCs. Concentración de IL-12 mostrada en barras (+/- SEM) prueba estadística Mann-Whitney, * $p < 0.05$.

La generación de DCs a partir de monocitos para uso clínico, emplea la adherencia para el enriquecimiento de monocitos la cual es favorecida por la propiedad de estas células de adherirse al plástico. Recientemente la FDA aprobó la primera “vacuna” basada en DCs para la inmuno-terapia del cáncer de próstata Sipuleucel-T (Provenge®) la cual consiste en la infusión de PBMCs totales del paciente luego de su co-cultivo *in vitro* con una proteína de fusión de GM-CSF y un antígeno prostático (fosfatasa ácida prostática, PAP) [121, 122]. Atendiendo a la complejidad de la composición celular infundida en Sipuleucel-T, se decidió comparar el rendimiento y el fenotipo de DCs generadas a partir de PBMCs totales empleando un sistema similar al propuesto por Martinuzzi y cols [58] en el cual PBMCs totales son cultivados en GM-CSF e IL-4 por 24 horas seguido de la adición al medio del coctel de maduración para stDCs o aDCs (derivación de monocitos presentes en PBMCs totales a DCs *in situ*). Luego de 24 horas del estímulo de maduración dos fracciones de células de cada cultivo (adherentes y no adherentes) fueron cosechadas por separado y la expresión de los marcadores CD83, CD14, CCR7 y CD80 en células CD11c+ provenientes de las fracciones adherentes y no adherentes de PBMCs cultivados en GM-CSF e IL-4 suplementado o no con el coctel stDCs o aDCs (iDCs, 2d-stDC o 2d-aDC respectivamente en Figura 13), fue cuantificada por CF y comparada con el fenotipo de 2d-stDC o 2d-aDC

obtenidas a partir de monocitos purificados por adherencia al plástico utilizados como control positivo en este experimento.

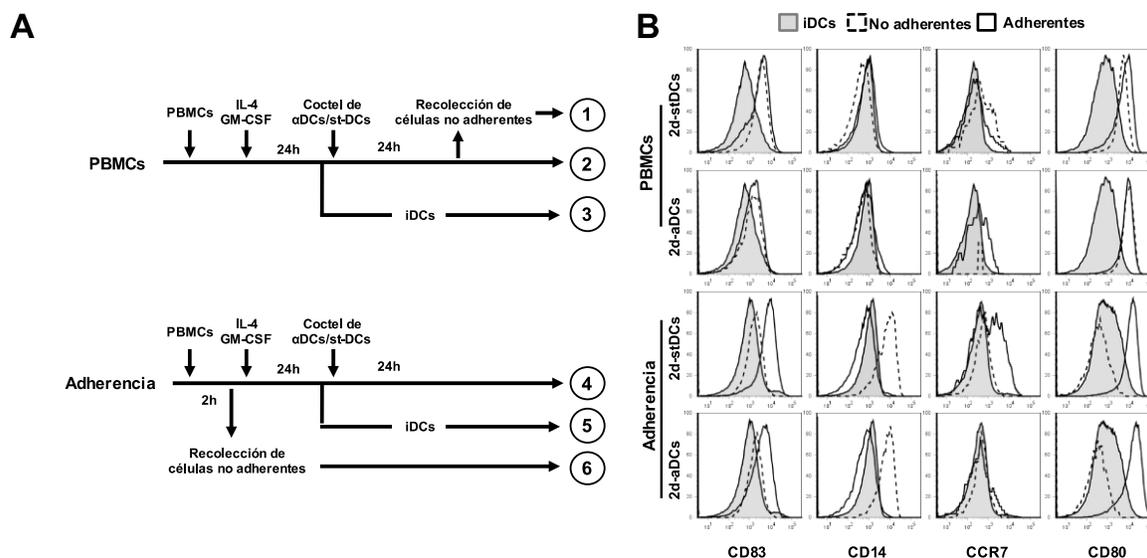


Figura 13. Análisis del fenotipo de DCs en la fracción adherente y no adherente de PBMCs totales incubadas por 48 horas con citoquinas utilizadas para la obtención de 2d-stDCs y 2d-aDCs. (A) Esquema de generación de DCs in vitro. Las DCs en el esquema superior (PBMCs) se indujeron “in situ” a partir del cultivo de PBMCs totales incubados con GM-CSF e IL-4 por 24 horas seguido de la exposición por 24 horas a los cócteles de citoquinas aDC o stDC por 24 horas. (1) Células no adherentes; (2) “in situ” 2d-stDCs o 2d-aDCs maduras adheridas y (3) “in situ” DC inmaduras. El esquema inferior corresponde al cultivo control positivo que representa el método de adherencia comúnmente utilizado para inducir: (4) DCs maduras 2d-aDCs o 2d-stDC obtenidas a partir de células adherentes; (5) iDCs obtenidas por adherencia (células adherentes expuestas sólo a IL-4 y GM-CSF por 24 horas) y (6) células cosechadas luego de 2 horas de adherencia de monocitos y que no fueron expuestas a ninguna citoquina. (B) Perfil de expresión de los marcadores CD83, CD14, CCR7 y CD80 en iDCs (histograma gris), células presentes en la fracción adherente (histograma vacío) y no adherente (histograma con línea punteada) de cada cultivo obtenidas a partir del cultivo de PBMC totales como se describe en el panel A (filas superiores) o de células adherentes (filas inferiores) con cócteles de citoquinas aDC o stDCs. Todos los histogramas provienen del análisis de células individuales seleccionadas por los parámetros (FSC-A vs FSC-H) y tamaño y complejidad de DC analizadas utilizando los parámetros FSC-A vs SSC-A en células CD11c positivas.

El análisis del rendimiento (Tabla 6) y fenotipo de células presentes en la fracción adherente y no adherente obtenida de PBMCs luego de 48 horas de cultivo con citoquinas demostró que DCs maduras con fenotipo tanto stDC como aDCs están presentes tanto en la fracción adherente como en la no adherente de los PBMCs luego del cultivo (Figura 13). Nuestros resultados confirman la diferenciación “in situ” a DCs de células presentes en PBMCs como lo propone Martinuzzi [58]. La eficiente diferenciación a DCs a partir de PBMCs observada es favorecida por la incubación de PBMCs con las citoquinas GM-CSF e IL-4 más un estímulo de maduración y probablemente por el contacto célula-célula en cultivos de alta densidad como los utilizados por nosotros [57].

Evaluación *in vitro* de la capacidad funcional de DCs

2d-aDCs estimulan eficientemente la expansión de LT-CD4+ con fenotipo "stem" productoras de IFN- γ que circulan en sangre

Una vez optimizado el proceso de generación de aDCs maduras de dos días, era importante evaluar la capacidad de estas células de inducir la activación *in vitro* de LT.

2d-aDCs estimulan eficientemente LT CD4+

El fenotipo de maduración observado en 2d-aDCs se caracteriza por la importante producción de IL-12, citoquina fundamental para la diferenciación de células T CD4+ hacia un fenotipo Th1 productor de IFN- γ . Esta característica nos llevó a evaluar el desempeño de 2d-aDCs para monitorear células Th1 en sangre. El *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb) es un patógeno que genera en individuos infectados sin enfermedad activa (individuos con tuberculosis latente) células Th1 detectables en sangre periférica. Por esta razón, para evaluar la capacidad de 2d-aDCs para estimular células Th1, se comparó la producción de IFN- γ por células T CD4+ presentes en sangre de individuos con tuberculosis latente en respuesta a 2d-aDCs o 2d-stDCs pulsadas con antígenos de Mtb. Para hacerlo, 2d-stDCs y 2d-aDCs de individuos con tuberculosis latente pulsadas con péptidos de Mtb (Tabla 10) que estimulan producción de IFN- γ por células Th1 en estos individuos [123-126] fueron co-cultivadas con células T CD4+ por seis días al cabo de los cuales se cuantificó la producción intracelular de IFN- γ y la secreción de varias citoquinas al medio de cultivo. Los resultados muestran que la frecuencia de células T CD4+ productoras de IFN- γ detectada es mayor cuando el antígeno es presentado por 2d-aDCs (Figura 15A) que por 2d-stDC las cuales solo inducen respuesta de células T CD4+ con bajos niveles intracelulares de IFN- γ (<1%) similares al inducido por DCs no pulsadas con antígeno (Figura 15A). Para confirmar estos resultados, se analizó en los sobrenadantes la secreción de citoquinas Th1 / Th2. Únicamente se observó un aumento en la secreción de IL-6, TNF- α e IFN- γ en cultivos estimulados tanto por 2d-aDCs como 2d-stDCs pulsadas con péptidos de Mtb comparado con DCs no pulsadas (Figura 14 panel izquierdo). La capacidad funcional de las DCs se evaluó simultáneamente con DCs frescas o posterior a la crio-preservación en nitrógeno líquido luego de haberlas madurado. Los resultados de esta comparación entre DCs frescas vs congeladas muestran que son igualmente funcionales para estimular LT-CD4+ evidenciado por la secreción similar de las citoquinas IL-6, TNF- α e IFN- γ en cultivos estimulados (Figura 14 paneles centrales y derecho).

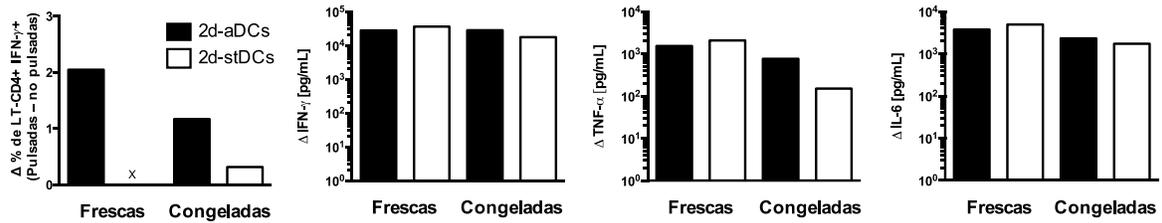


Figura 14. Nivel de activación de LT-CD4+ en respuesta a estimulación con DCs derivadas en dos días. Producción de citoquinas a nivel intracelular en LT-CD4+, en cultivos con 2d-aDCs o 2d-stDCs pulsadas (barras negras) y no pulsadas (barras blancas) con coctel de péptidos de Mtb (panel izquierdo). Paneles derechos, secreción de citoquinas en los sobrenadantes de los cultivos cuantificando IFN- γ , IL-6 y TNF- α por CBA a partir de los cultivos estimulados con 2d-aDCs o 2d-stDCs frescas o crio-preservadas (congeladas).

2d-aDCs inducen la secreción de IFN- γ en LT CD4+ con fenotipo "stem" de memoria.

Recientemente, Gattinoni y col., [70] describieron una población de células T de memoria con fenotipo de células madre humanas (Scm) que exhibe una capacidad superior de proliferación y actividad antitumoral que da origen a células efectoras y que pueden ser responsables de la inmunidad antitumoral. El inmuno-fenotipo de estas células se caracteriza por la expresión de los siguientes marcadores: CD45RA+ CCR7+ CD62-L+ CD28+ CD27+ CD95+, IL-2R β + y CXCR3+. El estudio de Scm ha demostrado que estas células son responsables de la memoria inmunológica y la generación de inmunidad contra agentes infecciosos y el cáncer [66, 71, 74, 127]. Por lo anterior la implementación de sistemas para el monitoreo de estas células en sangre periférica quizás sea una herramienta útil en pacientes con cáncer. Para implementar condiciones *in vitro* que permitan el estudio de células Scm en sangre se exploró la presencia de estas células en individuos con tuberculosis latente, en vista de que la producción de IFN- γ registrada con la prueba de QuantiFERON TB Gold® (utilizado para diagnosticar tuberculosis latente) y la detectada en ensayos de estimulación *in vitro* como el realizado por nosotros en individuos con tuberculosis latente es atribuida a células T CD4+ de memoria productoras de IFN- γ y responsables de la inmunidad a tuberculosis. Por lo anterior, además del análisis de producción de citoquinas, se comparó por CF la presencia de células T CD4+ con fenotipo Scm en los cultivos estimulados con 2d-aDCs y 2d-stDCs pulsados con péptidos de Mtb con el fin de analizar si existe relación entre la producción de IFN- γ observada y la detección de células con fenotipo Scm en el cultivo. Para este propósito, en el cultivo de PBMCs totales de uno de los voluntarios (n=4) con tuberculosis latente (descrito en la Figura 15) se indujo la diferenciación de monocitos a 2d-aDCs o 2d-stDC *in situ* y simultáneamente los

cultivos fueron pulsados con péptidos de Mtb (Figura 15). Después de 6 días de estimulación, las células T CD4+ se analizaron por CF con el fin de cuantificar la producción de IFN- γ intracelular en distintas sub-poblaciones de células T CD4+ (Figura 15A). Como se muestra en la Figura 15B, los resultados sugieren que la producción de IFN- γ intracelular (porcentaje de células T CD4+ IFN- γ + obtenido en el cultivo estimulado con DCs pulsadas menos el porcentaje de células T CD4+ IFN- γ + detectado en cultivos estimulados con DCs no pulsadas), es atribuible a células T CD4+ Scm ya que la producción intracelular de esta citoquina fue detectada mayoritariamente en células Scm y no fue detectada en ninguna de las otras sub-poblaciones de células T CD4+ analizadas: memoria central (CM), Naïve (nativa), memoria efectora (EM) y efectoras terminales (EF).

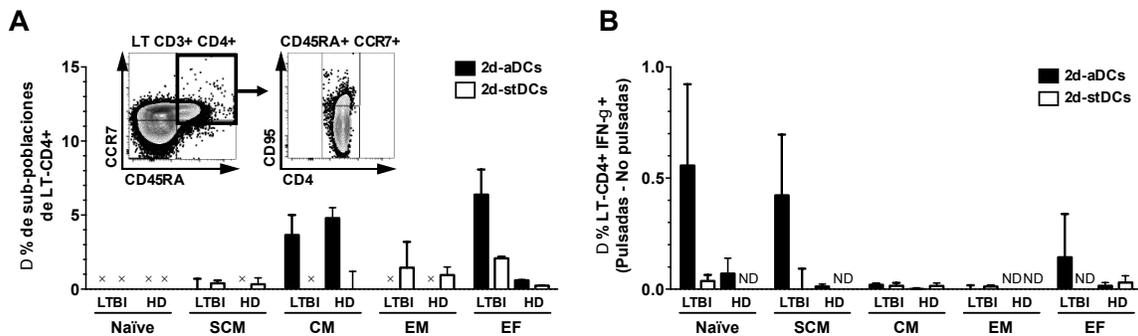


Figura 15. Fenotipo de linfocitos T CD4+ en respuesta a activación con DCs. (A) Fenotipo de LT-CD4+ de donantes sanos infectados con Mtb (LTBI n = 4) o individuos sanos no infectados con Mtb (n = 4), estimuladas con 2d-aDCs (barras negras) o 2d-stDCs (barras blancas) pulsadas con péptidos de las proteínas ESAT-6 y CFP-10 específicas de Mtb. El inserto corresponde a una gráfica de contorno representativa de células “naïve” (CD45RA+ CCR7+) que expresan CD95+ (células con fenotipo “stem like”: SCM). (B) Diferencia en el porcentaje de distintas sub-poblaciones de LT-CD4+ que producen IFN- γ analizados en el panel A (Delta del % de LT-CD4+ IFN- γ +), detectada esta diferencia entre cultivos estimulados o no con péptidos de Mtb.

Las 2d-aDCs favorecen la expansión de LT CD4+ “helper” foliculares (Tfh) presentes en sangre

La secreción de las citoquinas IL-23 y TGF- β por DCs, juega un papel importante en el proceso de diferenciación de LT-CD4+ “naïve” a células pre-Tfh. Gracias a la expresión del receptor CXCR5 en células pre-Tfh estas células migran y se anidan en diferentes tejidos en especial en los centros germinales (GC-Tfh). Las GC-Tfh agrupan diferentes sub-poblaciones de células foliculares “helper” residentes en tejidos (Tfh); son células fundamentales para la producción y maduración de la afinidad de anticuerpos de los linfocitos B en los GC en un proceso en el cual la IL-12 producida por las DCs juega un papel muy importante [113]. Por la importancia de las células Tfh en la inmuno-vigilancia de los tumores de cáncer de mama [128] y la oportunidad que brinda para su estudio el análisis de aquellas que circulan en sangre [113, 129, 130], consideramos importante el monitorear

en sangre de pacientes con cáncer de mama la inmuno-competencia de Tfh antes y después de quimioterapia. Para esto fue necesario la estandarización de un panel multicolor de marcadores y la implementación de condiciones de cultivo *in vitro* de PBMCs utilizando 2d-aDCs derivadas “*in situ*” (debido a su capacidad para producir altas concentraciones de IL-12 (Figura 12)), que favorecieran en primer lugar la detección y análisis por CF de Tfh en la sangre de donantes sanas.

Inicialmente se implementó un panel de anticuerpos para el estudio *ex vivo* de Tfh con base en diversos marcadores descritos para su identificación en sangre. Además de CXCR5 y PD1 descritos originalmente para definir esta población de células, el empleo de los marcadores CCR7, CCR6 y CXCR3 recientemente ha permitido determinar tres subpoblaciones denominadas Tfh1, Tfh2 y Tfh17 [114]. La Figura 16, muestra los resultados del análisis *ex vivo* de la frecuencia de Tfh en sangre periférica de un individuo sano determinada dentro de LT-CD4+ que expresan CD4+ CXCR5+ (panel izquierdo). Dentro de estas células en el panel derecho de la Figura 16 se muestra la distribución de estas células en las tres sub-poblaciones Tfh1, Tfh2 y Tfh17 definidas por la expresión diferencial de los marcadores CCR6 y CXCR3 así: (CXCR3+ CCR6- (Tfh1); CXCR3- CCR6+ (Tfh17) y CXCR3- CCR6- (Tfh2).

Para analizar el estatus de activación o quiescencia de cada una de las tres subpoblaciones Tfh1, Tfh2 y Tfh17 con base en publicaciones realizadas por otros grupos [114], se analizó la expresión de PD1 y CCR7 en cada una de ellas tal como se muestra en la Figura 16 (paneles inferiores). Sin embargo, en comparación con lo reportado por otros grupos [114], la distribución de células en estos estados no pudo ser evidenciable en las muestras de cuatro individuos sanos procesados. Por lo anterior, y atendiendo a resultados recientes en favor del rendimiento del uso de los marcadores CXCR5, PD1 asociado al análisis de la expresión de ICOS y producción de IL-21 para el estudio de células Tfh en sangre, se optó por el empleo de estos marcadores en LT CD4+ para el análisis de Tfh.

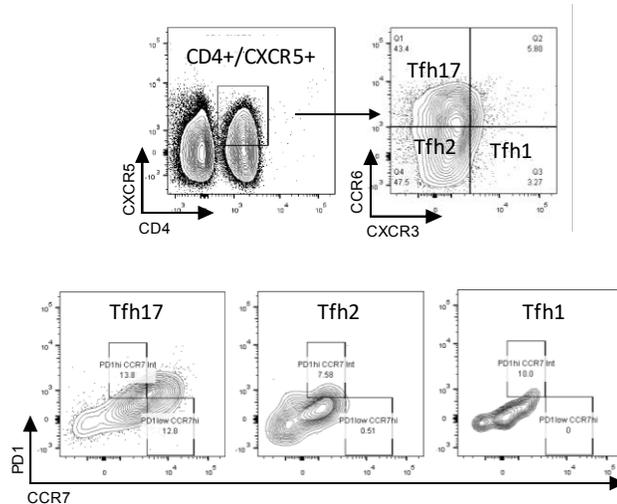


Figura 16. Estrategia de análisis mediante CF de Tfh en sangre periférica de un individuo sano. Diagrama de contornos de células linfoides de sangre periférica seleccionadas por los parámetros FSC-A y SSC-A y marcadas con CD4 y CXCR5 con el fin de analizar en células Tfh (CD4+CXCR5+, panel superior izquierdo) tres sub-poblaciones (Tfh1, Tfh2 y Tfh17) determinadas por la expresión diferencial de los marcadores CXCR3 vs. CCR6 (panel superior derecho). En cada una de estas tres sub-poblaciones, Tfh17 (panel inferior izquierdo), Tfh2 (centro) y Tfh1 (derecho), se evaluó el grado de activación (nivel de expresión de PD1+) o de quiescencia (expresión de CCR7+). Gráficas representativas del análisis ex vivo de Tfh en sangre de un individuo sano de cuatro analizados.

En un ensayo *in vitro* utilizando PBMCs de donantes sanas en los que se indujeron *in situ* 2d-aDCs y 2d-stDC y se estimularon los LT con perlas acopladas a anti-CD3 / CD28 / CD2, se estableció por CF la frecuencia de Tfh (CD4+ CXCR5+ PD1 +) en LT CD4+. La Figura 17 muestra una expansión significativa de Tfh favorecida por 2d-aDCs (media 2,54%) en comparación con DC inmaduras (1,29%) y 2d-stDCs (1,64%) inducidas *in situ* en PBMCs de donantes sanas (n=4).

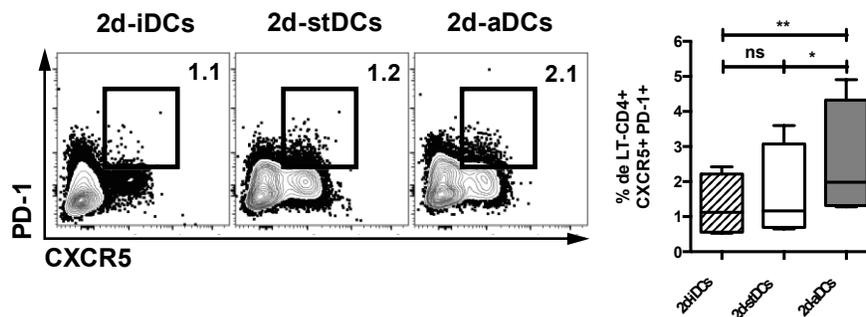


Figura 17. Expansión de Tfh presentes en sangre de donantes sanas inducida por el estímulo con dos tipos de DCs. Cuantificación de las células Tfh CD4+, CXCR5+, PD1+ en la región de células linfoides de sangre periférica seleccionadas para análisis con los parámetros FSC-A y SSC-A luego del estímulo de PBMCs con perlas acopladas a anti-CD3 / CD28 / CD2 en presencia de 2d-iDCs, 2d-stDCs o 2d-aDCs derivadas *in situ* (paneles de izquierda a derecha respectivamente). Cuantificación del porcentaje de Tfh en PBMCs de donantes sanas (n = 4) estimulados con cada tipo DC (panel derecho). ANOVA una vía con comparación múltiple pareada mediante Holm-Sidak. * p<0.05, ** p<0.01.

Posteriormente utilizando PBMCs cultivadas con los dos tipos de citoquinas con el fin de derivar 2d-stDCs y 2d-aDCs “*in situ*”, evaluamos en PBMCs de donantes sanas la expresión de ICOS e IL-21 como marcadores funcionales de Tfh en respuesta a la estimulación con perlas del TCR. En respuesta a la estimulación del TCR en combinación con 2d-aDCs los Tfh incrementaron la expresión de ICOS (77% a comparación de 58% con 2d-stDCs o 61% inducido por iDCs - Figura 18 panel izquierdo). Por último, se evaluó la producción intracelular de IL-21 en Tfh estimuladas; este ensayo reveló un aumento significativo del MFI de IL-21 en células Tfh cuando el estímulo se hizo en presencia de 2d-aDCs (media 31,2) en comparación con 2d-iDCs (media -5,3) y 2d-stDC (media 18,7) (Figura 18 panel derecho). Estos resultados sugieren un papel importante de la IL-12 producida por 2d-aDCs en la expresión de ICOS y producción de IL-21 por células Tfh cuyo TCR es eficientemente estimulado *in vitro*.

En conjunto, estos resultados demuestran que 2d-aDC pueden inducir células T CD4+ Th1 productoras de IFN- γ (Figura 15) y además son una herramienta útil para monitorear la actividad de Tfh circulantes en sangre periférica probablemente debido a su capacidad para producir IL-12.

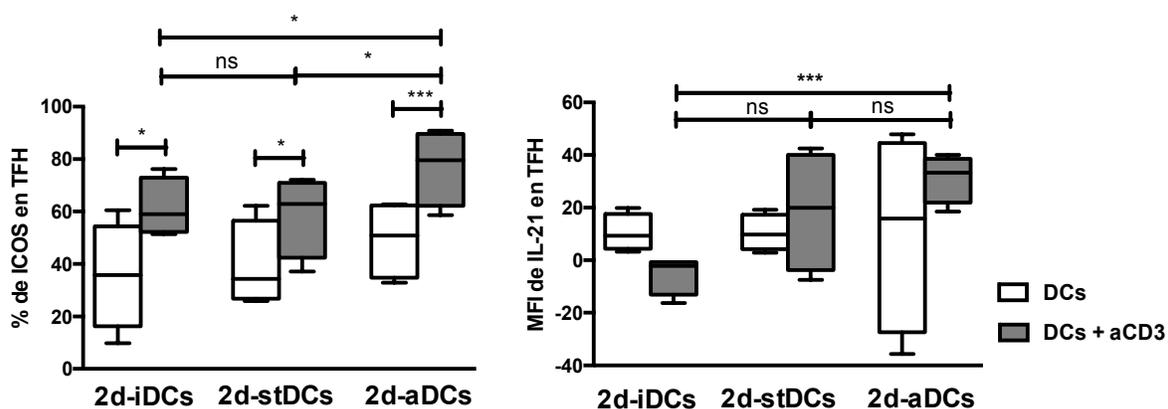


Figura 18. Fenotipo de activación de Tfh (ICOS+ e IL-21+) presentes en PBMCs en respuesta a 2d-DCs inducidas “*in situ*” en la presencia de perlas antiCD3/CD28/CD2. Cuantificación de ICOS (panel izquierdo) e IL-21 (panel derecho) en células Tfh linfoides (delimitadas por FSC-A y SSC-A y marcadas como CD4+) en PBMCs estimulados con perlas acopladas a anticuerpos contra CD3/CD28/CD2 en combinación con 2d-iDCs, 2d-stDCs y 2d-aDCs derivadas *in situ*. Análisis de ANOVA una vía con comparación múltiple pareada mediante Holm-Sidak. * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$.

2d-stDCs y 2d-aDCs inducen *in vitro* la expansión y activación de LT vírgenes y de memoria específicas para un antígeno tumoral en una paciente con cáncer de mama.

El monitoreo de las células T específicas de antígenos tumorales (TAA por sus siglas en inglés Antígenos Asociados a Tumor) presentes en sangre de pacientes con cáncer es un importante desafío porque requiere sistemas de cultivo *in vitro* que permitan estimular células que han perdido la capacidad de vigilancia del tumor, están en frecuencias muy bajas y que no responden a TAAs como consecuencia de diferentes mecanismos de supresión inducidos por el tumor. Aunque existen diferentes metodologías para el estudio de estas células, con frecuencia estas requieren importantes volúmenes de sangre. Para monitorear células específicas para TAAs en condiciones con limitado volumen de sangre como el utilizado en este estudio (20 mL), se implementaron dos sistemas de cultivo *in vitro* que no sólo permiten expandir células T específicas del antígeno sino además evaluar precursores anti-TAA dentro del repertorio de LT “naïve”.

El primer sistema *in vitro* se basó en el método descrito por Martinuzzi et al. [58]. Brevemente, DCs fueron inducidas “*in situ*” a partir de PBMC tomados previo a quimioterapia de una paciente HLA A*-02:01 al momento del diagnóstico de un cáncer de mama Her2/neu+++ los cuales fueron cultivados en IL-4 y GM-CSF por 24 horas en presencia del TAA HER2 / neu (péptido 369-377 (KIFGSLAFL)). El cultivo de PBMCs fue tratado por 24 horas adicionales con los cócteles de maduración para 2d-aDC o 2d-stDC en presencia del péptido HER2/neu (5 µM) (Figura 3A). Luego de seis días de cultivo se analizó por CF la expansión de células T CD8+ específicas de HER2 utilizando un dextrámero A2 específico para HER2/neu (péptido KIFGSLAFL (Immudex)) y se comparó el grado de expansión de estas células entre cultivos de PBMCs en que las células CD8+ fueron estimuladas con: DCs inmaduras, con 2d-aDC o con 2d-stDC derivadas *in situ* en presencia del péptido KIFGSLAFL. Los resultados mostraron un aumento de células T CD8+ específicas de HER2 en respuesta a la estimulación con 2d-stDCs (3,6%) o 2d-aDCs (3,91%) en comparación con DCs inmaduras sin pulsar con péptido (0,94%) (Figura 19A). Estos resultados sugieren que la estimulación con 2d-stDCs o 2d-aDCs pulsadas con antígeno induce más de 3 veces la expansión de células T CD8+ específicas de HER2/neu presentes en la sangre de una paciente con cáncer de mama previo a la quimioterapia.

De otra parte, células T “vírgenes” purificadas por “sorting” celular a partir de la muestra de 20 mL de sangre tomada a la paciente fueron cultivadas en condiciones originalmente descritas por Moser et al. [59]. Brevemente, los LT CD4+ y CD8+ “vírgenes” se cultivaron

durante 14 días con 2d-stDCs o 2d-aDCs derivadas a partir de monocitos purificados (relación DC: célula T de 1:20) en presencia de péptido HER2/neu KIFGSLAFL (células T CD8+) o un pool de péptidos HER2/neu de 20 aminoácidos (Tabla 8) (LT CD4+) en ausencia de suplemento de IL-2. Luego de 14 días del cultivo se realizó un refuerzo con 2d-stDCs o 2d-aDC durante 6 días adicionales (Figura 3B). Después de la re-estimulación, las células T CD8+ específicas para el péptido de HER2 experimentaron una expansión de 5 a 6 veces (Figura 19B) en comparación con la inducida por el respectivo tipo de DC no pulsada con péptido (de 1.98 a 15.6% con 2d-aDC y de 1.71 a 17.5% con 2d-stDC).

Para analizar la activación de precursores de LT CD4+ “vírgenes” estimulados con un “pool” de péptidos de la región intra- y extra-celular de HER2/neu de 15-aa, se midió por CF la expresión de CD154 (CD40-L) (Figura 19C) en LT CD4+ y se observó que sólo 2d-aDC indujo la expresión de CD154 en comparación con LT-CD4+ estimuladas con 2d-stDCs. Además de medir la activación, se cuantificó la secreción de IFN- γ en sobrenadantes de cultivo de LT-CD4+ y CD8+ vírgenes luego de las tres semanas de estimulación con 2d-aDCs o 2d-stDCs pulsadas con antígeno. Los resultados mostraron niveles más altos (> 3 logs) de IFN- γ en LT-CD4+ y CD8+ estimuladas con 2d-aDCs (delta entre DC pulsadas menos no pulsadas) en comparación con LT-CD4+ y CD8+ estimuladas con 2d-stDCs (Figura 19D). Estos resultados sugieren que previo al tratamiento de quimioterapia en esta paciente con cáncer de mama, 2d-aDCs tuvieron mayor capacidad que 2d-stDCs para activar el fenotipo efector de precursores de LT-CD4+ y CD8+ vírgenes específicas para epítopes de HER2/neu reconocidas por estas células.

Estos resultados sugieren que el diseño experimental implementado permite detectar en la sangre de pacientes con cáncer de mama LT-CD4+ y CD8+ tanto vírgenes como de memoria específicas de antígenos tumorales que pueden ser expandidos eficientemente *in vitro* lo cual hace posible el monitoreo de su respuesta durante el tratamiento antitumoral.

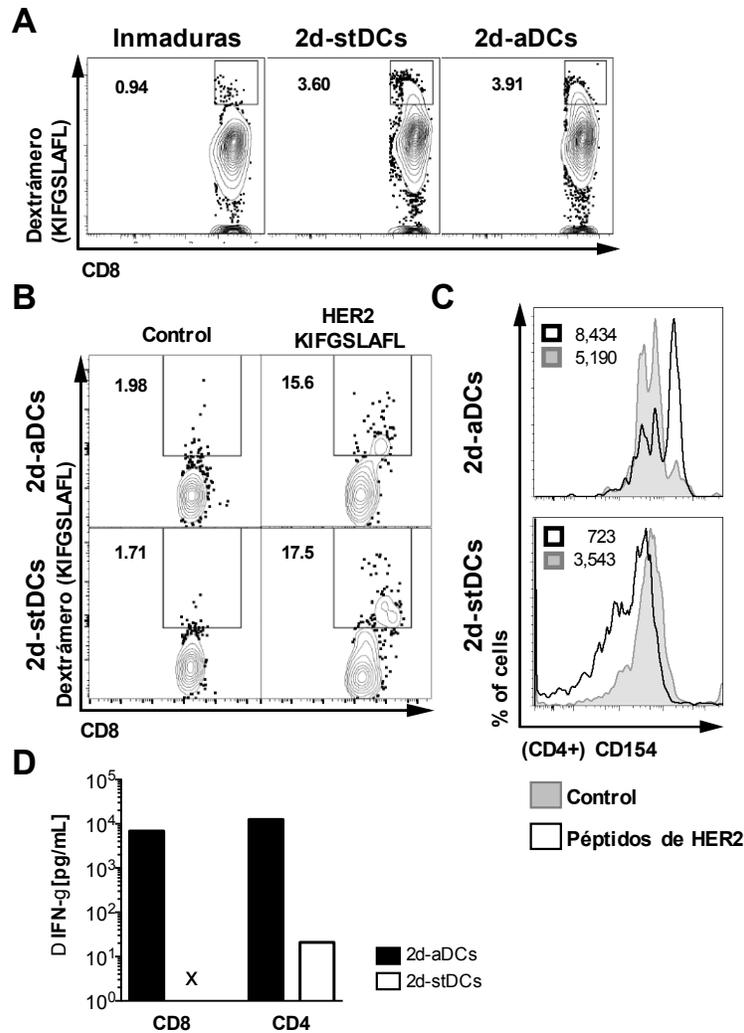


Figura 19. Evaluación de LT específicos de HER2/neu en una paciente con cáncer de mama antes del tratamiento. (A) Porcentaje de LT-CD8+ dextrámero positivas en PBMCs obtenidos de una paciente con cáncer de mama antes de tratamiento y estimulados por 7 días con DCs, 2d-aDC o 2d-stDC diferenciadas *in situ* y pulsadas con la ep tipe HLA-A2 KIFGSLAFL de HER2 (células individuales provenientes de la región CD3+). **(B)** Porcentaje de LT-CD8+ dextrámero positivas seleccionadas en la región en células únicas, CD3+ / CD8+ después de co-cultivo de LT-CD8+ vírgenes purificados con 2d-aDCs o 2d-stDCs pulsadas con la ep tipe HLA-A2 KIFGSLAFL durante 14 días en ausencia de suplemento citoquinas y re-estimuladas por 6 días adicionales con 2d-aDC o 2d-aDC pulsadas con la ep tipe HLA-A2 de HER2. **(C)** MFI de CD154 (CD40L) en LT-CD4+ purificadas en respuesta a 2d-aDC o 2d-stDC pulsadas con pool de péptidos HER2 durante 14 días y re-estimuladas con 2d-aDCs o 2d-aDCs pulsadas con péptidos de HER2 durante 6 días (análisis por histograma de células únicas CD3+/CD4+ en el que se compara el MFI de CD154 en cultivo sin péptidos - histograma gris y estimulado con pool de péptidos de HER2, histograma vacío). **(D)** Delta de la secreción de IFN- γ en los sobrenadantes de los cultivos descritos en los paneles B y C.

La terapia antitumoral restituye la inmuno-vigilancia del tumor en LT antitumorales.

La implementación de condiciones *in vitro* para la detección y análisis de LT antitumorales presentes en la sangre de pacientes antes del tratamiento hace posible su monitoreo durante la terapia antitumoral y permite cotejar el estatus fenotípico y funcional de estas

células con la respuesta clínica del tumor al tratamiento. En tal sentido se planearon una serie de experimentos en pacientes con cáncer de mama ductal que cumplieren los siguientes criterios de inclusión: (i) la expresión del alelo HLA-A*02:01 por la paciente; (ii) sobre-expresión por el tumor de al menos uno de los siguientes TAAs-A2: HER2, NY-ESO1, Survivina o Telomerasa; (iii) disposición de la paciente a donar sendos concentrados leucocitarios obtenidos por leuco-aféresis (uno antes y otro después del tratamiento antitumoral); y (iv) pacientes que hubiesen experimentado respuesta clínica completa (pCR, por sus siglas en Inglés: **p**athological **C**omplete **R**esponse) luego de varios años de culminado el tratamiento antitumoral. Con la inclusión de pacientes que cumplieran estos criterios se perseguía obtener LT suficientes para realizar ensayos *ex vivo* e *in vitro* orientados a correlacionar el inmuno-fenotipo de LT-CD8+ anti-TAAs-A2 (detectados con tetrámero) con la respuesta clínica del tumor al tratamiento antitumoral (pCR). Estos criterios de inclusión (especialmente la donación del concentrado leucocitario antes y después de la quimioterapia) en pacientes con cáncer de mama en terapia neo-adyuvante con Doxorrubicina y Ciclofosfamida limitó en gran medida la vinculación al estudio de pacientes con estas características; sin embargo, el estudio de LT-CD8+ anti-TAAs-A2 antes y después del tratamiento antitumoral pudo realizarse en una paciente (MCC-002) quién cumplió con todos los criterios de inclusión anotados. A continuación, se muestran resultados de una serie de mediciones inmunológicas realizadas en LT de esta paciente con el fin de: (i) cotejar la especificidad y fenotipo de la respuesta inmune de linfocitos T CD8+ antitumorales antes y después del tratamiento antitumoral y (ii) investigar si en pacientes con respuesta clínica favorable, el tratamiento antitumoral restituye la inmunovigilancia del tumor por estos linfocitos [131].

Resumen datos clínicos de la paciente MCC-002

Mujer de 63 años de edad diagnosticada con carcinoma de mama ductal invasivo (Estadío II, T2N3M0) diagnosticado después de un resultado sugestivo de tumor (BIRADS 6) por mamografía. Después de la biopsia tomada con aguja fina, se pudo establecer amplificación en el tumor de HER2/neu (C-erb-b2) (+++), la no expresión de los receptores para estrógenos y progestágenos (ER^{neg} / PR^{neg}) y tinción positiva por inmunohistoquímica (IHQ) para NY-ESO 1. Al examen físico de la paciente se encontraron ganglios linfáticos axilares comprometidos, sin evidencia por gammagrafía de metástasis ósea (Ver Figura 20). Esta paciente se tipificó como positiva para HLA-A2 por citometría de flujo (utilizando el anticuerpo BB7.2 de BD) lo cual fue confirmado como positivo para HLA-A*02:01 por SSP-PCR. Después de firmado el consentimiento informado, se obtuvo mediante leucaféresis

un concentrado leucocitario de 150mL enriquecido en PBMCs los cuales fueron criopreservados. Esta paciente fue tratada con mastectomía radical modificada (MRM) de la mama izquierda incluyendo vaciamiento axilar (5 de 21 ganglios linfáticos comprometidos por el tumor). Después de la cirugía (septiembre de 2008), la paciente fue tratada con 12 dosis semanales de paclitaxel (150mg) y se programó tratamiento por un año con trastuzumab (440 mg cada tres semanas) y cuatro semanas de radioterapia (2.5Gy al día). En marzo de 2009, después de la quinta dosis de trastuzumab y la cuarta dosis de radioterapia la paciente experimentó una insuficiencia cardíaca aguda (fracción de eyección ventricular (FEV) por debajo del 30%) con respecto a FEV del 59% medida en agosto de 2008 antes de la cirugía. Debido a la toxicidad cardíaca del trastuzumab y la quimioterapia se suspendieron los dos tratamientos. La insuficiencia cardíaca se manejó exitosamente con Espironolactona (50mg/día) y furosemida (40mg/12h). Desde entonces las mamografías y gammagrafías óseas de seguimiento han sido negativas (BIRADS 2 de la mama contralateral). Ocho meses después de la suspensión del tratamiento antitumoral, se obtuvo un segundo concentrado leucocitario por leuco-aféresis y los PBMCs fueron criopreservados. Actualmente la paciente MCC-002 se mantiene controlada con mamografía anual con una respuesta clínica completa después de 9 años de suspendida la terapia antitumoral.

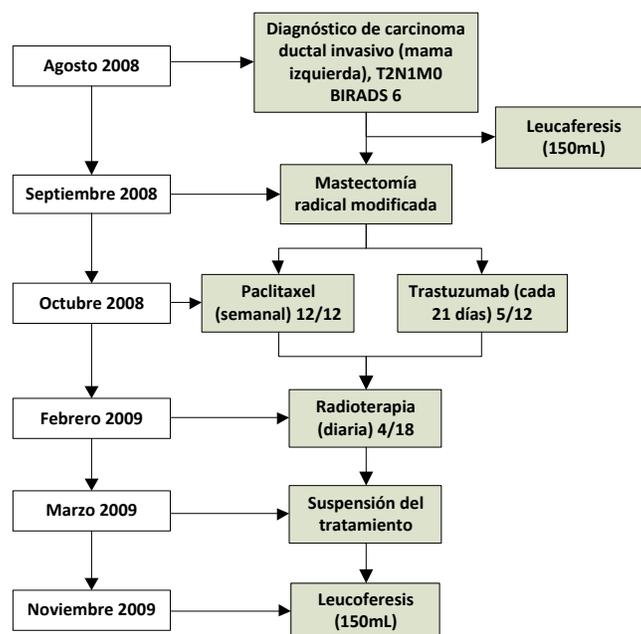


Figura 20. Diagrama de historia clínica y tratamientos de la paciente MCC-002.

Determinación del grado de funcionalidad de respuesta inmune

Existe evidencia experimental que sugiere que los pacientes con cáncer - similar a lo que se ha descrito en algunas infecciones virales crónicas - experimentan una importante reducción funcional de los LT [132, 133]. Con el fin de determinar el efecto de la terapia antitumoral (anti-TTx) en la capacidad de respuesta de LT al estímulo, se comparó la capacidad de LT de la paciente MCC-002 antes y después de anti-TTx para responder al estímulo del TCR y/o a un estímulo pro-inflamatorio provisto por 2d-aDCs derivadas de PBMC "*in situ*" (Ver Figura 3), con la de muestras de sangre tomadas de individuos sanos. Para evaluar esto, se implementó un ensayo *in vitro* utilizando PBMCs de mujeres sanas estimulados o no con perlas acopladas a anticuerpos anti-CD3, anti-CD28 y anti-CD2 con el fin de medir el grado de internalización del TCR (disminución la intensidad de fluorescencia media - MFI - de CD3) y el grado de expresión de los marcadores de activación de CD69, CD25 (IL-2R α) y CD154 (CD40L) en LT estimulados de seis mujeres sanas. La respuesta a la estimulación de TCR en células T de donantes sanas se comparó entonces con los de la paciente antes y después de anti-TTx. La internalización del TCR en respuesta a la estimulación determinada por la disminución del MFI de CD3 mostró que las células T de la paciente antes de la terapia tenían una capacidad limitada para internalizar el TCR en comparación con las células de donantes sanas las cuales mostraron una internalización significativa del TCR en respuesta al estímulo (Figura 21). En contraste, la internalización fue 10 veces mayor después de la terapia anti-TTx con respecto a la observada antes de la terapia (valores de MFI antes y después de anti-TTx fueron 3266 y 328 respectivamente - Figura 21A). Este resultado sugiere que la funcionalidad limitada de LT de la paciente medida en términos de la internalización del CD3 observada antes de anti-TTx se recuperó plenamente después de anti-TTx. La baja capacidad de internalización de TCR observada en respuesta a la estimulación del TCR en LT de la paciente antes de anti-TTx fue acompañada de una expresión limitada de CD69, CD25 y CD154 en estas células. Al igual que lo observado en relación con la recuperación de la internalización del TCR después de anti-TTx, la expresión de CD69, CD25 y CD154 en LT de la paciente luego de anti-TTx alcanzó niveles similares a los observados en células de donantes sanas (Figura 21A, B y Figura 22).

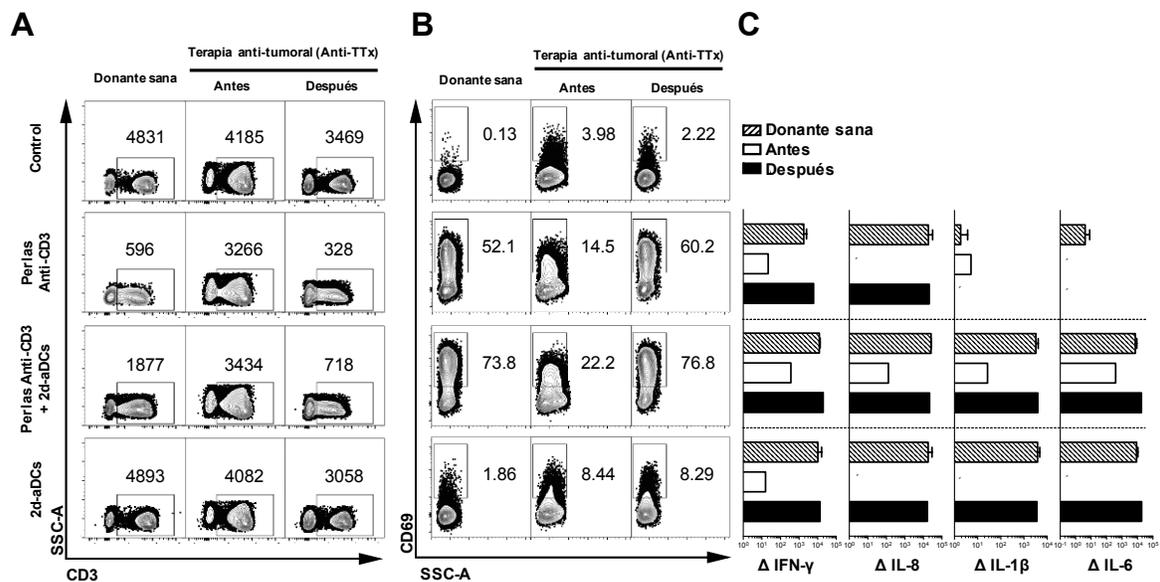


Figura 21. Análisis de la funcionalidad de LT en donantes sanas y de la paciente con cáncer de mama MCC-002 antes y después de Anti-TTx. (A) Análisis por CF de la internalización del TCR en LT CD3+ (monitoreada en gráficas de contornos en células linfoides seleccionadas por SSC-A_{bajo}) después de 72 h de estimulación policlonal del TCR con perlas anti-CD3/CD28/CD2; con una combinación de perlas y 2d-aDCs o con solo 2d-aDC. Las aDCs fueron inducidas “in situ” en PBMCs de donantes sanas (se muestran los resultados de uno de seis individuos sanos analizados) o en PBMCs de la paciente MCC-002 obtenidos antes y después de Anti-TTx; los números en el interior de cada panel corresponden al MFI de CD3 analizado en linfocitos (seleccionados por SSC-A vs FSC-A). (B) Gráficas de contorno en las que muestra el porcentaje de expresión de CD69 en células T (seleccionadas como en (A) por SSC-A_{bajo} CD3+), los números en cada panel corresponden al porcentaje de células que expresan CD69+ en LT-CD3+. Los resultados presentados en (A y B) son representativos de un experimento de tres realizados. (C) Delta de la secreción relativa de las citoquinas IFN-γ, IL-8, IL-1β e IL-6 (pg/mL) por PBMCs estimulados en relación con el control no estimulado de donantes sanas (n = 6, barras discontinuas) y de la paciente MCC-002 antes y después de Anti-TTx (barras blancas y negras respectivamente). Las barras muestran SEM. X: no detectado. Los resultados presentados en el panel C son representativos de tres experimentos realizados.

Finalmente, la cuantificación de la secreción de IFN-γ, IL-8, IL-1β e IL-6 por PBMCs de la paciente previo a anti-TTx mostró que sus LT exhiben un marcado déficit de secreción de estas citoquinas en respuesta al estímulo con perlas anti-CD3/CD28/CD2. Sin embargo, los resultados presentados en la Figura 21C sugieren que la secreción de estas citoquinas es restablecida por la anti-TTx (Figura 21C). Los resultados muestran que mientras la anti-TTx restituye la capacidad de secreción de IFN-γ e IL-8 cuando los LT son estimulados con perlas anti-CD3/CD28/CD2, la secreción de las cuatro citoquinas por estos linfocitos fue evidente cuando estas células fueron estimuladas bien sea con 2d-aDCs solas o en combinación con perlas anti-CD3/CD28/CD2. El papel fundamental de 2d-aDCs en restablecer la producción de estas cuatro citoquinas en LT de la paciente se evidenció por una parte en células tomadas después de la terapia antitumoral en que la inducción de 2d-aDCs provocó niveles de las cuatro citoquinas similares a los detectados en las células de

individuos sanos, y por la otra, en LT de la paciente tomados previo a anti-TTx los cuales restablecieron parcialmente la secreción de las cuatro citoquinas cuando fueron estimuladas con la combinación 2d-aDCs y perlas anti-CD3/CD28/CD2 (Figura 21C).

En conjunto, estos resultados indican que la terapia antitumoral en esta paciente restauró la capacidad de las células T para responder a la estimulación del TCR *in vitro*; la recuperación de esta función fue en parte dependiente del estímulo pro-inflamatorio proporcionado por el coctel de citoquinas utilizado para la diferenciación de 2d-aDCs *in situ*.

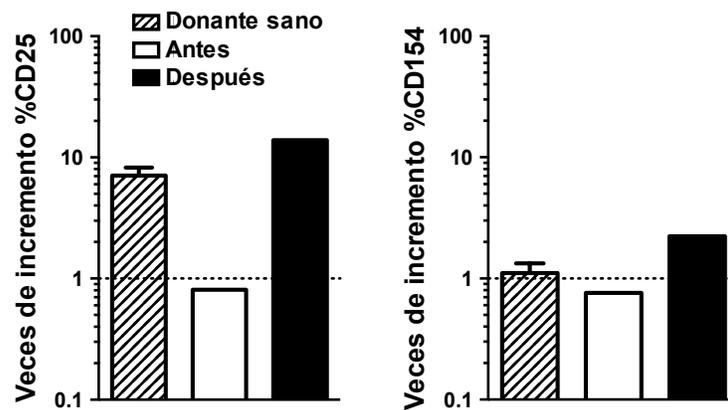


Figura 22. Veces de incremento de la expresión de CD25 y CD154 en LT en respuesta al estímulo con perlas antiCD3/CD28/CD2. Veces de incremento del porcentaje de expresión de CD25 (izquierda) y CD154 (derecha) en linfocitos T CD3+ presentes en PBMCs estimulados o no con perlas acopladas a anticuerpos anti-CD3/CD28/CD2 en donantes sanas (barras con rayas) (n = 3) y la paciente MCC-002 con cáncer de mama (antes y después de la quimioterapia barras blancas y negras respectivamente). Línea representa SEM.

Para evaluar si la quimioterapia indujo en la paciente la expansión de LT CD8+ de memoria que reconocen las epítopes HER2/neu₃₆₉₋₃₇₇ y NY-ESO 1₁₅₇₋₁₆₅ (restringidos para HLA-A*02:01), PBMCs de la paciente obtenidos antes y después del tratamiento anti-TTx se estimularon con 2d-aDCs o 2d-stDCs utilizando dos diferentes sistemas de cultivo *in vitro* (Ver Figura 3). El primero basado en el sistema descrito originalmente por Martinuzzi y cols. [134] en cultivos de alta densidad [57] diseñado para estudiar en sangre periférica la capacidad de respuesta al antígeno de células T de memoria (Figura 3A). En breve, PBMCs de la paciente obtenidos antes y después del tratamiento antitumoral fueron estimulados con citoquinas con el fin de inducir la diferenciación de 2d-stDCs y 2d-aDC *in situ*. Los cultivos fueron pulsados por seis días con las epítopes HER2/neu₃₆₉₋₃₇₇ y NY-ESO 1₁₅₇₋₁₆₅ y luego de cosechadas las células fueron teñidas con tetrámeros fluorescentes HLA-A2 específicos para cada epítope. El resultado presentado en la Figura 23 muestra que en los cultivos en los que se indujeron 2d-aDCs se observó un incremento en el porcentaje de LT

CD8⁺ efectoras terminales (CD62L⁻ CD45RO⁻ CD45RA⁺) tetrámero positivas para la epítipo HER2/neu₃₆₉₋₃₇₇ en la muestra de PBMCs tomada después comparado con la tomada antes del tratamiento antitumoral (3,2% y 0,01% respectivamente). El hecho de que esta expansión no se observó en PBMCs en los que se indujeron 2d-stDCs (0,06% y 0,02% respectivamente) (Figura 23) sugiere que 2d-aDC induce más eficientemente que 2d-stDCs la expansión *in vitro* de LT de memoria HER2/neu₃₆₉₋₃₇₇ favorecida por anti-TTx en la paciente MCC-002.

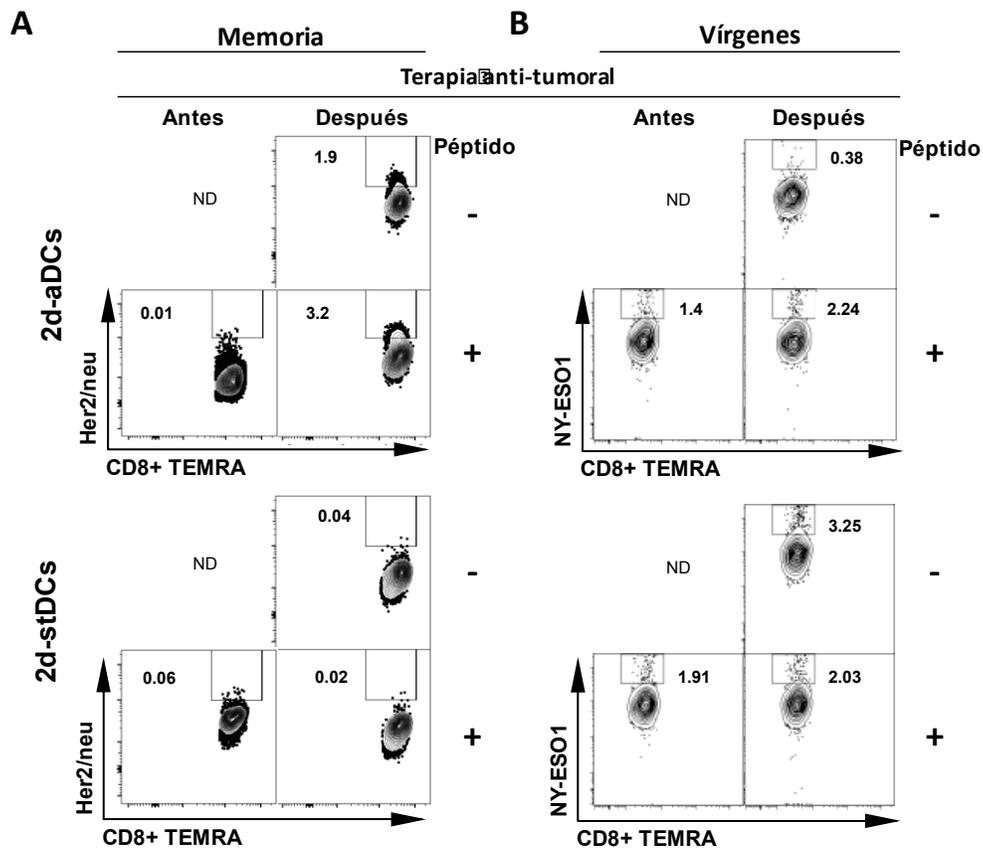


Figura 23. Expansión de LT-CD8⁺ específicos para las epítipes HER2/neu₃₆₉₋₃₇₇ y NY-ESO 1₁₅₇₋₁₆₅ a partir del repertorio de LT virgen y de memoria en sangre de la paciente MC-002. (A) Porcentaje de células T CD8⁺ efectoras terminales (TEMRA) tetrámero positivas para la epítipo HER2/neu₃₆₉₋₃₇₇ que fueron expandidas a partir de muestras de PBMCs totales de la paciente MCC-002 tomadas antes (recuadros a la izquierda) y después de anti-TTx (recuadros a la derecha) en respuesta al estímulo por seis días con 2d-aDCs y 2d-stDCs inducidas *in situ* sin pulsar (-) y pulsadas (+) con el péptido HER2/neu₃₆₉₋₃₇₇. (B) Porcentaje de células T CD8⁺ TEMRA específicas para la epítipo NY-ESO 1₁₅₇₋₁₆₅ expandidas *in vitro* a partir de células T CD8⁺ naïve en co-cultivo por 21 días con 2d-aDC o 2d-stDCs pulsadas (+) o no (-) con el péptido NY-ESO 1₁₅₇₋₁₆₅. En la figura se muestra el grado de expansión de CD8⁺ TEMRA específicas para esta epítipo logrado en células naïve obtenidas antes (recuadros a la izquierda) y después de anti-TTx (recuadros a la derecha). X: no hecho. Los resultados de los experimentos presentados en los paneles A y B son representativos de dos experimentos realizados.

Utilizando este sistema de cultivo orientado estudiar la capacidad de células T de memoria presentes en sangre periférica de responder al antígeno *in vitro*, no fue posible detectar LT de memoria específicos contra NY-ESO 1₁₅₇₋₁₆₅ (datos no mostrados), sin embargo LT específicos para este antígeno pudieron ser expandidos a partir de células vírgenes gracias al uso de un segundo sistema de cultivo *in vitro* diseñado para amplificar *in vitro* LT CD8+ específicos de antígeno a partir de células T naïve de sangre periférica [59]. Para esto, LT-CD8+ naïve obtenidos de muestras de sangre de la paciente antes y después del tratamiento antitumoral fueron estimulados independientemente con 2d-stDCs o 2d-aDCs que fueron pulsados con los péptidos HER2/neu₃₆₉₋₃₇₇ o NY-ESO 1₁₅₇₋₁₆₅. Después de 14 días de cultivo, las células fueron re-estimulados con cada tipo de 2d-DCs pulsada con su respectivo péptido durante una semana adicional (Figura 3B). La estimulación de LT CD8+ naïve con DCs pulsadas con NY-ESO 1₁₅₇₋₁₆₅ mostró que 2d-aDC estimularon la expansión de LT CD8+ naïve específicos para esta epítope más eficientemente en las muestras tomadas después comparado con las obtenidas antes de anti-TTx (2,24% vs. 1,4%, respectivamente, Figura 23B). Por el contrario, las 2d-stDCs no indujeron en LT-CD8+ de memoria una expansión de LT efectores específicos para NY-ESO 1₁₅₇₋₁₆₅. Al cabo de 21 días de estímulo de LT-CD8 vírgenes con 2d-DCs pulsadas con NY-ESO 1₁₅₇₋₁₆₅ se cuantificó la secreción de citoquinas IFN- γ y TNF- α en sobrenadantes de estos cultivos y se observó que ambas citoquinas fueron secretadas en altas concentraciones en sobrenadantes de células obtenidas después de anti-TTx, pero solo cuando fueron estimuladas con 2d-aDC. Las células T CD8+ naïve estimuladas con 2d-stDC indujo niveles bajos de estas dos citoquinas tanto en muestras obtenidas antes como después de anti-TTx (Figura 24). Estos resultados nos llevan a concluir que en esta paciente las 2d-aDCs favorecen la expansión selectiva de LT CD8+ anti NY-ESO 1₁₅₇₋₁₆₅ en la muestra de LT-CD8+ vírgenes tomada después pero no antes de la anti-TTx. Es importante anotar, que luego de varios ensayos no fue posible amplificar LT específicos para HER2/neu₃₆₉₋₃₇₇ a partir de LT-CD8+ vírgenes (datos no mostrados).

Al igual que lo evaluado en LT-CD8+ vírgenes, la amplificación de LT-CD4+ específicos para epítopes de la proteína HER2/neu a partir de LT CD4+ vírgenes fue analizado utilizando el mismo sistema de cultivo. Los LT CD4+ vírgenes obtenidos antes y después de anti-TTx fueron estimulados por 21 días con 2d-stDCs o con 2d-aDCs pulsadas con un coctel de seis péptidos: tres péptidos HER2/neu₄₂₋₅₆, HER2/neu₉₈₋₁₁₄, y HER2/neu₃₂₈₋₃₄₅ del dominio extracelular y tres HER2/neu₇₇₆₋₇₉₀, HER2/neu₉₂₇₋₉₄₁ y HER2/neu₁₁₆₆₋₁₁₈₀ del dominio intracelular de la proteína HER2/neu. Luego de 21 días la producción de las

citoquinas IFN- γ y TNF- α en sobrenadantes de estos cultivos fue medida. Como se muestra en la Figura 25, solo 2d-aDCs pulsadas con péptidos de HER2/neu indujo en LT-CD4+ vírgenes obtenidos después de anti-TTx la producción de una cantidad substancialmente alta de estas dos citoquinas comparado con la inducida por 2d-stDCs pulsadas con los mismos péptidos (Figura 24 panel derecho).

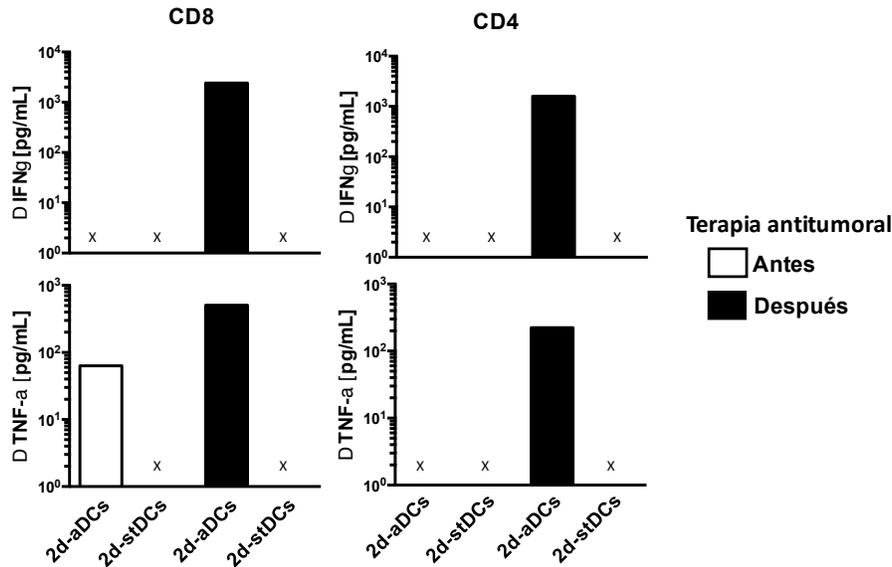


Figura 24. Mayor secreción de IFN- γ y TNF- α por LT CD8+ y CD4+ después de la terapia antitumoral es inducida por la estimulación de LT vírgenes con 2d-aDCs. Delta de la concentración de IFN- γ y de TNF- α en pg/mL (cultivo estimulado con DCs menos el cultivo control sin estimular) en los sobrenadantes de células T CD8+ y CD4+ vírgenes tomadas antes y después de la terapia antitumoral después de la estimulación durante 14 días y un re-estimulo por 6 días adicionales con 2d-aDCs o 2d-stDCs pulsadas con el péptido NY-ESO 1₁₅₇₋₁₆₅ (LT CD8+) y con el pool de péptidos HER2/neu₄₂₋₅₆, HER2/neu₉₈₋₁₁₄, y HER2/neu₃₂₈₋₃₄₅, HER2/neu₇₇₆₋₇₉₀, HER2/neu₉₂₇₋₉₄₁ y HER2/neu₁₁₆₆₋₁₁₈₀ de la proteína HER2/neu (LT CD4+). Los resultados de experimentos presentados son representativos de dos realizados.

Con el fin de examinar si la anti-TTx favoreció en la paciente MCC-002 la expansión de LT CD8+ de memoria específicos para TAAs-A2 (restringidos para epítopes TAAs HLA-A*02:01) expresados por el tumor, se comparó el grado de expansión y fenotipo de memoria de LT CD8+ específicos para tres TAAs-A2 de HER2/neu: HER2/neu₃₆₉₋₃₇₇, HER2/neu₆₈₉₋₆₉₇ y HER2/neu₄₃₅₋₄₄₃ en PBMCs antes y después de anti-TTx luego del estímulo con 2d-aDC pulsadas con un pool de estas tres epítopes mediante tinción con tetrámeros. Como control se comparó la expansión de células T CD8+ inducida por 2d-aDCs pulsadas con los antígenos virales HLA-A2 restringidos (CMV_{PP65}, EBV₂₈₀₋₂₈₈ y FLU₅₈₋₆₆ - Ver Tabla 7) entre las muestras antes y después de anti-TTx. La cuantificación con tetrámero de células T CD8+ que expandieron en respuesta al estímulo con el pool de péptidos virales indujo en

los cultivos después de anti-TTx una mayor expansión de LT CD8+ específicos para estos antígenos (porcentajes de células CD8+ tetrámero positivas en las muestras después y antes de anti-TTx fueron 0.22% y 0.09% respectivamente). En contraste a lo observado en respuesta a antígenos virales no hubo diferencia en el grado de expansión de LT CD8+ específicos para el pool de TAAs-A2 de la proteína HER2/neu entre las muestras antes y después anti-TTx (0.31% vs. 0.39% respectivamente en la Figura 25A).

En contraste con la ausencia de expansión de LT-CD8+ tetrámero positivos para las tres epítopes de la proteína HER2/neu, el fenotipo de memoria de las células tetrámero positivas si evidenció una marcada diferencia en la distribución de las sub-poblaciones de memoria de las células específicas para los antígenos virales y las específicas para tres TAAs-A2 de la proteína HER2/neu en las muestras antes y después de anti-TTx. Mientras la estimulación de LT CD8+ específicos de antígenos virales se caracterizó por una expansión de células con fenotipo TEM y TEMRA evidente tanto en la muestra antes como después de anti-TTx, la expansión de TEM y TEMRA en respuesta al pool de TAAs-A2 de HER2/neu solo fue evidente en la muestra después de anti-TTx (Ver Figura 25B). Lo anterior sugiere que mientras los LT CD8+ con fenotipo TEM y TEMRA específicos contra las epítopes virales expanden de manera independiente del estatus de la terapia anti-TTx, la expansión de células TEM y TEMRA específicas para antígenos tumorales solo fue evidente después de la terapia antitumoral (Ver Figura 25B).

El fenotipo efector observado en LT específicos de antígenos virales observado antes y después de anti-TTx sumado a la observación de que el fenotipo efector de las células T específicas de TAA solo pudo ser evidenciado en la muestra luego de anti-TTx señala que la respuesta de LT CD8+ a antígenos virales está preservada en el paciente con cáncer y que la anti-TTx restituye de manera específica la inmuno-vigilancia del tumor por LT-CD8+ antitumorales (Figura 25B). Una posible explicación a este resultado es que la restitución del fenotipo efector de LT CD8+ antitumorales inducida por anti-TTx sea atribuible a una expresión diferencial en LT específicos de TAAs de receptores inhibitorios de la respuesta de LT efectores como PD1, BTLA y CTLA-4 cuya expresión suele estar aumentada en LT infiltrantes de tumor (TIL) [103]. Para investigar esto se evaluó en los LT CD8+ tetrámero positivo la expresión de los receptores inhibitorios PD1, BTLA y CTLA-4 en superficie de estas células antes y después de anti-TTx. El análisis de la expresión de estos receptores en LT-CD8+ totales no mostró hallazgos significativos (dato no mostrados), sin embargo este análisis en LT-CD8+ anti TAAs-A2 en las muestras antes y después de la terapia

antitumoral luego de la estimulación con el antígeno mostraron un aumento en la expresión de CTLA-4 en LT-CD8+ específicas para el pool de TAAs-A2 de HER2/neu en la muestra después de anti-TTx (43 veces antes vs. 58 después de anti-TTx) sin cambios mayores en la expresión de este marcador en células específicas para el pool de antígenos virales. Por su parte, la expresión de PD1 o BTLA no evidenció ningún cambio de expresión ni en LT anti-TAAs ni en LT antivirales asociado a anti-TTx (Figura 25C).

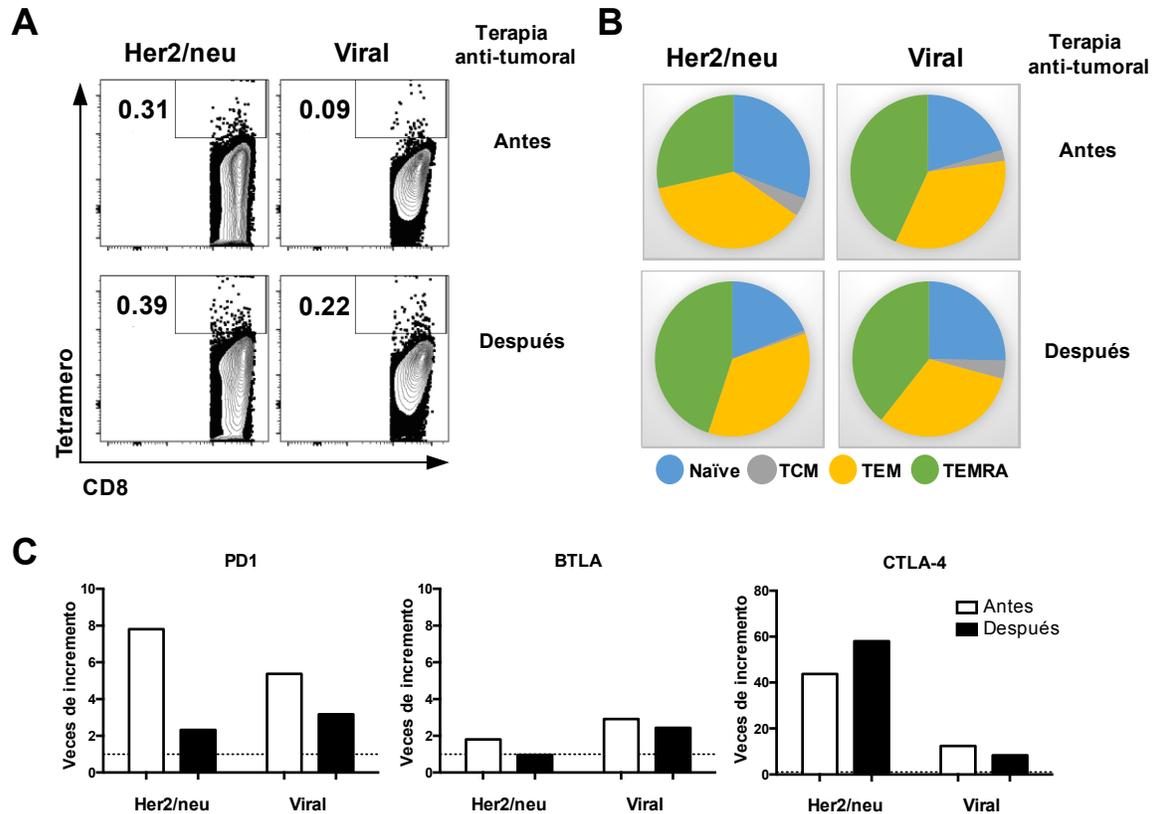


Figura 25. Evaluación del efecto del tratamiento antitumoral en la diferenciación de células efectoras y la expresión de receptores inhibitorios en LT anti-virales y anti-TAAs. (A) Expansión de LT CD8+ tetrámero positivos específicos para TAAs-A2 o para péptidos virales en LT CD8+ después de 6 días de estimulación con 2d-aDCs pulsados con péptidos HLA-A*02:01 restringidos (HER2/neu₃₆₉₋₃₇₇, HER2/neu₆₈₉₋₆₉₇ y HER2/neu₄₃₅₋₄₄₃, o péptidos virales CMV_{PP65}, EBV₂₈₀₋₂₈₈ y FLU₅₈₋₆₆). (B) Diagrama de distribución de las subpoblaciones naïve y de memoria en LT CD8+ tetrámero positivo (TAAs de HER2/neu o específico de antígenos virales) después de la estimulación con 2d-aDCs pulsados antes y después de anti-TTx (naïve - azul, TCM - gris, amarillo - TEM y verde - TEMRA). (C) Veces de incremento de la expresión de receptores inhibitorios (PD1, BTLA, y CTLA-4) entre LT CD8+ positivos frente a tetrámero positivo después de la estimulación con 2d-aDC pulsadas con péptido, obtenidas antes (barras blancas) y después (barras negras) de la terapia antitumoral.

En los resultados presentados hasta ahora se utilizó como antígeno un pool de antígenos TAAs-A2 de la proteína HER2/neu. Con el fin de precisar el efecto de anti-TTx en la respuesta efectora de LT CD8 antitumorales se midió tanto el grado de expansión como el

fenotipo efector de células tetrámero positivas específicas para cuatro epítopes TAAs-A2 expresadas por el tumor. Este análisis se realizó de manera individual en cada epítope tanto *ex vivo* como luego de su estimulación *in vitro* (Figura 26A paneles izquierdos) y se comparó con el de las células T CD8+ específicas para las epítopes virales CMV_{PP65}, FLU₅₈₋₆₆ (Figura 26A paneles de la derecha) y EBV₂₈₀₋₂₈₈ (dato no mostrado). El análisis del grado de expansión de LT CD8+ tetrámero positivas para las epítopes individuales reveló que no hubo diferencias importantes en los porcentajes de LT CD8+ tetrámeros positivas para la mayoría de antígenos tumorales o virales medidas *ex vivo* en muestras obtenidas antes y después de la terapia antitumoral a excepción del péptido de HER2/neu RLLQETELV que mostró un discreto incremento en la frecuencia posterior a la terapia (0.3 vs 0.7% respectivamente) (Figura 26A). Por otra parte, cuando las PBMCs fueron estimuladas *in vitro* con 2d-aDC en presencia de cada TAA, el análisis de la frecuencia de LT CD8+ tetrámero positivo evidenció un discreto aumento en respuesta a la epítope HER2/neu₃₆₉₋₃₇₇ (KIFGSLAFL) (0,42% antes vs. 0,72% después de la terapia antitumoral) y en menor medida en respuesta a NY-ESO1 (0,45% antes vs. 0,61% después). sin embargo, LT-CD8+ específicos para la epítope RLLQETELV luego de la estimulación experimentaron una disminución en su frecuencia después de la terapia antitumoral. Como control, se evidenció que la frecuencia de LT-CD8+ específicos para antígenos virales no cambió en relación con la terapia antitumoral (Figura 26B).

Los análisis *ex vivo* de la distribución de las cinco subpoblaciones de LT evaluadas (naïve, de memoria tipo stem, memoria central, memoria efectora y efectoras terminales – TEMRA) y de memoria dentro de LT CD8+ tetrámero positivos específicos para antígenos tumorales o virales no mostró diferencias importantes entre las muestras obtenidas antes o después de la terapia antitumoral (paneles derecho e izquierdo de la Figura 26C). Como se esperaba de acuerdo a los resultados presentados en la Figura 26B cuando se utilizó el pool de péptidos virales, una notable expansión de células T CD8+ TEMRA en muestras antes y después de anti-TTx tras la estimulación de las células *in vitro* durante seis días con péptidos virales individuales de CMV_{PP65}, y FLU₅₈₋₆₆ fue observada (Figura 26D derecha). De manera notable y similar a lo observado con células estimuladas con el pool de TAAs-A2 de la proteína HER2/neu, la estimulación de las células con TAAs-A2 individuales mostró una respuesta efectora similar de LT-CD8+ específicas a los antígenos tumorales después de la estimulación *in vitro* con cuatro epítopes tumorales diferentes sólo en muestras obtenidas después de la terapia antitumoral, no evidente en células obtenidas previo al tratamiento (Figura 26D paneles izquierdos) lo cual nos lleva a proponer que la terapia

antitumoral en esta paciente promovió eficientemente la capacidad de respuesta de LT-CD8+ efectores específicas de tumor (TEMRA). Basándose en el aumento de la expresión de CTLA-4 en LT-CD8+ específicas de TAA después del tratamiento, se evaluó la expresión de CTLA-4 en células tetrámero positivas. Se encontró un aumento sustancial en el porcentaje de expresión de CTLA-4 en HER2/neu₃₆₉₋₃₇₇; NY-ESO 1 y LT-CD8+ específicos de FLU posterior a la terapia (12,4% antes vs. 31,9% después; 10,1% vs. 19,7% y 10,2% vs. 19,0% respectivamente) sin cambios mayores en células específicas para el CMV (15,8% antes del 12,8% después del tratamiento) (Figura 26E).

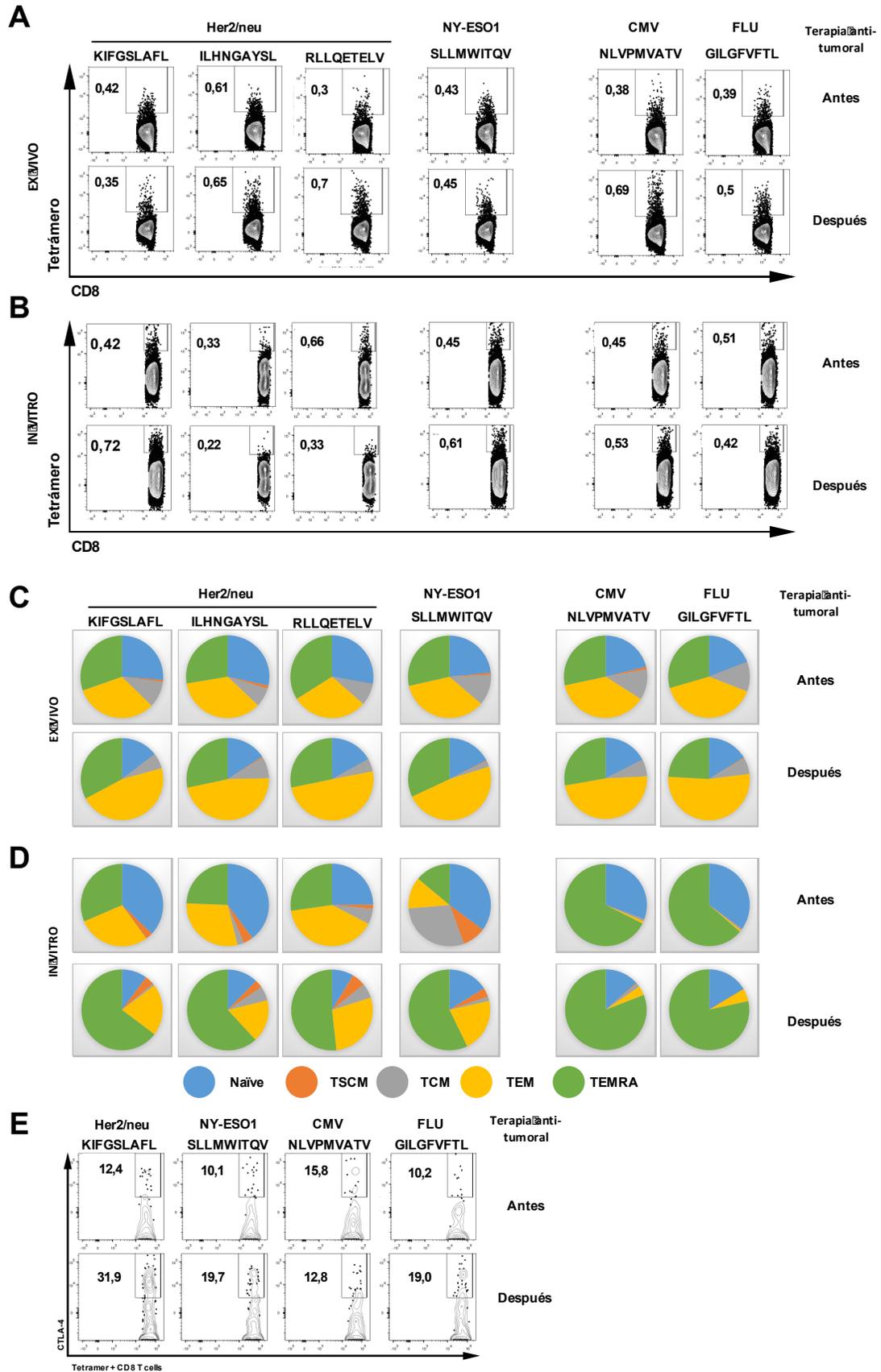
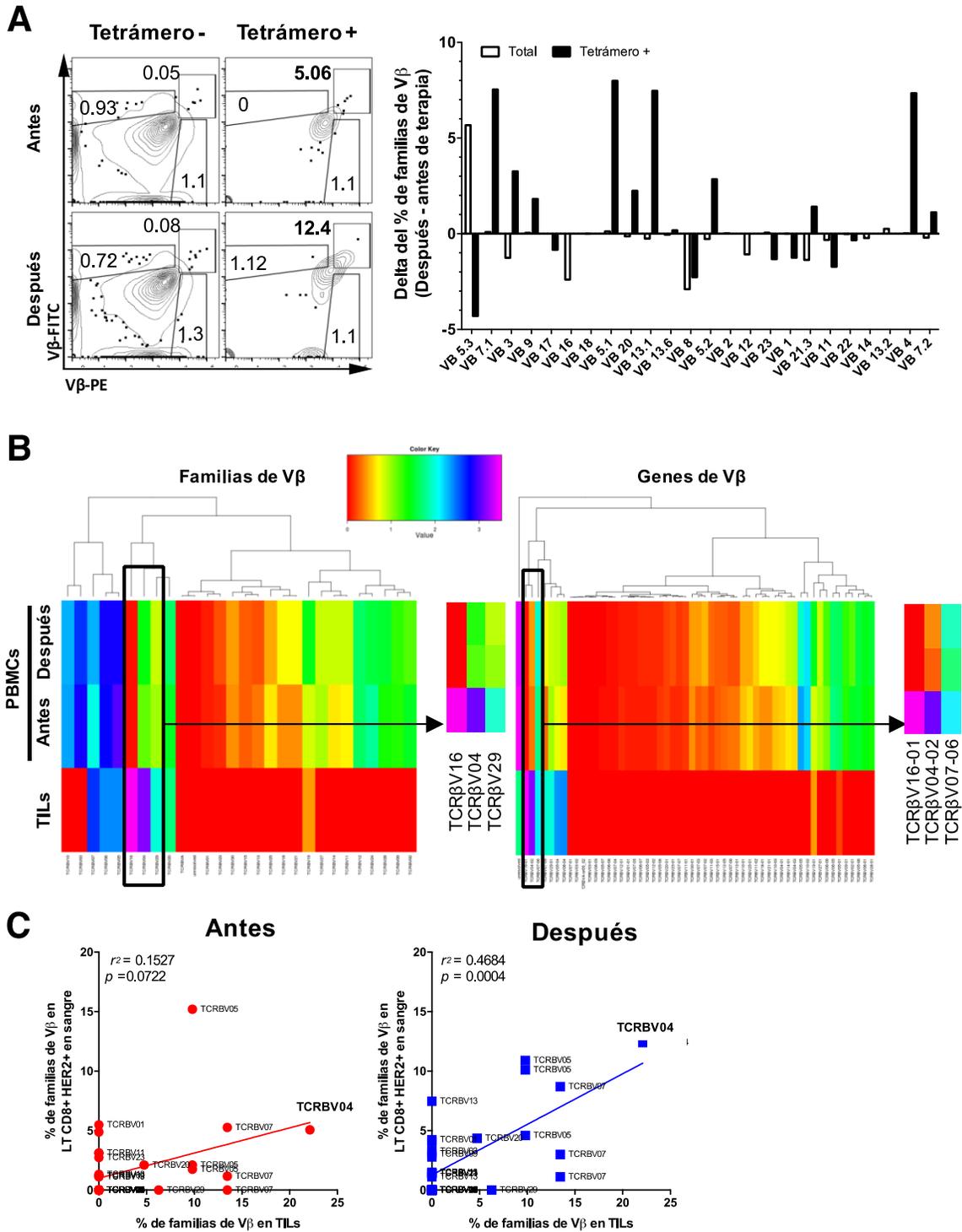


Figura 26. La terapia antitumoral induce expansión de LT CD8+ efectores específicos para cuatro TAAs-A2 y expresión de CTLA-4 en LT específicos de Her2/neu₃₆₉₋₃₇₇. (A) Patrones de contorno representativos de células T CD8+ específicas de tetrámero que tiñen para HER2/neu₃₆₉₋₃₇₇ (KIFGSLAFL), HER2/neu₆₈₉₋₆₉₇ (RLLQETELV), HER2/neu₄₃₅₋₄₄₃ (ILHNGAYSL) y NY-ESO 1₁₅₇₋₁₆₅ (SLLMWITQV), y dos tetrámeros para antígenos virales (NLVPMVATV - CMV_{PP65} y GILGFVFTL - influenza M1 FLU₅₈₋₆₆), teñidos ex vivo en células T CD8 + purificadas de la paciente MCC-002 antes y después de la terapia antitumoral. El número dentro de las gráficas representa el porcentaje de LT CD8+ específicos del tetrámero. (B) Patrones de contorno representativos de células T CD8 + específicas de tetrámero después de 7 días de estimulación in vitro con 2d-aDCs en PBMCs pulsadas con el péptido correspondiente, el número dentro de las gráficas representa el porcentaje de células T CD8 + específicas de tetrámero. Los resultados de los experimentos presentados en los paneles A y B son representativos de dos realizados. (C) y (D) Gráficos de pie ex vivo (C) o después de la estimulación in vitro de PBMC (D), tal como se describe en A y B, con el porcentaje de las subpoblaciones vírgenes y de memoria en células T positivas para tetrámeros CD8 + cuatro TAA y dos péptidos HLA-A*02:01 virales antes y después de la terapia. Azul; vírgenes, naranja; TSCM, Gris; TCM, amarillo; TEM; y verde TEMRA. Los resultados de los experimentos presentados en los paneles C y D son representativos de dos realizados. (E) Patrones de contorno representativos de la expresión de CTLA-4 en LT CD8+ tetrámero positivo para HER2/neu₃₆₉₋₃₇₇ (KIFGSLAFL) y NY-ESO1₁₅₇₋₁₆₅ (SLLMWITQV) y para dos antígenos virales (NLVPMVATV - CMVPP65 y GILGFVFTL - influenza M1 FLU58-66), en PBMCs estimuladas con 2d-aDC obtenidas antes y después de la terapia antitumoral como se describe en A y B. Los resultados de los experimentos presentados son representativos de dos realizados.

Para evaluar los cambios en el repertorio de LT CD8+ específicos de TAA en sangre periférica inducidos por la terapia antitumoral y su relación con linfocitos infiltrantes de tumor, se comparó mediante citometría de flujo el repertorio ex vivo de TCR-V β de LT-CD8+ positivas para HER2/neu₃₆₉₋₃₇₇ presentes ex vivo en PBMCs de la paciente MCC-002 antes y después del tratamiento. El porcentaje de 24 familias de V β en LT-CD8+ se comparó entre células tetrámero positivas y negativas tanto antes como después de la terapia (Figura 27A). Este resultado mostró que posterior a la terapia, las células positivas de tetrámero presentan un enriquecimiento de las familias V β 7.1, V β 9, V β 5.1, V β 20, V β 13.1, V β 5.2 y V β 04 (Figura 27A panel derecho). La especificidad y la frecuencia de las células T se genera por la reorganización somática de los genes TCR y se centra principalmente en la región de complementariedad 3 (CDR3). Esto se ha evaluado por espectratipo en combinación con la cuantificación de las familias de TCR-V β por citometría en pacientes con cáncer [135] haciendo estos sistemas útiles para la identificación de células T; sin embargo, técnicas recientes pueden secuenciar la región CDR3 permitiendo la cuantificación de cada TCR a nivel del gen [136]. Esta tecnología en combinación con la determinación de células tetrámero-positivas específicas para TAAs puede ser relevante para la evaluación de células T específicas para TAA en respuesta a la terapia antitumoral. Para establecer la identidad de estos TCRs, se secuenció la región CDR3 y se estimó el número de copias de transcritos en muestras de PBMCs obtenidas antes y después del tratamiento de la paciente MCC-002. Para evaluar la capacidad de infiltración tumoral de estas células, se realizó un análisis similar en los linfocitos infiltrantes de tumores (TILs) utilizando muestras de tejido tumoral obtenidos del espécimen quirúrgico del tumor de la paciente que fueron fijadas en

formol y embebidas en parafina (FFPE por sus siglas en inglés Formalin-Fixed-Parafin-Embedded) y cortadas con micrótomo (3 μ m). La Figura 27B muestra el perfil de las familias TCR V β (mapa de calor izquierdo) y de genes (mapa de calor derecho) en sangre antes y después de la terapia al igual que en TILs con aquellos en las frecuencias más altas resaltadas en los recuadros negros. A pesar de que ambos mapas de calor evidenciaron una gran variabilidad de las frecuencias de V β , en TILs, los resultados revelaron que las familias V β 16 y V β 04 junto con los genes correspondientes V β 16-01 y V β 04-02 estaban presentes en alta frecuencia (Figura 27B filas inferiores del mapa de calor).

Por último, al correlacionar la especificidad de TILs con la expansión de células T CD8+ específicas para HER2/neu₃₆₉₋₃₇₇ detectado en sangre por citometría, se comparó la frecuencia de las familias V β expresadas por las células tetrámero-positivas (Figura 27A) con la frecuencia de la misma familia de V β en TILs detectado por la secuencia TCR CDR3 (Figura 27B). De manera interesante, posterior a la terapia antitumoral, se encontró una mejor correlación (r^2) de V β s expresado por TILs con los V β de las células T CD8+ específicas para HER2/neu₃₆₉₋₃₇₇ (r^2 : 0,15 y r^2 : 0,47, antes y después de la terapia antitumoral respectivamente) con una alta correlación del V β 04 (Figura 27C). Estos resultados sugieren que la terapia indujo en la paciente MCC-002 un aumento en la frecuencia de LT CD8+ específicas de HER2/neu₃₆₉₋₃₇₇ en sangre que probablemente corresponden a LT infiltrantes de tumor cuyo aumento pudo ser detectado en la sangre periférica un año después de haber terminado la terapia antitumoral en la paciente MCC-002.



después menos la muestra previo al tratamiento de cada una de las 24 familias en las células negativas y positivas para tetrámero (barras vacías y negras respectivamente, derecha. **(B)** Mapa de calor de TCR secuenciados a partir de PBMC totales (antes y después de anti-TTx) y de linfocitos infiltrantes de tumores (TILs) obtenidos del tejido tumoral embebido en parafina. Las flechas señalan el recuadro de las familias y genes TCR V β altamente expresados en TILs. **(C)** Las gráficas de correlación de las familias V β de células positivas a tetrámeros HER2/neu₃₆₉₋₃₇₇ (rojo corresponde a la muestra antes de la terapia y azul corresponde a la muestra posterior a la terapia) analizada por citometría de flujo frente al porcentaje de familias V β obtenidas de TILs. Pre-quimioterapia r^2 : 0,152, valor p: 0,0722, post-quimioterapia r^2 : 0,468, valor p 0,0004 (análisis de regresión lineal).

Conclusiones

- DCs obtenidas a partir de monocitos de sangre periférica en dos días son fenotípica y funcionalmente similares a DCs derivadas en 7 días.
- DCs Tipo I Alfa productoras de altos niveles de IL-12 son eficientemente derivadas en dos días.
- Se implementaron dos sistemas de cultivo *in vitro* los cuales permiten la detección y análisis de LT-CD8+ específicos de antígenos tumorales en sangre periférica de pacientes con cáncer de mama y de individuos sanos.
- El uso de 2d-aDCs como APCs *in vitro* permite estudiar la diferenciación y análisis funcional de LT-CD4+ foliculares en sangre periférica.
- La terapia antitumoral restituye de manera específica la funcionalidad de LT-CD8+ específicos de antígenos tumorales.
- El uso combinado de análisis por citometría de flujo del repertorio V β de LT-CD8+ tetrámero positivas específicas de antígenos tumorales y del transcriptoma del tumor obtenido de biopsias embebidas en parafina permiten monitorear LT antitumorales en sangre periférica durante el tratamiento antitumoral.

CAPITULO 2. Utilidad del monitoreo de los compartimentos T y APC para predecir la respuesta clínica del tumor a la quimioterapia con A/C en pacientes con cáncer de mama.

Resumen

El tratamiento de elección para las pacientes con cáncer de mama tipo ductal invasivo (DIC) es la quimioterapia primaria con el esquema A/C (Doxorrubicina y Ciclofosfamida). En los últimos 10 años se han estudiado los efectos sobre el sistema inmune de ciertos agentes de quimioterapia incluyendo Doxorrubicina y Ciclofosfamida, donde en modelos animales existe un efecto claro inmuno-potenciador de estos y otros medicamentos. Sin embargo, los mecanismos involucrados en la respuesta clínica de pacientes con quimioterapia A/C no han sido claramente asociados con un efecto estimulante de la respuesta inmune de la quimioterapia.

En el presente capítulo se muestra la utilidad del inmunomonitorio de pacientes con cáncer de mama antes y después de la quimioterapia neo-adyuvante con A/C a partir de PBMCs para predecir la respuesta clínica al tratamiento. El modelo de inmunomonitorio se centra en la evaluación de dos compartimentos de la respuesta inmune: (i) la funcionalidad de las DCs derivadas de monocitos en respuesta al cóctel de citoquinas pro-inflamatorias para inducir su maduración – compartimiento APC, y (ii) la capacidad de respuesta de células T a un estímulo policlonal con perlas acopladas a anticuerpos contra CD3/CD28/CD2 – compartimiento de LT. En cada uno de los compartimientos se determinó diversas variables inmunológicas que permitió establecer los parámetros más relevantes basado en su valor predictivo.

En relación con el compartimiento APC, las pacientes antes del tratamiento presentan una respuesta limitada de DCs derivadas de monocitos a la presencia de citoquinas pro-inflamatorias reflejado en una baja expresión de CD83 y una reducción marcada de la secreción de IL-12p70. Por otro lado, en el compartimiento de células T, se observó en las pacientes recién diagnosticadas un impedimento de los LT para internalizar el TCR (medido por la disminución del MFI de CD3) y expresar marcadores de activación importantes como CD25, CD69 y parcialmente CD154 (CD40L). El efecto de la quimioterapia A/C sobre el sistema inmune fue posible evidenciarlo usando el modelo de inmunomonitorio, reflejado en una recuperación parcial en la capacidad funcional de los compartimientos tanto de

células APC (maduración de DCs y producción de IL-12) como en el compartimiento de LT (recuperación de la expresión de CD25 y CD69).

Finalmente, los diferentes parámetros inmunológicos evaluados se correlacionaron con parámetros de la respuesta clínica permitiendo describir marcadores con posible valor predictivo como la expresión de CD83 en DCs plasmacitoides y la internalización del TCR.

Racional

A nivel general es ampliamente reconocido el valor que tiene el sistema inmune para controlar los tumores; sin embargo, múltiples estudios tanto en modelos animales como en ensayos clínicos han mostrado la gran complejidad que representa el estudio de la respuesta inmune contra los tumores. Por lo anterior, es difícil concebir que la respuesta clínica en pacientes con cáncer de mama posterior a la quimioterapia esté asociada a cambios en el sistema inmune fácilmente detectables, o menos aún, que la regresión tumoral y la generación de inmunidad contra el tumor puedan ser atribuibles a mediciones simples del desempeño de algunas pocas funciones del sistema inmune. Por lo anterior es relevante poder establecer métodos de análisis que permitan integrar y analizar múltiples variables y determinantes inmunológicas con datos del comportamiento clínico del tumor durante el tratamiento.

Finalmente, consideramos que con análisis de regresión y determinaciones de curvas ROC (acrónimo de Receiver Operating Characteristic, o Característica Operativa del Receptor), es posible evaluar la utilidad en términos de sensibilidad y especificidad de mediciones inmunológicas orientadas a predecir una respuesta clínica favorable de los tumores a la quimioterapia neo-adyuvante con A/C.

En este capítulo se describe en primer lugar la implementación del abordaje experimental establecido en el **Capítulo 1** para el manejo de la muestra y el registro de múltiples mediciones inmunológicas en muestras de pacientes obtenidas pre y pos-quimioterapia, los cuales tuvieron que ser optimizados dado el limitado volumen de sangre al que se tuvo acceso y el bajo nivel de adherencia de las pacientes al estudio.

En conjunto los resultados presentados en este capítulo nos permiten argüir en favor de la utilidad que en un futuro cercano tendrá el monitoreo por CF multi-paramétrica de distintas funciones del sistema inmune como herramienta confiable para predecir la respuesta clínica de las pacientes con cáncer de mama sometidas a quimioterapia neo-adyuvante con Doxorubicina y Ciclofosfamida.

Marco teórico

Perfil inmunológico del paciente con cáncer

Existen múltiples evidencias que soportan la importancia de la respuesta del sistema inmune para controlar la progresión y respuesta al tratamiento de los tumores incluyendo el cáncer de mama [137]. Una medición clara del efecto del sistema inmune sobre la progresión del tumor se refleja en el buen pronóstico de la presencia de linfocitos infiltrantes de tumor (TILs) en cáncer de mama, principalmente en las pacientes triple negativas donde se ha mostrado que mejora la sobrevida y respuesta a la quimioterapia de estas pacientes [138, 139]. Adicionalmente se ha observado que la infiltración por TILs se asocia con una disminución en la frecuencia de metástasis[140]. En concordancia con la infiltración de LT, la presencia de LT CD8+ citotóxicos (CTLs), CD4+ helper y Linfocitos B (CD20+) son marcadores de buen pronóstico en relación con la sobrevida de las pacientes [137, 141]; un incremento de la frecuencia en el infiltrado de LT reguladores (FoxP3+) en relación con la frecuencia de CTLs predice una disminución en la progresión libre de enfermedad y sobrevida general en pacientes con cáncer de mama[142].

Dependiendo del nivel de expresión de diferentes marcadores el carcinoma de mama se clasifica en 4 sub-tipos[143]:

1. Luminal A: ER+ y/o PR+, HER-2- y Ki67 bajo.
2. Luminal B: ER+ y/o PR+, HER-2- y/o HER-2+ y Ki67 alto.
3. Her2+: ER- y HER-2+.
4. Tipo basal: ER-PR-HER-2- (triple-negativas) con expresión elevada de citoqueratina (CK)5/6 o expresión de EGFR.

Aunque el cáncer de mama HER-2+ y el tipo basal (triples negativos) tienen mal pronóstico en relación con otros subtipos, presentan mayor infiltración de linfocitos. Los tumores ER- presentan mayor grado de infiltración a comparación de los tumores ER+, pero incluye un fenotipo de infiltrados de Tregs [144] siendo un factor predictivo de mala respuesta en relación al tiempo libre de enfermedad.

Asociado a la infiltración de Tregs, se ha evidenciado la expresión de diferentes receptores inhibitorios como los que median la muerte programada (PD-1) y su ligando PD-L1 [144]. La expresión de los ligandos de PD-1 son inducibles por la presencia de IFN- γ [145, 146] favoreciendo la activación de PD-1 con el fin de inhibir la activación y proliferación de LT [147].

La evaluación *ex vivo* del infiltrado de células inmunes provenientes de diferentes tipos de tumores *ex vivo* por citometría de flujo, análisis por HCL y PCA, definen 5 perfiles inmunes que se asocian a la sobrevida, el marcador de la proporción entre CD4/CD14-DR- (>2) tienen mejor pronóstico de sobrevida a 30 meses [148]. El reciente desarrollo de la inmunoterapia con el uso de anticuerpos contra receptores inhibitorios, y propuestas de combinaciones con quimioterapia o radioterapia con el fin de mejorar su efectividad y reducir los efectos adversos asociados, resalta la necesidad de encontrar biomarcadores y ensayos *in vitro* por [149]:

1. La variedad de mecanismos de la inmunoterapia incluyendo anticuerpos contra PD-1, CTLA-4, terapia de transferencia de células, receptores quiméricos (CARs) y modificaciones al TCR [150];
2. La heterogeneidad de los tumores incluye mecanismos moleculares muy diferentes (por ejemplo, cáncer gástrico y cáncer de mama) cambiando los perfiles antigénicos;
3. Los múltiples sistemas de supresión inmune presentes en el microambiente tumoral.

Tras el reconocimiento de un antígeno tumoral por APCs y una adecuada presentación de dicho antígeno a LT, los LT citotóxicos (CTL) se expanden de manera clonal y buscan las células fuente del antígeno, en este caso células tumorales para erradicarlas[151]. En pacientes con cáncer claramente este proceso no ha sido efectivo ya que el tumor puede evadir la respuesta de LT por varios mecanismos como: (i) la localización inadecuada en el microambiente del cáncer de mama, donde los CTL no son capaces de alcanzar la célula tumoral productora de antígeno debido a la localización en el estroma u otra región; (ii) inmuno-edición, que conduce a una pérdida de antígeno o expresión de HLA que impide que los CTL detecten la célula tumoral; (iii) reclutamiento de células supresoras que expresan citoquinas o ligandos capaces de suprimir la función CTL; o (iv) expresión de ligandos de muerte que pueden desactivar o inducir apoptosis en las TILs [152].

Efecto de la quimioterapia neo-adyuvante (NAC) en las células tumorales y micro-ambiente tumoral

La evaluación directa de diferentes sub-poblaciones celulares que infiltran el tumor se realizó con un grupo limitado de muestras de biopsias y tumores de pacientes mediante un protocolo de arreglo de tejidos para la marcación simultánea de 23 muestras por corte, para un total de 80 zonas evaluadas. Sin embargo, los resultados de IHQ no presentaron diferencias importantes en relación con la terapia con A/C (Ver Anexo 8. Caracterización del microambiente tumoral asociado a la quimioterapia con A/C).

La gran mayoría de efectos supresores sobre la respuesta de LT es ejercido por el microambiente tumoral, con un efecto progresivo en correlación con la proximidad de los LT al tumor reflejado en un efecto sobre la cadena ζ [153]; sin embargo, en esta cohorte de pacientes fue posible detectar varios efectos supresores en sangre periférica. Las pacientes evaluadas presentaron una clara deficiencia en la capacidad funcional de LT ante el estímulo policlonal del TCR a comparación de las mujeres sanas evidenciado por una limitación en la internalización del TCR.

Además del efecto sobre la antigenicidad y la inmunogenicidad de las células tumorales, los agentes quimioterapéuticos empleados clínicamente para NAC pueden funcionar como verdaderos adyuvantes que hacen que las células tumorales emitan señales de peligro que estimulan respuestas inmunes innatas o adaptativas. Por ejemplo, los IFN de tipo I, producidos por células infectadas que normalmente perciben la señal de peligro emitida por el virus (por ejemplo, ARN viral), también parecen ser producido por tumores de mama bajo quimioterapia con antraciclinas. La producción de IFN tipo I en respuesta a las antraciclinas parece ser importante para una respuesta clínica favorable ya que se ha descrito recientemente un perfil relacionado con los IFN de tipo I que predice una respuesta clínica a la quimioterapia con antraciclinas en varias cohortes independientes de pacientes con cáncer de mama [154]. Notablemente, muchos quimioterapéuticos incluyendo cisplatino, etopósido, paclitaxel, topotecán y vinblastina también estimulan a las células tumorales para producir IFN- $\alpha\beta$ que favorecen la maduración de las DC, y en última instancia, mejoran las respuestas de las células T contra los tumores. Del mismo modo, IFN- $\alpha\beta$ estimula la expresión del MHC clase I por las células tumorales [154] y las células del estroma [155]. Vale la pena mencionar que la expresión de las moléculas MHC de clase I también pueden ser estimuladas en el tumor después del tratamiento con los agentes de quimioterapia como la Ciclofosfamida, Oxaliplatino o Gemcitabina [156] que mejora la inmunogenicidad de las células tumorales, por lo tanto, su eficiente muerte por CTLs.

A través de su acción directa sobre las células cancerosas, la radiación y aumenta la expresión de antígenos tumorales [157]. Dado el estrés de Retículo Endoplásmico (ER estrés) inducida por radiación o la quimioterapia con antraciclinas, péptidos asociados a moléculas MHC clase I en las células tumorales pueden derivar de los polipéptidos abortivos originados de la traducción de microRNA (miRNA) [158]. La desregulación de la expresión de miRNA observada en pacientes con cáncer de mama [159] está influenciada por la NAC con fármacos como epirubicina más paclitaxel y la combinación del análisis de miR-19a y

miR-205 en el suero de los pacientes puede predecir la quimiosensibilidad del cáncer luminal de mama a NAC con epirubicina más paclitaxel [160].

Los avances en las ciencias "ómicas" también han proporcionado información importante sobre la expresión de las firmas de genes relacionados con el sistema inmunológico que predicen la pCR de NAC en pacientes afectados por todos los subtipos principales de cáncer de mama, aumentando así el poder predictivo de los parámetros clínico-patológicos asociados a la respuesta inmune del paciente al NAC [161-165].

El manejo clásico de la patología tumoral intenta producir una toxicidad directa sobre las células cancerosas, sin ser esto suficiente para su completa destrucción; el daño espontáneo o producido por un fármaco a las células tumorales genera un microambiente inflamatorio de activación de efectores tempranos, al igual que la atracción de APCs, las cuales fagocitan las células en proceso de muerte y cargarán los antígenos una vez migren al encuentro con LT vírgenes para que se diferencien a células efectoras y a células de memoria específica contra el tumor. Las células efectoras deben haber adquirido receptores para quemoquinas y modular la expresión de distintas integrinas que les permite viajar desde el nódulo linfoide al tumor, lo cual es necesario para su eliminación. Estas células (en su mayoría LT-CD8+ y LT-CD4+), se activan a expensas de la estimulación de antígenos presentados por APCs en el contexto del Complejo Mayor de Histocompatibilidad (MHC) clase I y clase II respectivamente.

Para que este proceso ocurra, es necesario que ocurra un tipo especial de muerte de las células tumorales, y contrario a lo que se esperaba inicialmente, es la muerte por apoptosis la que dispara la cadena de eventos inmunológicos descritos, y no la muerte por necrosis [166], probablemente debido a que su desencadenamiento no depende del tipo de muerte *per se*, sino de la naturaleza de la célula o de los estímulos que la indujeron a su muerte [167]. Las células reaccionan ante agentes citotóxicos con alteraciones en la diferenciación celular, detención de la proliferación o muerte celular. La muerte por apoptosis de células tumorales ha sido demostrada en la presencia de la terapia con antraciclinas, como se mencionó anteriormente [31, 168-170]. En ensayos *in vivo* con Doxorubicina, se evidenció su mayor actividad tumoricida, mientras las condiciones inmunes del hospedero permanecen indemnes [171]. Sorprendentemente, a pesar de la infiltración del fármaco en células sanas, incluidas las células del sistema inmune, en algunos casos se ha demostrado que lejos de ser tóxicas para ellas estos fármacos potencian su acción antitumoral [172] (ver más adelante). Estas observaciones han llevado a considerar la posibilidad de

combinar este tipo de terapia antitumoral farmacológica con la terapia inmune, esta última en distintas modalidades que van desde la transferencia adoptiva de células hasta la infusión de citoquinas (IL-2 recombinante y el Factor de Necrosis Tumoral alfa (TNF- α)), entre otros. La combinación de quimio- e inmuno-terapia ha demostrado en varios estudios clínicos una remisión sostenida de los tumores y una prolongación del periodo de supervivencia [173-175] con limitada toxicidad. Estudios recientes en modelos animales, demuestran claramente que el tratamiento con Doxorubicina de células tumorales, incrementa su inmunogenicidad al punto que cuando son utilizadas como vacuna confieren inmunidad contra el tumor a expensas de LT-CD8+ antitumorales específicos [28, 31, 168-170, 176-178].

Hasta hace poco la quimioterapia y la inmunoterapia eran consideradas como tratamientos antagónicos. Siempre se ha considerado que el uso de agentes quimioterapéuticos no sólo afecta a las células tumorales, sino que también generan supresión medular secundaria que compromete la división de los linfocitos. Sin embargo, actualmente se ha encontrado evidencia de que estas dos estrategias pueden complementarse, e incluso potenciarse de diferentes maneras, incrementando las respuestas de LT antígeno tumoral específica [179],

Varios son los mecanismos propuestos como responsables de la inmunogenicidad de los tumores inducida por la quimioterapia. La generación de una muerte celular inmunogénica, acompañada de la expresión de proteínas de choque térmico (HSP) en la superficie de las células tumorales muertas ha sido analizada en estos casos [29]. Lo anterior estimula la activación de una respuesta inmune adaptativa antitumoral, que a su vez ayuda a erradicar las células de cáncer residual (Stem cells). Entre los agentes que se han identificado que producen una muerte celular de tales características se encuentran las antraciclinas (Doxorrubicina, Daunorubicina o Idarrubicina), los taxanos (docetaxel y Taxol), Imanitib, Bortezomib y la irradiación gamma [29].

Algunas de las características que se han encontrado en este tipo de muerte, es la translocación de moléculas que se encuentran a nivel intracelular a la superficie de la célula que entró en muerte celular programada, que incluso aparecen mucho antes de que ocurran cambios típicos de la apoptosis. Dichas moléculas incluyen la calreticulina (CRT, esta es una proteína soluble que actúa como chaperona en el Retículo endoplásmico y que está asociada con la modulación y homeostasis del calcio (Ca²⁺) y está involucrada en la presentación de péptidos en el MHC), y la fosfatidilserina como señal de inversión de la cara interna de la membrana plasmática hacia el medio extracelular. Éstas actúan como

una señal "cómeme" para las DCs, facilitando que las células tumorales sean fagocitadas, aumentando así el procesamiento y presentación de antígenos tumorales a los CTLs [180-183]. En experimentos con células de cáncer de colon murino (CT26) y fibrosarcoma (MCA205) tratadas con antraciclinas o radiación ionizante se encontró traslocación del 5-10% del contenido de CRT desde el retículo endoplásmico hacia la superficie celular en etapas tempranas del proceso, incluso antes de la exposición de la fosfatidilserina [30]. La traslocación de CRT estuvo acompañada de la expresión de ERp57 formando un complejo protéico en la superficie como indicador de estrés del retículo endoplásmico; este proceso de traslocación no ocurre en la muerte celular no inmunogénica [184, 185]. Al parecer la expresión de este tipo de señales no es suficiente para generar una muerte celular inmunogénica; se necesita simultáneamente la activación de toda una cascada de señalización que induce una muerte celular programada con la activación de algunas caspasas pero que generan inflamación [180, 183]. Además de lo anterior se ha observado que se requieren de otras señales como la liberación de núcleo-proteínas de la célula apoptótica como la proteína *High Mobility Group Box 1* (HMGB-1) la cual una vez liberada se fija al TLR-4 lo cual induce la maduración de las DCs [29]. La complejidad del proceso de activación de las DCs por células tumorales es sugerida por evidencia experimental a favor de que células tumorales deficientes en CRT tratadas con Doxorubicina no tienen la capacidad de inducir maduración de DCs a pesar de la adición de CRT y HMGB-1 de manera exógena [186].

Además de la Doxorubicina, actualmente se explora el poder adyuvante de otras moléculas que han mostrado ser capaces de inducir inmunogenicidad en los tumores *in vitro*. En este nuevo grupo de antineoplásicos se encuentran fármacos como los taxanos (docetaxel y paclitaxel), los cuales tienen su acción principal sobre la polimerización de los microtúbulos, aunque se ha descrito que a bajas dosis actúan sobre moléculas reguladoras del ciclo celular como p53 y p21, logrando la detención de la célula tumoral en fase G2 y favoreciendo la senescencia celular o la apoptosis [187-189]. Estudios *in vitro* con células de cáncer de mama muestran como el Taxol altera la expresión y funcionalidad de proteínas anti-apoptóticas de la familia Bcl2/Bcl-X(L) por disminución en el mRNA o fosforilación directa de éstas, favoreciendo la inducción de la apoptosis [190]. Adicionalmente, otros estudios han postulado la capacidad del Taxol de mimetizar ligandos de TLR-4 a altas dosis, con dosis normales se observa un incremento en la producción de IL-6. Este hallazgo muestra que el taxol involucra mecanismos de activación del sistema inmune innato para la inducción de apoptosis [187, 191]. Sin embargo, en diferentes líneas celulares de ovario y

carcinoma de mama la muerte inducida por taxol es independiente de caspasa 3 y caspasa 9 [192].

El receptor del factor de crecimiento epidermal 2 (HER2, HER2/neu o ErbB-2 del inglés human epidermal growth factor receptor 2) se sobre expresa entre 20% - 30% de los carcinomas de mama y está relacionado con la agresividad del tumor, una alta recurrencia y una disminución de la sobrevida de las pacientes [4, 193].

Además de las antraciclinas y los taxanos, se han empleado anti-inflamatorios no esteroideos (AINEs) logrando disminución de la masa tumoral en diferentes modelos como cáncer de colon [194, 195] y cáncer gástrico [196]. Al parecer el efecto apoptótico de medicamentos como la Mesalazina en carcinoma de colon, está relacionado con la inhibición de las ciclooxigenasas, favoreciendo de forma indirecta la acumulación de ceramidas, conocidas como potentes inmunomoduladores al actuar como quimio-atrayentes de CTLs [194, 197]. Finalmente, se ha reportado un aumento de Linfocitos Infiltrantes de Tumor (TIL) considerado como un factor pronóstico positivo en el seguimiento de la respuesta al tratamiento en carcinoma de colon con la administración del Sulindac [195].

Monitoreo de compartimentos de LT y células presentadoras de antígeno (APC) en sangre de pacientes con cáncer de mama en NAC

A pesar que todos los estudios sobre el microambiente tumoral para la identificación de biomarcadores con potencial para predecir las respuestas al NAC en cáncer de mama son alentadores, no existen sistemas de monitoreo basados en sangre para predecir la respuesta clínica al tratamiento. En pacientes con cáncer de mama bajo NAC, la identificación de marcadores predictivos de la respuesta clínica utilizando sangre completa es deseable, ya que esto ayudaría al ajuste de los regímenes de quimioterapia en tratar de lograr pCR en todos los pacientes tratados.

El análisis del microambiente tumoral presentado anteriormente conduce a la conclusión de que el crecimiento tumoral es al menos en parte el resultado de la falta de vigilancia inmune de las células tumorales por los compartimentos T y APC (para una revisión completa ver [198]). A pesar de la evidencia experimental que sugiere que NAC con antraciclinas induce MCI que favorece las respuestas antitumorales y los cambios en la contextura del tumor, el efecto estimulante de las antraciclinas en los compartimentos T y APC aún no se ha demostrado. Para abordar esto, en esta tesis se plantea la hipótesis que una respuesta

clínica favorable de las pacientes con cáncer de mama a NAC debe revertir la supresión en estos dos compartimentos. En un estudio reciente, diseñamos un sistema *in vitro* para monitorear en la sangre del paciente la respuesta antitumoral específica antes y después de la terapia antitumoral. Nuestros resultados sugieren que la respuesta clínica favorable es apoyada por la respuesta de linfocitos T específicos de antígenos tumorales inducidos por la terapia antitumoral [131].

Diseño experimental y metodología

En el presente capítulo, se evaluó la respuesta del sistema inmune en las pacientes con cáncer de mama sometidas a la quimioterapia con A/C desde diferentes compartimentos con el fin de definir un perfil inmunológico completo en las muestras obtenidas y poder así evidenciar si la quimioterapia primaria con el esquema A/C es capaz de modificar este perfil y si esta modificación se correlaciona con una respuesta clínica al tratamiento. Sin embargo, dado el bajo volumen de sangre obtenido de las pacientes previo y posterior a la quimioterapia (cantidad aprobada por el comité de ética fue de 20mL de sangre periférica), fue necesario optimizar el uso de esta muestra con el fin de extraer la mayor cantidad de información posible sin poner en riesgo los experimentos propuestos.

Mediante citometría de flujo multiparamétrica, se caracterizó la frecuencia y funcionalidad de las diferentes poblaciones celulares en PBMCs de cada paciente. Dichos análisis se agruparon de la siguiente manera: (i) Análisis de poblaciones celulares *ex vivo*, los cuales exploraron determinar la frecuencia de Tregs, MDSCs, DC mieloides y DCs plasmacitoides, y (ii) un sistema de cultivo de PBMCs en alta densidad que explora el compartimiento APC, compartimiento T y la generación de LT de memoria. Finalmente, todos los datos obtenidos se analizaron mediante una serie de modelos estadísticos multivariados con el fin de explorar la interacción de cada variable en el modelo propuesto y su posible relación con la respuesta clínica (Ver: CAPITULO 3. Aplicación de algoritmos automatizados para análisis multidimensional de la respuesta inmune).

Vinculación de pacientes, donantes sanas y obtención de muestras de sangre

Esta fase del estudio fue aprobada por el Comité de Ética del Instituto Nacional de Cancerología - Bogotá (Acta 018 de mayo 2012). Las pacientes y todas las donantes sanas firmaron el formato del consentimiento informado antes de tomar las muestras de sangre. Un total de 560 pacientes con diagnóstico patológico de cáncer de mama fueron entrevistadas en el Instituto Nacional de Cancerología y la Clínica del Seno (Bogotá-

Colombia) entre los años 2012 y 2015. De estas pacientes, el 36% eran elegibles para recibir tratamiento con Doxorubicina y Ciclofosfamida (A/C) en el esquema de quimioterapia neo-adyuvante (primaria) y el 22% del total de pacientes sobre expresaba Her2/neu. Un total de 17 pacientes con diagnóstico de carcinoma ductal invasivo (CDI) se incluyeron en el estudio.

De cada paciente se obtuvieron dos muestras de sangre (20 mL cada una) de uno a tres días antes de la primera dosis de quimioterapia y ocho a diez días después de la tercera dosis de quimioterapia A/C. Las mujeres sanas (HD), se utilizaron como controles (de edades similares a las pacientes). Las PBMC se aislaron por gradiente de densidad con Ficoll Hypaque (GE) y se crioconservaron en nitrógeno líquido en medio de congelación (RPMI-1640 50%, FBS 40% y 10% de DMSO) hasta su uso. Los datos clínicos de las pacientes incluidas se muestran en la Tabla 3. La respuesta clínica se evaluó por la clasificación residual de la carga de cáncer (RCB) [199]. La RCB se calculó basándose en el área del tumor primario, la celularidad general del tumor, el porcentaje de cáncer que es enfermedad *in situ*, el número de ganglios linfáticos positivos y el diámetro de metástasis más grande.

Tabla 3. Características clínico-patológicas de las pacientes

Característica clínica	n	Característica clínica	n
Edad (años) media 55.6		Clasificación de carga residual de cáncer (Residual Cancer Burden - RCB) [199]	
<50	6	RCB-III	0
>50	11	RCB-II	11
TNM (Estadio)		RCB-I	2
1	1	pCR	4
2	10	Receptor de estrógenos (ER)	
3	6	Positivo (>10%)	13
Estado clínico		Negativo (<10%)	4
IIA	2	Receptor de progesterona (PR)	
IIB	9	Positivo (>10%)	10
IIIA	6	Negativo (<10%)	7
IIIB	1	Ki-67	
Clasificación de ganglio linfático		Positivo (>14%)	4
cN0	3	Negativo (<14%)	13
cN1	10	Her2/neu	
cN2	4	Positivo	5
cN3	0	Negativo	12
Metástasis		Clasificación molecular	
No	17	Luminal A	3
Sí	0	Luminal B	10
		Tipo Basal	3
		Her2/neu	1

Citometría de Flujo

Para los análisis de diferentes subpoblaciones y fenotipo de LT y APC se usaron paneles de anticuerpos específicos. Para las subpoblaciones *ex vivo* en las PBMCs obtenidas de las pacientes antes y después del tratamiento y donantes sanas se cuantificó en un solo tubo: (i) células T reguladoras (Tregs), (ii) células supresoras derivadas de mieloides (MDSCs), y (iii) DCs mieloides y plasmacitoides, mediante la combinación de los siguientes anticuerpos: CD4-BV510, CD25-APC-Cy7, CD127-PE Cy5, FoxP3-Pacific Blue, Lin1-FITC (CD3, CD14, CD16, CD19, CD20, CD56), CD15-FITC, CD13-PE, CD33-PE, HLA-DR-PE Dazzle 594, CD11c-Alexa Fluor 700, CD123-PE Cy7 (todos de Biolegend), Arg1-APC (R&D Systems).

La estrategia de análisis para subpoblaciones *ex vivo* se representa en la Figura 28. Para el fenotipo de DC maduras, se utilizaron los siguientes anticuerpos: Lin1-FITC, HLA-DR-PE Dazzle 594, CD11c-Alexa Fluor 700, CD123-PE Cy7, CD83-PE Cy5, CCR7-Alexa Fluor 647 y CD86-PE (todos de Biolegend), la estrategia de análisis se representa en la Figura 32. Para el análisis de la internalización de TCR y los marcadores de activación de células T, se usaron los siguientes anticuerpos: CD3-FITC, CD154-APC, CD69-PE Cy7, CD25-PE (todos de Biolegend). Por último, para la cuantificación en el sobrenadante de la secreción de citoquinas, se miden mediante el kit de Cytometric Bead Array (CBA) humano Th1/2 y citoquinas inflamatorias (BD) después de la activación de células T y maduración de DCs respectivamente. Los datos de citometría de flujo se adquirieron utilizando el equipo FACS Aria II (BD) y se analizaron utilizando el programa FlowJo (Tree Star Inc.).

Evaluación funcional de la respuesta de APCs y LT

La capacidad funcional de las DCs derivadas de monocitos obtenidos de las pacientes y de los donantes sanas fue evaluada *in vitro* basado en la metodología descrita por Martinuzzi et al. [58]. Se cultivaron 10^7 PBMCs/mL en platos de 96 pozos fondo plano en medio AIM-V y estimulados con IL-4 y GM-CSF como se explicó en el Capítulo 1 (Ver Tabla 2) por 24 horas. Posteriormente se maduraron con la combinación de citoquinas pro-inflamatorias descritas para la maduración de DCs con el coctel estándar (TNF- α , IL-6, IL-1 β y PGE-2) y para la maduración de DCs con el coctel alfa (IFN- γ , IFN- α , TNF- α , IL-6, IL-1 β y Poly I:C) como lo describe Mailliard et al. [108, 200] (Ver Tabla 2).

La evaluación del nivel de maduración de DCs se determinó mediante CF por la expresión de CD83 en DCs, CD11c y HLA-DR positivas y negativas para Lin-1 (Figura 32), en los

cultivos de iDCs, 2d-aDCs y 2d-stDCs. Adicionalmente, a partir de los sobrenadantes de los cultivos de las DCs se cuantificó la secreción de IL-12p70 por el kit de CBA para citoquinas inflamatorias (BD).

Para la determinación del grado de respuesta de LT se empleó la metodología descrita en el Capítulo 1 (Ver Evaluación de la funcionalidad del compartimiento de LT). Adicionalmente, en los PBMCs estimulados con las perlas anti-CD3/CD28/CD2 se cuantificó la internalización del TCR por la disminución del MFI del CD3. Simultáneamente se determinó en LT (CD3+) la expresión de tres marcadores de activación CD69, CD25 y CD154 (CD40L) como se muestra en la Figura 35 (panel izquierdo).

Resultados

Caracterización fenotípica de Tregs, MDSCs y DCs *ex vivo*

El desarrollo de un tumor es consecuencia del escape de las células tumorales a mecanismos de inmuno-vigilancia los cuales al parecer son restablecidos por la terapia antitumoral [201].

Los tumores escapan a la vigilancia del sistema inmune por diferentes mecanismos y el monitoreo de estos mecanismos representa un importante desafío de la inmunología moderna. Dificultades del monitoreo del grado de inmuno-supresión del paciente con cáncer al momento del diagnóstico y de cómo ésta evoluciona con el trascurso del tratamiento son la complejidad de la respuesta inmune antitumoral y la dificultad de evaluar de manera fiable la respuesta antitumoral en sangre periférica. Con el fin de optimizar el manejo de una muestra de sangre de 20 mL para el monitoreo de pacientes con cáncer de mama en etapas tempranas del tratamiento, en este capítulo se monitoreó por citometría de flujo (FC), y haciendo uso de un panel de 15 anticuerpos fluoromarcados, la influencia del tratamiento con A/C en la funcionalidad de: (i) Linfocitos T reguladores (Tregs), (ii) células supresoras de origen mieloide (MDSCs), (iii) células dendríticas (DCs) primarias de origen mieloide y (iv) DCs de origen plasmacitoide.

En la Figura 28 se muestra la estrategia de análisis por CF. Inicialmente la selección para el análisis de células únicas se hizo utilizando los parámetros FSC-A vs FSC-H y SSC-H vs SSC-W y dentro de ellas, utilizando parámetros de tamaño y complejidad (FSC-A vs SSC-A), se definieron las poblaciones de células linfoides y de monocitos. Dentro de los monocitos se definieron dos poblaciones basados en la expresión de Lin-1 (marcador de

linaje, ver leyenda Figura 28) y CD15 vs la expresión de MHC clase II (HLA-DR). Dentro de células (Lin-1/CD15+; HLA-DR+) se estableció el porcentaje de dos sub-poblaciones de DCs primarias: (i) DCs mieloides (CD11c+ CD123-) y (ii) plasmacitoides (CD11c- CD123+); por otro lado, a partir de la población negativa para Lin-1/CD15 y HLA-DR se definieron las poblaciones: MDSCs como células CD33+/CD13+ y dentro de ellas se analizaron aquellas positivas para la expresión de Arginasa 1 (Arg-1). Finalmente, de la región linfoide determinada en células únicas utilizando FSC-A vs SSC-A, se estableció la región de LT-CD4+, en los que se evaluó la expresión de CD127 y CD25 con el fin de delimitar la población de Tregs como células (CD127- CD25+) dentro de las cuales se analizó la expresión del factor de transcripción FoxP3+ característico de Tregs [202].

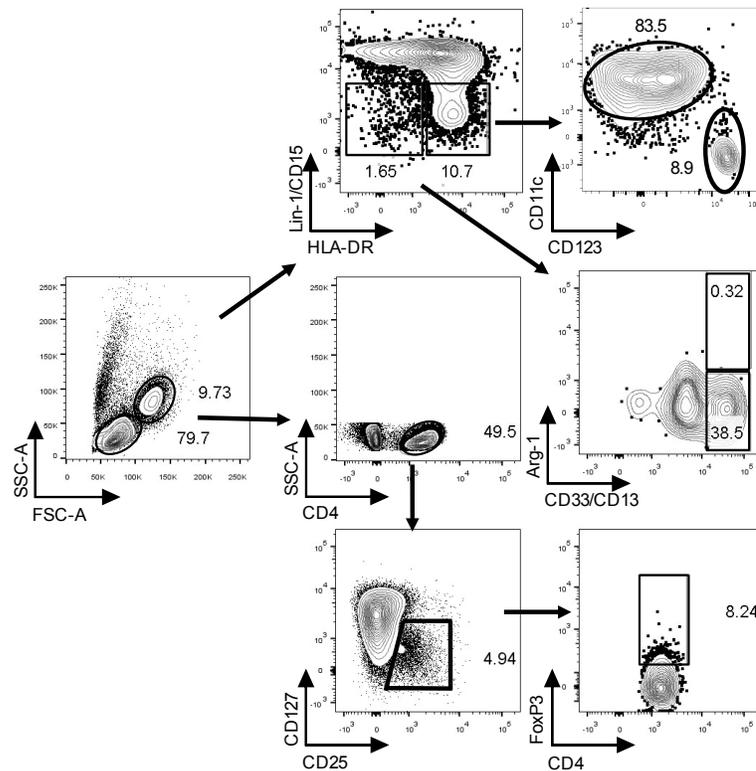


Figura 28. Estrategia y cuantificación ex vivo por CF de sub-poblaciones celulares en PBMCs. Ejemplo representativo del análisis ex vivo por CF de sub-poblaciones celulares en un donante sano. El análisis inicia con la selección de células únicas utilizando los parámetros (FSC-H y FSC-A); dentro de estas luego de definir las poblaciones linfoides y monocitos con base en sus características de tamaño y complejidad utilizando los parámetros (FSC-A y SSC-A) en células linfoides se delimitó la región de células CD4+ y dentro de éstas la población de Tregs (LT-CD4+ CD25+ CD127-) seguido del análisis de la expresión del factor de transcripción FoxP3. En la región de monocitos, se analizó el patrón de distribución de células marcadas con CD15/Linaje 1 (Lin-1: células marcadas con anticuerpos que reconocen células que expresan los marcadores CD14, CD19, CD56, CD3) y HLA-DR+; a partir de este análisis se definieron dos poblaciones: la primera, doble negativa (Lin-1- HLA-DR-) dentro de la cual la expresión de CD33/CD13 y Arginasa 1 fue utilizada para analizar la población de células MDSCs y la segunda (Lin-1 – HLA-DR+) dentro de la cual se estudiaron dos sub-poblaciones de DCs primarias: DCs mieloides (CD11c+ CD123-) y DCs plasmacitoides (CD11c- CD123+).

Monitoreo del porcentaje de Linfocitos T reguladores (Tregs) ex vivo

Las células Tregs se definen fenotípicamente como Linfocitos T CD4+ que expresan CD25 (la cadena alfa del receptor de IL-2), son CD127 negativos (receptor de IL-7) y que expresan el factor de transcripción FoxP3. Esta población se encuentra incrementada en pacientes con cáncer (incluyendo el cáncer de mama) y han sido blanco de nuevos enfoques de la quimioterapia como el uso de dosis metronómicas de Ciclofosfamida con las que se buscan su disminución [203]. Si bien el papel supresor de Tregs en cáncer ha sido evidenciado tanto en sangre periférica como en linfocitos infiltrantes de tumor en pacientes con cáncer de mama en estados avanzados de la enfermedad [144, 204-206], en la cohorte de pacientes estudiada por nosotros, no se encontró una diferencia significativa en el porcentaje de LT-CD4+ CD25+ CD127 o LT-CD4+ CD25+ CD127- FoxP3+ entre donantes sanas y pacientes ni dentro de éstas, en los niveles antes y después de tres ciclos de quimioterapia neo-adyuvante con A/C (Figura 29 panel central e izquierdo respectivamente).

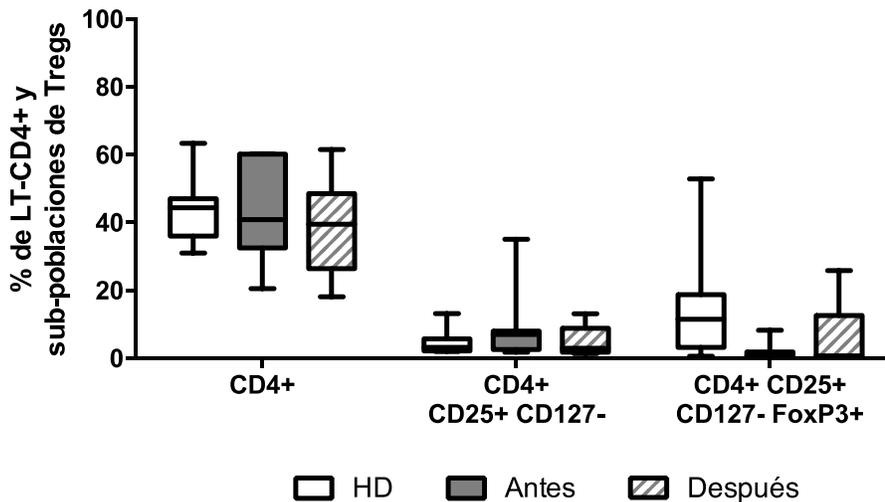


Figura 29. Cuantificación ex vivo del porcentaje de LT CD4+ supresores. Determinación del porcentaje de diferentes poblaciones de LT (CD4+, CD4+CD25+CD127- y CD4+CD25+CD127-FoxP3+) en los tres grupos de mujeres analizadas, Donantes sanas (HD – barras blancas n=10), pacientes antes de la quimioterapia (Antes – barras grises, n=12) y muestras de pacientes luego de tres ciclos de quimioterapia (Después – barras con rayas, n=12). Se muestra la dispersión de los datos en caja y bigotes (5-95%). Cada grupo se analizó mediante ANOVA de dos vías con post test de Bonferroni.

Células supresoras de origen Mieloide (MDSCs)

La población de células supresoras de origen Mieloide (MDSCs) juega un papel importante en la supresión de la respuesta inmune en pacientes con cáncer. En cáncer de mama, esta población se ha visto incrementada en estadios avanzados de la enfermedad [206]. En modelos de cáncer en ratón, estas células ejercen una función supresora de la respuesta inmune mediante diferentes mecanismos como la producción de Arginasa, la secreción de TGF- β e iNOS, entre otros [207, 208]. Sin embargo, en pacientes con cáncer de mama no existe un consenso acerca del fenotipo de estas células ya que su origen ha sido descrito a partir de al menos dos tipos de linaje: células mononucleares inmaduras similares a monocitos, y células polimorfo-nucleares similares a neutrófilos que a su vez se derivan de diferentes linajes (monocitos, neutrófilos y polimorfos, entre otros). Actualmente se proponen diferentes sub-clasificaciones de MDSCs, dependiendo de la combinación de marcadores evaluados en estas células (HLA-DR, LIN-1, CD14, CD45, CD11b, CD33, CD13, CD15, p-STAT1) [209]. Para su evaluación en las muestras de las pacientes con cáncer de mama en este estudio las MDSCs se definieron con los siguientes marcadores: HLA-DR, LIN-1, CD33, CD13, CD15 y Arginasa 1 (Arg1). Como se muestra en la Figura 30, la evaluación del porcentaje de MDSCs en las pacientes no mostró ningún cambio con respecto a los niveles de MDSCs observados en las muestras de donantes sanas. Tampoco hubo cambios en los porcentajes de las poblaciones de MDSCs analizadas dentro del grupo de pacientes en relación con el estatus de tratamiento (Figura 30).

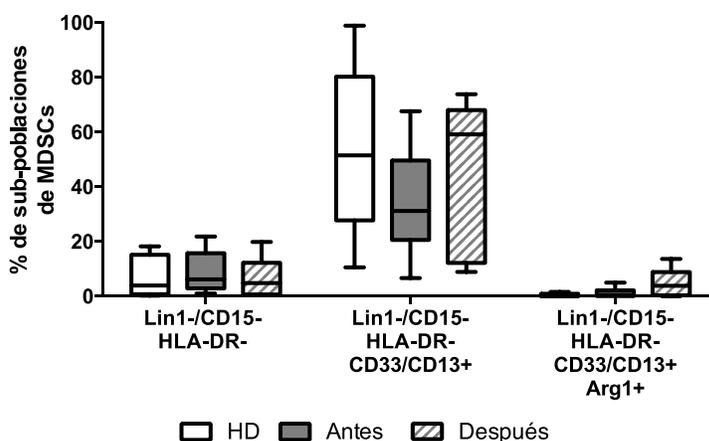


Figura 30. Cuantificación ex vivo del porcentaje de MDSCs. Determinación del porcentaje de diferentes poblaciones de MDSCs totales definidas como (Lin-1-/CD15- HLA-DR-); Lin-1-/CD15- HLA-DR- CD33/13+) y Lin-1-/CD15- HLA-DR- CD33/13+ Arginasa 1+ determinados por CF en los tres grupos de donantes analizados. Donantes sanas (HD – barras blancas n=10), pacientes antes de la quimioterapia (antes – barras grises, n=12) y muestras de pacientes posterior a la quimioterapia (Después – barras con rayas, n=12). Se muestra la dispersión de los datos en caja y bigotes (5-95%). Se analizó cada grupo mediante ANOVA de dos vías con post test de Bonferroni.

Cuantificación de células dendríticas mieloides y plasmacitoides

En una publicación previa hecha por Pinzón-Charry y col, la evaluación *ex vivo* de la frecuencia de células dendríticas (DCs) en sangre de pacientes con cáncer de mama avanzado reveló no solo disminución del porcentaje de éstas sino además un compromiso de su capacidad de respuesta a algunos estímulos *in vitro* [45]. El análisis de las dos principales sub-poblaciones de DCs (mieloides y plasmacitoides) que circulan en sangre de las pacientes reveló al igual que en el caso de Tregs y MDSCs, que no hubo diferencias estadísticamente significativas entre los porcentajes establecidos por FC de estas células en sangre de pacientes y donantes sanas. Además, los resultados presentados en la Figura 31 muestran que los niveles de los dos tipos de DCs no experimentaron cambios de importancia asociados a la administración de la quimioterapia.

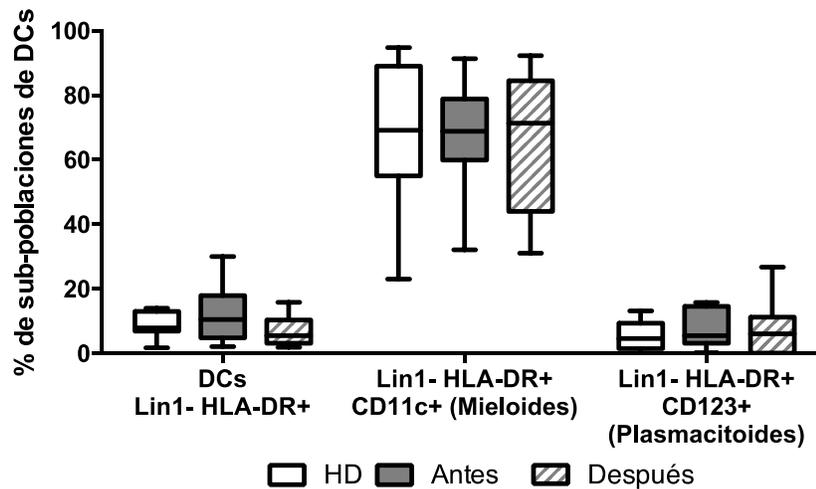


Figura 31. Cuantificación *ex vivo* del porcentaje de células dendríticas en sangre. Determinación del porcentaje de DCs totales en sangre definidas como células (Lin-1- HLA-DR+), de DCs mieloides (Lin-1- HLA-DR+ CD11c+ CD123-) y DCs plasmacitoides (Lin-1- HLA-DR+ CD11c- CD123+), en los tres grupos de mujeres analizadas, Donantes sanas (HD – barras blancas n=10), pacientes antes de la quimioterapia (Antes – barras grises, n=12) y muestras de pacientes posterior a la quimioterapia (Después – barras con rayas, n=12). Se muestra la dispersión de los datos en cajas y bigotes (5-95%). Se analizó cada grupo mediante ANOVA de dos vías con post test de Bonferroni.

Análisis funcional del compartimiento de células presentadoras de antígeno (APC)

A través de diferentes mecanismos, el microambiente tumoral modula la capacidad funcional de los compartimientos de células T y APC [198, 210]. Este microambiente tumoral en pacientes con cáncer de mama afecta la capacidad de maduración de DC [210, 211] y la función de las células T [212]. Sin embargo, se desconoce el efecto de tres ciclos de

quimioterapia con A/C en la funcionalidad de los compartimentos T y APC y si esto se puede evaluar en sangre periférica de las pacientes tratadas.

Para evaluar el efecto de la terapia antitumoral sobre la capacidad funcional del compartimento APC, se estableció un sistema *in vitro* para analizar la expresión de varios marcadores de maduración (CD83, CCR7 y CD86), en DC derivadas *in situ* a partir de monocitos presentes en PBMCs tratados por dos días con el cóctel de citoquinas pro-inflamatorias Alfa (2d-aDCs) (**Capítulo 1**) [58] y en DC mieloides y plasmacitoides primarias presentes en PBMCs (población de células Lin-1- HLA-DR+ CD11c+ CD123- y Lin-1- HLA-DR+ CD123+ CD11c- respectivamente - Figura 32).

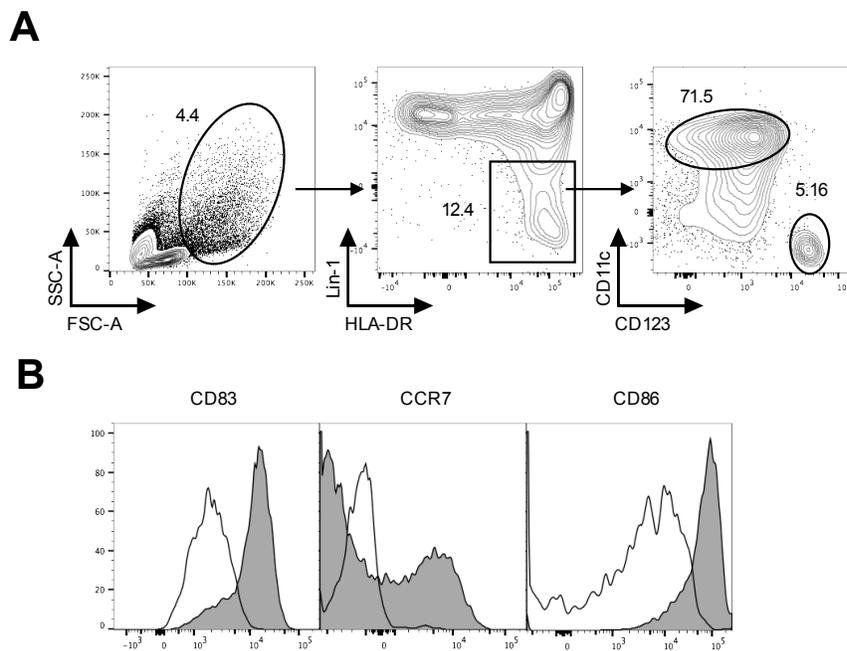


Figura 32. Estrategia de análisis del grado de maduración de 2d-aDCs primarias y derivadas *in situ* a partir de monocitos presentes en PBMCs. (A) Estrategia de análisis por CF de DCs mieloides (Lin1- HLA-DR+ CD11c+) y plasmacitoides (Lin1- HLA-DR+ CD123+) en PBMCs de una donante sana (una muestra representativa de 10 donantes sanas analizadas). Panel izquierdo, gráfica de puntos en que con base en los parámetros SSC-A vs FSC-A se delimita la región de monocitos. Panel central, gráfico de contornos en que se presentan cuatro sub-poblaciones de células monocíticas resultado de la marcación de las células con Lin-1 (un grupo de anticuerpos específicos para los marcadores CD3, CD14, CD19, CD56) y un anticuerpo anti-HLA-DR. Panel derecho, patrón de tinción de células Lin-1 negativas HLA-DR+ con anti-CD11c+ (DCs mieloides) vs anti-CD123 (DCs plasmacitoides). (B) Histogramas representativos del grado de maduración de DCs mieloides (Lin1- HLA-DR+ CD11c+) detectadas en PBMCs luego de cultivo por dos días en medio AIM-V con GM-CSF e IL-4 y en las últimas 24 horas suplementado (DCs maduras) o no suplementado (DCs inmaduras) con el coctel de citoquinas utilizado para madurar DCs alfa (IL-6, TNF- α , Poly I:C, IFN- γ , IFN- α e IL-1 β). El grado de maduración fue estimado con base en el porcentaje de células que expresan los marcadores CD83, CCR7 y CD86 en DCs (inmaduras – histograma vacío) y DCs maduras (histograma gris).

Como se esperaba, después de la estimulación de PBMCs con citoquinas pro-inflamatorias utilizadas para madurar aDCs (IL-6, TNF- α , Poly I:C, IFN- α , IFN- γ e IL-1 β), 2d-aDCs derivadas *in situ* de monocitos provenientes de donantes sanas (HD) mostraron una respuesta positiva al estímulo pro-inflamatorio, evidenciado por el aumento de la expresión de CD83, CD86 y CCR7 en comparación con DCs inmaduras (Figura 32B). CD83 fue seleccionado como un marcador importante para identificar DCs maduras con base en resultados previos de nuestro grupo [56] (Ver Figura 5). Las diferencias en porcentaje de DCs que expresan CD83 en respuesta a la maduración entre DCs maduras e inmaduras de donantes sanas (HD) y pacientes antes y después del tratamiento son presentados en la Figura 33. En contraste con lo observado en DC de HD, en el grupo de pacientes, las DC derivadas de monocitos y DC mieloides antes de la terapia exhibieron una expresión reducida de CD83 en respuesta al estímulo de maduración con el cóctel de citoquinas alfa ($p < 0,001$ y $p < 0,01$, respectivamente). Este porcentaje fue restaurado en las DCs mieloides (CD11c+) después de tres ciclos de quimioterapia (Figura 33). En contraste con lo encontrado en DC mieloides se encontró que, en respuesta al estímulo, la expresión de CD83 en DC plasmacitoides de pacientes (bien sea antes o después de la quimioterapia) y en HD fue similar (Figura 33).

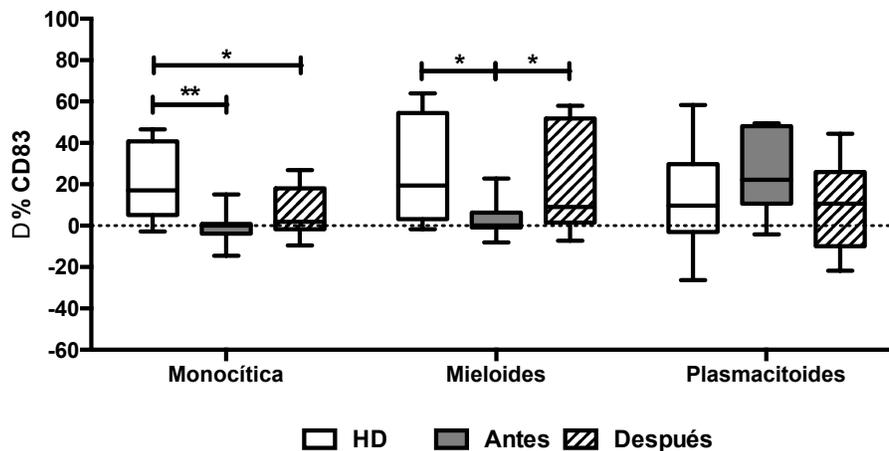


Figura 33. APCs de pacientes con cáncer de mama antes de la quimioterapia exhiben una limitada capacidad de maduración en respuesta a un estímulo pro-inflamatorio. La diferencia (del porcentaje de expresión de CD83 (Δ - CD83) corresponde a la diferencia de porcentaje de células CD83+ en Monocitos, DCs Mieloides y DCs Plasmacitoides presente en PBMCs estimulados o no con un estímulo pro-inflamatorio. El porcentaje Δ - CD83 de cada tipo de APC fue establecido por FC luego de cultivar PBMCs de donantes sanas (HD – barras blancas $n=10$), de pacientes antes de la quimioterapia (Antes – barras grises, $n=17$) y de pacientes posterior a la quimioterapia (Después – barras con rayas, $n=12$) en medio AIM-V con GM-CSF + IL-4 por dos días de los cuales las últimas 24 horas el medio fue (i) suplementado o (ii) no suplementado con el cóctel de citoquinas pro-inflamatorias utilizado para madurar aDCs (IL-6, TNF- α , Poly I:C, IFN- γ , IFN- α e IL-1 β). La dispersión de los valores Δ - porcentaje CD83+ en cada uno de los tres grupos de células se presenta en diagrama de caja y bigotes (5-95%); en que se señalan los datos extremos. Los valores fueron procesados mediante ANOVA de dos vías con post test de Bonferroni. * $p < 0.05$ y ** $p < 0.01$.

Además de la medición de CD83 para evaluar la funcionalidad DCs en respuesta a un estímulo pro-inflamatorio, se midió la secreción de IL-12p70 (IL-12) en sobrenadantes de cultivo de PBMCs estimulados o no con el coctel de citoquinas pro-inflamatorias utilizadas para diferenciación y maduración de Alfa-DCs *in situ* [108]. Mientras que una producción significativa de IL-12 graficada como Δ IL-12p70 en pg/mL en la Figura 34 y que corresponde a la diferencia en concentración de IL-12 en el sobrenadante de PBMCs suplementados con el coctel de citoquinas pro-inflamatorias menos la concentración de IL-12 en el sobrenadante de iDCs en la muestra control (PBMCs cultivados sin citoquinas pro-inflamatorias) fue registrada en sobrenadantes de DCs de HD (mediana 200 pg/mL), una reducción significativa en la secreción de IL-12 en células de pacientes previo a la quimioterapia (media 0.3 pg/mL). El hecho de que el análisis pareado de la producción de IL-12 entre las muestras de las pacientes antes y después de tres ciclos de A/C mostró un incremento estadísticamente significativo en la concentración de IL-12 producido por DCs maduras en las muestras de las pacientes después de la quimioterapia (media 274 pg/mL), es evidencia a favor de que la quimioterapia restituye en las pacientes la capacidad de DCs para producir IL-12 (Figura 34). En conjunto, los resultados de respuesta al estímulo de maduración y secreción de IL-12 de DCs, muestran un notable defecto en el compartimiento APC de las pacientes antes del tratamiento que se recupera después de tres ciclos de quimioterapia neo-adyuvante con A/C.

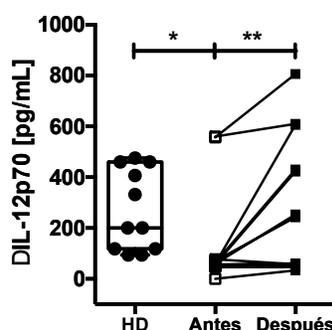


Figura 34. La deficiente producción de IL-12p70 detectada en DCs de pacientes con cáncer de mama al momento del diagnóstico se restablece luego de tres ciclos de quimioterapia. Δ IL-12p70 (pg/mL) representa diferencias en pg/ml en la contracción de IL-12 detectada en sobrenadantes de cultivo de PBMCs de donantes sanas (HD, n=10), de pacientes antes de la quimioterapia (Antes, n=17) y de pacientes luego de tres ciclos de quimioterapia (Después, n=12) cultivados en medio AIM-V en presencia de GM-CSF + IL-4 por dos días y suplementado o no durante las últimas 24 horas con el coctel de citoquinas pro-inflamatorias para madurar aDCs *in situ* (IL-6, TNF- α , Poly I:C, IFN- γ , IFN- α e IL-1 β). La dispersión de los valores en el grupo HD se presenta en diagrama de caja y bigotes (5-95%) en que se señalan los datos extremos. Los valores fueron procesados mediante ANOVA de dos vías con post test de Bonferroni. Análisis pareado no paramétrico con prueba de los rangos con signo de Wilcoxon. * $p < 0.05$ y ** $p < 0.01$.

Análisis funcional del compartimiento de LT en pacientes con cáncer de mama

Además del compromiso funcional del compartimento APC, en pacientes con cáncer de mama también se han reportado defectos funcionales en diferentes sub-poblaciones de LT [128]. En el **Capítulo 1** se reveló una importante limitación funcional de LT-CD8+ específico de antígenos tumorales que se recupera luego de la terapia antitumoral en la paciente MCC-002 [131]. Con el fin de evaluar la capacidad de respuesta de las células T *in vitro* y de analizar el efecto de la terapia antitumoral con A/C en esta respuesta, se estimularon PBMCs de pacientes antes y después de la quimioterapia primaria con A/C y de HD con perlas acopladas a anticuerpos contra CD3/CD28/CD2 durante 24 horas. Después de la estimulación *in vitro*, los LT de HD mostraron una eficiente internalización del receptor de células T (TCR) evidenciada por la reducción de la intensidad de fluorescencia media (MFI) de CD3 luego de 24 horas de estímulo (Figura 35A). El análisis pareado del MFI de CD3 en células obtenidas de donantes sanas estimuladas y no estimuladas mostró que la internalización provocada por el estímulo fue estadísticamente significativa en los individuos sanos examinados (Figura 35B panel izquierdo). Cuando se comparó el grado de internalización de CD3 (delta del MFI de CD3 en LT estimulados menos MFI en células no estimuladas), entre donantes sanas (MFI CD3 -6013) y pacientes pre- (MFI CD3 -826) o pos-quimioterapia (MFI CD3 -1636) se observó una deficiencia significativa en la internalización del CD3 en LT de las pacientes (Figura 35B panel derecho).

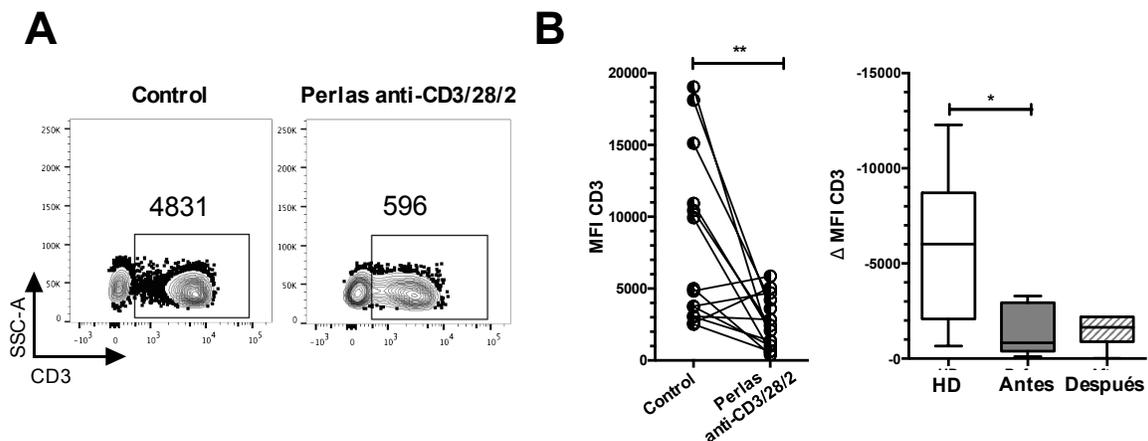


Figura 35. Estimulación *in vitro* de PBMCs evidencia una baja capacidad de internalización del TCR en las pacientes con cáncer de mama. (A) Gráfica de contornos (SSC-A vs CD3) en la que se cuantifica el MFI de CD3 en una muestra de PBMCs de una donante sana sin estimular (MFI de CD3 = 4831) y 24 horas luego de la estimulación *in vitro* con perlas acopladas a anticuerpos contra CD3/CD28/CD2 (MFI de CD3 = 596) (se presenta un ensayo representativo de 12 realizados). **(B)** Análisis pareado de la cuantificación del delta de MFI de CD3 en 12 donantes sanas antes (control) y luego de la estimulación por 24 horas *in vitro* con perlas anti-CD3/28/2 (panel izquierdo); Cuantificación de la diferencia del MFI de CD3 (Δ MFI CD3: delta del valor MFI en

células estimuladas menos valor del MFI en células no estimuladas) en donantes sanas (HD – barras blancas n=12), pacientes antes de la quimioterapia (Antes – barras grises, n=17) y muestras de pacientes posterior a la quimioterapia (Después – barras con rayas, n=17). Se muestra la dispersión de los datos en caja y bigotes (5-95%). Se analizó cada grupo mediante ANOVA de dos vías con post test de Bonferroni. * p<0.05, ** p<0.01.

El proceso de internalización TCR se acompaña de la expresión de diferentes señales de activación en la superficie de las células T tales como el aumento de la expresión de la cadena alfa del receptor de IL-2 (CD25), la expresión del ligando para CD40 denominado CD40L (CD154) y la expresión de CD69 [61, 213]. Además de medir la internalización de CD3, se cotejó en células T de las pacientes y en donantes sanas (HD) el fenotipo de activación de LT (expresión de CD25, CD154 y CD69) en respuesta a la estimulación con perlas anti-CD3/CD28/CD2 *in vitro*. Estos experimentos mostraron una mayor expresión de CD25, CD154 y CD69 en superficie de LT-CD3+ en respuesta a la estimulación (Figura 36A). Sin embargo, cuando se comparó el delta de MFI (MFI de cada marcador en células estimuladas menos MFI en células no estimuladas), entre HD y pacientes con cáncer de mama antes y después de la quimioterapia, se observó una pequeña diferencia en la expresión de CD25 ($p = 0,08$) (Figura 36B, panel izquierdo) y una disminución significativa de la expresión de CD69 en LT-CD3+ de las pacientes antes y después de la quimioterapia (Figura 36B, panel central). En relación con la expresión de CD154 en respuesta al estímulo, se observó una expresión limitada estadísticamente significativa de CD154 en superficie de LT de las pacientes antes de la terapia comparada con la expresión de esta molécula en LT de HD (Figura 36B, panel de la derecha). El hecho de que no hubo diferencia significativa de la expresión de CD154 en LT estimulados de las mismas pacientes después de quimioterapia, sugiere una recuperación de esta función en LT posterior a la quimioterapia. En conjunto, estos resultados sugieren una capacidad funcional limitada de LT-CD3+ en pacientes con cáncer de mama antes del tratamiento que se recuperan parcialmente después de tres ciclos de quimioterapia A/C.

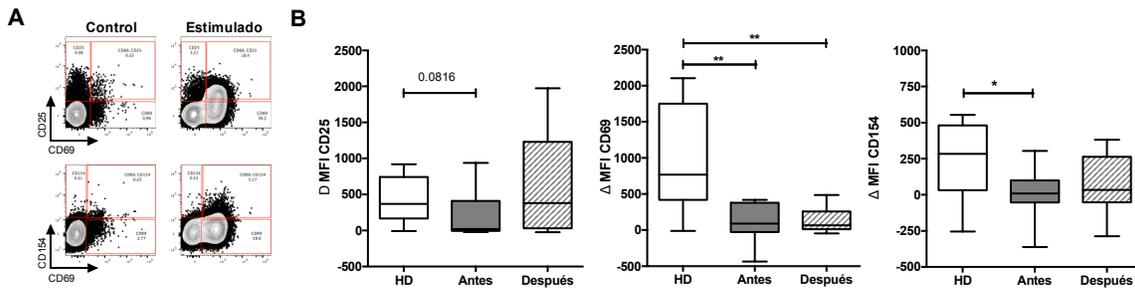


Figura 36. La limitada capacidad funcional de LT-CD3+ en pacientes con cáncer de mama se recupera luego de tres ciclos de quimioterapia neo-adyuvante con A/C. (A) Gráficas de contornos en que se mide

por FC el porcentaje y MFI de los marcadores de superficie de LT CD3+: CD25 vs CD69 – arriba y CD154 vs CD69 - abajo en PBMCs de una donante sana sin estimulación (columna izquierda) y luego de 24 horas de estimulación (columna derecha) con perlas anti-CD3/28/2 (experimento representativo de 12 realizados). **(B)** Cuantificación de la deferencia (Δ - delta del MFI entre estimulado menos no estimulado) de expresión en superficie de LT-CD3+ de cada uno de los tres marcadores en donantes sanas (HD – barras blancas n=12), en pacientes antes de la quimioterapia (Antes– barras grises, n=17) y en pacientes posterior a la quimioterapia (Después – barras con rayas, n=17). Se muestra la dispersión de los datos en caja y bigotes (5-95%). Se analizó cada grupo mediante ANOVA de dos vías con post test de Bonferroni. *p<0.05, ** p<0.01.

Correlación entre el inmuno-monitoreo y la respuesta clínica

Existe numerosa evidencia experimental generada en modelos de cáncer en animales que sugieren que la respuesta del sistema inmune es responsable al menos en parte de la respuesta clínica del tumor (evidenciable en la reducción del volumen tumoral) así como de la generación de inmunidad antitumoral. Sin embargo, en el caso de pacientes con cáncer de mama el establecer correlaciones entre respuesta del sistema inmune y respuesta clínica del tumor es un tema aún pendiente por resolver. Por otro lado, a pesar de que la gran mayoría de las pacientes responden con una reducción significativa del tamaño tumoral luego de tres ciclos de quimioterapia (Ver Figura 37), no existen evidencias publicadas hasta ahora sobre si existe relación entre el estatus funcional de las células del sistema inmune y el grado de respuesta clínica del tumor observado en las primeras etapas del tratamiento.

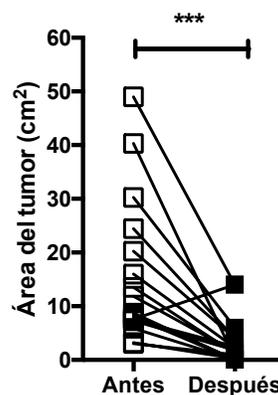


Figura 37. Respuesta clínica es evidente luego de tres ciclos de quimioterapia neo-adyuvante con A/C. Cuantificación del tamaño tumoral (área en cm² de las dos dimensiones mayores) cuantificado por ecografía de las pacientes antes y después de tres ciclos de quimioterapia neo-adyuvante con el esquema A/C (n=17). Análisis pareado no paramétrico con prueba de los rangos con signo de Wilcoxon. *** p<0.001.

Basados en los resultados descritos hasta ahora en los estudios *in vitro* con PBMCs de donantes sanas y pacientes, se analizaron, mediante curvas ROC, diferentes variables de respuesta inmune con el fin de explorar su posible utilidad para discriminar entre donantes sanas y pacientes con cáncer de mama antes de la quimioterapia. Como era de

esperarse, la capacidad de la internalización del TCR, reveló una significancia estadística importante en este sentido. Como se muestra en la Figura 38, la internalización del TCR tiene un área bajo la curva (AUC) de 0,67 ($p=0.05$) que permite diferenciar entre donantes sanas y pacientes con cáncer de mama recién diagnosticadas.

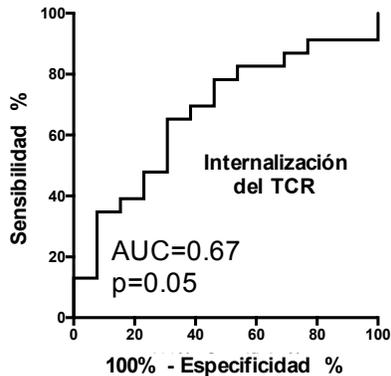


Figura 38. Curvas ROC de Internalización de TCR para diferenciar personas sanas de pacientes con cáncer de mama. Curva ROC realizada a partir del porcentaje de internalización del TCR en donantes sanas ($n=10$) y pacientes antes de la quimioterapia ($n=17$) con un AUC de 0.67 (sensibilidad de 75%, especificidad de 80% y LR 3.75).

Este resultado sugiere que el uso de un modelo simple de análisis *in vitro* como es el grado de internalización de CD3 en células T de sangre periférica en respuesta a un estímulo policlonal permite diferenciar pacientes con cáncer de mama de donantes sanas con una sensibilidad y especificidad importantes. Sin embargo, la trascendencia de este resultado está supeditada a su validación en un tamaño de muestra mayor.

Predecir la respuesta clínica de los tumores a la quimioterapia neo-adyuvante sigue siendo un importante desafío. A pesar de que pruebas moleculares como TOP2A y el análisis *in situ* de la contextura del tumor después de la quimioterapia neo-adyuvante son sistemas prometedores para predecir la respuesta del tumor y la supervivencia luego del tratamiento de pacientes con cáncer de mama y otros tumores [214, 215], la utilidad de los análisis funcionales de leucocitos de sangre periférica para predecir la respuesta tumoral a la quimioterapia es desconocida. Con el fin de tratar de abordar esta pregunta, las lecturas inmunológicas de todos los estudios funcionales realizados en este trabajo con leucocitos de sangre periférica de pacientes antes de la quimioterapia se categorizaron primero y luego se analizaron mediante un análisis categórico multifactorial (mediante ecuaciones generales de estimación - GEE) con el fin de calcular coeficientes de variable explicativos

(en este caso variables inmunológicas) que mejor se ajusten a un modelo en el cual el comportamiento de uno o varios parámetro(s) clínico(s) se explique(n) satisfactoriamente con base en resultados de lecturas inmunológicas (Tabla 4).

Tabla 4. Asociación entre lecturas inmunológicas en sangre periférica y factores clínico-patológicos en las pacientes con cáncer de mama participantes en este estudio.

Característica clínica	Wald (Chi) ²	Variables del modelo GEE (Lecturas inmunológicas)	Coefficiente	Valor p	95% CI
Ki-67	1.49	% de internalización de CD3	-.0293	0.332	-.0886 a .0299
		MFI de CD69	.0005	0.621	-.0015 a .0025
		Concentración de IL-12p70 (pg/mL)	-.0387	0.281	-.1093 a .0317
Her2/neu	1.72	% de internalización de CD3	-.0407	0.194	-.1022 a .0207
		MFI de CD69	.0010	0.382	-.0012 a .0031
		Concentración de IL-12p70 (pg/mL)	-.0090	0.571	-.0401 a .0221
Respuesta tumoral	6.1	% de internalización de CD3	.0067	0.780	-.0403 a .0536
		MFI de CD69	-.0029	0.061*	-.0058 a .0001
		Concentración de IL-12p70 (pg/mL)	-.0110	0.094*	-.0239 a .0019
Receptores de Estrógenos	9.68	% de internalización de CD3	-.0867	0.002*	-.1428 a -.0305
		MFI de CD69	.0039	0.004*	.0012 a .0066
		Concentración de IL-12p70 (pg/mL)	.0120	0.002*	.0042 a .0198
Receptores de Progesterona	1.23	% de internalización de CD3	-.0261	0.323	-.0779 a .0256
		MFI de CD69	.0003	0.732	-.0016 a .0023
		Concentración de IL-12p70 (pg/mL)	-.0038	0.663	-.0208 a .0132

Teniendo en cuenta tres lecturas inmunológicas después de la quimioterapia: la internalización de CD3, la expresión de CD69 por células T y la producción de IL-12 por DCs, producto del análisis categórico multifactorial realizado, se hizo evidente que los valores explicativos de la expresión de CD69 y producción de IL-12 (valores $p < 0.061$, $p < 0.09$ marcados con (*)) y resaltados en negrilla en la Tabla 4) son útiles para definir un modelo asociado a la respuesta tumoral a la quimioterapia (área del tumor después de A/C menor de 2,4 cm² – media del área del tumor posterior a la quimioterapia) y que los tres valores están asociados de manera significativa con la expresión del receptor de estrógenos, pero no con la expresión de receptores de progesterona, HER2/neu, ni de Ki-67 por el tumor (Tabla 4). En conjunto, estos resultados sugieren que la capacidad de respuesta de los compartimentos T y APC y la respuesta clínica del tumor son fenotipos favorecidos por la quimioterapia que de alguna manera están relacionados.

Con el fin de tratar de precisar nuevas asociaciones mediante este tipo de análisis, se examinó qué lecturas inmunológicas evaluadas en leucocitos de las pacientes están asociadas a una respuesta clínica favorable del tumor a la quimioterapia. Se encontró, que

después de tres ciclos de quimioterapia con A/C, el porcentaje de internalización del TCR se asocia a una regresión significativa del tumor en respuesta al tratamiento (tamaño tumoral $<2,4 \text{ cm}^2$ en la Figura 39A). Adicionalmente, teniendo en cuenta el estado TNM de las pacientes antes de iniciar la quimioterapia A/C el análisis reveló que en estadios iniciales (TNM I y II) las DC plasmacitoides tienen una mejor respuesta al coctel de inducción de 2d-aDCs medido en términos de la expresión de CD83 comparado con DCs plasmacitoides de las pacientes con estadios de tumor más avanzados (TNM III y IV) (Figura 39B).

Por otro lado, se evaluó hasta qué punto las lecturas inmunológicas obtenidas de las muestras antes de la terapia antitumoral permiten predecir el resultado clínico al tratamiento; para ello se verificó el desempeño de los diferentes análisis establecidos antes del tratamiento en relación con el tamaño del tumor después de la terapia. Aunque la frecuencia *ex vivo* de Tregs estuvo cerca de predecir tumores pequeños ($<2,4 \text{ cm}^2$) después de la quimioterapia con A/C, este resultado no fue estadísticamente significativo ($p = 0,1$ - datos no mostrados). En contraste, se encontraron niveles más altos de internalización del TCR ($p = 0,07$) y de DC plasmacitoides maduras (CD83+ ($p = 0,038$) en pacientes con tumores más pequeños ($<2,4 \text{ cm}^2$) (Figura 39C y D).

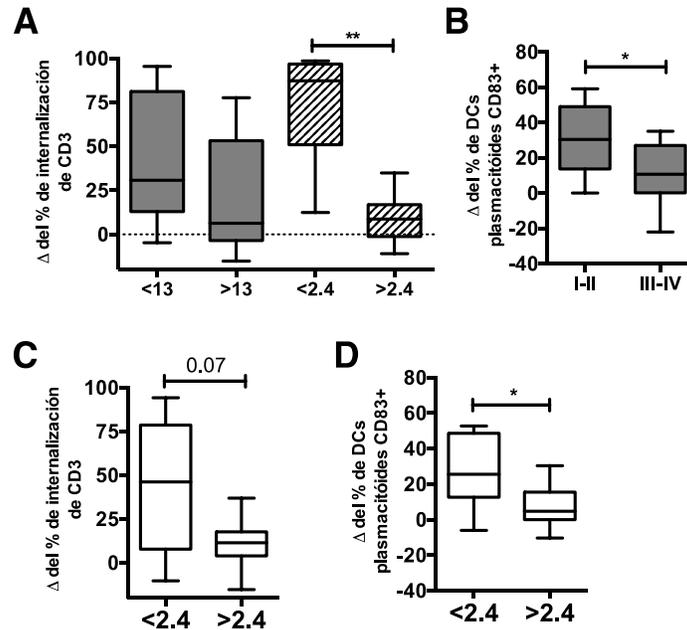


Figura 39. Relación entre grado de internalización del TCR en LT-CD3 en respuesta a la estimulación del TCR y expresión de CD83 en DCs plasmacitoides en respuesta a un estímulo pro-inflamatorio y su relación con la respuesta clínica del tumor al tratamiento. (A) Porcentaje de internalización de CD3 en pacientes antes (barras grises) o después (barras con rayas) del tratamiento con A/C en relación con el tamaño tumoral (área en cm^2). (B) Delta del grado de maduración (expresión de CD83) en DCs plasmacitoides (Lin-1negativo, HLA-DR+ CD1c-, CD123+) antes de la quimioterapia con A/C categorizadas según el TNM (estadio

inicial I y II, estadio avanzado III y IV). Capacidad predictiva del porcentaje de internalización del CD3 (C) y de maduración de DCs plasmacitoides (expresión de CD83) (D) determinados antes de la quimioterapia analizado en relación con el área del tumor (área en cm²) determinada posterior a tres ciclos de quimioterapia con A/C. Gráficas de cajas y bigotes del 10 al 90%, prueba t con Mann-Whitney, número sobre cada caja corresponde al número de pacientes evaluadas en cada grupo.

Finalmente, se caracterizó la respuesta clínica mediante el índice creado por el MD Anderson Center, considerado actualmente como el parámetro estándar para determinar la carga tumoral posterior a la quimioterapia, denominado RCB (del inglés Residual Cancer Burden) el cual se basa en el área del tumor, en el porcentaje de la celularidad tumoral (estudio por patología), número y tamaño de ganglios linfáticos afectados y metástasis distantes el cual genera un índice de carga tumoral y una categoría clínica que va desde respuesta patológica completa (pCR) hasta RCB I, II y III [199]. Con el fin de evaluar si existe una asociación entre los parámetros inmunológicos antes del tratamiento seleccionados hasta el momento con el índice RCB se determinó la correlación entre estos parámetros. De manera importante el porcentaje de internalización del TCR se correlacionó con el índice RCB (Pearson = -0.583, $p < 0.05$) (Figura 40A). De igual manera la comparación de las pacientes en categorías del RCB de bajo riesgo (pCR y RCB I) con las de alto riesgo (RCB II y III), reveló que las primeras (mejor respuesta clínica) exhiben un mayor grado de internalización del TCR que las pacientes RCB II y III (Figura 40B). Semejante a la asociación encontrada entre internalización del TCR con las categorías RCB de bajo riesgo, la evaluación funcional de DCs plasmacitoides medida en términos de alta expresión de CD83 en estas células, también mostró una asociación significativa en pacientes con bajo riesgo comparado con las pacientes de alto riesgo (Figura 40C).

Por último, basado en estos resultados, se estableció la sensibilidad y especificidad de estas lecturas inmunológicas en la predicción de la respuesta tumoral al tratamiento A/C mediante una curva ROC. Se encontró que las curvas ROC de internalización de CD3 y maduración de DC plasmacitoides tienen un AUC alto (0,816 y 0,825 respectivamente) con valores p significativos ($p=0,0452$ y $p=0,039$ respectivamente), que permiten discriminar pacientes que responden de las que no responden (Figura 40D y E).

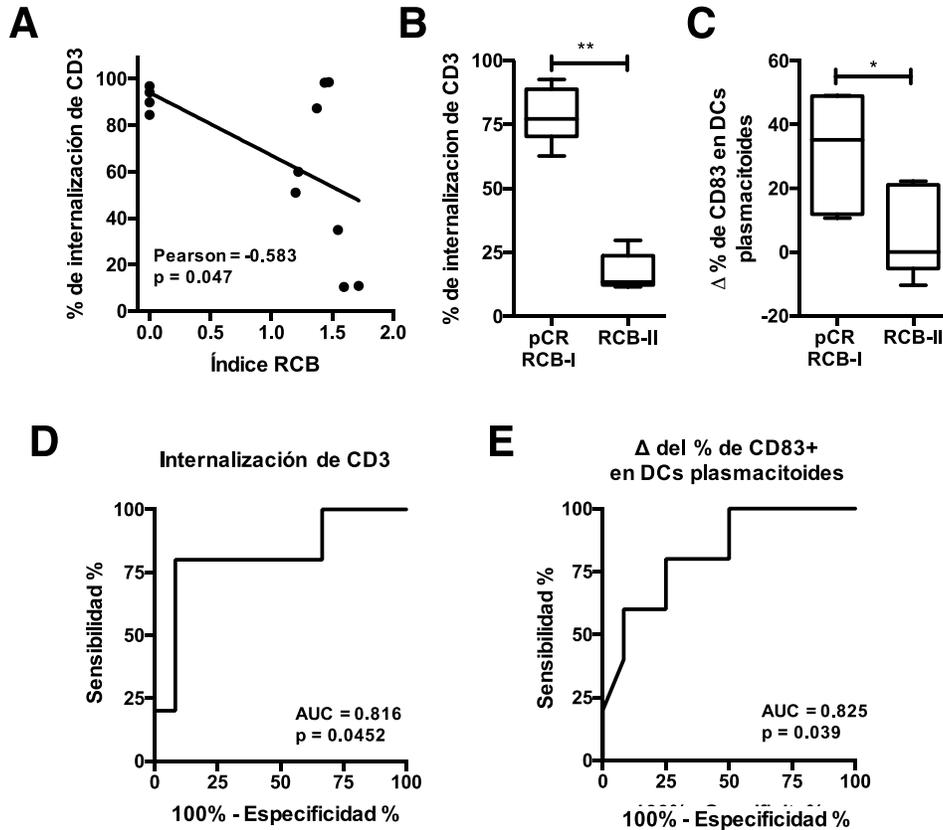


Figura 40. Capacidad de predicción de la respuesta clínica del inmunomonitoring de pacientes previo al tratamiento y su respuesta clínica después de tres ciclos de quimioterapia con A/C. (A) Correlación entre el porcentaje de internalización del CD3 determinado por CF en muestras de sangre tomadas antes de la quimioterapia en relación con la respuesta del tumor luego a tres ciclos de quimioterapia con A/C expresada mediante el índice RCB. Capacidad predictiva del porcentaje de internalización del CD3. Correlación de Pearson = -0.583 p=0.047 **(B)** y de la maduración de DCs plasmacitoides (expresión de CD83) **(C)** expresados antes de la quimioterapia en relación con las categorías de buena respuesta (pCR y RCB I) a comparación de mala respuesta clínica (RCB II). Curvas ROC de los parámetros evaluados en **(B)**, internalización del CD3 (AUC=0.816, p=0.0452) **(D)** y delta del porcentaje de CD83 en DCs plasmacitoides (AUC=0.825, p=0.039) para predecir una buena respuesta clínica (pCR y RCB I). Gráficas de cajas y bigotes del 10 al 90%, prueba t con Mann-Whitney.

Estos resultados permiten argumentar que empleando los sistemas de estimulación *in vitro* propuestos, niveles altos de DC plasmacitoides maduros (CD83+) y la internalización de CD3 detectados en sangre periférica antes de la quimioterapia son posibles bio-marcadores para predecir antes de iniciado el tratamiento la respuesta clínica de los tumores a la quimioterapia primaria con A/C en pacientes con cáncer de mama.

Conclusiones

- Tres ciclos de quimioterapia neo-adyuvante con A/C son suficientes para evidenciar una reducción objetiva del tamaño tumoral en la mayoría de pacientes.
- DCs de pacientes con cáncer de mama recién diagnosticadas presentan una deficiente respuesta funcional a estímulos pro-inflamatorios.
- Previo al tratamiento los LT de las pacientes con cáncer de mama experimentan una deficiencia funcional en respuesta a la estimulación del TCR.
- Luego de tres ciclos de quimioterapia con A/C (90 días), DCs y LT restablecen las funciones evaluadas a niveles cercanos a los detectados en mujeres sanas.
- Existe relación entre el grado de restitución funcional de DCs y TL inducidos por la quimioterapia y la respuesta clínica del tumor.
- Es posible detectar inmuno-fenotipos en DCs y LT cuyo desempeño antes del tratamiento permite predecir la respuesta clínica del tumor a la quimioterapia con A/C.

CAPITULO 3. Aplicación de algoritmos automatizados para análisis multidimensional de la respuesta inmune

Resumen

La citometría de flujo (CF) es una disciplina en permanente evolución. En los últimos años los avances en el campo de la CF han permitido el análisis simultáneo de 10 o más marcadores en una misma célula. Tecnologías como CyTOF (versión avanzada de análisis cito-métricos complejos), permite evaluar 40 o más parámetros en una misma célula. De esta forma, este tipo de análisis permite describir características fenotípicas y funcionales complejas en distintas sub-poblaciones celulares.

El análisis manual de datos de citometría multicolor tradicionalmente empleado permite evaluar de manera simultánea la expresión positiva o negativa de dos marcadores a la vez en la muestra analizada. Este tipo de análisis que está limitado al análisis por parejas de los marcadores utilizados probablemente le imprime algún grado de sesgo al análisis de los datos derivados de la interpretación visual de los resultados.

En los últimos años los avances de la bioinformática han permitido aplicar a los datos de citometría herramientas computacionales y estadísticas usualmente empleadas para análisis genéticos. Lo anterior favorece el análisis integral de múltiples dimensiones de manera automática generando reportes de tipo gráfico y cuantitativo que en el caso de la citometría multicolor facilita la interpretación y el manejo de la información multi-paramétrica colectada vía CF.

El acceso a nuevas alternativas de análisis hizo que, sumado a la optimización del manejo de la muestra con las células del grupo de pacientes con cáncer de mama, se tratara de dinamizar el análisis de los resultados obtenidos de citometría mediante el manejo automatizado de los datos con el fin de evaluar mediante este tipo de análisis el efecto de la terapia antitumoral sobre la respuesta inmune de las pacientes y correlacionar los datos inmunológicos con la respuesta clínica.

En el **Capítulo 3** se presentan los resultados del uso de los algoritmos FLOCK, SPADE y CITRUS en el análisis de datos de citometría de células de dos grupos de pacientes en terapia neo-adyuvante con el fin de realizar el análisis automatizado de: (i) datos de citometría del monitoreo de células APC y LT en pacientes en terapia neo-adyuvante cuyos resultados - producto del análisis manual - fueron presentados en el segundo capítulo. (ii)

Datos de citometría obtenidos en muestras de pacientes pre-quimioterapia en las que los LT se estimularon y fueron marcadas con dos paneles de anticuerpos; el primero para evaluar el fenotipo, grado de expansión y activación de LT-CD4+ Tfh, y el segundo, para evaluar el grado de expresión de receptores inhibitorios en células vírgenes y subpoblaciones de LT-CD4+ y LT-CD8+ efectores y de memoria; la producción de IL-17 por estas células y el fenotipo de Tregs.

Los resultados del análisis automatizado de APCs mostró que las pacientes pre-quimioterapia presentan un incremento *ex vivo* de una sub-población de DCs plasmacitoides no detectable mediante análisis manual. El uso de SPADE permitió comprobar que previo a la quimioterapia los LT exhiben una activación del TCR, un fenotipo detectado previamente mediante análisis manual del monitoreo de LT. Además, el análisis automatizado permitió evidenciar que en respuesta al estímulo *in vitro* los LT de pacientes pre-quimioterapia (comparados con los LT de mujeres sanas), presentan una diferenciación y activación deficiente de LT-CD4+ Tfh circulantes en sangre. Finalmente, la evaluación de la expresión en LT de los receptores inhibitorios CTLA-4, PD1 y BTLA mediante estos análisis mostró que las pacientes antes de la quimioterapia tienen disminuida una población de LT-CD4+ con características de Tregs PD1+.

Racional

Modelos estadísticos como el análisis por componentes principales (PCA - del inglés principal component analysis) - mediante la reducción de factores y modelos de regresión múltiple - hacen posible la integración de un alto número de variables con el fin de poderlas analizar de manera conjunta “reduciendo” a dos o tres las dimensiones que describen de la mejor forma, en nuestro caso, el comportamiento de los datos entre pacientes con cáncer de mama y mujeres sanas como control. Por otro lado, nuevas posibilidades de análisis de datos de citometría de flujo (FC) multi-paramétrica como FLOCK, SPADE y CITRUS se perfilan hoy como nuevas estrategias aplicables al inmuno-monitoreo de pacientes con cáncer de mama. Estas herramientas mediante algoritmos automatizados tienen la capacidad de agrupar en “clúster” células que comparten un mismo fenotipo facilitando el análisis de poblaciones en n dimensiones y reduciendo el sesgo del análisis manual de los datos de CF.

Diseño experimental y metodología

Manejo de datos

Para el análisis automatizado de los datos haciendo uso de diferentes paquetes estadísticos y algoritmos empleados se requirió de la unificación de los parámetros de los archivos FCS (Flow Cytometry Standard) de los resultados obtenidos de muestras procesadas por CF en un equipo FACS Aria II.

En primer lugar, todos los archivos fueron exportados en formato FCS versión 3.0. En FlowJo (FlowJo, LLC v10.3) se realizó un análisis básico para determinar la población de células únicas FSC-A vs FSC-H y SSC-H vs SSC-W y la región de interés en relación a los parámetros de SSC-A vs FSC-A para definir la población linfocítica o monocítica a analizar (Ver Figura 41). A partir de este análisis, se exporta una nueva versión del archivo FCS que solo incluye los datos de la población de interés, con el fin de eliminar ruido de fondo generado por poblaciones no específicas y por detritos celulares. El archivo FCS es analizado por cuatro sistemas, el primero, mediante un análisis por componentes principales (PCA) usando la herramienta estadística SPSS (IBM) con el fin de “reducir” a componentes principales el comportamiento en las pacientes y en los controles sanas de las variables evaluadas (en este caso grado de expresión de marcadores en las poblaciones evaluadas expresados en términos de MFI o porcentaje), los cuales fueron establecidos mediante el análisis manual de los datos de citometría (Ver Análisis multivariado por componentes principales separa la respuesta inmune de pacientes con cáncer de mujeres sanas más adelante).

Los tres sistemas de análisis restantes FLOCK, SPADE y CITRUS (ver descripción más adelante), requieren de un procesamiento previo de los datos que se describe a continuación. Los datos del archivo FCS se exportan a una tabla CSV (valores separados por comas) y allí se organiza y se unifica la nomenclatura de los marcadores evaluados para finalmente convertirlos en formato FCS mediante la herramienta GenePattern (Broadinstitute MIT). A partir de esta versión de los archivos FCS se procede al análisis con los diferentes algoritmos como se describe más adelante.

Para analizar de manera automatizada los resultados obtenidos por citometría de flujo, se estableció una secuencia de trabajo empleando diferentes programas que permiten manejar sistemas de análisis multidimensional. Con el fin de ilustrar cada paso de dicho análisis en la Figura 41 se muestra dicha secuencia.

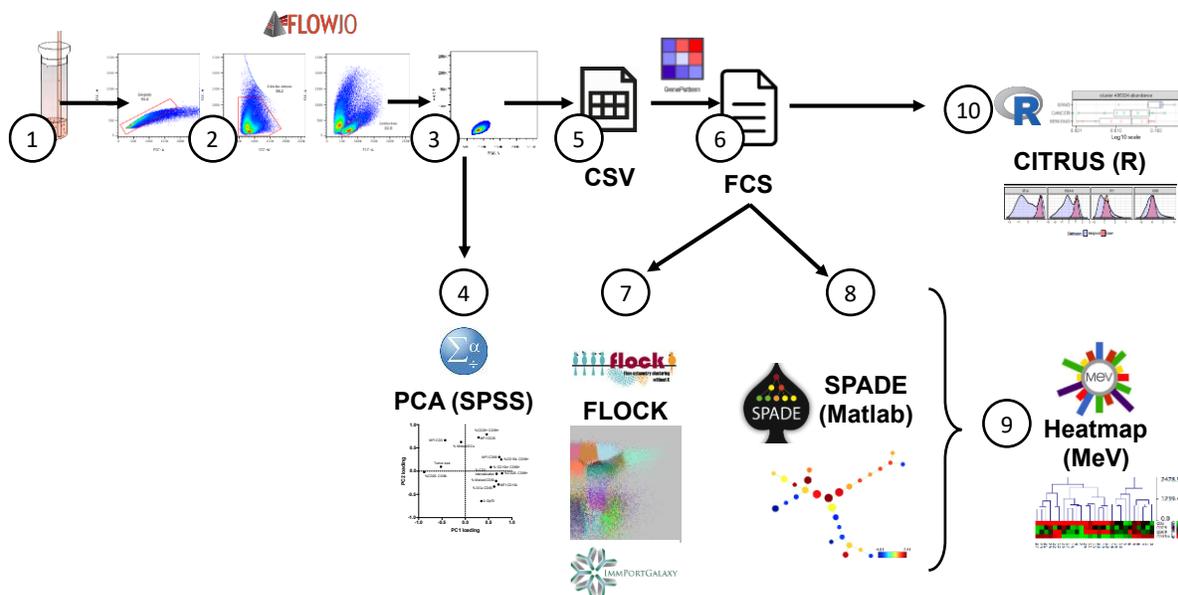


Figura 41. Modelo esquemático del análisis multivariado de los datos de citometría de flujo. (1) Captura de la información del fenotipo de células por citometría de flujo (archivo en formato FCS). (2) Análisis manual por FlowJo para la definición de región linfocítica (o monocitoide, no mostrado) a partir de células únicas (FSC-A vs FSC-H y SSC-H vs SSC-W). (3) Archivo de FCS exportado en FlowJo con los datos de la región de interés. (4) Análisis por componentes principales de los datos analizados manualmente utilizando el paquete SPSS. (5) Datos de interés exportados a formato CSV con el fin de unificar parámetros. (6) Conversión de formato de CSV a FCS con la herramienta en línea GenePattern. (7) Análisis FLOCK para determinación de grupos de datos convertidos a formato FCS. (8) Análisis por SPADE (Matlab) para análisis de relaciones en árbol que permite comparaciones entre muestras individuales. (9) Creación de mapas de calor y análisis jerárquico (HCL) con la información generada a partir de FLOCK (que revela un valor promedio de MFI de cada parámetro en cada grupo) y SPADE mediante la herramienta MeV (TM4 software). (10) Análisis de CITRUS para la identificación de grupos de células a partir de datos de citometría de flujo multidimensional asociados con el desenlace final experimental o clínico de interés (paquete estadístico de R).

Programas y paquetes empleados

Análisis por componentes principales - PCA

El análisis de diversas variables requiere de procesos estadísticos que permitan la integración de dichas variables con el fin de apreciar de manera más sencilla el comportamiento de las muestras. Para lo anterior existen diferentes pruebas estadísticas como el análisis por componentes principales (PCA) que hace parte del grupo de análisis conocido como análisis factorial. Como su nombre lo indica, busca obtener dentro de un grupo de datos con múltiples variables, factores dominantes que expliquen o describan de manera “resumida” (en dos componentes) el comportamiento de las variables. Producto del análisis las variables son registradas en un plano x y (componente 1 y 2 respectivamente) lo cual reduce el número de dimensiones facilitando el análisis de múltiples variables. En este caso, se buscó determinar el comportamiento en las pacientes antes y después de la quimioterapia con A/C y en mujeres sanas como control el comportamiento de diferentes

variables inmunológicas provenientes de los grupos de análisis tanto *ex vivo* como de los cultivos *in vitro*. Generalmente estos factores se disponen de manera ortogonal entre ellos (planos perpendiculares entre cada dimensión evaluada), y se ordenan según la varianza de las variables que explican cada componente. Por lo anterior, algunos factores se mantienen para ser considerados y algunos pueden ser descartados, esto último en el caso de que no reflejan el comportamiento de los datos en los dos componentes. Una vez seleccionados los factores principales estos pueden ser “rotados” con el fin de facilitar su interpretación [216, 217].

Algoritmo “FLOw Clustering without K” - FLOCK

La agrupación de poblaciones mediante FLOCK funciona a través de un algoritmo diseñado para el análisis sistemático de datos de citometría de flujo no supervisado. Para graficar el resultado, FLOCK utiliza un proceso de partición de los eventos de citometría en grupos de células en cuadrículas. Este proceso se combina con un análisis de distribución de densidades (basados en MFI), que permite identificar sub-poblaciones celulares con base en datos de citometría de flujo multi-paramétrica [218]; este sistema de análisis de datos es de acceso libre a través del servicio Import (<https://importgalaxy.org/>). Los resultados obtenidos por FLOCK, se muestran mediante un análisis de distribución de densidades las cuales son reflejo de diferentes agrupaciones de células identificadas, a las cuales se les asignan “coordenadas” de identificación en el centro de dicha densidad establecida con base en el MFI (conocidas como “centroide”) para cada población según los parámetros analizados.

La salida del análisis por FLOCK genera tres elementos principales: (i) el número de grupos (agrupamientos de células) que representa el comportamiento de todos los fluorocromos en la muestra analizada; (ii) la asignación de cada uno de los eventos originalmente adquiridos al grupo al cual pertenece; y (iii) la información de los centroides que depende de la intensidad de fluorescencia media (MFI) de cada fluorocromo y el porcentaje de eventos comprendido en cada grupo. La limitante de este paquete de análisis es la capacidad de comparación entre grupos de muestras y la relación que existe entre las agrupaciones celulares determinadas en cada análisis.

Algoritmo SPAnning tree progression of Density normalized Events - SPADE

SPADE se define como “un algoritmo en el que con base en densidad se visualizan los datos de una sola célula lo cual permite la inferencia jerarquía celular entre subpoblaciones de células similares”. Este algoritmo tiene en cuenta el nivel de expresión de cada marcador

(o variable de análisis), a nivel multidimensional en datos obtenidos de secuenciación, pero más recientemente de datos de citometría de flujo multi-paramétrica en especial datos colectados vía CyTOF (“**CyTometry**” based in “**Time Of Flight**”), el cual consiste en un citómetro de flujo acoplado a un equipo de masas que emplea anticuerpos acoplados a isótopos utilizados para discriminar cada marcador. En este último, la caracterización de poblaciones celulares con base en 40 parámetros o más hace que el análisis manual sea muy dispendioso, subjetivo y dependiente del usuario.

Aunque la herramienta SPADE se ha empleado básicamente para el análisis jerárquico de poblaciones celulares (diferenciación de linajes de Linfocitos B, T y mieloides) [219], su fundamento es aplicable a ensayos funcionales *in vitro*, como lo muestra Bodenmiller y col., [220], quienes evaluaron una serie de señales intracelulares en diferentes subpoblaciones celulares en respuesta a 27 inhibidores de 14 diferentes quinasas utilizando esta herramienta.

CITRUS

CITRUS (*Identificación, caracterización y regresión de clústeres*) es uno de los sistemas de análisis multidimensional para citometría de flujo más recientes. De manera similar a SPADE, CITRUS emplea un análisis jerárquico de agrupación de poblaciones basados en una matriz de segmentación; sin embargo emplea algoritmos adicionales que permiten calcular de manera estadística, si existen poblaciones celulares que presenten diferencias significativas entre los grupos de muestras analizadas (algoritmos PAM y SAM – ver detalles más adelante) [221, 222]. Esta herramienta se puede acceder a vía web (<https://www.cytobank.org/> - pero requiere de una suscripción paga) sin embargo, el código para su implementación en R está disponible en línea (<https://github.com/>). CITRUS inicia con un análisis jerárquico no supervisado de células fenotípicamente similares para identificar agrupaciones de subconjuntos celulares similar a la empleada por SPADE. A diferencia de SPADE, CITRUS emplea algoritmos de aprendizaje para identificar las agrupaciones cuyo comportamiento entre las muestras sean predictivas de los grupos de muestras empleados para el análisis. Las propiedades de las agrupaciones identificadas se calculan empleando uno o más modelos. Los modelos estadísticos más empleados son: (i) modelo SAM - *significance analysis of microarrays*: que se emplea de para análisis de correlación de muestras; y (ii) el modelo PAM - *prediction analysis microarray*: el cual es un modelo predictivo el cual se utiliza para detectar asociaciones entre las propiedades

(fenotipo de las células) de la agrupación calculada con una respuesta (p. ej. mujeres sanas vs. pacientes pre-quimioterapia).

El sistema de análisis por CITRUS genera varios resultados, el primero, es un registro de las propiedades de la agrupación celular que están asociadas con el punto final del experimento (p. ej. sanas vs pacientes). Adicionalmente, CITRUS genera una serie de gráficas que permiten determinar la calidad de la predicción del modelo (Figura 42A), el fenotipo de todos los grupos celulares establecidos (Figura 42B), la identificación de los grupos identificados que son capaces de diferenciar las muestras analizadas (Figura 42C), el fenotipo de dichas agrupaciones representadas en histogramas (Figura 42D) y la abundancia de dichas agrupaciones entre las muestras comparadas (Figura 42E). La interpretación de la salida de un análisis de CITRUS generalmente consiste en 3 pasos: (i) determinar si las asociaciones detectadas entre las propiedades del clúster y los puntos finales experimentales cumplen los requisitos estadísticos deseados; (ii) ver la relación entre las propiedades de clúster significativas y el punto final experimental; y (iii) determinar el fenotipo de las agrupaciones celulares a partir de los cuales se han calculado las propiedades de agrupamiento significativas.

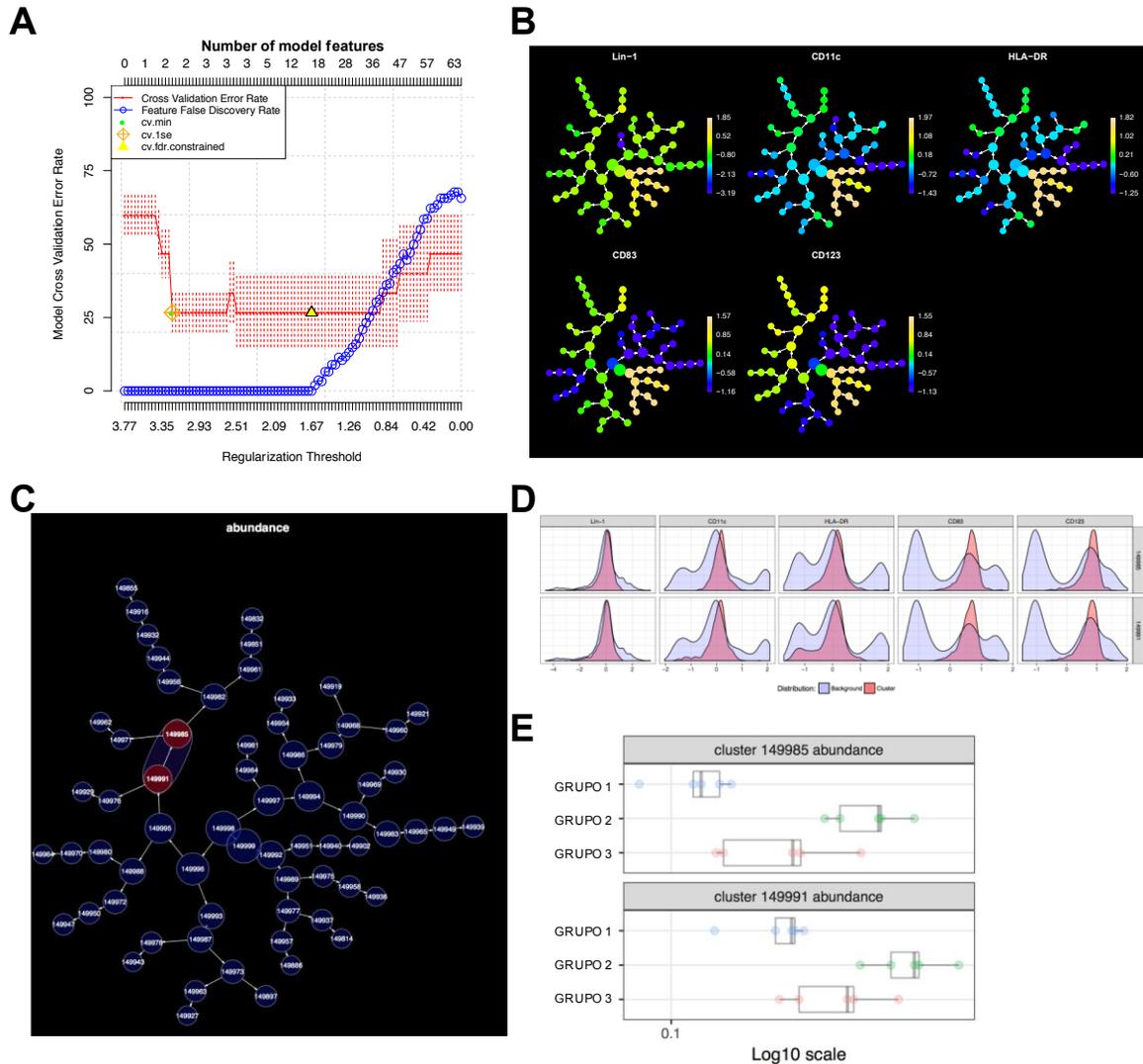


Figura 42. Estructura de resultados del análisis CITRUS. (A) Curva de modelo predictivo que muestra en rojo la tasa de error estimada del modelo y en azul la tasa de descubrimientos falsos. Se muestra una validación adecuada (baja tasa de falsos descubrimientos con una baja tasa de error de validación) para el uso del modelo PAM obtenido. Se resaltan tres modelos (cv.min, círculo verde; cv.1se, diamante naranja; y cv.fdr.constrained, triángulo amarillo). (B) Árbol de expresión de cada marcador en cada agrupación celular establecida. (C) Gráfica de características de agrupaciones que son capaces de diferenciar los grupos (resaltados en rojo), los números en cada círculo corresponden a la identificación de cada agrupación. (D) Histogramas de expresión de cada marcador en los grupos determinados en el panel C, comparando la expresión de fondo (histograma azul) con la expresión del agrupamiento (histograma rojo). (E) Gráfica de caja y bigotes de la abundancia de cada agrupación celular en los grupos de muestras establecidos.

El resultado de este proceso de evaluación (algoritmo PAM - predictivo) se representa en un gráfico que evalúa la calidad del análisis predictivo, mostrando la tasa de error estimada para cada modelo (puntos rojos) a medida que se utilizan diferentes umbrales de regularización. Esta tasa tiene valores de 0 a 100% en donde un valor de 0% es igual a un valor predictivo perfecto. Además, de cada punto rojo sale una línea punteada que señala

el error estándar de la tasa. De la misma forma, el modelo genera una línea azul, que indica la tasa de falsos descubrimientos en cada modelo, con valores igualmente de 0 a 100%. Por último, la escala superior muestra el número de propiedades de cada modelo (Figura 42A).

CITRUS reporta tres modelos preseleccionados basándose en las tasas de error y de falsos descubrimientos (Figura 42A). El primero: **cv.min**, indicado por un punto verde, representa el set de clústeres (agrupaciones celulares) que diferencian los grupos con la menor tasa de error. El segundo: **cv.1se**, identificado como un diamante naranja, representa el modelo más simple teniendo una tasa de error estándar de uno, en los casos en el que este modelo tiene cero propiedades (escala horizontal de la parte superior de la curva), la evaluación debe considerarse nula, pues el punto final (p. ej., paciente vs. mujer sana), no puede ser descrito debido a la gran magnitud de la varianza de los datos (Figura 42A). El último modelo: **cv.fdr. constrained** está representado por un triángulo amarillo, y representa el modelo con el mayor número de propiedades o clústeres, manteniendo una tasa de descubrimiento falso menor al 1%.

Resultados

La funcionalidad de los compartimientos APCs y de LT están correlacionados

La activación eficiente de las células T contra los tumores es un proceso complejo que comprende múltiples etapas no sólo la capacidad de APCs para estimular las células T a través de la interacción entre el TCR y el complejo péptido-MHC [223], sino a su vez en la capacidad de las células T activadas de estimular en APCs la expresión de moléculas co-estimuladoras tales como CD80 y CD83 y la producción de IL-12 una citoquina que promueve la actividad de LT antitumorales [224, 225]. En condiciones normales, lo anterior se logra a través de la estimulación del CD40 en la superficie de APCs por el CD40 ligando (CD154), una molécula expresada por células T tras su activación vía TCR [62, 226]. por lo tanto, es lógico pensar que la disfunción evidenciada en el **Capítulo 2** de los compartimientos tanto de LT como APC que se recupera en las pacientes luego de tres ciclos de quimioterapia, (Figura 33 a Figura 36), probablemente sea atribuible a la restauración de la interacción APC / LT vía CD40/CD154 favorecida por el tratamiento. Para tratar de evidenciar esto, correlaciones entre las diferentes lecturas inmunológicas de APCs y LT fueron examinadas por correlación de Spearman (prueba no paramétrica de Spearman $\rho < -0,5$ o $> 0,5$). Inicialmente, se observó una correlación entre el grado de internalización del TCR (medido a través de la diferencia de MFI de CD3 en muestras estimuladas menos

el MFI de las muestras sin estimular) con el grado de maduración de 2d-aDCs (medido por el delta de CD83 en las muestras de mujeres sanas y pacientes posterior a la quimioterapia), que previamente se había observado presentan un comportamiento similar que difiere al comportamiento de las células obtenidas de pacientes previo a la quimioterapia con A/C. Esta correlación significativa entre los compartimientos de APCs y LT (Figura 43A) es inversa en las muestras de las pacientes previo a la quimioterapia con A/C, como se observa en la Figura 43B (pasa de $r = -0.526$, $p = 0.012$ a $r = 0.43$, $p = 0.15$ respectivamente).

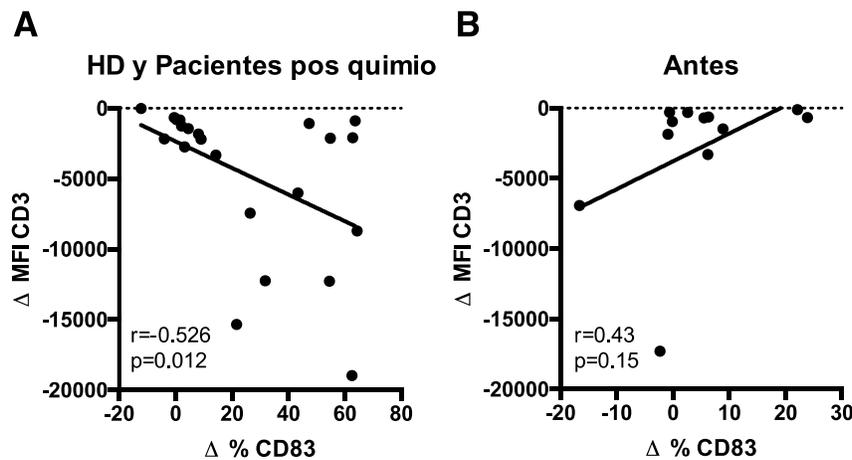


Figura 43. Pérdida de la correlación entre la funcionalidad de los compartimientos APC y LT en pacientes antes de la quimioterapia con A/C. Correlación de Spearman entre el delta del MFI de CD3 (internalización del TCR) con el grado de maduración de 2d-aDCs medida por el delta de la expresión de CD83 en muestras de mujeres sanas (HD) y pacientes con cáncer de mama posterior a la quimioterapia con A/C ($n = 22$) $r = -0.526$, $p = 0.012$ (A) y en pacientes previo a la quimioterapia con A/C ($n = 12$) $r = 0.43$, $p = 0.15$.

Un segundo grupo de análisis del grado de correlación de diferentes combinaciones de variables en todas las mujeres participantes en el estudio (pacientes + mujeres sanas), reveló una clara relación entre las diferentes asociaciones analizadas. La expresión de CD83 en DCs mieloides (CD11c+) y la secreción de IL-12 en el sobrenadante de DCs maduras derivadas *in situ* se correlacionaron de manera significativa (Spearman rho = 0,511, $p = 0,005$ - Figura 44A). Igualmente, después de analizar en dichas correlaciones el rendimiento del compartimiento APC en respuesta a la estimulación (medida con la expresión de CD83 y producción de IL-12 por DCs), cada uno de estos dos parámetros se correlacionaron de manera independiente con la expresión de CD154 y la internalización de TCR respectivamente (Figura 44B, C y D). En conjunto, estos análisis mostraron correlaciones significativas de la expresión de CD154 con la maduración de DCs y la

activación eficiente de células T (expresión de CD154 e internalización del TCR), con la producción de IL-12 por DCs, confirmando lo esperado en el sentido de que una adecuada interacción entre los LT y APCs vía CD40/CD154 favorece la producción eficiente de IL-12 [225].

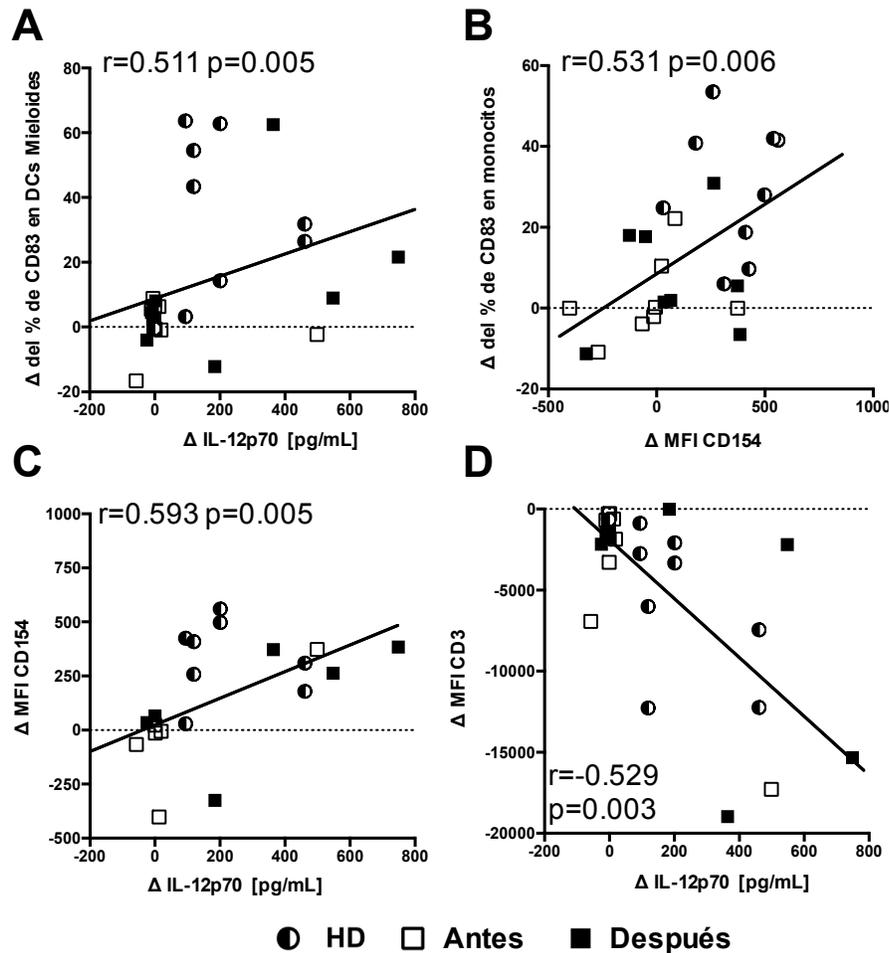


Figura 44. La respuesta del compartimento APC se correlaciona con la respuesta del compartimento de LT. Correlación de Spearman entre diferentes variables de la respuesta entre los compartimentos APC y de LT de donantes sanas (círculos medio llenos $n=10$), pacientes con cáncer de mama antes ($n=12$ cuadro blanco) y después de la quimioterapia ($n=12$ cuadro negro); (A) La funcionalidad de APC se evaluó con la producción de IL-12p70 y la maduración de DCs mieloides (expresión de CD83+); $r=0,511$ $p=0,005$. (B) Correlación entre APCs y la capacidad de respuesta de las células T mediante la expresión de CD83 en células monocíticas y delta del MFI de CD154 en LT; $r=0,531$ $p=0,006$. (C) Correlación entre la interacción entre la expresión de CD154 (MFI) en LT y la secreción de IL-12p70 por DCs; $r=0,593$ $p=0,005$. (D) Correlación entre el grado de internalización del TCR (delta del MFI CD3) con la secreción de IL-12p70 por DCs; $r=-0,529$ $p=0,003$.

Por lo anterior, los resultados acerca del déficit funcional de DCs y alteraciones de la activación temprana de LT en las pacientes con cáncer de mama previo a la quimioterapia que se recuperan luego de tres ciclos de quimioterapia (Figura 33 a Figura 36), nos permite

proponer que la respuesta clínica del tumor al tratamiento (Figura 37) probablemente pueda ser atribuida a la recuperación funcional de estos dos tipos de células evidenciada desde los primeros ciclos de quimioterapia neo-adyuvante.

Análisis multivariado por componentes principales separa la respuesta inmune de pacientes con cáncer de mujeres sanas

Con el propósito de poder correlacionar el comportamiento de múltiples variables analizadas en el inmuno-monitoreo de las pacientes con cáncer de mama y analizar si su comportamiento se diferencia del observado en las mujeres sanas, se realizó un análisis por PCA, el cual determina la importancia de cada variable en el comportamiento de cada uno de los componentes principales. El PCA arroja en cada variable un valor sobre cada componente el cual refleja el efecto o “relevancia” de dicha variable sobre los componentes motivo de análisis. Como regla general se considera que una variable es relevante si el número absoluto es superior a 0.5. Este criterio permite de manera sistemática eliminar variables que no reflejen el comportamiento de las muestras, (Figura 45 panel izquierdo, variables poco relevantes para la descripción de los componentes, enmarcadas en rojo). El modelo se optimiza empleando solo las variables relevantes entre los parámetros hasta tener una combinación adecuada de variables en cada componente (Figura 45 panel de la derecha).

Finalmente, la validez del muestreo y significancia estadística del PCA, se verifica en primer lugar con la medición Kaiser-Meyer-Olkin (KMO) cuyo valor debe ser superior a 0.6 y la significancia con el valor p cuyo valor se establece con la prueba de esfericidad de Bartlett [227].

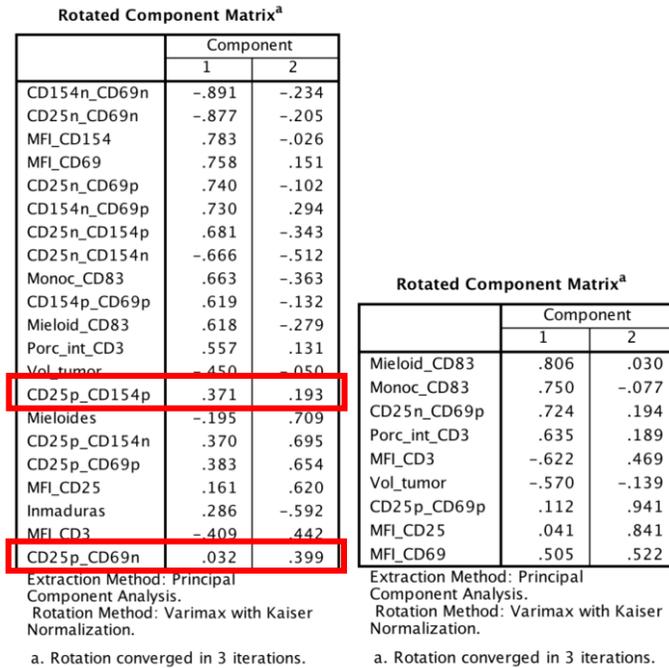


Figura 45. Salida de variables rotadas en SPSS posterior al PCA. Tablas de resultados de PCA (valor en cada uno de los componentes principales) para cada variable incluida inicialmente (tabla izquierda) donde se resaltan variables poco explicativas (valor de los componentes en rango de -0.5 a 0.5). En la tabla de la derecha se muestra los resultados una vez excluidas las variables poco explicativas.

Todos los datos obtenidos se organizaron en una base de datos que se procesó con el programa SPSS (IBM Corp. USA versión 22). Una vez incluidos los datos se procedió a su procesamiento y análisis multidimensional (Ver código en Anexo 7. Análisis multidimensionales). Luego de analizados los datos por PCA, se obtuvo la matriz de los componentes (dos componentes en este caso) descritos en la Tabla 5, la cual muestra los puntajes de cada variable en relación a cada uno de los dos componentes (columnas 1 y 2 respectivamente en la Tabla 5).

Tabla 5. Relación de variables de cada componente resultado del análisis por PCA

Component Matrix^a

	Component	
	1	2
CD25n_CD69n	-.854	-.153
CD25n_CD69p	.796	.050
Mieloid_CD83	.727	-.169
Monoc_CD83	.708	-.329
MFI_CD69	.671	.256
Porc_int_CD3	.617	.114
Vol_tumor	-.541	-.117
Mieloides	-.226	.796
MFI_CD25	.215	.786
CD25p_CD69p	.373	.773
Inmaduras	.365	-.502
MFI_CD3	-.454	.472

Posterior a la rotación (ver métodos), se obtuvo una gráfica de dos componentes y en la Tabla 5, se relacionan en la columna de la izquierda las variables con mayor importancia; mientras las primeras variables de la mitad superior explican la varianza en el componente 1 las últimas explican la varianza en el componente 2. Una vez graficadas las variables en un plano cuyos ejes corresponden a los dos componentes principales, se observó que la mayoría de las variables se localizaron a la derecha y arriba de los ejes de los componentes 1 y 2 respectivamente (valor KMO = 0.626 Chi cuadrado p=0.000). Finalmente, teniendo en cuenta los componentes seleccionados posterior a la rotación, se graficaron las muestras de los individuos de cada uno de los tres grupos analizados. En esta grafica (Figura 46 panel derecho) la ubicación de cada individuo está determinada por la resultante del comportamiento de las variables de cada individuo en los dos componentes. En la Figura 46 (panel derecho) se observa en rojo las muestras de las pacientes pre-quimioterapia, en verde las muestras de pacientes luego de la quimioterapia y en azul las muestras de las mujeres sanas.

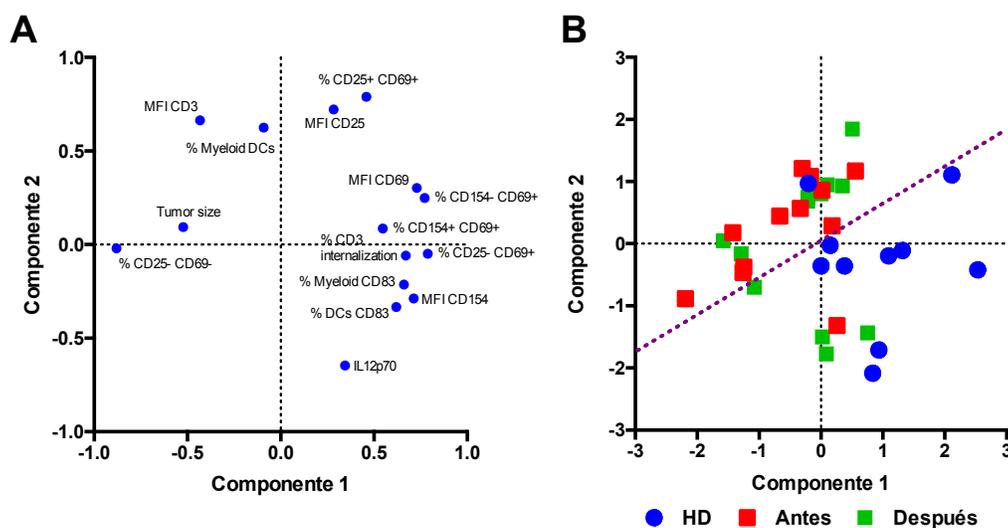


Figura 46. El análisis por componentes principales permite diferenciar donantes sanas de pacientes con cáncer. Espacio de distribución de cargas de las variables seleccionadas por PCA, Derecha. Distribución de las muestras según el puntaje de PCA (PC score) de donantes sanas (círculos azules n=10), pacientes con cáncer de mama antes (n = 12 cuadros rojos) y después de la quimioterapia (n = 12 cuadros verdes). La línea punteada separa el comportamiento general de pacientes vs donantes sanas a la izquierda y derecha de la línea respectivamente.

En esta figura se puede observar que el comportamiento de las pacientes pre-quimioterapia se aparta del comportamiento de las mujeres sanas y además que la ubicación de algunas pacientes pos-quimioterapia “migran” en dirección a la región en donde se encuentra la

mayoría de mujeres sanas. Lo anterior sugiere que empleando PCA es posible discriminar los estatus de paciente y de mujer sana y que este análisis permite evidenciar en algunas pacientes pos-quimioterapia una transición de su estatus inmunológico hacia el de mujer sana sugestivo de una recuperación de las variables inmunológicas analizadas en estas pacientes favorecida por la quimioterapia y probablemente asociado a la respuesta clínica de las pacientes.

Análisis automatizado por FLOCK confirma la capacidad de respuesta de LT

FLOCK fue utilizado con el fin de evaluar si la citometría de flujo permite detectar cambios en las poblaciones celulares. Inicialmente como control, se comparó la distribución de agrupaciones celulares determinadas por FLOCK en PBMCs de 10 mujeres donantes sanas (datos fusionados en FlowJo luego de la selección de células únicas en la región linfoide), estimulados o no con perlas acopladas a antiCD3/CD28/CD2 por 24 horas seguida de la marcación con anticuerpos fluoro-marcados contra CD3, CD25, CD69 y CD154, con el fin de comparar en mujeres sanas el patrón de agrupamiento de las células antes y después del estímulo. Cada agrupación de células es presentada en una gráfica de puntos con un color y la gráfica permite apreciar además el patrón de distribución de las agrupaciones dentro de la población (Figura 47).

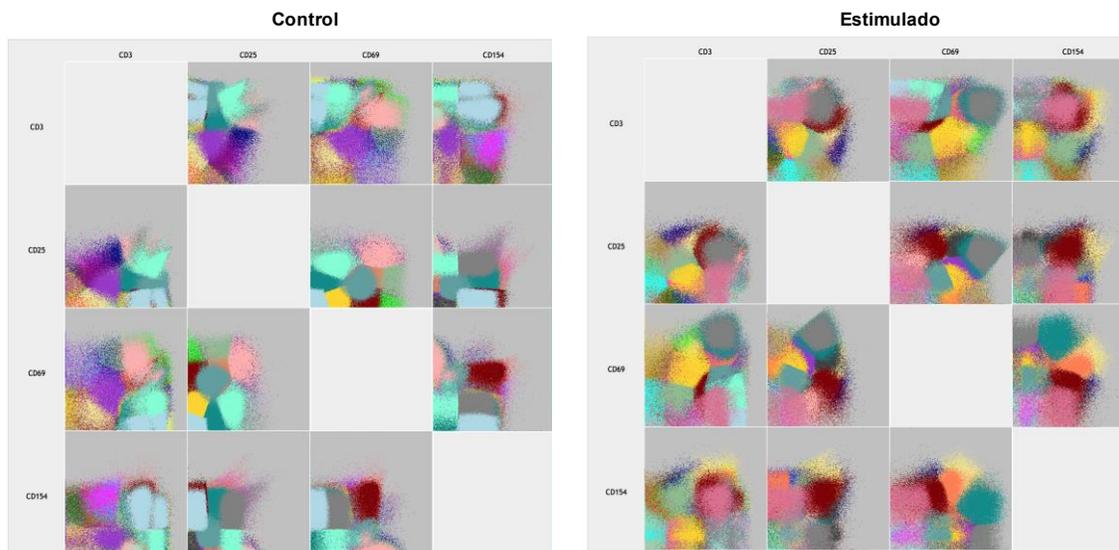


Figura 47. Análisis por FLOCK del comportamiento de las células en respuesta al estímulo de LT en PBMCs de donantes sanas. Resultado del análisis por FLOCK del patrón de agrupamiento de células en PBMCs de 10 individuos sanos estimulados (Estimulados) o no (Control) con perlas acopladas a anticuerpos contra CD3, CD28, y CD2 por 24 horas in vitro. La figura muestra gráficos de dispersión de puntos en que los grupos de células aparecen teñidas con diferentes colores y organizadas en una matriz en la que el patrón de agrupamiento está determinado por la co-expresión de todas las posibles combinaciones de dos marcadores de activación de LT (expresión de CD3, CD25, CD69 y CD154). En cada uno de los ejes se describen los anticuerpos fluoro-marcados cuyo patrón de tinción determina el patrón de distribución de las células.

Como se puede observar en la Figura 47, con respecto al patrón de grupos de células en la muestra control no estimulada (izquierda), este patrón experimentó cambios luego de la estimulación (derecha). A partir de este resultado se obtuvo la información de los “centroides” (MFI de cada parámetro en cada agrupación de células y porcentaje de eventos dentro de cada grupo de células – Ver Anexo 7. Análisis multidimensionales).

Cuando se compararon los MFI de centroides de muestras estimuladas y no estimuladas, este análisis reveló un cambio en la intensidad media de fluorescencia (MFI) de los marcadores analizados en los centroides (Figura 48). Como se esperaba, en el caso de la expresión de CD3 hubo una tendencia a la disminución de la media del MFI de CD3 en “centroides” de células estimuladas con respecto a “centroides” no estimulados (Figura 48, CD3). Igualmente, se detectó tendencia al incremento de la media del MFI en “centroides” en los que se analizó la expresión de CD25 y CD154 y un aumento estadísticamente significativo ($p < 0.01$) en la media del MFI de CD69 en “centroides” de clúster de células estimuladas con respecto a las no estimuladas (Figura 48).

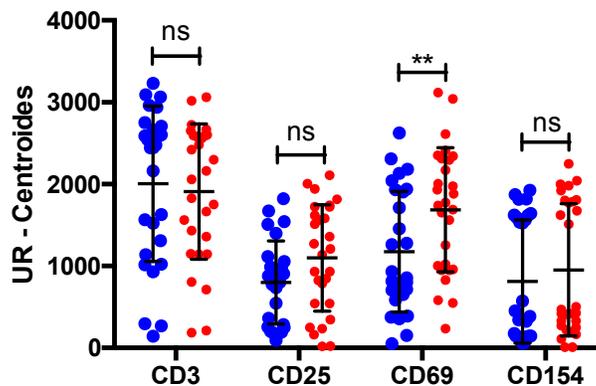


Figura 48. Análisis comparativo de las unidades relativas (UR) en cada marcador obtenido de los centroides. Niveles de intensidad de fluorescencia en unidades relativas (UR) de cada uno de los centroides entre muestras de donantes sanas no estimuladas (círculos azules) vs estimuladas (círculos rojos) en cada uno de los marcadores de activación evaluados (CD3, CD25, CD69 y CD154). Cada punto representa una agrupación (clúster) de células determinado por FLOCK. Prueba t test – Mann-Whitney entre estimulado vs no estimulado. Gráfica de media con SD. Números representan el valor p de cada comparación. ** $p < 0.01$

Una vez determinado la capacidad del sistema FLOCK para caracterizar los diferentes grupos celulares en las muestras de 10 voluntarias sanas, se procedió a evaluar el comportamiento de grupos celulares en muestras provenientes de pacientes con cáncer de mama antes y después de la quimioterapia. Se emplearon los datos de citometría de flujo de una paciente representativa en el mismo ensayo *in vitro* utilizado con las muestras de

las donantes sanas en el que se compararon cuatro situaciones (pre y pos-quimioterapia estimuladas o no con perlas por 24 horas). Como se observa en la Figura 49, las gráficas de dispersión de puntos en la matriz en la que se muestran los marcadores analizados mostraron cambios en el patrón de expresión de los marcadores de activación en grupos de la muestra estimulada y no estimulada tanto en las muestras pre- como pos-quimioterapia. Para poder confirmar si estas diferencias eran estadísticamente significativas, se realizó un análisis de comparación de mediana (Figura 50).

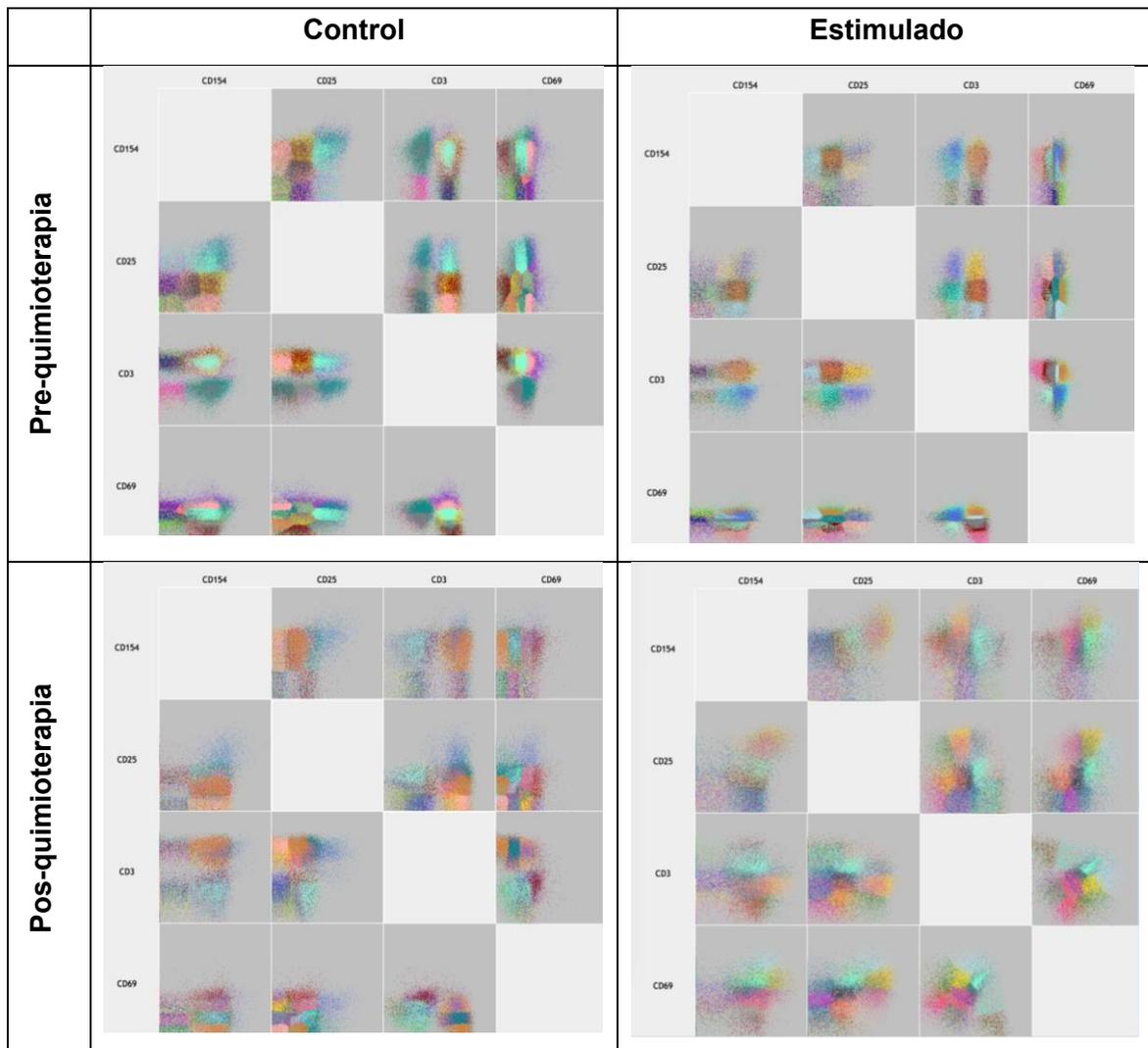


Figura 49. Análisis por FLOCK en la muestra de una paciente antes y después de quimioterapia luego de ser estimuladas o no *in vitro*. Al igual que en la Figura 47, se muestran poblaciones en grupos en colores independientes determinadas por la expresión de los marcadores señalados en la matriz. Presentación de los resultados de una paciente representativa de 12 analizadas.

El análisis estadístico muestra claramente la respuesta funcional en respuesta al estímulo *in vitro* de centroides analizados en la muestra de PBMCs de la paciente tanto pre- como pos-quimioterapia (Figura 50, paneles superiores); mientras que previo a la quimioterapia no hubo ninguna diferencia estadísticamente significativa entre la muestra estimulada (círculos rojos) y no estimulada (círculos azules) (Figura 50 panel izquierdo: pre-quimioterapia), posterior a la quimioterapia con A/C, se evidenciaron claramente cambios estadísticamente significativos como el aumento de la internalización del CD3 y el incremento en la expresión de CD25 y CD69 (Figura 50 panel derecho). Finalmente, el efecto de la quimioterapia se observó claramente cuando la comparación se hizo solo entre las muestras pre- y pos-quimioterapia estimuladas (Figura 50 panel inferior) en que en la muestra pos-quimioterapia se observa un aumento estadísticamente significativo de la internalización de CD3 y de la expresión de CD69 en respuesta al estímulo.

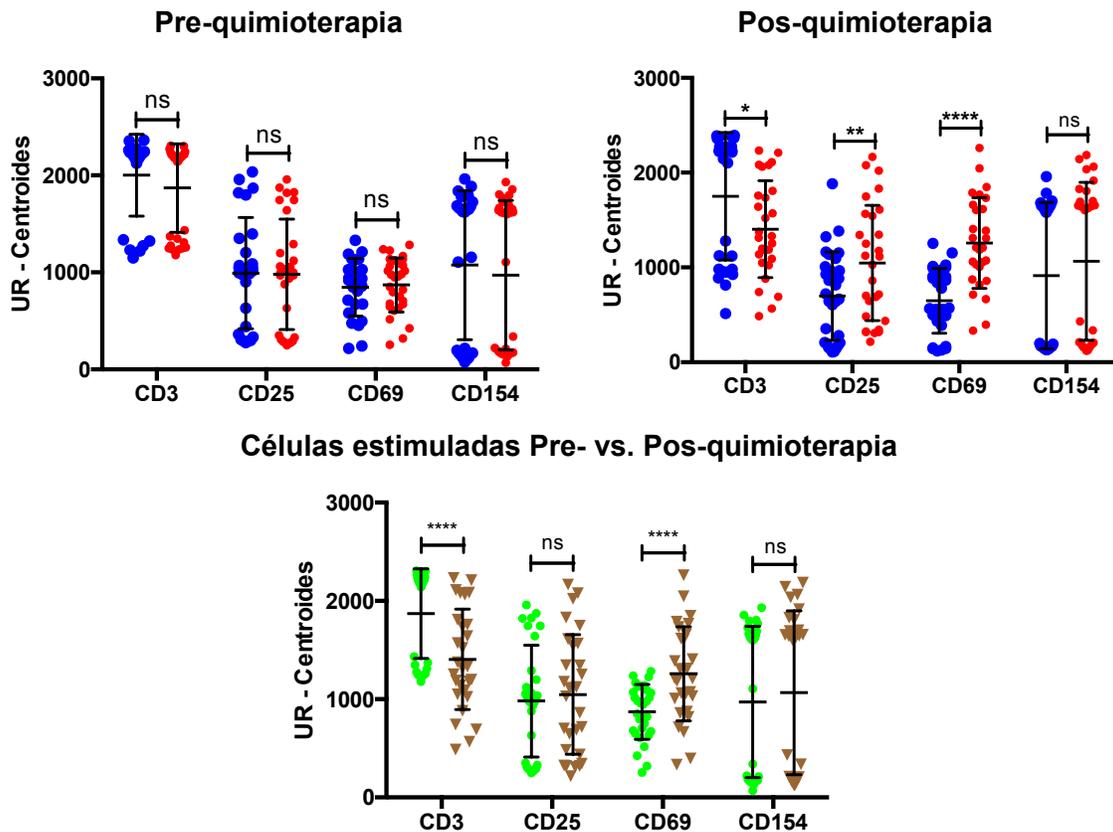


Figura 50. Comparación del fenotipo de centroides en respuesta a estímulo *in vitro* de PBMCs de pacientes pre y pos-quimioterapia. Análisis de las unidades relativas de fluorescencia (UR) de cada uno de los centroides generados a partir de FLOCK. Cuantificación de la expresión (UR) de CD3, CD25, CD69 y CD154 en la muestra de una paciente pre- (panel izquierdo) y pos-quimioterapia (panel derecho) con A/C en respuesta a la estimulación con perlas antiCD3/CD28/CD2 *in vitro* (círculos rojos) o cultivo control no estimulado (círculos azules). Panel inferior, comparación de las muestras estimuladas pre (Círculos verdes) vs pos-quimioterapia (triángulos cafés) -. Pruebas t no paramétricas con Mann-Whitney. Grafica de mediana con SD. (* $p < 0.05$), (** $p < 0.01$), (**** $p < 0.0001$). ns: diferencia no significativa.

Análisis de la respuesta de LT por SPADE confirma deficiencia en pacientes con cáncer de mama

Para la evaluación de la capacidad funcional de LT mediante el uso del algoritmo SPADE fue necesario el uso del software MATLAB (Mathworks, versión 2015) y de un código disponible en línea [228]. En primer lugar, se evaluó con SPADE utilizando PBMCs de donantes sanas. En este ensayo se cotejó nuevamente el grado de internalización de CD3 con la expresión de CD25, CD69 y CD154 como marcadores de activación. Cuando se analizan los datos de citometría de manera manual se observa una clara reducción del MFI de CD3 (Figura 35) asociada a la expresión de marcadores de activación (CD25, CD69 y CD154) en respuesta al estímulo (Figura 36). La interfaz gráfica de SPADE comprende una serie de herramientas que permiten, además del análisis del grado de expresión de los marcadores, procesos de transformación de los datos, número de eventos a analizar por muestreo y fijar el nivel de umbral para el análisis, entre otros (Figura 51) [228].

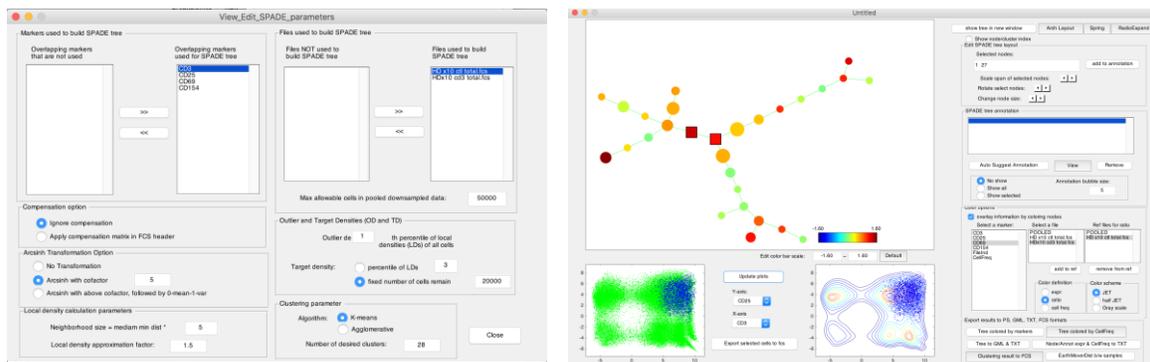


Figura 51. Interfaz de propiedades y salida de SPADE en MATLAB. En la ventana de la izquierda se determinan los parámetros para el análisis por SPADE incluidos los marcadores y el número de grupos. En la ventana de la derecha se observa la salida del análisis donde se muestra el árbol SPADE, la intensidad (escala de colores) de los diferentes marcadores en los grupos (proporción a un referente o total), ubicación del grupo seleccionado en relación con los datos originales.

En primer lugar, se analizaron los datos de citometría de una mujer sana representativa de 10 analizadas en el que se estableció el número de grupos basado en resultados de FLOCK seguido de una comparación de la expresión de CD3, CD25, CD69 y CD154 entre el cultivo control y el estimulado con perlas antiCD3/CD28/CD2 por 24 horas. Como se muestra en la Figura 52, se observó acorde a lo esperado una disminución en la intensidad en la expresión de CD3 (color azul) asociado con un incremento en la expresión de CD25 y CD69 (color rojo). De manera llamativa, el nivel de expresión relativo de CD154 en respuesta al

estímulo *in vitro* - observado en el análisis manual - no fue evidente en las poblaciones analizadas por SPADE.

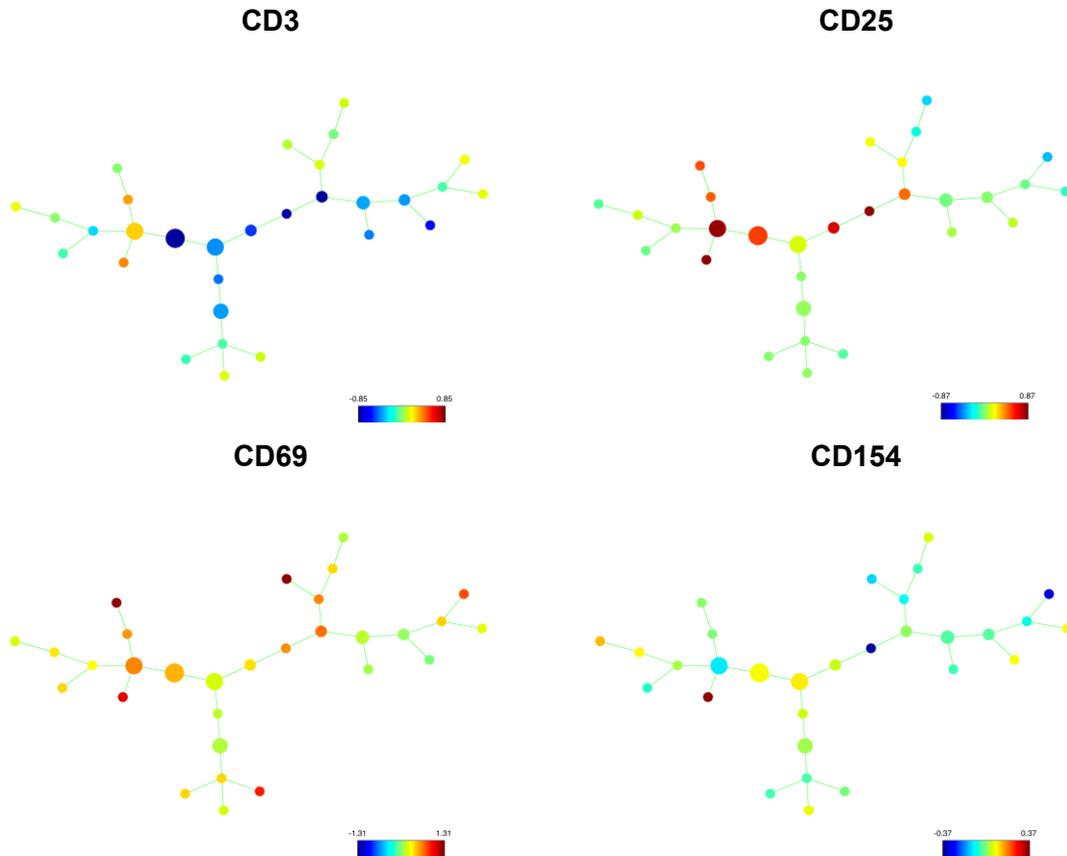


Figura 52. Árbol de SPADE representativo de la respuesta de PBMCs al estímulo *in vitro*. Análisis por SPADE de PBMCs de una donante sana representativa de 10 analizadas, en el que se muestra el nivel de expresión de cada marcador (escala de colores, bajo = azul – alto = rojo) en proporción al cultivo no estimulado en una escala de colores en el que se observa una disminución de CD3 (círculos azules) con un incremento de CD25 y CD69 (círculos rojos) y diferentes niveles de expresión de CD154 en los grupos evaluados.

Una vez establecido que la herramienta SPADE permite evidenciar el efecto de la estimulación *in vitro* en muestras individuales de donantes sanas, mediante la concatenación de archivos de citometría de flujo permitida por SPADE, se estableció el nivel de expresión de los marcadores CD3, CD25, CD69 y CD154 en 10 muestras de mujeres sanas luego del estímulo (Figura 53 – Columna izquierda: Donantes sanas x10). Una vez obtenido este resultado se procedió a cotejar bajo las mismas condiciones del ensayo *in vitro* los resultados de una paciente pre y pos-quimioterapia con los resultados concatenados de las 10 mujeres sanas. Con respecto a la muestra no estimulada, la muestra estimulada de la paciente pre-quimioterapia no mostró cambios importantes

(Figura 53 – Columna central: Pre-quimioterapia). En contraste, en respuesta al estímulo, la muestra de la paciente luego del tratamiento mostró una capacidad funcional de LT cercana a la observada en las muestras de las 10 donantes sanas luego del estímulo. De manera notable la recuperación funcional de LT pos-quimioterapia en la paciente se evidenció con el grado de expresión de los cuatro marcadores evaluados (Figura 53 – Columna derecha: Pos-quimioterapia).

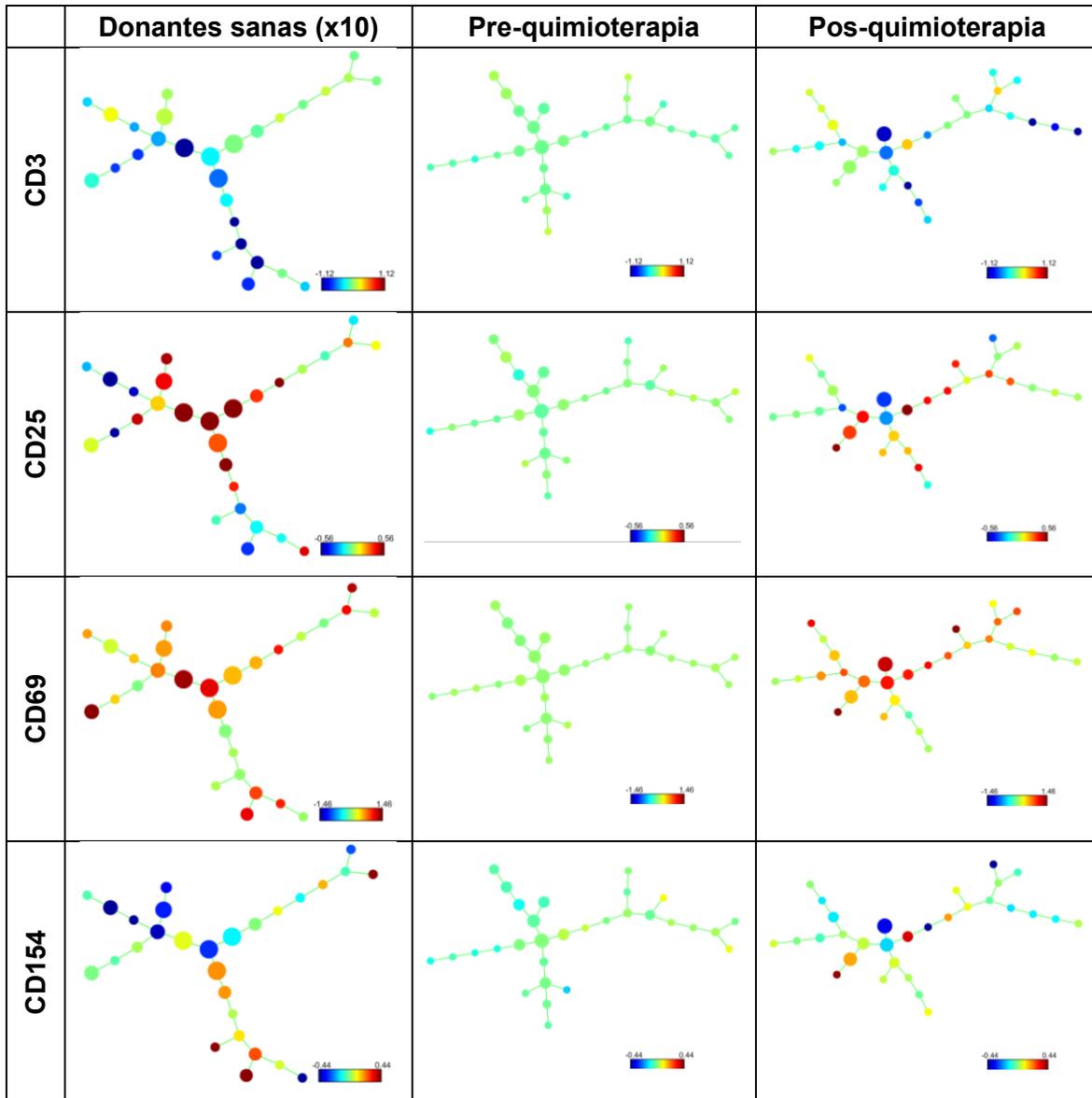


Figura 53. Árbol de SPADE de los datos concatenados de 10 donantes sanas y una paciente pre y pos quimioterapia evidencia la recuperación de la respuesta al estímulo in vitro de las células en la muestra pos-quimioterapia. Matriz de análisis por SPADE de 10 donantes sanas (columna de la izquierda) y una paciente pre- y pos-quimioterapia (columna central y de la derecha respectivamente) en que se muestra el nivel de expresión de cada marcador (diferentes filas) en proporción al cultivo no estimulado. En los resultados presentados en las columnas pre- y pos-quimioterapia, se ajustó la escala en proporción al valor más alto de expresión registrado en cada marcador. Se presenta una muestra representativa de 12 pacientes analizadas. Cada árbol se analizó en relación al cultivo no estimulado.

Estos resultados de SPADE, son concordantes con los resultados obtenidos en FLOCK en el sentido de que la respuesta funcional de LT de las pacientes pre-quimioterapia es deficiente comparada con la respuesta de donantes sanas. En conjunto, el uso de dos tipos de análisis automatizado permitió confirmar la recuperación de la capacidad funcional de las células en las pacientes luego de tres ciclos de terapia neo-adyuvante con A/C sugerida en el **Capítulo 2** por los resultados del análisis manual.

Basados en los resultados del análisis manual en que las poblaciones *ex vivo* de Tregs, MDSCs y DCs primarias no permitió evidenciar diferencias significativas entre los donantes sanas y las pacientes previo y posterior a la quimioterapia, se decidió procesar los datos de citometría de tales mediciones mediante análisis automatizado por SPADE con el fin de explorar si el comportamiento *ex vivo* de estas sub-poblaciones celulares permiten establecer diferencias entre los grupos analizados (mujeres sanas vs. pacientes y pacientes vs. pre- y pos-quimioterapia).

Para analizar el comportamiento *ex vivo* de Tregs en PBMCs se monitoreó en LT-CD4+ la co-expresión de los marcadores CD25+, CD127neg y FoxP3+ (Figura 54A) En el caso de MDSCs y DCs primarias (mieloides y plasmacitoides) se utilizaron los marcadores Lin-1/CD15, HLA-DR, CD33/CD13, CD11c y CD123 (Figura 54B). Si bien en ambos grupos de análisis se observó una distribución de los diferentes marcadores en cada una de estas tres sub-poblaciones no fue posible establecer diferencias entre los grupos analizados (datos no mostrados).

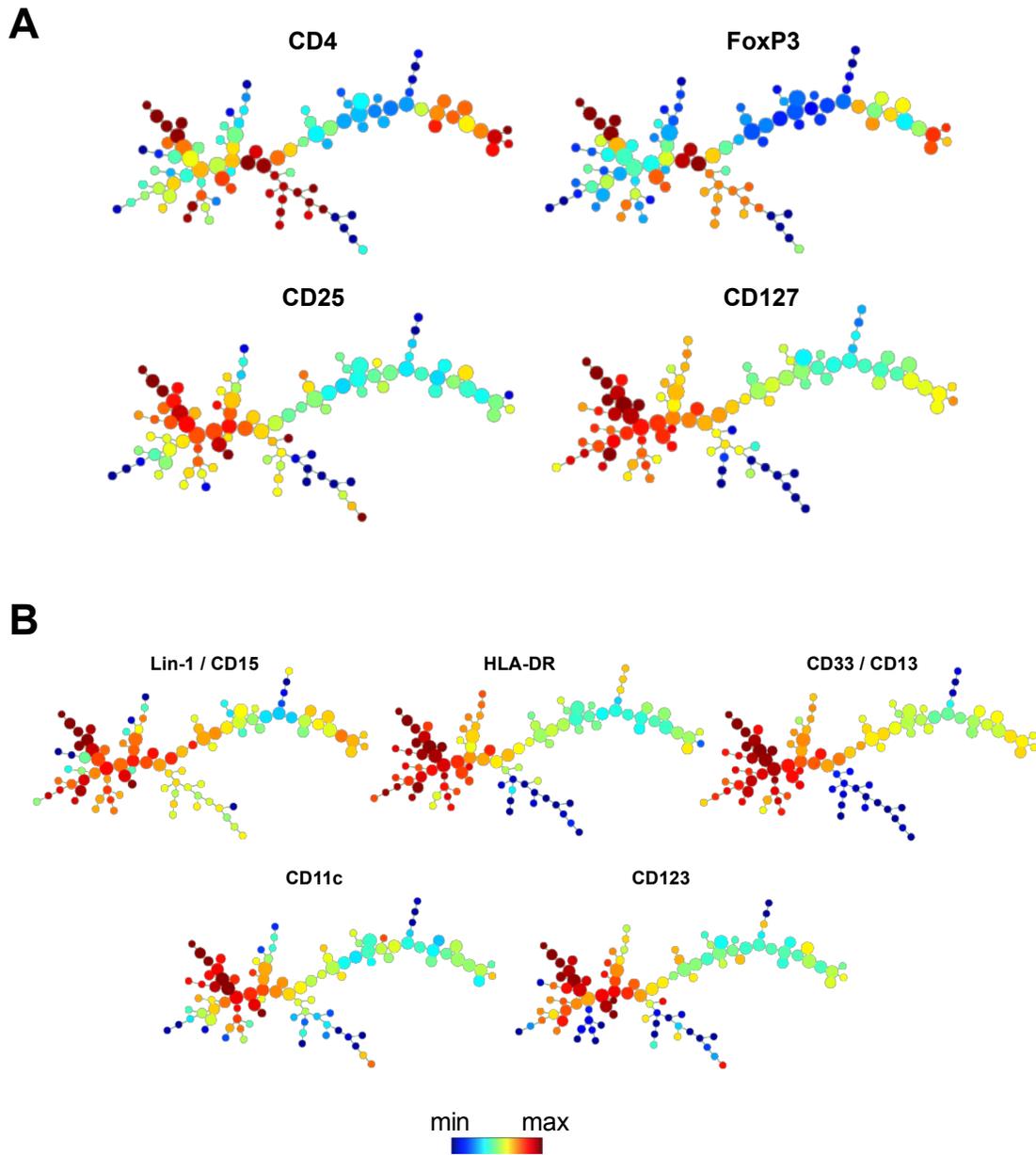


Figura 54. Evaluación por SPADE del patrón jerárquico de expresión de marcadores característicos de Tregs, MDSCs y DCs primarias. Análisis de SPADE proveniente de donantes sanas (n=10) y pacientes pre y pos quimioterapia (n=12) para los marcadores de Tregs CD4, CD25, CD127 y FoxP3 (A) y marcadores CD15, HLA-DR, CD33/CD13, CD11c y CD123 en células Lin-1 negativas utilizados con el fin de monitorear niveles de MDSCs o DCs: células negativas para Lin-1/CD15, HLA-DR, CD33/CD13 y CD11c+CD123- (DCs mieloides) o CD123+/CD11c- (DCs plasmacitoides) (B). El nivel de expresión de cada marcador se muestra en escala de colores (azul - mínimo, rojo – máximo).

Análisis de organización jerárquica no supervisada - HCL

La expresión de cada marcador en términos de magnitud del MFI en grupos celulares obtenida en FLOCK permite mediante el software MeV (Multi-experiment Viewer – TM4) obtener una organización jerárquica no supervisada (HCL – hierarchical clustering) de grupos celulares cuya salida es un “mapa de calor”.

Los resultados tanto de FLOCK como de SPADE analizados con HCL nos permitió en primer lugar un análisis jerárquico de poblaciones celulares con base en la expresión relativa de los marcadores CD3, CD25, CD69 y CD154 en LT de 10 mujeres sanas antes y después del estímulo con perlas acopladas a anti-CD3, anti-CD28 y anti-CD2. Como se observa en la Figura 55, en respuesta al estímulo se evidencian varias poblaciones con incremento en la expresión simultánea de los marcadores de activación CD25, CD69 y CD154 en la muestra estimulada. Adicional a la aparición de agrupaciones celulares que sobre-expresan todos los marcadores de activación, la frecuencia de eventos pertenecientes a cada población (Figura 55, barras horizontales) reveló que los porcentajes de poblaciones de células activadas fue sistemáticamente mayor en la muestra estimulada y menor en la muestra control, principalmente por un incremento en la expresión de CD154.

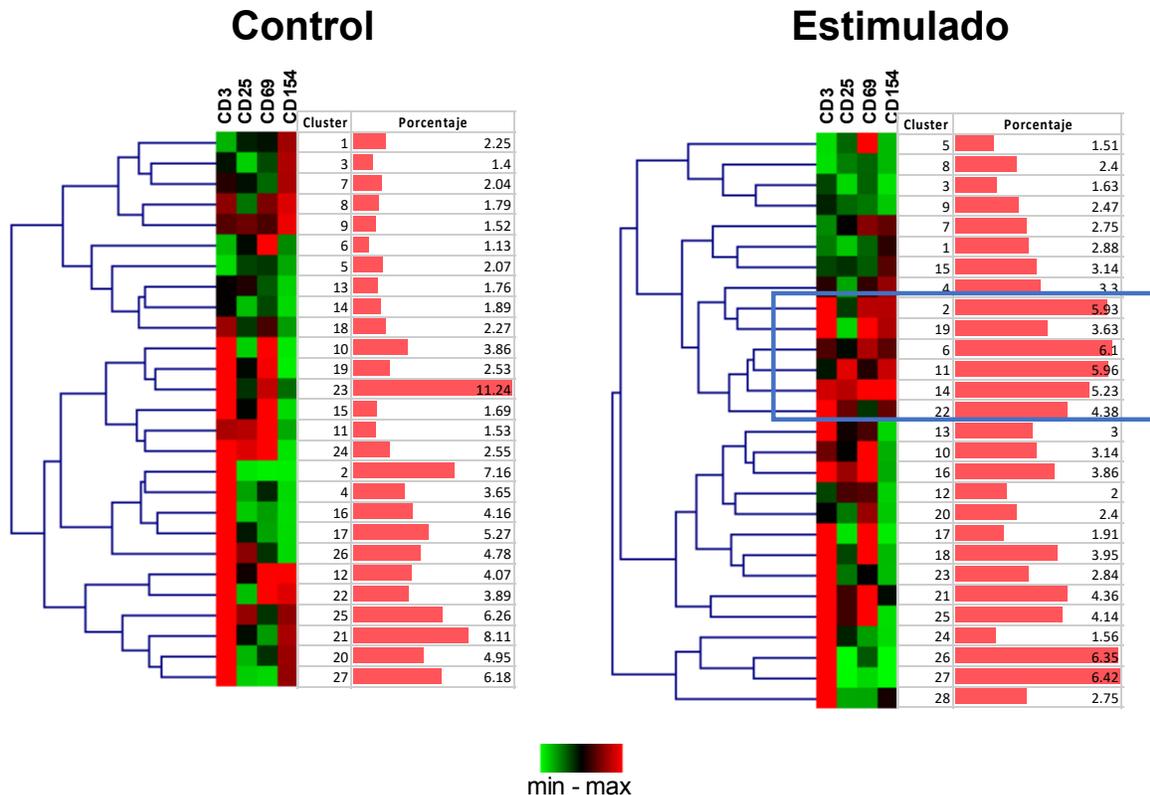


Figura 55. Representación en mapa de calor del análisis por HCL de las agrupaciones de 10 donantes sanas. Se evaluó el análisis jerárquico de los grupos obtenidos por la herramienta FLOCK de 10 muestras de donantes sanas sin- (control) y con- estímulo *in vitro* (estimulado) con perlas acopladas a anti-CD3, anti-CD28 y anti-CD2. En el mapa de calor se observa la intensidad de la expresión de cada marcador a partir del MFI y al lado derecho se muestra el porcentaje de cada grupo en la población. Muestra representativa de 10 mujeres sanas analizadas. Cuadro azul resalta los clústers asociados con un fenotipo de activación y alta frecuencia de células.

Los resultados de análisis jerárquico no supervisado (HCL) en muestras de donantes sanas en respuesta al estímulo *in vitro*, nos condujo a evaluar de igual manera en pacientes el efecto de la quimioterapia en la capacidad funcional de LT. En consecuencia, a partir de los resultados de FLOCK (Figura 49) se empleó HCL en muestras pre- y pos-quimioterapia en las dos condiciones de cultivo (control y estimulado). Como se observa en la Figura 56, en una paciente representativa de 12 analizadas, en la muestra previa a la quimioterapia (paneles superiores) no hay una clara evidencia del efecto de la estimulación *in vitro*, y no hay agrupaciones celulares que expresen de manera simultánea los marcadores de activación. Sin embargo, bajo el mismo análisis, la muestra posterior a la quimioterapia (Figura 56, paneles inferiores) se asemeja a las muestras de las donantes sanas en el sentido de que hay una expresión simultánea de marcadores de activación con incremento en el porcentaje de células con este tal perfil de activación.

Con base en nuestros resultados, el procesamiento de datos de citometría haciendo uso de sistemas no supervisados y diferentes tipos de análisis automatizado sugiere que las pacientes con cáncer de mama antes de la quimioterapia presentan cierta deficiencia funcional de LT y que esta deficiencia es recuperada parcialmente luego de tres ciclos de quimioterapia neo-adyuvante.

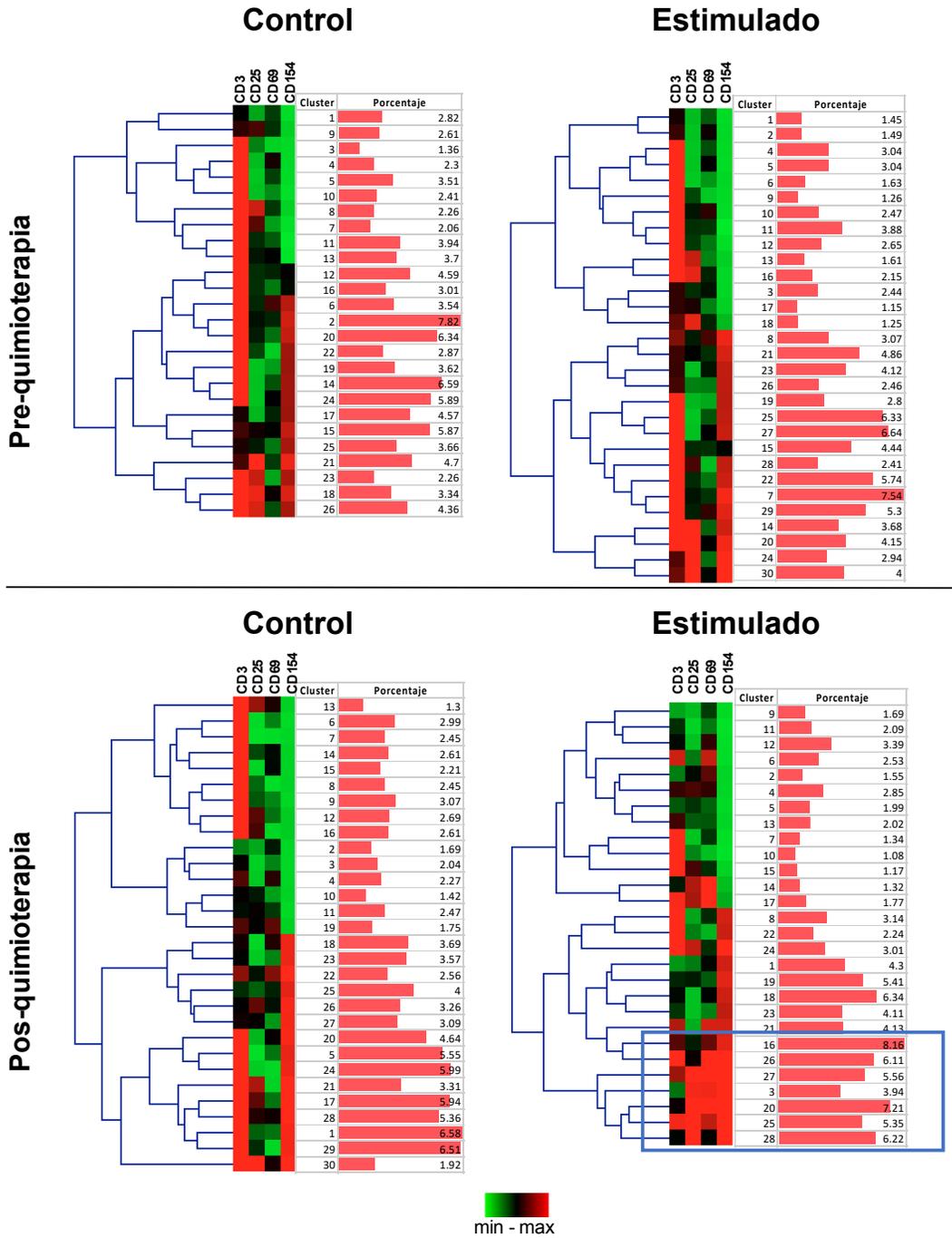


Figura 56. Mapa de calor del análisis por HCL de una paciente antes y después de quimioterapia en respuesta a la estimulación in vitro. Análisis jerárquico de los grupos obtenidos por la herramienta FLOCK de una paciente antes (parte superior) y después de la quimioterapia (parte inferior) sin (control) y con estímulo in vitro (estimulado). Frecuencia de eventos/células en cada grupo son presentados en barras horizontales. Se presentan resultados representativos de una de las 12 pacientes analizadas. Cuadro azul resalta los clústers asociados con un fenotipo de activación y alta frecuencia de células.

Finalmente, los análisis de los resultados *ex vivo* de las pacientes utilizando análisis manual y por SPADE, mostraron una gran complejidad en las poblaciones que no permitieron detectar diferencias claras entre donantes sanas y pacientes. Una muestra de esta complejidad es el mapa de calor presentado en la Figura 57, el cual comprende una muestra de 100 clústers y el nivel de expresión de cada marcador en estas poblaciones en los tres grupos de mujeres analizadas (mujeres sanas, y pacientes pre y pos-quimioterapia, HD, Pre- Pos respectivamente en Figura 57).

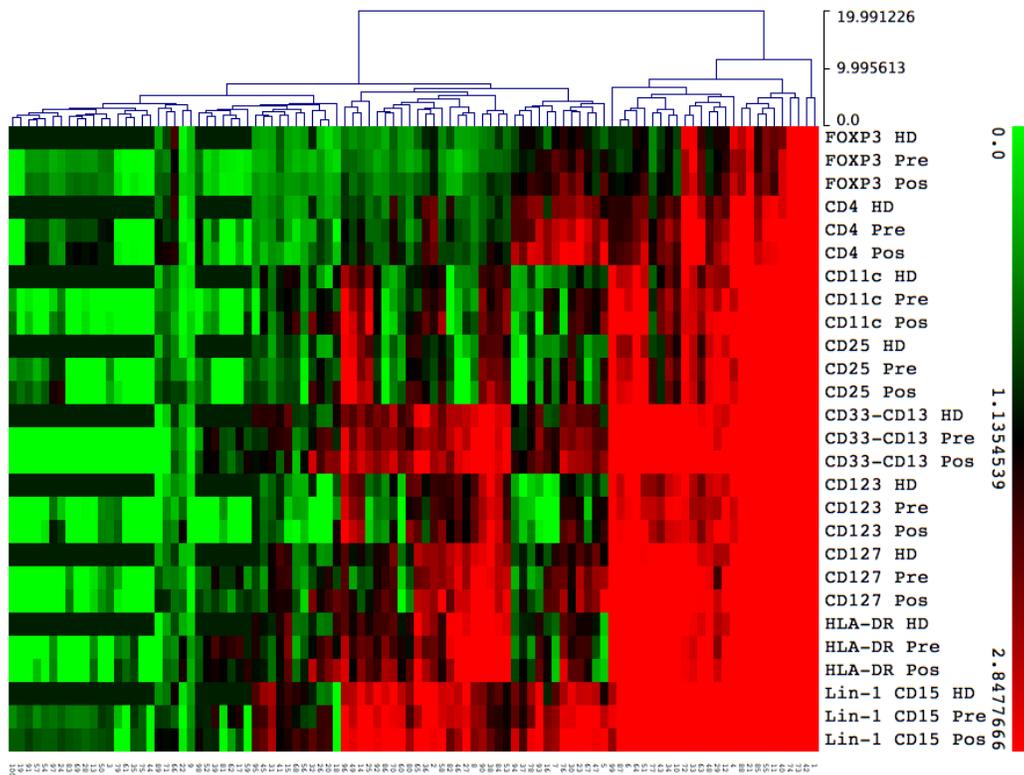


Figura 57. Mapa de calor del análisis por HCL de distintas sub-poblaciones celulares analizadas *ex vivo* por FC en sangre de donantes sanas y pacientes antes y posterior a la quimioterapia. Análisis jerárquico de 100 grupos obtenidos por SPADE del total de donantes sanas (n=10) y pacientes antes (pre) y después de la quimioterapia (pos) (n=12 cada una) de la caracterización *ex vivo* de las poblaciones de Tregs, MDSCs y DCs mieloides y plasmacitoides.

CITRUS permitió detectar nuevas sub-poblaciones celulares capaces de diferenciar pacientes de mujeres sanas

Debido a que el uso de las herramientas mencionadas hasta aquí no permitió definir poblaciones analizadas *ex vivo* que permitiesen diferenciar mujeres sanas de pacientes y dentro de las pacientes el estado pre- vs. pos-quimioterapia, para el análisis *ex vivo* de las

distintas sub-poblaciones analizadas por FC multi-paramétrica en el **Capítulo 2** (MDSCs, Tregs y DCs), se decidió emplear una herramienta adicional denominada CITRUS.

Inicialmente se evaluó mediante CITRUS la expresión *ex vivo* de los marcadores analizados por FC en muestras de donantes sanas (n=10), y pacientes previo y posterior a la quimioterapia (n=12) (Figura 28) con el fin de identificar un posible “biomarcador” o fenotipo de células que permitiese diferenciar los grupos en estudio. En la Figura 58, se muestra el perfil de expresión de cada marcador utilizado para el análisis *ex vivo* de DCs (Lin-1neg/CD15, HLA-DR+, CD11c+ (mieloides) o CD123+ (plasmacitoides)), MDSCs (Lin-1neg/CD15, HLA-DRneg, CD33+/CD13+) y Tregs (LT-CD4+, CD25+, CD127neg y FoxP3+), en el árbol de poblaciones (Ver descripción en CITRUS). Aunque la estructura de análisis de CITRUS se asemeja a la de SPADE, estas se diferencian en el sentido de que en el árbol generado por CITRUS las poblaciones más alejadas del centro están contenidas en la población inmediatamente anterior, es decir, se describe la distribución del todo y cada población es generada con base en atributos propios de cada sub-población.

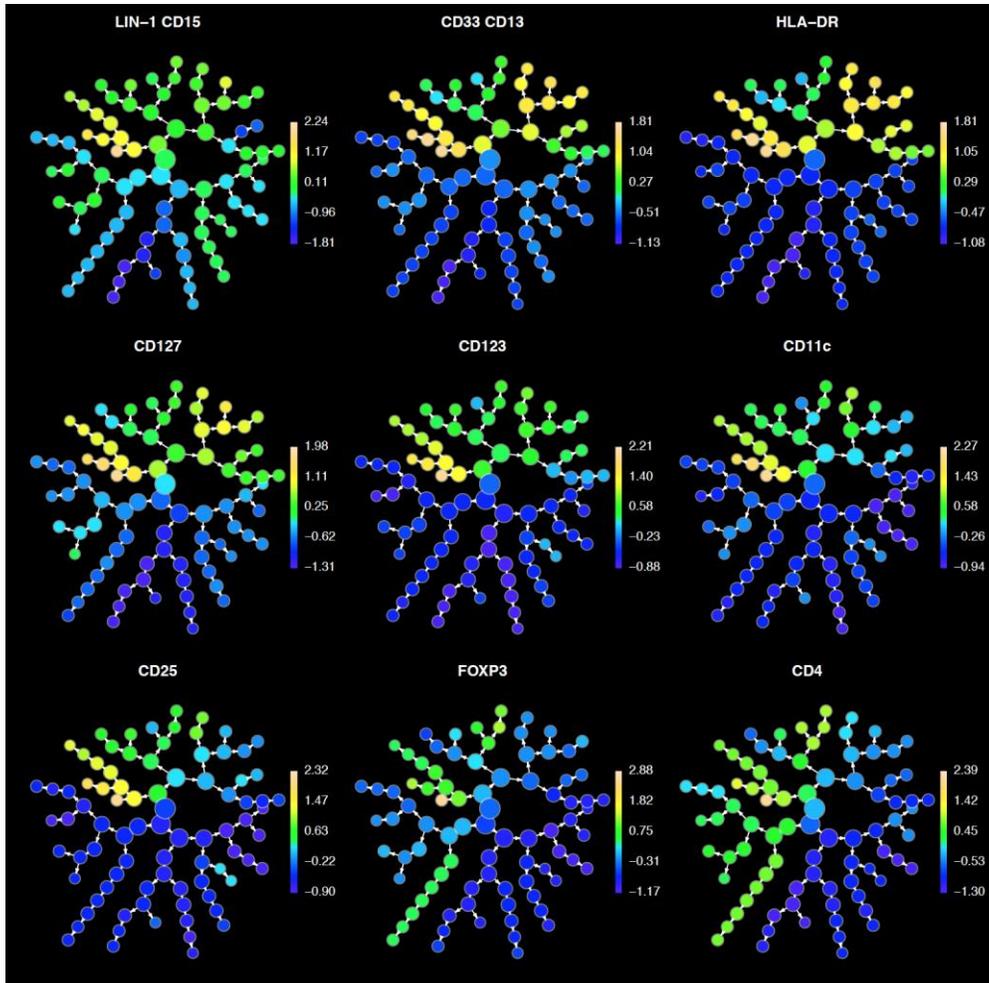


Figura 58. Perfil de abundancia y expresión de marcadores en árbol jerárquico generado por CITRUS con el fin de analizar ex vivo fenotipo y frecuencia de MDSCs, DCs y Tregs en sangre. Grado de expresión (unidades relativas) de marcadores ex vivo en PBMCs en las muestras de donantes sanas (n=10), y pacientes pre y pos-quimioterapia (n=12 cada una). Datos de citometría empleados del análisis ex vivo (ver Figura 28).

Validación de los modelos predictivos para poblaciones analizadas por FC ex vivo

Luego del análisis de expresión de los marcadores en las poblaciones determinadas por CITRUS, se debe analizar la validación de los modelos (Figura 59) En este tipo de gráfica propio de la validación de los modelos en CITRUS se compara la tasa de descubrimientos de falsos positivos (curva azul) - que guarda relación con el número de características del modelo (escala “number of model features” en la parte superior de la Figura 59) – la cual es empleada para predecir la respuesta y la curva roja, la cual señala la tasa de error estimada del modelo. Como se mencionó en la sección de métodos (Figura 42), los modelos se representan con un punto verde y un diamante naranja; el primero (punto verde) llamado **cv.min**, corresponde al modelo que presenta la menor tasa de error. El segundo modelo

(diamante naranja) llamado **cv.1se**, representa el modelo más simple con una tasa de error establecida de 1. Idealmente la salida de validación de datos debe describir el desplazamiento de izquierda a derecha de las curvas roja y azul dentro de la mitad inferior de la gráfica la cual determina la rata de error (Model Cross Validation Error Rate). Como se observa en la Figura 59, a pesar de que la curva no es perfecta, el modelo empleado (**cv.min**, punto verde) es suficiente para permitir diferenciar la salida (en este caso estatus de paciente y donante sana).

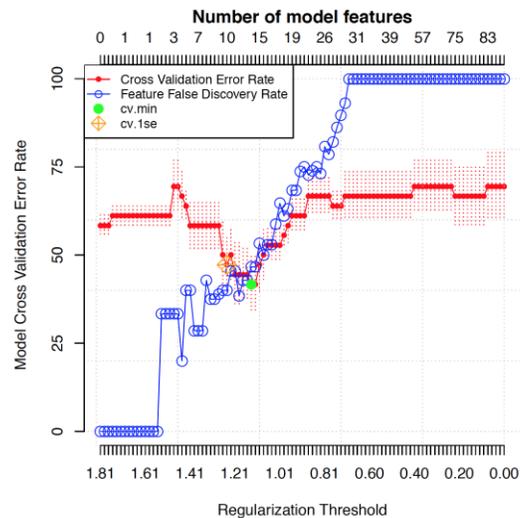


Figura 59. Gráfica de validación del modelo predictivo. Curva roja, la tasa de error estimada del modelo y curva azul que corresponde a la tasa de falsos descubrimientos. Se muestran los dos modelos predictivos aplicables a los datos obtenidos: **cv.min**, - círculo verde (menor tasa de error) y **cv.1se** (tasa de error establecida de 1) – diamante naranja.

Una vez validados los datos y el modelo, se analizan las agrupaciones de células que permiten diferenciar en este caso pacientes de donantes sanas. Como se observa en la Figura 60A, en el árbol jerárquico se resaltan las agrupaciones cuyo fenotipo y expresión según CITRUS es diferente entre los grupos analizados. El fenotipo de las células evaluadas *ex vivo* que son capaces de diferenciar las muestras de donantes sanas de pacientes pre y pos quimioterapia se describe en la Figura 60B. Las características fenotípicas del clúster son compatibles con un fenotipo de células dendríticas plasmacitoides (Lin-1 negativa, HLA-DR+, CD123+, CD11c-, CD4-, FoxP3-).

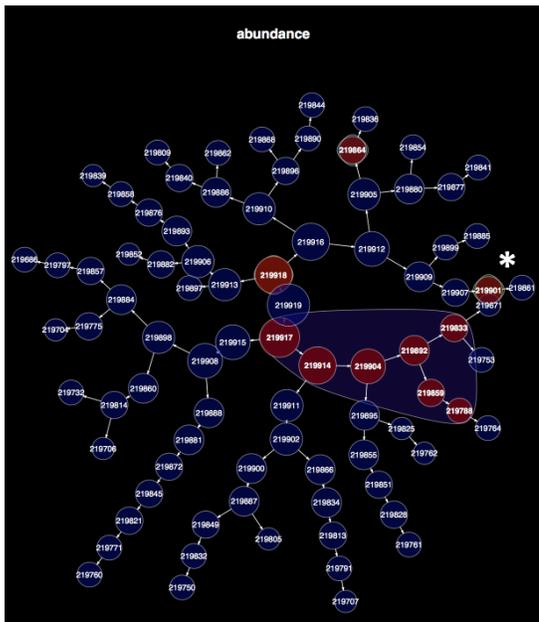
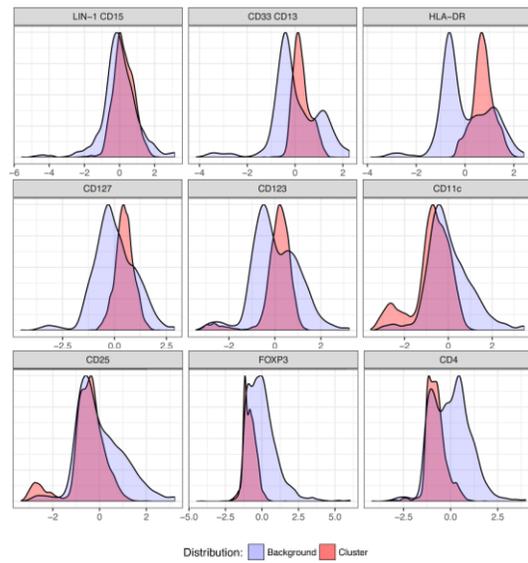
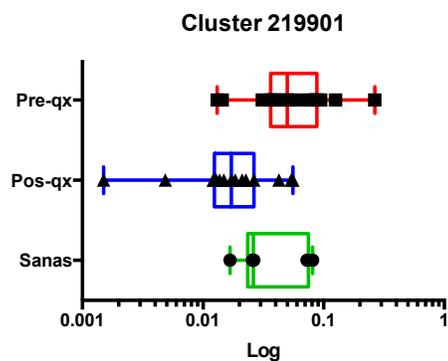
A**B****C**

Figura 60. Distribución jerárquica y caracterización del clúster 219901 en el análisis ex vivo. (A) Árbol jerárquico en donde se muestra la dependencia entre cada uno de las agrupaciones generadas. En rojo se resaltan los clústeres de mayor interés que tienen una expresión diferencial significativa entre los tres grupos analizados. * Denota clúster 219901. **(B)** Histogramas de expresión de cada marcador del clúster (rojo) en relación con la expresión basal (azul). De izquierda a derecha y de arriba a abajo, Lin1/CD15, CD33/CD13, HLA-DR, CD127, CD123, CD11c, CD25, FoxP3 y CD4. **(C)** Gráfica de cajas y bigotes de la abundancia del clúster 219901 para cada uno de los grupos analizados.

Finalmente, la abundancia de estas agrupaciones (clúster) es diferente entre los grupos analizados; en este caso el clúster 219901, tiene una expresión mayor en el grupo de pacientes previo a la quimioterapia (Figura 60C). El análisis estadístico de esta subpoblación de DCs evaluada *ex vivo* reveló que ésta se sobre-expresa en pacientes previo a la quimioterapia. Comparados los niveles de esta población antes y después de quimioterapia se deduce que luego de tres ciclos de quimioterapia con A/C los niveles de esta sub-población disminuyen a niveles similares a los observados en las muestras de las mujeres sanas (Figura 60C).

En el **Capítulo 1** el uso de 2d-aDCs derivadas *in situ* en combinación con un estímulo policlonal para la estimulación del TCR de LT permitió evidenciar la expansión y activación de Tfh circulantes en sangre periférica de individuos sanos (Figura 17 y Figura 18). El monitoreo de la expansión de estas células mediante análisis manual en algunas de las pacientes en quimioterapia utilizando una primera combinación de anticuerpos para monitorear estas células (CD4 FITC, CXCR5 PE Cy7, PD1 APC, CCR6 PE, CCR7 Alexa Fluor 430 y CXCR3 Pacific Blue) no permitió evidenciar diferencias significativas en su expansión en respuesta al mismo estímulo entre voluntarias sanas y pacientes antes y después de tres ciclos de quimioterapia neo-adyuvante (Ver Figura suplementaria 5)

La expansión y activación de Tfh circulantes en sangre periférica de una nueva cohorte de pacientes pre-quimioterapia utilizando la metodología descrita en el **Capítulo 1** (Ver Generación de sub-poblaciones de linfocitos T) y un nuevo panel de anticuerpos para FC multicolor fueron utilizados para el estudio de estas células. Los datos adquiridos por FC fueron analizados por SPADE y por CITRUS con el fin de comparar entre pacientes y donantes sanas la capacidad de 2d-aDCs y el estímulo del TCR de inducir la expansión de LT con fenotipo Tfh en sangre. Igual a como se describió en el Capítulo 1, PBMCs cultivados en alta densidad provenientes de donantes sanas (n=5) y de pacientes pre-quimioterapia (n=6), fueron tratados *in situ* con el coctel de citoquinas de aDCs con el fin de inducir su diferenciación *in situ* en presencia o no de anti-CD3/CD28/CD2 por un periodo de seis días, luego de los cuales los cultivos fueron cosechados y marcados con los siguientes anticuerpos fluoro-marcados: CD4 BV510, CD45RA APC-Cy7, CCR7 FITC, ICOS PE, PD-1 Alexa 647 y CXCR5 PE-Cy7 (todos de Biolegend).

Los datos de FC obtenidos de las muestras estimuladas y no estimuladas fueron analizados utilizando SPADE (número de clúster analizados = 100). Con el fin de establecer el grado de expresión relativa en respuesta al estímulo de cada marcador en los 100 clústers, los resultados fueron normalizados con respecto a las muestras no estimuladas y el patrón neto de expresión se determinó por un análisis HCL. El fenotipo de expresión de los marcadores Tfh en los 100 clúster en respuesta al estímulo es presentado en la Figura 61. En esta figura se evidencian dos patrones de expresión de los marcadores en los 100 clúster, uno por cada grupo de mujeres analizado: pacientes pre-quimioterapia (mitad superior) y mujeres control en la mitad inferior (HD y pre-qx, respectivamente en Figura 61).

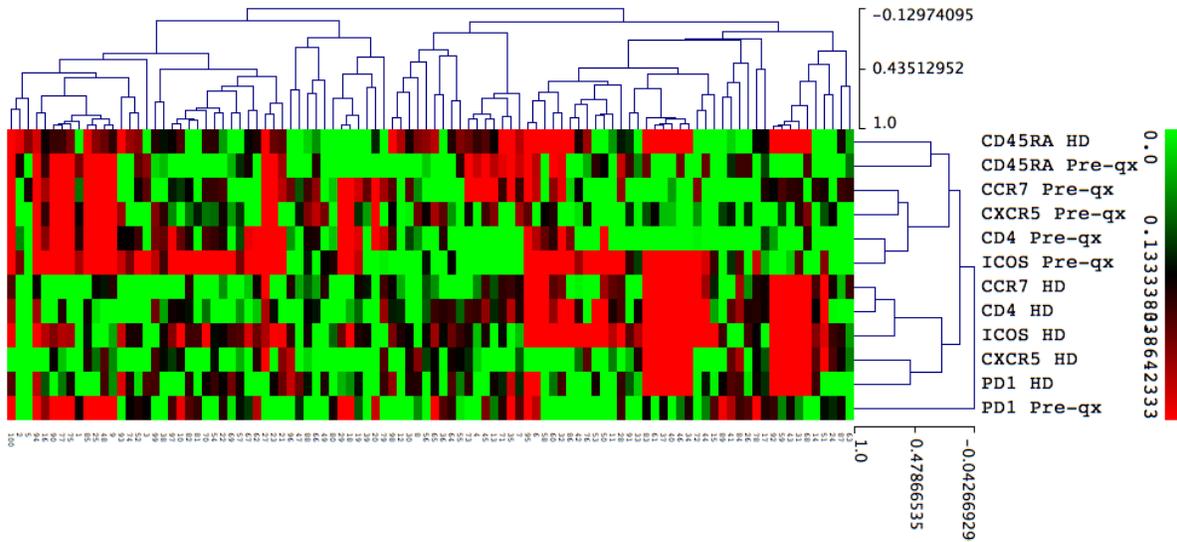


Figura 61. Mapa de calor (HCL) de la expresión del fenotipo *Tfh* en mujeres sanas y pacientes con cáncer de mama antes del tratamiento. Análisis por HCL de la matriz analizada por SPADE luego de su normalización con las muestras no estimuladas de cada marcador (promedio de la expresión) en las muestras de PBMCs de donantes sanas (HD, n=5) y de pacientes previo a la quimioterapia (pre-qx, n=6). El patrón resultante agrupa la mayoría de marcadores expresados por HD y por pre-qx de manera separada.

Posteriormente, las muestras obtenidas fueron procesadas mediante CITRUS con el fin de determinar si existe diferencia significativa en la expresión de los clústers presentes en donantes sanas y en pacientes con cáncer de mama. Inicialmente se validó el análisis por CITRUS comparando el grupo de donantes sanas con y sin el estímulo de 2d-aDCs más la estimulación del TCR. El modelo de la tasa de error fue satisfactorio (dato no mostrado). La distribución de la expresión de los diferentes marcadores y el árbol de abundancia de los clústers que diferencian el comportamiento de las muestras estimuladas de las no estimuladas se observa en la Figura 62.

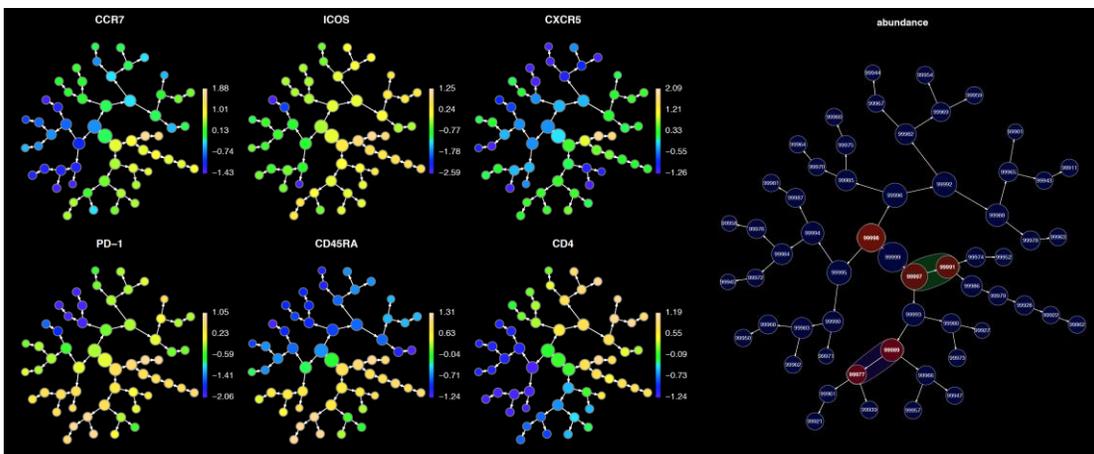


Figura 62. Árbol de expresión de los marcadores y abundancias de las poblaciones Tfh de donantes sanas. Jerarquía y niveles de expresión de los seis marcadores empleados para la caracterización de Tfh en donantes sanas (panel izquierdo). Árbol de abundancia de los clústers diferenciales entre los grupos evaluados (Estimulados vs Control) en donantes sanas (círculos rojos - panel derecho).

El análisis de CITRUS reveló en células de mujeres sanas reveló la existencia de cinco clústers diferentemente expresados entre las muestras estimuladas y sin estimular. El fenotipo de estos clústers que se muestra en la Figura 63. corresponde al de LT-CD4+ Tfh activados caracterizado por la co-expresión de CD4, CXCR-5, PD-1 e ICOS (Figura 63A). En particular, el clúster 99991 exhibe un fenotipo de células vírgenes caracterizado por la co-expresión de CCR7 y CD45RA. Este clúster expandió eficientemente en células estimuladas (Figura 63B). Estos hallazgos confirman resultados presentados en el Capítulo 1 en relación con la capacidad del uso combinado 2d-aDCs *in situ* y un estímulo al TCR como estrategia útil para analizar en sangre periférica la expansión y el perfil de activación (expresión de ICOS) de LT-CD4+ con fenotipo Tfh en respuesta a un estímulo (Figura 18).

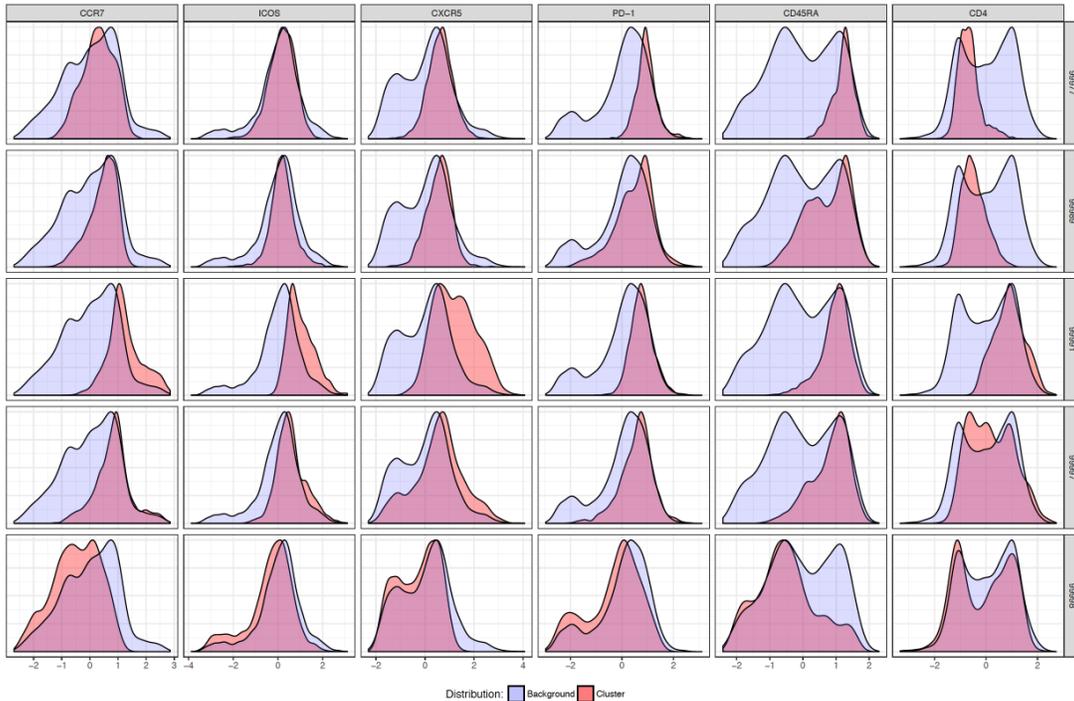
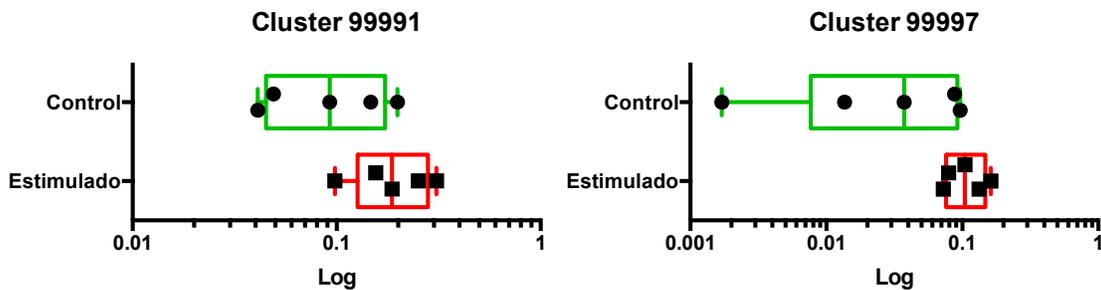
A**B**

Figura 63. Fenotipo y abundancia de clúster que diferencian Tfh en donantes sanas. (A) Histogramas de expresión de cada marcador (columnas de izquierda a derecha CCR7, ICOS, CXCR-5, PD-1, CD45RA y CD4) en la muestra global (histograma azul – Background) y el propio de cada clúster (Histograma rojo - Clúster) para cada clúster identificado como diferencial (filas). **(B)** Abundancia de los clústers 99991 y 99997 en las muestras control (verde) y estimulados (rojo) con 2d-aDCs más estímulo policlonal del TCR.

Cuando se comparó entre donantes sanas y pacientes pre-quimioterapia la eficiencia del estímulo *in vitro* del TCR en presencia de aDCs en la inducción de la diferenciación de Tfh en sangre, se evidenció una expansión deficiente de células con fenotipo de Tfh en cuatro clúster (Figura 64) en sangre de las pacientes (Figura 65). Este resultado sugiere una limitación funcional de la diferenciación de LT-CD4+ con fenotipo Tfh en sangre de las pacientes, una evidencia adicional en favor de la deficiencia funcional del compartimento de células T en sangre de pacientes con cáncer de mama previo a la quimioterapia.

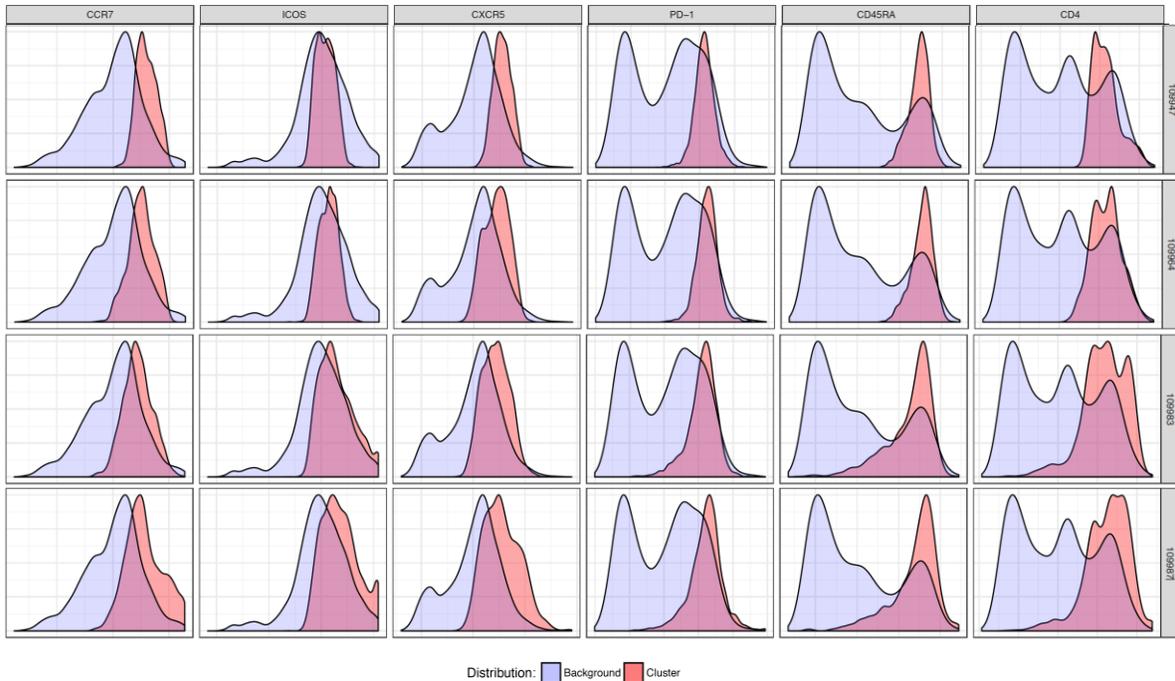


Figura 64. Fenotipo de Tfh de los clústers por análisis Citrus en muestras de donantes sanas y pacientes pre-quimioterapia. Nivel de expresión de la fenotipificación de Tfh en cuatro clústers en histogramas del nivel basal (histograma azul) y el respectivo de cada clúster (histograma rojo) para los marcadores CCR7, ICOS, CXCR-5, PD-1, CD45RA y CD4 (columnas de izquierda a derecha).

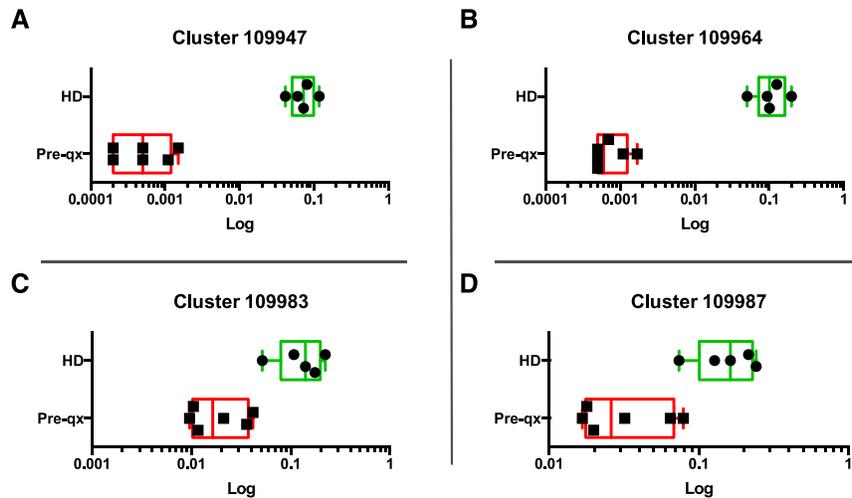


Figura 65. Frecuencia relativa de cuatro clústers diferenciales con fenotipo Tfh entre donantes sanas y pacientes. Frecuencia relativa (abundancia) de los clústers 109947 (A), 109964 (B), 109983 (C) y 109987 (D) de donantes sanas (n=5 - Verdes) y pacientes pre-quimioterapia (pre-qx, n=6 - Rojos) que presentan un fenotipo de Tfh (como se observa en los histogramas de la Figura 64).

Evaluación de expresión de receptores inhibitorios, Tregs e IL-17 in vitro

Hasta el momento, no existe evidencia publicada acerca del patrón de expresión de receptores inhibitorios como PD-1, CTLA-4 y BTLA, en LT totales y diferentes subpoblaciones de LT de pacientes con cáncer de mama en quimioterapia neo-adyuvante con A/C cuando estas células son estimuladas *in vitro*. Con el fin de monitorear la expresión de estos receptores en LT de sangre periférica de pacientes con cáncer de mama, en esta segunda cohorte de pacientes se analizó la expresión de estos receptores en Tregs y en LT vírgenes, de memoria central y efectora, luego del estímulo *in vitro* con un estímulo policlonal al TCR en presencia de aDCs. Para esto el TCR de LT presentes en PBMCs de pacientes pre-quimioterapia y mujeres sanas fueron estimuladas o no por seis días *in vitro* con perlas acopladas a anticuerpos anti-CD3, anti-CD28 y anti-CD2 en presencia de 2d-aDCs diferenciadas *in situ*; seguido del análisis en LT-CD4+ y LT-CD8+ del patrón de tinción de estas células con los siguientes anticuerpos fluoro-marcados: anti-CD8-PE Dazzle, anti-CD4-BV510, anti-PD-1-Alexa Fluor 647, anti-CTLA-4-PE-Cy7, anti-BTLA-PerCP, anti-CCR7-FITC, anti-CD45RA-PE-Cy7, anti-CD25-Alexa fluor 700, anti-FoxP3-Pacific Blue e IL-17-PE.

Una vez procesadas las muestras en un citómetro de flujo FACS Aria II (BD), los datos de FC obtenidos se analizaron por SPADE con el fin de determinar la expresión individual de cada marcador en las muestras de 5 donantes sanas y 6 pacientes con cáncer de mama previo al inicio de la quimioterapia neo-adyuvante.

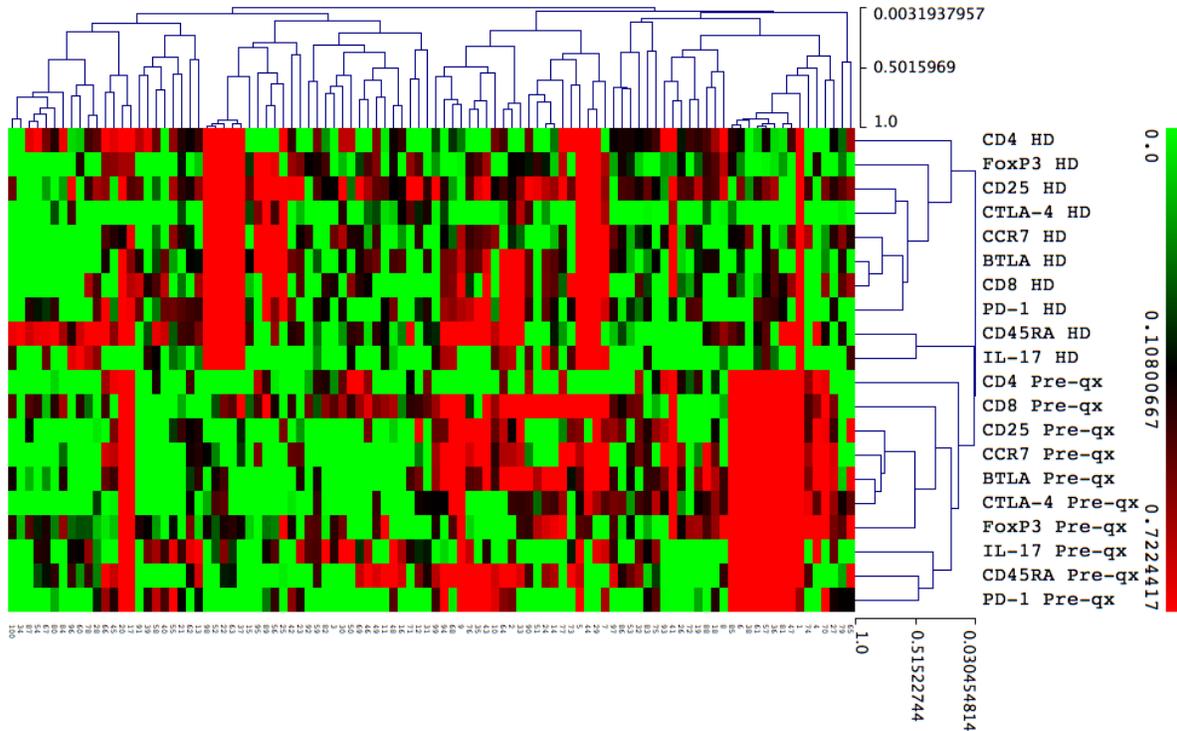


Figura 66. Análisis HCL de la expresión de receptores inhibitorios, sub-poblaciones de memoria, Tregs e IL-17. Análisis por HCL de la matriz analizada por SPADE para la evaluación de CD8, CD4, PD-1, CTLA-4, BTLA, CCR7, CD45RA, CD25, FoxP3 e IL-17 luego de su normalización con las células no estimuladas de cada marcador (promedio de la expresión) en las muestras de PBMCs de donantes sanas (HD, n=5) y de pacientes previo a la quimioterapia (pre-qx, n=6). El patrón resultante agrupa la mayoría de marcadores expresados por HD y por pre-qx de manera separada.

Como se observa en la Figura 66, el análisis por HCL generó dos patrones de marcación diferentes para los marcadores evaluados por SPADE, uno característico de células de donantes sanas y otro de células de pacientes. El número de clústers con alta expresión de los marcadores analizados en las células de donantes sanas fue menor con respecto al número observado en células de pacientes pre-quimioterapia (HD y Pre-qx respectivamente - Figura 66).

Posteriormente usando CITRUS, se procesaron en dos fases: 1) en muestras de donantes sanas se comparó el efecto del estímulo *in vitro* en LT vírgenes, de memoria central, memoria efectora y en Tregs. Como se observa en la Figura 67, la expresión diferencial de los diez marcadores evaluados determinó la distribución esperada de sub-poblaciones tanto en LT-CD4+ como LT-CD8+ de manera mutuamente excluyente. En el caso particular de BTLA e IL-17, se observó una expresión preferencial de estos receptores en LT-CD8+ y como era esperado la expresión de FoxP3 estuvo asociado a la co-expresión del

correceptor CD4 en LT. La expresión de los demás marcadores como era de esperarse se asoció indistintamente tanto a LT-CD4+ como a LT-CD8+.

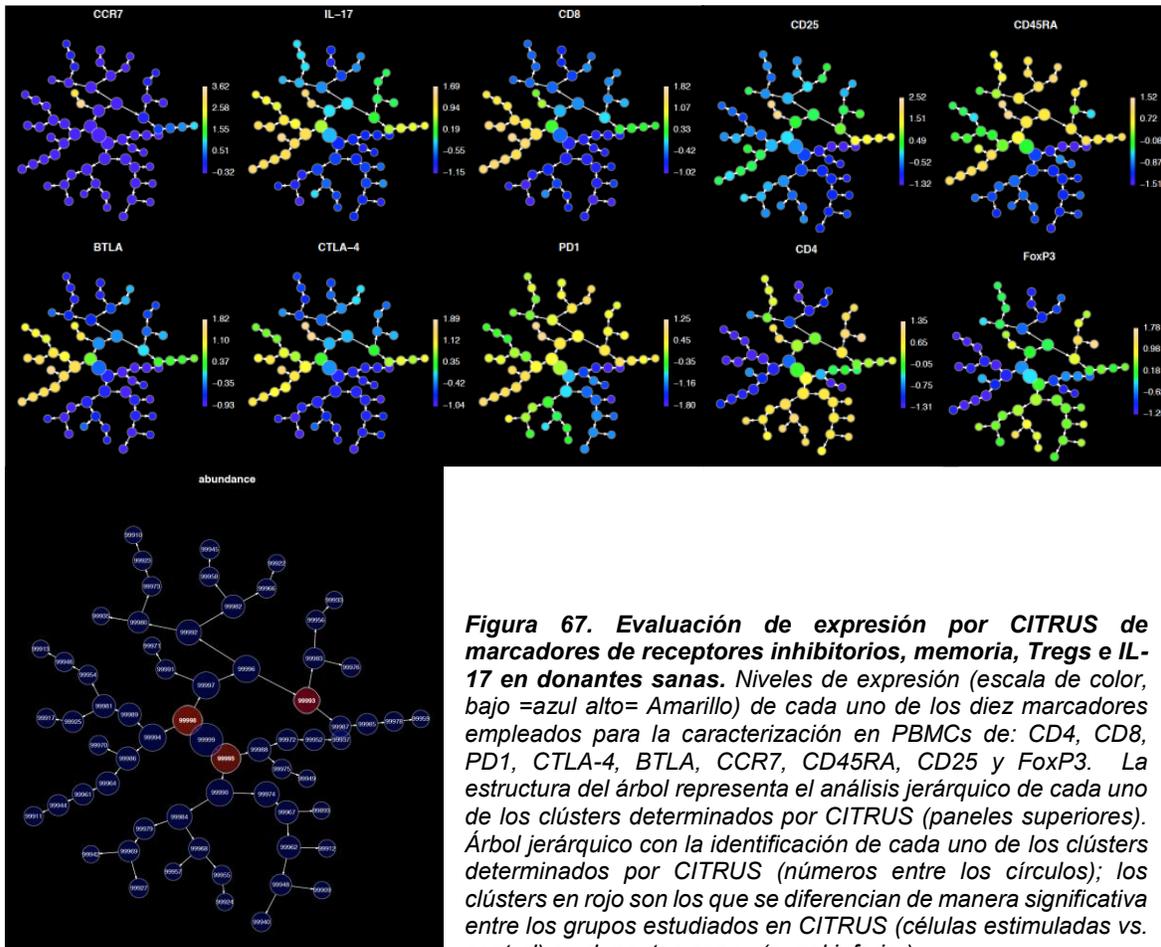


Figura 67. Evaluación de expresión por CITRUS de marcadores de receptores inhibitorios, memoria, Tregs e IL-17 en donantes sanas. Niveles de expresión (escala de color, bajo =azul alto= Amarillo) de cada uno de los diez marcadores empleados para la caracterización en PBMCs de: CD4, CD8, PD1, CTLA-4, BTLA, CCR7, CD45RA, CD25 y FoxP3. La estructura del árbol representa el análisis jerárquico de cada uno de los clústers determinados por CITRUS (paneles superiores). Árbol jerárquico con la identificación de cada uno de los clústers determinados por CITRUS (números entre los círculos); los clústers en rojo son los que se diferencian de manera significativa entre los grupos estudiados en CITRUS (células estimuladas vs. control) en donantes sanas (panel inferior).

El análisis fenotípico de tres clústers que diferencian las muestras de donantes sanas estimuladas vs. no estimuladas revela el incremento de un patrón de Tregs (clúster 99993) con expresión alta de CD4, FoxP3, CD25 y CD45RA y baja expresión de CD8, BTLA e IL-17.

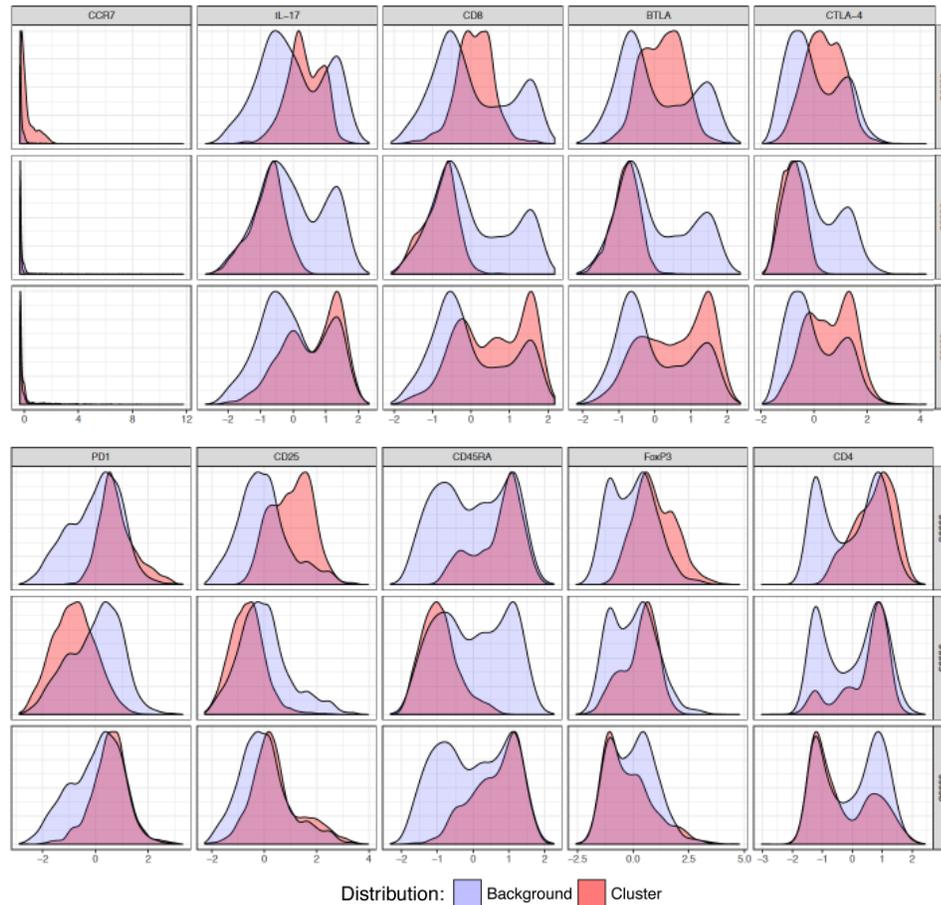
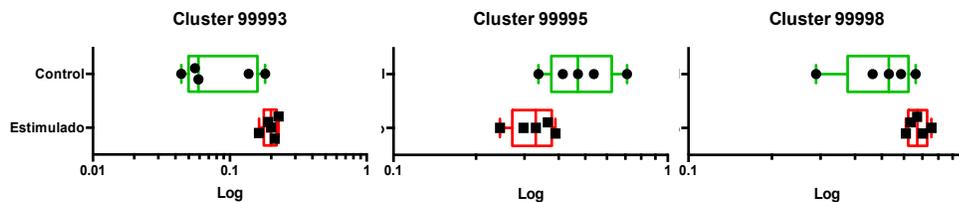
A**B**

Figura 68. Fenotipo y abundancia de clúster asociados a perfil Tregs y Tc17 en donantes sanos. (A) Histogramas de expresión de cada marcador (columnas CCR7, IL-17, CD8, BTLA, CTLA-4, PD1, CD25, CD45RA, FoxP3 y CD4) en la muestra global (histograma azul – Background) y el propio de cada clúster (Histograma rojo - Clúster) identificado como diferencial (filas). **(B)** Abundancia de los clústers 99993 (fenotipo Treg), 99995 y 99998 (fenotipo Tc17) en las muestras control (verde) y estimulados (rojo) con 2d-aDCs más estímulo policlinal del TCR.

Un segundo clúster 99998, exhibe un fenotipo de LT-CD8+ que produce IL-17 (células conocidas como Tc17 [229-231] caracterizado además por una alta expresión de BTLA, CTLA-4, PD1 y CD45RA y una baja expresión de CD4, CD25 y CD45RA (Figura 68). De manera interesante el marcador CCR7 fue negativo en los tres clústers evaluados.

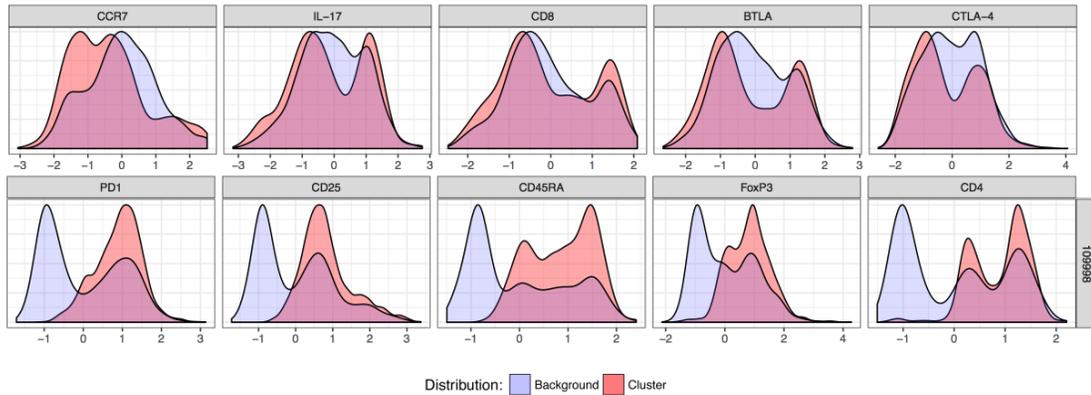
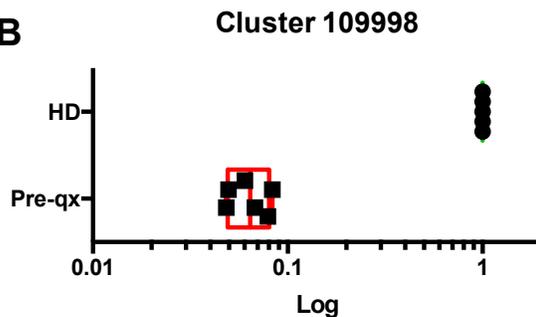
A**B**

Figura 69. Fenotipo y cuantificación de clúster diferencial entre donantes sanas y pacientes. (A) Histogramas de expresión de cada marcador (columnas CCR7, IL-17, CD8, BTLA, CTLA-4, PD1, CD25, CD45RA, FoxP3 y CD4) en la muestra global (histograma azul – Background) y del clúster 109998 (Histograma rojo - Clúster) que diferencia las muestras provenientes de donantes sanas (HD) de pacientes previo a la quimioterapia (Pre-qx) (Panel superior). **(B)** Abundancia del clúster 109998 (fenotipo Treg en las muestras de donantes sanas estimulados (HD - verde) y de pacientes pre-qx estimulados (rojo) (panel inferior).

Finalmente, luego de identificados tres clústers asociados a la respuesta al estímulo *in vitro* de LT en mujeres sanas, se comparó entre muestras de estas mujeres y de pacientes previo a la quimioterapia la expansión de clúster en respuesta al estímulo. Al comparar el fenotipo de clúster que amplifican con el estímulo entre los dos grupos de mujeres se observó que un clúster que se caracteriza por poseer un fenotipo Treg se encuentra disminuido en las pacientes con relación a las mujeres sanas (Figura 69).

Conclusiones

La implementación realizada en este trabajo del uso de sistemas automatizados para el análisis de poblaciones complejas obtenidas por citometría de flujo (FC) multi-paramétrica permite concluir lo siguiente:

- Los análisis de correlación (Spearman), entre fenotipos de LT y APC confirma que en condiciones normales la funcionalidad de estos dos tipos de células están inter-relacionadas y que la inter-relación entre estos dos tipos de células en pacientes con cáncer de mama antes del tratamiento esta significativamente afectada.
- El análisis por componentes principales de múltiples parámetros inmunológicos obtenidos por FC en leucocitos de sangre periférica permitió discriminar el comportamiento inmunológico entre los grupos de pacientes y de mujeres sanas.
- La combinación de los algoritmos FLOCK, SPADE y CITRUS se perfila como herramienta útil para el análisis automatizado de datos de citometría de flujo multi-paramétrica.
- Estos algoritmos permitieron confirmar hallazgos del inmuno-monitoreo de leucocitos en las pacientes obtenidos mediante el procesamiento manual de los datos de FC.
- La herramienta CITRUS permitió detectar *ex vivo* un aumento significativo de una población celular de DCs con fenotipo similar al de DCs plasmacitoides en pacientes pre-quimioterapia.
- El uso de CITRUS para el estudio de poblaciones Tfh en sangre periférica evidenció una deficiente expansión de estas células en respuesta a un estímulo *in vitro* en sangre de pacientes pre-quimioterapia con respecto a las donantes sanas.
- Finalmente, el análisis con CITRUS de la expresión de receptores inhibitorios, en Tregs y en poblaciones de LT de memoria en respuesta a un estímulo *in vitro*, a los LT reveló una disminución significativa de células Tregs en sangre de pacientes pre-quimioterapia con respecto a los niveles de estas células detectados en las muestras de donantes sanas.

DISCUSION

El uso de agentes quimioterapéuticos para tratar el cáncer ha salvado millones de vidas. Históricamente, el uso de fármacos para la quimioterapia del cáncer ha estado acompañado de dos tipos de creencias en la práctica clínica: (i) el efecto antitumoral de estos fármacos depende enteramente de su capacidad para destruir de manera directa las células tumorales. Por esta razón, la selección del efecto antitumoral de estos fármacos comienza con la evaluación del efecto antitumoral del fármaco *in vivo* en tumores xenotransplantados en ratones que carecen de linfocitos T y B; y (ii) debido a su efecto citotóxico y baja especificidad, estos fármacos ejercen un efecto tóxico supresor en tejidos sanos incluidas las células del sistema inmune. Como resultado de estas creencias, en la práctica clínica se ha subestimado por años el papel que durante el tratamiento de los pacientes con cáncer pudiese jugar el sistema inmunológico en el control del cáncer.

En contraste con la perspectiva histórica centrada en el efecto citotóxico de estos fármacos, numerosa evidencia experimental reciente de estudios preclínicos y ensayos clínicos con pacientes con cáncer en quimioterapia, demuestra que ciertos regímenes de quimioterapia, además de reducir la masa tumoral, modula la función de diferentes subtipos celulares infiltrantes de tumor que contribuye a la recuperación de la vigilancia inmunológica del tumor (Inmuno-vigilancia) [201]. Estos efectos son de tal importancia para el control de tumores que algunos estudios han establecido correlaciones entre dichos efectos y la respuesta patológica completa (pCR) en varios pacientes [164]. El hecho de que ciertos fármacos que además de sus efectos citotóxicos directos sobre las células tumorales, al inducir muerte celular inmunogénica en los tumores tendrían un efecto adyuvante sobre células endoteliales, células estromales y del sistema inmune. Estos hallazgos han favorecido el cambio de la concepción de la inmunosupresión inducida por estas terapias por un nuevo concepto de ser inmuno-estimulantes [22]. Esto se ha demostrado en modelos animales de cáncer [232] y en pacientes que reciben quimioterapia estándar junto con una vacuna antitumoral [233] o la vacuna de la gripe [234], sin embargo, no ha sido demostrado hasta ahora en pacientes con cáncer de mama en terapia neo-adyuvante con A/C.

En conjunto, estos estudios sugieren que lejos de comportarse como agentes inmunosupresores, ciertos agentes quimioterapéuticos fomentan respuestas inmunes vigorosas a los antígenos. Esta nueva visión de la quimioterapia ha promovido un trabajo dinámico entre oncólogos clínicos e investigadores en ciencias básicas encaminado a establecer patrones de respuestas inmunitarias antitumorales detectadas *in situ* y a nivel

sistémico en sangre, promovidas por quimioterapia que pueden usarse como biomarcadores de pCR o predictores de sobrevida libre de enfermedad. La idea que el sistema inmunológico desempeña un papel fundamental en la respuesta antitumoral durante la quimioterapia en diversas neoplasias ha impulsado el uso combinado de estrategias de quimioterapia con diferentes estrategias de inmuno-estimulación en pacientes con cáncer en lo que hoy se conoce como quimio-inmuno-terapia.

La evaluación de la relación entre respuesta inmune y terapia antitumoral requirió en este trabajo de la optimización de protocolos para la generación de DCs *in vitro* a partir de monocitos de sangre periférica en que se disminuyó a dos días el periodo de tiempo de siete días habitualmente utilizado para obtener DCs funcionales tanto empleando el coctel de citoquinas estándar [53, 107], como de DCs denominadas Tipo I alfa polarizadas (aDCs) cuya funcionalidad se caracteriza por la secreción de altas cantidades de IL-12p70 [56]. El análisis booleano de expresión simultánea de múltiples marcadores en respuesta a estímulos de maduración confirma que en este sentido 2d-DCs y 7d-DCs maduras son fenotípicamente indistinguibles.

Adicional a presentar un fenotipo de DCs maduras, 2d-DCs estimulan eficientemente LT específicos de diferentes antígenos (microbianos y tumorales) tanto en personas sanas como en pacientes con cáncer de mama con actividad citotóxica productores de citoquinas IFN- γ , TNF- α e IL-2. Comparativamente las 2d-aDCs fueron más eficientes comparadas con 2d-stDCs para secretar IL-12 y estimular la expansión de LT-CD4+ Th1 de memoria con características “*stem cell like CD95+*”.

Para el monitoreo *in vitro* de LT se utilizaron cultivos de alta densidad que buscan la recuperación de la sensibilidad funcional de estas células para el reconocimiento de antígenos, proceso que normalmente opera en los tejidos debido a un estatus de pre-activación debido al contacto célula – célula y que disminuye con su salida a la sangre periférica [57]. Adicionalmente, basados en los trabajos de Moser y cols., [59] y de Martinuzzi y cols., [58] se emplearon dos sistemas de cultivo con el fin de explorar la reactividad de LT vírgenes y de memoria respectivamente en ensayos *in vitro*. En este último sistema la inducción de DCs “*in situ*” en PBMCs favorece la interacción de LT de memoria con DCs durante el pulso con el antígeno y el proceso de maduración. La inducción de DCs *in situ* en PBMCs totales favoreció el rendimiento de recuperación de DCs (CD11c+) con fenotipo maduro tanto en las fracciones adherentes como no adherentes (Ver Figura 13 y Anexo 1. Rendimiento de cultivos de DCs a partir de células adherentes y

PBMCs totales). Estos resultados están acordes con el rendimiento de DCs obtenido en el proceso empleado con Sipuleucel-T (Provenge) la primera vacuna basada en DCs aprobada por la FDA en 2010 para la inmunoterapia del cáncer de próstata en el cual DCs son producidas a partir de PBMCs del paciente, diferenciadas y maduradas en presencia de una proteína de fusión del antígeno PAP y GM-CSF [121, 122].

En la paciente MCC-002 la evaluación de la reactividad *in vitro* de precursores de LT contra epítopes específicos para Her2/neu y NY-ESO1 evidenció una reactividad diferente de los compartimientos de LT vírgenes y de memoria. Mientras que a partir del repertorio virgen no fue posible evidenciar una amplificación de LT-CD8+ específicos para Her2/neu esto si fue posible en el caso del antígeno NY-ESO1. Por su parte en el compartimiento de células de memoria fue posible evidenciar LT-CD8+ específicos para Her2/neu, pero no para NY-ESO1 (Figura 23). La reactividad de células vírgenes y de memoria anotadas fue favorecida por el uso 2d-aDCs como APCs. En conjunto estos resultados sugieren que la reactividad de precursores de los compartimientos de LT-CD8+ vírgenes y de memoria contra una misma epítope es distinta y sugiere que el uso de 2d-aDCs como APCs *in vitro* es útil para el estudio de precursores de LT-CD8+ específicos de antígenos tumorales presentes tanto en células vírgenes como de memoria.

Los antígenos presentes en las células tumorales son blancos importantes para el sistema inmune; sin embargo, muchos no son totalmente específicos del cáncer ya que también se pueden encontrar en diferentes proporciones en ciertos tejidos normales. En cáncer de mama se han estudiado diferentes antígenos como HER2, NY-ESO1, antígeno carcinoembrionario (CEA), mucina 1 (MUC-1), telomerasa y Tumor de Wilms (WT1). Es importante establecer la eficacia terapéutica y la inmunogenicidad de dichos antígenos para ser seleccionados en esquemas de inmunoterapia. Las vacunas que contienen epítopes derivadas de antígenos tumorales tales como MUC1, HER2/neu y CEA son los más estudiados para ser empleados en diferentes esquemas de inmunoterapia en cáncer de mama mostrando ser seguros y proporcionan inmunogenicidad [235]. Las vacunas basadas en péptidos que han sido evaluadas en ensayos clínicos de fase I a III incluyen péptido inmunodominante HER-2/neu (25% de los cánceres de mama), MUC1 (expresado en el 70% de los tumores) y CEA (expresado en un 70% de lesiones metastásicas) [236-238]. El HER2/neu humano también se sobre expresa en carcinoma gástrico, colorrectal, de ovario y páncreas [238].

2d-stDCs y 2d-aDCs nos permitieron expandir *in vitro* de manera eficiente LT-CD8+ específicos de antígenos tumorales de sangre de individuos sanos (Figura 9) y de pacientes con cáncer (Figura 19). Esta amplificación de LT-CD8+ específicos de TAAs en donantes sanos o de pacientes con cáncer (a partir del compartimiento de células vírgenes o de memoria), nos permite proponer el uso de 2d-DCs para la amplificación *in vitro* de TCR de alta avidez de la sangre de individuos sanos que pueden ser clonados y transfectados a LT de pacientes en inmunoterapia de cáncer como lo propone Yadav y cols., [7, 8].

La evaluación de la expresión de receptores inhibitorios en LT-CD8+ específicas para Her2/neu (pero no contra antígenos virales) reveló que estos linfocitos en respuesta a la estimulación con el antígeno *in vitro*, expresan CTLA-4 (Figura 25C) sugiriendo que su expresión está asociada a la activación de estas células. Atendiendo a que la expresión de este receptor se ha considerado sugestivo de un estatus de supresión de la respuesta celular, la expresión de CTLA-4 en LT-CD8+ antitumorales presentes en sangre un año después de finalizado el tratamiento antitumoral en la paciente MCC-002 podría ser un marcador de respuesta al antígeno de linfocitos de memoria en esta paciente. Este resultado sumado al hecho de que la expresión de CTLA-4 en LT-CD8 antitumorales recientemente haya sido asociado a una buena respuesta clínica del tumor en pacientes en inmunoterapia con anti-PD-L1, sugiere la necesidad de revisar el significado de la expresión de este marcador por LT-CD8+ de memoria en pacientes en terapia antitumoral [239]. Speiser y cols., revisaron recientemente la expresión de receptores inhibitorios como PD1, CTLA-4, BTLA, TIM-3, LAG y confirmaron que su expresión es característica de LT en agotamiento celular y un hallazgo frecuente en LT de individuos infectados de forma crónica con virus y en pacientes con cáncer. En contraste con lo anterior, estudios recientes han mostrado que la expresión en LT de marcadores como PD1 podrían estar asociados a un estatus de control de la diferenciación de LT efectores importante en la generación de inmunidad y que su expresión podría no estar ligada necesariamente al agotamiento celular [103, 106].

La identidad de LT específicos de TAAs detectados en sangre de pacientes con cáncer de mama y que han infiltrado previamente el tumor (TIL) es un desafío difícil de abordar desde el punto de vista experimental. Para tratar de cotejar la identidad de LT-CD8+ específicos para una epítotope HLA-A*02:01 de Her2/neu que circulan en sangre de la paciente MCC-002 con la de LT-CD8+ que infiltraban el tumor de esta paciente, en este trabajo utilizamos una combinación de (i) marcación con tetrámero y un coctel de anticuerpos específicos para

24 familias V β del TCR - estandarizado en donantes sanos (Ver Figura suplementaria 7) - de las muestras de sangre de la paciente MCC-002 tomadas antes y 10 meses después de finalizada la terapia antitumoral con el fin de establecer por CF las familias V β a las que pertenecen las células tetrámero positivas que expandieron en sangre luego del tratamiento y (ii) secuenciación del transcriptoma de la cadena β del CDR3 a partir de tejido tumoral embebido en parafina y a partir de muestras de sangre obtenidas antes y después de la terapia antitumoral. El análisis reveló la identidad del CDR3 de LT-CD8+ (familia V β 04) que infiltraban el tumor, que estaban presentes en la muestra de sangre tomada antes del inicio del tratamiento y cuya expansión por tetrámero y por secuenciación fueron registradas en la muestra de sangre tomada 10 meses después de finalizada la terapia antitumoral con respecto a la observada en la muestra de sangre tomada antes del tratamiento. Esta amplificación fue detectada tanto por FC en células V β 04 tetrámero positivas (análisis V β) como por la secuenciación cuantitativa de transcritos de la cadena V β 04 del CDR3.

La secuenciación del CDR3 tiene la ventaja de ser una técnica cuantitativa con alta sensibilidad que permite cuantificar todas las familias y genes V β del humano [116, 117, 136]. Esta aproximación en nuestro trabajo permitió establecer *ex vivo* el V β de LT-CD8+ específicos contra un péptido HLA-A*02:01 de Her2/neu circulantes en sangre y correlacionar la identidad de este V β con LT infiltrantes de tumor. El análisis de 24 familias de V β por citometría de flujo a comparación de la información que permite la secuenciación para describir las 45 familias y sus genes respectivos limita la caracterización y correlación de los fenotipos de LT específicos de antígenos con la cuantificación de dichos V β mediante la secuenciación (por ejemplo, en tejido tumoral).

A pesar de los resultados obtenidos con la paciente MCC-002, esta metodología no pudo ser aplicada en la cohorte de pacientes por el poco volumen de sangre obtenido de las pacientes del estudio en quimioterapia neo-adyuvante con A/C; por la limitación de tejido tumoral de diagnóstico y por los altos costos de la secuenciación. Aunque existen reportes acerca de aproximaciones metodológicas similares para la determinación del CDR3 en tejidos y en PBMCs de pacientes con cáncer gástrico y colorrectal [240], una aproximación cercana a la realizada por nosotros fue realizada recientemente en cáncer pulmonar [241], en donde evaluaron la funcionalidad de TILs en sangre periférica. Aunque en nuestro trabajo no fue posible evaluar de manera directa la funcionalidad de TILs, nuestros resultados revelan que en la paciente MCC-002 estas células en circulación experimentaron un incremento en frecuencia 10 meses después del tratamiento y recuperaron su capacidad

de producir citoquinas evidenciado con el uso de 2d-aDCs pulsadas con el antígeno. Es importante resaltar que el defecto funcional observado en estas células previo a la terapia antitumoral fue restringido a células específicas para tres epítopes de Her2/neu y una de NY-ESO1 y no fue evidenciado en LT-CD8+ específicos para dos epítopes virales (Figura 26D y [131]). Estos resultados están en concordancia con evidencia publicada en favor de una expansión clonal selectiva de LT específicos de TAAs posterior a la terapia neoadyuvante [242].

La capacidad citotóxica antitumoral de LT-CD8+ es claramente dependiente de la funcionalidad “helper” proporcionada por LT-CD4+ [243-245]. En este sentido, además de evaluar la respuesta de LT-CD8 contra antígenos del tumor se evaluó el brazo “helper” de la respuesta inmune de LT-CD4+ en las pacientes con cáncer. El sistema de inmunomonitoring permitió observar una recuperación de la internalización del TCR y expresión de CD154 (CD40L) en células posterior a la quimioterapia. El CD154 se expresa tanto en LT-CD4+ como en LT-CD8+ en respuesta a la estimulación del TCR; sin embargo, resultados no mostrados sugieren que en las pacientes la expresión de CD154 en respuesta al estímulo fue mayor en LT-CD4+ que en LT-CD8+. Este hallazgo permite proponer que la recuperación de la expresión de CD154 por LT Th1 favorecería la vigilancia por LT-CD8+ en pacientes con cáncer posterior a la quimioterapia al promover DCs más competentes por una interacción adecuada de CD40/CD40L lo que estimularía tanto la secreción de IL-12 como la expresión de moléculas co-estimuladoras como CD83, las cuales se ha descrito que sucede gracias a la activación del CD40 [246-254].

Los LT-CD4+ ejercen también ayuda a los LB para la producción de anticuerpos. Con el fin de evaluar si la quimioterapia favorece la producción de anticuerpos contra el tumor en las pacientes nosotros comparamos en plasma antes y después de quimioterapia los títulos de anticuerpos contra seis péptidos (15 aa) de Her2/neu (Tabla 8) y cinco péptidos (35-43 aa) de NY-ESO1 (Tabla 9). Los resultados de estas mediciones mostraron que no fue posible establecer diferencias estadísticamente significativas entre los títulos de anticuerpos contra estos antígenos medidos en las muestras del plasma de las pacientes antes y después del tratamiento (datos no mostrados).

Un importante grupo de LT-CD4+ está representado por los LT-CD4+ “helper” foliculares (Tfh). Estas células se encuentran principalmente en órganos linfoides secundarios debido a la secreción de la quemoquina CXCL13 por células el estroma del folículo linfoide que se une al receptor CXCR5 altamente expresado en Tfh [255], secretan principalmente IL-21 e

IL-4 y poco IFN- γ [256] y su infiltración a tejido tumoral en pacientes con cáncer de mama ha demostrado ser un marcador de sobrevida [128]. Más recientemente, Schmitt N y col., describieron tres sub-poblaciones de células Tfh (Tfh1, Tfh2 y Tfh17) y su fenotipo asociado a un estado de activación o de quiescencia [114]. En el **Capítulo 1** nosotros presentamos evidencias de que con el uso de 2d-aDCs (derivadas *in situ*) y un estímulo al TCR es posible detectar en PBMCs de individuos sanos la expansión y activación de células Tfh (Figura 17). Utilizando 2d-aDCs pulsadas con seis epítopes MHC de Clase II de Her2/neu de 15-aa (Tabla 8) utilizados por Czerniecki y col., como antígeno para estimular LT-CD4 con una vacuna basada en 2d-stDCs en pacientes con cáncer de mama [257], se analizaron diferencias en el grado de expansión de células Tfh1, Tfh2 y Tfh17 en muestras de sangre pre y pos-quimioterapia con A/C en pacientes del estudio. Los resultados mostraron que no fue posible determinar diferencias significativas en la expansión de las tres sub-poblaciones de Tfh asociada a la quimioterapia con A/C en estas pacientes (Figura suplementaria 5).

Locci y cols., describieron recientemente una sub-población de Tfh CXCR5+ circulantes en sangre periférica que se caracteriza por la baja expresión de CXCR3 y una alta expresión de PD1 (similares a las Tfh de centro germinal) importante para la generación de anticuerpos neutralizantes del virus en pacientes VIH+ [130]. De otra parte, el uso de DCs, IL-12 y enterotoxina B estafilocócica (SEB) *in vitro* les ha permitido a varios grupos analizar en sangre periférica la actividad “helper” de células Tfh de memoria importante para la producción de anticuerpos por los linfocitos B [114, 130, 258]. La expansión y activación de células Tfh en individuos sanos con 2d-aDCs reportada en el **Capítulo 1** (Figura 17), sumado a la alta producción de IL-12 por 2d-aDCs (Figura 12), nos indujo a considerar que el uso de 2d-aDCs es útil para el estudio *in vitro* de células Tfh de memoria circulantes en sangre importantes para la producción de anticuerpos por LB. Resultados preliminares generados en colaboración con la Profesora Vinuesa en el Jhon Curtin School of Medical Research en la Universidad Nacional de Australia, utilizando 2d-aDCs como APCs, LT-CD4+ vírgenes (CXCR5 negativos), LB-vírgenes (CD19+ CD27 neg IgD+) y el constructo T1BT* que comprende una epítope Th universal (epítope T*) + una epítope B (secuencia NANP) de la proteína CS de *Plasmodium falciparum*, sugieren que es posible implementar un sistema *in vitro* que permite evidenciar la generación de LT-CD4+ específicos para T* los cuales favorecen la expansión *in vitro* de LB productores de anticuerpos contra la secuencia NANP [259] (ver Anexo 2. Modelo *in vitro* para la evaluación del papel “helper” de Tfh en la producción de anticuerpos por LB).

Una vez establecidas las condiciones de los diferentes ensayos *in vitro* que hacen parte del sistema de inmuno-monitoreo implementado en este trabajo, estos ensayos se utilizaron para el monitoreo de pacientes con cáncer de mama en tratamiento neo-adyuvante con A/C. Inicialmente, se determinó la frecuencia *ex vivo* de diferentes sub-poblaciones celulares: Tregs, MDSCs o DCs (mieloides y plasmacitoides) en las muestras de sangre antes y después de tres ciclos de quimioterapia A/C. La cuantificación *ex vivo* de estas poblaciones en las muestras de pacientes no evidenció diferencias significativas en las frecuencias de estas células. Este resultado que no está acorde con lo reportado en otros estudios (ver más adelante), probablemente debido a diferencias en las características clínicas de nuestras pacientes con respecto a las de pacientes de otros estudios en los que principalmente participaron pacientes con tumores avanzados (estadios III y IV) [206, 260] comparado con los estadios en su mayoría IIa y IIb de nuestras pacientes. En el caso del fenotipo de MDSCs en humanos, a diferencia de los estudios en ratones no ha sido precisado debido a la complejidad de las sub-poblaciones de MDSCs descritas en el humano. El análisis de MDSCs en la mayoría de estudios se ha centrado principalmente en células que no expresan HLA-DR y son negativas para el marcador de linaje (Lin1), pero a partir de allí se incluye una alta variabilidad en los marcadores incorporados a su análisis: CD14, CD45, CD11b, CD33, CD13, CD15, Arginasa y p-STAT1 [261-267] lo cual hace difícil comparar los resultados entre estudios. La evaluación cuantificación *ex vivo* de Tregs (CD4+ FoxP3+ CD127-) no ha sido explorada en nuestro estudio. En la mayoría de trabajos acerca de Tregs se han analizado su frecuencia y relación con respecto a otras poblaciones celulares, incluyendo Tregs/LT-CD4 o Tregs/LT-CD8+ bien sea por cuantificación directa en el tejido tumoral o por inmuno-histoquímica (IHQ) [144, 204-206]. Quizás las diferencias descritas por otros grupos no se vean reflejadas cuando se analiza la frecuencia de Tregs en sangre periférica y sea la razón por la cual en la cohorte de nuestro estudio no permitió encontrar diferencias entre grupos de pacientes a comparación de donantes sanos.

La evaluación de la capacidad funcional de los diferentes compartimientos del sistema inmune ha sido revisada de manera independiente por otros grupos, mostrando una clara disfunción del sistema inmune en mujeres con cáncer de mama y cáncer pulmonar [20, 21]. El compartimiento de APCs evaluado mediante la caracterización de la capacidad funcional de DCs derivadas de monocitos en dos días, evidenció en pacientes con cáncer de mama una deficiencia tanto en el fenotipo de maduración como en la producción de IL-12 por 2d-aDCs derivadas *in situ* a partir de PBMCs de las pacientes pre-quimioterapia. La producción de IL-12 producida por las DCs es un punto clave en la inmunoterapia del cáncer ya que

promueve CTLs que secretan IFN- γ , una citoquina con actividad antitumoral reconocida [224]. Esta evidencia sugiere que la evaluación de la competencia inmune de las DC para producir IL-12 y madurar en respuesta a un estímulo pro-inflamatorio es útil para evaluar la vigilancia inmunológica en las pacientes con cáncer de mama. Sin embargo, ciertos estudios han sugerido que la producción de la IL-12 por DCs puede tener diferente valor pronósticos dependiendo del estado de la enfermedad. Los resultados aquí presentados sugieren que en las fases iniciales del tratamiento la producción de IL-12 promovería la inmuno-vigilancia del tumor por el sistema inmune lo que se traduce en una respuesta clínica favorable del tumor a la quimioterapia con A/C.

La deficiencia en la capacidad de maduración de las DCs está acorde con trabajos previos que muestran la expresión de marcadores como CD1a, CD83, CD80, CD86 y CD54 en DCs está disminuida en muestras de pacientes con cáncer de mama en estadios iniciales que sumado a su baja capacidad funcional limita la estimulación de LT en respuesta a la estimulación *in vitro* con antígenos como toxoide tetánico (TT) [268]. La deficiencia de las DCs observadas en pacientes con cáncer no solo se refleja en el grado de maduración expresado posterior a la estimulación *in vitro* con citoquinas o ligandos de TLRs, sino además en la cantidad de estas células circulantes que se correlaciona de manera directa con el estadio tumoral [45]. La disminución de DCs asociada a la inducción de apoptosis en las DCs, la cual se puede evitar mediante la estimulación con IL-2 y CD40L [269], que ejercen un efecto anti-apoptótico mediante la activación de NF κ B favoreciendo a su vez la producción de IL-12 por estas células [270]. En otro estudio, Della Bella y cols., demostró una disminución en el número absoluto de DCs mieloides en la sangre periférica de las pacientes con cáncer de mama [210]. Esta reducción se asoció con una disminución de CD119 (IFN- γ R) y aumento de la expresión de CD83 sin alterar la expresión de CD80 y CD86 en respuesta a LPS que se correlacionó con la severidad del tumor. Recientemente se realizó un análisis en sangre total con el fin de monitorear la competencia inmune en cohortes de mujeres sanas y pacientes con cáncer de mama en diferentes etapas de progresión antes de cualquier tratamiento lo que evidenció en las pacientes una falta de respuesta de DCs BDCA3+ al interferón alfa *in vitro* [271].

El uso del sistema de inmuno-monitoreo en pacientes con cáncer de mama en terapia neoadyuvante con A/C mostró que previo al inicio del tratamiento las pacientes presentan una clara disfunción del sistema inmune y que posterior al tratamiento la capacidad funcional de

las células del sistema inmune se restablece. Este hallazgo puede deberse en primer lugar a que el efecto cito-reductor de la quimioterapia sobre la masa tumoral hace que los mecanismos de evasión propios del microambiente tumoral se reduzcan permitiendo así la recuperación de las funciones normales del sistema inmune. La otra opción, es un efecto directo de la quimioterapia sobre la sensibilidad del sistema inmune que en combinación con el efecto citotóxico conocido de la quimioterapia favorece una respuesta inmune contra el tumor. En este sentido, la Doxorubicina probablemente induce MCI favoreciendo la maduración y presentación de antígenos por DCs [272]; adicionalmente, este fármaco induce la liberación de interferones de tipo I (IFN- α e IFN- β) que ejercen una función autocrina y paracrina en las células tumorales favoreciendo la liberación de CXCL10 que concomitante con el dsRNA liberado por las células que mueren estimula el TLR-3 en células tumorales lo cual favorece el reclutamiento al tumor de LT mediante el receptor CXCR3. Por esta razón es que probablemente la cuantificación de un patrón genético asociado a la expresión de IFN de tipo I en respuesta a antraciclinas es predictivo de la respuesta clínica de pacientes con cáncer de mama en terapia con A/C [154].

El papel directo de la inmuno-modulación de la Doxorubicina sobre LT, ha sido explorado tanto en LT-CD8+ y en LT-CD4+. En relación a LT-CD8+, se ha asociado la persistencia de la inmunidad a diferentes antígenos a pesar de la linfocitopenia causada por el tratamiento con Doxorubicina; estas descripciones sugieren la existencia de poblaciones de LT resistentes a la quimioterapia. En este sentido, Murata y cols, describieron recientemente un nuevo tipo de sub-población de LT-CD8+ (denominada células T de memoria jóvenes - T_{ym}) que expresan CD73 y CXCR3 dentro de un fenotipo de células vírgenes [273]. Por otro lado, la quimioterapia con Doxorubicina favorece la expresión de CD40 y 4-1BB en estas células posterior al estímulo del TCR [274]. Estos resultados se correlacionan con modelos animales en los que se evidencia que el tratamiento con Doxorubicina y Paclitaxel previo a la inmunoterapia contra Her2/neu incrementa su eficacia comparado con la administración de estos tratamientos de manera independiente [275, 276].

En ocho pacientes de este estudio que expresan el alelo HLA-A*02:01, se monitoreó con el uso de tetrámeros para tres epítopes HLA-A2 restringidas de Her2/neu y una de NY-ESO1 se monitoreó la distribución de diferentes sub-poblaciones de LT-CD8+ (vírgenes, de memoria y efectoras) presentes en PBMCs pre- y pos-quimioterapia, así como la expresión de los receptores inhibitorios CTLA-4, PD1 y BTLA en cada una de estas subpoblaciones luego del estímulo con 2d-aDCs pulsadas con las epítopes (Anexo 6). Estos análisis

comparados con los resultados obtenidos en esta materia con células de la paciente MCC-002 presentados en las Figuras 23, 25 y 26, revelaron una gran heterogeneidad de la respuesta sin resultados concluyentes (Anexo 6, Figuras 9-14). En estos ensayos, en respuesta al estímulo *in vitro* con 2d-aDCs derivadas *in situ* pulsadas con el antígeno la distribución de las poblaciones vírgen, de memoria y efectoras en los casos en que se utilizaron PBMCs totales como fuente de LT [58] fue muy distinta a la observada en casos en que se realizó el “priming” *in vitro* de células vírgenes [59]. Esta observación sugiere que el resultado obtenido en respuesta al estímulo *in vitro* en estos dos sistemas de cultivo es determinado por el antígeno o por el fenotipo celular (Ver Anexo 6. Caracterización fenotípica de LT-CD8+ específicos de TAAs A2) (Figura suplementaria 11).

La diferencia en los resultados de evaluación con tetrámero de la respuesta de LT-CD8+ de memoria en respuesta al estímulo con antígenos tumorales *in vitro* entre la paciente MCC-002 y las pacientes en terapia con A/C puede ser explicada por varios factores: (i) la limitada cantidad de la muestra de sangre (20 mL) limitó la reproducibilidad de los ensayos; (ii) los regímenes de tratamiento antitumoral fueron distintos (ver diagrama Figura 20 en el caso de la paciente MCC-002 vs. tres ciclos de terapia neo-adyuvante con A/C); y (iii) el tiempo de medición de la respuesta pos-quimioterapia: 10 meses luego de cirugía y de haber finalizado el tratamiento antitumoral en la paciente MCC-002 vs. 90 días luego de tres ciclos de quimioterapia A/C.

El sistema de inmuno-monitoreo permitió observar una recuperación de la internalización del TCR y expresión de CD154 (CD40L) en células posterior a la quimioterapia. El CD154 se expresa tanto en LT-CD4+ como en LT-CD8+ en respuesta a la estimulación del TCR. Este hallazgo permite proponer que la recuperación de la expresión de CD154 por LT Th1 favorecería la vigilancia por LT-CD8+ en pacientes con cáncer posterior a la quimioterapia al promover DCs más competentes por una adecuada interacción de CD40/CD40L lo que estimularía la secreción de IL-12 así como la expresión de moléculas co-estimuladoras como CD83, las cuales se expresan como ha descrito, debido a la activación del CD40 [246-254].

Actualmente existen varios bio-marcadores probables de IHQ identificados principalmente en estudios *in situ* [23, 215] que pudiesen contribuir a predecir la sobrevida de las pacientes con cáncer de mama en respuesta a la quimioterapia neo-adyuvante. La internalización del TCR y la capacidad de maduración de DCs plasmacitoides (expresión de CD83), posibles bio-marcadores analizados en sangre, en este estudio mostraron diferencias significativas

posterior al tratamiento. Adicionalmente estos se analizaron con el fin de determinar si tienen capacidad de predecir el grado de respuesta clínica de las pacientes a la quimioterapia con A/C. Mediante el análisis con curvas ROC, se observó una sensibilidad y especificidad significativas que una vez validadas permitirían diferenciar pacientes recién diagnosticadas de pacientes luego del tratamiento. Más aún, la cuantificación de estos marcadores en sangre previo al inicio de la terapia permitió asociarlos al grado de respuesta clínica teniendo en cuenta la reducción del tamaño tumoral (TNM) o teniendo en cuenta los nuevos criterios de la plataforma RCB de respuesta clínica del MD Anderson de Estados Unidos [199]. Este hallazgo permite proponer estos dos parámetros (internacionalización de CD3 y maduración de DCs plasmacitoides) como posibles bio-marcadores predictivos de la respuesta antitumoral de la quimioterapia neo-adyuvante con A/C. Sin embargo, dado el amplio margen establecido por el intervalo de confianza de las curvas ROC, la confirmación de estos hallazgos debe aguardar su validación en un estudio con un número mayor de pacientes participantes.

El sistema de inmuno-monitoreo utilizado reveló un defecto funcional de LT y DCs en las pacientes con cáncer de mama antes de iniciado su tratamiento. Consideramos importante señalar que tal grado de supresión no pudo ser evidenciado en pacientes con cáncer gástrico en estadio IV (trabajo de grado de Anamaría Morales). Estas observaciones sugieren que la supresión en estos dos compartimentos observada en pacientes con cáncer de mama no es necesariamente atribuible al cáncer per se sino posiblemente a diferencias en la biología del tumor de cáncer de mama (un tumor que difícilmente genera inflamación), comparado con un tumor como el cáncer gástrico que cursa con inflamación crónica de la mucosa gástrica.

Los sistemas de monitoreo inmune basados en citometría de flujo (CF) generalmente se analizan mediante estrategias manuales, siendo necesario establecer regiones de análisis con base en gráficas bidimensionales. Este proceso puede generar sesgos en los resultados y limitación cuando se utilizan combinaciones complejas de marcadores. La versatilidad y eficiencia de la CF permite hoy en día evaluar simultáneamente múltiples parámetros brindando información acerca de una amplia variedad de inmuno-fenotipos a partir de una muestra limitada de células. El uso de herramientas estadísticas como el análisis por componentes principales y algoritmos computacionales permiten monitorear la respuesta inmune de forma automatizada, además, permite generar algoritmos de

aprendizaje que van a permitir en un futuro cercano clasificar pacientes en diferentes estadios, basados en el monitoreo de distintos marcadores de respuesta inmune.

Nuevas tecnologías de análisis multi-paramétricos como el CyTOF permite caracterizar a profundidad fenotipos celulares con más de 50 parámetros [277]. Estas herramientas requieren también nuevos enfoques para el análisis masivo de datos. Algoritmos como SPADE [219], FLOCK [218], viSNE [278], ACCENSE [279] y más recientemente CITRUS [221], han proporcionado las herramientas necesarias para el análisis automatizado multidimensional de datos de CF con el fin de facilitar la interpretación de datos complejos y el análisis de dichos fenotipos con las muestras analizadas, en nuestro caso mujeres sanas vs. pacientes pre y pos-quimioterapia. Los sistemas iniciales de procesamiento automatizado asumían un comportamiento de los datos como positivos o negativos y no como un gradiente de expresión [280], lo cual limita la sensibilidad del análisis para detectar poblaciones poco frecuentes. Estas limitaciones fueron posteriormente resueltas con el desarrollo de herramientas como SPADE [219], que comparativamente con otros sistemas como viSNE y ACCENSE emplea un algoritmo más eficiente y visualmente más fácil de interpretar [228]. A pesar de los avances del algoritmo SPADE, la comparación estadística de muestras es limitada. Ciertas herramientas como CITRUS [221], están diseñadas no solo para definir bio-marcadores que diferencien los grupos de análisis sino incluso para establecer a que grupo podría pertenecer una muestra desconocida (p.ej., una muestra de una mujer sin diagnóstico). Estas herramientas se han utilizado principalmente para el análisis de jerarquía celular en muestras de médula ósea provenientes de pacientes con leucemia, y algunas en respuesta de mecanismos celulares posterior al tratamiento farmacológico [281]. Sin embargo, hasta la fecha no existe evidencia publicada en que se haya reportado su empleo como herramienta para el monitoreo inmune de respuesta clínica a quimioterapia neo-adyuvante en pacientes con cáncer de mama.

El uso de las herramientas para el análisis automatizado en las muestras de pacientes marcadas con fines de análisis vía CF multi-paramétrica (12 parámetros) permitió no solo implementar la infraestructura informática necesaria para ejecutar los algoritmos FLOCK, SPADE y CITRUS sino además detectar un incremento significativo de una población de DCs con fenotipo similar a DCs plasmacitoides *ex vivo* en las muestras de pacientes pre-quimioterapia que se reduce a niveles similares a los observados en esta población en mujeres sanas. La diferencia en el porcentaje de esta población no pudo ser detectada mediante el análisis manual empleando una estrategia de selección manual de regiones. El

significado del hallazgo de esta población por el método automatizado está por establecerse; esta podría estar asociada al papel que juegan estas células en el desarrollo tumoral [282] posiblemente por mecanismos que facilitan la diferenciación de Tregs [283].

El concepto clásico de la infiltración de DCs de tipo plasmacitoides en tumores de mama está asociado a un valor pronóstico negativo por incremento de la infiltración de Tregs [284]. Sin embargo, estudios realizados por Le Mercier y cols. [282] muestran como el tratamiento de tumores con ligandos de TLR7 en un modelo murino puede revertir la supresión inmune y favorecer la regresión tumoral. Igualmente se conoce el papel especializado de pDC en la inducción de tolerancia periférica [283, 285, 286] a través de la eliminación de células T específicas de Ag [287] o diferenciación / expansión de células T supresoras [288, 289]. Resultados interesantes han favorecido el desarrollo de ensayos clínicos fase I / II donde evalúan el potencial terapéutico de agonistas de TLR para el tratamiento de varios tipos de cáncer [290] como moduladores de la respuesta de DCs plasmacitoides. Estas evidencias estarían explicando el incremento de DCs con fenotipo plasmacitoide encontrado por CITRUS en el análisis ex vivo en el grupo de pacientes antes de la quimioterapia.

Por otra parte, el análisis de la respuesta *in vitro* de sub-poblaciones de Tfh en las pacientes pre-quimioterapia, permitió determinar una serie de clústers con fenotipo de Tfh que no solo expanden de manera adecuada en muestras de mujeres sanas luego del estímulo del TCR en combinación con 2d-aDCs, como se había establecido con el análisis manual en respuesta a diferentes antígenos, sino que además, y a diferencia de lo establecido con el análisis manual (Figura suplementaria 5), de manera interesante, las muestras de las pacientes antes de la quimioterapia son deficientes para la expansión de estas células comparado con las mujeres sanas. La implementación de estos sistemas automatizados para el análisis de modelos de inmuno-monitoreo basados en CF, hace de estas herramientas una estrategia promisoriosa para la detección de nuevas sub-poblaciones y su monitoreo durante el tratamiento. Confiamos que la caracterización de su función y comportamiento biológico sea útil para establecer nuevos bio-marcadores pronósticos en las pacientes con cáncer de mama.

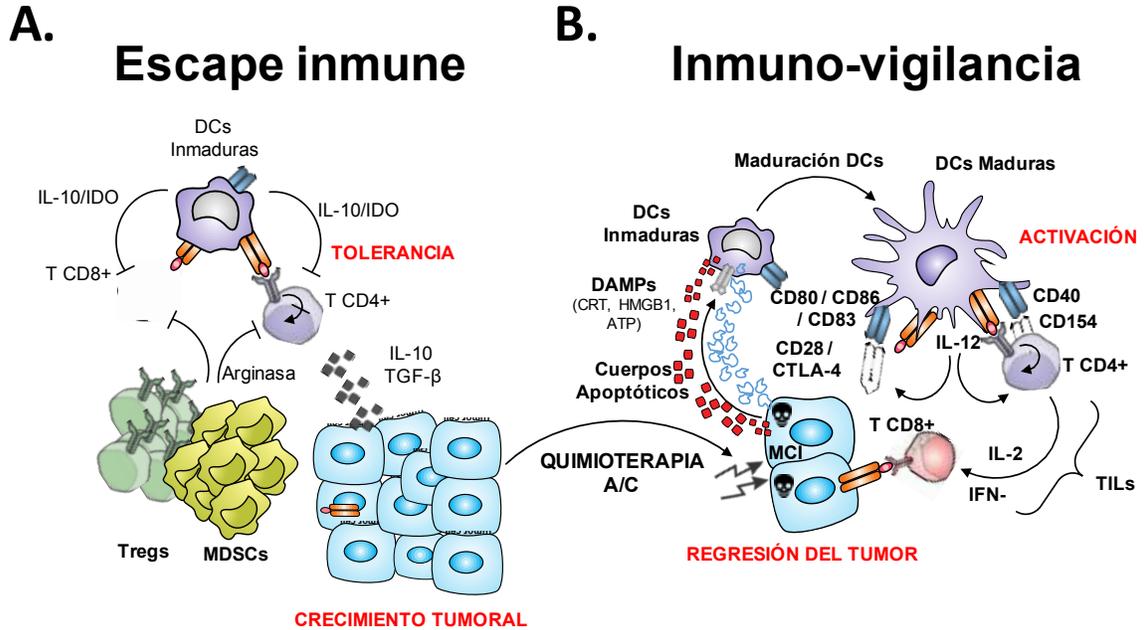


Figura 70. Modelo propuesto del efecto inmuno-estimulador de la quimioterapia A/C en pacientes con cáncer de mama. (A) En pacientes con un cáncer de mama establecido, el sistema inmune no pudo controlar el crecimiento tumoral, fase denominada inmuno-escape. Las células tumorales presentan una cantidad disminuida de MHC clase I y liberación de citoquinas supresoras como IL-10 y TGF- β , hay una mayor frecuencia de células supresoras MDSCs que producen arginasa, células Tregs y DCs inmaduras o plasmacitoides DCs (con niveles elevados de IDO). Eso favorece a una deficiente activación de LT citotóxicos e inhibición de la función ayudadora de LT-CD4+ mediante citoquinas supresoras como IL-10. **(B)** En las pacientes con cáncer de mama que son tratadas con quimioterapia con el esquema A/C, el sistema de inmunomonitorio propuesto es capaz de evaluar la restauración de la inmunovigilancia de los tumores restableciendo la respuesta inmune al inducir MCI en las células tumorales con la liberación de señales de peligro (DAMPs) como CRT, HMGB-1 y ATP, que son reconocidos por DCs inmaduras. Este reconocimiento induce la maduración de DCs con incremento en la expresión de CD80, CD83, CD86 y posiblemente presentación cruzada de antígenos favoreciendo el reconocimiento de estos antígenos por parte de los LT. Los LT estimulados inducen la producción de IL-12 por la interacción de CD154 con CD40 receptor en las APCs, y así colaborando en la producción de IFN- γ prestando la actividad ayudadora a los CTL para atacar las células tumorales restantes.

CONCLUSIONES GENERALES

Las conclusiones provenientes del trabajo presentado, se pueden resumir en los siguientes puntos dando cumplimiento a los objetivos propuestos en el trabajo de la siguiente forma:

- Para el primer objetivo, se implementó un modelo de inmuno-vigilancia en células de sangre periférica que se basa en la evaluación funcional de LT y de APCs *in vitro* que fuera realizable con pequeños volúmenes de sangre, que permitió evidenciar una deficiencia funcional de ambos compartimientos en las pacientes con cáncer de mama previo a la quimioterapia.
- El segundo objetivo, se pudo establecer como LT específicos de antígenos tumorales (Her2/neu) en una paciente HLA-A*02:01, estaban infiltrando el tumor y se encontraban en una baja frecuencia previo a la terapia antitumoral, más aún, posterior a un año de tratamiento dichas células específicas contra Her2/neu, se encontraron incrementadas en sangre periférica; con la ventaja de ser funcionalmente activas posterior al estímulo *in vitro* con péptidos específicos de HER2/neu, contrario a las células específicas obtenidas antes del tratamiento.
- Para el tercer objetivo, se vinculó una cohorte de pacientes con cáncer de mama, candidatas a terapia neo-adyuvante con el esquema A/C a las cuales se aplicó el sistema de inmuno-monitoreo comparando las muestras de sangre obtenidas antes y después de tres ciclos de quimioterapia con A/C. Este modelo mostró claramente que con solo tres ciclos de quimioterapia con el esquema A/C fue posible rescatar la funcionalidad de las células a niveles cercanos de las mujeres sanas. Esta recuperación involucró la respuesta tanto del compartimiento APC como la del compartimiento de LT.
- Finalmente, para el cuarto objetivo, se establecieron dos parámetros inmunológicos en relación con la funcionalidad de APCs (expresión de CD83 en DCs plasmacitoides) y con la funcionalidad de LT (internalización del TCR) que fueron capaces de predecir el grado de respuesta clínica a la quimioterapia con A/C determinada por la carga tumoral residual y por el volumen tumoral.

PERSPECTIVAS

Este trabajo plantea la posibilidad de aplicar la cuantificación de una serie de parámetros inmunes que deben ser validados para el uso como predictores de la respuesta clínica de pacientes con cáncer de mama en esquema de quimioterapia con A/C. Estas mediciones se están realizando actualmente en el primer estudio clínico del país en relación a inmunoterapia de cáncer, donde pacientes con los mismos criterios de inclusión/exclusión están siendo tratadas con una combinación especial de células dendríticas autólogas. Hasta la fecha este tratamiento ha sido bien tolerado por las pacientes, sin embargo, queda por analizar el efecto sobre el sistema inmune y sobre la respuesta clínica de las pacientes intervenidas (Ensayo clínico: *“Inmunogenicidad y seguridad de células dendríticas autólogas en pacientes con cáncer de mama tratadas con quimioterapia neo-adyuvante”*, estudio Fase I/II desarrollado en el marco de una alianza entre la Fundación Salud de los Andes y la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional de Colombia con el patrocinio de COLCIENCIAS).

Adicionalmente este trabajo proyecta mediciones específicas en linfocitos T que se deben profundizar en cuanto a los mecanismos involucrados en las pacientes con cáncer de mama y el papel que juega la quimioterapia en estos mecanismos.

Finalmente se espera que con aproximaciones metodológicas que permitan predecir la respuesta o sensibilidad de los pacientes a una quimioterapia, este sistema se pueda explorar y aplicar a diferentes patologías malignas como el cáncer colorrectal, cáncer gástrico, próstata entre otros.

CONSIDERACIONES ÉTICAS

De acuerdo a la resolución N° 008430 de 1993 que establece las normas científicas, técnicas y administrativas para la investigación en humanos, Artículo 11, este trabajo se clasificó como investigación con riesgo leve a moderado: *“estudios prospectivos que emplean el registro de datos a través de procedimientos comunes consistentes en: exámenes físicos o psicológicos de diagnóstico o tratamientos rutinarios, entre los que se consideran: pesar al sujeto, electrocardiogramas, pruebas de agudeza auditiva, termografías, colección de excretas y secreciones externas, obtención de placenta durante el parto, recolección de líquido amniótico al romperse las membranas, obtención de saliva, dientes deciduales y dientes permanentes extraídos por indicación terapéutica, placa dental y cálculos removidos por procedimientos profilácticos no invasores, corte de pelo y uñas sin causar desfiguración, extracción de sangre por punción venosa en adultos en buen estado de salud, con frecuencia máxima de dos veces a la semana y volumen máximo de 450 ml en dos meses excepto durante el embarazo ...”*. La norma no es clara en cuanto a volumen de sangre tomado en pacientes con cáncer en estadios tempranos de la enfermedad, por el volumen de 20mL (volumen aprobado por los diferentes comités de ética, consideramos que el riesgo para las pacientes fue leve y se le explicaron todos los posibles riesgos generados por la toma de la muestra (ninguna paciente presentó efectos asociados por la toma de la muestra de sangre).

Las muestras obtenidas en el presente estudio solo fueron utilizadas para los experimentos aquí mostrados, por ningún motivo fueron compartidos ni empleados en otros proyectos.

Consideraciones ambientales

Todos los procesos de laboratorio como la toma de muestras generaron desechos ambientales de tipo biológico y químico por el empleo de los reactivos. Para disminuir el impacto ambiental generado por estos desechos, la disposición de los mismos se realizó acorde con las guías del Laboratorio de Equipos Comunes de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional de Colombia.

BIBLIOGRAFÍA

1. Ferlay J, S.I., Ervik M, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M, Parkin DM, Forman D, Bray, F. *GLOBOCAN 2012 v1.0, Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC CancerBase No. 11 [Internet]*. 2013 [cited 2017 02/mar/2017]; Available from: <http://globocan.iarc.fr/>.
2. Cancerología, I.N.d., *Anuario Estadístico 2008*. 2009. **6**: p. 100.
3. Ministerio de la Protección Social. Instituto Nacional de Cáncerología, E.S.E., *Anuario estadístico, "Por el control del cáncer"*. 2005: Bogotá, D.C., Colombia.
4. Hudis, C.A., *Trastuzumab--mechanism of action and use in clinical practice*. N Engl J Med, 2007. **357**(1): p. 39-51.
5. Zuppinger, C. and T.M. Suter, *Cancer therapy-associated cardiotoxicity and signaling in the myocardium*. J Cardiovasc Pharmacol, 2010. **56**(2): p. 141-6.
6. Wijayahadi, N., et al., *Changes in cellular immunity during chemotherapy for primary breast cancer with anthracycline regimens*. J Chemother, 2007. **19**(6): p. 716-23.
7. Stronen, E., et al., *Targeting of cancer neoantigens with donor-derived T cell receptor repertoires*. Science, 2016. **352**(6291): p. 1337-41.
8. Yadav, M. and L. Delamarre, *IMMUNOTHERAPY. Outsourcing the immune response to cancer*. Science, 2016. **352**(6291): p. 1275-6.
9. Gardner, R.V., *Long term hematopoietic damage after chemotherapy and cytokine*. Front Biosci, 1999. **4**: p. e47-57.
10. van der Most, R.G., et al., *Cranking the immunologic engine with chemotherapy: using context to drive tumor antigen cross-presentation towards useful antitumor immunity*. Cancer Res, 2006. **66**(2): p. 601-4.
11. Weiner, H.L. and J.A. Cohen, *Treatment of multiple sclerosis with cyclophosphamide: critical review of clinical and immunologic effects*. Mult Scler, 2002. **8**(2): p. 142-54.
12. Leone, J.P., et al., *Sixteen years follow-up results of a randomized phase II trial of neoadjuvant fluorouracil, doxorubicin, and cyclophosphamide (FAC) compared with cyclophosphamide, methotrexate, and 5-fluorouracil (CMF) in stage III breast cancer: GOCS experience*. Breast Cancer Res Treat, 2014. **143**(2): p. 313-23.
13. Diaz-Montero, C.M., et al., *Increased circulating myeloid-derived suppressor cells correlate with clinical cancer stage, metastatic tumor burden, and doxorubicin-cyclophosphamide chemotherapy*. Cancer Immunol Immunother, 2009. **58**(1): p. 49-59.
14. Kurt, R.A., et al., *Peripheral T lymphocytes from women with breast cancer exhibit abnormal protein expression of several signaling molecules*. Int J Cancer, 1998. **78**(1): p. 16-20.
15. Mozaffari, F., et al., *NK-cell and T-cell functions in patients with breast cancer: effects of surgery and adjuvant chemo- and radiotherapy*. Br J Cancer, 2007. **97**(1): p. 105-11.
16. Mozaffari, F., et al., *Systemic immune effects of adjuvant chemotherapy with 5-fluorouracil, epirubicin and cyclophosphamide and/or radiotherapy in breast cancer: a longitudinal study*. Cancer Immunol Immunother, 2009. **58**(1): p. 111-20.
17. Murta, E.F., et al., *Lymphocyte subpopulations in patients with advanced breast cancer submitted to neoadjuvant chemotherapy*. Tumori, 2000. **86**(5): p. 403-7.
18. Solomayer, E.F., et al., *Influence of adjuvant hormone therapy and chemotherapy on the immune system analysed in the bone marrow of patients with breast cancer*. Clin Cancer Res, 2003. **9**(1): p. 174-80.
19. Wasserman, J., et al., *Immunosuppression in irradiated breast cancer patients: in vitro effect of cyclooxygenase inhibitors*. Bull N Y Acad Med, 1989. **65**(1): p. 36-44.

20. Campbell, M.J., et al., *Immune dysfunction and micrometastases in women with breast cancer*. *Breast Cancer Res Treat*, 2005. **91**(2): p. 163-71.
21. Caras, I., et al., *Evidence for immune defects in breast and lung cancer patients*. *Cancer Immunol Immunother*, 2004. **53**(12): p. 1146-52.
22. Galluzzi, L., et al., *The secret ally: immunostimulation by anticancer drugs*. *Nat Rev Drug Discov*, 2012. **11**(3): p. 215-33.
23. Ladoire, S., et al., *Immunogenic cell death-related biomarkers: Impact on the survival of breast cancer patients after adjuvant chemotherapy*. *Oncoimmunology*, 2016. **5**(2): p. e1082706.
24. Pfirschke, C., et al., *Immunogenic Chemotherapy Sensitizes Tumors to Checkpoint Blockade Therapy*. *Immunity*, 2016. **44**(2): p. 343-54.
25. Garg, A.D., et al., *Molecular and Translational Classifications of DAMPs in Immunogenic Cell Death*. *Front Immunol*, 2015. **6**: p. 588.
26. Zitvogel, L., O. Kepp, and G. Kroemer, *Immune parameters affecting the efficacy of chemotherapeutic regimens*. *Nat Rev Clin Oncol*, 2011. **8**(3): p. 151-60.
27. Kepp, O., et al., *Molecular determinants of immunogenic cell death elicited by anticancer chemotherapy*. *Cancer Metastasis Rev*, 2011. **30**(1): p. 61-9.
28. Tesniere, A., et al., *Immunogenic death of colon cancer cells treated with oxaliplatin*. *Oncogene*, 2010. **29**(4): p. 482-91.
29. Tesniere, A., et al., *Immunogenic cancer cell death: a key-lock paradigm*. *Curr Opin Immunol*, 2008. **20**(5): p. 504-11.
30. Obeid, M., et al., *Calreticulin exposure dictates the immunogenicity of cancer cell death*. *Nat Med*, 2007. **13**(1): p. 54-61.
31. Casares, N., et al., *Caspase-dependent immunogenicity of doxorubicin-induced tumor cell death*. *J Exp Med*, 2005. **202**(12): p. 1691-701.
32. Steinman, R.M. and Z.A. Cohn, *Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. I. Morphology, quantitation, tissue distribution*. *J Exp Med*, 1973. **137**(5): p. 1142-62.
33. Palucka, K. and J. Banchereau, *Cancer immunotherapy via dendritic cells*. *Nat Rev Cancer*, 2012. **12**(4): p. 265-77.
34. Draube, A., et al., *Dendritic cell based tumor vaccination in prostate and renal cell cancer: a systematic review and meta-analysis*. *PLoS One*, 2011. **6**(4): p. e18801.
35. Avigan, D., *Dendritic cells: development, function and potential use for cancer immunotherapy*. *Blood Rev*, 1999. **13**(1): p. 51-64.
36. Banchereau, J., et al., *Immune and clinical responses in patients with metastatic melanoma to CD34(+) progenitor-derived dendritic cell vaccine*. *Cancer Res*, 2001. **61**(17): p. 6451-8.
37. Hsu, F.J., et al., *Vaccination of patients with B-cell lymphoma using autologous antigen-pulsed dendritic cells*. *Nat Med*, 1996. **2**(1): p. 52-8.
38. Melief, C.J., *Cancer immunotherapy by dendritic cells*. *Immunity*, 2008. **29**(3): p. 372-83.
39. Motta, M.R., et al., *Generation of dendritic cells from CD14+ monocytes positively selected by immunomagnetic adsorption for multiple myeloma patients enrolled in a clinical trial of anti-idiotypic vaccination*. *Br J Haematol*, 2003. **121**(2): p. 240-50.
40. Osada, T., et al., *Dendritic cell-based immunotherapy*. *Int Rev Immunol*, 2006. **25**(5-6): p. 377-413.
41. Schuler, G., B. Schuler-Thurner, and R.M. Steinman, *The use of dendritic cells in cancer immunotherapy*. *Curr Opin Immunol*, 2003. **15**(2): p. 138-47.
42. Liu, Y.J., *Dendritic cell subsets and lineages, and their functions in innate and adaptive immunity*. *Cell*, 2001. **106**(3): p. 259-62.

43. Satpathy, A.T., et al., *Re(de)fining the dendritic cell lineage*. Nat Immunol, 2012. **13**(12): p. 1145-54.
44. Lenahan, C. and D. Avigan, *Dendritic cell defects in patients with cancer: mechanisms and significance*. Breast Cancer Res, 2006. **8**(1): p. 101.
45. Pinzon-Charry, A., et al., *Numerical and functional defects of blood dendritic cells in early- and late-stage breast cancer*. Br J Cancer, 2007. **97**(9): p. 1251-9.
46. Curiel, T.J., et al., *Dendritic cell subsets differentially regulate angiogenesis in human ovarian cancer*. Cancer Res, 2004. **64**(16): p. 5535-8.
47. Fricke, I. and D.I. Gabrilovich, *Dendritic cells and tumor microenvironment: a dangerous liaison*. Immunol Invest, 2006. **35**(3-4): p. 459-83.
48. Bloy, N., et al., *Trial watch: Dendritic cell-based anticancer therapy*. Oncoimmunology, 2014. **3**(11): p. e963424.
49. Berntsen, A., et al., *Therapeutic dendritic cell vaccination of patients with metastatic renal cell carcinoma: a clinical phase 1/2 trial*. J Immunother, 2008. **31**(8): p. 771-80.
50. Kavanagh, B., et al., *Vaccination of metastatic colorectal cancer patients with matured dendritic cells loaded with multiple major histocompatibility complex class I peptides*. J Immunother, 2007. **30**(7): p. 762-72.
51. Wierdecky, J., et al., *Immunologic and clinical responses after vaccinations with peptide-pulsed dendritic cells in metastatic renal cancer patients*. Cancer Res, 2006. **66**(11): p. 5910-8.
52. Sallusto, F. and A. Lanzavecchia, *Efficient presentation of soluble antigen by cultured human dendritic cells is maintained by granulocyte/macrophage colony-stimulating factor plus interleukin 4 and downregulated by tumor necrosis factor alpha*. J Exp Med, 1994. **179**(4): p. 1109-18.
53. Dauer, M., et al., *Mature dendritic cells derived from human monocytes within 48 hours: a novel strategy for dendritic cell differentiation from blood precursors*. J Immunol, 2003. **170**(8): p. 4069-76.
54. Mailliard, R.B., *-Type-1 Polarized Dendritic Cells: A Novel Immunization Tool with Optimized CTL-inducing Activity*. Cancer Research, 2004. **64**(17): p. 5934-5937.
55. Obermaier, B., et al., *Development of a new protocol for 2-day generation of mature dendritic cells from human monocytes*. Biol Proced Online, 2003. **5**: p. 197-203.
56. Bernal-Estévez, D., D. Tovar, and C. Parra-López, *Functional and phenotypic analysis of two-day monocyte-derived dendritic cells suitable for immunotherapy purposes*. SOJ Immunology, 2016. **4**(2).
57. Wegner, J., et al., *High-density preculture of PBMCs restores defective sensitivity of circulating CD8 T cells to virus- and tumor-derived antigens*. Blood, 2015. **126**(2): p. 185-94.
58. Martinuzzi, E., et al., *Accelerated co-cultured dendritic cells (acDCs) enhance human antigen-specific T-cell responses*. Blood, 2011.
59. Moser, J.M., et al., *Optimization of a dendritic cell-based assay for the in vitro priming of naive human CD4+ T cells*. J Immunol Methods, 2010. **353**(1-2): p. 8-19.
60. Alcover, A. and B. Alarcon, *Internalization and intracellular fate of TCR-CD3 complexes*. Crit Rev Immunol, 2000. **20**(4): p. 325-46.
61. Krowka, J.F., et al., *Expression of CD69 after in vitro stimulation: a rapid method for quantitating impaired lymphocyte responses in HIV-infected individuals*. J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol, 1996. **11**(1): p. 95-104.
62. Mackey, M.F., R.J. Barth, Jr., and R.J. Noelle, *The role of CD40/CD154 interactions in the priming, differentiation, and effector function of helper and cytotoxic T cells*. J Leukoc Biol, 1998. **63**(4): p. 418-28.

63. Gonzalez-Amaro, R., et al., *Is CD69 an effective brake to control inflammatory diseases?* Trends Mol Med, 2013. **19**(10): p. 625-32.
64. Sallusto, F., et al., *Two subsets of memory T lymphocytes with distinct homing potentials and effector functions.* Nature, 1999. **401**(6754): p. 708-12.
65. Sallusto, F., J. Geginat, and A. Lanzavecchia, *Central memory and effector memory T cell subsets: function, generation, and maintenance.* Annu Rev Immunol, 2004. **22**: p. 745-63.
66. Biasco, L., et al., *In vivo tracking of T cells in humans unveils decade-long survival and activity of genetically modified T memory stem cells.* Sci Transl Med, 2015. **7**(273): p. 273ra13.
67. Arens, R. and S.P. Schoenberger, *Plasticity in programming of effector and memory CD8 T-cell formation.* Immunol Rev, 2010. **235**(1): p. 190-205.
68. Hamann, D., et al., *Phenotypic and functional separation of memory and effector human CD8+ T cells.* J Exp Med, 1997. **186**(9): p. 1407-18.
69. Geginat, J., F. Sallusto, and A. Lanzavecchia, *Cytokine-driven proliferation and differentiation of human naive, central memory and effector memory CD4+ T cells.* Pathol Biol (Paris), 2003. **51**(2): p. 64-6.
70. Gattinoni, L., et al., *A human memory T cell subset with stem cell-like properties.* Nat Med, 2011. **17**(10): p. 1290-7.
71. Gattinoni, L., C.A. Klebanoff, and N.P. Restifo, *Paths to stemness: building the ultimate antitumor T cell.* Nat Rev Cancer, 2012. **12**(10): p. 671-84.
72. Gattinoni, L., et al., *Acquisition of full effector function in vitro paradoxically impairs the in vivo antitumor efficacy of adoptively transferred CD8+ T cells.* J Clin Invest, 2005. **115**(6): p. 1616-26.
73. Klebanoff, C.A., et al., *Central memory self/tumor-reactive CD8+ T cells confer superior antitumor immunity compared with effector memory T cells.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2005. **102**(27): p. 9571-6.
74. Gattinoni, L., et al., *Wnt signaling arrests effector T cell differentiation and generates CD8+ memory stem cells.* Nat Med, 2009. **15**(7): p. 808-13.
75. Muranski, P. and N.P. Restifo, *Essentials of Th17 cell commitment and plasticity.* Blood, 2013. **121**(13): p. 2402-14.
76. Mosmann, T.R. and R.L. Coffman, *TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties.* Annu Rev Immunol, 1989. **7**: p. 145-73.
77. Pearce, E.J., et al., *Th2 response polarization during infection with the helminth parasite Schistosoma mansoni.* Immunol Rev, 2004. **201**: p. 117-26.
78. Huppert, J., et al., *Cellular mechanisms of IL-17-induced blood-brain barrier disruption.* FASEB J, 2010. **24**(4): p. 1023-34.
79. Cho, B.S., et al., *Circulating IL-17 levels during the peri-transplant period as a predictor for early leukemia relapse after myeloablative allogeneic stem cell transplantation.* Ann Hematol, 2012. **91**(3): p. 439-48.
80. Zou, W. and N.P. Restifo, *T(H)17 cells in tumour immunity and immunotherapy.* Nat Rev Immunol, 2010. **10**(4): p. 248-56.
81. Martin-Orozco, N., et al., *T helper 17 cells promote cytotoxic T cell activation in tumor immunity.* Immunity, 2009. **31**(5): p. 787-98.
82. Wang, L., et al., *IL-17 can promote tumor growth through an IL-6-Stat3 signaling pathway.* J Exp Med, 2009. **206**(7): p. 1457-64.
83. Ma, Y., et al., *Contribution of IL-17-producing gamma delta T cells to the efficacy of anticancer chemotherapy.* J Exp Med, 2011. **208**(3): p. 491-503.

84. Goldberg, J.E. and K.L. Schwertfeger, *Proinflammatory cytokines in breast cancer: mechanisms of action and potential targets for therapeutics*. *Curr Drug Targets*, 2010. **11**(9): p. 1133-46.
85. Aggarwal, B.B., *Signalling pathways of the TNF superfamily: a double-edged sword*. *Nat Rev Immunol*, 2003. **3**(9): p. 745-56.
86. Sheen-Chen, S.M., et al., *Serum concentration of tumor necrosis factor in patients with breast cancer*. *Breast Cancer Res Treat*, 1997. **43**(3): p. 211-5.
87. Attaf, M., E. Huseby, and A.K. Sewell, *alphabeta T cell receptors as predictors of health and disease*. *Cell Mol Immunol*, 2015. **12**(4): p. 391-9.
88. Jenkins, M.K., et al., *In vivo activation of antigen-specific CD4 T cells*. *Annu Rev Immunol*, 2001. **19**: p. 23-45.
89. Arstila, T.P., *A Direct Estimate of the Human T Cell Receptor Diversity*. *Science*, 1999. **286**(5441): p. 958-961.
90. Vormehr, M., et al., *Mutanome directed cancer immunotherapy*. *Curr Opin Immunol*, 2016. **39**: p. 14-22.
91. Linnemann, C., et al., *High-throughput epitope discovery reveals frequent recognition of neo-antigens by CD4+ T cells in human melanoma*. *Nat Med*, 2015. **21**(1): p. 81-5.
92. Johnson, L.A., et al., *Gene therapy with human and mouse T-cell receptors mediates cancer regression and targets normal tissues expressing cognate antigen*. *Blood*, 2009. **114**(3): p. 535-46.
93. Krueger, A., N. Zietara, and M. Lyszkiewicz, *T Cell Development by the Numbers*. *Trends Immunol*, 2017. **38**(2): p. 128-139.
94. Jenkins, M.K. and J.J. Moon, *The role of naive T cell precursor frequency and recruitment in dictating immune response magnitude*. *J Immunol*, 2012. **188**(9): p. 4135-40.
95. Blattman, J.N., et al., *Estimating the precursor frequency of naive antigen-specific CD8 T cells*. *J Exp Med*, 2002. **195**(5): p. 657-64.
96. McHeyzer-Williams, M.G. and M.M. Davis, *Antigen-specific development of primary and memory T cells in vivo*. *Science*, 1995. **268**(5207): p. 106-11.
97. Altman, J.D., et al., *Phenotypic analysis of antigen-specific T lymphocytes*. *Science*, 1996. **274**(5284): p. 94-6.
98. Moon, J.J., et al., *Naive CD4(+) T cell frequency varies for different epitopes and predicts repertoire diversity and response magnitude*. *Immunity*, 2007. **27**(2): p. 203-13.
99. Kotturi, M.F., et al., *Naive precursor frequencies and MHC binding rather than the degree of epitope diversity shape CD8+ T cell immunodominance*. *J Immunol*, 2008. **181**(3): p. 2124-33.
100. Alanio, C., et al., *Enumeration of human antigen-specific naive CD8+ T cells reveals conserved precursor frequencies*. *Blood*, 2010. **115**(18): p. 3718-25.
101. Chu, H.H., et al., *Positive selection optimizes the number and function of MHCII-restricted CD4+ T cell clones in the naive polyclonal repertoire*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2009. **106**(27): p. 11241-5.
102. Kwok, W.W., et al., *Frequency of epitope-specific naive CD4(+) T cells correlates with immunodominance in the human memory repertoire*. *J Immunol*, 2012. **188**(6): p. 2537-44.
103. Fuertes Marraco, S.A., et al., *Inhibitory Receptors Beyond T Cell Exhaustion*. *Front Immunol*, 2015. **6**: p. 310.
104. Baitsch, L., et al., *Extended co-expression of inhibitory receptors by human CD8 T-cells depending on differentiation, antigen-specificity and anatomical localization*. *PLoS One*, 2012. **7**(2): p. e30852.

105. Walker, L.S. and D.M. Sansom, *The emerging role of CTLA4 as a cell-extrinsic regulator of T cell responses*. Nat Rev Immunol, 2011. **11**(12): p. 852-63.
106. Legat, A., et al., *Inhibitory Receptor Expression Depends More Dominantly on Differentiation and Activation than "Exhaustion" of Human CD8 T Cells*. Front Immunol, 2013. **4**: p. 455.
107. Dauer, M., et al., *FastDC derived from human monocytes within 48 h effectively prime tumor antigen-specific cytotoxic T cells*. J Immunol Methods, 2005. **302**(1-2): p. 145-55.
108. Mailliard, R.B., et al., *alpha-type-1 polarized dendritic cells: a novel immunization tool with optimized CTL-inducing activity*. Cancer Res, 2004. **64**(17): p. 5934-7.
109. Bajana, S., et al., *Differential CD4(+) T-cell memory responses induced by two subsets of human monocyte-derived dendritic cells*. Immunology, 2007. **122**(3): p. 381-93.
110. Rubio, V., et al., *Ex vivo identification, isolation and analysis of tumor-cytolytic T cells*. Nat Med, 2003. **9**(11): p. 1377-82.
111. Vincenti, D., et al., *Identification of early secretory antigen target-6 epitopes for the immunodiagnosis of active tuberculosis*. Mol Med, 2003. **9**(3-4): p. 105-11.
112. Arend, S.M., et al., *Tuberculin skin testing and in vitro T cell responses to ESAT-6 and culture filtrate protein 10 after infection with Mycobacterium marinum or M. kansasii*. J Infect Dis, 2002. **186**(12): p. 1797-807.
113. Schmitt, N., et al., *Human dendritic cells induce the differentiation of interleukin-21-producing T follicular helper-like cells through interleukin-12*. Immunity, 2009. **31**(1): p. 158-69.
114. Schmitt, N., S.E. Bentebibel, and H. Ueno, *Phenotype and functions of memory Tfh cells in human blood*. Trends Immunol, 2014. **35**(9): p. 436-42.
115. Geiger, R., et al., *Human naive and memory CD4+ T cell repertoires specific for naturally processed antigens analyzed using libraries of amplified T cells*. J Exp Med, 2009. **206**(7): p. 1525-34.
116. Robins, H., et al., *Ultra-sensitive detection of rare T cell clones*. J Immunol Methods, 2012. **375**(1-2): p. 14-9.
117. Robins, H.S., et al., *Comprehensive assessment of T-cell receptor beta-chain diversity in alphabeta T cells*. Blood, 2009. **114**(19): p. 4099-107.
118. Okada, H., et al., *Induction of CD8+ T-cell responses against novel glioma-associated antigen peptides and clinical activity by vaccinations with {alpha}-type 1 polarized dendritic cells and polyinosinic-polycytidylic acid stabilized by lysine and carboxymethylcellulose in patients with recurrent malignant glioma*. J Clin Oncol, 2011. **29**(3): p. 330-6.
119. Sallusto, F. and A. Lanzavecchia, *Understanding dendritic cell and T-lymphocyte traffic through the analysis of chemokine receptor expression*. Immunol Rev, 2000. **177**: p. 134-40.
120. Nishioka, Y., et al., *Induction of systemic and therapeutic antitumor immunity using intratumoral injection of dendritic cells genetically modified to express interleukin 12*. Cancer Res, 1999. **59**(16): p. 4035-41.
121. Kantoff, P.W., et al., *Sipuleucel-T immunotherapy for castration-resistant prostate cancer*. N Engl J Med, 2010. **363**(5): p. 411-22.
122. Small, E.J., et al., *Placebo-controlled phase III trial of immunologic therapy with sipuleucel-T (APC8015) in patients with metastatic, asymptomatic hormone refractory prostate cancer*. J Clin Oncol, 2006. **24**(19): p. 3089-94.
123. Goletti, D., et al., *Region of difference 1 antigen-specific CD4+ memory T cells correlate with a favorable outcome of tuberculosis*. J Infect Dis, 2006. **194**(7): p. 984-92.
124. Goletti, D., et al., *Accuracy of an immune diagnostic assay based on RD1 selected epitopes for active tuberculosis in a clinical setting: a pilot study*. Clin Microbiol Infect, 2006. **12**(6): p. 544-50.

125. Leyten, E.M., et al., *Use of enzyme-linked immunospot assay with Mycobacterium tuberculosis-specific peptides for diagnosis of recent infection with M. tuberculosis after accidental laboratory exposure.* J Clin Microbiol, 2006. **44**(3): p. 1197-201.
126. Scarpellini, P., et al., *Selected pool of peptides from ESAT-6 and CFP-10 proteins for detection of Mycobacterium tuberculosis infection.* J Clin Microbiol, 2004. **42**(8): p. 3469-74.
127. Fuertes Marraco, S.A., et al., *Long-lasting stem cell-like memory CD8+ T cells with a naive-like profile upon yellow fever vaccination.* Sci Transl Med, 2015. **7**(282): p. 282ra48.
128. Gu-Trantien, C., et al., *CD4(+) follicular helper T cell infiltration predicts breast cancer survival.* J Clin Invest, 2013. **123**(7): p. 2873-92.
129. Vinuesa, C.G., et al., *Follicular Helper T Cells.* Annu Rev Immunol, 2016. **34**: p. 335-68.
130. Locci, M., et al., *Human circulating PD-1+CXCR3-CXCR5+ memory Tfh cells are highly functional and correlate with broadly neutralizing HIV antibody responses.* Immunity, 2013. **39**(4): p. 758-69.
131. Bernal-Estevez, D., et al., *Chemotherapy and radiation therapy elicits tumor specific T cell responses in a breast cancer patient.* BMC Cancer, 2016. **16**: p. 591.
132. Baniyash, M., *TCR zeta-chain downregulation: curtailing an excessive inflammatory immune response.* Nat Rev Immunol, 2004. **4**(9): p. 675-87.
133. Crespo, J., et al., *T cell anergy, exhaustion, senescence, and stemness in the tumor microenvironment.* Curr Opin Immunol, 2013. **25**(2): p. 214-21.
134. Martinuzzi, E., et al., *acDCs enhance human antigen-specific T-cell responses.* Blood, 2011. **118**(8): p. 2128-37.
135. Pilch, H., et al., *Improved assessment of T-cell receptor (TCR) VB repertoire in clinical specimens: combination of TCR-CDR3 spectratyping with flow cytometry-based TCR VB frequency analysis.* Clin Diagn Lab Immunol, 2002. **9**(2): p. 257-66.
136. Robins, H.S., et al., *Overlap and effective size of the human CD8+ T cell receptor repertoire.* Sci Transl Med, 2010. **2**(47): p. 47ra64.
137. Cimino-Mathews, A., J.B. Foote, and L.A. Emens, *Immune targeting in breast cancer.* Oncology (Williston Park), 2015. **29**(5): p. 375-85.
138. Loi, S., et al., *Prognostic and predictive value of tumor-infiltrating lymphocytes in a phase III randomized adjuvant breast cancer trial in node-positive breast cancer comparing the addition of docetaxel to doxorubicin with doxorubicin-based chemotherapy: BIG 02-98.* J Clin Oncol, 2013. **31**(7): p. 860-7.
139. Adams, S., et al., *Prognostic value of tumor-infiltrating lymphocytes in triple-negative breast cancers from two phase III randomized adjuvant breast cancer trials: ECOG 2197 and ECOG 1199.* J Clin Oncol, 2014. **32**(27): p. 2959-66.
140. Loi, S., et al., *Tumor infiltrating lymphocytes are prognostic in triple negative breast cancer and predictive for trastuzumab benefit in early breast cancer: results from the FinHER trial.* Ann Oncol, 2014. **25**(8): p. 1544-50.
141. Emens, L.A., *Breast cancer immunobiology driving immunotherapy: vaccines and immune checkpoint blockade.* Expert Rev Anticancer Ther, 2012. **12**(12): p. 1597-611.
142. Bates, G.J., et al., *Quantification of regulatory T cells enables the identification of high-risk breast cancer patients and those at risk of late relapse.* J Clin Oncol, 2006. **24**(34): p. 5373-80.
143. Norum, J.H., K. Andersen, and T. Sorlie, *Lessons learned from the intrinsic subtypes of breast cancer in the quest for precision therapy.* Br J Surg, 2014. **101**(8): p. 925-38.
144. Ghebeh, H., et al., *FOXP3+ Tregs and B7-H1+/PD-1+ T lymphocytes co-infiltrate the tumor tissues of high-risk breast cancer patients: Implication for immunotherapy.* BMC Cancer, 2008. **8**: p. 57.

145. Dong, H., et al., *Tumor-associated B7-H1 promotes T-cell apoptosis: a potential mechanism of immune evasion*. Nat Med, 2002. **8**(8): p. 793-800.
146. Soliman, H., F. Khalil, and S. Antonia, *PD-L1 expression is increased in a subset of basal type breast cancer cells*. PLoS One, 2014. **9**(2): p. e88557.
147. Butte, M.J., et al., *Programmed death-1 ligand 1 interacts specifically with the B7-1 costimulatory molecule to inhibit T cell responses*. Immunity, 2007. **27**(1): p. 111-22.
148. Gustafson, M.P., et al., *Immune monitoring using the predictive power of immune profiles*. J Immunother Cancer, 2013. **1**: p. 7.
149. Masucci, G.V., et al., *Validation of biomarkers to predict response to immunotherapy in cancer: Volume I - pre-analytical and analytical validation*. J Immunother Cancer, 2016. **4**: p. 76.
150. Hinrichs, C.S. and S.A. Rosenberg, *Exploiting the curative potential of adoptive T-cell therapy for cancer*. Immunol Rev, 2014. **257**(1): p. 56-71.
151. Baxevanis, C.N., et al., *Tumor specific cytolysis by tumor infiltrating lymphocytes in breast cancer*. Cancer, 1994. **74**(4): p. 1275-82.
152. Varn, F.S., et al., *Adaptive immunity programmes in breast cancer*. Immunology, 2017. **150**(1): p. 25-34.
153. Boniface, J.D., et al., *Tumor-dependent down-regulation of the zeta-chain in T-cells is detectable in early breast cancer and correlates with immune cell function*. Int J Cancer, 2012. **131**(1): p. 129-39.
154. Sistigu, A., et al., *Cancer cell-autonomous contribution of type I interferon signaling to the efficacy of chemotherapy*. Nat Med, 2014. **20**(11): p. 1301-9.
155. Zhang, B., et al., *Induced sensitization of tumor stroma leads to eradication of established cancer by T cells*. J Exp Med, 2007. **204**(1): p. 49-55.
156. Liu, W.M., et al., *Pre-treatment with chemotherapy can enhance the antigenicity and immunogenicity of tumours by promoting adaptive immune responses*. Br J Cancer, 2010. **102**(1): p. 115-23.
157. Reits, E.A., et al., *Radiation modulates the peptide repertoire, enhances MHC class I expression, and induces successful antitumor immunotherapy*. J Exp Med, 2006. **203**(5): p. 1259-71.
158. Granados, D.P., et al., *MHC I-associated peptides preferentially derive from transcripts bearing miRNA response elements*. Blood, 2012. **119**(26): p. e181-91.
159. Iorio, M.V., et al., *MicroRNA gene expression deregulation in human breast cancer*. Cancer Res, 2005. **65**(16): p. 7065-70.
160. Li, Q., et al., *Circulating miR-19a and miR-205 in serum may predict the sensitivity of luminal A subtype of breast cancer patients to neoadjuvant chemotherapy with epirubicin plus paclitaxel*. PLoS One, 2014. **9**(8): p. e104870.
161. Al-Khanbashi, M., et al., *Tissue and Serum miRNA Profile in Locally Advanced Breast Cancer (LABC) in Response to Neo-Adjuvant Chemotherapy (NAC) Treatment*. PLoS One, 2016. **11**(4): p. e0152032.
162. Hatzis, C., et al., *A genomic predictor of response and survival following taxane-anthracycline chemotherapy for invasive breast cancer*. JAMA, 2011. **305**(18): p. 1873-81.
163. Lips, E.H., et al., *Next generation sequencing of triple negative breast cancer to find predictors for chemotherapy response*. Breast Cancer Res, 2015. **17**(1): p. 134.
164. Stoll, G., et al., *Immune-related gene signatures predict the outcome of neoadjuvant chemotherapy*. Oncoimmunology, 2014. **3**(1): p. e27884.

165. Tan, S.H., et al., *High-Throughput Mutation Profiling Changes before and 3 Weeks after Chemotherapy in Newly Diagnosed Breast Cancer Patients*. PLoS One, 2015. **10**(12): p. e0142466.
166. Albert, M.L., B. Sauter, and N. Bhardwaj, *Dendritic cells acquire antigen from apoptotic cells and induce class I-restricted CTLs*. Nature, 1998. **392**(6671): p. 86-9.
167. Bartholomae, W.C., et al., *T cell immunity induced by live, necrotic, and apoptotic tumor cells*. J Immunol, 2004. **173**(2): p. 1012-22.
168. Apetoh, L., et al., *Molecular interactions between dying tumor cells and the innate immune system determine the efficacy of conventional anticancer therapies*. Cancer Res, 2008. **68**(11): p. 4026-30.
169. Zitvogel, L., O. Kepp, and G. Kroemer, *Decoding cell death signals in inflammation and immunity*. Cell, 2010. **140**(6): p. 798-804.
170. Zitvogel, L., et al., *Immunogenic tumor cell death for optimal anticancer therapy: the calreticulin exposure pathway*. Clin Cancer Res, 2010. **16**(12): p. 3100-4.
171. Grindey, H.S.S.a.G.B., *Adriamycin and daunorubicin: a comparison of antitumor activities and tissue uptake in mice following immunosuppression*. Cancer Res, 1973(33): p. 1837-1844.
172. Zaleskis, G., et al., *Intracellular doxorubicin kinetics in lymphoma cells and lymphocytes infiltrating the tumor area in vivo: a flow cytometric study*. Oncol Res, 1994. **6**(4-5): p. 183-94.
173. Le Cesne, A., et al., *Combination interleukin-2 and doxorubicin in advanced adult solid tumors: circumvention of doxorubicin resistance in soft-tissue sarcoma?* J Immunother, 1999. **22**(3): p. 268-77.
174. Smalley, R.V., et al., *Interferon alfa combined with cytotoxic chemotherapy for patients with non-Hodgkin's lymphoma*. N Engl J Med, 1992. **327**(19): p. 1336-41.
175. Solal-Celigny, P., et al., *Recombinant interferon alfa-2b combined with a regimen containing doxorubicin in patients with advanced follicular lymphoma. Groupe d'Etude des Lymphomes de l'Adulte*. N Engl J Med, 1993. **329**(22): p. 1608-14.
176. Tongu, M., et al., *Immunogenic chemotherapy with cyclophosphamide and doxorubicin against established murine carcinoma*. Cancer Immunol Immunother, 2010. **59**(5): p. 769-77.
177. Apetoh, L., et al., *The interaction between HMGB1 and TLR4 dictates the outcome of anticancer chemotherapy and radiotherapy*. Immunol Rev, 2007. **220**: p. 47-59.
178. Viaud, S., et al., *Dendritic cell-derived exosomes for cancer immunotherapy: what's next?* Cancer Res, 2010. **70**(4): p. 1281-5.
179. Williams, K.M., F.T. Hakim, and R.E. Gress, *T cell immune reconstitution following lymphodepletion*. Semin Immunol, 2007. **19**(5): p. 318-30.
180. Blachere, N.E., R.B. Darnell, and M.L. Albert, *Apoptotic cells deliver processed antigen to dendritic cells for cross-presentation*. PLoS Biol, 2005. **3**(6): p. e185.
181. Nowak, A.K., R.A. Lake, and B.W. Robinson, *Combined chemoimmunotherapy of solid tumours: improving vaccines?* Adv Drug Deliv Rev, 2006. **58**(8): p. 975-90.
182. Groenendyk, J., J. Lynch, and M. Michalak, *Calreticulin, Ca²⁺, and calcineurin - signaling from the endoplasmic reticulum*. Mol Cells, 2004. **17**(3): p. 383-9.
183. Chaput, N., et al., *Molecular determinants of immunogenic cell death: surface exposure of calreticulin makes the difference*. J Mol Med, 2007. **85**(10): p. 1069-76.
184. Panaretakis, T., et al., *The co-translocation of ERp57 and calreticulin determines the immunogenicity of cell death*. Cell Death Differ, 2008. **15**(9): p. 1499-509.

185. Gardai, S.J., et al., *Cell-surface calreticulin initiates clearance of viable or apoptotic cells through trans-activation of LRP on the phagocyte*. *Cell*, 2005. **123**(2): p. 321-34.
186. Bak, S.P., et al., *Calreticulin requires an ancillary adjuvant for the induction of efficient cytotoxic T cell responses*. *Mol Immunol*, 2008. **45**(5): p. 1414-23.
187. Wang, T.H., et al., *Paclitaxel (Taxol) upregulates expression of functional interleukin-6 in human ovarian cancer cells through multiple signaling pathways*. *Oncogene*, 2006. **25**(35): p. 4857-66.
188. Fan, W., M. Sui, and Y. Huang, *Glucocorticoids selectively inhibit paclitaxel-induced apoptosis: mechanisms and its clinical impact*. *Curr Med Chem*, 2004. **11**(4): p. 403-11.
189. Giannakakou, P., et al., *Low concentrations of paclitaxel induce cell type-dependent p53, p21 and G1/G2 arrest instead of mitotic arrest: molecular determinants of paclitaxel-induced cytotoxicity*. *Oncogene*, 2001. **20**(29): p. 3806-13.
190. Ganansia-Leymarie, V., et al., *Signal transduction pathways of taxanes-induced apoptosis*. *Curr Med Chem Anticancer Agents*, 2003. **3**(4): p. 291-306.
191. Villunger, A., et al., *Constituents of autocrine IL-6 loops in myeloma cell lines and their targeting for suppression of neoplastic growth by antibody strategies*. *Int J Cancer*, 1996. **65**(4): p. 498-505.
192. Ofir, R., et al., *Taxol-induced apoptosis in human SKOV3 ovarian and MCF7 breast carcinoma cells is caspase-3 and caspase-9 independent*. *Cell Death Differ*, 2002. **9**(6): p. 636-42.
193. Kiessling, R., et al., *Cellular immunity to the Her-2/neu protooncogene*. *Adv Cancer Res*, 2002. **85**: p. 101-44.
194. Bus, P.J., et al., *Mesalazine-induced apoptosis of colorectal cancer: on the verge of a new chemopreventive era?* *Aliment Pharmacol Ther*, 1999. **13**(11): p. 1397-402.
195. Masunaga, R., et al., *Sulindac inhibits growth of rat colon carcinoma by inducing apoptosis*. *Eur Surg Res*, 2000. **32**(5): p. 305-9.
196. Zhu, G.H., et al., *Non-steroidal anti-inflammatory drug-induced apoptosis in gastric cancer cells is blocked by protein kinase C activation through inhibition of c-myc*. *Br J Cancer*, 1999. **79**(3-4): p. 393-400.
197. Kauffman, J. and J. Van Dam, *Mechanism underlying nsaid-mediated inhibition of colorectal tumorigenesis*. *Gastroenterology*, 1998. **115**(6): p. 1599-600.
198. Rabinovich, G.A., D. Gabrilovich, and E.M. Sotomayor, *Immunosuppressive strategies that are mediated by tumor cells*. *Annu Rev Immunol*, 2007. **25**: p. 267-96.
199. Symmans, W.F., et al., *Measurement of residual breast cancer burden to predict survival after neoadjuvant chemotherapy*. *J Clin Oncol*, 2007. **25**(28): p. 4414-22.
200. Jonuleit, H., et al., *Pro-inflammatory cytokines and prostaglandins induce maturation of potent immunostimulatory dendritic cells under fetal calf serum-free conditions*. *Eur J Immunol*, 1997. **27**(12): p. 3135-42.
201. Zitvogel, L., et al., *Mechanism of action of conventional and targeted anticancer therapies: reinstating immunosurveillance*. *Immunity*, 2013. **39**(1): p. 74-88.
202. Liu, W., et al., *CD127 expression inversely correlates with FoxP3 and suppressive function of human CD4+ T reg cells*. *J Exp Med*, 2006. **203**(7): p. 1701-11.
203. Ge, Y., et al., *Metronomic cyclophosphamide treatment in metastasized breast cancer patients: immunological effects and clinical outcome*. *Cancer Immunol Immunother*, 2012. **61**(3): p. 353-62.
204. Demir, L., et al., *Predictive and prognostic factors in locally advanced breast cancer: effect of intratumoral FOXP3+ Tregs*. *Clin Exp Metastasis*, 2013. **30**(8): p. 1047-62.
205. Shou, J., et al., *Worse outcome in breast cancer with higher tumor-infiltrating FOXP3+ Tregs : a systematic review and meta-analysis*. *BMC Cancer*, 2016. **16**: p. 687.

206. Verma, C., et al., *Abnormal T regulatory cells (Tregs: FOXP3+, CTLA-4+), myeloid-derived suppressor cells (MDSCs: monocytic, granulocytic) and polarised T helper cell profiles (Th1, Th2, Th17) in women with large and locally advanced breast cancers undergoing neoadjuvant chemotherapy (NAC) and surgery: failure of abolition of abnormal treg profile with treatment and correlation of treg levels with pathological response to NAC.* J Transl Med, 2013. **11**: p. 16.
207. Youn, J.I., et al., *Subsets of myeloid-derived suppressor cells in tumor-bearing mice.* J Immunol, 2008. **181**(8): p. 5791-802.
208. Peranzoni, E., et al., *Myeloid-derived suppressor cell heterogeneity and subset definition.* Curr Opin Immunol, 2010. **22**(2): p. 238-44.
209. Raber, P.L., et al., *Subpopulations of Myeloid-Derived Suppressor Cells (MDSC) impair T cell responses through independent nitric oxide-related pathways.* Int J Cancer, 2013.
210. Della Bella, S., et al., *Altered maturation of peripheral blood dendritic cells in patients with breast cancer.* Br J Cancer, 2003. **89**(8): p. 1463-72.
211. Gottfried, E., M. Kreutz, and A. Mackensen, *Tumor-induced modulation of dendritic cell function.* Cytokine Growth Factor Rev, 2008. **19**(1): p. 65-77.
212. Finn, O.J., *Cancer immunology.* N Engl J Med, 2008. **358**(25): p. 2704-15.
213. Wieland, E. and M. Shipkova, *Lymphocyte surface molecules as immune activation biomarkers.* Clin Biochem, 2016. **49**(4-5): p. 347-54.
214. Desmedt, C., et al., *Multifactorial approach to predicting resistance to anthracyclines.* J Clin Oncol, 2011. **29**(12): p. 1578-86.
215. Ladoire, S., et al., *In situ immune response after neoadjuvant chemotherapy for breast cancer predicts survival.* J Pathol, 2011. **224**(3): p. 389-400.
216. Thurstone, L., *Multiple factor analysis.* University of Chicago Press, 1947.
217. Cattell, R.B., *The Scientific Use of Factor Analysis.* New York: Plenum., 1978.
218. Qian, Y., et al., *Elucidation of seventeen human peripheral blood B-cell subsets and quantification of the tetanus response using a density-based method for the automated identification of cell populations in multidimensional flow cytometry data.* Cytometry B Clin Cytom, 2010. **78 Suppl 1**: p. S69-82.
219. Qiu, P., et al., *Extracting a cellular hierarchy from high-dimensional cytometry data with SPADE.* Nat Biotechnol, 2011. **29**(10): p. 886-91.
220. Bodenmiller, B., et al., *Multiplexed mass cytometry profiling of cellular states perturbed by small-molecule regulators.* Nat Biotechnol, 2012. **30**(9): p. 858-67.
221. Bruggner, R.V., et al., *Automated identification of stratifying signatures in cellular subpopulations.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2014. **111**(26): p. E2770-7.
222. Gaudilliere, B., et al., *Clinical recovery from surgery correlates with single-cell immune signatures.* Sci Transl Med, 2014. **6**(255): p. 255ra131.
223. Cochran, J.R., et al., *Receptor clustering and transmembrane signaling in T cells.* Trends Biochem Sci, 2001. **26**(5): p. 304-10.
224. Lee, J.J., et al., *Type 1-polarized dendritic cells loaded with autologous tumor are a potent immunogen against chronic lymphocytic leukemia.* J Leukoc Biol, 2008. **84**(1): p. 319-25.
225. Carreno, B.M., et al., *IL-12p70-producing patient DC vaccine elicits Tc1-polarized immunity.* J Clin Invest, 2013. **123**(8): p. 3383-94.
226. Van Gool, S.W., et al., *CD80, CD86 and CD40 provide accessory signals in a multiple-step T-cell activation model.* Immunol Rev, 1996. **153**: p. 47-83.
227. Tabachnick, B.G. and L.S. Fidell, *Principal components and factor analysis.* Using multivariate statistics, 2001. **4**: p. 582-633.

228. Anchang, B., et al., *Visualization and cellular hierarchy inference of single-cell data using SPADE*. Nat Protoc, 2016. **11**(7): p. 1264-79.
229. Faghieh, Z., et al., *IL-17 and IL-4 producing CD8+ T cells in tumor draining lymph nodes of breast cancer patients: positive association with tumor progression*. Iran J Immunol, 2013. **10**(4): p. 193-204.
230. Liang, Y., H.F. Pan, and D.Q. Ye, *Tc17 Cells in Immunity and Systemic Autoimmunity*. Int Rev Immunol, 2015. **34**(4): p. 318-31.
231. Saito, H., et al., *Clinical relevance of the number of interleukin-17-producing CD 8+ T cells in patients with gastric cancer*. Surg Today, 2015. **45**(11): p. 1429-35.
232. Lesterhuis, W.J., et al., *Platinum-based drugs disrupt STAT6-mediated suppression of immune responses against cancer in humans and mice*. J Clin Invest, 2011. **121**(8): p. 3100-8.
233. Emens, L.A., et al., *Timed sequential treatment with cyclophosphamide, doxorubicin, and an allogeneic granulocyte-macrophage colony-stimulating factor-secreting breast tumor vaccine: a chemotherapy dose-ranging factorial study of safety and immune activation*. J Clin Oncol, 2009. **27**(35): p. 5911-8.
234. Rousseau, B., et al., *Immunogenicity and safety of the influenza A H1N1v 2009 vaccine in cancer patients treated with cytotoxic chemotherapy and/or targeted therapy: the VACANCE study*. Ann Oncol, 2012. **23**(2): p. 450-7.
235. Finn, O.J., *Cancer vaccines: between the idea and the reality*. Nat Rev Immunol, 2003. **3**(8): p. 630-41.
236. Thundimadathil, J., *Cancer treatment using peptides: current therapies and future prospects*. J Amino Acids, 2012. **2012**: p. 967347.
237. Tormey, D.C., et al., *Biological markers in breast carcinoma: III. Clinical correlations with carcinoembryonic antigen*. Cancer, 1977. **39**(6): p. 2397-2404.
238. Criscitiello, C., *Tumor-associated antigens in breast cancer*. Breast Care (Basel), 2012. **7**(4): p. 262-6.
239. Herbst, R.S., et al., *Predictive correlates of response to the anti-PD-L1 antibody MPDL3280A in cancer patients*. Nature, 2014. **515**(7528): p. 563-7.
240. Matsutani, T., et al., *Evidence for existence of oligoclonal tumor-infiltrating lymphocytes and predominant production of T helper 1/T cytotoxic 1 type cytokines in gastric and colorectal tumors*. Int J Oncol, 2004. **25**(1): p. 133-41.
241. Echchakir, H., et al., *Cytotoxic T lymphocytes directed against a tumor-specific mutated antigen display similar HLA tetramer binding but distinct functional avidity and tissue distribution*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2002. **99**(14): p. 9358-9363.
242. Park, J.H., et al., *Clonal expansion of antitumor T cells in breast cancer correlates with response to neoadjuvant chemotherapy*. Int J Oncol, 2016. **49**(2): p. 471-8.
243. Bedoui, S., W.R. Heath, and S.N. Mueller, *CD4(+) T-cell help amplifies innate signals for primary CD8(+) T-cell immunity*. Immunol Rev, 2016. **272**(1): p. 52-64.
244. Kennedy, R. and E. Celis, *Multiple roles for CD4+ T cells in anti-tumor immune responses*. Immunol Rev, 2008. **222**: p. 129-44.
245. Knutson, K.L. and M.L. Disis, *Tumor antigen-specific T helper cells in cancer immunity and immunotherapy*. Cancer Immunol Immunother, 2005. **54**(8): p. 721-8.
246. Alderson, M.R., et al., *CD40 expression by human monocytes: regulation by cytokines and activation of monocytes by the ligand for CD40*. J Exp Med, 1993. **178**(2): p. 669-74.
247. Campbell, K.A., et al., *CD40 ligand is required for protective cell-mediated immunity to Leishmania major*. Immunity, 1996. **4**(3): p. 283-9.

248. Caux, C., et al., *Activation of human dendritic cells through CD40 cross-linking*. J Exp Med, 1994. **180**(4): p. 1263-72.
249. Cella, M., et al., *Ligation of CD40 on dendritic cells triggers production of high levels of interleukin-12 and enhances T cell stimulatory capacity: T-T help via APC activation*. J Exp Med, 1996. **184**(2): p. 747-52.
250. Kelsall, B.L., et al., *Interleukin-12 production by dendritic cells. The role of CD40-CD40L interactions in Th1 T-cell responses*. Ann N Y Acad Sci, 1996. **795**: p. 116-26.
251. Kiener, P.A., et al., *Stimulation of CD40 with purified soluble gp39 induces proinflammatory responses in human monocytes*. J Immunol, 1995. **155**(10): p. 4917-25.
252. Koch, F., et al., *High level IL-12 production by murine dendritic cells: upregulation via MHC class II and CD40 molecules and downregulation by IL-4 and IL-10*. J Exp Med, 1996. **184**(2): p. 741-6.
253. Shu, U., et al., *Activated T cells induce interleukin-12 production by monocytes via CD40-CD40 ligand interaction*. Eur J Immunol, 1995. **25**(4): p. 1125-8.
254. Stuber, E., W. Strober, and M. Neurath, *Blocking the CD40L-CD40 interaction in vivo specifically prevents the priming of T helper 1 cells through the inhibition of interleukin 12 secretion*. J Exp Med, 1996. **183**(2): p. 693-8.
255. Campbell, D.J., C.H. Kim, and E.C. Butcher, *Chemokines in the systemic organization of immunity*. Immunol Rev, 2003. **195**: p. 58-71.
256. Yu, D. and C.G. Vinuesa, *The elusive identity of T follicular helper cells*. Trends Immunol, 2010. **31**(10): p. 377-83.
257. Czerniecki, B.J., et al., *Targeting HER-2/neu in early breast cancer development using dendritic cells with staged interleukin-12 burst secretion*. Cancer Res, 2007. **67**(4): p. 1842-52.
258. Morita, R., et al., *Human blood CXCR5(+)/CD4(+) T cells are counterparts of T follicular cells and contain specific subsets that differentially support antibody secretion*. Immunity, 2011. **34**(1): p. 108-21.
259. Parra-Lopez, C.A., et al., *An unstable Th epitope of P. falciparum fosters central memory T cells and anti-CS antibody responses*. PLoS One, 2014. **9**(7): p. e100639.
260. Yu, J., et al., *Myeloid-derived suppressor cells suppress antitumor immune responses through IDO expression and correlate with lymph node metastasis in patients with breast cancer*. J Immunol, 2013. **190**(7): p. 3783-97.
261. Dong, J., et al., *CD33(+)/p-STAT1(+) double-positive cell as a prognostic factor for stage IIIa gastric cancer*. Med Oncol, 2013. **30**(1): p. 442.
262. Fu D, L.H.-W., Peng Q, Lin H, Li Y-Y, *Myeloid-derived suppressor cells highly expressing CD14+DR low/ in peripheral blood and tumor tissues of stomach carcinoma*. Chinese J Cancer Biol, 2011. **18**.
263. Mundy-Bosse, B.L., et al., *Distinct myeloid suppressor cell subsets correlate with plasma IL-6 and IL-10 and reduced interferon-alpha signaling in CD4(+) T cells from patients with GI malignancy*. Cancer Immunol Immunother, 2011. **60**(9): p. 1269-79.
264. Wang, L., et al., *Increased myeloid-derived suppressor cells in gastric cancer correlate with cancer stage and plasma S100A8/A9 proinflammatory proteins*. J Immunol, 2013. **190**(2): p. 794-804.
265. Xia, R., et al., *[The number of myeloid-derived suppressor cells in the peripheral blood and tumor tissues in patients with gastric cancer and its clinical significance]*. Xi Bao Yu Fen Zi Mian Yi Xue Za Zhi, 2014. **30**(7): p. 740-3.
266. Ye N, C.W., *Relationship between immunosuppressive cells Treg*. Chinese J Gasterol, 2015. **20**: p. 210-3.

267. Zhuang, Y., et al., *CD8(+) T cells that produce interleukin-17 regulate myeloid-derived suppressor cells and are associated with survival time of patients with gastric cancer*. *Gastroenterology*, 2012. **143**(4): p. 951-62 e8.
268. Kichler-Lakomy, C., et al., *Deficiencies in phenotype expression and function of dendritic cells from patients with early breast cancer*. *Eur J Med Res*, 2006. **11**(1): p. 7-12.
269. Pinzon-Charry, A., et al., *Spontaneous apoptosis of blood dendritic cells in patients with breast cancer*. *Breast Cancer Res*, 2006. **8**(1): p. R5.
270. Pirtskhalaishvili, G., et al., *Cytokine-mediated protection of human dendritic cells from prostate cancer-induced apoptosis is regulated by the Bcl-2 family of proteins*. *Br J Cancer*, 2000. **83**(4): p. 506-13.
271. Verronese, E., et al., *Immune cell dysfunctions in breast cancer patients detected through whole blood multi-parametric flow cytometry assay*. *Oncoimmunology*, 2016. **5**(3): p. e1100791.
272. Kroemer, G., et al., *Immunogenic cell death in cancer therapy*. *Annu Rev Immunol*, 2013. **31**: p. 51-72.
273. Murata, K., et al., *Identification of a novel human memory T-cell population with the characteristics of stem-like chemo-resistance*. *Oncoimmunology*, 2016. **5**(6): p. e1165376.
274. Park, J.Y., et al., *Doxorubicin enhances CD4(+) T-cell immune responses by inducing expression of CD40 ligand and 4-1BB*. *Int Immunopharmacol*, 2009. **9**(13-14): p. 1530-9.
275. Eralp, Y., et al., *Doxorubicin and paclitaxel enhance the antitumor efficacy of vaccines directed against HER 2/neu in a murine mammary carcinoma model*. *Breast Cancer Res*, 2004. **6**(4): p. R275-83.
276. Ramakrishnan, R., et al., *Chemotherapy enhances tumor cell susceptibility to CTL-mediated killing during cancer immunotherapy in mice*. *J Clin Invest*, 2010. **120**(4): p. 1111-24.
277. Newell, E.W., et al., *Combinatorial tetramer staining and mass cytometry analysis facilitate T-cell epitope mapping and characterization*. *Nat Biotechnol*, 2013. **31**(7): p. 623-9.
278. Amir el, A.D., et al., *viSNE enables visualization of high dimensional single-cell data and reveals phenotypic heterogeneity of leukemia*. *Nat Biotechnol*, 2013. **31**(6): p. 545-52.
279. Shekhar, K., et al., *Automatic Classification of Cellular Expression by Nonlinear Stochastic Embedding (ACCENSE)*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2014. **111**(1): p. 202-7.
280. Murphy, R.F., *Automated identification of subpopulations in flow cytometric list mode data using cluster analysis*. *Cytometry*, 1985. **6**(4): p. 302-9.
281. Kidd, B.A., et al., *Mapping the effects of drugs on the immune system*. *Nat Biotechnol*, 2016. **34**(1): p. 47-54.
282. Le Mercier, I., et al., *Tumor promotion by intratumoral plasmacytoid dendritic cells is reversed by TLR7 ligand treatment*. *Cancer Res*, 2013. **73**(15): p. 4629-40.
283. Wei, S., et al., *Plasmacytoid dendritic cells induce CD8+ regulatory T cells in human ovarian carcinoma*. *Cancer Res*, 2005. **65**(12): p. 5020-6.
284. Treilleux, I., et al., *Dendritic cell infiltration and prognosis of early stage breast cancer*. *Clin Cancer Res*, 2004. **10**(22): p. 7466-74.
285. de Heer, H.J., et al., *Essential role of lung plasmacytoid dendritic cells in preventing asthmatic reactions to harmless inhaled antigen*. *J Exp Med*, 2004. **200**(1): p. 89-98.
286. Fugier-Vivier, I.J., et al., *Plasmacytoid precursor dendritic cells facilitate allogeneic hematopoietic stem cell engraftment*. *J Exp Med*, 2005. **201**(3): p. 373-83.
287. Goubier, A., et al., *Plasmacytoid dendritic cells mediate oral tolerance*. *Immunity*, 2008. **29**(3): p. 464-75.
288. Gilliet, M. and Y.J. Liu, *Human plasmacytoid-derived dendritic cells and the induction of T-regulatory cells*. *Hum Immunol*, 2002. **63**(12): p. 1149-55.

289. Sisirak, V., et al., *Impaired IFN-alpha production by plasmacytoid dendritic cells favors regulatory T-cell expansion that may contribute to breast cancer progression*. *Cancer Res*, 2012. **72**(20): p. 5188-97.
290. Goutagny, N., et al., *Targeting pattern recognition receptors in cancer immunotherapy*. *Target Oncol*, 2012. **7**(1): p. 29-54.
291. Galon, J., et al., *Type, density, and location of immune cells within human colorectal tumors predict clinical outcome*. *Science*, 2006. **313**(5795): p. 1960-4.
292. Kirilovsky, A., et al., *Rational bases for the use of the Immunoscore in routine clinical settings as a prognostic and predictive biomarker in cancer patients*. *Int Immunol*, 2016. **28**(8): p. 373-82.
293. Mahmoud, S., et al., *CD8(+) T lymphocytes infiltrating breast cancer: A promising new prognostic marker?* *Oncoimmunology*, 2012. **1**(3): p. 364-365.
294. Oldford, S.A., et al., *Tumor cell expression of HLA-DM associates with a Th1 profile and predicts improved survival in breast carcinoma patients*. *Int Immunol*, 2006. **18**(11): p. 1591-602.
295. Yoon, N.K., et al., *Higher levels of GATA3 predict better survival in women with breast cancer*. *Hum Pathol*, 2010. **41**(12): p. 1794-801.
296. Mahmoud, S.M., et al., *Tumour-infiltrating macrophages and clinical outcome in breast cancer*. *J Clin Pathol*, 2012. **65**(2): p. 159-63.
297. Panse, J., et al., *Chemokine CXCL13 is overexpressed in the tumour tissue and in the peripheral blood of breast cancer patients*. *Br J Cancer*, 2008. **99**(6): p. 930-8.
298. Galluzzi, L., et al., *Cell death modalities: classification and pathophysiological implications*. *Cell Death Differ*, 2007. **14**(7): p. 1237-43.
299. Kroemer, G., et al., *Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2009*. *Cell Death Differ*, 2009. **16**(1): p. 3-11.
300. Levine, B. and V. Deretic, *Unveiling the roles of autophagy in innate and adaptive immunity*. *Nat Rev Immunol*, 2007. **7**(10): p. 767-77.
301. Festjens, N., T. Vanden Berghe, and P. Vandenabeele, *Necrosis, a well-orchestrated form of cell demise: signalling cascades, important mediators and concomitant immune response*. *Biochim Biophys Acta*, 2006. **1757**(9-10): p. 1371-87.
302. Golstein, P. and G. Kroemer, *Cell death by necrosis: towards a molecular definition*. *Trends Biochem Sci*, 2007. **32**(1): p. 37-43.
303. Hotchkiss, R.S., et al., *Cell death*. *N Engl J Med*, 2009. **361**(16): p. 1570-83.
304. Matzinger, P., *The danger model: a renewed sense of self*. *Science*, 2002. **296**(5566): p. 301-5.
305. Gebremeskel, S. and B. Johnston, *Concepts and mechanisms underlying chemotherapy induced immunogenic cell death: impact on clinical studies and considerations for combined therapies*. *Oncotarget*, 2015. **6**(39): p. 41600-19.
306. Vacchelli, E., et al., *Trial Watch: Chemotherapy with immunogenic cell death inducers*. *Oncoimmunology*, 2014. **3**(1): p. e27878.
307. Martins, I., et al., *Molecular mechanisms of ATP secretion during immunogenic cell death*. *Cell Death Differ*, 2014. **21**(1): p. 79-91.
308. Schwartz, H.S. and G.B. Grindey, *Adriamycin and daunorubicin: a comparison of antitumor activities and tissue uptake in mice following immunosuppression*. *Cancer Res*, 1973. **33**(8): p. 1837-44.
309. Obeid, M., et al., *Calreticulin exposure dictates the immunogenicity of cancer cell death*. *Nature Medicine*, 2006. **13**(1): p. 54-61.

310. Garg, A.D., et al., *Immunogenic cell death, DAMPs and anticancer therapeutics: an emerging amalgamation*. *Biochim Biophys Acta*, 2010. **1805**(1): p. 53-71.
311. Kepp, O., et al., *The immunogenicity of tumor cell death*. *Curr Opin Oncol*, 2009. **21**(1): p. 71-6.
312. Scaffidi, P., T. Misteli, and M.E. Bianchi, *Release of chromatin protein HMGB1 by necrotic cells triggers inflammation*. *Nature*, 2002. **418**(6894): p. 191-5.
313. Park, J.S., et al., *High mobility group box 1 protein interacts with multiple Toll-like receptors*. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2006. **290**(3): p. C917-24.
314. Bianchi, M.E. and A.A. Manfredi, *High-mobility group box 1 (HMGB1) protein at the crossroads between innate and adaptive immunity*. *Immunol Rev*, 2007. **220**: p. 35-46.
315. Apetoh, L., et al., *Toll-like receptor 4-dependent contribution of the immune system to anticancer chemotherapy and radiotherapy*. *Nat Med*, 2007. **13**(9): p. 1050-9.
316. Dong Xda, E., et al., *High mobility group box 1 (HMGB1) release from tumor cells after treatment: implications for development of targeted chemoimmunotherapy*. *J Immunother*, 2007. **30**(6): p. 596-606.
317. Ullrich, E., et al., *Dendritic cells and innate defense against tumor cells*. *Cytokine Growth Factor Rev*, 2008. **19**(1): p. 79-92.
318. Venereau, E., et al., *Mutually exclusive redox forms of HMGB1 promote cell recruitment or proinflammatory cytokine release*. *J Exp Med*, 2012. **209**(9): p. 1519-28.
319. Schaper, F., J. Westra, and M. Bijl, *Recent developments in the role of high-mobility group box 1 in systemic lupus erythematosus*. *Mol Med*, 2014. **20**: p. 72-9.
320. Bindea, G., et al., *Spatiotemporal dynamics of intratumoral immune cells reveal the immune landscape in human cancer*. *Immunity*, 2013. **39**(4): p. 782-95.
321. Ravelli, A., et al., *Tumor-infiltrating lymphocytes and breast cancer: Beyond the prognostic and predictive utility*. *Tumour Biol*, 2017. **39**(4): p. 1010428317695023.
322. Ahn, S.G., et al., *Current Issues and Clinical Evidence in Tumor-Infiltrating Lymphocytes in Breast Cancer*. *J Pathol Transl Med*, 2015. **49**(5): p. 355-63.
323. Mahmoud, S.M., et al., *Tumor-infiltrating CD8+ lymphocytes predict clinical outcome in breast cancer*. *J Clin Oncol*, 2011. **29**(15): p. 1949-55.
324. Ruffell, B., et al., *Leukocyte composition of human breast cancer*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2012. **109**(8): p. 2796-801.
325. Rathore, A.S., et al., *Is the tumor infiltrating natural killer cell (NK-TILs) count in infiltrating ductal carcinoma of breast prognostically significant?* *Asian Pac J Cancer Prev*, 2014. **15**(8): p. 3757-61.
326. Liu, S., et al., *Prognostic significance of FOXP3+ tumor-infiltrating lymphocytes in breast cancer depends on estrogen receptor and human epidermal growth factor receptor-2 expression status and concurrent cytotoxic T-cell infiltration*. *Breast Cancer Res*, 2014. **16**(5): p. 432.
327. Gobert, M., et al., *Regulatory T cells recruited through CCL22/CCR4 are selectively activated in lymphoid infiltrates surrounding primary breast tumors and lead to an adverse clinical outcome*. *Cancer Res*, 2009. **69**(5): p. 2000-9.
328. Faget, J., et al., *Early detection of tumor cells by innate immune cells leads to T(reg) recruitment through CCL22 production by tumor cells*. *Cancer Res*, 2011. **71**(19): p. 6143-52.
329. Senovilla, L., et al., *An immunosurveillance mechanism controls cancer cell ploidy*. *Science*, 2012. **337**(6102): p. 1678-84.
330. Miyashita, M., et al., *Prognostic significance of tumor-infiltrating CD8+ and FOXP3+ lymphocytes in residual tumors and alterations in these parameters after neoadjuvant*

- chemotherapy in triple-negative breast cancer: a retrospective multicenter study.* Breast Cancer Res, 2015. **17**: p. 124.
331. DeNardo, D.G., et al., *Leukocyte complexity predicts breast cancer survival and functionally regulates response to chemotherapy.* Cancer Discov, 2011. **1**(1): p. 54-67.
332. Demaria, S., et al., *Development of tumor-infiltrating lymphocytes in breast cancer after neoadjuvant paclitaxel chemotherapy.* Clin Cancer Res, 2001. **7**(10): p. 3025-30.
333. Denkert, C., et al., *Tumor-associated lymphocytes as an independent predictor of response to neoadjuvant chemotherapy in breast cancer.* J Clin Oncol, 2010. **28**(1): p. 105-13.
334. Disis, M.L., *Immune regulation of cancer.* J Clin Oncol, 2010. **28**(29): p. 4531-8.
335. Pages, F., et al., *Immune infiltration in human tumors: a prognostic factor that should not be ignored.* Oncogene, 2010. **29**(8): p. 1093-102.
336. Ali, H.R., et al., *Computational pathology of pre-treatment biopsies identifies lymphocyte density as a predictor of response to neoadjuvant chemotherapy in breast cancer.* Breast Cancer Res, 2016. **18**(1): p. 21.
337. Giesen, C., et al., *Highly multiplexed imaging of tumor tissues with subcellular resolution by mass cytometry.* Nat Methods, 2014. **11**(4): p. 417-22.
338. Jung, Y.Y., et al., *Histomorphological Factors Predicting the Response to Neoadjuvant Chemotherapy in Triple-Negative Breast Cancer.* J Breast Cancer, 2016. **19**(3): p. 261-267.
339. Yu, X., et al., *Prognostic and predictive value of tumor-infiltrating lymphocytes in breast cancer: a systematic review and meta-analysis.* Clin Transl Oncol, 2016. **18**(5): p. 497-506.
340. Miyashita, M., et al., *Tumor-infiltrating CD8+ and FOXP3+ lymphocytes in triple-negative breast cancer: its correlation with pathological complete response to neoadjuvant chemotherapy.* Breast Cancer Res Treat, 2014. **148**(3): p. 525-34.
341. Kepp, O., et al., *Consensus guidelines for the detection of immunogenic cell death.* Oncoimmunology, 2014. **3**(9): p. e955691.
342. Ghiringhelli, F., et al., *Metronomic cyclophosphamide regimen selectively depletes CD4+CD25+ regulatory T cells and restores T and NK effector functions in end stage cancer patients.* Cancer Immunol Immunother, 2007. **56**(5): p. 641-8.
343. Ma, Y., et al., *Anticancer chemotherapy-induced intratumoral recruitment and differentiation of antigen-presenting cells.* Immunity, 2013. **38**(4): p. 729-41.
344. Zhang, Z., et al., *Anthracyclines potentiate anti-tumor immunity: A new opportunity for chemoimmunotherapy.* Cancer Lett, 2015. **369**(2): p. 331-5.

ANEXOS

Anexo 1. Rendimiento de cultivos de DCs a partir de células adherentes y PBMCs totales

La siguiente tabla muestra el rendimiento de DCs maduras obtenidas en las diferentes fracciones de los cultivos *in vitro* tanto por el sistema de adherencia (enriquecimiento de monocitos adheridos al plástico) como en el sistema de inducción *in situ* en PBMCs totales. La recuperación de las DCs se establece en relación con las células cultivadas inicialmente como se detalla en la Figura 13.

Tabla 6. Tabla de rendimientos de obtención de DCs maduras a partir del cultivo de 9.9×10^6 PBMCs

#*	Sistema	Muestra	# células (10^6)	% Celular	% DCs (CD11c+)	% DCs CD83+ y CD80+
1	PBMCs	No Adherentes 2d-stDCs	4.4	44.77	16.7	78.9
1	PBMCs	No Adherentes 2d-aDCs	2.9	29.9	7.92	7.18
2	PBMCs	Adherentes 2d-stDCs	1	10.51	2.86	62.4
2	PBMCs	Adherentes 2d-aDCs	1.9	19.72	3.67	52.5
3	PBMCs	No Adherentes iDCs	2.4	24.4	4.47	3.67
4	Adherencia	Adherentes 2d-stDCs	1	10.67	5.81	82.9
4	Adherencia	Adherentes 2d-aDCs	0.8	8.16	1.48	56.5
5	Adherencia	Adherentes iDCs	0.8	8.4	3.76	2.51
6	Adherencia	No Adherentes	1.4	14.22	0.25	1.09

* Número corresponde con la condición de cultivo detallada en la Figura 13.

Anexo 2. Modelo *in vitro* para la evaluación del papel “helper” de Tfh en la producción de anticuerpos por LB

Trabajo dirigido por la Profesora *Carola Vinuesa*

Como pasantía durante el programa de Doctorado, visité al laboratorio JCSMR de la Universidad Nacional de Australia, el cual es uno de los laboratorios de investigación médica reconocidos a nivel mundial. En su historia investigadores del JCSMR han recibido tres premios Nobel en medicina. El desarrollo de esta pasantía hizo parte de los compromisos del proyecto TEBICA con el apoyo de la Fundación Salud de los Andes, la Universidad Nacional de Colombia y COLCIENCIAS.

El grupo de investigación dirigido por la Profesora Carola Vinuesa del JCSMR, se enfoca principalmente en el estudio de la respuesta inmune generada por anticuerpos y el papel de los linfocitos T foliculares ayudadores (Tfh), tanto en modelos animales con el uso de ratones transgénicos como en pacientes con enfermedades autoinmunes como lupus eritematoso, artritis y vasculitis. El grupo de investigación tiene gran experiencia en técnicas como citometría de flujo, inmuno-fluorescencia, biología molecular y genética. El trabajo de la pasantía se enfocó en el aprendizaje de conceptos relacionados con el trabajo del grupo, principalmente el papel de LT-CD4+ “helper” foliculares (células Tfh) en la biología y funciones de los Linfocitos B (LB).

ANTECEDENTES: Parte de mi trabajo durante la pasantía consistió en establecer un modelo que permitiese analizar factores que favorecen la diferenciación de células Tfh *in vitro* utilizando PBMCs como fuente de LT-CD4+ y LB vírgenes. Dentro de estos factores investigué la capacidad de células dendríticas Tipo I Alfa generadas en dos días (2d-aDCs) como APCs para promover la diferenciación *in vitro* de células Tfh a partir de LT-CD4+ vírgenes y la capacidad de estas células para inducir la diferenciación *in vitro* de LB vírgenes a LB de memoria productores de anticuerpos. En T1BT*, la secuencia T* actúa como una epítotope CD4 helper HLA-DR β 1*04:01 (DR4) favoreciendo la producción de anticuerpos contra la secuencia NANP en individuos DR4 [259]. **MÉTODOS:** Como antígenos modelo, utilizamos los constructos T1BT* y T1BT*-Y conformados por la secuencia T1 DPNANPNVDPNANPNV tres copias de la secuencia NANP reconocida por Linfocitos B $(NANP)_3$ seguidas de la secuencia T* EYLNKIQNSLSTEWSPCSVT. T1 y T* son epítotos “helper” reconocidos por LT-CD4+ y NANP: es una secuencia de la proteína CS de *Plasmodium falciparum* que

induce la producción de anticuerpos tipo IgG por los LB (NF54): T1BT*: DPNANPNVDPNANPNV(NANP)3EYLNKIQNSLSTEWSPCSVT y el constructo T1BT*-Y: DPNANPNVDPNANPNV(NANP)3EYLNKIQNSYSTEWSPCSVT que contiene sustitución de un solo amino-ácido (resaltado en negrilla y subrayado). LT-CD4+ vírgenes (CD4+ CXCR5- CD45RO- y CD62L+) de una voluntaria sana DR4 fueron estimulados *in vitro* en cultivo POR dos semanas con 2d-aDCs que habían sido previamente pulsadas con los péptido T1BT* o con el péptido T1BT*-Y por dos días durante el proceso de maduración. Al cabo de las dos semanas el cultivo se re-estimuló con 2d-aDCs pulsadas con antígeno Y se adicionaron LB vírgenes (IgD+CD27-) autólogos al cultivo. Luego de cuatro días de re-estímulo se cosecharon las células y se marcaron con dos paneles de anticuerpos, el primero para analizar el fenotipo de células Tfh: (ICOS-PE; CXCR5-PerCP, PD1-QD605, CD45RO-PECy7, CD4-APC-Cy7 y CD3-AF700) y el segundo para analizar el fenotipo de LB y el reconocimiento de la secuencia NANP por estos linfocitos: (CD27-PerCP, IgG-AF700, IgD-FITC, CD19-PE-Cy7 y un nonúmero de NANP-fluoromarcado con APC y PE). **RESULTADOS Y CONCLUSION:** Los resultados sugieren que 2d-aDCs tienen la capacidad de inducir la diferenciación de LT-CD4+ vírgenes a Tfh a partir de PBMCs de una donante sana DR4 no inmune a malaria y que las condiciones *in vitro* establecidas permiten la generación de Linfocitos B de memoria específicos para la epítotope B (NANP) de la proteína CS de *Plasmodium falciparum* en esta persona.

Evaluación de TFH de centro germinal

Inicialmente se estandarizó el panel de anticuerpos para la detección de Tfh (CD4+ CXCR5+ PD1+) por CF, con una muestra de células obtenidas de amígdalas humanas, donde se encuentran en una alta proporción (ver Figura suplementaria 1). Las Tfh de amígdala se caracterizan por una alta expresión de PD1 a diferencia de las Tfh circulantes donde el nivel de expresión de PD1 en LT-CD4+ CXCR5+ es bajo.

Una vez establecido el fenotipo adecuado para el análisis de Tfh, se decidió evaluar la posibilidad de detectar y amplificar Tfh circulantes en sangre periférica en un modelo *in vitro*. Inicialmente para el desarrollo de este modelo se emplearon 2d-aDCs derivadas de monocitos (CD14+) purificados por sorting (Figura suplementaria 2), estas células se cultivaron con IL-4 y GM-CSF por 24 horas en presencia de los péptidos T1BT* o T1BT*-Y (10µg/mL). Posterior a la incubación se indujo la maduración de las DCs con el coctel de citoquinas pro-inflamatorias (Tabla 2).

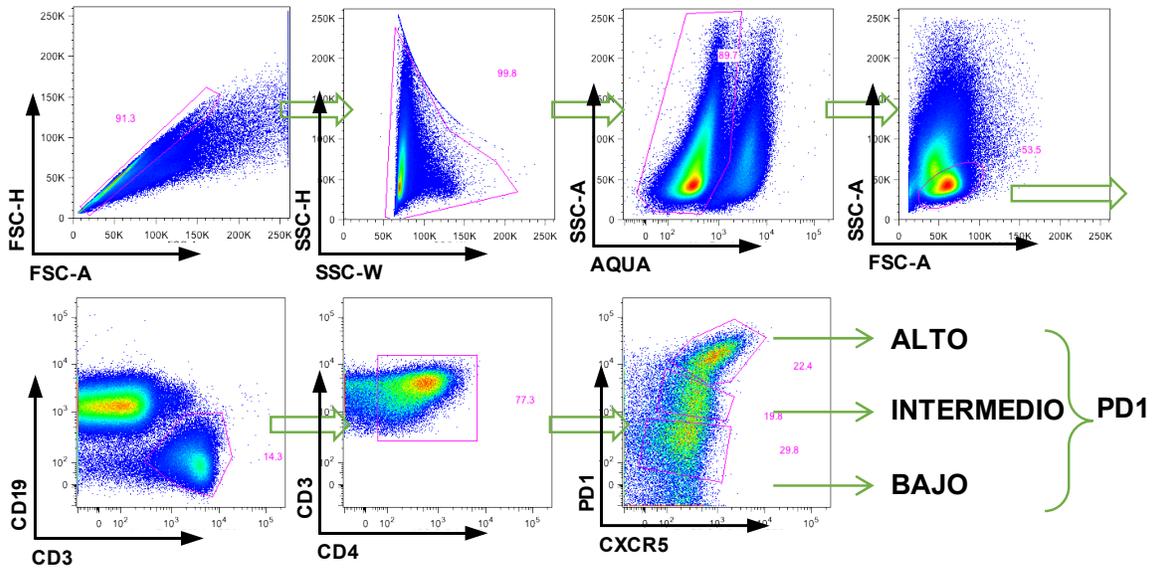


Figura suplementaria 1. Evaluación de Tfh por citometría de flujo en muestra de amígdala humana. Esquema del proceso de análisis manual para la identificación de Tfh en una muestra de amígdala humana (muestra obtenida en el Canberra Hospital). Se identificaron las tres sub-poblaciones de TL CD4+ PD1negativo, bajo (+) y (++).

Las DCs maduras se co-cultivaron con LT-CD4 vírgenes CXCR5- autólogas obtenidas por sorting a partir de PBMCs de la donante sana por un periodo de 14 días. En la Figura suplementaria 3 se muestra la estrategia y la pureza del proceso de separación por sorting de Linfocitos T CD4+ vírgenes CXCR5-.

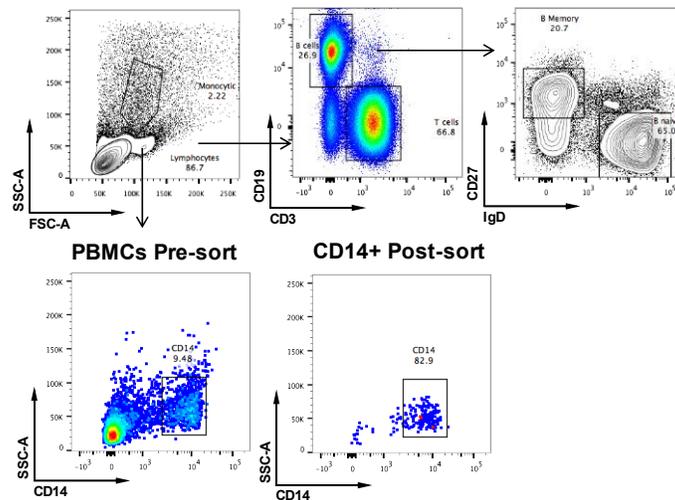


Figura suplementaria 2. Análisis de poblaciones de memoria de LT y LB en PBMCs de donante sano y sorting de Monocitos CD14. Determinación de poblaciones requeridas para proceso de sorting celular, CD14 para derivación de 2d-ADCs, LB vírgenes (CD19+ IgD+ CD27-) y CD4+ vírgenes (ver más adelante).

A las dos semanas de cultivo se realiza un nuevo estímulo por 4 días con 2d-aDCs pulsadas con el péptido correspondiente con la adición de Linfocitos B vírgenes (CD27- IgD+) para evaluar la capacidad de inducción a LB de memoria que expresaran IgG. Posterior a 4 días se evaluó nuevamente el porcentaje de expresión de TFH activados (expresión de ICOS y CD45RO) y la diferenciación de LB de memoria que reconocen la epítotope repetida de NANP fluoromarcada con PE y APC (Nonúmero dado por Ian Cockburn - Ver Figura suplementaria 4).

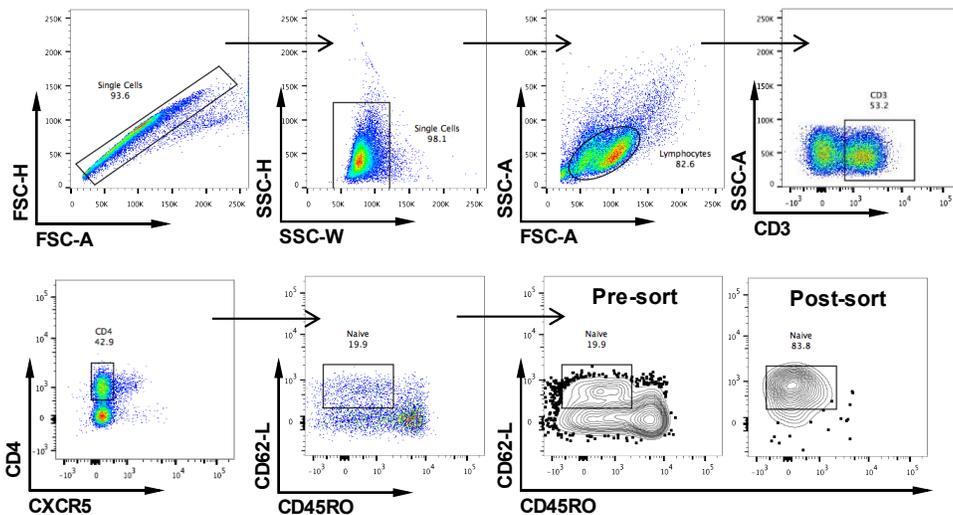


Figura suplementaria 3. Esquema de purificación de LT-CD4+ Naive CXCR5- Esquema de análisis para purificar LT CD4 vírgenes (CD62-L+ CD45RO- CXCR5-), a partir células únicas (FSC-H vs FSC-A y SSC-H y SSC-W), en región linfoide (SSC-A vs FSC-A), posteriormente se selecciona LT (CD3+), finalmente en LT CD4+ CXCR5- se selecciona la población virgen (CD62-L+ CD45RO-).

En un trabajo preliminar Parra-López y cols. demostraron que se podía amplificar LT-CD4 específicos contra una epítotope helper de la proteína CS de *P. falciparum* [259] de un repertorio virgen de una donante sana que nunca ha estado expuesta a la malaria. Como conclusión, estos resultados preliminares muestran la capacidad de evaluar en sangre periférica Tfh activados (Figura suplementaria 4A y B) a partir de la diferenciación de LT vírgenes (CD45RA+ CXCR5-) favorecido por la presencia de aDCs y la estimulación con el péptido T1BT*-Y mostrando una detección de LB que reconocen la secuencia NANP (Figura suplementaria 4C). Estos resultados se correlacionan con los hallazgos descritos por Parra-López y cols., donde demuestran que esta epítotope fue eficiente para producir anticuerpos en tiempos cortos en un modelo murino transgénico para DR4.

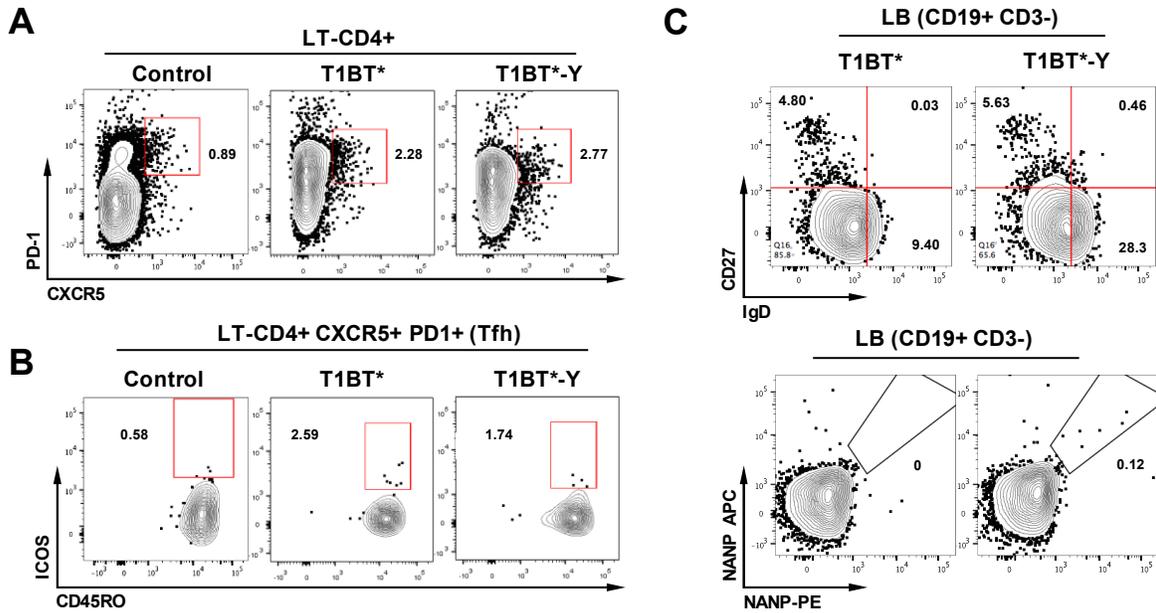


Figura suplementaria 4. Expansión de Tfh (CXCR5/PD1) y diferenciación de LB específicos de NANP. Posterior a 12 días de estimulación *in vitro* con 2d-aDCs, los LT vírgenes purificados se analizaron para definir el fenotipo de Tfh con PD1 y CXCR5 en los cultivos control (sin estímulo) o con los péptidos T1BT* y T1BT*-Y (A). Se determina el nivel de activación de Tfh mediante la cuantificación de ICOS en células de memoria (CD45RO+) (B). Determinación del fenotipo de LB (C) (gráficas superiores) y el grado de reconocimiento de LB a epítipo repetida de NANP fluoromarcada con APC y PE (gráficas inferiores) en relación a los cultivos estimulados con las epítipo helper T1BT* y T1BT*-Y.

Anexo 3. Evaluación de linfocitos T foliculares (Tfh) en sangre periférica de pacientes con cáncer de mama

A continuación, se describe el proceso para caracterizar Linfocitos T foliculares (Tfh) en células de sangre periférica. Inicialmente se evaluó PBMCs de un donante sano el fenotipo de Tfh sin ningún tipo de estimulación mediante la cuantificación de la expresión de los marcadores CXCR5 y PD-1 en LT-CD4+. A partir de esta población de Tfh, se determinó las proporciones de diferentes sub-poblaciones de Tfh basados en la expresión de CXCR3 y CCR6, que permite describir una población Tfh1, Tfh2 y Tfh17 [114]. El panel de anticuerpos fluoromarcados empleados en este experimento está descrito en la sección de Análisis de la expansión de sub-poblaciones de linfocitos T foliculares (Tfh) presentes en sangre periférica del **Capítulo 1**.

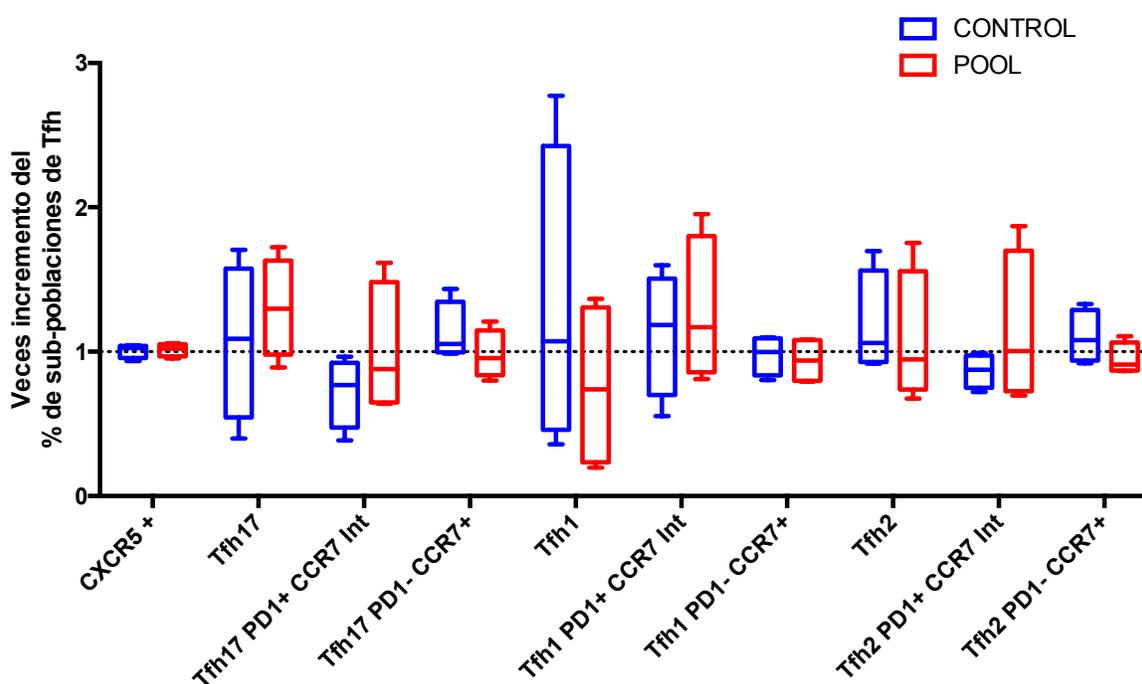


Figura suplementaria 5. Expansión de Tfh en pacientes con cáncer de mama posterior a la quimioterapia con A/C. Veces de incremento de la expansión de las diferentes sub-poblaciones de Tfh en pacientes posterior a la quimioterapia con A/C en relación con la frecuencia de cada sub-población en las muestras previo a la quimioterapia (n=4). Las muestras fueron estimuladas con 2d-aDCs pulsadas con la combinación de péptidos de Her2/neu 15-aa (rojo, pool) o con 2d-aDCs sin pulsar (azul, control). Gráfica de caja y bigotes. No se observaron diferencias significativas entre las muestras estimuladas y no estimuladas. Prueba de Mann-Whitney.

Anexo 4. Lista de péptidos y tetrámeros empleados

Para la detección de LT-CD8+ específicos de antígenos, se requiere que el donante exprese el alelo HLA-A*02:01. Como se muestra en la Figura suplementaria 6A, se analiza por citometría de flujo la expresión de la molécula HLA-A2 mediante el uso de un anticuerpo fluoromarcado. Adicionalmente, se establece el ruido de la marcación con tetrámeros en donantes sanas (1 a 3) empleando dos estreptavidinas acopladas a PE y APC para seis epítopes A2 (dos antígenos virales y 4 de TAAs). Como se observa en la Figura suplementaria 6B y C, la marcación con tetrámero acoplado a APC genera un alto ruido de fondo, lo cual restringe su uso en los paneles de anticuerpos necesarios.

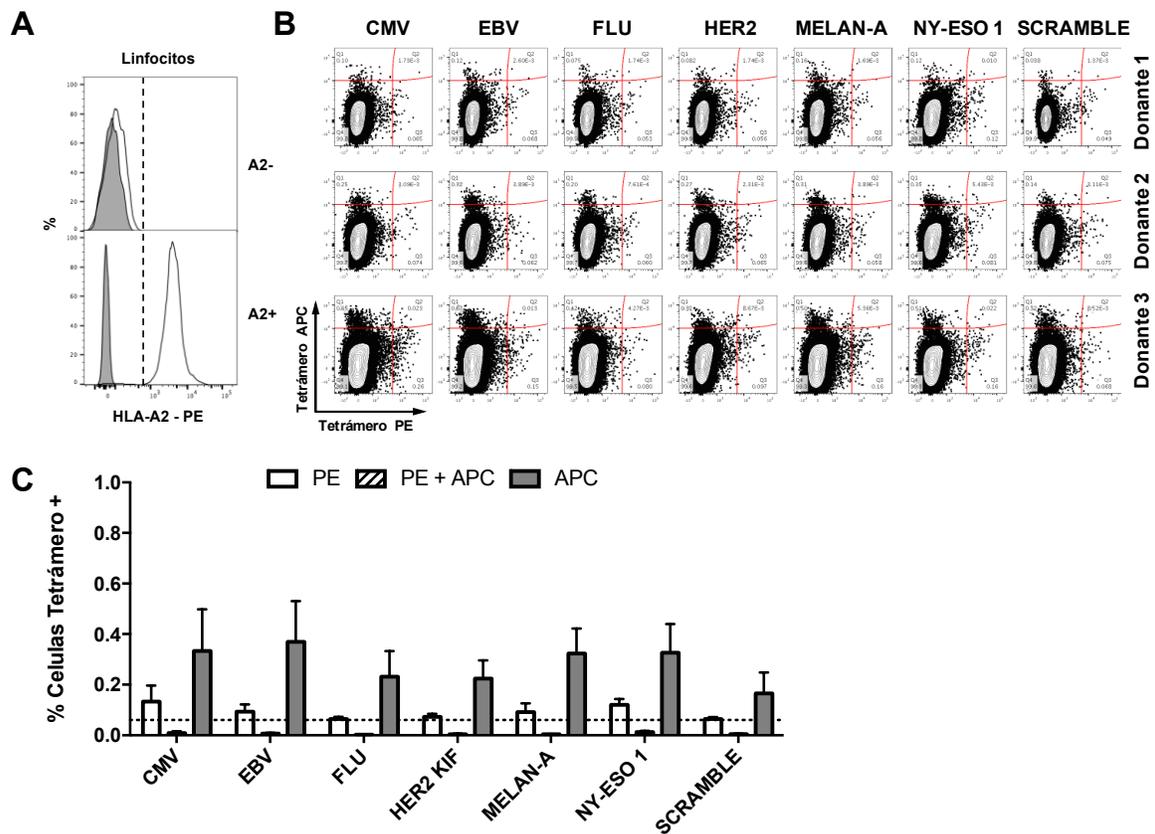


Figura suplementaria 6. Evaluación y cuantificación ex vivo de células tetrámero positivas específicas para antígenos tumorales y virales en mujeres sanas HLA-A*02:01+. (A) Histogramas de expresión de HLA-A*2 (anticuerpo B7.1) en la región linfóide en un donante negativo (arriba) y un donante positivo (abajo) comparando muestra no marcada (histograma gris) vs muestra marcada con anticuerpo B7.1 (histograma blanco). (B) Gráfica de contornos de la expresión de LT-CD8+ específicos para seis tetrámeros, tres virales (CMV, EBV y FLU) y tres tumorales (HER2, MELAN-A y NY-ESO1) comparación de tetrámero scramble (control) marcados con dos estreptavidinas diferentes PE (eje X) y APC (eje Y). (C) Porcentajes de las tres muestras de donantes sanas A2+ para cada uno de los seis tetrámeros y el control para PE (barras blancas), doble positivas PE y APC (barras con rayas) y APC sola (barras grises). Gráfica de barras con SEM.

A continuación, se describen las secuencias de los péptidos restringidos a HLA-A*02:01 y los péptidos de 15 a 18 aa Clase II empleados.

Tabla 7. Péptidos restringidos HLA-A*02:01

PEPTIDO	SECUENCIA	AA
HER2 689	RLLQETELV	689-697
HER2 369	KIFGSLAFL	369-377
HER2 435	ILHNGAYSL	435-443
NY-ESO1	SLLMWITQC	157-165
MELAN-A E _L A	ELAGIGILTV	26-35
Telomerasa	ILAKFLHWL	540-548
CMV	NLVPMVATV	495-504
FLU	GILGFVFTL	58-66
EBV BMLF1	GLCTLVAML	280-288

Tabla 8. Secuencia de péptidos de HER2 restringidos a HLA clase II

Péptido	Longitud (aa)	Secuencia*
HER-2/neu 42-56	15	HLDMLRHL YQGCQVV
HER-2/neu 98-114	17	RLRIVRGTQLFEDNYAL
HER-2/neu 328-345	18	TQRCEKCSKPCARVCYGL
HER-2/neu 776-790	15	GVGSPYVSRLLGICL
HER-2/neu 927-941	15	PAREIPDLLEKGERL
HER-2/neu 1166-1180	15	TLERPKTLS PGKNGV

* Secuencia tomada de [257]

La secuencia de la proteína completa de NY-ESO1 se obtiene de la búsqueda de la base de datos Uniprot y se obtiene la secuencia completa en formato FASTA para los 180 aminoácidos: <http://www.uniprot.org/uniprot/P78358>.

Tabla 9. NY-ESO-1

#	PEPTIDOS LARGOS	LONGITUD	POSICIÓN
1	STGDADGPGGGPIPDGPGGNAGGPGEAGATGGRGPRGAGAARA	43	11 a 53
2	EAGATGGRGPRGAGAARASGPGGGAPRGPHGGAASGLNG	39	36 a 74
3	RCGARGPESRLLEFY LAMPFATPMEAE LARRSLAQDAP	38	77 a 114
4	PLPVPGLLKEFTVSGNILTIRLTAADHRQLQLSI	35	115 a 149
5	ADHRQLQLS ISSCLQLSLLMWITQCFLPVFLAQPPSGQRR	41	140 a 180

Tabla 10. Péptidos de Mycobacterium tuberculosis presentes en la prueba de QuantiFERON TB Gold

Proteína	Aminoácidos	Longitud	Secuencia
ESAT-6	6-28	23	WNFAGIEAAASAIQGNVTSIHSL
ESAT-6	67-79	13	NALQNLARTISEA
CFP-10	18-31	14	FERISGDLKTQIDQ
CFP-10	43-68	28	GQWRGAAGTAAQA AVVRFQEAANKQKQE
CFP-10	53-68	16	AAVVRFQEAANKQKQE
CFP-10	74-86	13	TNIRQAGVQYSRA
TB7.7 P4	38-55	18	AWRTAAVELARALVRAVA

Anexo 5. Caracterización de V β por citometría de flujo y por secuenciación del CDR3

La cuantificación de las 24 familias de V β en LT-CD4+ y CD8+ se estandarizó en donantes sanos HLA-A*02:01+ y se determinó la frecuencia de cada familia en la población CD4+, CD8+ y LT-CD8+ tetrámero positivas para el antígeno viral de CMV (Figura suplementaria 7).

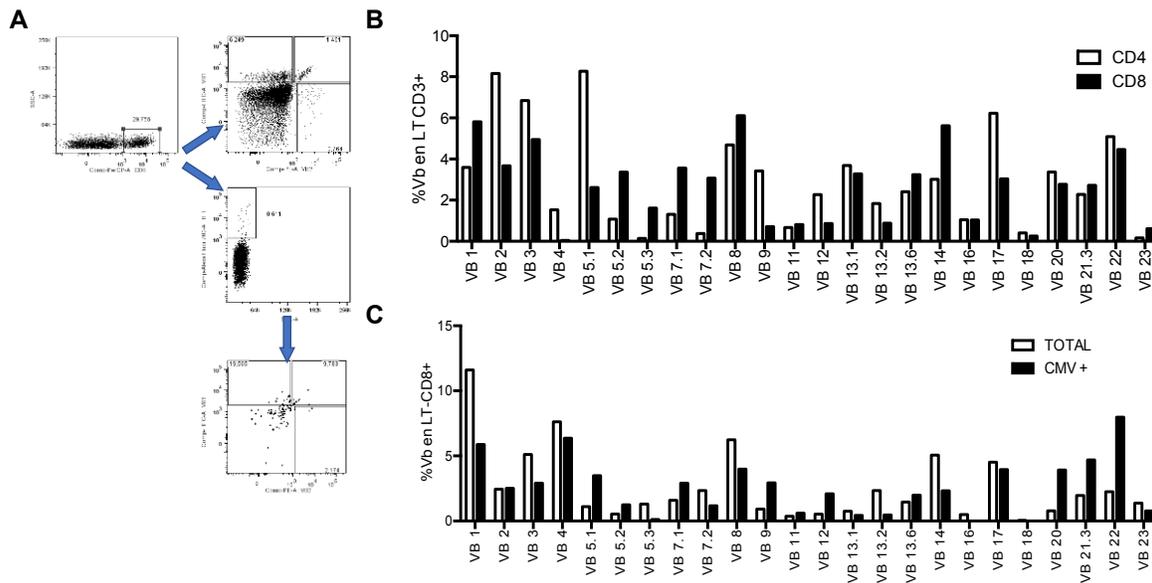


Figura suplementaria 7. Cuantificación del porcentaje de familias V β en LT CD4, CD8 y específicas de antígeno. (A) Esquema de análisis de citometría de flujo para la cuantificación de las 24 familias de V β en LT de donantes sanos. **(B)** Determinación de la frecuencia de las 24 familias en LT-CD4 y LT-CD8+ de un donante sano. **(C)** Determinación de la frecuencia de las 24 familias en LT-CD8+ (total) y LT-CD8+ específicas de antígeno para CMV (CMV+) mediante la marcación con tetrámero.

Posteriormente, en la paciente MCC-002 se caracterizó *ex vivo* la frecuencia de las 24 familias de V β en las muestras tomadas previo y posterior a la terapia antitumoral, cuantificando en LT-CD8+ y específicas de antígeno Her2/neu (LT-CD8+ tetrámero+) como se muestra en la Figura suplementaria 8.

Vial coctel anticuerpos familias Vβ

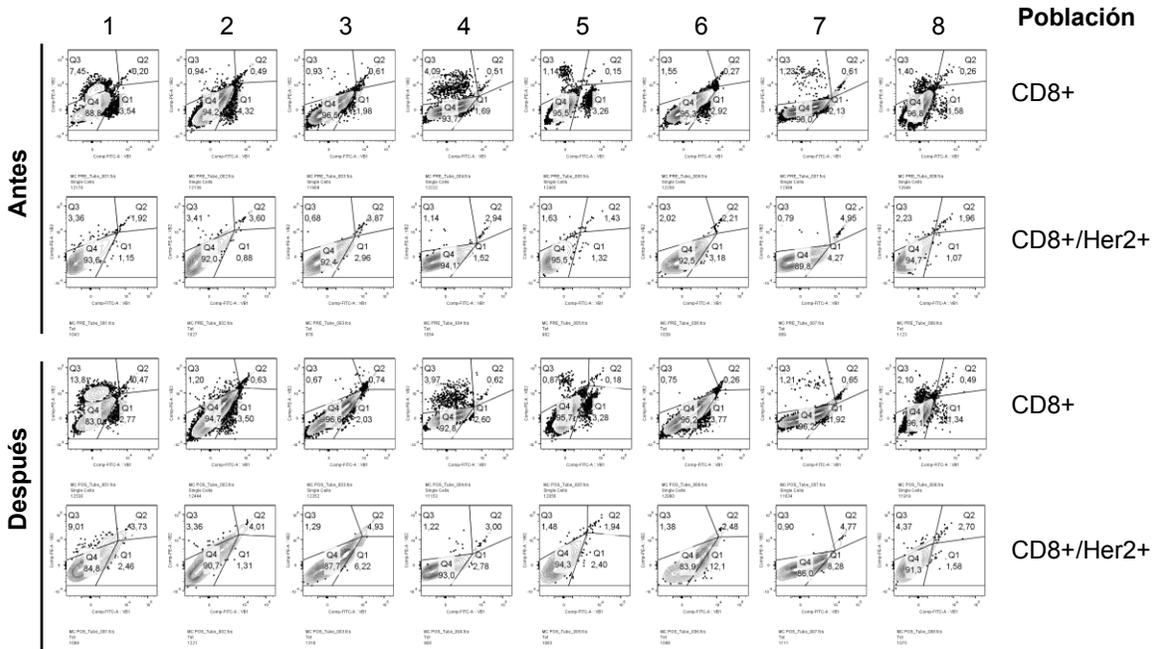


Figura suplementaria 8. Caracterización ex vivo por CF de las familias de Vβ en LT-CD8+ y HER2/neu+ en la paciente MCC-002. Evaluación de las 24 familias de Vβ (tres familias por tubo en 8 tubos) en muestras de PBMCs totales obtenidas antes (graficas superiores) y después (graficas inferiores) en LT-CD8+ y en Her2/neu+ (secuencia KIFGSLAFL).

Los resultados de la cuantificación de las 24 familias Vβ en PBMCs pre y pos-tratamiento se resumen en la Tabla 11.

Tabla 11. Familias de Vβ en PBMCs

Familia	LT-CD8+		LT-CD8+ Tetrámero+	
	Pre-	Post-	Pre-	Post-
Vβ 5.3	8,23	13,9	15,2	10,9
Vβ 7.1	0,02	0,1	1,17	8,7
Vβ 3	3,69	2,43	0	3,26
Vβ 9	0,23	0,27	1,22	3,03
Vβ 17	0	0	4,88	4,04
Vβ 16	2,76	0,36	0	0
Vβ 18	0,09	0,079	0	0
Vβ 5.1	0,02	0,14	2,11	10,1
Vβ 20	0,42	0,28	2,11	4,35
Vβ 13.1	3,66	3,4	0	7,46
Vβ 13.6	0,078	0,021	1,32	1,49
Vβ 8	2,93	0,032	5,26	2,99

VB 5.2	0,94	0,66	1,75	4,6
VB 2	0	0,02	0	0
VB 12	3,35	2,27	0	0
VB 23	0,048	0,098	2,74	1,41
VB 1	0,00967	0	5,48	4,23
VB 21.3	1,39	0,02	0	1,41
VB 11	0,76	0,43	3,12	1,39
VB 22	0,019	0	3,12	2,78
VB 14	0,57	0,34	0	0
VB 13.2	1,11	1,36	1,12	1,12
VB 4	0,057	0,079	5,06	12,4
VB 7.2	0,93	0,72	0	1,12

Finalmente, en la Tabla 12 se resume la frecuencia de los TCRVB obtenido a partir de la secuenciación del CDR3 de la muestra de tejido tumoral de la paciente MCC-002.

Tabla 12. Frecuencia de familias de VB en tejido tumoral de la paciente MCC-002

count	frequency	Count (%)	cdr3Length	vMaxResolved	vFamilyName
427	32,67023718		53	TCRBV16-01	TCRBV16
289	22,1117062		45	TCRBV04-02*01	TCRBV04
133	10,17597552		53	TCRBV06-04	TCRBV06
128	9,79342005		45	TCRBV05-04*01	TCRBV05
97	7,42157613		48	TCRBV07-06*01	TCRBV07
80	6,12088753		42	TCRBV29-01*01	TCRBV29
79	6,04437643		51	TCRBV07-09	TCRBV07
62	4,74368783		39	TCRBV20	TCRBV20
7	0,53557766		2	TCRBV19-01	TCRBV19
3	0,22953328		50	TCRBV05-01*01	TCRBV05
2	0,15302219		42	TCRBV29-01*01	TCRBV29

Anexo 6. Caracterización fenotípica de LT-CD8+ específicos de TAAs A2

En pacientes HLA-A*02:01 se evaluó la expresión de LT-CD8+ específicos de TAAs y la distribución de las sub-poblaciones de LT vírgenes, de memoria y efectoras de las células totales y específicas. En la Figura suplementaria 9, se muestran las gráficas de distribución de las poblaciones en LT-CD8+, la expresión de tetrámero y la distribución de las sub-poblaciones en las células tetrámero positivas en una paciente tomadas previo a la quimioterapia estimulada con 2d-aDCs, 2d-stDCs pulsadas con el péptido de Her2/neu (369) y sin estimular.

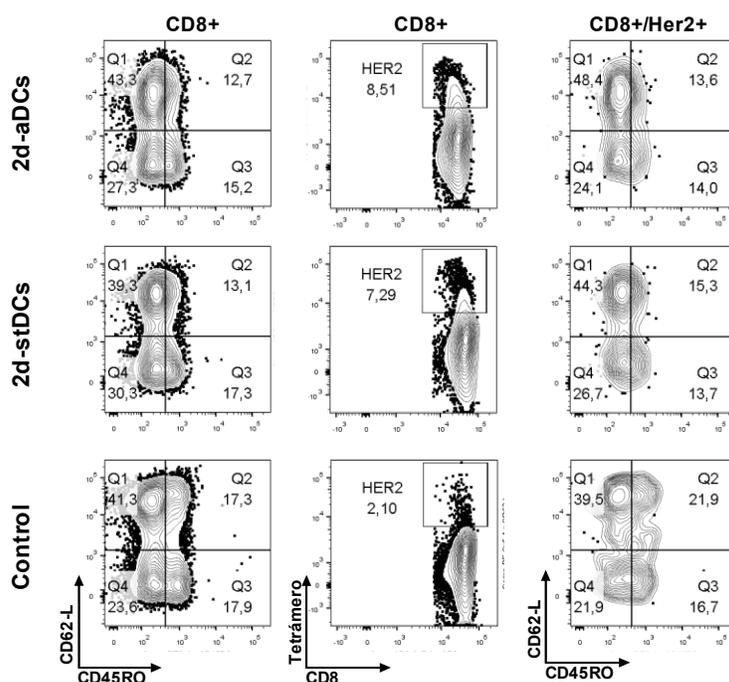


Figura suplementaria 9. Expresión y caracterización de LT-CD8+ específicos de Her2/neu₃₆₉. Gráfica de contornos de PBMCs obtenidos de una paciente previo a la quimioterapia con A/C estimulados con 2d-aDCs o con 2d-stDCs pulsadas con el péptido Her2/neu₃₆₉ durante 6 días. Posterior a la estimulación se caracterizó las sub-poblaciones de LT-CD8 y la expansión de células tetrámero positivas en respuesta al estímulo. En la columna de la izquierda se muestra la distribución de las cuatro sub-poblaciones de LT (vírgenes CD62-L+, CD45RO-, memoria central CD62-L+, CD45RO+, efectoras de memoria CD62-L-, CD45RO+, y efectoras terminales CD62-L-, CD45RO-) en LT-CD8+, en la columna central se muestra la marcación con tetrámero para Her2/neu en LT-CD8+ y en la columna de la derecha la distribución de las sub-poblaciones de LT al igual que en la columna de la izquierda, en LT específicos de Her2/neu.

Posteriormente se caracterizó de igual forma las sub-poblaciones de LT en respuesta a dos antígenos tumorales (Her2/neu y NY-ESO1) en dos pacientes (OMB y AVD) antes y posterior al tratamiento con A/C.

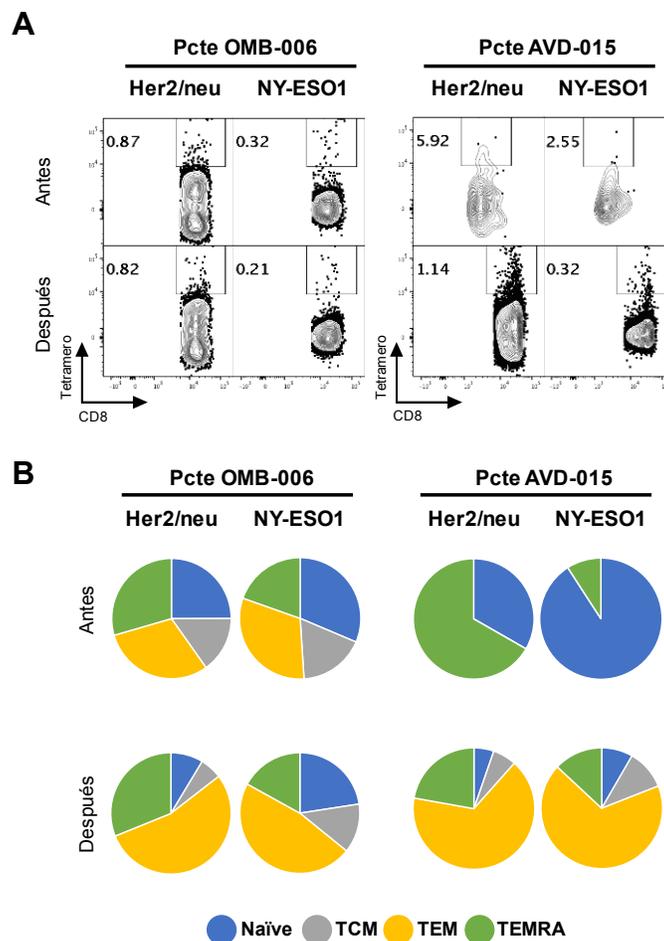


Figura suplementaria 10. Evaluación de poblaciones de memoria y expresión de LT-CD8+ específicos de HER2 en dos pacientes antes y después de la quimioterapia con A/C. Gráfica de contornos de PBMCs obtenidos de dos pacientes (OMB y AVD) previo y posterior a la quimioterapia con A/C estimulados con 2d-aDCs pulsadas con el péptido Her2/neu₃₆₉ o con el péptido NY-ESO1 durante 6 días (A). Se caracterizó las subpoblaciones de LT-CD8+ en cada grupo de análisis (Her2/neu, NY-ESO1) para la distribución de las cuatro subpoblaciones de LT (vírgenes CD62-L+, CD45RO-, memoria central CD62-L+, CD45RO+, efectoras de memoria CD62-L-, CD45RO+, y efectoras terminales - TEMRA CD62-L-, CD45RO-) en LT-CD8+ (B).

Para analizar en detalle el comportamiento de las sub-poblaciones de LT (vírgenes y de memoria) de células específicas para antígenos de Her2/neu y NY-ESO1, en una paciente HLA-A2 se compararon los dos sistemas de cultivo propuestos en el **Capítulo 1** (Figura 3), adicionalmente se comparó la estimulación con los dos tipos de DCs (2d-aDCs y 2d-stDCs).

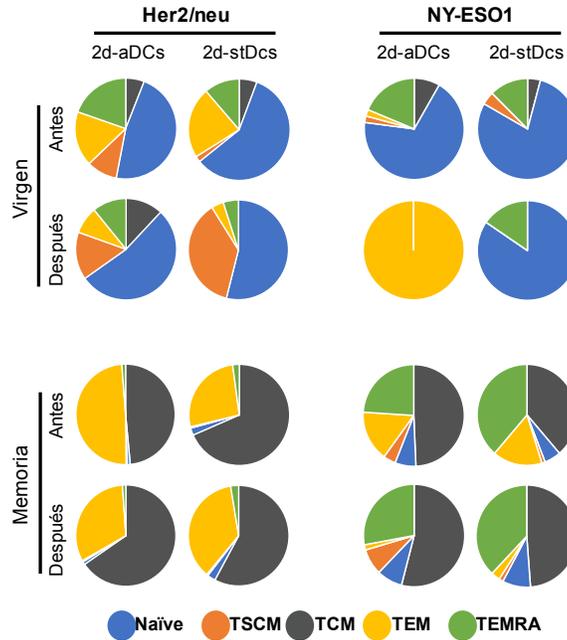


Figura suplementaria 11. Distribución de sub-poblaciones de LT-CD8+ específicos de TAAs A2 estimuladas con 2d-aDCs y con 2d-stDCs. Distribución de cinco sub-poblaciones de LT-CD8+ específicos para los antígenos tumorales Her2/neu y NY-ESO1 en una paciente HLA-A2+ (BNC-003). Las muestras se obtuvieron antes y después de tres ciclos de quimioterapia con A/C empleando los sistemas de cultivo a partir de células vírgenes [59] (gráficas superiores) y en el compartimiento de células de memoria en PBMCs totales [58] (gráficas inferiores). La caracterización de las cinco sub-poblaciones se realizó como se muestra en la Figura 15A.

La cuantificación de la expresión de dos receptores inhibitorios (CTLA-4 y BTLA) en células específicas de tres epítopes HLA-A*02:01 de Her2/neu (Ver Tabla 7), se evaluó en una paciente antes y posterior a la quimioterapia con A/C con el fin de comparar la expresión de dichos marcadores en las células *ex vivo* y posterior al cultivo por 6 días con 2d-aDCs pulsadas con los péptidos correspondientes (Figura suplementaria 12).

Finalmente, se evaluó en tres pacientes la expresión de LT-CD8+ específicos de TAAs (mezcla de las tres epítopes) antes y posterior a la quimioterapia primaria con A/C en comparación con la respuesta a antígenos virales (CMV, EBV y FLU) (Figura suplementaria 13), adicionalmente, en estas poblaciones de LT-CD8+ específicas de antígenos, se evaluó la expresión de tres receptores inhibitorios (PD1, CTLA-4 y BTLA) (Figura suplementaria 14).

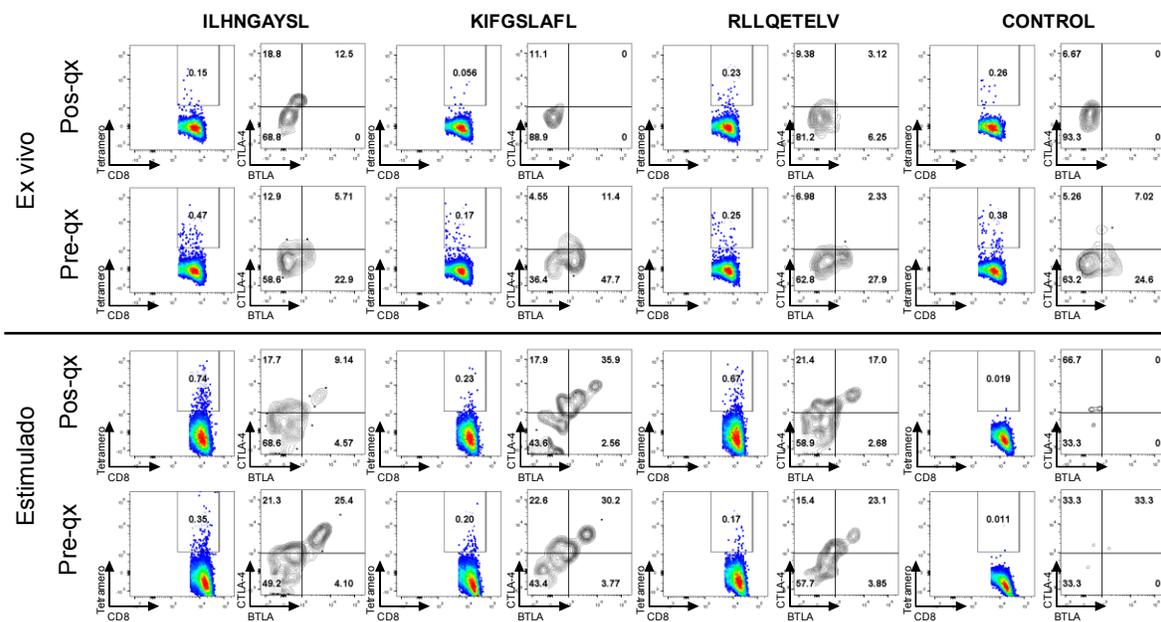


Figura suplementaria 12. Expresión de receptores inhibitorios en una paciente (ALC) HLA-A2+ ex vivo y en respuesta a estímulo in vitro con péptidos individuales de HER2/neu. Gráficas de dispersión de puntos y de contornos de la expresión de LT-CD8+ específicos de TAA para tres epítopes de Her2/neu (ILHNGAYSL, KIFGSLAFL Y RLLQETELV) en una paciente antes y posterior de la quimioterapia con A/C, en muestras ex vivo (gráficas superiores) y posterior al estímulo in vitro con 2d-aDCs pulsadas con los respectivos péptidos por 6 días. En las células tetrámero positivas se caracterizó la expresión de los marcadores CTLA-4 y BTLA.

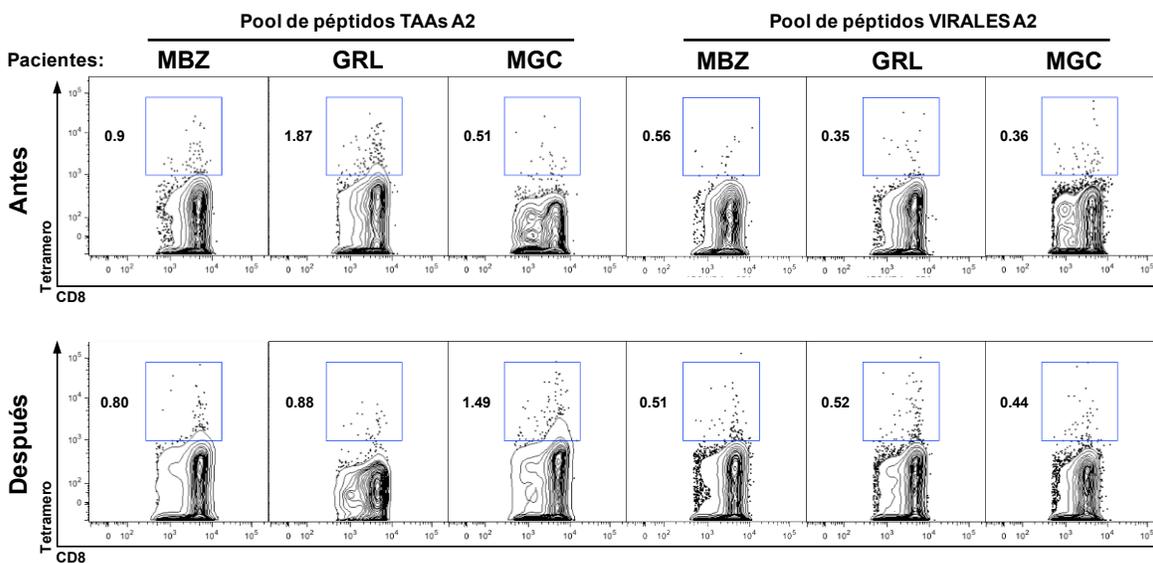


Figura suplementaria 13. Expansión pos-quimioterapia de LT-CD8 específicos de TAA a comparación de LT-CD8+ específicos de antígenos virales posterior a la estimulación in vitro con 2d-aDCs. Gráficas de contornos del análisis de la expansión de LT-CD8 específicos para la mezcla de péptidos de Her2/neu o la mezcla de péptidos de antígenos virales (CMV, EBV y FLU) en tres pacientes HLA-A*02:01 previo y posterior a la quimioterapia con A/C a partir de PBMCs estimuladas in vitro con 2d-aDCs pulsadas con las mezclas de los péptidos correspondientes.

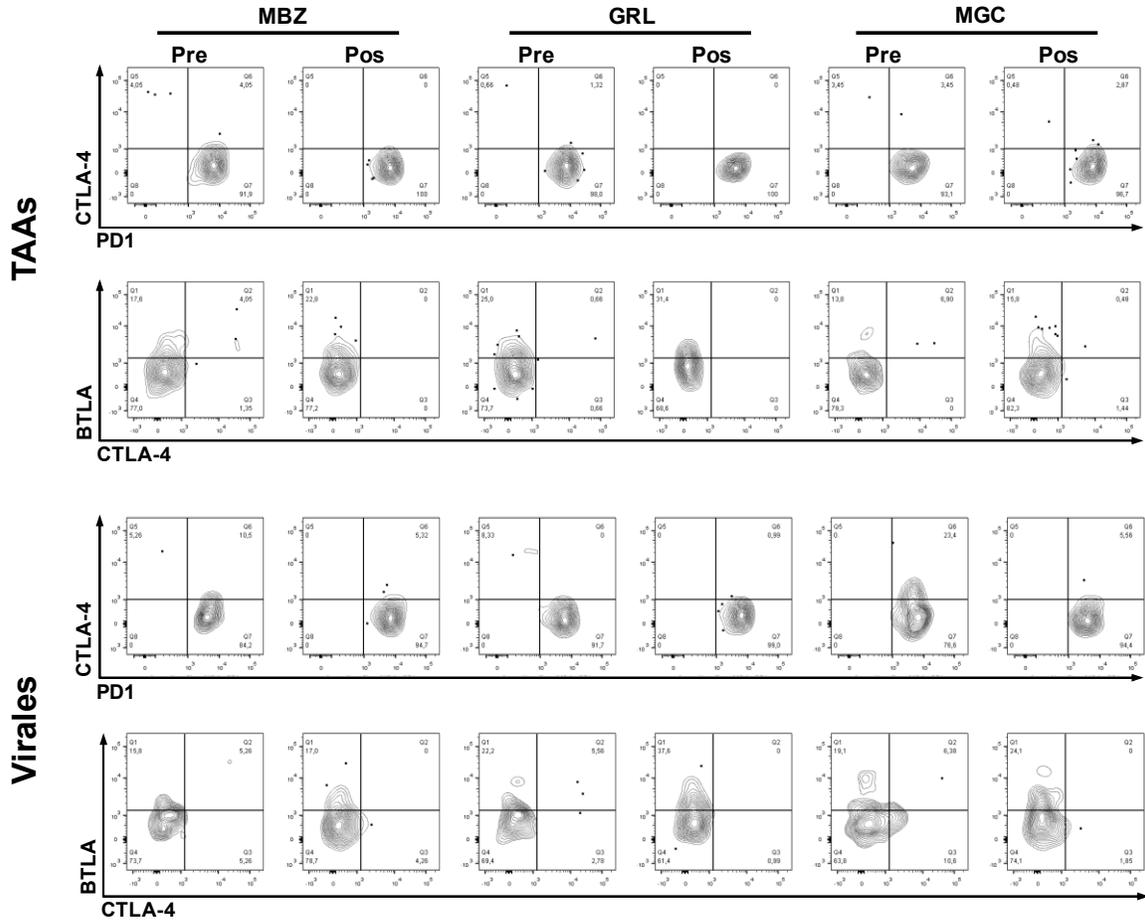


Figura suplementaria 14. Expresión de receptores inhibitorios en LT-CD8+ específicos para antígenos tumorales y virales. Gráficos de contornos de la expresión de PD1, CTLA-4 y BTLA en LT-CD8+ específicos de TAAs (mezcla de tres péptidos de Her2/neu) y virales (CMV, EBV y FLU) en muestras de tres pacientes (MBZ, GRL y MGC) antes y posterior a la quimioterapia primaria con A/C.

Anexo 7. Análisis multidimensionales

Código procesamiento PCA en SPSS

```

FACTOR
/VARIABLES Porc_int_CD3 MFI_CD25 MFI_CD69 MFI_CD3 Vol_tumor Monoc_CD83
Mieloid_CD83 CD25n_CD69p CD25p_CD69p CD25n_CD69n Inmaduras Mieloides
/MISSING MEANSUB
/ANALYSIS Porc_int_CD3 MFI_CD25 MFI_CD69 MFI_CD3 Vol_tumor Monoc_CD83
Mieloid_CD83 CD25n_CD69p CD25p_CD69p CD25n_CD69n Inmaduras Mieloides
/PRINT UNIVARIATE INITIAL CORRELATION DET KMO EXTRACTION ROTATION
FSCORE
/FORMAT SORT
/PLOT EIGEN ROTATION
/CRITERIA FACTORS(2) ITERATE(25)
/EXTRACTION PC
/CRITERIA ITERATE(25)
/ROTATION VARIMAX
/METHOD=CORRELATION.
    
```

Tabla de centroides por FLOCK

Tabla 13. Resultados del análisis FLOCK de 10 donantes sanas, MFI de centroides para cada agrupación y la frecuencia (%) de eventos por agrupación.

Control						Estimulado					
ID	CD3	CD25	CD69	CD154	%	ID	CD3	CD25	CD69	CD154	%
1	929	180	705	1641	2.25	1	806	345	949	1676	2.88
2	3232	92	53	61	7.16	2	2603	1207	2004	1998	5.93
3	296	878	933	1589	1.4	3	1142	235	959	164	1.63
4	3093	363	855	142	3.65	4	1664	542	1688	1920	3.3
5	140	734	781	341	2.07	5	211	931	2310	424	1.51
6	267	965	2131	452	1.13	6	1752	1511	1976	1785	6.1
7	1139	941	585	1620	2.04	7	710	1560	1883	1803	2.75
8	1522	544	1455	1816	1.79	8	184	786	949	418	2.4
9	1309	1398	1278	1871	1.52	9	1359	932	828	327	2.47
10	2751	179	2040	80	3.86	10	1827	1581	2612	469	3.14
11	1629	1672	2181	326	1.53	11	1431	2107	1652	2040	5.96
12	2586	1056	1939	1925	4.07	12	1145	1740	1775	272	2
13	1021	1115	650	174	1.76	13	2161	1618	1739	248	3
14	1014	254	714	144	1.89	14	2059	2006	2294	2249	5.23
15	2163	987	2626	138	1.69	15	1149	1270	1003	1772	3.14
16	2444	202	376	125	4.16	16	2483	1940	2350	503	3.86
17	2544	906	355	137	5.27	17	2595	162	2343	107	1.91
18	1566	775	1260	384	2.27	18	2651	1137	2411	419	3.95
19	2588	971	1904	59	2.53	19	2582	247	2171	1981	3.63
20	2601	284	815	1561	4.95	20	1563	825	1931	327	2.4
21	2479	952	388	1618	8.11	21	2587	1722	3040	1510	4.36
22	2660	248	1931	1818	3.89	22	2299	1816	1255	1807	4.38
23	3066	802	1713	570	11.24	23	2668	844	1561	408	2.84
24	2445	1820	2308	100	2.55	24	2725	1358	580	218	1.56
25	2938	1543	798	1525	6.26	25	2558	1724	3119	195	4.14
26	2962	1508	800	144	4.78	26	3018	18	1021	7	6.35
27	2707	190	152	1535	6.18	27	3062	23	234	9	6.42
						28	2423	540	548	1623	2.75

Anexo 8. Caracterización del microambiente tumoral asociado a la quimioterapia con A/C

Resumen

El análisis de la contextura celular de los tumores es útil para determinar el pronóstico de algunos tipos de cáncer como los de colon y recto. La implementación del análisis del infiltrado tumoral por inmunohistoquímica (IHQ) demanda optimizar la tinción de muestras de tejido embebidas en parafina con anticuerpos específicos para distintos marcadores con el fin de racionalizar el consumo de anticuerpos y optimizar la uniformidad de la marcación de las células. Con este trabajo se persigue la evaluación por IHQ de 80 muestras de tejido tumoral de las 17 pacientes con cáncer de mama del estudio en las que se determinaría en las muestras de tejido pos-quimioterapia el patrón de expresión de marcadores de muerte celular inmunogénica (HMGB-1 y Calreticulina (CRT)) y grado de infiltración del tumor por células (CD45+, CD4+, CD8+ y CXCL13+). Para cuantificar el grado de expresión de dichos marcadores en el infiltrado se utilizó un mecanismo de digitalización de las preparaciones de IHQ y el uso de un software de análisis de imágenes. Las muestras fueron organizadas en tres arreglos de tejidos y teñidas con todos los marcadores luego de que el patrón de tinción de cada marcador fuera estandarizado utilizando como control positivo preparaciones de tejido sugeridas por la casa comercial productora del anticuerpo como control positivo de expresión de cada marcador. Debido al alto volumen de material digital para analizar (cerca de \approx 600 fotografías por lámina y por paciente), en este anexo se presenta solamente el resultado del análisis de la tinción de las muestras de dos experimentos piloto: el primero con dos pacientes pos-quimioterapia una paciente con respuesta patológica completa del tumor fue comparada con otra en el que el tumor no se redujo luego del tratamiento; entre estas dos pacientes, no fue posible detectar diferencias significativas entre los niveles de expresión de los marcadores, analizados (HMGB1 y CRT, CD45, CD4, CD8 y CXCL13) entre preparaciones ni correlación de ningún marcador con la respuesta clínica del tumor a la quimioterapia. En el segundo experimento piloto, se comparó el patrón de tinción de muestras pre- y pos-quimioterapia de dos pacientes de cáncer de mama, en quienes luego del tratamiento se evidenció un patrón característico de tinción de la proteína HMGB1 en el citoplasma de las células y no en el núcleo.

Introducción

El estudio *in situ* del ambiente tumoral es de gran valor para determinar el pronóstico de tumores como el cáncer colorrectal en el que ha sido posible establecer la importancia de algunos marcadores inmunológicos en el tejido tumoral para predecir la sobrevida y tiempo libre de metástasis. El mayor progreso en este tipo de estudios se ha alcanzado en tumores de colon y recto con la implementación del “immunoscore” el cual permite discriminar de manera más precisa que la clasificación TNM la sobrevida libre de enfermedad de los pacientes. Este sistema cuantifica el grado de infiltración tumoral con linfocitos T de memoria y efectores que infiltran el tumor y que expresan los marcadores CD3, CD8 y CD45RO [291]. Este sistema está en proceso de validación en múltiples centros con el fin de determinar su valor predictivo en el tratamiento de tumores con diferentes modalidades de terapia antitumoral, incluida la inmuno-terapia con anticuerpos contra receptores inhibitorios [292]. En el caso del cáncer de mama, se ha podido establecer ciertos marcadores inmunológicos de buen pronóstico: (i) El incremento de CD8 y CD45RO, [293], (ii) proporción entre el infiltrado de Linfocitos T CD8 con la expresión de FoxP3 [215], (iii) perfil Th1 [294] y Th2 [295] en TILs y (iv) la reducción del grado de infiltración de FoxP3 [142] y de macrófagos CD68+[296].

Recientemente el grupo de Zitvogel y cols., en un esfuerzo por identificar en el tumor marcadores asociados a la inducción de Muerte celular Inmunogénica y respuesta tumoral al tratamiento con antraciclinas publicó un estudio en el que se evidencia en una serie de 140 pacientes una asociación entre expresión incrementada en el tejido tumoral de HMGB-1 y LC3B (un marcador característico del proceso de autofagia), con una mejor tasa de sobrevida y tiempo libre de metástasis luego quimioterapia neo-adyuvante [23]. De otra parte, en tejido tumoral - asociados a la respuesta clínica al tratamiento con antraciclinas de tumores de pacientes con cáncer de mama – recientemente fue descrito un metagene asociado a CXCL13 (ligando del receptor de quemoquina CXCR5) [164]. En contraste con esos resultados in incremento en la expresión de CXCL13 tanto en suero como en tejido tumoral ha sido asociado a enfermedad metastásica [297].

Racional

El estudio del infiltrado y del microambiente tumoral brinda la oportunidad del estudio directo de la interacción de las células tumorales con distintos tipos de células incluidas las células del sistema inmune encargadas de la inmuno-vigilancia del tumor. Toda paciente con cáncer de mama tiene una biopsia de diagnóstico (pre-quimioterapia) y la mayoría de ellas

luego de quimioterapia neo-adyuvante con A/C son llevadas a cirugía para resección del tumor, lo que favorece el acceso a tejido tumoral pos-quimioterapia. La descripción de algunos marcadores inmunológicos como posibles bio-marcadores pronósticos por una parte, y por la otra, la expresión de marcadores de muerte celular inmunogénica como HMGB1 y LCB3 en tumores de cáncer de mama asociados de manera independiente a una buena respuesta clínica del tumor a la quimioterapia neo-adyuvante, nos ha llevado a considerar que en el trabajo que estamos realizando es necesario evaluar si es posible registrar asociación de marcadores de muerte celular inmunogénica expresados *in situ* con la infiltración del tumor por células responsables de la inmuno-vigilancia del tumor como LT-CD8, LT-CD4 y leucocitos CD45+ que expresen CXCL13, una quemoquina importante para la infiltración de tumores de cáncer de mama por linfocitos T helper foliculares (Tfh) CXCR5+, que es un predictor de sobrevida en pacientes con cáncer de mama [128]. Obtenida esta información quizás resulte muy útil cotejar estos hallazgos con los resultados acerca del inmuno-monitoreo en sangre de leucocitos cuyos resultados se presentaron en los **Capítulos 2 y 3**.

Marco teórico

Muerte celular inmunogénica

La clasificación clásica de la muerte celular se basa en apoptosis (muerte celular programada) y necrosis (muerte celular no programada) [298, 299]. Sin embargo, se han descrito nuevos mecanismos de muerte celular como la autofagia (consumo de organelos propios como fuente de energía para mantenimiento de la función celular) [300]. Esta última categoría de muerte celular también entraría en el grupo de muerte celular programada, sin embargo estudios recientes han mostrado como la necrosis en ciertos aspectos también tiene mecanismos controlados o programados [301, 302]. Existen también descripciones de formas alternas de muerte celular: (i) *Catástrofe mitótica*: dada por una mitosis no satisfactoria en un punto de chequeo, ésta se caracteriza por un contenido genómico anormal como multinucleación, su mecanismo molecular no está claro pero comparte elementos de apoptosis y de necrosis; (ii) *Piroptosis*: asociado a una muerte celular programada pero con efectos pro-inflamatorios, principalmente mediada por caspasa 1; (iii) *Paraptosis*: descrita principalmente en enfermedades neurodegenerativas con vacuolización pero sin condensación del núcleo; (iv) *Entosis*: observado en células epiteliales, donde hay un proceso de internalización de una célula dentro de otra no

mediado por fagocitosis; (v) *Anoikis*: donde se activa un proceso apoptótico dado el desprendimiento de la célula de la matriz extracelular [303] y (vi) *Necroptosis*: descrito como un proceso de necrosis controlado, principalmente por RIP1 [299]. Una de los tipos de muerte celular recientemente descrita y que ha tomado importancia en el estudio del cáncer es la muerte celular inmunogénica (MCI) [272, 304-306], la cual se caracteriza por la liberación de patrones moleculares asociados a peligro (del inglés DAMPS – danger associated molecular patterns); DAMPS como HMGB-1[177], CRT[30] y ATP[307] se caracterizan por ser capaces de estimular receptores específicos TLRs, CD91 y P2XR7 (respectivamente), en células presentadoras de antígeno lo que conlleva a un incremento en la maduración de células dendríticas, y activación de linfocitos T citotóxicos.

Inmunogenicidad inducida por apoptosis pro-inflamatoria

Las células reaccionan a agentes citotóxicos con alteraciones en la diferenciación celular, detención de la proliferación y muerte celular. La muerte por apoptosis de células tumorales ha sido demostrada en la presencia de la terapia con antraciclinas [31, 168, 169]. En ensayos realizados *in vivo* con Doxorubicina ha sido posible demostrar que su eficiente actividad tumoricida cursa con condiciones indemnes de la respuesta inmune del hospedero [308]. Sorprendentemente, a pesar de la infiltración del fármaco en células sanas, incluidas las células del sistema inmune, en algunos casos se ha demostrado que, lejos de ser tóxicas para ellas estos fármacos potencian su acción antitumoral [172].

Estudios recientes en modelos de cáncer en animales, demuestran claramente que el tratamiento con Doxorubicina de células tumorales, incrementa su inmunogenicidad al punto que cuando células de tumor (como cáncer de colon) son tratadas *in vitro* con Doxorubicina y posteriormente utilizadas como vacuna confieren inmunidad contra el tumor en los ratones vacunados a expensas de linfocitos T CD8+ [31, 168-170].

Existen varios mecanismos propuestos como responsables de la inmunogenicidad de los tumores inducida por la quimioterapia. La generación de una muerte celular inmunogénica, acompañada de la expresión de proteínas de choque térmico (HSP) en la superficie de las células tumorales muertas ha sido analizada en estos casos [29]. Lo anterior estimula la activación de una respuesta inmune adaptativa antitumoral, que a su vez ayuda a erradicar las células de cáncer residual (consideradas células madres tumorales). Entre los agentes que se han identificado que producen una muerte celular de tales características se encuentran las antraciclinas (Doxorubicina, daunorubicina o idarrubicina), los taxanos (docixatel y Taxol), Imanitib, Bortezumib y la irradiación gamma [29].

Una de las características que se asocian a este tipo de muerte, es la translocación a la superficie de la célula de Calreticulina una proteína normalmente confinada a nivel del retículo endoplásmico y que representa un evento que aparece mucho antes de que se sucedan cambios típicos de la apoptosis.

Calreticulina

La calreticulina (CRT) es una de las primeras moléculas descritas en el proceso de MCI. Esta proteína soluble actúa como chaperona en el retículo endoplásmico y que está asociada con la modulación y homeostasis del calcio (Ca^{2+}) e involucrada en la presentación de péptidos en el MHC y la fosfatidilserina como señal de inversión de la cara interna de la membrana plasmática hacia el medio extracelular. Estas actúan como una señal "cómeme" para las DCs, facilitando que las células tumorales sean fagocitadas, y aumentando así el procesamiento y presentación de antígenos tumorales a los CTLs [180, 182, 183]. En experimentos con células de cáncer de colon murino (CT26) y fibrosarcoma (MCA205) tratadas con antraciclinas o radiación ionizante se encontró una traslocación del 5-10% del contenido de CRT desde el retículo endoplásmico hacia la superficie celular en etapas tempranas del proceso, incluso antes de la exposición de la fosfatidilserina [309]. La traslocación de CRT estuvo acompañada de la expresión de ERp57 formando un complejo protéico en la superficie como indicador de estrés del retículo endoplásmico; este proceso de traslocación no ocurrió en la muerte celular no inmunogénica [184, 185]. Al parecer la expresión de este tipo de señales no es suficiente para generar una muerte celular inmunogénica; se necesita simultáneamente la activación de toda una cascada de señales que inducen una muerte celular programada con la activación de algunas caspasas (principalmente caspasa-1) que genera inflamación [180, 183].

HMGB-1

Además de lo anterior se ha observado que se requieren de otras señales como la liberación del núcleo de núcleo-proteínas de la célula apoptótica como la proteína HMGB-1 (*High Mobility Group Box 1*) la cual una vez liberada se fija al TLR-4 lo cual induce la maduración de las DCs [29]. La complejidad del proceso de activación de DCs por células tumorales es sugerida por evidencia experimental a favor de que células tumorales deficientes en CRT tratadas con Doxorubicina no tienen la capacidad de inducir maduración de DCs a pesar de la adición de CRT y HMGB-1 recombinantes de forma exógena [186].

La HMGB-1 es una nucleoproteína que tiene una función chaperona, permanece unida a las histonas durante la apoptosis favoreciendo la formación de segmentos de DNA con un

tamaño definido (observable en un corrido electroforético del DNA). Durante la necrosis o la apoptosis inflamatoria, la HMGB-1 es liberada del núcleo hacia el citoplasma [28, 310, 311]. La HMGB-1 permanece en el núcleo de la célula y actúa como factor de transcripción [312], pero cuando es liberada al medio extracelular ejerce su acción sobre receptores de DCs (TLR-2 y TLR-4) [312-315]. Su acción sobre DCs se ha relacionado con la inducción de una respuesta inflamatoria similar a la desencadenada por el lipopolisacárido (LPS), la cual se caracteriza por la traslocación del factor NF- κ B, induciendo la maduración de DCs [177, 313]. De estos receptores, el TLR-4 es el más relevante en la respuesta a la quimioterapia dado que facilita la presentación cruzada de antígenos vía MHC clase I [177].

La muerte celular inmunogénica inducida por antraciclinas favorece la liberación de HMGB-1, la cual puede ser detectada en el sobrenadante de los cultivos de células tumorales tratadas con este grupo de agentes quimioterapéuticos. En relación con esto, se encontró que la falta de liberación de HMGB-1 por parte de células tumorales tratadas con quimioterapia, inhibe la capacidad de éstas últimas para inducir la maduración de DCs [316, 317]. Por último, pacientes con cáncer de seno en quimioterapia que portan el alelo TLR-4^{Asp299Gly} el cual es disfuncional para la unión de HMGB-1 a este receptor, tienen una probabilidad 17 veces mayor de desarrollar metástasis comparados con aquellos que exhiben una copia normal del alelo de TLR-4 [315]. Además de lo anterior, la capacidad de inducir tolerancia o de inducir inmunidad por esta proteína ha sido analizado a nivel molecular con el estudio del estado de oxidorreducción de HMGB-1 en especial de una cisteína puede ser altamente diferencial en la capacidad de activación del receptor TLR-4 [318]. Estos conceptos acerca de mecanismos moleculares como ejerce su función HMGB-1 están siendo evaluados como posibles biomarcadores no solo en cáncer sino en enfermedades autoinmunes como el lupus [319].

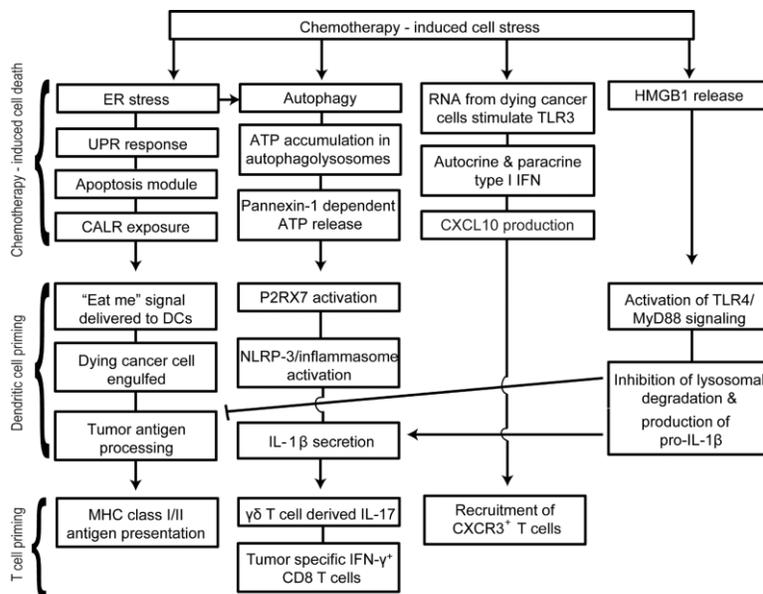


Figura suplementaria 15. Esquema representativo de la inducción de muerte celular inmunogénica por la quimioterapia. Tomado de [305]

Caracterización del Infiltrado tumoral en pacientes con cáncer de mama

La composición de los TILs en pacientes con cáncer de diferentes tumores como el cáncer colorrectal ha sido ampliamente estudiado, y ha permitido proponer nuevos sistemas de clasificación de los tumores como el “*immunoscore*” probablemente con mayor capacidad pronóstica que el TNM [291, 320], en el caso de cáncer de mama una alta frecuencia de TILs se asocia con un buen pronóstico, sin embargo, las características de la composición del infiltrado tumoral todavía se desconoce. La mayoría de las células infiltrantes en cáncer de mama son LT (75%) con un fenotipo de CTLs [321]. Entre ellas, los LT CD8+ se correlacionan con resultados clínicos favorables [322]. Incluso la presencia de LT CD8+ se asocia con tasas de supervivencia más prolongadas[323]. En menor proporción las células NK también infiltran el tumor, alrededor del 5% de TILs son NK [324], se ha observado que una disminución en la proporción de NK en tumores se asocia con una respuesta clínica desfavorable [325]. Por otra parte, los LT-CD4+, con fenotipo Th-1 y Tfh, también representan un buen factor pronóstico en la supervivencia de las pacientes [128]. En relación a las células supresoras, el papel de Tregs (incremento de Tregs en proporción a LT-CD8+) en general se asocia con una mala respuesta clínica [142, 326], mientras esto soporta el concepto de inmuno-vigilancia dado por la presencia de CTLs en el microambiente tumoral la capacidad de este microambiente de generar supresión sobre el sistema inmune favorecida la infiltración por Tregs está acorde al concepto de inmunoeedición. El papel de

los LB CD19+ infiltrantes de tumor ha sido menos evaluado como factor pronóstico y/o predictivo. Su presencia dentro de las lesiones de cáncer de mama está alrededor del 20% del total de TILs y se ha asociado con un pronóstico más favorable debido a la capacidad de estos linfocitos para diferenciarse en células productoras de gran-enzima B mediada por la estimulación por IL-21 [321, 324].

Efecto de la quimioterapia neo-adyuvante en el microambiente tumoral

Desde la perspectiva inmunológica, la detección de una masa tumoral en una paciente con cáncer de mama significa que después de que el tumor ha estado durante un tiempo en equilibrio con el sistema inmune del paciente, el tumor ha logrado escapar de la inmunovigilancia de células T y células efectoras que hacia ese momento exhiben un fenotipo tolerante. Los estudios de los elementos celulares y su distribución dentro del estroma tumoral muestran un microambiente tumoral que se caracteriza por un elevado número de (i) LT supresores CD4+ (FoxP3+) (Tregs); (ii) macrófagos o células granulocíticas poco diferenciadas (Lin-1-, HLA-DR- CD33+, CD11b+) conocidas como células supresoras de origen mieloide (MDSCs); (iii) DC tolerogénicas que expresan PD-L2; baja expresión de CD83, CD80 y CD86 (requerida para co-estimulación de LT) y producción deficiente de IL-12 (una citoquina clave para la actividad antitumoral de CTL y células NK).

La frecuencia de Tregs infiltrantes observadas en las biopsias de pacientes con cáncer de mama predice el destino a largo plazo de las pacientes que reciben quimioterapia neo-adyuvante (NAC, por sus siglas en inglés Neo-Adjuvant Chemotherapy). Antes del tratamiento las Tregs son activados por DCs LAMP+ en estrecha proximidad a LT-CD3+ y CD8+ dentro del infiltrado linfóide en la zona marginal, pero no en el lecho tumoral. Esta distribución predice la recaída de la enfermedad [327]. Células FoxP3+ se reclutan a las lesiones neoplásicas por un diálogo entre NK y las células tumorales que conduce a la secreción de IFN- γ por NKs e IL-1 β además de la liberación de TNF- α por monocitos que impulsan la producción de CCL22/CCR4 por células tumorales necesarias para el reclutamiento de Tregs [328]. En particular, cambios en la relación intra-tumoral de la proporción entre CD8+/Tregs durante el NAC revelan resultados a favor de la recuperación de la vigilancia inducida por la quimioterapia antitumoral; la elevación en células CD8+ después de un único ciclo de NAC con antraciclina predice la respuesta patológica completa, posterior a completar el régimen quimioterapéutico [215, 329]. Más recientemente, varios grupos han demostrado la importancia de la proporción de TILs/Tregs

en la predicción de las respuestas al tratamiento NAC de cáncer de mama agresivo [330]. DeNardo y sus colegas demostraron que la infiltración de las lesiones primarias de pacientes con cáncer de mama por las células que muestran un perfil de CD68Low (macrófago/DC plasmacitoide) está positivamente asociada con la supervivencia total y libre de recaídas, además NAC puede reprogramar el microambiente inmunológico a uno que fomenta la inmunidad antitumoral [331].

Por otro lado, durante los últimos 15 años, estudios longitudinales han evaluado el impacto de la quimioterapia en las células inmunitarias que infiltran las lesiones de las pacientes con cáncer de mama. Así, Demaria et al., demostró que la quimioterapia neo-adyuvante empleando paclitaxel, aumenta la frecuencia de los linfocitos infiltrantes detectados por Hematoxilina/Eosina (HE) en los pacientes que respondieron clínicamente a la quimioterapia [332]. Desde entonces, Mahmoud [323] y otros autores [138, 333] han confirmado el valor pronóstico de los linfocitos T CD8 + infiltrantes de tumores en los pacientes con cáncer de mama en una serie de estudios en los que el número de linfocitos que infiltran los tumores detectados por inmunohistoquímica (IHC) en el diagnóstico tumoral constituye un biomarcador predictivo fuerte e independiente para el éxito de la NAC, medido en términos de pCR. La acumulación de todas estas evidencias indica que NAC estimula la infiltración de tumores por células de origen mieloides y gran-enzima B adicional a un cambio en la proporción de LT-CD8+ con respecto a LT CD4+ [324].

Por último, en lo que respecta a las características del infiltrado tumoral y su relación con NAC, dos hallazgos adicionales merecen ser mencionados. En primer lugar, se encontró que la infiltración de tumores de mama por LT-CD4+ con un fenotipo T folicular (Tfh) se caracteriza por la expresión de CXCL13 un fuerte predictor de la respuesta a NAC [128]. Este hallazgo está de acuerdo con la firma de un metagene basado en CXCL13 el cual refleja la presencia intra-tumoral de células T que producen IFN- γ con una buena capacidad predictiva de pCR asociado al tratamiento con NAC [164]. En segundo lugar, el estudio de la autofagia y la expresión de HMGB-1 en una gran serie de especímenes tumorales de pacientes con cáncer de mama tratados con antraciclinas, indica que en las pacientes cuyas muestras de IHQ carecen del signo de activación de autofagia LC3B+ o han perdido la expresión de HMGB-1 su enfermedad tiene mal pronóstico [23].

En conjunto, estos resultados indican que las respuestas inmunitarias inducidas por NAC son responsables en última instancia de la erradicación de tumores. Hasta ahora, para evaluar el impacto de NAC en la inmunomodulación de DCs, TILs, MDSCs y Tregs, los

estudios clásicos de IHC han sido fundamentales; sin embargo, estos métodos tienen una resolución limitada para descifrar la complejidad de las interacciones celulares detrás de estos procesos. La buena noticia es que las herramientas modernas con suficiente resolución para descomponer la compleja arquitectura histopatológica de los especímenes tumorales y para analizar de manera objetiva la localización intratumoral precisa de diferentes poblaciones celulares dentro del infiltrado inmune que tiene un importante impacto en el pronóstico de NAC [334, 335], están evolucionando rápidamente [327, 336-338].

Evaluación del infiltrado tumoral como factor predictivo

La terapia neo-adyuvante se considera comúnmente como el mejor modelo para la evaluación de las interacciones entre los fármacos antitumorales con el microambiente tumoral y la respuesta del paciente. Denkert y cols., en 2010 describen por primera vez una conexión positiva entre la presencia de TILs y resultados clínicos favorables mediante una correlación lineal entre los altos niveles de TILs, especialmente las células T, y respuesta clínica y radiológica posterior a NAC con antraciclinas ([333]. Desde entonces, el papel predictivo de los TIL con respecto al éxito del NAC ha sido respaldado por un número considerable de estudios, principalmente en las pacientes con expresión de HER2 y tripe-negativas [339]. La correlación entre LT CD8+ y Tregs se ha establecido recientemente como un indicador de éxito en la terapia con NAC, específicamente, la relación CD8+/FoxP3+ el cual representa un parámetro confiable, ya que incluye la relación entre la inmunosupresión del microambiente tumoral con la actividad citotóxica de LT, lo que se asocia a una mayor probabilidad de obtener una respuesta patológica completa (pCR) [204, 205, 340]. El vínculo entre los infiltrados inmunes y el éxito terapéutico parece estar relacionado con dos mecanismos principales: el primero basado en el concepto de muerte celular inmunogénica causado principalmente por las antraciclinas que provocan en las células tumorales la liberación de señales de peligro (DAMPs) que estimulan adecuadamente células presentadoras de antígenos como DCs, favoreciendo mecanismos como la presentación cruzada y activación de LT-CD8+ citotóxicos [25, 341]; el segundo mecanismo se centra en el compartimiento de células supresoras como Tregs y MDSCs, las primeras se ven afectadas con dosis metronómicas de ciclofosfamida [342] (usualmente combinado con Doxorubicina en NAC), de manera similar taxanos y 5-fluoro-pirimidinas (como el 5 fluorouracilo – 5-FU) están asociados con el incremento de la expresión de mecanismos pro-apoptóticos, reducción de mecanismo anti-apoptóticos y disminución de citoquinas supresoras como IL-10 [343, 344].

Diseño experimental

La optimización de los procesos necesarios para la marcación por IHQ, requirió una estandarización y puesta a punto de un sistema de arreglo de tejidos. Este sistema se basa en la identificación en los bloques de parafina por un patólogo experto las zonas de interés (infiltración linfocitaria, tejido tumoral, glándulas, etc.) y tomar mediante una broca los tejidos seleccionados y trasladarlos a una matriz de parafina, de manera que en una sola lámina se puedan evaluar varias muestras (23 en nuestro caso), favoreciendo la uniformidad de la marcación. Este proceso se resume en el diagrama representado en la Figura suplementaria 16. A partir del bloque completo del tejido tumoral se realiza una marcación con Hematoxilina y Eosina (H/E), esta lámina es evaluada por un patólogo experto quien define una o más zonas de interés. Estas zonas de interés se ubican en el bloque de parafina y se extraen mediante una broca para trasladarlas de manera secuencial en una matriz de parafina. Al completar 23 muestras (zonas de interés provenientes de diferentes bloques) se procede a realizar los cortes para la marcación correspondiente. Finalmente, las láminas marcadas son digitalizadas mediante una cámara con el fin de procesarlas de manera cuantitativa por el software CellProfiler.

El sistema de optimización del procesamiento de muestras para estudios de IHQ, no fue posible hacerlo con las biopsias de diagnóstico (muestra pre-quimioterapia) de las pacientes participantes dado la escasa cantidad de muestra pre-quimioterapia disponible y la necesidad de evitar el agotamiento de esta muestra y con el fin de favorecer la preservación de parte de la misma.

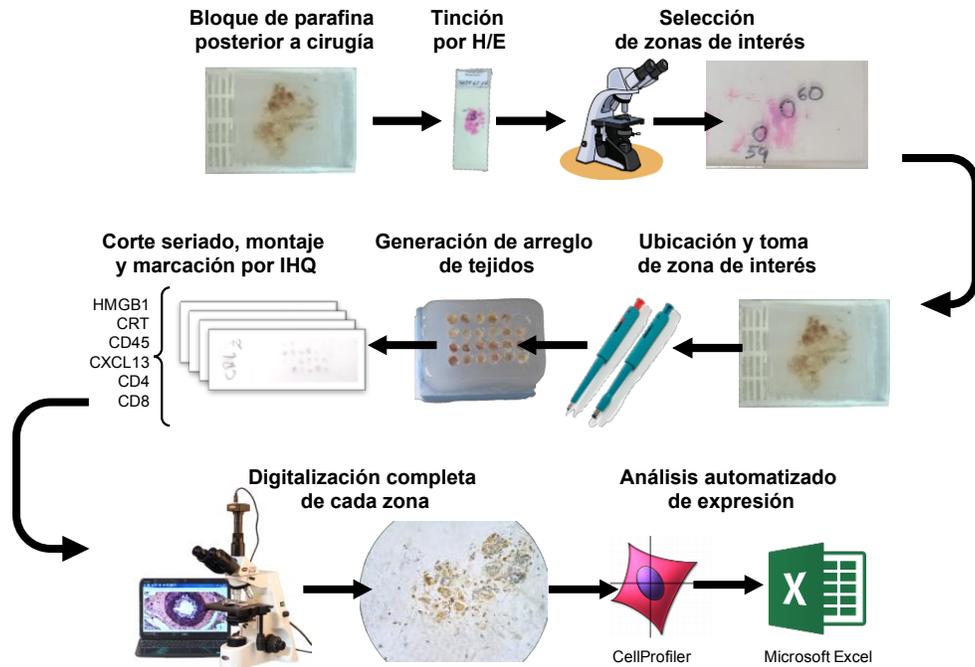


Figura suplementaria 16. Diagrama del proceso de selección, procesamiento de arreglo de tejidos, marcación por IHQ y cuantificación sistemática. El proceso se inicia con el bloque de parafina almacenado en los repositorios de patología. Inicialmente se realiza un corte y marcación con H/E para su análisis por un patólogo experto quien define zonas de interés. De las zonas de interés se define y se extrae del bloque original de parafina mediante una broca una parte de la preparación con el fin de transferir solo la zona de interés a una matriz de parafina la cual se homogeniza, se transfiere a una lámina porta-objeto, se marca con los diferentes anticuerpos y se revela por IHQ. Finalmente se colecta y procesan las imágenes capturadas en el software CellProfiler para cuantificar de manera diferencial la marcación de hematoxilina (núcleos) y la señal de peroxidasa revelada por el anticuerpo contra el marcador de interés acoplado a peroxidasa.

Resultados

Obtención de muestras

Para el proceso de obtención de muestras y marcación, se realizó la búsqueda de material en los repositorios de patología de los diferentes centros de atención de las pacientes participantes en el estudio (Clínica del Seno, Clínica Palermo e Instituto Nacional de Cancerología). Se solicitó la autorización correspondiente para la obtención de los bloques de parafina de las biopsias (empleadas para el diagnóstico de las pacientes) y los especímenes quirúrgicos (posterior a la quimioterapia primaria). El acceso al material de las biopsias fue muy limitado dada las restricciones de los diferentes centros y a la limitada muestra obtenida. En total se consiguieron 2 pacientes con muestras completas de biopsias y espécimen quirúrgico, por aparte se obtuvieron 17 muestras de solo espécimen quirúrgico para un total de 80 bloques de parafina.

Marcación con Hematoxilina y Eosina

A partir de los 80 bloques obtenidos de las muestras, se realizó un corte para marcación con hematoxilina/eosina (H/E) para seleccionar las zonas de interés (región tumoral con infiltración linfocitaria y zonas sanas de control de la misma paciente) bajo el apoyo del Dr. Yobany Sánchez (patólogo de la Facultad de Medicina - Universidad Nacional). Se determinaron un total de 60 zonas de interés en las 17 muestras de los especímenes quirúrgicos marcadas directamente en la lámina como se muestra en la Figura suplementaria 17.

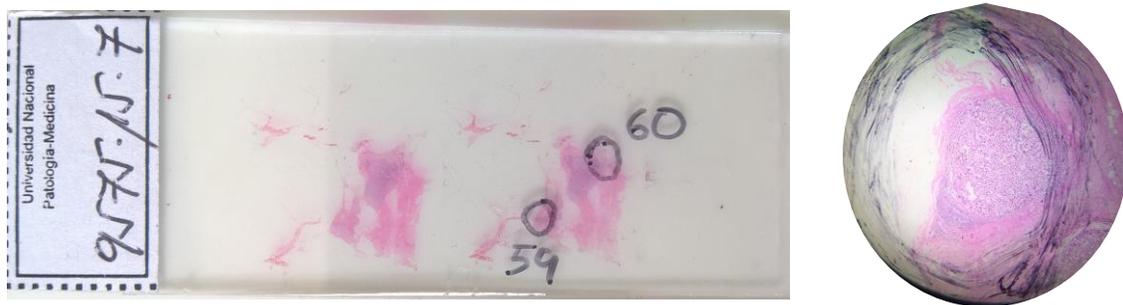


Figura suplementaria 17. Definición sobre la lámina de zonas de interés en marcación por H/E de muestra quirúrgica de paciente con cáncer de mama. Lámina representativa de una paciente marcada con H/E y con dos zonas de interés (59 y 60) definidas por el grado de infiltración linfocitaria y presencia de células tumorales (izquierda). Fotografía en microscopio óptico a 10X de la zona de interés 59 (derecha).

Creación de bloques con arreglo de tejidos

De los 80 bloques de parafina analizados se seleccionaron 60 zonas de interés confirmadas por tinción H/E (Figura suplementaria 18).



Figura suplementaria 18. Relación entre zona de interés definida con el bloque de parafina. *Proceso de ubicación de la zona de interés definida en la lámina con respecto al bloque original de parafina.* Una vez ubicadas las áreas de interés dentro de cada bloque, se implementó un método para la estructuración de un arreglo de tejido mediante un proceso de “ponchado” en el que se extrae la zona de interés con una broca y se ubica de manera consecutiva en una matriz de parafina con una capacidad límite de 23 muestras por bloque. De esta forma se obtuvo un total de 3 arreglos de tejidos que son representativos de los 80 bloques con muestras pos-quimioterapia pertenecientes a 17 pacientes (Figura suplementaria 19 y 23).

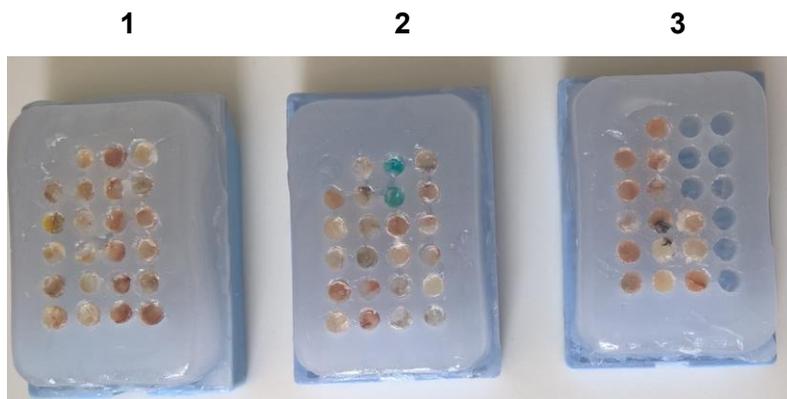


Figura suplementaria 19. Distribución de arreglos de tejidos. *Fotografía en que se muestra la distribución final de los tres bloques de parafina en los que se encuentran ordenadas las 60 zonas de interés (dos de 23 muestras y una de 14), extraídas de 80 bloques de parafina de 17 pacientes participantes en el estudio.*

Posterior a la generación de los tres bloques de parafina que contienen las 60 zonas de interés, se homogenizó la parafina de la matriz, con la parafina proveniente de los tejidos,

incubándolos a 60°C por 30 minutos. Finalmente, se realizaron los cortes correspondientes para la marcación por IHQ en láminas cargadas (Figura suplementaria 20).

Marcación por IHQ

A partir de cortes (3µm) montados en láminas cargadas, se procede a la marcación mediante la técnica de IHQ, con los anticuerpos que reconocen CD45, CXCL13, HMGB-1, CRT, CD4 y CD8. El protocolo de marcación se estandarizó previamente en el grupo de investigación (trabajo de tesis de maestría de Anamaría Morales). Las láminas se desparafinaron a 60°C x 30 minutos, posteriormente se rehidrataron (gradiente de alcoholes a xilol). Se procede a lavar con buffer de recuperación antigénica y humedecer en vaporera. Luego del lavado se procede a bloquear la peroxidasa endógena con metanol y peróxido (3%) por 10 minutos. Se define la zona de tinción con un marcador hidrofóbico. Se adiciona 200µL del anticuerpo a la concentración establecida y se incuba a temperatura ambiente en cámara húmeda. Posterior al lavado adicionar anticuerpo secundario acoplado a peroxidasa (kit Envision Dako) por 20 minutos y lavar. Adicionar 100µL de 3,3'-Diaminobenzidine (DAB) como solución de revelado bajo observación en el microscopio por 30 segundos y se detiene la reacción con agua. Las láminas se marcan con Hematoxilina por 20 segundos para observar los núcleos y se adiciona agua amoniacal. Previo a montar las láminas se deshidrata la muestra pasando por concentraciones crecientes de alcohol y xilol.

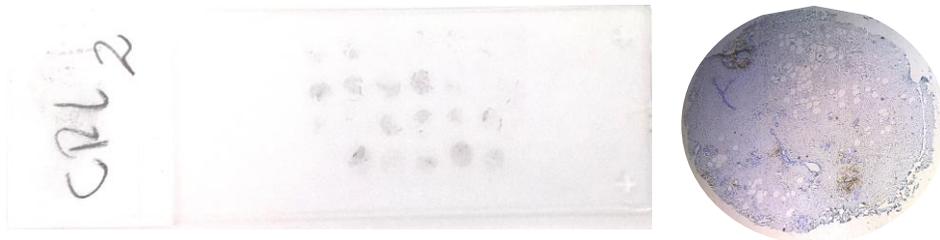


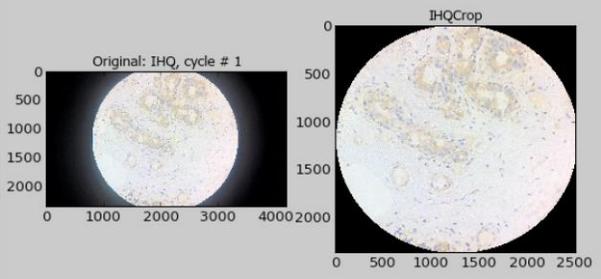
Figura suplementaria 20. Ejemplo de tejido posterior al corte y marcación por IHQ. Lámina marcada con Calreticulina (CRT) del segundo bloque de muestras (izquierda). Fotografía a 10X de una muestra representativa de tejido marcado con CRT (derecha).

Cuantificación sistematizada

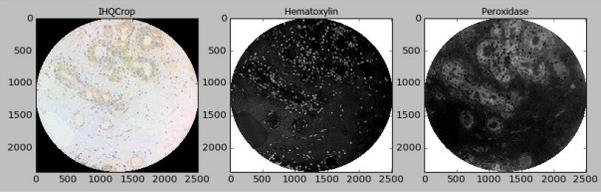
Con el fin de cuantificar la expresión de los marcadores de manera sistemática, se digitalizaron las imágenes a 40X (mínimo quince campos por muestra) con cámara de 20MPX con ajuste automático de exposición, balance de blancos e ISO.

Para el análisis de las imágenes se empleó el software CellProfiler v2.1.1 (Board Institute). Con una línea de trabajo del software la cual consiste en los siguientes pasos:

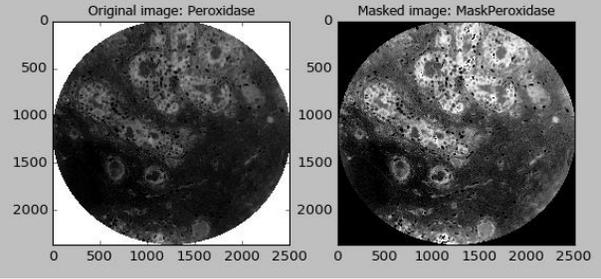
Paso 1: Se establece la ubicación de los archivos con las imágenes para ser analizadas (formato JPG). Se configura un paso de recorte de la imagen para eliminar áreas no relacionadas (configuración de punto central y un radio en pixeles en X y Y).

<p>Module settings</p> <p>Select the input image: IHQ (from NamesAndTypes) ?</p> <p>Name the output image: IHQCrop ?</p> <p>Select the cropping shape: Ellipse ?</p> <p>Select the cropping method: Coordinates ?</p> <p>Apply which cycle's cropping pattern?: First ?</p> <p>Coordinates of ellipse center X: 2067 Y: 1183 ?</p> <p>Ellipse radius, X direction: 1255 ?</p> <p>Ellipse radius, Y direction: 1183 ?</p> <p>Remove empty rows and columns?: All ?</p>	
---	---

Paso 2: A partir de la imagen recortada, se realiza una separación de colores. Se establece la separación entre hematoxilina (azul) para células y la marcación con peroxidasa (café) del anticuerpo específico.

<p>Select the input color image: IHQCrop (from Crop #05) ?</p> <p>Name the output name: Hematoxylin ?</p> <p>Stain: Hematoxylin ?</p> <p>Name the output name: Peroxidase ?</p> <p>Stain: AEC ?</p> <p>Remove this image ?</p> <p>Add another stain ?</p>	
---	--

Paso 3: Generación de máscara de color. Se define una máscara (área de interés) a partir del color de peroxidasa (anticuerpo de interés) y hematoxilina (celularidad).

<p>Select the input image: Peroxidase (from UnmixColors #06) ?</p> <p>Name the output image: MaskPeroxidase ?</p> <p>Use objects or an image as a mask?: Image ?</p> <p>Select image for mask: Peroxidase (from UnmixColors #06) ?</p> <p>Invert the mask?: <input checked="" type="radio"/> Yes <input type="radio"/> No ?</p>	
---	--

Paso 4: Conversión de imagen a blanco y negro. A partir de la máscara se define un umbral de intensidad de señal para establecer lo que es positivo o negativo para cada color.

Select the input image: MaskPeroxidase (from MaskImage #07)

Name the output image: ThreshPeroxide

Select the output image type: Binary (black and white)

Threshold strategy: Global

Thresholding method: RobustBackground

Select the smoothing method for thresholding: Automatic

Threshold correction factor: 0.9

Lower and upper bounds on threshold: 0.0 1.0

Original image: MaskPeroxidase Thresholded image: ThreshPeroxide

Paso 5: Se cuantifica el área ocupada por la peroxidasa y hematoxilina. Adicionalmente se cuantifica el área total de la imagen.

Measure the area occupied in a binary image, or in objects? Binary Image

Select a binary image to measure: ThreshPeroxide (from ApplyThreshold #08)

Add another area

Remove this area

Objects or Image	Area Occupied	Perimeter	Total Area
ThreshPeroxide	589427	109571	5943537

Paso 6: Se define el área que es ocupada de manera simultánea por Hematoxilina y por la peroxidasa, el cual equivaldría a la expresión de dicho marcador en el núcleo.

Module settings (CalculateImageOverlap #12)

Compare segmented objects, or foreground/background? Foreground/background segmentation

Select the image to be used as the ground truth basis for calculating the amount of overlap: ThreshHematox (from ApplyThreshold #10)

Select the image to be used to test for overlap: ThreshPeroxide (from ApplyThreshold #09)

Calculate earth mover's distance? Yes No

Measurement	Value
Ffactor	0.0630635491348
Precision	0.0495787982388
Recall	0.0866241169652
FalsePosRate	0.130945707571
FalseNegRate	0.913275983035
FandIndex	0.68033422498
AdjustedRandIndex	-0.03042844971

Paso 7: Los resultados de todas las imágenes se almacenan en un archivo de texto separado por tabuladores, el cual se puede analizar en programas estadísticos o en Excel.

Select the column delimiter: Tab

Output file location: Default Input Folder sub-folder

Sub-folder: OneDrive/2016/TESES/IHQ/Arreglo tejidos/CRT 1/muestra 18

Add a prefix to file names? Yes No

Filename prefix: MyExpt_

Overwrite without warning? Yes No

Add image metadata columns to your object data file? Yes No

Limit output to a size that is allowed in Excel? Yes No

Representation of Nan/Inf: NaN

Select the measurements to export? Yes No

Calculate the per-image mean values for object measurements? Yes No

Calculate the per-image median values for object measurements? Yes No

Calculate the per-image standard deviation values for object measurements? Yes No

	A	B	C	D	E	F	G
1	AreaOccupie	AreaOccupie	AreaOccupie	Channel_IHC	Crop_AreaRe	Crop_Origine	ExecutionTin Ex
2	608627	179351	5943537	-2	4664145	9964544	0
3	608503	150698	5943537	-2	4664145	9964544	0
4	556850	171835	5943537	-2	4664145	9964544	0
5	571263	116373	5943537	-2	4664145	9964544	0
6	601848	183423	5943537	-2	4664145	9964544	0
7	579200	139739	5943537	-2	4664145	9964544	0
8	577529	190816	5943537	-2	4664145	9964544	0
9	589427	109571	5943537	-2	4664145	9964544	0
10	495669	177800	5943537	-2	4664145	9964544	0
11	560626	182886	5943537	-2	4664145	9964544	0
12	551481	168885	5943537	-2	4664145	9964544	0
13	621125	230408	5943537	-2	4664145	9964544	0
14	638363	176515	5943537	-2	4664145	9964544	0
15	660229	161778	5943537	-2	4664145	9964544	0
16	584101	187554	5943537	-2	4664145	9964544	0

Expresión de marcadores de muerte celular inmunogénica

La evaluación *in situ* de patrones moleculares asociados a peligro (DAMPs) ha sido estudiado previamente en pacientes con cáncer de mama mostrando que ciertos comportamientos de moléculas como CRT y HMGB-1 no se asocian claramente a un determinado comportamiento clínico como era lo esperado. En el caso de HMGB-1 esta proteína tiene un comportamiento biológico dependiente del grado de oxidación/reducción de la cisteína 106 cuyo análisis está fuera del alcance de este estudio. Por lo anterior la evaluación por IHQ, no permitió establecer correlaciones con los resultados de los estudios publicados en modelos animales y en algunos estudios en pacientes con cáncer de mama.

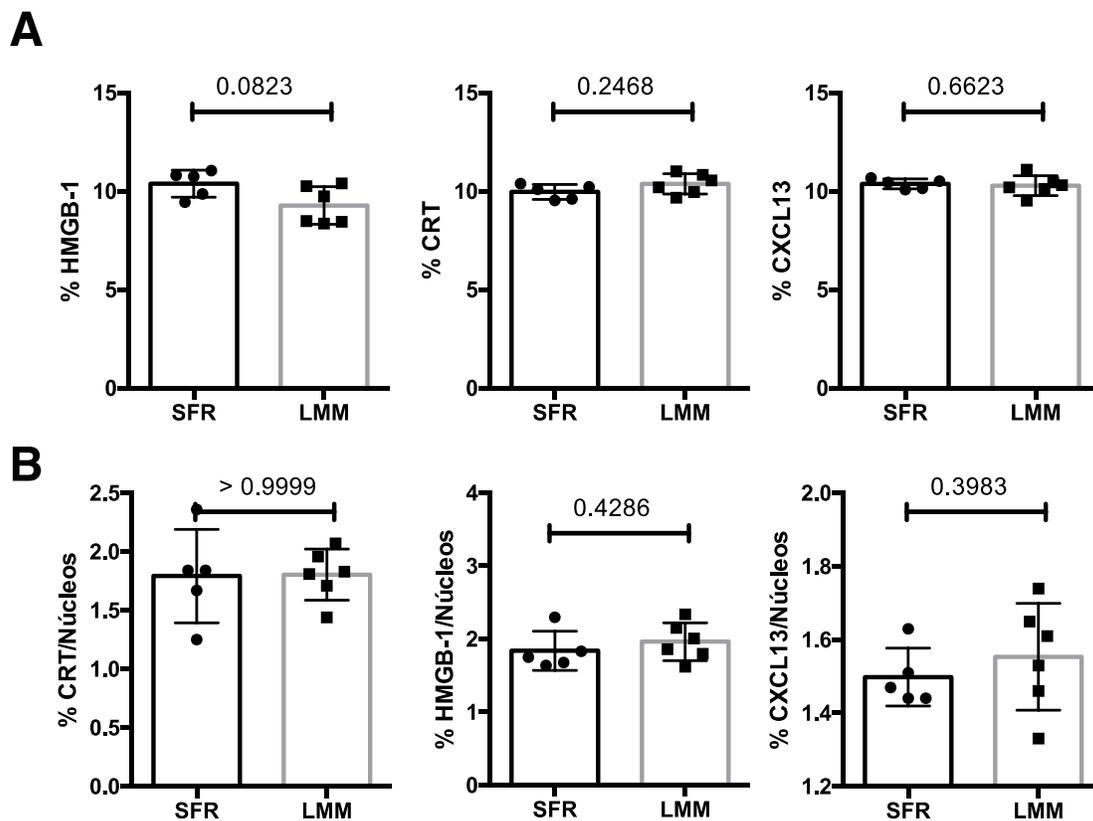
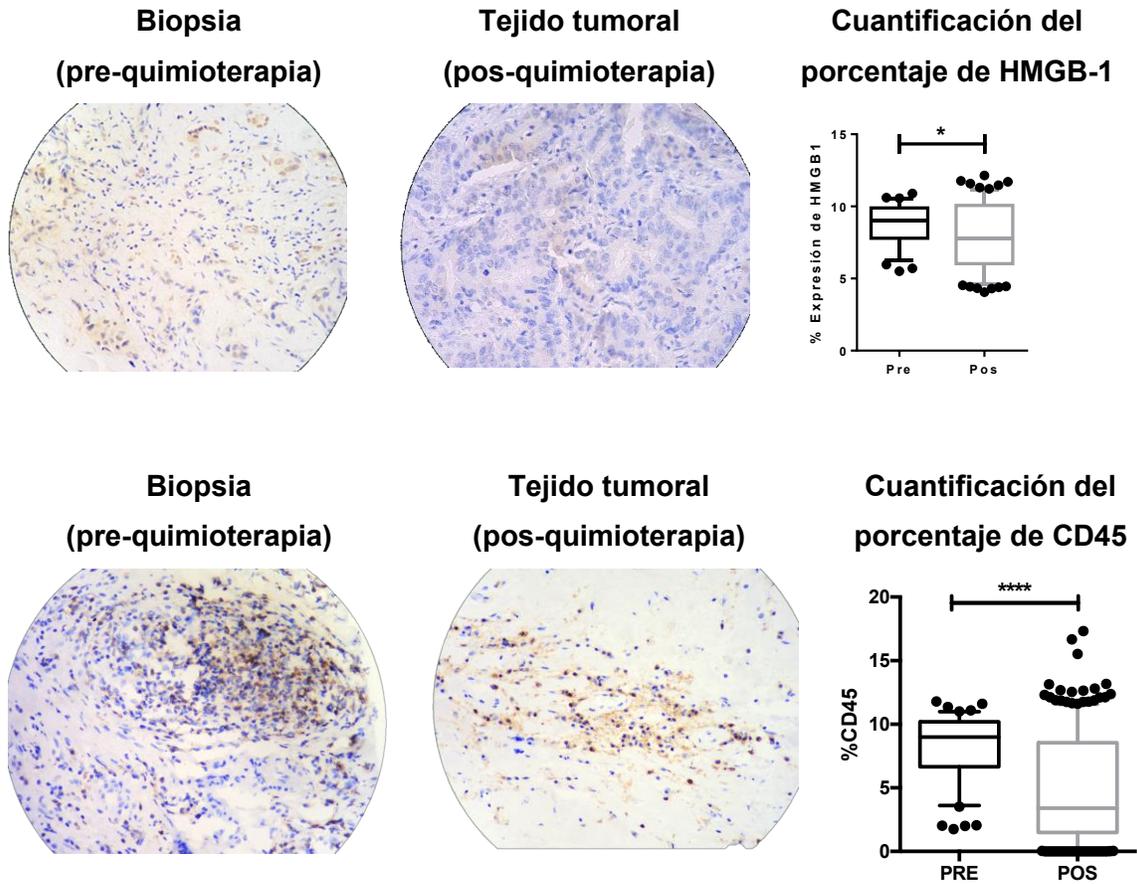


Figura suplementaria 21. Evaluación de la expresión de marcadores de muerte celular inmunogénica (HMGB-1 y CRT) y CXCL13 en pacientes pos-quimioterapia. Determinación del porcentaje de área ocupada por la marcación positiva por peroxidasa para HMGB-1, CRT y CXCL13 por IHQ en dos pacientes con cáncer de mama, SFR (buena respuesta clínica) y LMM (enfermedad progresiva) ya sea por cuantificación directa (A) o en proporción con la cantidad de área ocupada por los núcleos (eosina) (B). Puntos representan cada una de las láminas analizadas por paciente (media de la cuantificación de cada foto por lámina). Números representan valor p de la prueba de Mann-Whitney.

No obstante, se evaluó en las muestras de parafinas obtenidas de las pacientes antes y posterior a la quimioterapia primaria con A/C, la expresión de HMGB-1 mediante IHQ, con el fin de determinar si existe un efecto evidente entre la quimioterapia con los niveles de expresión de este DAMP. Como se muestra en la Figura suplementaria 22, el porcentaje de expresión de HMGB-1 en las muestras de tejido tumoral previo a la quimioterapia presentaron niveles significativamente más altos de HMGB-1 comparados con las muestras posterior al tratamiento.



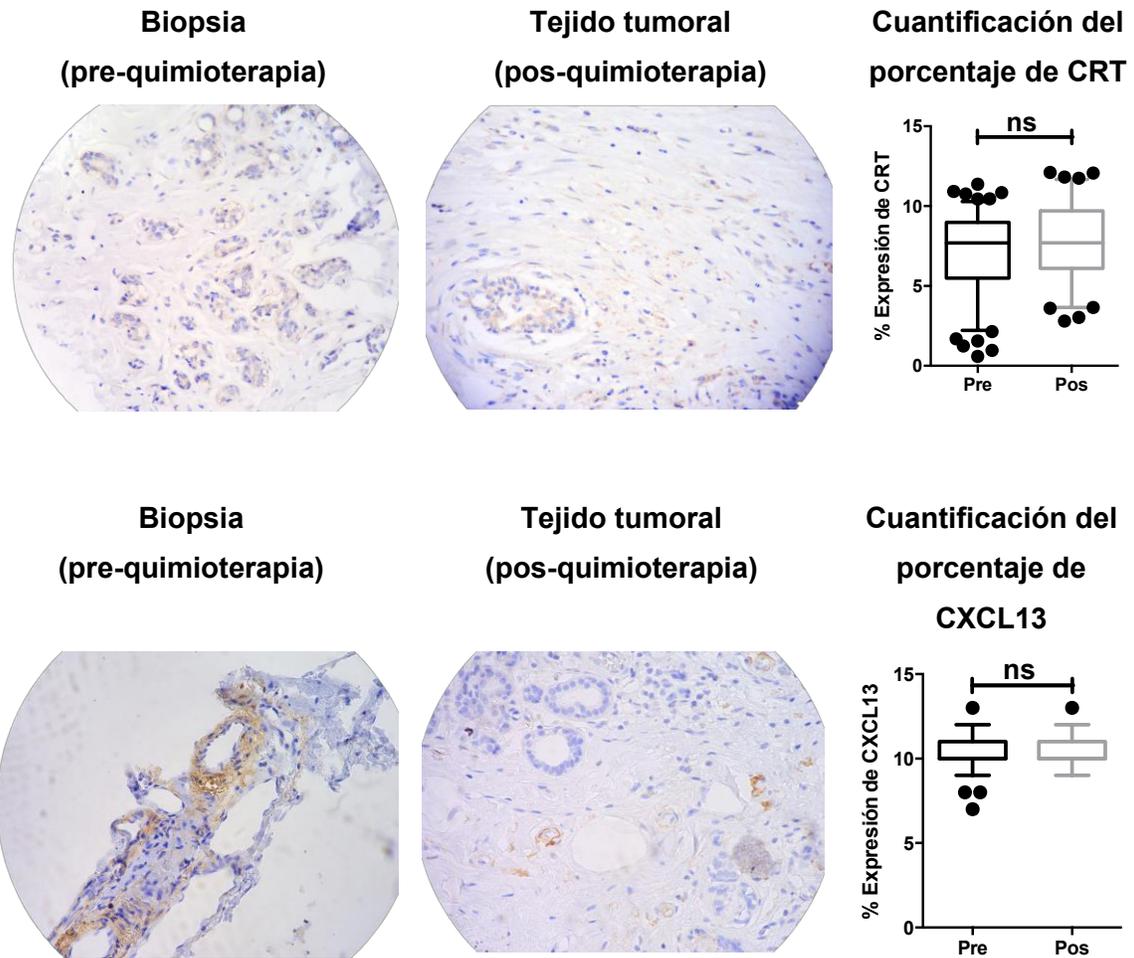


Figura suplementaria 22. Niveles de expresión de HMGB-1 en biopsias y tejido tumoral por IHQ. Lámina representativa de la expresión de HMGB-1 en biopsia (izquierda) y en muestra de tejido tumoral obtenido de la cirugía (centro), donde se observa la marcación con peroxidasa (color café) en las células. En el panel izquierdo se muestra el porcentaje de expresión de HMGB-1 cuantificado de manera automática en las fotografías pre ($n=76$) y pos ($n=159$). * $p < 0.05$, prueba no paramétrica Mann-Whitney.

La reducción significativa de la expresión de HMGB-1 en los tejidos procesados posterior a la quimioterapia podría interpretarse como una reducción de las células tumorales favorecido por el tratamiento con A/C, sin embargo, al ser esta una núcleo-proteína expresada normalmente en las células es difícil su interpretación en la expresión cuantificada por IHQ. Adicional a la expresión de HMGB-1, la cuantificación de otros DAMPs como CRT y la asociación con la cuantificación de TILs medidos con CD45 y la cuantificación de la sub-población TFH (expresión de CXCL13) han mostrado ser predictores de una buena respuesta clínica en pacientes con cáncer de mama[23].

Anexo 10. Premios recibidos

2015 - Immunocolombia 2015 The AAI Young Investigator Award, Medellin, Colombia



2016 – V Jornadas de Investigación en Cáncer Cali, Colombia



Anexo 11. Publicaciones realizadas

RESEARCH ARTICLE

Open Access

Chemotherapy and radiation therapy elicits tumor specific T cell responses in a breast cancer patient



David Bernal-Estévez^{1,2}, Ramiro Sánchez³, Rafael E. Tejada⁴ and Carlos Parra-López^{1,5*}

Abstract

Background: Experimental evidence and clinical studies in breast cancer suggest that some anti-tumor therapy regimens generate stimulation of the immune system that accounts for tumor clinical responses, however, demonstration of the immunostimulatory power of these therapies on cancer patients continues to be a formidable challenge. Here we present experimental evidence from a breast cancer patient with complete clinical response after 7 years, associated with responsiveness of tumor specific T cells.

Methods: T cells were obtained before and after anti-tumor therapy from peripheral blood of a 63-years old woman diagnosed with ductal breast cancer (HER2/neu+++₊, ER-, PR-, HLA-A*02:01) treated with surgery, followed by paclitaxel, trastuzumab (suspended due to cardiac toxicity), and radiotherapy. We obtained a leukapheresis before surgery and after 8 months of treatment. Using in vitro cell cultures stimulated with autologous monocyte-derived dendritic cells (DCs) that produce high levels of IL-12, we characterize by flow cytometry the phenotype of tumor associated antigens (TAAs) HER2/neu and NY-ESO 1 specific T cells. The ex vivo analysis of the TCR-V β repertoire of TAA specific T cells in blood and Tumor Infiltrating Lymphocytes (TILs) were performed in order to correlate both repertoires prior and after therapy.

Results: We evidence a functional recovery of T cell responsiveness to polyclonal stimuli and expansion of TAAs specific CD8⁺ T cells using peptide pulsed DCs, with an increase of CTLA-4 and memory effector phenotype after anti-tumor therapy. The ex vivo analysis of the TCR-V β repertoire of TAA specific T cells in blood and TILs showed that whereas the TCR-V β 04-02 clonotype is highly expressed in TILs the HER2/neu specific T cells are expressed mainly in blood after therapy, suggesting that this particular TCR was selectively enriched in blood after anti-tumor therapy.

Conclusions: Our results show the benefits of anti-tumor therapy in a breast cancer patient with clinical complete response in two ways, by restoring the responsiveness of T cells by increasing the frequency and activation in peripheral blood of tumor specific T cells present in the tumor before therapy.

Keywords: Breast cancer, Type I alpha dendritic cells, T cells, Chemotherapy, HER2/neu, CTLA-4, TCR repertoire

* Correspondence: caparral@unal.edu.co

¹Immunology and Translational Medicine Research Group, Graduated School in Biomedical Sciences, Department of Microbiology, Medical School, Universidad Nacional de Colombia, Carrera 30 #45-03 Building 471, office 304, Bogotá, Colombia South-America

⁵Facultad de Medicina, Departamento de Microbiología, Universidad Nacional de Colombia, Carrera 30 Calle 45, Bogotá, Colombia

Full list of author information is available at the end of the article

Background

Nowadays exists clinical evidence that the quality and number of tumor infiltrating lymphocytes (TILs) is crucial for clinical outcome of cancer patients [1]. On the other hand, Kroemer and colleagues have published abundant experimental evidence that suggests that some chemo-radiotherapy regimens in cancer generate T cell stimulation that accounts for the clinical response induced by these therapies [2]. Despite all this experimental evidence, the demonstration of the stimulatory power of the anti-tumor therapy (anti-TTx) on tumor-specific T cells in cancer patients with complete response after cancer treatment continues to be a formidable challenge. The anergy induced early in the course of the tumors [3], followed by tolerance and exhaustion of T cells occurring late in a wide variety of solid tumors [4], together with the low frequency of T cells specific for tumor associated antigens (TAAs) [5, 6] fosters the unresponsiveness of T cells to tumor antigens that is one important hurdles to monitor the response of T cells specific for TAA in cancer patients during anti-TTx. The design of *in vitro* systems that circumvent these obstacles and that leads us into immunological readouts useful to monitor the response of anti-tumoral T cells during cancer treatment, may become instrumental in establishing correlates between tumor outcome achieved with these therapies and the response of T cells to tumors *in vivo*. CD8⁺ T cells in peripheral blood are themselves a complex mixture comprised of at least four major subsets – naïve (TN), central memory (TCM), effector memory (TEM) and effector memory expressing CD45RA (TEMRA) subsets – each having different functional qualities [7]. Efforts have focused on identifying traits of T cells *in vitro* that correlate with anti-tumor responsiveness *in vivo*. TEMRA cells are developed from long-lasting memory cells and because their potent effector cytolytic capacity they are the responsible for tumor control. It is expected that evidencing the development of TEMRA cells *in vitro* may be a reflection of the generation of proficient anti-tumor immunity *in vivo* [8, 9].

Geiger and colleagues attempted to overcome the limited detection capacity of functional T cell assays for the detection of naïve and memory antigen (Ag)-specific T cells in blood through the augmentation of the number of these cells using *in vitro* expansion, however, this approach is time consuming and requires considerable manipulation [10]. To overcome these limitations, we consider that the use of dendritic cells (DCs) induced and matured *in situ* as antigen presenting cells (APCs), using the standard maturation cocktail (stDCs) [11] or the cytokine mix recently described for the induction of Type I alpha DCs (aDCs) characterized by the production of high levels of IL-12 [12] to activate memory T

cells [13] or to prime *in vitro* naïve T cells present in peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) [14], might be a powerful approach for measuring the response of tumor-specific T cells that expand in cancer patients in response to anti-TTx. In search for *in vitro* assays that helps to establish a correlation between clinical tumor outcome and T cell responses elicited by anti-TTx in cancer patients, we performed a series of functional assays with T cells obtained from a breast cancer patient before and after anti-TTx that were stimulated *in vitro* with two types of DCs pulsed with TAAs.

Our results suggest that the stimulation of T cells with Type I alpha DCs derived in two days (2d-aDCs) pulsed with TAAs allowed us to demonstrate that anti-TTx rescues T cells from the profound unresponsiveness status typically observed in patient T cells before treatment, this recovery of T cell function could be explained in part by the production of IL-12 by 2d-aDCs (data not show). The T cell responsiveness after anti-TTx was reflected in the recovery of TCR internalization; expression at the cell surface of T cell activation markers; activation of effector T cells specific for several TAAs and in the expansion in peripheral blood of T cells specific for TAAs that were present in the tumor infiltrate prior anti-TTx.

Methods

Patient and volunteers PBMCs isolation

This study was approved by the ethics committee of the Medical School – Universidad Nacional de Colombia (CE-14, 9 August 2008, Act. 107). The patient MCC-002 and all healthy donors signed an informed consent form before blood samples were taken. Heparinized blood samples were obtained from healthy volunteers (60 mL). From patient MCC-002 a leukapheresis was obtained before and after eight months of having finished the treatment (Additional file 1: Figure S1). PBMCs were purified using density gradient centrifugation with Ficoll-Paque PLUS (GE Healthcare Life Sciences) and cryopreserved in freezing medium containing 50 % RPMI-1640 + 40 % fetal bovine serum (FBS) (Gibco - Life Technologies) + 10 % Dimethyl sulfoxide (DMSO) (Sigma-Aldrich, St. Louis, United States) at a maximum concentration of 10^7 cells/mL using controlled freezing temperature with an isopropanol filled container and afterwards stored in liquid nitrogen until use. The viability of cells was evaluated directly with 0.4 % Trypan Blue (Life Technologies) and/or with flow cytometry (FC) using LIVE/DEAD Fixable Aqua Dead Cell Stain Kit (Life Technologies).

T cell purification

CD4⁺ and CD8⁺ naïve T cells were purified using MACS cell separation with Naïve T CD4⁺ Cell Isolation Kit II and Naïve CD8⁺ Cell Isolation Kit (Miltenyi

Biotec, Germany) system with magnetic labeled antibodies following manufacturer's protocol, briefly PBMCs were resuspended in MACS buffer (RPMI-1640 + 0.5 mM EDTA + 1 % FBS) and labeled with corresponding antibody cocktail, after cells were washed in MACS buffer, they were pass-through in a humidified (MS) column. Positive cells were washed twice and cell purity was verified by flow cytometry with a purity > 95 %.

T cells stimulation

Two different T cell stimulation methods were used (Additional file 2: Figure S2). Total PBMCs were enriched with 2d-stDCs or 2d-aDCs based on the methodology of Martinuzzi et al., [13]. Briefly, 10^6 PBMCs were cultured with IL-4 and GM-CSF as described by Scandella [15] in the presence of 5 μ M of tumor-associated antigens (TAAs), HLA-A*02:01 restricted viral peptides (CMV, FLU or EBV) for 24 hours and subsequently matured using either 2d-aDCs or 2d-stDCs maturation cocktails [12, 16], with the addition of 5 μ M of the corresponding peptide(s) for 6 days (Additional file 2: Figure S2A); in some experiments unpulsed DCs were used as control in order to determine the basal level of T cell stimulation. The second method using purified CD4+ or CD8+ naïve T cells is based on the methodology published by Moser et al., [14]. Briefly, purified monocytes were differentiated into 2d-stDCs or 2d-aDCs, pulsed or unpulsed with TAA peptide(s) (5 μ M each) and subsequently cultured with purified CD4+ or CD8+ naïve T cells for 14 days at a ratio of 50:1 (T cell: DCs) in serum free AIM-V culture media (Life Technologies, Carlsbad, CA, United States). After 14 days of priming, CD4+ or CD8+ T cell cultures were boosted with corresponding peptide-pulsed 2d-stDCs or 2d-aDCs and cultured for 6 additional days (Additional file 2: Figure S2B). For polyclonal stimulation, 5×10^6 PBMCs/mL were stimulated in different conditions; (i) 2d-aDCs induced in PBMCs *in situ*; (ii) combining 2d-aDCs with T cell activation/Expansion kit (antiCD3/CD28/CD2 micro beads - Miltenyi Biotec) for 24 h after differentiation of 2d-aDCs; (iii) only with T cell activation/Expansion kit; and (iv) PBMCs cultured without stimulation for 3 days as control.

Flow cytometry and cytokine quantification

For the staining procedure, cells were collected and stained in a final volume of 50 μ L of staining buffer (PBS + 1 % FBS) for 30 min at 4 °C and washed with staining buffer before flow cytometry acquisition. Purified T cells or total PBMCs were stained with the following fluorescent antibodies: CD3, CD4, CD152 (CTLA-4), BTLA, PD1 or CD69 (Biolegend, San Diego, United States) or CD8 (eBiosciences, San Diego, United States), CD45RO, CD45RA, CD62-L (BD), CD154 (CD40L)

(eBiosciences, San Diego, United States), CD95 (Fas), or CCR7 (R&D Systems). Cytokine secretion (TNF- α , IFN- γ , IL-6 or IL-12p70) was measured in the culture supernatants using human Th1/Th2 and Inflammatory CBA kits (BD Biosciences) following manufacturer's protocol. All samples were acquired using the FACSAria II (BD Biosciences) at the Universidad Nacional de Colombia; cytometric bead array (CBA) data was analyzed using FCAP Array™ Software (BD). The flow cytometry data were exported in FCS file format v3 and analyzed using FlowJo software (TreeStar Inc.). The graphics and statistics were generated using Prism v5 software (Graph Pad).

Peptide synthesis

Three peptides from extracellular domains of HER2/neu (HER2/neu₄₂₋₅₆, ₉₈₋₁₁₄, and ₃₂₈₋₃₄₅) and three peptides from intracellular domains (HER2/neu₇₇₆₋₇₉₀, ₉₂₇₋₉₄₁, and ₁₁₆₆₋₁₁₈₀) [17], HLA-A*02:01 restricted viral (NLVPMVATV – CMV_{PP65}, GLCTLVAML – EBV₂₈₀₋₂₈₈ BMFL1, and GILGFVFTL – influenza M1), and TAAs HER2/neu₃₆₉₋₃₇₇ (KIFGSLAFL), HER2/neu₆₈₉₋₆₉₇ (RLQETELV), HER2/neu₄₃₅₋₄₄₃ (ILHNGAYSL), and NY-ESO1₁₅₇₋₁₆₅ (SLLMWITQV) peptides were generated through solid phase peptide synthesis (viral peptides were purchased to 21st Century Biochemicals, CPC Scientific) and TAAs peptides were synthesized at the Fundación Instituto de Inmunología de Colombia - FIDIC), with purity >85 % analyzed by mass spectrometry. The lyophilized peptides were dissolved in DMSO and diluted in PBS to a working concentration of 2 mM each.

Tetramer staining

Biotinylated HLA-A*02:01 tetramers were synthesized by CPL at the Lawrence Stern Laboratory, University of Massachusetts Medical school. The tetramers were labeled with streptavidin-PE or streptavidin Alexa 700 (Invitrogen™ Life Technologies) at a 4:1 molar ratio in a stepwise addition before use. For tetramer staining process, cells were labeled with 2 μ g/mL of corresponding tetramers during 2 h at 37 °C, followed by the addition of the corresponding antibody cocktail for surface markers added as described above. In Fig. 2, CD8+ T cells were labeled with HER2/neu₃₆₉₋₃₇₇ APC MHC dextramer kindly gifted by Immudex (Copenhagen – Denmark).

TCR V β quantification and CDR3 sequence

To compare the 24 families of TCR V β repertoire in tetramer positive and negative CD8+ T cells, *ex vivo* PBMCs were stained with HER2/neu₃₆₉₋₃₇₇ biotin tetramer labeled with streptavidin Alexa fluor 700 as described above in 8 different tubes, followed by TCR V β family label using IOTest Beta Mark TCR V Kit (Beckman Coulter, Pasadena, United States) with each antibody

cocktail (vials A to H) and anti-CD8 PE-Texas Red (eBiosciences, San Diego, United States); a minimum of 5×10^4 CD8⁺ T cells were acquired, and the percentage of each family in HER2/neu specific CD8⁺ T cells was analyzed with FlowJo software (Treestar, Ashland, United States). For CDR3 sequences, 2×10^7 PBMCs collected before and after anti-TTx were used to obtain genomic DNA using Wizard[®] Genomic DNA Purification Kit (Promega Corp., Madison, United States) following manufacturer's protocol. For the CDR3 sequencing of TILs, two tumor slices (3 μ m thick each) were obtained from tumor resection by surgery of the MCC-002 patient fixed-formalin paraffin embedded (FFPE). The DNA from the FFPE sample (extracted by ImmunoSEQ) and DNA from the two PBMCs samples were verified and then sequenced by ImmunoSEQ service (Adaptive Biotechnologies, Seattle, United States), raw data can be found in Additional file 3: Table S1.

Results

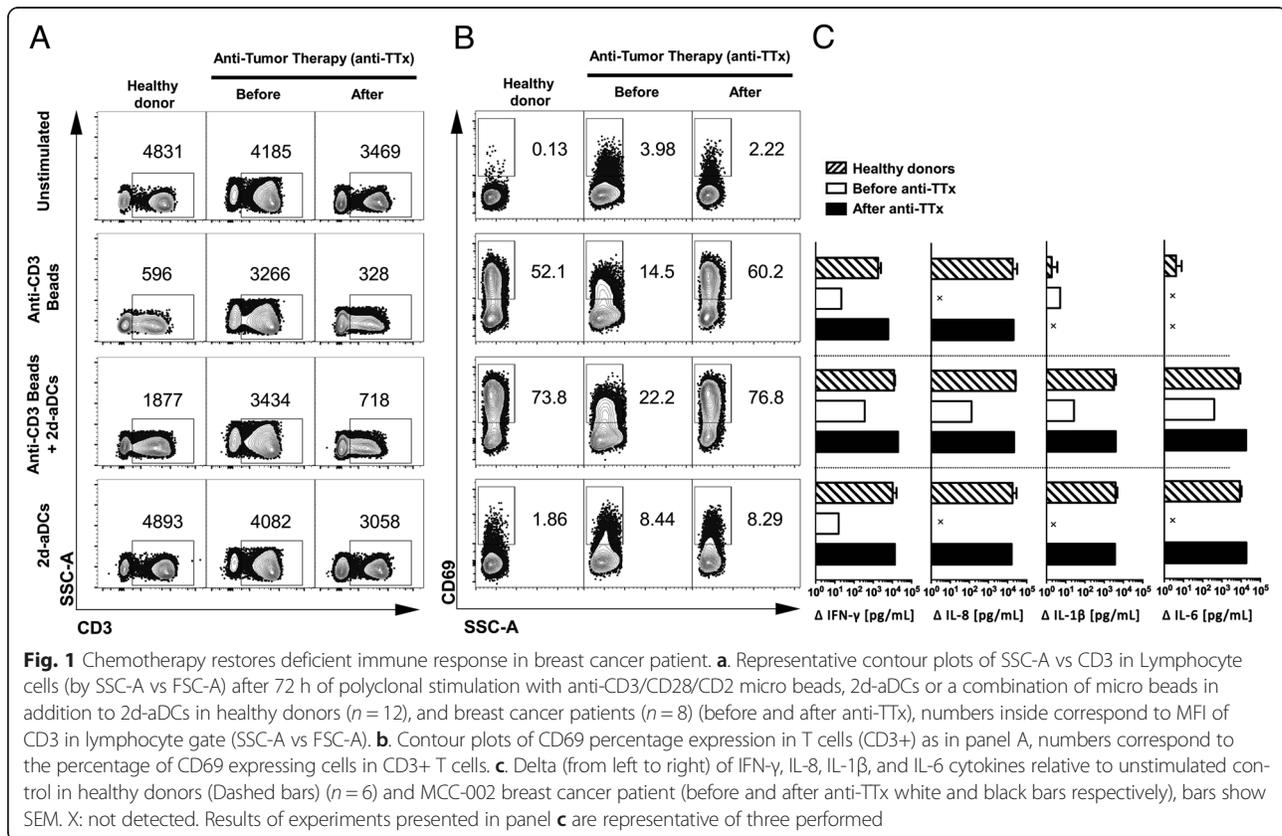
The anti-tumor therapy reestablishes T cell responsiveness

Experimental evidence suggests that cancer patients - similar to what has been described in some chronic viral infections - experience a reduction in T cell function [4, 18], in order to determine the effect of anti-TTx on the responsiveness of the T cell compartment, the capacity in MCC-002 patient's T cells to respond either to a TCR stimulation or to a pro-inflammatory stimuli was compared in PBMCs from blood samples taken before and after anti-TTx (see patients details in Additional file 1: Figure S1). For this, we established first an *in vitro* assay using PBMCs from healthy individuals stimulated with a mixture of anti-CD3, anti-CD28 and anti-CD2 conjugated to micro beads in order to measure the degree of TCR internalization and expression of CD69, CD25, and CD154 on T lymphocytes of normal individuals. The response to TCR stimulation in T cells from healthy donors was then compared with those from the patient before and after anti-TTx. TCR internalization in response to stimulation was determined by the mean fluorescence intensity (MFI) of CD3. This measurement showed that patient's T cells prior therapy had a limited capacity to internalize the TCR compared to cells from healthy donors. Notably, the TCR internalization was 10 times higher after anti-TTx than before therapy (MFI values before and after anti-TTx were 3266 and 328 respectively - Fig. 1a) suggesting that this function was recovered after anti-TTx. The low capacity of TCR internalization observed in cells prior anti-TTx was accompanied by a limited expression of CD69, CD25, and CD154 in response to TCR stimulation compared with surface

levels of these molecules on stimulated cells from healthy donors (Fig. 1b and Additional file 4: Figure S3 respectively). Likewise, to TCR internalization after anti-TTx the cells recovered the expression of these three molecules to levels similar to those found in cells from healthy donors (Fig. 1a, b and Additional file 4: Figure S3). Interestingly, the secretion of IFN- γ , IL-8, IL-1 β , and IL-6 in response to TCR stimulation showed that before anti-TTx the cells had a deficit to secrete these cytokines (Fig. 1c), however, after anti-TTx the T cell responsiveness measured in terms of IFN- γ and IL-8 secretion was recovered (Fig. 1c). Finally, whereas induction of 2d-aDCs *in situ* in cells from healthy individuals showed in culture supernatants a high concentration of IFN- γ , IL-8, IL-1 β , and IL-6 that was not observed in cells of the patient before treatment, the induction *in situ* of 2d-aDCs in cells after anti-TTx elicited levels of these cytokines similar to those detected in cells from healthy individuals (Fig. 1c). Altogether, these results indicate that anti-TTx in this patient restores the ability of T cells to respond to TCR stimulation and to a pro-inflammatory stimulus provided by 2d-aDCs.

2d-aDCs helps revealing responsiveness of tumor specific CD8⁺ T cells induced by anti-TTx

To explore the effect of anti-TTx in favoring the responsiveness of the T cell compartment in breast cancer patients, the expansion of CD8⁺ memory T cells [7] that recognize HLA-A*02:01 restricted epitopes from HER2 and NY-ESO 1 was analyzed in PBMCs before and after anti-TTx in our patient stimulated with 2d-aDCs or 2d-stDCs as control APCs using two different *in vitro* systems (Additional file 2: Figure S2). The first *in vitro* system is based on the method originally described by Martinuzzi et al., [13] to study the responsiveness of antigen specific memory T cells in peripheral blood (Additional file 2: Figure S2A) patient's PBMCs were stimulated for six days with either 2d-stDCs or 2d-aDCs derived *in situ* with cytokines and pulsed with a pool of three HER2/neu and one NY-ESO 1 HLA-A*02:01 restricted epitopes. We did not observe *ex vivo* difference in the percentage of HER2- or NY-ESO 1-specific memory T cells among total CD8⁺ cells in samples obtained before and after therapy (data not shown). In contrast, in cultures stimulated with peptide-pulsed 2d-aDCs, the percentage of HER2/neu₃₆₉₋₃₇₇ (KIFGSLAFL) tetramer-positive TEMRA CD8⁺ T cells (CD62-L^{low}/CD45RO^{low}/CD45RA^{high}) was higher after than before anti-TTx (3.2 % and 0.01 % respectively). This expansion after treatment was not observed when the cultures were stimulated with peptide-pulsed 2d-stDCs (percentages before and after anti-TTx were 0.06 % and 0.02 % respectively) (Fig. 2a). These results suggest that 2d-aDCs



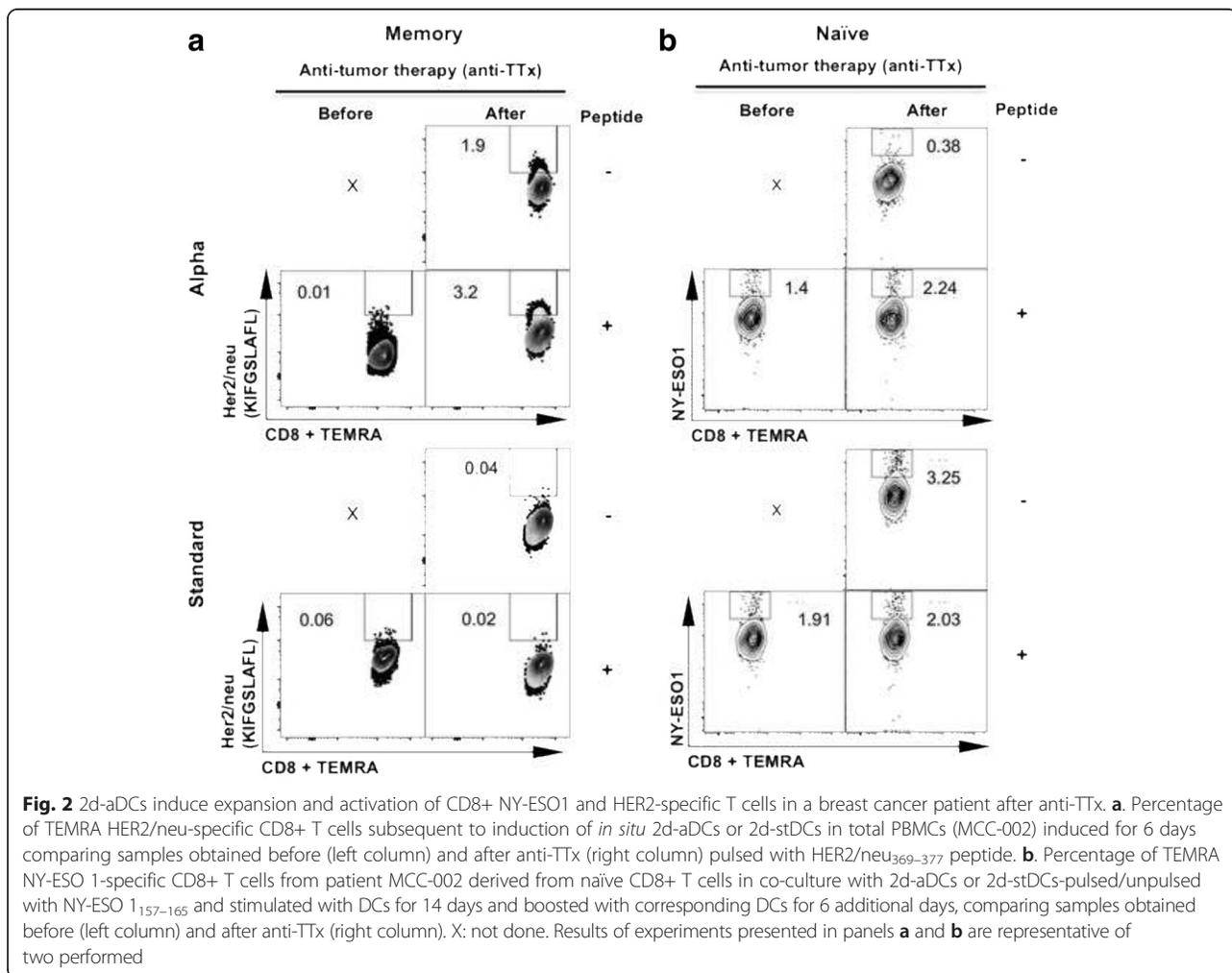
are more efficient than 2d-stDCs in evidencing the responsiveness of anti-tumor memory T cells elicited by anti-TTx. We failed to detect in PBMCs from this patient CD8+ memory T cells specific for NY-ESO 1₁₅₇₋₁₆₅ epitope (SLLMWITQV) using 2d-aDCs or 2d-stDCs (Additional file 2: Figure S2A and data not shown).

The second in vitro system is based on methodology used by Moser et al., to estimate the repertoire of antigen specific naïve T cells present in peripheral blood [14]. To do this, naïve CD4+ and CD8+ T cells obtained from blood samples before and after therapy were primed independently with either 2d-stDCs or 2d-aDCs pulsed with HER2/neu₃₆₉₋₃₇₇ or NY-ESO 1₁₅₇₋₁₆₅ peptides. After 14 days of priming, the cultures were boosted with the corresponding DCs pulsed with peptide for one additional week (Additional file 2: Figure S2B). Stimulation of naïve T cells with peptide pulsed DCs showed that naïve T cells specific for NY-ESO 1 (SLLMWITQV) HLA-A*02:01 epitope from samples after anti-TTx were primed and boosted more efficiently by 2d-aDCs than naïve T cell preparations obtained before therapy (2.24 % vs. 1.4 %, respectively). 2d-stDCs did not induce the expansion of NY-ESO 1-specific CD8+ T cells compared with unpulsed DCs (2.03 % and 3.25 %, respectively) (Fig. 2b). After several attempts, no expansion of HER2/neu₃₆₉₋₃₇₇ (KIFGSLAFL)-specific CD8+ T cells using this in vitro system

was observed (data not shown). Thereafter, we quantified IFN- γ and TNF- α cytokine secretion in both CD8+ and CD4+ T cell culture supernatants (delta of peptide-pulsed DCs minus unpulsed DCs). IFN- γ and TNF- α were secreted in higher concentrations by patient's cells after anti-TTx stimulated with peptide-pulsed 2d-aDCs. In contrast, we observed that in patient's naïve T cells (CD8+ or CD4+), 2d-stDCs induced similar levels of cytokine secretion in samples obtained before or after anti-TTx (Additional file 5: Figure S4). These results suggested that after anti-TTx, 2d-aDCs successfully prime and boost the naïve repertoire of anti-tumor CD4+ and CD8+ T cells present in the peripheral blood of this breast cancer patient.

Anti tumor-therapy induces the expansion and activation of tumor specific effector CD8+ T cells

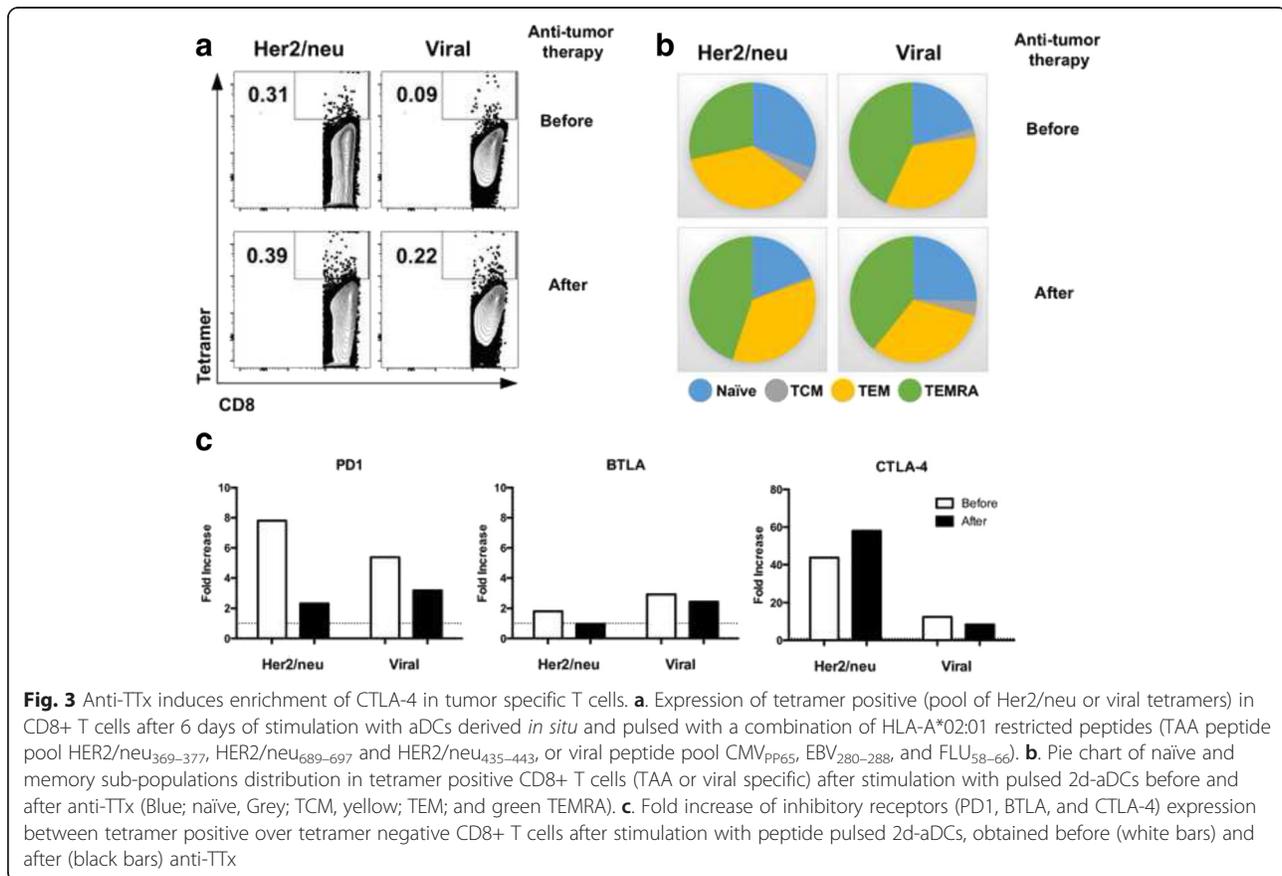
To assess efficacy of anti-TTx in fostering the expansion of tumor specific T cells, we compared in blood samples of this breast cancer patient before and after anti-TTx, the frequency and the memory phenotype of CD8+ T cells specific for several HLA-A*02:01 restricted tumor epitopes (TAAs): Initially, we evaluate the expansion of Her2/neu specific T cells in total PBMC in response to 2d-aDCs pulsed with a pool of three different HLA-A*02:01 restricted peptides (HER2/neu₃₆₉₋₃₇₇ KIFGSLAFL, HER2/neu₆₈₉₋₆₉₇ RLLQETELV, and HER2/neu₄₃₅₋₄₄₃



ILHNGAYSL) and compared with the expansion of viral specific T cells (cytomegalovirus CMV pp65_{495–503} NLVPMVATV; Influenza Matrix protein 1 FLU_{58–66} GILGFVFTL, and EBV BMLF1 protein EBV_{280–288} GLCTLVAML). We evidence a small expansion of TAA and viral specific CD8+ T cells after 6 days of stimulation with peptide pulsed 2d-aDCs in PBMCs obtained after anti-TTx (Fig. 3a), in contrast, we observe a different distribution of naïve and memory sub-populations between TAA vs viral specific T cells, in response to peptide pool viral specific T cells have a high proportion of TEM and TEMRA phenotype, compared to TAA specific T cells before anti-TTx. The phenotype of TAA specific T cells change in response to anti-TTx, with a similar distribution of viral specific T cells (Fig. 3b). To further characterize the immune-phenotype of tetramer positive CD8+ T cells after *in vitro* expansion with 2d-aDCs, we evaluated the expression of three different inhibitory receptors (PD1, BTLA and CTLA-4) on tetramer positive cells [19] and compared with the expression of these receptors in total CD8+ T cells; we found a substantial fold increase only in

CTLA-4 expression in TAA specific CD8+ T cells after compared to before anti-TTx (43 before- to 58 after anti-TTx) with no major changes in cells specific for viral antigens or the expression of PD1, or BTLA (Fig. 3c).

To evaluate the specificity of the anti-tumor immune response against each TAA elicited by anti-TTx, the profile of tetramer positive CD8+ T cells specific to four individual tumor epitopes was measured *ex vivo* and *in vitro* (Fig. 4a left panels). This profile was compared to that of tetramer positive CD8+ T cells specific for three HLA-A*02:01 restricted viral epitopes CMV pp65_{495–503}; FLU_{58–66} (Fig. 4a right panels) and EBV_{280–288} (data not shown). There were not major differences *ex vivo* in the percentages of CD8+ tetramer positive cells specific for tumor or viral antigens in samples obtained before and after anti-TTx (Fig. 4a). On the other hand, when PBMCs were stimulated with *in situ* derived 2d-aDCs in the presence of each TAA, the frequency of tetramer positive CD8+ T cells showed some increase in response to HER2/neu_{369–377} (KIFGSLAFL) epitope (from 0.42 % before to 0.72 % after anti-TTx) and to lower extent in



response to NY-ESO1 (from 0.45 % to 0.61 % before vs. after anti-TTx). Neither before nor after the anti-TTx, CD8+ T cells specific for viral antigens exhibited significant expansion upon stimulation *in vitro* with 2d-aDCs pulsed with each viral epitope (Fig. 4b).

The analyses *ex vivo* of the distribution of naïve and memory T cell sub-populations within tetramer positive CD8+ T cells specific for tumor or viral antigens did not show major differences among samples obtained before or after anti-TTx (Fig. 4c right and left panels). As expected a remarkable expansion of TEMRA CD8+ T cells was observed in samples before and after anti-TTx upon stimulation of the cells *in vitro* for six days with CMV, FLU (Fig. 4d right panels) and EBV (data not shown) viral peptides. That similar responsiveness of CD8+ T cells specific to tumor antigens was observed after individual *in vitro* stimulation with four different tumor epitopes only in samples obtained after anti-TTx and was not evident in cells before anti-TTx (Fig. 4d left panels), lead us to argue that the anti-TTx in this patient efficiently promotes the responsiveness of tumor specific effector CD8+ T cells (TEMRA). Based on the increase of CTLA-4 expression in TAA specific CD8+ T cells after anti-TTx, we evaluated the expression of CTLA-4 on tetramer positive cells; we found a substantial increase

in the percentage of CTLA-4 expression in HER2/neu₃₆₉₋₃₇₇; NY-ESO 1 and FLU specific CD8+ T cells after compared to before anti-TTx (12.4 % before- to 31.9 % after anti-TTx; 10.1–19.7 % and 10.2–19.0 % respectively) with no major changes in cells specific for CMV (15.8 % prior- to 12.8 % post-treatment) (Fig. 4e).

Expansion of TAA specific CD8+ T cells after anti-tumor therapy correlates with the T cell repertoire of tumor infiltrating lymphocytes

To assess changes in the repertoire of TAA specific CD8+ T cells in peripheral blood induced by anti-TTx and their relationship with tumor infiltrating lymphocytes, we compared *ex vivo* by FC the TCR-V β repertoire of HER2/neu₃₆₉₋₃₇₇ tetramer positive CD8+ T cells present in PBMCs from the patient before and after anti-TTx. The percentage of 24 V β families in tetramer positive and tetramer negative CD8+ T cells before and after anti-TTx is summarized in Fig. 5a right panel. This result showed the enrichment in tetramer positive cells after anti-TTx of the V β families V β 7.1, V β 9, V β 5.1, V β 20, V β 13.1, V β 5.2, and V β 04 (Fig. 5a). The specificity and the frequency of T cells is generated by somatic rearrangement of TCR genes and mainly focused on the CDR3 region. This has been

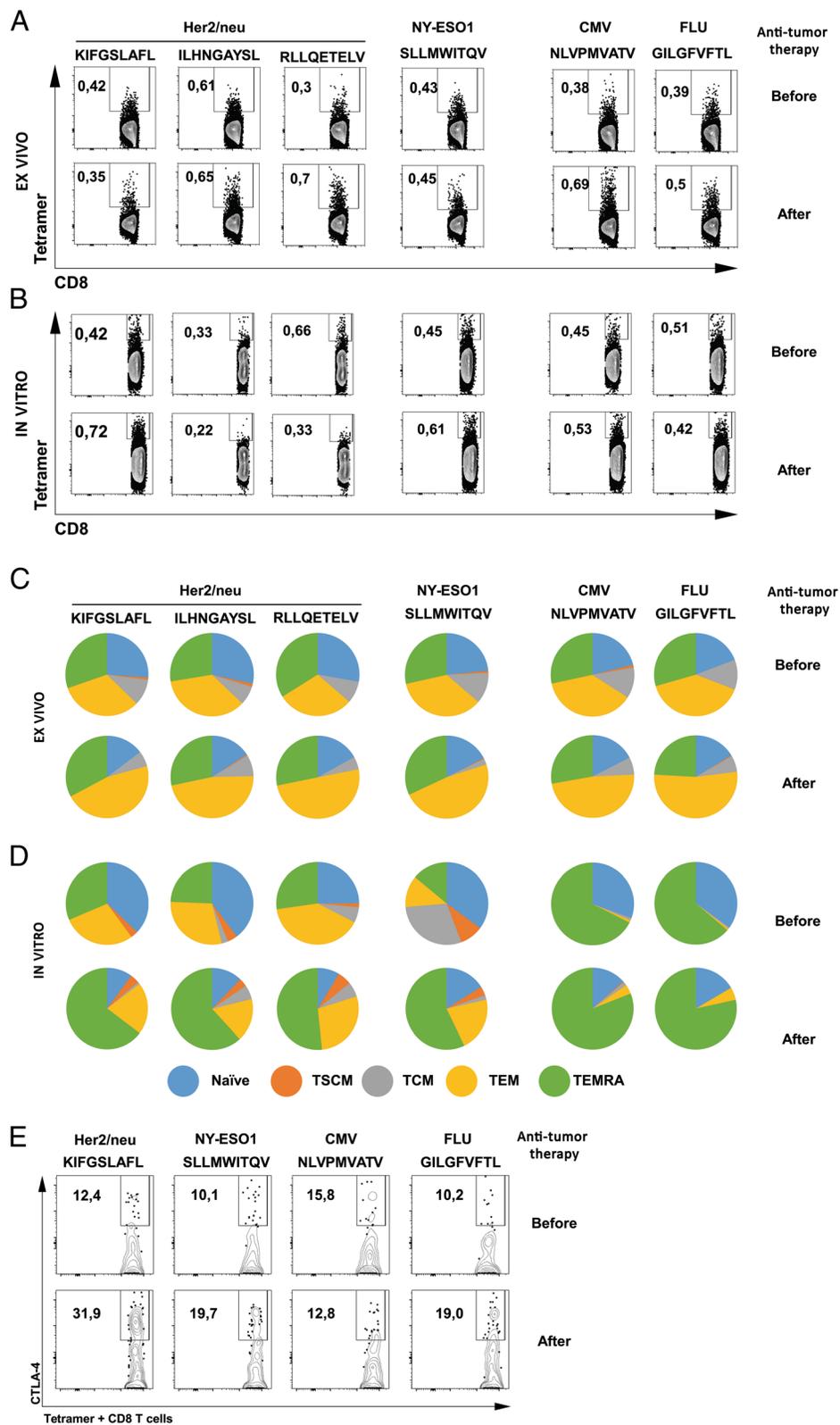


Fig. 4 (See legend on next page.)

(See figure on previous page.)

Fig. 4 Anti-TTx induces the expansion, differentiation and CTLA-4 expression in Her2/neu₃₆₉₋₃₇₇ tumor specific CD8+ T cells. **a.** Representative contour plots of tetramer specific CD8+ T cells staining for HER2/neu₃₆₉₋₃₇₇ (KIFGSLAFL), HER2/neu₆₈₉₋₆₉₇ (RLQETELV), HER2/neu₄₃₅₋₄₄₃ (ILHNGAYSL) and NY-ESO 1₁₅₇₋₁₆₅ (SLLMWITQV), and two tetramers for viral antigens (NLVPMVATV – CMV_{PP65}, and GILGFVFTL – influenza M1 FLU₅₈₋₆₆), stained ex vivo in PBMCs from a breast cancer patient before and after anti-TTx in purified CD8+ T cells. The number inside the plots represents the percentage of tetramer-specific CD8+ T cells. **b.** Representative contour plots of tetramer specific CD8+ T cells after 7 days of in vitro stimulation of PBMCs with the corresponding peptide pulsed 2d-aDCs, the number inside the plots represents the percentage of tetramer-specific CD8+ T cells. Results of experiments presented in panels **a.** and **b.** are representative of two performed. **c.** and **d.** Representative pie charts of ex vivo (**c.**) or after in vitro PBMC stimulation (**d.**), as described in **a.** and **b.**, with the percentage of the phenotype of naïve and memory sub-populations in CD8+ tetramer positive T cells for four TAAs and two viral HLA-A*02:01 peptides before and after anti-TTx. Blue; naïve, Orange; TSCM, Grey; TCM, yellow; TEM; and green TEMRA. Results of experiments presented in panels **c.** and **d.** are representative of two performed. **e.** Representative contour plots of CTLA-4 vs CD8 in tetramer positive CD8+ T cells for HER2/neu₃₆₉₋₃₇₇ (KIFGSLAFL) and NY-ESO1₁₅₇₋₁₆₅ (SLLMWITQV) tetramer + CD8+ T cells for two viral antigens (NLVPMVATV – CMV_{PP65}, and GILGFVFTL – influenza M1 FLU₅₈₋₆₆), in PBMCs stimulated with *in situ* 2d-aDCs from PBMCs obtained before and after anti-TTx as described in **a.** and **b.** Results of experiments presented are representative of two performed

evaluated by spectratyping in combination with family quantification of TCR-V β by FC in cancer patients [20] making these systems useful for T cell identification, but recent techniques can sequence the CDR3 region allowing the quantification of each TCR at a gen level [21]. This technology in combination with TAA MHC-class I tetramers can be relevant for the evaluation of TAA specific T cells in response to anti-TTx. In order to establish the identity of these TCRs we sequenced the CDR3 region and estimated the copy number of encoding transcripts in PBMCs samples obtained before and after anti-TTx from our breast cancer patient. To evaluate the tumor infiltration capacity of these cells we performed a similar analysis in tumor infiltrating lymphocytes (TILs) using fixed-formalin paraffin embedded (FFPE) tumor slices. Figure 5b shows the profile of TCR V β families (left heat map) and TCR V β genes (right heat map) in blood before and after anti-TTx and in TILs with those at the highest frequencies highlighted in black squares. Whereas the heat map of V β families and defined genes expressed by T cells in blood samples before and after therapy evidenced great variability, in TILs, V β 16 and V β 04 families (V β 16-01 and V β 04-02 genes) were present at high frequency (Fig. 5b heat map lower rows). Finally, in trying to correlate specificity of TILs with expansion of CD8+ T cells specific for HER2/neu₃₆₉₋₃₇₇ detected in blood by FC, we correlated frequency of V β families expressed by tetramer positive cells (Fig. 5a) with the frequency of the same V β families in TILs detected by the TCR CDR3 sequence (Fig. 5b). Interestingly, we found a better correlation (r^2) of V β s expressed by TILs with that of HER2/neu₃₆₉₋₃₇₇ specific CD8+ T cells in blood samples after than before anti-TTx (r^2 : 0.47 and r^2 : 0.15 respectively) with a high correlation of V β 04 (Fig. 5c). These results suggest that the anti-TTx induced an increase of HER2/neu₃₆₉₋₃₇₇ specific CD8+ T cells capable of infiltrating the tumor and that this increase can be detected in the peripheral blood of this patient.

Discussion

Previous results obtained by our group showed that alpha DCs generated in two days (2d-aDCs) has a mature phenotype similar to those generated by Mailliard et al., in seven days [12] and also similar to standard DCs generated in seven (7d-stDCs) [12, 22] or two (2d-stDCs) days [23, 24] (DB et al., manuscript in preparation). One of the major functional characteristics of aDCs is the secretion of IL-12 and we found that 2d-aDCs secrete IL-12 more efficiently than 2d-stDCs (data not shown) suggesting that 2d-aDCs are not in an exhausted state [25]. The production of IL-12 by DCs is of paramount importance for plasma cell differentiation; for antibody production promoted by follicular CD4+ T-helper cells (TFH) [26] and for the generation of anti-tumor specific CD8+ T cells [27–29] both in vitro [30] and in vivo [31], hence, IL-12 production by DCs is considered one important requirement for DC-based cancer immunotherapy. In this work, we use 2d-aDCs as a tool for assess Th1 response against TAAs and to monitor the responsiveness of anti-tumor specific T cells induced in cancer patients by anti-TTx.

To evaluate the immune response of the T cell compartment in patients with breast cancer, we established an in vitro method of polyclonal stimulation of T cells to assess the responsiveness of T cells characterized by internalization of CD3, the expression of different activation markers and secretion of Th1 cytokines. This system enabled us to determine that before the anti-TTx, T cells obtained from a breast cancer patient who is free of disease after several years of completion of the anti-TTx, exhibited a pronounced defect in responsiveness to stimuli and that anti-TTx efficiently rescued the sensitiveness of T cells to TCR stimulation. The responsiveness of the T cell compartment to the stimulus elicited by anti-TTx was measured through different immunological readouts such as TCR internalization, surface expression of activation markers and secretion of cytokine that

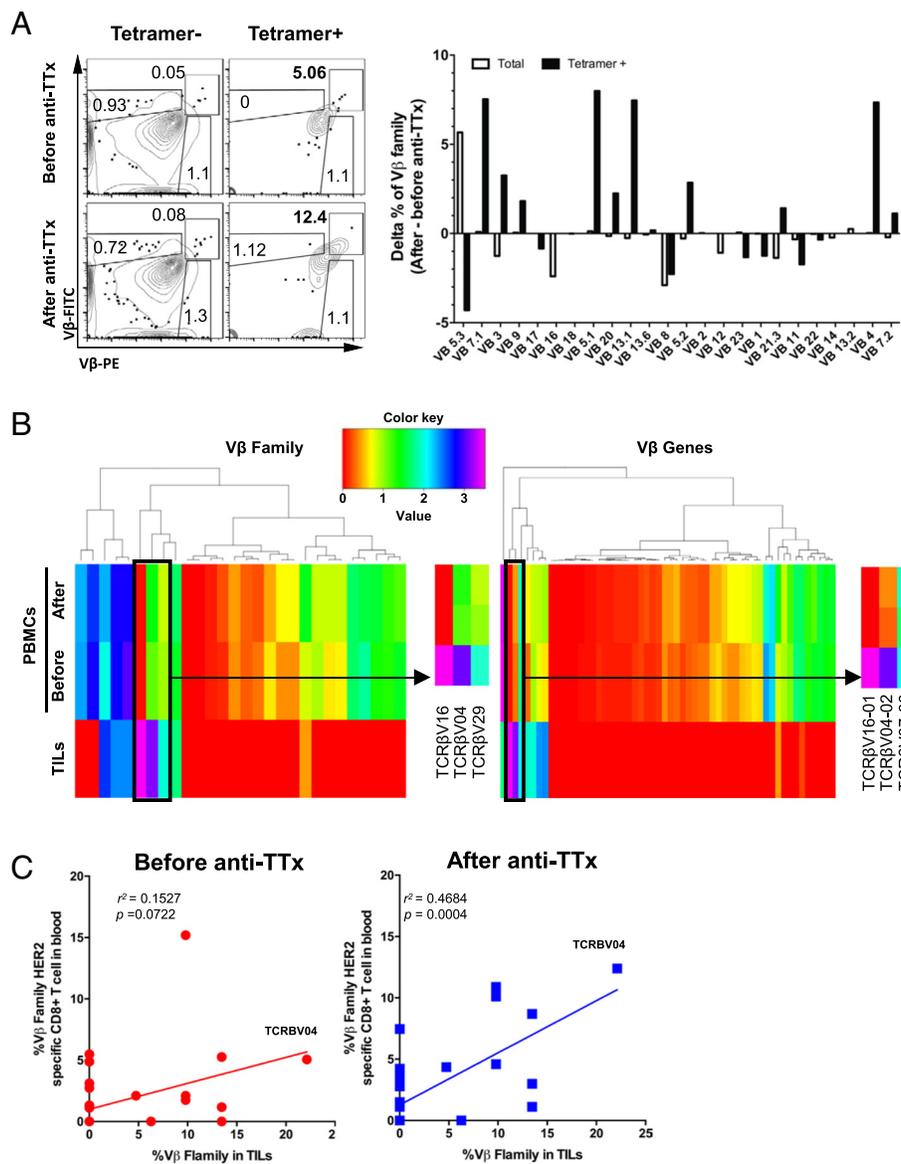


Fig. 5 Increased correlation of TCR Vβ families between tumor infiltrating lymphocytes and HER2/neu tetramer CD8+ T cells after chemotherapy. **a.** Dot plot example of an ex vivo flow cytometry analysis of TCR-Vβ families 13.2, 4 and 7.2 in CD8+ T cells HER2/neu₃₆₉₋₃₇₇ tetramer negative vs. tetramer positive from before and after anti-TTx cells, each gate represents one TCR-Vβ family, PE positive correspond to Vβ13.2, the double positive cells corresponds to family Vβ4, and FITC positive corresponds to family Vβ7.2, numbers correspond to percentage of each family, left; Delta of the percentage of each of 24 families (after minus before therapy) in total CD8+ T cells (empty bars) or tetramer positive CD8+ T cells (black bars), right. **b.** Heat map of sequenced TCRs from total PBMCs (before and after anti-TTx) and Tumor Infiltrating Lymphocytes (TILs) from FFPE tumor tissue slice. Arrows points insert of highly expressed of TCR Vβ families and genes in TILs. **c.** Correlation plots of Vβ families of HER2/neu₃₆₉₋₃₇₇ tetramer positive cells (red corresponds to before anti-TTx sample, and blue corresponds to after anti-TTx sample) analyzed by flow cytometry vs. the percentage of Vβ families obtained from TILs. Pre-chemotherapy r^2 : 0.164, p value: 0.017, post-chemotherapy r^2 : 0.477, p value: <0.0001 (linear regression analysis)

were low in cells before therapy but that in T cells from the patient after anti-TTx reached similar levels to those observed in stimulated T cells from healthy individuals (Fig. 2). These results support the adjuvant effect of the anti-TTx in the T cell compartment of breast cancer patients proposed by others in preclinical studies of cancer

mouse models [32]. Based on these observations, we are currently analyzing this phenotype in a series of patients with breast cancer before and after treatment with neoadjuvant chemotherapy with anthracyclines (doxorubicin) and cyclophosphamide with similar results (DB et al., manuscript in preparation).

In order to evaluate the functional capacity of 2d-aDCs to induce expansion of TAA-specific T cells, two *in vitro* culture conditions were used (Additional file 2: Figure S2); the first condition was used to determine the degree of expansion and activation of T cells that recognize different TAA present in the pool of memory CD8⁺ T cells and the second to assess the response of naïve T lymphocytes to priming *in vitro* with these TAAs. As described previously, the anti-TTx resulted in the recovery of the T cell responsiveness to a polyclonal stimulus. To demonstrate the effect of anti-tumor therapy in response of antigen specific T cells, it was compared in both culture systems the capacity of anti-TTx to favors the expansion *in vitro* of TAA specific T cells after chemotherapy using as APCs 2d-aDC or 2d-stDCs to stimulate T cells. The results suggest that 2d-aDCs are more efficient than 2d-stDCs in evidencing the expansion of TEMRA CD8⁺ T cells specific for TAAs favored by anti-TTx (Fig. 2). Notably, the expansion of naïve T cells in post-chemotherapy samples primed *in vitro* with 2d-aDCs pulsed with TAAs increased IFN- γ and TNF- α in supernatants of CD8⁺ T cells (Additional file 5: Figure S4). Furthermore, the stimulatory capacity of the anti-TTx on CD8⁺ T lymphocytes was evidenced in the expansion of TEMRA CD8⁺ T cells specific for HER2/neu_{369–377} (KIFGSLAFL) epitope only in samples after anti-TTx contrary to the conserved response to viral antigens before and after anti-TTx (Fig. 4). Also HER2/neu specific T cells expressed high levels of CTLA-4 (Fig. 4e), interestingly the expression of CTLA-4 as a biomarker of stimulated CD8⁺ T cells has been associated with a favorable clinical response in patients in immunotherapy treated with anti-PD-L1 [33]. These results are consistent with the recent analysis of Speiser and colleagues in the sense that the expression on CD8⁺ T cells of molecules such as PD-1, BTLA and CTLA-4 does not mark necessarily cells with a reduced T cell function but rather mark different subsets of activated T cells linked to positive clinical outcomes [19]. Together these results suggest that in this patient with breast cancer, 2d-aDCs allow the expansion of tumor specific T cells favored by chemotherapy and they could be used to monitor the immunological effects of the anti-TTx on tumor specific T cells. Hence we propose that the observed competence as APCs of 2d-aDCs derived *in situ* from PBMCs will be a useful system for monitoring tumor specific T cells using small volumes of blood in patients with cancer in anti-tumor treatment.

Different studies using next generation sequencing (NGS) show an anti-tumor effect of anti-TTx on the T cell repertoire in different tumors such as lung [34] and colorectal cancer [35]. Combining strategies proposed by Pilch et al., [20] and Robins et al., [21] we analyzed the frequency of TCR V β by FC and the identity of TCR

CDR3 through NGS to optimize the assessment of TCR repertoire of anti-tumor cells in the patient MCC-002. To establish the identity of TILs we analyzed the V β repertoire of TILs in the diagnosis biopsy using FFPE as source of tumor tissue followed by CDR3 sequencing using NGS. The repertoire of TILs was then compared to that obtained *ex vivo* from blood samples before and after anti-TTx. The results of the analysis of the CDR3 repertoire in the biopsy and in blood before and after therapy lead us to suggest that anti-TTx favors the expansion in peripheral blood of tumor specific T cells that infiltrate the tumor before therapy. Altogether our results suggest that the use of FFPE as a source of tumor tissue combined with NGS and the detection and functional analysis of T cells that recognize TAAs in blood using fluorescent tetramers may be useful to monitor both the dynamics of the traffic of TILs between tumor and peripheral blood and for the assessment of the functional status of these cells in peripheral blood during anti-TTx.

Evaluating to what extent clinical response to cancer is attributable to the activation of anti-tumor T cells induced by chemo- or radiotherapy is currently a matter of interest of numerous clinical studies [36]. Similar to what was shown in patients with colorectal cancer under radiotherapy [37]; in the present study using 2d-aDCs we found that the anti-TTx stimulates CD8⁺ anti-tumor T cells. The use of these cells as APCs reveals a stimulatory effect of anti-TTx on the responsiveness of CD8⁺ T cells specific for TAAs in breast cancer patients. The results presented here, were possible by the considerably amount of cells obtained from an ideal patient (Her2/neu⁺⁺⁺, HLA-A*02:01), are limited by the number of patients that could be followed up with this deep immunological study. The recovery of the unresponsiveness observed prior anti-TTx is reflected in the improvement in T cell function. As a whole, our results suggest that evidencing the adjuvant effect of the anti-TTx in breast cancer that can be explored in other tumors.

Conclusions

The anti-tumor therapy benefits the immune response of the treated patient. This benefit was evidenced *in vitro* by increasing the T cell responsiveness and expanding tumor-specific CD8⁺ T cells in peripheral blood with a functional phenotype of memory effector cells. This *in vitro* approach can be implemented in a cohort of breast cancer patients in order to evidence the effect of other chemotherapy regimens that includes anthracyclines, known for inducing immunogenic cell death in tumor cells, and to establish a possible predictive marker for clinical response.

Additional files

Additional file 1: Figure S1. Timeline of MCC-002 treatment. A 63-year-old woman (MCC-002) was diagnosed with invasive ductal breast carcinoma (stage II, T2N3M0) after a suggestive result in a control process by mammography (BIRADS 6). After the realization of the biopsy, the tumor is positive for HER2/neu (C-erb2), and NY-ESO 1, and negative for hormonal receptors (ER and PR), with compromised axillary lymph nodes but no evidence of bone metastasis. This patient was screened for HLA-A2 by flow cytometry that was confirmed by SSP-PCR for HLA-A*02:01. After signed informed consent, we obtained by leukapheresis a preparation of 150 mL buffy coat enriched in peripheral blood mononuclear cells (PBMC). This patient was treated with modified radical mastectomy (MRM) of the left breast including axillary clearance (5 of 21 lymph nodes were compromised with tumor), with no complications. After surgery (September 2008), the patient was treated with 12 weekly doses of paclitaxel (150 mg) and was programmed for one year of treatment with trastuzumab (440 mg every three weeks) and four weeks of radiotherapy (2.5Gy daily). In March 2009, after the fifth dose of trastuzumab and four doses of radiotherapy, the patient experimented acute cardiac failure with a ventricular ejection fraction (VEF) below 30 % (VEF on August 2008 prior surgery was 59 %). Because cardiac toxicity, the chemo- and radio-therapy were suspended. The cardiac failure was managed successfully with spironolactone (50 mg/daily) and furosemide (40 mg/12 h). The follow-up mammographies were negative (BIRADS 2 for the contralateral breast). Finally, 8 months after the suspension of anti-tumor treatment, a second leukapheresis was obtained in order compare prior vs. after anti-TTx the effect of treatment on the immune response using a number of experimental readouts. Currently, MCC-002 maintains with a clinical complete response after 7 years of the anti-tumor therapy suspension controlled with annual mammography. (TIF 437 kb)

Additional file 2: Figure S2. Flowchart of the methodology used for cell culture with 2d-aDCs and 2d-stDCs. A. Methodology for *in situ* induction of 2d-aDC and 2d-stDC in total PBMCs (based on the methodology of Martinuzzi et al., [13]). PBMCs were stimulated for 24 h with IL-4 and GM-CSF with peptide(s) and matured with a combination of proinflammatory cytokines and TLR ligands for the corresponding DCs with or without a new addition of the corresponding peptide(s) for 6 days. B. T cell stimulation scheme based on the methodology described by Moser et al., [14]. Briefly, 2d-aDCs and 2d-stDCs were derived from monocytes and cultured with purified autologous naïve CD4+ or CD8+ T cells for 14 days and re-stimulated for 6 days with peptide (5 μM)-pulsed 2d-aDCs or 2d-stDCs. (TIF 308 kb)

Additional file 3: TCR raw data sequence from PBMCs obtained before and after therapy and TILs obtained from FFPE tumor. (XLSX 27054 kb)

Additional file 4: Figure S3. Expression recovery of CD25 and CD154 in T cells after chemotherapy. Fold percentage of CD25 (left) and CD154 (right) in CD3 positive T cells relative to un-stimulated PBMCs as described in Fig. 5 in healthy donors (Dashed bars) ($n = 3$) and a breast cancer patient (pre and post chemotherapy white and black bars respectively), bars show SEM. Results of experiments presented are representative of three performed. (TIF 175 kb)

Additional file 5: Figure S4. High IFN- γ and TNF- α secretion from CD8+ and CD4+ T cells after anti-TTx when stimulated with 2d-aDCs. Delta of IFN- γ and TNF- α concentration in pg/mL (pulsed minus unpulsed DCs culture) in the supernatants of CD8+ and CD4+ T cells subsequent to stimulation for 14 days, with boosting for 6 days in samples before and after anti-TTx with 2d-aDCs or 2d-stDCs pulsed with HER2 peptides. Results of experiments presented are representative of two performed, x = data not detected. (TIF 317 kb)

Abbreviations

2d-aDCs, two-day derived alpha dendritic cells; 2d-stDCs, two-day derived standard dendritic cells; anti-TTx, anti-tumor therapy; APCs, antigen presenting cells; CBA, cytometric bead array; CTL, cytotoxic lymphocytes; DCs, dendritic cells; DMSO, dimethyl sulfoxide; FBS, fetal bovine serum; FC, flow cytometry;

FFPE, formalin-fixed paraffin embedded; iDCs, immature dendritic cells; IL, interleukin; moDCs, monocyte derived Dendritic Cells; NGS, next generation sequencing (NGS); PBMCs, peripheral blood mononuclear cells; TAAs, tumor associated antigens; TCM, central memory T cell; TEM, effector memory T cell; TEMRA, effector memory CD45RA+ T cell; TILs, tumor infiltrating lymphocytes; TLR, toll-like receptors; TN, naïve T cell; TSCM, stem cell like memory T cell

Acknowledgments

This study was supported through funding from the Universidad Nacional de Colombia. DIB, Vicedecanatura de Investigación Universidad Nacional Medical School; funds from a joint grant between Fundación Salud de los Andes, Universidad Nacional and COLCIENCIAS. The authors express their gratitude to Dr. Fabio Méndez CEO at the Fundación Salud de los Andes (FSA) and to FSA for their generous support. The authors would also like to thank Dr. Bernardo Camacho and to personnel at the Hemocentro Distrital for their kind assistance in obtaining blood buffy coats from volunteers. We are very thankful to Dr. Larry Stern, Dr. Mauricio Calvo-Calle and personnel at their laboratories at the University of Massachusetts for their generous support in providing reagents, infrastructure and knowledge required for building up HLA-A2 tetramers. We thank Dr. Manuel Patarroyo and personnel at the Fundación Instituto de Inmunología de Colombia (FIDIC) for assistance with peptide synthesis. Finally, our deepest gratitude to volunteers (especially to the patient MCC-002) and healthy volunteers for their generous denotation of blood samples used in this study.

Funding

This work was funded through Dirección de Investigación de Bogotá (DIB)-HERMES Grants (Numbers 13245, 12543 and 14976) from the Universidad Nacional de Colombia and funds from the joint grant between Fundación Salud de los Andes, Universidad Nacional and COLCIENCIAS (Contract No. 110150227509). DBE was supported by the Fundación Salud de los Andes, Bogotá-Colombia South America. Adaptive Biotechnologies Corp. support sequences analyses by Young Investigator Award granted to DBE.

Availability of data and materials

Datasets of TCR sequencing is available *in situ* supporting materials.

Authors' contributions

Conceived and designed the experiments: DBE, CPL. Performed the experiments: DBE. Analyzed the data: DBE, RS, RT, CPL. Contributed reagents/materials/analysis tools: DBE, RS, RT, CPL. Wrote the paper: DBE, CPL. All authors read and approved the final manuscript.

Authors' Information

DBE: MD and PhD candidate in Biomedical Sciences, Research associated of Fundación Salud de los Andes.

RS: MD Surgeon oncologist of breast and soft tissue, Director of the Clínica del Seno.

RT: MD Oncohematology, Director of the Oncology service at Hospital Occidental de Kennedy.

CPL: MD and PhD, Director of the Graduated in Biomedical Sciences program at Universidad Nacional de Colombia.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Consent for publication

The patient MCC-002 and all healthy donors signed the form to publish their personal and clinical data.

Ethics approval and consent to participate

This study was approved by the ethics committee of the Medical School – Universidad Nacional de Colombia (CE-14, 9, Act. 107). The patient MCC-002 and all healthy donors signed the inform consent before obtaining the blood samples.

Author details

¹Immunology and Translational Medicine Research Group, Graduated School in Biomedical Sciences, Department of Microbiology, Medical School, Universidad Nacional de Colombia, Carrera 30 #45-03 Building 471, office 304, Bogotá, Colombia South-America. ²Immunology and Clinical Oncology

Research Group (GIIOC), Fundación Salud de los Andes, Calle 44 No. 58-05, Bogotá, Colombia South-America. ³Clinica del Seno, Carrera 11 # 68-36, Bogotá, Colombia South-America. ⁴Hospital Occidente de Kennedy E.S.E., Servicio de Oncología, Bogotá, Colombia South-America. ⁵Facultad de Medicina, Departamento de Microbiología, Universidad Nacional de Colombia, Carrera 30 Calle 45, Bogotá, Colombia.

Received: 10 March 2016 Accepted: 26 July 2016

Published online: 03 August 2016

References

- Galon J, Costes A, Sanchez-Cabo F, Kirilovsky A, Mlecnik B, Lagorce-Pages C, Tosolini M, Camus M, Berger A, Wind P, et al. Type, density, and location of immune cells within human colorectal tumors predict clinical outcome. *Science*. 2006;313(5795):1960–4.
- Zitvogel L, Kepp O, Kroemer G. Immune parameters affecting the efficacy of chemotherapeutic regimens. *Nat Rev Clin Oncol*. 2011;8(3):151–60.
- Staveley-O'Carroll K, Sotomayor E, Montgomery J, Borrello I, Hwang L, Fein S, Pardoll D, Levitsky H. Induction of antigen-specific T cell anergy: An early event in the course of tumor progression. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998;95(3):1178–83.
- Baniyash M. TCR zeta-chain downregulation: curtailing an excessive inflammatory immune response. *Nat Rev Immunol*. 2004;4(9):675–87.
- Liang X, Weigand LU, Schuster IG, Eppinger E, van der Griendt JC, Schub A, Leisegang M, Sommermeyer D, Anderl F, Han Y, et al. A single TCR alpha-chain with dominant peptide recognition in the allorestricted HER2/neu-specific T cell repertoire. *J Immunol*. 2010;184(3):1617–29.
- Alanio C, Lemaitre F, Law HK, Hasan M, Albert ML. Enumeration of human antigen-specific naive CD8+ T cells reveals conserved precursor frequencies. *Blood*. 2010;115(18):3718–25.
- Sallusto F, Lenig D, Forster R, Lipp M, Lanzavecchia A. Two subsets of memory T lymphocytes with distinct homing potentials and effector functions. *Nature*. 1999;401(6754):708–12.
- Restifo NP, Dudley ME, Rosenberg SA. Adoptive immunotherapy for cancer: harnessing the T cell response. *Nat Rev Immunol*. 2012;12(4):269–81.
- June CH. Principles of adoptive T cell cancer therapy. *J Clin Invest*. 2007;117(5):1204–12.
- Geiger R, Duhen T, Lanzavecchia A, Sallusto F. Human naive and memory CD4+ T cell repertoires specific for naturally processed antigens analyzed using libraries of amplified T cells. *J Exp Med*. 2009;206(7):1525–34.
- Schuler G, Schuler-Thurner B, Steinman RM. The use of dendritic cells in cancer immunotherapy. *Curr Opin Immunol*. 2003;15(2):138–47.
- Mailliard RB, Wankowicz-Kalinska A, Cai Q, Wesa A, Hilkens CM, Kapsenberg ML, Kirkwood JM, Storkus WJ, Kalinski P. alpha-type-1 polarized dendritic cells: a novel immunization tool with optimized CTL-inducing activity. *Cancer Res*. 2004;64(17):5934–7.
- Martinuzzi E, Afonso G, Gagnerault MC, Naselli G, Mittag D, Combadiere B, Boitard C, Chaput N, Zitvogel L, Harrison LC, et al. acDCs enhance human antigen-specific T-cell responses. *Blood*. 2011;118(8):2128–37.
- Moser JM, Sassano ER, Leistritzdel C, Eatrises JM, Phogat S, Koff W, Drake 3rd DR. Optimization of a dendritic cell-based assay for the in vitro priming of naive human CD4+ T cells. *J Immunol Methods*. 2010;353(1–2):8–19.
- Scandella E, Men Y, Gillessen S, Forster R, Groettrup M. Prostaglandin E2 is a key factor for CCR7 surface expression and migration of monocyte-derived dendritic cells. *Blood*. 2002;100(4):1354–61.
- Jonuleit H, Kuhn U, Muller G, Steinbrink K, Paragnik L, Schmitt E, Knop J, Enk AH. Pro-inflammatory cytokines and prostaglandins induce maturation of potent immunostimulatory dendritic cells under fetal calf serum-free conditions. *Eur J Immunol*. 1997;27(12):3135–42.
- Czerniecki BJ, Koski GK, Koldovsky U, Xu S, Cohen PA, Mick R, Nisenbaum H, Pasha T, Xu M, Fox KR, et al. Targeting HER-2/neu in early breast cancer development using dendritic cells with staged interleukin-12 burst secretion. *Cancer Res*. 2007;67(4):1842–52.
- Crespo J, Sun H, Welling TH, Tian Z, Zou W. T cell anergy, exhaustion, senescence, and stemness in the tumor microenvironment. *Curr Opin Immunol*. 2013;25(2):214–21.
- Fuertes Marraco SA, Neubert NJ, Verdeil G, Speiser DE. Inhibitory Receptors Beyond T Cell Exhaustion. *Front Immunol*. 2015;6:310.
- Pilch H, Hohn H, Freitag K, Neukirch C, Necker A, Haddad P, Tanner B, Knapstein PG, Maeurer MJ. Improved assessment of T-cell receptor (TCR) VB repertoire in clinical specimens: combination of TCR-CDR3 spectratyping with flow cytometry-based TCR VB frequency analysis. *Clin Diagn Lab Immunol*. 2002;9(2):257–66.
- Robins HS, Srivastava SK, Campregher PV, Turtle CJ, Andriesen J, Riddell SR, Carlson CS, Warren EH. Overlap and effective size of the human CD8+ T cell receptor repertoire. *Sci Transl Med*. 2010;2(47):47ra64.
- Sallusto F, Lanzavecchia A. Efficient presentation of soluble antigen by cultured human dendritic cells is maintained by granulocyte/macrophage colony-stimulating factor plus interleukin 4 and downregulated by tumor necrosis factor alpha. *J Exp Med*. 1994;179(4):1109–18.
- Obermaier B, Dauer M, Herten J, Schad K, Endres S, Eigler A. Development of a new protocol for 2-day generation of mature dendritic cells from human monocytes. *Biol Proced Online*. 2003;5:197–203.
- Dauer M, Schad K, Herten J, Junkmann J, Bauer C, Kiefl R, Endres S, Eigler A. FastDC derived from human monocytes within 48 h effectively prime tumor antigen-specific cytotoxic T cells. *J Immunol Methods*. 2005;302(1–2):145–55.
- Kalinski P, Schuitemaker JH, Hilkens CM, Wierenga EA, Kapsenberg ML. Final maturation of dendritic cells is associated with impaired responsiveness to IFN-gamma and to bacterial IL-12 inducers: decreased ability of mature dendritic cells to produce IL-12 during the interaction with Th cells. *J Immunol*. 1999;162(6):3231–6.
- Jacquemin C, Schmitt N, Contin-Bordes C, Liu Y, Narayanan P, Seneschal J, Maurouard T, Dougall D, Davizon ES, Dumortier H, et al. OX40 Ligand Contributes to Human Lupus Pathogenesis by Promoting T Follicular Helper Response. *Immunity*. 2015;42(6):1159–70.
- Kalinski P, Edington H, Zeh HJ, Okada H, Butterfield LH, Kirkwood JM, Bartlett DL. Dendritic cells in cancer immunotherapy: vaccines or autologous transplants? *Immunol Res*. 2011;50(2–3):235–47.
- Berk E, Muthuswamy R, Kalinski P. Lymphocyte-polarized dendritic cells are highly effective in inducing tumor-specific CTLs. *Vaccine*. 2012;30(43):6216–24.
- Okada H, Lieberman FS, Walter KA, Lunsford LD, Kondziolka DS, Bejjani GK, Hamilton RL, Torres-Trejo A, Kalinski P, Cai Q, et al. Autologous glioma cell vaccine admixed with interleukin-4 gene transfected fibroblasts in the treatment of patients with malignant gliomas. *J Transl Med*. 2007;5:67.
- Butterfield LH, Gooding W, Whiteside TL. Development of a potency assay for human dendritic cells: IL-12p70 production. *J Immunother*. 2008;31(1):89–100.
- Okada H, Kalinski P, Ueda R, Hoji A, Kohanbash G, Donegan TE, Mintz AH, Engh JA, Bartlett DL, Brown CK, et al. Induction of CD8+ T-cell responses against novel glioma-associated antigen peptides and clinical activity by vaccinations with alpha-type 1 polarized dendritic cells and polyinosinic-polycytidylic acid stabilized by lysine and carboxymethylcellulose in patients with recurrent malignant glioma. *J Clin Oncol*. 2011;29(3):330–6.
- Zitvogel L, Galluzzi L, Smyth MJ, Kroemer G. Mechanism of action of conventional and targeted anticancer therapies: reinstating immunosurveillance. *Immunity*. 2013;39(1):74–88.
- Herbst RS, Soria JC, Kowanetz M, Fine GD, Hamid O, Gordon MS, Sosman JA, McDermott DF, Powderly JD, Gettinger SN, et al. Predictive correlates of response to the anti-PD-L1 antibody MPDL3280A in cancer patients. *Nature*. 2014;515(7528):563–7.
- Fang H, Yamaguchi R, Liu X, Daigo Y, Yew PY, Tanikawa C, Matsuda K, Imoto S, Miyano S, Nakamura Y. Quantitative T cell repertoire analysis by deep cDNA sequencing of T cell receptor alpha and beta chains using next-generation sequencing (NGS). *Oncoimmunology*. 2014;3(12):e968467.
- Luo W, Liao WJ, Huang YT, Shi M, Zhang Y, Wen Q, Zhou MQ, Ma L. Normalization of T cell receptor repertoire diversity in patients with advanced colorectal cancer who responded to chemotherapy. *Cancer Sci*. 2011;102(4):706–12.
- Aranda F, Buque A, Bloy N, Castoldi F, Eggermont A, Cremer I, Fridman WH, Fucikova J, Galon J, Spisek R, et al. Trial Watch: Adoptive cell transfer for oncological indications. *Oncoimmunology*. 2015;4(11):e1046673.
- Schae D, Comin-Anduix B, Ribas A, Zhang L, Goodglick L, Sayre JW, Debucquoy A, Haustermans K, McBride WH. T-cell responses to survivin in cancer patients undergoing radiation therapy. *Clin Cancer Res*. 2008;14(15):4883–90.

BMC Cancer

MONITORING THE RESPONSIVENESS OF T AND ANTIGEN PRESENTING CELL COMPARTMENTS IN BREAST CANCER PATIENTS IS USEFUL TO PREDICT CLINICAL TUMOR RESPONSE TO NEOADJUVANT CHEMOTHERAPY

--Manuscript Draft--

Manuscript Number:	BCAN-D-17-00109	
Full Title:	MONITORING THE RESPONSIVENESS OF T AND ANTIGEN PRESENTING CELL COMPARTMENTS IN BREAST CANCER PATIENTS IS USEFUL TO PREDICT CLINICAL TUMOR RESPONSE TO NEOADJUVANT CHEMOTHERAPY	
Article Type:	Research article	
Section/Category:	Translational oncology	
Funding Information:	Dirección de Investigación, Universidad Nacional de Colombia (CO) (13245, 12543, 14976)	Dr. Carlos Alberto Parra-Lopez
	Fundación Salud de los Andes, Universidad Nacional de Colombia y Colciencias (110150227509)	Dr. Carlos Alberto Parra-Lopez
Abstract:	<p>Background: Vaccination of mice with tumors treated with Doxorubicin promotes a T cell immunity that relies on dendritic cell (DC) activation and is responsible for tumor control in vaccinated animals. Despite Doxorubicin in combination with Cyclophosphamide (A/C) is widely used to treat breast cancer patients, the stimulating effect of A/C on T and APC compartments and its correlation with patient's clinical response remains to be proved. Method: In this work, we designed an in vitro system to monitor various immunological readouts in PBMCs obtained from breast cancer patients before, and after neoadjuvant anti-tumor therapy with A/C. Results: The results show that before treatment, T cells and DCs, exhibit a marked unresponsiveness to stimulus: whereas T cells exhibit poor TCR internalization and limited expression of CD154 in response to anti-CD3/CD28/CD2 stimulation, DCs secrete low levels of IL-12p70 and limited CD83 expression in response to pro-inflammatory cytokines. Conclusions: Notably, the limited interaction between T and APCs prior therapy was significantly recovered after treatment, and furthermore, the recovery of T and APC functionality correlates with tumor regression and patients' TNM stage. Altogether, our results let us to argue that this model is suitable to predict tumor response and to monitor the recovery of immune surveillance during chemotherapy.</p>	
Corresponding Author:	Carlos Alberto Parra-Lopez, MD, PhD. Universidad Nacional de Colombia Bogota, Cundinamarca COLOMBIA	
Corresponding Author Secondary Information:		
Corresponding Author's Institution:	Universidad Nacional de Colombia	
Corresponding Author's Secondary Institution:		
First Author:	David Andres Bernal-Estévez, M.D., PhD.	
First Author Secondary Information:		
Order of Authors:	David Andres Bernal-Estévez, M.D., PhD.	
	Oscar García, MD	
	Ramiro Sánchez, MD	
	Carlos Alberto Parra-Lopez, MD, PhD.	
Order of Authors Secondary Information:		
Opposed Reviewers:		

[Click here to view linked References](#)

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

1 **MONITORING THE RESPONSIVENESS OF T AND ANTIGEN PRESENTING CELL**
2 **COMPARTMENTS IN BREAST CANCER PATIENTS IS USEFUL TO PREDICT**
3 **CLINICAL TUMOR RESPONSE TO NEOADJUVANT CHEMOTHERAPY**

4 David Bernal-Estévez^{¶§}, Oscar García[‡], Ramiro Sánchez^{§€}, and Carlos A. Parra-López^{§*£}

5 [§]Universidad Nacional de Colombia, Graduated School in Biomedical Sciences. Department of
6 Microbiology, Carrera 30 Calle 45, Bogotá-Colombia South-America.

7 [‡]Instituto Nacional de Cancerología, Servicio de seno y tejidos blandos, Calle 1 Carrera 9,
8 Bogotá-Colombia South-America.

9 [€]Clínica del Seno, Carrera 11 calle 68, Bogotá-Colombia South-America.

10 [¶]Immunology and Clinical Oncology Research Group (GIIOC). Fundación Salud de los Andes,
11 Bogotá-Colombia South-America.

12

13 [£] Corresponding author: Carlos A. Parra-López, e-mail: caparral@unal.edu.co

14 **Authors' e-mail:**

15 DBE: dabernale@unal.edu.co

16 OG: osaga72@gmail.com

17 RS: ramirosr@cable.net.co

18 CPL: caparral@unal.edu.co

19

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

22 **ABSTRACT**

23 **Background:** Vaccination of mice with tumors treated with Doxorubicin promotes a T cell
24 immunity that relies on dendritic cell (DC) activation and is responsible for tumor control in
25 vaccinated animals. Despite Doxorubicin in combination with Cyclophosphamide (A/C) is widely
26 used to treat breast cancer patients, the stimulating effect of A/C on T and APC compartments and
27 its correlation with patient’s clinical response remains to be proved. **Method:** In this work, we
28 designed an in vitro system to monitor various immunological readouts in PBMCs obtained from
29 breast cancer patients before, and after neoadjuvant anti-tumor therapy with A/C. **Results:** The
30 results show that before treatment, T cells and DCs, exhibit a marked unresponsiveness to
31 stimulus: whereas T cells exhibit poor TCR internalization and limited expression of CD154 in
32 response to anti-CD3/CD28/CD2 stimulation, DCs secrete low levels of IL-12p70 and limited
33 CD83 expression in response to pro-inflammatory cytokines. **Conclusions:** Notably, the limited
34 interaction between T and APCs prior therapy was significantly recovered after treatment, and
35 furthermore, the recovery of T and APC functionality correlates with tumor regression and
36 patients’ TNM stage. Altogether, our results let us to argue that this model is suitable to predict
37 tumor response and to monitor the recovery of immune surveillance during chemotherapy.

38

39 **KEYWORDS**

40 Breast cancer, Chemotherapy, neoadjuvant, T cells, Dendritic Cells, Doxorubicin, immune-
41 monitoring

42

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

43 **BACKGROUND**

44 Pre-clinical experimental evidence suggests that tumor treatment with some chemo- radiotherapy
45 regimens induce in tumor cells immunogenic cell death (ICD) that promotes the antigenicity and
46 immunogenicity of tumors [1]. The immunogenicity of tumor cells dying via ICD is favored by
47 cross-presentation of antigens by DCs to anti-tumor CD8 T-cells responsible for controlling the
48 tumor. Retrospective studies have confirmed that cancer patients treated with Doxorubicin having
49 mutations in molecular components involved in recognition of tumor cells that die by ICD have
50 shorter overall survival and a higher risk of metastatic disease [2].

51 Clinical evidence on the immunogenicity of tumors induced by anti-tumor therapy has shown that
52 a good clinical response to Doxorubicin is correlated with changes in immune contexture of the
53 tumor [3, 4]. Furthermore, the study of biomarkers in colon cancer to predict clinical response has
54 identified immunological signatures in the tumor microenvironment with predictive and
55 prognostic value [4, 5]. The efforts to demonstrate a relationship between immunogenicity of
56 tumors induced by chemotherapy and anti-tumor immune signatures in breast cancer (BC) patients
57 with clinical response to treatment have yielded some evidence in this direction [6, 7]. Despite,
58 these studies for the identification of biomarkers with the potential to predict chemotherapeutic
59 responses in BC are encouraging, blood-based monitoring systems to predict clinical response to
60 treatment does not exist. In the case of BC patients under neoadjuvant therapy, the identification
61 of predictive markers of clinical response using whole blood or PBMCs is desirable because this
62 would help the adjustment of the chemotherapy regimes in trying to achieve pathological complete
63 responses (pCR) in all patients treated.

64

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

65 Tumor growth is the result of tumor escape of immune surveillance due to a poor performance of
66 T and APC compartments [8]. Although experimental evidence suggests that primary
67 chemotherapy with Doxorubicin induces ICD that favors anti-tumor responses and changes in the
68 contexture of the tumor, the effect of Doxorubicin on T and APC compartments in patients under
69 primary chemotherapy is yet to be demonstrated. We hypothesized that a favorable clinical
70 response of BC tumors to neoadjuvant therapy with Doxorubicin and Cyclophosphamide (A/C)
71 will revert suppression in these two compartments. In a recent study we design an in vitro system
72 to monitor the specific anti-tumor response before and after anti-tumor therapy [9]. Our results
73 suggest that the status of disease-free survival and a complete clinical response is supported by
74 tumor-specific T lymphocytes induced by anti-tumor treatment. To generate clinical evidence that
75 chemotherapeutic agents inducing ICD restores immunosurveillance of the T and APC
76 compartments in cancer patients with clinical tumor response to Doxorubicin, in the present work
77 we studied a group of 23 patients with BC in neoadjuvant therapy (three cycles of A/C), whose
78 tumors experienced significant clinical response after chemotherapy. This behavior of the tumor
79 prompted us to investigate whether a favorable clinical response to primary chemotherapy (A/C)
80 is correlated with the better performance of T cells and APCs interaction. To do this, we compared
81 the immunological performance of T and APC compartments in peripheral blood of these patients
82 before and after chemotherapy. We found that the overall suppression of these two compartments
83 perceived before treatment is reversed after chemotherapy and this recovery correlates with
84 clinical response. Altogether our results let us argue four things: first, the unresponsiveness to
85 stimuli of T/APC compartments observed in these BC patients before treatment starts to recover
86 after three cycles of A/C; second, primary chemotherapy reestablished the crosstalk between
87 T/APC compartments; third, the recovery of this crosstalk is correlated with the clinical response

1
2
3
4 88 of the tumor and, fourth, monitoring T/APC compartments may be useful to identify predictive
5
6 89 biomarkers of tumor responsiveness to treatment.
7
8

9 90

10
11
12 91
13

14 15 16 92 **MATERIALS AND METHODS** 17

18
19 93 *Patients and blood samples:* This study was approved by the ethics committee of the Instituto
20
21 94 Nacional de Cancerología - Bogotá (Act 018 May 2012). The patients and all healthy donors had
22
23 95 signed an informed consent form before blood samples were taken. A total of 560 patients with
24
25 96 pathological diagnosis of Ductal carcinoma in situ (DCIS) were interviewed at the Instituto
26
27 97 Nacional de Cancerología and the Clínica del Seno (Bogotá-Colombia) between 2012 to 2015; of
28
29 98 these patients, 36% were eligible to be treated with Doxorubicin and Cyclophosphamide (A/C)
30
31 99 scheme as neoadjuvant chemotherapy and 22% of total patients express HER2+ in tumor biopsy;
32
33 100 a total of 23 patients were included in the study, and from those 15 were possible to obtain post-
34
35 101 treatment blood sample for paired and correlation analysis. After informed consent was signed,
36
37 102 two blood samples were taken (20 mL each) before and after three cycles of A/C chemotherapy.
38
39 103 Healthy women (HD). were used as controls (age-matched). PBMCs were isolated by density
40
41 104 gradient with Ficoll Hypaque (GE) and cryopreserved in liquid nitrogen in freezing media (RPMI-
42
43 105 1640 50%, FBS 40% and 10% of DMSO) upon use. Clinical data of the included patients is shown
44
45 106 in Table 1; tumor area was determined by multiplying the two longest diameters measured by
46
47 107 mammography or sonography before and after anti-tumor therapy. Categorical data of tumor size,
48
49 108 estrogen receptor, progesterone receptor and Ki-67 expression was separated as positive or
50
51 109 negative based on the mean in each category.
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

Flow Cytometry: For the analyses of different sub-populations and phenotype of T and APC we use specific staining panels. For *ex vivo* sub-populations in the PBMCs obtained from patients before and after treatment and HD we quantified in a single tube: (i) regulatory T cells, (ii) Myeloid-derived suppressor cells MDSCs, and (iii) Myeloid DCs and plasmacytoid DCs by the combination of the following antibodies: CD4-BV510, CD25-APC-Cy7, CD127-PECy5, FoxP3-Pacific Blue, Lin1-FITC (CD3, CD14, CD16, CD19, CD20, CD56), CD15-FITC, CD13-PE, CD33-PE, HLA-DR-PE Dazzle 594, CD11c-Alexa Fluor 700, and CD123-PECy7 (all from Biolegend); and Arg1-APC (R&D Systems). The gating strategy for *ex vivo* subpopulations is depicted in Figure 1B. For the phenotype of mature DCs, the following antibodies were used: Lin1-FITC, HLA-DR-PE Dazzle 594, CD11c-Alexa Fluor 700, CD123-PECy7, CD83-PECy5, CCR7-Alexa Fluor 647, and CD86-PE (all from Biolegend), the gating strategy is depicted in Figure 2A. For the analysis for TCR internalization and T cell activation markers, the following antibodies were used: CD3-FITC, CD154-APC, CD69-PECy7, CD25-PE (all from Biolegend). Finally, for cytokine secretion, we measure in the supernatant by CBA human Th1/2 and inflammatory cytokines of DCs after maturation and T cell activation (BD). Flow cytometry data was acquired using FACS Aria II (BD) and analyzed using FlowJo Software (Tree Star Inc.).

Functionality of APC and T cell compartments: The phenotype and functional capacity of monocyte-derived DCs was evaluated *in vitro* after exposure of PBMCs to IL-4 and GM-CSF as described by Martinuzzi et al. [10], and matured with pro-inflammatory cytokines in combination with Type I interferons as described by Mailliard et al. [11, 12]. Briefly, after induction of immature DCs (iDCs), a combination of IFN- γ (R&D systems), IFN- α (Intron-A-ROCHE), TNF- α , IL-6, IL-1 β (all from Cellgenix), and Poly I:C (Sigma-Aldrich). For DCs maturation phenotype, the expression of were analyzed in CD11c+, HLA-DR+, Lin1- cells by flow

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

133 cytometry (FC) in total PBMCs (Figure 2A), and IL-12p70 was quantified with Cytometric Bead
134 Array (CBA – BD Biosciences) in the supernatant of mature DCs culture. Simultaneously, for the
135 determination of responsiveness of T cells, 5×10^6 PBMCs/mL were stimulated 24 hours with a
136 mixture of anti-CD3, CD28, and CD2 microbeads (Miltenyi Biotec) in a ratio 2:1 (PBMC:beads)
137 cultured in AIM-V media (Thermo Fisher Scientific). After stimulation, we quantify the
138 internalization of TCR (reduction of CD3 MFI) and expression of CD69, CD25 and CD154 (MFI
139 and percentage) in CD3+ T cells as shown in Figure 3A, and C.

140 **Statistical analysis:** All immunological data were normalized against unstimulated controls (delta
141 between stimulated T cells or mature DCs with unstimulated T cells or iDCs respectively). Since
142 most of the readouts did not present a normal distribution, non-parametric tests were applied to
143 test for statistical differences between groups with Two-way ANOVA with Turkey’s multiple
144 comparison tests. For paired samples, we used Wilcoxon test. Receiver Operating Characteristic
145 (ROC) curves analysis were done with Prism 5 software (GraphPad). Factorial Analysis with
146 Principal Component Analysis (PCA) was made in SPSS (IBM – version 20), the component
147 matrix was rotated using Varimax rotation to facilitate the interpretation of PCA, two principal
148 components were extracted, and PC loadings of variables and PC scores of samples were a plot in
149 a two-dimensional graph. The multifactorial categorical analysis was done using Generalized
150 estimating equations (GEE) in STATA 13 software [13].

151
152 **RESULTS**

153 *After three cycles of antitumor therapy, the levels of different populations of suppressor cells do*
154 *not undergo significant changes in the peripheral blood.* Neoadjuvant anti-tumor therapy with

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

A/C is used in BC patients to induce a reduction in the tumor size before surgery. It is well known that anti-tumor therapy with A/C can produce a clinical response evidenced by the decrease in tumor size in most patients. The monitoring of tumor size in 23 patients with BC during neoadjuvant chemotherapy showed that after treatment pathological complete response (pCR) was not observed in either patient, however, tumors' size in 22/23 patients experienced a significant reduction (Figure 1A). Based on tumor decrease in this cohort, we explored the behavior of different immunological readouts before and after chemotherapy that could be associated with the clinical response. It is well known that tumor escape from immunosurveillance is favored by infiltration of the tumor by different populations of suppressor cells such as CD4+ CD25+ FoxP3+ regulatory (Tregs) [14], suppressor macrophages [15], Myeloid Derived Suppressor Cells (MDSCs) [16], and immature DCs, that inhibit tumor-specific T cells favoring escape from immune surveillance. Although some reports indicate that the expansion in the blood of some of these cells is a common finding in patients with BC [17-19], there is no published evidence on how anti-tumor therapy modulates the blood levels of these cells. To analyze whether the anti-tumor therapy induces changes in the levels of suppressor cells, we compared ex vivo in peripheral blood in a group of patients with BC (n = 12), the levels of Tregs, MDSC, and DCs before and after three cycles of antitumor therapy (Figure 1B). Once baseline levels of each population in peripheral blood from healthy donors were established (HD, n = 10), these were compared with those from patients with BC before and after treatment (n = 12). As shown in Figure 1C, the ex vivo analysis of Tregs, MDSCs and DC (both myeloid and plasmacytoid), present in PBMCs of patients before and after chemotherapy showed no significant differences with the levels detected in HD. Altogether these results suggest that in the cohort of patients analyzed, the levels of

1
2
3
4 177 different populations of suppressor cells in peripheral blood do not undergo significant changes
5
6 178 after chemotherapy.

9
10 179 ***Patients with BC exhibit a functional deficiency in dendritic cells that is recovered after***
11
12 180 ***treatment.*** Through different mechanisms, the tumor microenvironment modulates the functional
13
14
15 181 capacity of T and APC compartments [8, 19]. This tumor microenvironment in BC affects the
16
17 182 maturation capacity of DCs [19, 20] and function of T cells [21]. However, it is unknown if
18
19
20 183 chemotherapy with A/C restores the responsiveness of T and APC compartments and whether this
21
22 184 can be assessed in peripheral blood of treated patients. To evaluate the effect of anti-tumor therapy
23
24
25 185 on the functional capacity of the APC compartment, we established an in vitro system in order to
26
27 186 analyze the expression of several maturation markers on DC derived *in situ* from monocytes [10]
28
29
30 187 and on plasmacytoid and myeloid DCs present in PBMCs (cells CD123+ or CD11c+ within Lin-
31
32 188 1-/HLA-DR+ population respectively – Figure 2A), after stimulation with a cocktail of pro-
33
34
35 189 inflammatory cytokines [11]. As expected, after stimulation of PBMCs with cytokines, monocyte-
36
37 190 derived DCs of HD showed a positive response to the pro-inflammatory stimulus that was
38
39 191 evidenced by increased expression of CD83, CD86, and CCR7 in comparison with immature DCs
40
41
42 192 (Figure 2B). We choose the expression of CD83 as a key marker to identify mature DCs; then we
43
44 193 compared the delta percentage of mature DC minus the percentage of immature DCs in HD and
45
46
47 194 BC patients before and after treatment (Figure 2C). In contrast to what was observed in DC of HD,
48
49 195 in the patient group, monocyte-derived DCs and myeloid DC before therapy exhibited a reduced
50
51 196 expression of CD83 in response to the maturation stimuli ($p < 0.001$ and $p < 0.01$, respectively)
52
53
54 197 that was restored in myeloid DC after chemotherapy (Figure 2C). Interestingly, it was found that
55
56 198 in response to a cytokine cocktail, the expression of CD83 in plasmacytoid DCs of patients (either
57
58
59 199 before or after chemotherapy) and HD was rather similar (Figure 2C). Besides the measurement
60
61
62
63
64
65

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

of CD83 to evaluate the functionality of the DC we also measured the secretion of IL-12p70 (IL-12) in culture supernatants of PBMCs stimulated with the combination of pro-inflammatory cytokines described by Mailliard et al. [11]. While IL-12 was clearly detected in cells of HD in the presence of the cytokine cocktail, a significant reduction in the secretion of IL-12 in cells of patients before chemotherapy was observed, and furthermore, the production of IL-12 was significantly recovered after three doses of A/C (Figure 2D). Altogether, these results show a remarkable defect in the APC compartment of patients before therapy that is recovered after chemotherapy.

In BC patients, T cells have impairment in TCR internalization and expression of activation

markers. As observed in DCs, we hypothesized that T cells could also have a functional defect in BC patients. To evaluate the capacity of T cells to respond in vitro, we stimulated patients' and HD's PBMCs with anti-CD3/CD28/CD2 beads during 48 hours. As expected, after the in vitro stimulation, T cells from HD showed efficient TCR internalization, evidenced by the reduction of CD3 MFI in Figure 3A. Paired analyses demonstrated that the internalization elicited by the stimulus was statistically significant in the healthy individuals examined (Figure 3B left panel). Figure 3B right panel, shows that TCR internalization in BC patients before therapy was compromised (p=0.093). Following TCR internalization, several activation signals on T cells like increased expression of the alpha chain of the IL-2 receptor (CD25), CD154 (CD40L) and CD69 are associated with this phenotype [22, 23]. We evaluated the activation phenotype of CD3+ T lymphocytes in response to the in vitro stimulation in HD; we found an increased expression of CD25 (not shown), CD154, and CD69 in response to anti-CD3/CD28/CD2 beads (Figure 3C). However, when we compared the delta of MFI (MFI of stimulated cells minus MFI of unstimulated

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

cells) in BC patients before and after chemotherapy, we observed a small difference in the expression of CD25 ($p=0.106$) between HD and BC patients before treatment (Figure 3D, left panel). The expression of CD69 show a significant impairment in BC before and after chemotherapy compared to the expression levels of HD (Figure 3D, central panel). The limited expression of CD154 elicited by the stimulus observed in BC patients before therapy compared to HD showed a partial recovery after chemotherapy (Figure 3D, right panel). Together, these results suggest a dysfunctional capacity of T cells in BC patients before treatment that is partially recovered after three cycles of A/C chemotherapy.

Uncovering the effect of neoadjuvant chemotherapy by multivariable analysis of the immune response in BC patients. The efficient activation of T cells against tumors is a multi-step process that relies not only on the capacity of APC to stimulate T cells via TCR/MHC interactions [24] but also in the ability of activated T cells to stimulate on APCs the expression of costimulatory molecules such CD83 and the production of IL-12 via the stimulation by CD154 (expressed by T cells upon activation) of CD40 on APCs [25, 26]. For these reasons, we propose that the dysfunction of T and APC compartments evidenced here in BC patients are correlated and, furthermore, that by assessing the functional performance of these two compartments is possible to discriminate between BC patients and HD status. Our results so far suggest an associated defect in the functional capacity of APCs and T cells in patients with BC before the anti-tumor therapy in agreement with a diverse array of suppressive mechanisms of tumor cells that hampers immune surveillance of tumors [27]. To clarify different possible correlations that may exist between the cells responsible for the immune response against tumors, using the proposed in vitro model, we compared several immunological readouts in HD and cancer patients. To do this, we used multivariate analysis (factor analysis with Principal Component Analysis - PCA), to

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

246 simultaneously evaluate different parameters assessed in PBMCs including the (i) ex vivo
percentage of sub-populations in PBMCs; (ii) expression of maturation markers in DCs; including
247 phenotype and secretion of pro-inflammatory cytokines (not shown) and (iii) functional capacity
248 of T cells determined by the activation phenotype (expression of CD25, CD69 and CD154) and
249 Th1 and Th2 cytokine production (data not shown). Additionally, we included in the PCA some
250 clinical parameters of the patient (e.g., area of the patient's tumor - Table 1), to determine the
251 relationship between the immunological component and clinical response to their treatment. We
252 selected the variables (Table S1) that best describe the behavior of the samples by the matrix of
253 components of each variable in the PCA (Figure 4A). Examining the scores of the PCA in the
254 samples, we observed a clear separation between HD and BC patients before anti-tumor treatment;
255 strikingly, we found that samples of some patients after chemotherapy have an intermediate
256 behavior between HD and the same patient before receiving treatment (Figure 4B). This result
257 would suggest that this in vitro model may be useful to monitor the immune and clinical responses
258 in BC patients along adjuvant chemotherapy. Finally, we compared the sensitivity and specificity
259 of several immunological determinants analyzed to differentiate between HD and BC patients; for
260 this, using ROC curves we examined the area under the curve (AUC) of the internalization of the
261 TCR (Figure 4C, AUC = 0.67; p=0.05). The multiparametric analysis done by PCA represent the
262 complexity of the immune system involved in the response of BC patients to A/C chemotherapy.
263 The analysis of this complexity with our model suggest that by assessing the functionality of
264 T/APC compartments in blood it is possible to differentiate between HD and BC patients.
265

266 *Usefulness of immunological readouts to predict clinical response of tumors to A/C*
267 *chemotherapy.* Predicting clinical response of tumors to neoadjuvant chemotherapy remains a
268 formidable challenge. Despite that molecular testing of TOP2A and the in situ analysis of tumor

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

269 landscape after neoadjuvant chemotherapy are promising readouts useful to predict tumor response
270 and survival in treated BC patients [3, 28], the usefulness of functional analyses of peripheral blood
271 leukocytes to predict tumor responsiveness to chemotherapy remains unknown. To address this
272 possibility, the immunological readouts of all functional studies performed with peripheral blood
273 leukocytes from patients before chemotherapy were categorized first and then analyzed by a
274 multifactorial categorical analysis (by general estimating equations - GEE). This was done in order
275 to calculate coefficients for each explanatory variable that best fit a model that explain the behavior
276 of a given clinical parameter based on immune readouts (Table 2). Taking into account three
277 immunological readouts after chemotherapy: CD3 internalization and CD69 expression in T cells
278 and the IL-12 production in DCs, became evident that the explanatory values of CD69 and IL12
279 (Table 2) are useful for predicting tumor response to chemotherapy (tumor area after A/C smaller
280 than 2.4 cm²). All three values are associated with the expression of estrogen receptor but not to
281 the expression of progesterone receptors, HER2/neu or KI-67 by the tumor (Table 2). Altogether,
282 these results suggest that responsiveness of the T and APC compartments and tumor clinical
283 response are two components prompted by chemotherapy that somehow are related.

284 To further confirm this, we examined which immune characteristics are associated with the best
285 fitting of tumor clinical response to chemotherapy. We found that after three doses of A/C
286 chemotherapy, TCR internalization is associated with a significant tumor response to the treatment
287 (tumor size <2.4cm² in Figure 5A). Likewise, analyses of TNM status before A/C chemotherapy
288 revealed that initial TNM stage (Clinical stage I or II) is significantly related to a more efficient
289 responsiveness of plasmacytoid DCs to the stimulus (higher percentage of CD83+ CD123+ cell
290 population, Figure 5B).

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

292 Finally, we assessed the predictive value of immunological readouts (before chemotherapy) to
293 predict beforehand the clinical outcome before treatment, to do this, the performance of readouts
294 before treatment was cross-checked with tumor size after chemotherapy. Although TCR
295 internalization and the ex vivo frequency of Tregs were close to predicting small tumors (<2.4cm²)
296 after treatment, their p values were not statistically significant (p=0.14 and p=0.1, respectively,
297 (data not show)). In clear contrast, higher levels of TCR internalization (p=0.07), and matured
298 plasmacytoid DCs (p=0.038) were found in patients with smaller tumors (<2.4cm²) (Figure 5C).
299 Based on these results, we established the sensibility and specificity of this immunological readout
300 in predicting tumor response to A/C treatment by doing a ROC curve. We found that the CD3
301 internalization and DC maturation ROC curves have a high AUC (0.741 and 0.794 respectively)
302 that discriminate patients who respond from those who do not respond (Figure 5D). These results
303 let us argue for high levels of mature plasmacytoid DCs and the internalization of CD3 detected
304 in peripheral blood before chemotherapy after in vitro stimuli as useful biomarkers for predicting
305 clinical responsiveness of tumors to primary chemotherapy with A/C in BC patients.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

DISCUSSION

Based on parameters used by us to measure tumor-specific T cells generated in response to anti-tumor therapy [9], in the present study, we monitored a series of immunologic parameters in BC patients' PBMCs obtained before and after chemotherapy with A/C trying to establish, first, the capacity of neoadjuvant chemotherapy to reestablish immune responsiveness and second, the usefulness of immunological readouts to predict clinical tumor response prior to treatment. We evaluated the levels of expansion and phenotype of Tregs, MDSCs, and DCs present in patients' PBMCs. These three populations play a critical role in tumor escape of immune surveillance [4, 29]. Differences statistically significant between the levels of Tregs and MDSCs found in samples of patients' PBMCs (obtained either before or after chemotherapy) with those observed in control's PBMCs were not found. The fact that these measurements have usually been made in BC patients with advanced disease and not in patients with newly diagnosed primary tumors and before neoadjuvant chemotherapy, as in our case, may explain these results.

MDSCs are a heterogeneous population of myeloid cells that accumulate in cancer patients inhibiting T cell-mediated immune responses through the production of NO, Arginase and reactive oxygen and nitrogen species, which foster tumor infiltration by Tregs [30, 31]. By studying the role of MDSCs in inhibiting immune surveillance of BC tumors, Verma et al., reported the increase of MDSCs from two different sources: monocyte-derived (cells CD11b+ CD14+ CD124+ CD33+) and PMN-derived (cells CD11b+ CD14- HLA-DR- CD66b+ CD124+ CD15+) in peripheral blood of BC patients in neoadjuvant chemotherapy [32]. On the other hand, Yu et al. [33], reported an increase of cells Lin- HLA-DR- CD14- CD15- CD13+ CD33+ that produce IDO in BC patients with advanced tumors. Using the same markers employed by Yu et al. (except for IDO), we did

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

329 not find differences in the amounts of MDSC Arginase+ in BC patients before chemotherapy in
330 comparison with controls. The analysis of a complex population such as MDSC in different studies
331 using different sets of markers makes difficult the comparison between studies.

332
333 On the other hand, the impact of A/C chemotherapy in the levels of MDSCs and Tregs has been a
334 matter of debate. The use of A/C was associated with a significant increase of MDSC in the blood
335 of newly diagnosed BC cancer patients correlated with disease stage and metastatic tumor burden
336 [34]. In contrast, a more recent study shows a decrease in the levels of MDSCs and Tregs in blood
337 attributable to the cytotoxic effect of A/C on these cells [32]. After three cycles of A/C, we did not
338 observe variations in levels of MDSCs or Tregs (neither CD127- nor FoxP3+). The difference
339 between our results and those of others may be explained because the measurement of MDSCs
340 and Tregs in blood pre- and post- chemotherapy have not been previously analyzed. In short, the
341 contrasting results regarding the behavior of MDSCs and Tregs during anti-tumor therapy argues
342 for the need for standardized methods for monitoring these two cell populations in patients during
343 treatment.

344
345 IL-12 produced by DCs is a key point in cancer immunotherapy as it promotes CTLs that secrete
346 IFN- γ a cytokine with recognized anti-tumor activity [35]. This evidence suggests that evaluating
347 the immune competence of DCs to produce IL-12 and to mature in response to a pro-inflammatory
348 stimulus useful to assess the immune surveillance of tumors. Very recently a whole-blood assay
349 that was used for monitoring the immune competence in cohorts of healthy women and BC patients
350 at different progression stages prior any treatment evidenced unresponsiveness of patients' BDCA3
351 DCs to interferon alpha [36]. In another study, Della Bella et al., reported a decrease in the absolute

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

352 number of myeloid DCs in whole blood of BC patients' ex vivo [19]. This reduction that was
353 associated with a decrease in CD119 (IFN- γ R) and increased expression of CD83 without altering
354 the expression of CD80 and CD86 in response to LPS was correlated with the severity of BC.
355 Although we did not observe marked differences in percentages of DC populations among HD,
356 and BC patients pre- and post-treatment, after three doses of chemotherapy we found a substantial
357 recovery of CD83 expression and production of IL-12 in response to a cocktail of cytokines used
358 by Mailliard et al., [11] to derive type I DCs in situ [10]. An increased production of IL-12 was
359 detected after tumor removal in the study by Della Bella et al. [19], this and that the clinical tumor
360 response to A/C correlates with the production of IL-12 and CD83 expression by DCs in the
361 present study suggest that the responsiveness of DCs to the pro-inflammatory stimuli used here is
362 useful for monitoring the recovery of immune surveillance by DCs during neoadjuvant treatment
363 with A/C. In the same vein, results of preclinical studies in mice show that the A/C promotes
364 recovery of immune surveillance associated with antigen presentation, increased expression of
365 CD83 and IL-12 production by DCs [37]. However, it is possible that IL-12 production by DCs
366 has different prognostic value depending on the state of the disease, our results suggest that in
367 early stages of treatment it promotes the recovery of the immune-surveillance and a favorable
368 clinical response compared to its production after treatment apparently favors tumor relapse [36].
369
370 We observed a more efficient TCR internalization and the CD154/CD40L expression on T cells
371 after chemotherapy. CD154/CD40L is expressed on both CD4 and CD8 T cells upon TCR
372 stimulation. However, consequences of activated CD4 Th1 cells expressing CD154/CD40L is
373 better known [38, 39]. In this regard, we speculate that the recovery of CD154/CD40L by Th1
374 cells may foster CD8 surveillance in BC patients treated with AC by promoting competent DCs

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

375 after cognate CD40/CD40L interaction that probably stimulates IL-12 secretion as well as the up-
376 regulation of adhesion and co-stimulatory molecules by DCs (e.g., CD83), all of which have been
377 shown to occur after CD40 cross-linking on these two cell types [38-46]. On this perspective, the
378 responsiveness of the T and APC compartments after therapy observed in our patients argues in
379 favor that neoadjuvant therapy reestablishes the cross talk between these compartments and that
380 this is essential for immune surveillance (Figure S1).

381
382 By multivariate PCA analysis, it was possible to integrate TCR internalization, CD83 expression
383 and IL-12 production by mature DCs, with some immunological readouts (Table S1). Despite
384 neither parameter when were considered individually allows to discriminate between HD and
385 patients, the PCA allowed us to segregate HD individuals from donors in the patient group clearly.
386 In this regard, it is evident that after treatment, the behavior of variables in some patients becomes
387 like those observed in the control group (HD). Finally, by using ROC curves, the TCR
388 internalization allowed us to differentiate the immune response between HD and patients. Taken
389 together these results lead to propose that the recovery of crosstalk between T and APC
390 compartments induced by A/C therapy reflects the restoration of immune surveillance and is a
391 good prognostic factor in BC patients treated with neoadjuvant A/C (Figure S1).

392
393 Finally, it is of great interest to define biomarkers able to predict clinical response to chemotherapy
394 in BC patients, in this regard candidate biomarkers are tumor infiltration by CD8 + T cells [3] and
395 TFH [47] and in situ expression of markers such as HMGB-1 and autophagy [48]. We propose
396 that the proper TCR internalization and IL-12 production in response to treatment are potential
397 biomarkers to predict tumor size reduction after three months of chemotherapy. The correlation

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

398 between clinical response and ex vivo levels prior therapy of plasmacytoid DC CD83+ (a cell that
399 produces type-I IFN important to activate anti-tumor responses) suggests this marker as useful for
400 predicting clinical response to treatment. This result is consistent with the description of a type I
401 IFN-related signature that predicts clinical responses to anthracycline-based chemotherapy in
402 several independent cohorts of BC patients [49].

403
404 In summary, our results argue for the usefulness of in vitro assays using whole blood [36] or
405 PBMCs from BC patients to monitor the responsiveness of T and APC compartments during
406 treatment and to identify predictive markers of favorable clinical tumor response.

407
408
409
410 DECLARATIONS

411 Ethical Approval and Consent to participate

412 This study was approved by the ethics committee of the Instituto Nacional de Cancerología
413 (Bogotá-Colombia) by the Act 018 May 2012. The healthy donors and breast cancer patients sign
414 the informed consent before the blood sample was drawn.

415 Consent for publication

416 Not applicable.

417 Availability of supporting data

418 Not applicable.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

419 **Competing interests**

420 The authors declare that they have no competing interests.

421 **Funding**

422 This work was funded through Dirección de Investigación de Bogotá (DIB)-HERMES Grants
423 (Numbers 13245, 12543 and 14976) from the Universidad Nacional de Colombia and funds from
424 the joint grant among Fundación Salud de Los Andes, Universidad Nacional and COLCIENCIAS
425 (Contract No. 110150227509). DBE was supported by the Fundación Salud de Los Andes, Bogotá-
426 Colombia South America.

427 **Authors' contributions**

428 Conceived and designed the experiments: DBE, CPL.

429 Performed the experiments: DBE.

430 Analyzed the data: DBE, OG, RS, CPL.

431 Contributed reagents/materials/analysis tools: DBE, OG, RS, CPL.

432 Wrote the paper: DBE, CPL.

433 All authors read and approved the final manuscript.

434 **Acknowledgements**

435 This study was supported by funding from the Universidad Nacional de Colombia. DIB,
436 Vicedecanatura de Investigación Universidad Nacional Medical School; funds from a joint grant
437 between Fundación Salud de Los Andes, Universidad Nacional, and COLCIENCIAS. The authors

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

438 express their gratitude to Dr. Fabio Méndez CEO at the Fundación Salud de Los Andes (FSA) and
439 FSA for their generous support. The authors would also like to thank Dr. Bernardo Camacho and
440 to personnel at the Hemocentro Distrital for their kind assistance in obtaining blood buffy coats
441 from volunteers. Finally, our deepest gratitude to patients and healthy volunteers for their generous
442 denotation of blood samples used in this study.

443 Authors' information

444 David Andrés Bernal-Estévez, M.D., Ph.D. Universidad Nacional de Colombia, Microbiology
445 Department, Graduate School of Biomedical Sciences. Fundación Salud de los Andes, Research
446 Group in Immunology and Clinical Oncology. Bogotá-Colombia. dabernale@unal.edu.co,
447 dbernal.investigacion@saluddelosandes.com

448 Oscar Armando García, M.D., Surgeon, Instituto Nacional de Cancerología, Servicio de Seno y
449 Tejidos blandos, Bogotá-Colombia. ogarcia@cancer.gov.co

450 Ramiro Sánchez, M.D., Clínica del Seno, Surgeon, Bogotá-Colombia, ramirosr@cable.net.co

451 Carlos Alberto Parra-López, M.D., Ph.D. Universidad Nacional de Colombia, Microbiology
452 Department, Graduate School of Biomedical Sciences. Bogotá-Colombia. caparral@unal.edu.co

453

1
2
3
4 454
5
6
7 455
8
9
10
11 456
12
13
14 457
15 458
16 459
17 460
18 461
19 462
20 463
21 464
22 465
23 466
24 467
25 468
26 469
27 470
28 471
29 472
30 473
31 474
32 475
33 476
34 477
35 478
36 479
37 480
38 481
39 482
40 483
41 484
42 485
43 486
44 487
45 488
46 489
47 490
48 491
49 492
50 493
51 494
52 495
53 496
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

REFERENCES

1. Kepp, O., et al., *Consensus guidelines for the detection of immunogenic cell death*. Oncoimmunology, 2014. **3**(9): p. e955691.
2. Vacchelli, E., et al., *Loss-of-function alleles of P2RX7 and TLR4 fail to affect the response to chemotherapy in non-small cell lung cancer*. Oncoimmunology, 2012. **1**(3): p. 271-278.
3. Ladoire, S., et al., *In situ immune response after neoadjuvant chemotherapy for breast cancer predicts survival*. J Pathol, 2011. **224**(3): p. 389-400.
4. Angell, H. and J. Galon, *From the immune contexture to the Immunoscore: the role of prognostic and predictive immune markers in cancer*. Curr Opin Immunol, 2013. **25**(2): p. 261-7.
5. Galon, J., et al., *Type, density, and location of immune cells within human colorectal tumors predict clinical outcome*. Science, 2006. **313**(5795): p. 1960-4.
6. Peng, R.Q., et al., *Expression of calreticulin is associated with infiltration of T-cells in stage IIIB colon cancer*. World J Gastroenterol, 2010. **16**(19): p. 2428-34.
7. Stoll, G., et al., *Immune-related gene signatures predict the outcome of neoadjuvant chemotherapy*. Oncoimmunology, 2014. **3**(1): p. e27884.
8. Rabinovich, G.A., D. Gabrilovich, and E.M. Sotomayor, *Immunosuppressive strategies that are mediated by tumor cells*. Annu Rev Immunol, 2007. **25**: p. 267-96.
9. Bernal-Estevez, D., et al., *Chemotherapy and radiation therapy elicits tumor specific T cell responses in a breast cancer patient*. BMC Cancer, 2016. **16**: p. 591.
10. Martinuzzi, E., et al., *Accelerated co-cultured dendritic cells (acDCs) enhance human antigen-specific T-cell responses*. Blood, 2011.
11. Mailliard, R.B., et al., *alpha-type-1 polarized dendritic cells: a novel immunization tool with optimized CTL-inducing activity*. Cancer Res, 2004. **64**(17): p. 5934-7.
12. Jonuleit, H., et al., *Pro-inflammatory cytokines and prostaglandins induce maturation of potent immunostimulatory dendritic cells under fetal calf serum-free conditions*. Eur J Immunol, 1997. **27**(12): p. 3135-42.
13. Lipsitz, S.R., K. Kim, and L. Zhao, *Analysis of repeated categorical data using generalized estimating equations*. Stat Med, 1994. **13**(11): p. 1149-63.
14. Whiteside, T.L., *Induced regulatory T cells in inhibitory microenvironments created by cancer*. Expert Opin Biol Ther, 2014. **14**(10): p. 1411-25.
15. Hamilton, M.J., et al., *Macrophages are more potent immune suppressors ex vivo than immature myeloid-derived suppressor cells induced by metastatic murine mammary carcinomas*. J Immunol, 2014. **192**(1): p. 512-22.
16. Markowitz, J., et al., *Myeloid-derived suppressor cells in breast cancer*. Breast Cancer Res Treat, 2013. **140**(1): p. 13-21.
17. Wolf, A.M., et al., *Increase of regulatory T cells in the peripheral blood of cancer patients*. Clin Cancer Res, 2003. **9**(2): p. 606-12.
18. Marigo, I., et al., *Tumor-induced tolerance and immune suppression by myeloid derived suppressor cells*. Immunol Rev, 2008. **222**: p. 162-79.
19. Della Bella, S., et al., *Altered maturation of peripheral blood dendritic cells in patients with breast cancer*. Br J Cancer, 2003. **89**(8): p. 1463-72.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

497 20. Gottfried, E., M. Kreutz, and A. Mackensen, *Tumor-induced modulation of dendritic cell function*. Cytokine Growth Factor Rev, 2008. **19**(1): p. 65-77.

498

499 21. Finn, O.J., *Cancer immunology*. N Engl J Med, 2008. **358**(25): p. 2704-15.

500 22. Krowka, J.F., et al., *Expression of CD69 after in vitro stimulation: a rapid method for quantitating impaired lymphocyte responses in HIV-infected individuals*. J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol, 1996. **11**(1): p. 95-104.

501

502

503 23. Wieland, E. and M. Shipkova, *Lymphocyte surface molecules as immune activation biomarkers*. Clin Biochem, 2016. **49**(4-5): p. 347-54.

504

505 24. Cochran, J.R., et al., *Receptor clustering and transmembrane signaling in T cells*. Trends Biochem Sci, 2001. **26**(5): p. 304-10.

506

507 25. Mackey, M.F., R.J. Barth, Jr., and R.J. Noelle, *The role of CD40/CD154 interactions in the priming, differentiation, and effector function of helper and cytotoxic T cells*. J Leukoc Biol, 1998. **63**(4): p. 418-28.

509

510 26. Van Gool, S.W., et al., *CD80, CD86 and CD40 provide accessory signals in a multiple-step T-cell activation model*. Immunol Rev, 1996. **153**: p. 47-83.

511

512 27. Mittal, D., et al., *New insights into cancer immunoediting and its three component phases--elimination, equilibrium and escape*. Curr Opin Immunol, 2014. **27**: p. 16-25.

513

514 28. Desmedt, C., et al., *Multifactorial approach to predicting resistance to anthracyclines*. J Clin Oncol, 2011. **29**(12): p. 1578-86.

515

516 29. Zitvogel, L., A. Tesniere, and G. Kroemer, *Cancer despite immunosurveillance: immunoselection and immunosubversion*. Nat Rev Immunol, 2006. **6**(10): p. 715-27.

517

518 30. Datta, J., et al., *Progressive loss of anti-HER2 CD4+ T-helper type 1 response in breast tumorigenesis and the potential for immune restoration*. Oncoimmunology, 2015. **4**(10): p. e1022301.

519

520

521 31. Ge, Y., et al., *Metronomic cyclophosphamide treatment in metastasized breast cancer patients: immunological effects and clinical outcome*. Cancer Immunol Immunother, 2012. **61**(3): p. 353-62.

522

523

524 32. Verma, C., et al., *Abnormal T regulatory cells (Tregs: FOXP3+, CTLA-4+), myeloid-derived suppressor cells (MDSCs: monocytic, granulocytic) and polarised T helper cell profiles (Th1, Th2, Th17) in women with large and locally advanced breast cancers undergoing neoadjuvant chemotherapy (NAC) and surgery: failure of abolition of abnormal treg profile with treatment and correlation of treg levels with pathological response to NAC*. J Transl Med, 2013. **11**: p. 16.

525

526

527

528

529 33. Yu, J., et al., *Myeloid-derived suppressor cells suppress antitumor immune responses through IDO expression and correlate with lymph node metastasis in patients with breast cancer*. J Immunol, 2013. **190**(7): p. 3783-97.

530

531

532 34. Diaz-Montero, C.M., et al., *Increased circulating myeloid-derived suppressor cells correlate with clinical cancer stage, metastatic tumor burden, and doxorubicin-cyclophosphamide chemotherapy*. Cancer Immunol Immunother, 2009. **58**(1): p. 49-59.

533

534

535 35. Lee, J.J., et al., *Type 1-polarized dendritic cells loaded with autologous tumor are a potent immunogen against chronic lymphocytic leukemia*. J Leukoc Biol, 2008. **84**(1): p. 319-25.

536

537 36. Verronese, E., et al., *Immune cell dysfunctions in breast cancer patients detected through whole blood multi-parametric flow cytometry assay*. Oncoimmunology, 2016. **5**(3): p. e1100791.

538

539 37. Shurin, G.V., et al., *Chemotherapeutic agents in noncytotoxic concentrations increase antigen presentation by dendritic cells via an IL-12-dependent mechanism*. J Immunol, 2009. **183**(1): p. 137-44.

540

541

542 38. Shu, U., et al., *Activated T cells induce interleukin-12 production by monocytes via CD40-CD40 ligand interaction*. Eur J Immunol, 1995. **25**(4): p. 1125-8.

543

544 39. Stuber, E., W. Strober, and M. Neurath, *Blocking the CD40L-CD40 interaction in vivo specifically prevents the priming of T helper 1 cells through the inhibition of interleukin 12 secretion*. J Exp Med, 1996. **183**(2): p. 693-8.

545

546

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

40. Alderson, M.R., et al., *CD40 expression by human monocytes: regulation by cytokines and activation of monocytes by the ligand for CD40*. J Exp Med, 1993. **178**(2): p. 669-74.

41. Campbell, K.A., et al., *CD40 ligand is required for protective cell-mediated immunity to Leishmania major*. Immunity, 1996. **4**(3): p. 283-9.

42. Caux, C., et al., *Activation of human dendritic cells through CD40 cross-linking*. J Exp Med, 1994. **180**(4): p. 1263-72.

43. Cella, M., et al., *Ligation of CD40 on dendritic cells triggers production of high levels of interleukin-12 and enhances T cell stimulatory capacity: T-T help via APC activation*. J Exp Med, 1996. **184**(2): p. 747-52.

44. Kelsall, B.L., et al., *Interleukin-12 production by dendritic cells. The role of CD40-CD40L interactions in Th1 T-cell responses*. Ann N Y Acad Sci, 1996. **795**: p. 116-26.

45. Kiener, P.A., et al., *Stimulation of CD40 with purified soluble gp39 induces proinflammatory responses in human monocytes*. J Immunol, 1995. **155**(10): p. 4917-25.

46. Koch, F., et al., *High level IL-12 production by murine dendritic cells: upregulation via MHC class II and CD40 molecules and downregulation by IL-4 and IL-10*. J Exp Med, 1996. **184**(2): p. 741-6.

47. Gu-Trantien, C., et al., *CD4(+) follicular helper T cell infiltration predicts breast cancer survival*. J Clin Invest, 2013. **123**(7): p. 2873-92.

48. Ladoire, S., et al., *Immunogenic cell death-related biomarkers: Impact on the survival of breast cancer patients after adjuvant chemotherapy*. Oncoimmunology, 2016. **5**(2): p. e1082706.

49. Sistigu, A., et al., *Cancer cell-autonomous contribution of type I interferon signaling to the efficacy of chemotherapy*. Nat Med, 2014. **20**(11): p. 1301-9.

569
570
571

1
2
3
4 **572** **FIGURE LEGENDS**

5
6
7 **573** **Figure 1. Assessing different cell populations ex vivo in PBMCs from healthy donors and BC**
8 **patients before and after chemotherapy.** (A) Paired analysis of tumor size (area in cm²) of the
9
10 **574** patients before therapy and after three cycles of A/C chemotherapy. (B) Working strategy for
11
12 **575** multi-parametric cell analysis using flow cytometry. Monocytes and lymphocytes were defined by
13
14 **576** contour plots using SSC-A vs. FSC-A. Myeloid and plasmacytoid dendritic cell (DCs) (cells HLA-
15
16 **577** DR+ Lin1/CD15- CD11c+ or HLA-DR+ Lin1/CD15- CD123+ respectively) and myeloid-derived
17
18 **578** suppressor cells (MDSCs) (cells HLA-DR- Lin1/CD15- CD13+ CD33+ ± Arginase 1+), were
19
20 **579** analyzed within the monocytic cell region. Finally, the percentage of CD4+ and regulatory T cells
21
22 **580** CD4+ CD25+ CD127- FoxP3+ (Tregs) was estimated within the lymphoid cell region. (C)
23
24 **581** Percentage of different sub-populations ex vivo in PBMCs from healthy donors (white box n=10)
25
26 **582** and BC patients before (gray box n=12) and after chemotherapy (dashed box n=12). Panels
27
28 **583** summarize the percentages of DCs populations (top panel), MDSCs (middle panel) and CD4+ and
29
30 **584** CD4+ Tregs: CD4+ CD25+ CD127- and CD4+ CD25+ CD127- FoxP3+ (middle and right panels
31
32 **585** at the bottom). Paired analysis by Wilcoxon test, *** p<0.001. Box and whiskers graph with 10-
33
34 **586** 90% of data.
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44

45 **588** **Figure 2. DC maturation and IL-12p70 production are hampered in cancer patients before**
46 **treatment.** (A) The analysis by contour plots of a representative sample of myeloid (HLA-DR+
47
48 **589** Lin1- CD11c+) and plasmacytoid (HLA-DR+ Lin1- CD123+) DCs is shown. (B) Histograms
49
50 **590** comparing the phenotype (CD83, CCR7, and CD86) of immature (empty histogram) and mature
51
52 **591** (gray histogram) in myeloid DCs derived from HD. (C) Quantification of CD83 expression in
53
54 **592** response to maturation stimulus (delta of the percentage of CD83 expression between mature and
55
56 **593** immature DCs) in DCs derived in PBMCs from HD (white box), and breast cancer patients before
57
58
59
60 **594**

1
2
3
4 595 and after chemotherapy (grey and dashed box, respectively) in monocytic cells (defined by FSC-
5
6
7 596 A vs SSC-A (left)), myeloid (HLA-DR+ Lin1- CD11c+ (middle)) or plasmacytoid DCs (HLA-
8
9 597 DR+ Lin1- CD123+ (right)). (D) Delta of concentration in pg/mL of IL-12p70 secreted in culture
10
11 598 supernatants (difference in concentration secreted by mature and immature) DCs from HD (white
12
13
14 599 box, n=10) and patients before (gray box, n=23) and after chemotherapy (dashed box, n=15).
15
16 600 Boxes and whiskers 10-90%, two-way ANOVA analysis, with Turkey's multiple comparison tests,
17
18
19 601 * p<0.05, ** p<0.01, *** p<0.001.

22 602 **Figure 3. Suppressed T cell responsiveness in BC patients before chemotherapy.** (A)

23
24 603 Representative contour plots of T cells (CD3+) of HD unstimulated or stimulated 24 hours with
25
26
27 604 anti-CD3/CD28/CD2 beads (numbers represent MFI of CD3). (B) Quantification of CD3 MFI in
28
29 605 PBMCs of HD in response to *in vitro* stimulation (left panel), and delta of CD3 MFI from HD
30
31
32 606 (white box), and BC patients before (gray box) and after chemotherapy (dashed box – right panel).
33
34 607 (C) Representative contour plots of T cell (gated on CD3+) activation phenotype (CD154 vs.
35
36
37 608 CD69) of cells obtained from HD in response to *in vitro* stimulation with anti-CD3/CD28/CD2
38
39 609 beads, numbers represent the percentage of each population. (D) Quantification of MFI of each
40
41
42 610 activation marker (delta of stimulated minus unstimulated cells) of CD25 (left panel), CD69
43
44 611 (middle panel) and CD154 (right panel) of HD (white box), and BC patients before (gray box) and
45
46
47 612 after chemotherapy (dashed box). Box and whiskers 10-90%. HD (n=12), patients before (n=23)
48
49 613 and after chemotherapy (n=15). Non-parametric *t*-test (panel B – left panel) and Two-way
50
51 614 ANOVA analysis, with Turkey's multiple comparison tests, * p<0.05, ** p<0.01.

55 615 **Figure 4. Unresponsiveness of T cell and APC compartments are correlated in BC patients.**

56
57 616 (A) Principal component analysis (PCA) of several immunological readouts (Table S1) selected
58
59
60 617 after Varimax rotation, and two principal components (PC) were extracted and show the variable

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

618 loadings of rotated component matrix, and (B) dot plot of PC score of HD (half-filled circles), and
619 patients before (white box) and after (black box) neoadjuvant chemotherapy. The dashed line
620 represents an axis that separates BC patients from HD. KMO and Bartlett's Test 0.681 p=0.005.
621 (C) Receiver operating characteristic (ROC) curves, to differentiate HD vs. BC patients before
622 therapy using TCR internalization by MFI CD3 (left curve, AUC 0.67 p=0.05).

Figure 5. The predictive capacity of immune readouts for clinical response to chemotherapy.

623 (A) CD3 internalization in BC patients before (gray box) and after (dashed box) chemotherapy
624 categorized by tumor size (volume in cm²). (B) Delta of CD83 expression in plasmacytoid DCs in
625 BC patients before therapy based on TNM classification. (C) Predictive value of TCR (CD3)
626 internalization (left panel) and the delta percentage of CD83 expression in plasmacytoid DCs
627 evaluated before therapy and compared in patients with or without better clinical response (tumor
628 size below or above 2.4cm²). (D) ROC curves of TCR internalization (AUC=0.741, Std. err. =
629 0.1032, CI95%=0.53-0.94, p=0.071), and delta percentage of CD83 expression in plasmacytoid
630 DCs to predict Tumor response (AUC=0.794, Std. err. = 0.097, CI95%=0.60-0.98, p=0.027). Box
631 and whiskers 10-90%, Mann-Whitney test.

Figure S1. Immunomonitoring model of breast cancer patients treated with chemotherapy

with A/C. (A) In patients with established BC, the immune system could not control the tumor
634 growth phase called immune escape. Tumor cells exhibit a decreased amount of MHC class I and
635 release suppressive cytokines such as IL-10 and TGF- β , there is a greater frequency of suppressor
636 cells that produce arginase MDSCs, Tregs, and plasmacytoid DCs or immature DCs (with high
637 levels of IDO). These suppressor cells favor a weak cytotoxic T cells activation and inhibition of
638 function of T helper CD4+ cells by suppressive cytokines such as IL-10. (B) In BC patients who
639 are treated with chemotherapy A/C, the proposed immunomonitoring system can evaluate the
640

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

641 restoration of immunosurveillance of tumors by promoting the immune response by inducing ICD
642 in tumor cells with the release of DAMPs (CRT, HMGB1, and ATP) and apoptotic bodies that are
643 recognized by immature DCs. This recognition induces maturation of DCs with increased
644 expression of CD80, CD83, CD86, and antigen cross-presentation favoring the recognition of these
645 antigens by T cells. Stimulated T cells induce the production of IL-12 by the interaction CD154
646 with the CD40 receptor on APCs and thus assisting in the production of IFN- γ providing helper
647 activity to CTLs to attack the remaining tumor cells.

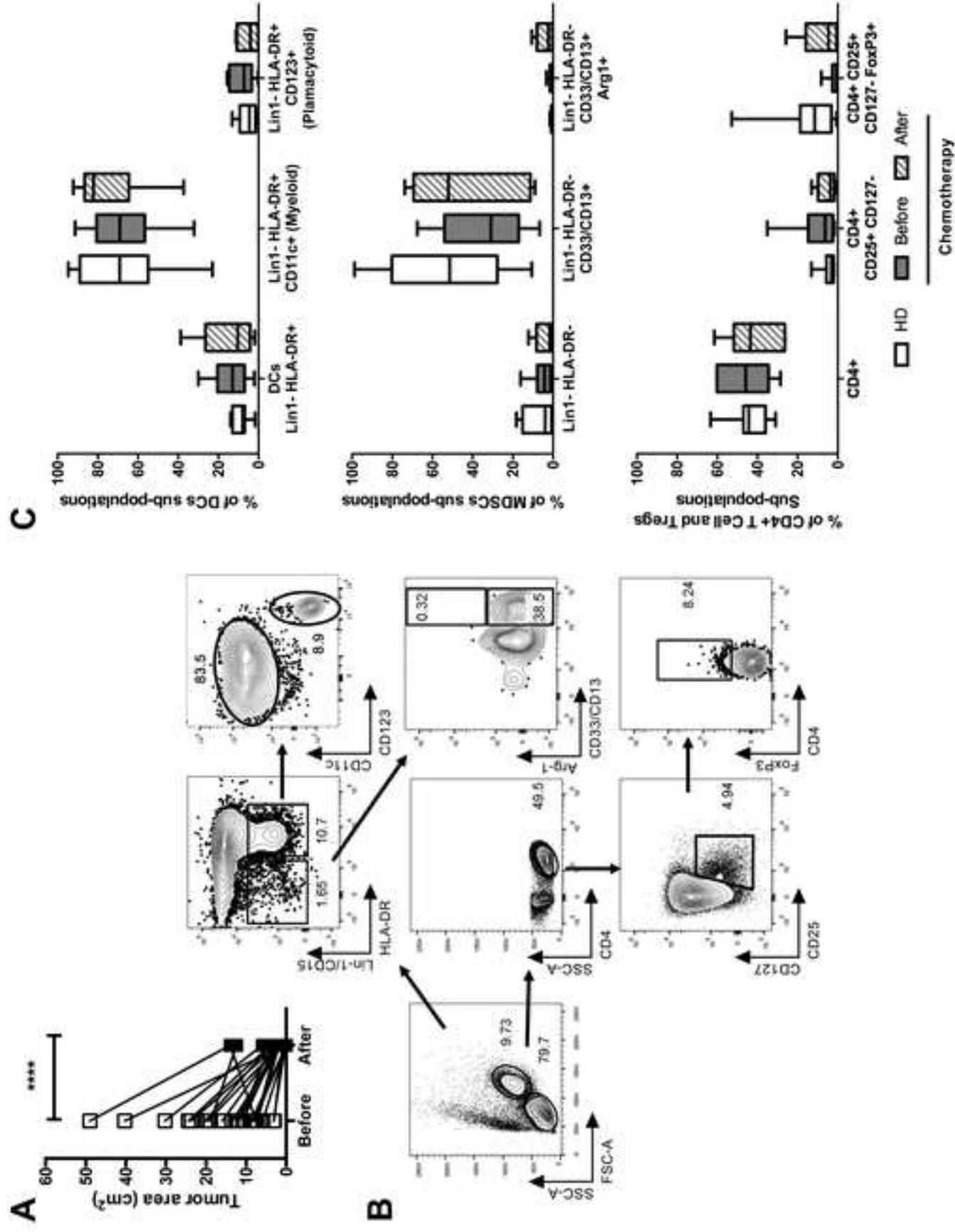
Table 2. Association between immunological readouts in peripheral blood and clinicopathologic factors of BC patients.

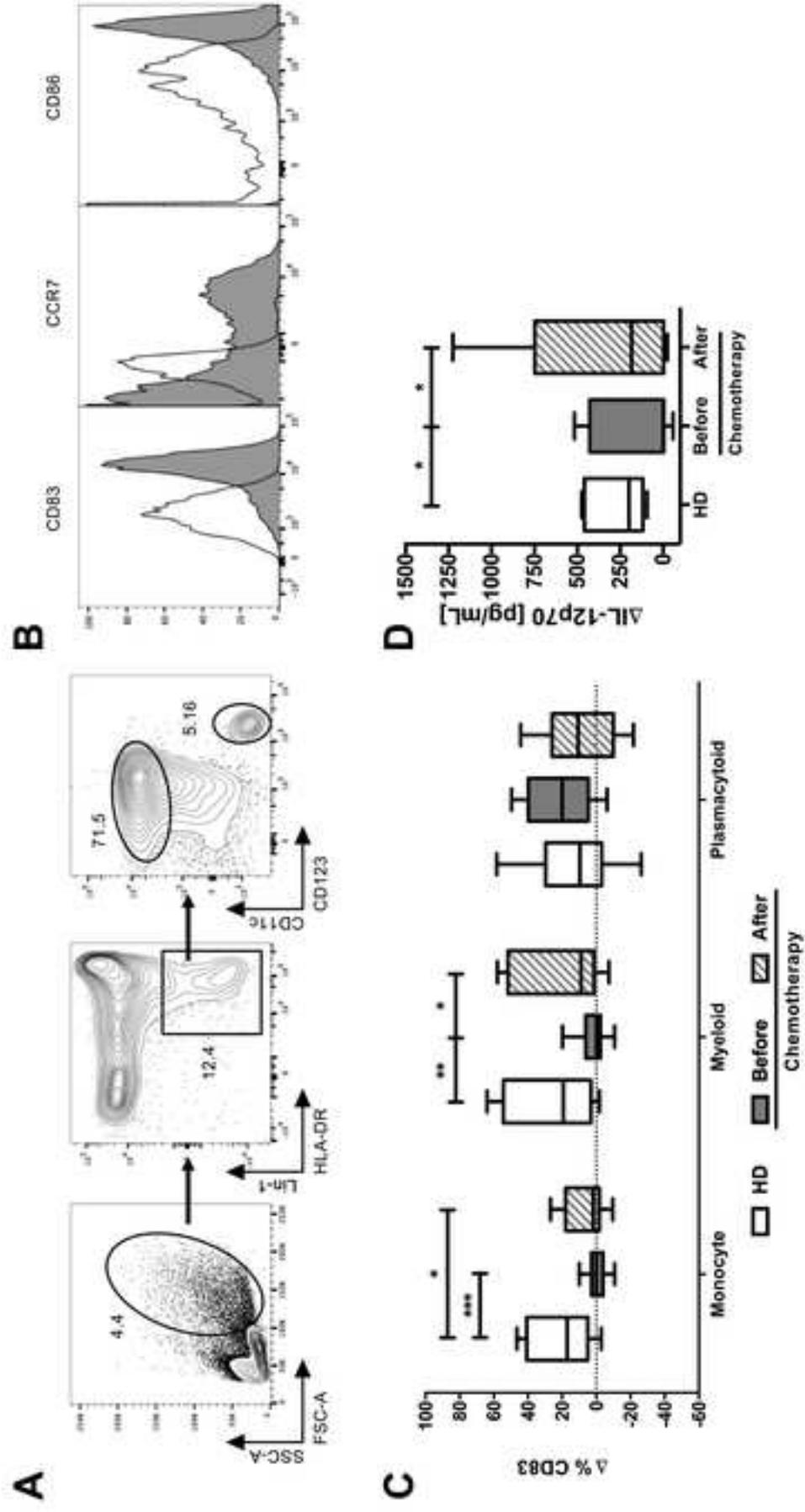
Clinical characteristic	Wald (Chi) ²	Model variables (Immunological readout)	Coefficient	P value	95% CI
KI-67	1.49	% of CD3 internalization	-.0293	0.332	-.0886 to .0299
		MFI of CD69	.0005	0.621	-.0015 to .0025
		IL-12p70 concentration (pg/mL)	-.0387	0.281	-.1093 to .0317
HER2/neu	1.72	% of CD3 internalization	-.0407	0.194	-.1022 to .0207
		MFI of CD69	.0010	0.382	-.0012 to .0031
		IL-12p70 concentration (pg/mL)	-.0090	0.571	-.0401 to .0221
Tumor response	6.1	% of CD3 internalization	.0067	0.780	-.0403 to .0536
		MFI of CD69	-.0029	0.061*	-.0058 to .0001
		IL-12p70 concentration (pg/mL)	-.0110	0.094*	-.0239 to .0019
Estrogen receptor	9.68	% of CD3 internalization	-.0867	0.002*	-.1428 to -.0305
		MFI of CD69	.0039	0.004*	.0012 to .0066
		IL-12p70 concentration (pg/mL)	.0120	0.002*	.0042 to .0198
Progesterone receptor	1.23	% of CD3 internalization	-.0261	0.323	-.0779 to .0256
		MFI of CD69	.0003	0.732	-.0016 to .0023
		IL-12p70 concentration (pg/mL)	-.0038	0.663	-.0208 to .0132

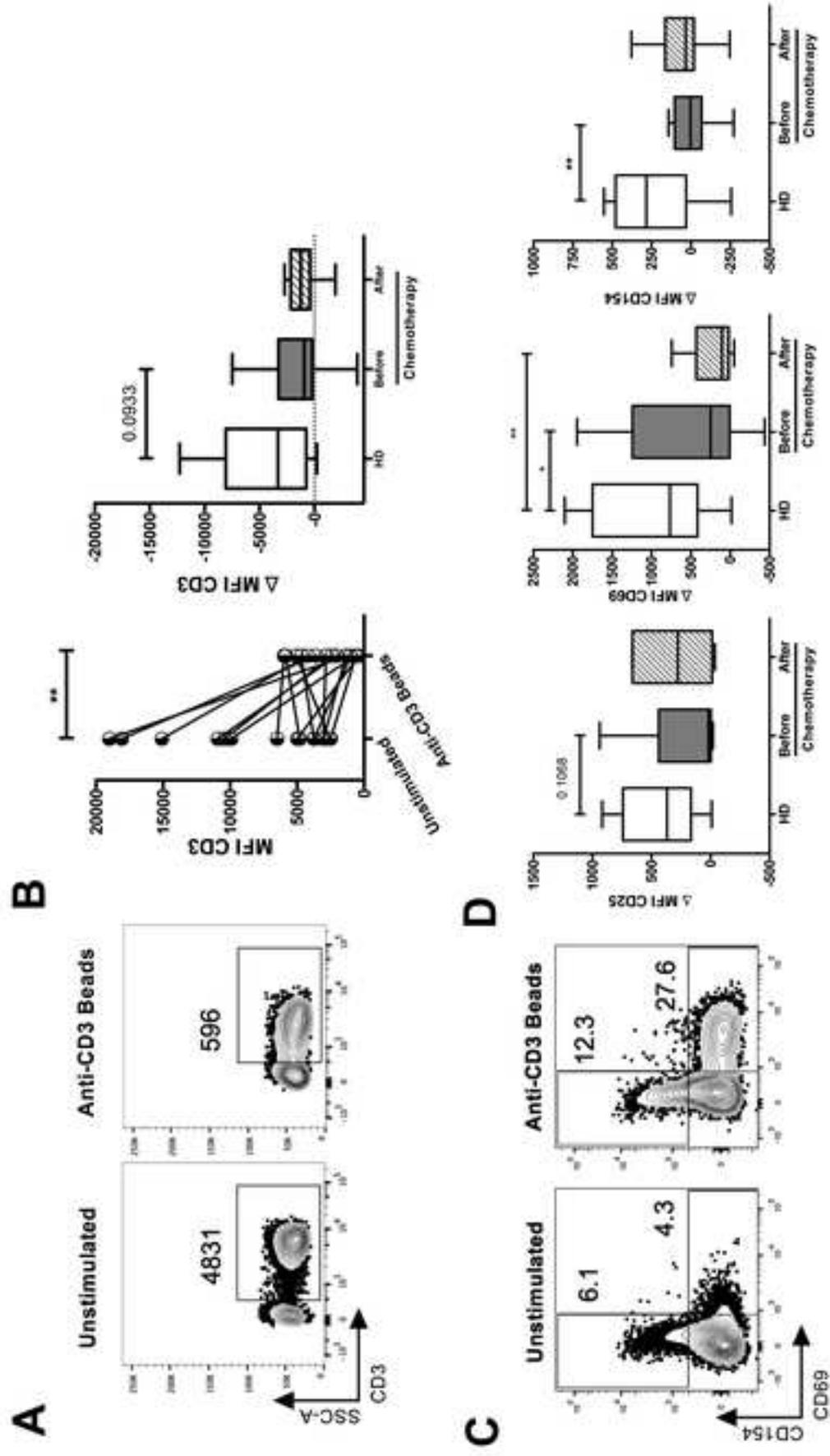
Multiple regression analysis – GEE, * p<0.1 was considered significant

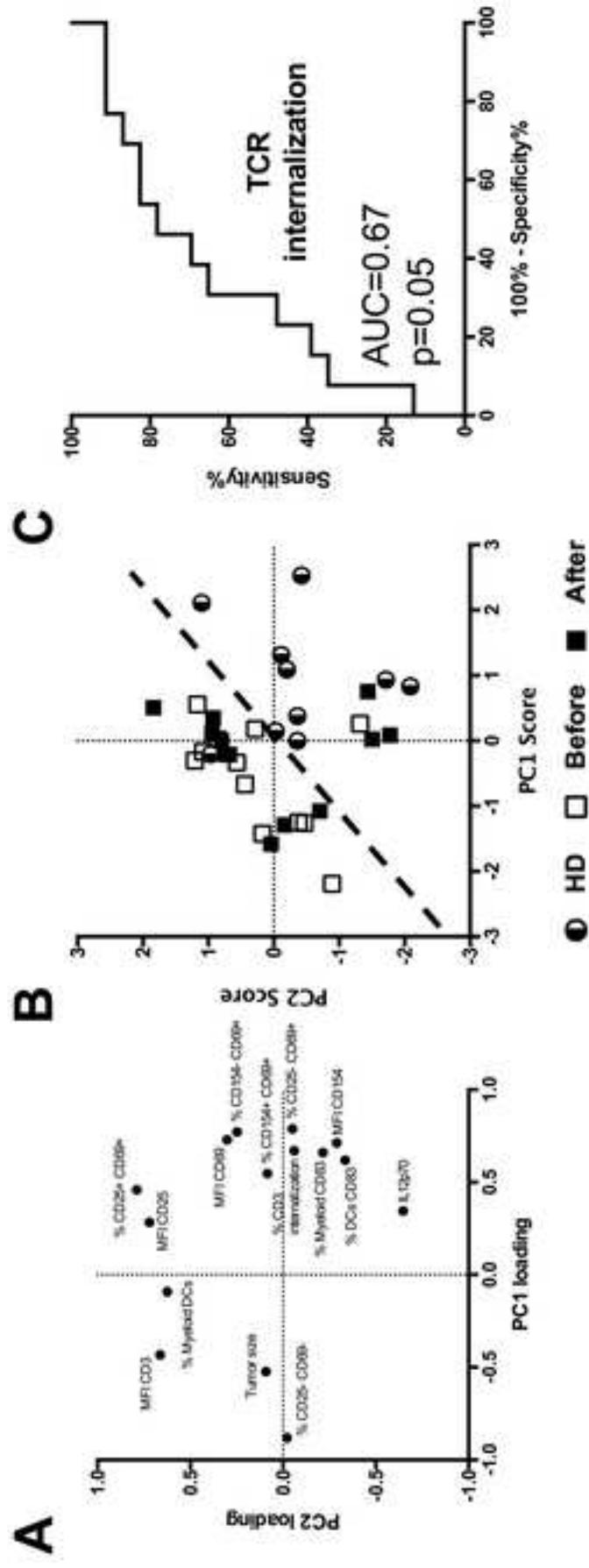
Table 1. Clinicopathologic factors of BC patients.

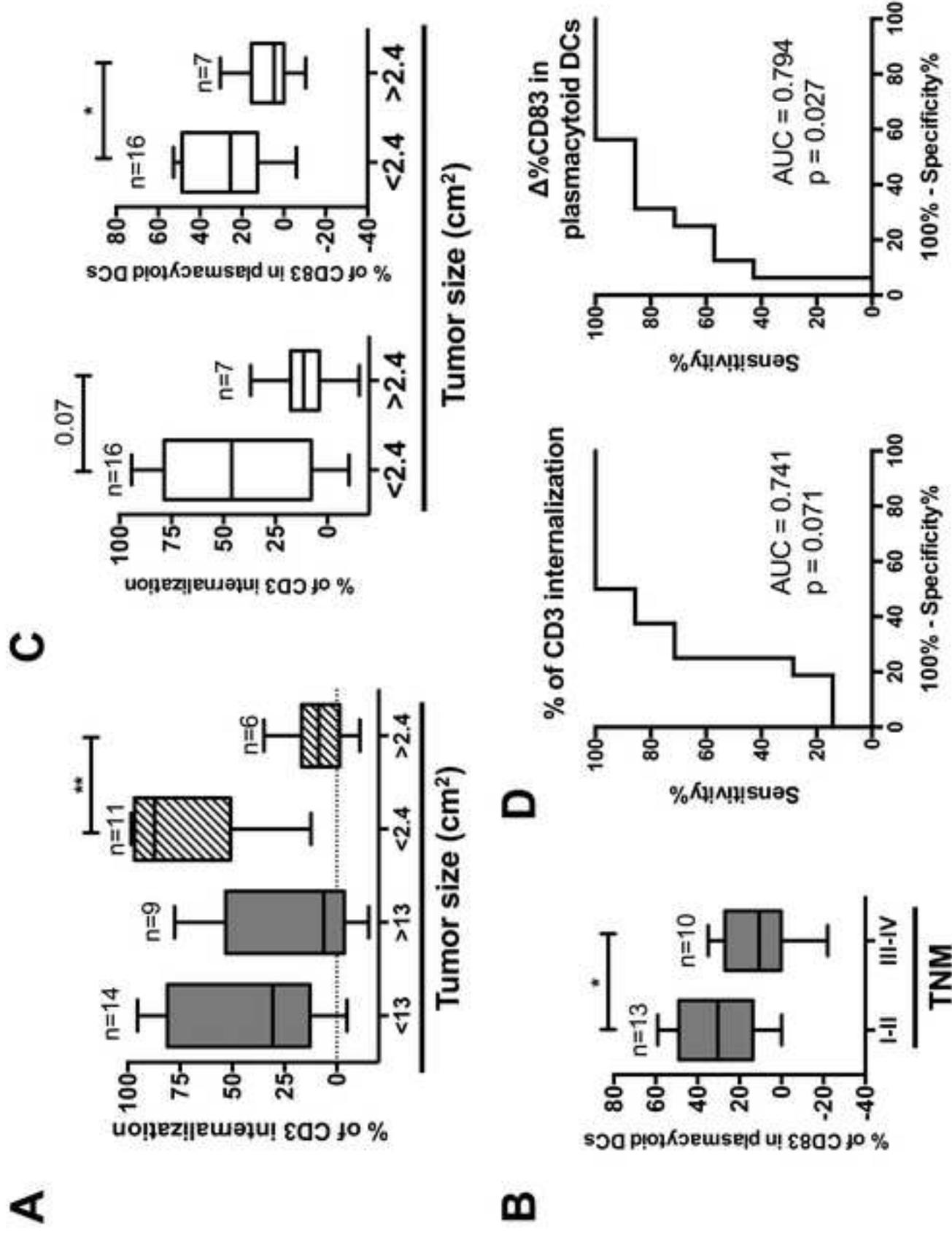
Patients' clinical characteristics	n
Age (years) mean 55.6	
<55	12
>55	11
TNM (stage)	
I	0
II	13
III	6
IV	4
Clinical stage	
IIA	4
IIB	8
IIIA	6
IIIB	4
IIIC	1
Lymph node invasion	
No	9
Yes	14
Distance metastases	
No	22
Yes	1
Tumor area (before therapy cm ²) mean 13.2	
<13	14
>13	9
Tumor area (after therapy cm ²) mean 2.4	
<2.4	11
>2.4	6
Estrogen receptor (ER) mean 52%	
<50%	9
>50%	14
Progesterone receptor (PR) mean 23.7%	
<23%	13
>23%	10
Ki-67 (%) mean 38%	
<38	13
>38	10
Her2/neu	
0-1	15
2-3	8

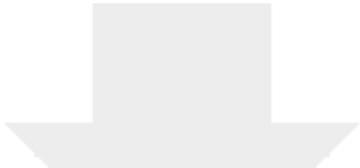




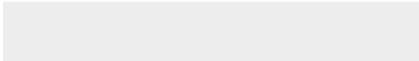
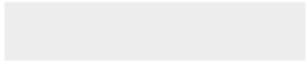






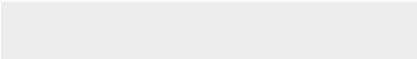
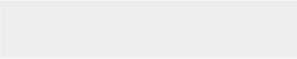


Click here to access/download
Supplementary Material
Figure S1.tif





Click here to access/download
Supplementary Material
Table S1.docx





EVENT ABSTRACT

[Back to Event](#)

AN IMMUNE SURVEILLANCE MODEL TO MONITOR THE RESPONSE TO NEOADJUVANT CHEMOTHERAPY TREATMENT IN BREAST CANCER PATIENTS

David A. Bernal-Estévez^{1, 2}, Oscar A. García³, Ramiro Sánchez⁴ and Carlos A. Parra-López^{1*}¹ Universidad Nacional de Colombia, Department of Microbiology, Colombia² Fundación Salud de los Andes, Colombia³ Instituto Nacional de Cancerología, Servicio de seno y tejidos blandos, Colombia⁴ Clínica del Seno, Colombia

Animal cancer models have allowed to evidence that vaccination of mice with tumors treated with doxorubicin generates immunological effects that contribute to the control of tumors in vaccinated animals. Doxorubicin induces immunogenic cell death of tumor cells, favoring cross-presentation of tumor antigens by dendritic cells (DCs) to CD8+ T-lymphocytes conferring antitumor immunity upon challenge with the tumor. On the other hand, several reports indicate that low-dose of cyclophosphamide used in cancer patients reduces the number of CD4+ FoxP3+ suppressor T cells (Treg). Although treatment with doxorubicin and cyclophosphamide (AC chemotherapy scheme) is widely used for neo-adjuvant treatment in patients with breast cancer, the immune-stimulating effect of AC treatment in these patients has been difficult to prove. In order to evaluate the immune-stimulating effect of neo-adjuvant chemotherapy with AC in patients with breast cancer, in this work - using factor analysis and principal component analysis (PCA) - we compared between pre- and post-chemotherapy samples a large number of immunological parameters (measured *ex vivo* and *in vitro*) in order to monitor changes in the response of T and APC compartments in the blood of patients during treatment. Using multicolor flow cytometry, and peripheral blood samples of patients collected before and after three cycles of AC chemotherapy we quantified: (i) regulatory T cells (CD4+, CD25+, CD127-, FoxP3+); (ii) MDSCs myeloid derived suppressor cells (Lin1-, CD15-, CD13+, CD33+, HLA-DR-, Arg1+); (iii) myeloid DCs (Lin1-, HLA-DR+, CD11c+) and plasmacytoid DCs (Lin1-, HLA-DR+, CD123+); (iv) the activation phenotype (CD69+, CD25+, CD154+, and TCR internalization) of T cells in response to polyclonal activation or to DCs matured with pro-inflammatory stimuli; and (v) the phenotype of Tumor Associated Antigens (TAAs) specific T cells. The results in the patient population analyzed show a reversal of the suppression of T cell response to polyclonal stimuli and maturation of DCs in response to pro-inflammatory stimuli in samples from patients after three cycles of chemotherapy that were not observed in the pre-chemotherapy samples. Interestingly, the T cell response (TCR internalization) highly correlated with IL-12 secretion by mature myeloid DC (CD83+) in the same samples. Using factor analysis and PCA, the data collected with our immune-surveillance system show significant differences between the three categories analyzed (pre- vs. post-chemotherapy patients and healthy donors). The analysis of different variable combinations by PCA lead us to propose an immune stimulating role attributed to chemotherapy with AC. This is characterized by immune responsiveness of T and APC compartments to different stimuli in post-chemotherapy samples not observed in the corresponding pre-chemotherapy samples with levels close to those exhibited by healthy donors. Applying this immune-surveillance model required a careful optimization process of small amount of blood samples and brief *in vitro* cell stimulation periods. Nevertheless these interesting results must be validated with a larger number of patients.

Acknowledgements

This study was supported through funding from the Universidad Nacional de Colombia. DIB, Vicedecanatura de Investigación Medical School (HERMES: 14976, 18458, 19058 and 21275), Colciencias grant No. 110150227509 and Fundación Salud de los Andes. The authors would like to thank Dr. Fabio Méndez. The authors would also like to thank the Hemocentro Distrital, and Dr. Bernardo Camacho, for patient assistance. Moreover, the authors would like to thank the patients and healthy volunteers for donating blood

samples.

Keywords: breast cancer, Chemotherapy, Adjuvant, T cells, Dendritic Cells, Doxorubicin, Monitoring, Immunologic

Conference: IMMUNOCOLOMBIA2015 – 11th Congress of the Latin American Association of Immunology – 10o. Congreso de la Asociación Colombiana de Alergia, Asma e Inmunología, Medellín, Colombia, 13 Oct – 16 Oct, 2015.

Presentation Type: Oral Presentation **Topic:** Tumor immunology

Citation: Bernal-Estévez DA, García OA, Sánchez R and Parra-López CA (2015). AN IMMUNE SURVEILLANCE MODEL TO MONITOR THE RESPONSE TO NEOADJUVANT CHEMOTHERAPY TREATMENT IN BREAST CANCER PATIENTS. *Front. Immunol. Conference Abstract: IMMUNOCOLOMBIA2015 – 11th Congress of the Latin American Association of Immunology – 10o. Congreso de la Asociación Colombiana de Alergia, Asma e Inmunología*. doi: 10.3389/conf.fimmu.2015.05.00285

Received: 07 May 2015; **Published Online:** 15 Sep 2015.

* **Correspondence:** MD, PhD. Carlos A Parra-López, Universidad Nacional de Colombia, Department of Microbiology, Bogota, Cundinamarca, 111321, Colombia, caparral@unal.edu.co

[Back to top](#)

© 2007 – 2015 Frontiers Media S.A. All Rights Reserved



EVENT ABSTRACT

[Back to Event](#)

USEFULNESS OF TWO DAY TYPE I ALPHA DENDRITIC CELLS TO MONITOR T CELL IMMUNITY ELICITED BY ANTI TUMOR THERAPY

David A. Bernal-Estévez^{1, 2}, Ramiro Sánchez³, Rafael Tejada⁴ and Carlos A. Parra-López^{1*}¹ Universidad Nacional de Colombia, Department of Microbiology, Colombia² Fundación Salud de los Andes, Colombia³ Clínica del Seno, Colombia⁴ Hospital Occidente de Kennedy, Servicio de Oncología, Colombia

Experimental evidence and clinical studies suggests that some chemo-radiotherapy regimens in cancer patients generate stimulation of the immune system that account for the clinical response induced by these therapies, however, demonstrate the immune-stimulatory power of the anti-tumor therapy continues to be a formidable challenge. In an effort to reveal the stimulating effect of the anti-tumor therapy, in this study we optimized first, in vitro conditions that allow to study in peripheral blood low number of antigen specific T cells (CD4+ or CD8+), and second, the validation of the usefulness of such culture conditions to assess the capacity of cancer therapy to induce immune responsiveness. To implement the in vitro culture conditions, two types of matured dendritic cells (DCs) obtained in two days from monocytes cultured in GM-CSF and IL-4 were used to stimulate antigen specific T cells. While the first DC type - hereinafter called to as Type I Alpha-DCs (aDCs) - was matured with type I interferons and TLR ligands, the second type named standard DCs (stDCs) was matured with a cocktail of pro-inflammatory cytokines. Despite both types of matured DCs exhibited a similar phenotype at the surface (CD80+, CD86+, CD83+), aDCs were more efficient than stDCs in the production of IL-12p70; in vitro expansion of CD4+ T cells with stem cell like memory phenotype (CD45RA+ CCR7+, CD95+, IFN- γ +) from a healthy individual with latent tuberculosis and expanding both CD8+ and CD4+ T cells specific for Tumor Associated Antigens (TAAs) present in blood samples from women with breast cancer. To evaluate the beneficial effect on the immune response of the anti-tumor treatment, we compared side by side the performance of aDCs and stDCs in priming naïve T cells and inducing stimulation of memory T cells with Tumor Associated Antigens (TAAs) present in peripheral blood samples taken before and after chemotherapy in a breast ductal cancer patient (HLA-A*02:01), stage IIIb (HER2/neu +++) treated with surgery and Herceptin that today remains tumor free after 7 years of having completed cancer treatment. In these experiments aDCs were again more efficient than stDCs in stimulating memory T cells and naïve TAAs specific CD8+ T cells in blood samples after chemotherapy. Moreover, the response of T cell to TCR stimulation and that of monocytes to a pro-inflammatory stimulus was compared side by side between samples pre- vs. post-chemotherapy. While in response to anti-CD3/anti-CD28/anti-CD2 micro-beads, T cells post-chemotherapy internalized the TCR and exhibited higher expression of CD69+; CD25+ and CD154+ more efficiently than T cell obtained from pre-chemotherapy, in response to a cocktail of pro-inflammatory cytokines monocytes post-chemotherapy responded with higher production of IL-1 β , IL-6, and IL-8 than monocytes pre-chemotherapy. Finally, the frequency of 24 families TCR-V β in CD8+ HLA-A*02:01 (HER2/neu 369-377) tetramer positive T cells present in blood samples pre- and post-chemotherapy was determined by flow cytometry in order to quantify the repertoire of CD8+ T cells specific for this antigen. This analysis showed an expansion in peripheral blood of the TCRV β families 7.1, 9, 5.1 and 4 after chemotherapy. In order to correlate this finding with the specificity of Tumor Infiltrating Lymphocytes (TILs), the sequence of the total CDR3 region of pre and post-chemotherapy T cells was performed and compared with CDR3 sequences retrieved from paraffin-fixed tumor tissue. The comparison of the TCRV β repertoire of T cells in blood pre- and post-chemotherapy with that detected in situ (within the tumor) showed that the TCR clonotype V β 4:02 selectively enriched in blood after chemotherapy and that this clonotype is highly represented in TILs. Taken together, these results suggest that antitumor therapy induces regression of immunosuppression in T and APC compartments observed in pre-chemotherapy and led us to argue on the usefulness of two day type I alpha dendritic cells to monitor T cell immunity elicited by anti tumor therapy.

Acknowledgements

This study was supported through funding from the Universidad Nacional de Colombia. DIB, Vicedecanatura de Investigación Medical School (HERMES: 14976, 18458, 19058 and 21275), Colciencias grant No. 110150227509 and Fundación Salud de los Andes. The authors would like to thank Dr. Fabio Méndez. Moreover, the authors would like to thank the patients and healthy volunteers for donating blood samples.

Keywords: breast cancer, Chemotherapy, Adjuvant, T cells, T cell repertoire, Dendritic Cells, her2/neu

Conference: IMMUNOCOLOMBIA2015 – 11th Congress of the Latin American Association of Immunology – 10o. Congreso de la Asociación Colombiana de Alergia, Asma e Inmunología, Medellín, Colombia, 13 Oct – 16 Oct, 2015.

Presentation Type: Oral Presentation **Topic:** Tumor immunology

Citation: Bernal-Estévez DA, Sánchez R, Tejada R and Parra-López CA (2015). USEFULNESS OF TWO DAY TYPE I ALPHA DENDRITIC CELLS TO MONITOR T CELL IMMUNITY ELICITED BY ANTI TUMOR THERAPY. *Front. Immunol. Conference Abstract: IMMUNOCOLOMBIA2015 – 11th Congress of the Latin American Association of Immunology – 10o. Congreso de la Asociación Colombiana de Alergia, Asma e Inmunología*. doi: 10.3389/conf.fimmu.2015.05.00284

Received: 11 May 2015; **Published Online:** 15 Sep 2015.

* **Correspondence:** MD, PhD. Carlos A Parra-López, Universidad Nacional de Colombia, Department of Microbiology, Bogota, Cundinamarca, 111321, Colombia, caparral@unal.edu.co

[Back to top](#)

© 2007 – 2015 Frontiers Media S.A. All Rights Reserved

Functional and Phenotypic Analysis of Two-Day Monocyte-Derived Dendritic Cells Suitable for Immunotherapy Purposes

David Andrés Bernal-Estévez^{1,2,#}, Diana Rocio Tovar Murillo^{1,2,#}, and Carlos Alberto Parra-López^{2*}

¹Immunology and Clinical Oncology Research Group (GIIOC), Fundación Salud de los Andes, Bogotá-Colombia South-America.

²Immunology and Translational Medicine Research Group, Universidad Nacional de Colombia, Graduated School in Biomedical Sciences. Department of Microbiology, Carrera 30 Calle 45, Bogotá-Colombia South-America.

[#]Both authors contribute equally to this work.

Received: November 07, 2016; Accepted: November 17, 2016; Published: December 19, 2016

*Corresponding author: Carlos Alberto Parra-López, Universidad Nacional de Colombia, Facultad de Medicina, Departamento de Microbiología oficina, Carrera 30 Calle 45-03, Bogotá, Colombia, Tel:+57 1 316 5000 x 15016; Fax: (+57 1) 316 5000 x 15024; E-mail: caparral@unal.edu.co

Abstract

Background: Optimize the generation of clinical-grade monocyte-derived dendritic cells (DC) suitable for cancer immunotherapy affordable to cancer patients worldwide remains a formidable challenge. Although vaccination with DC pulsed with tumor-associated antigens (TAA) has been thoroughly evaluated in Caucasian individuals, the immunogenicity of DCs in Colombian individuals is yet to be explored.

Methodology: Mononuclear cells obtained from buffy coats of healthy Colombian volunteers were used to compare the phenotype and proficiency as Antigen Presenting Cells (APC) of matured DCs obtained in two vs. seven days from monocytes purified either by adherence to plastic or by negative selection used fresh or after cryopreservation. Furthermore, the functional capacity of two types of 2d-DCs matured with two different cytokine-cocktails: Standard (2d-stDCs) or Type I Alpha (2d-aDCs), to prime or boost TAA specific CD8+ T cells and to stimulate Th1 stem cells and follicular T helper CD4+ T-cells (TFH), was examined.

Results: Both 2d-stDCs and 2d-aDCs exhibited a maturation profile similar to standard DCs obtained in seven days. Despite both types of DCs were efficient in stimulating antigen specific CD4+ and CD8+ T cells, only 2d-aDCs secreted high amounts of IL-12p70 and fostered more efficiently than 2d-stDCs the expansion of stem memory Th1, TFH cells and effector TAA specific CD8+ T cells.

Conclusions: Two-day derived DCs are phenotypically and functionally equivalent to seven day derived DCs and are suitable for cancer immunotherapy in Colombian individuals.

Key Words: Dendritic cells; T Lymphocytes; Flow Cytometry; Immunotherapy; HLA-A*0201-restricted Tumor-Associated Antigen.

Abbreviations

DCs: Dendritic Cells; 2d-DCs: two-day monocyte-derived DCs; 7d-stDCs: seven-day monocyte-derived DCs; iDCs: immature DCs; PBMCs: Peripheral Blood Mononuclear Cells; FC: Flow Cytometry; DC-SIGN: Dendritic cell-specific ICAM-3 grabbing non-integrin (CD209); CFSE: Carboxy Fluorescein Succinimidyl ester; TAAs-A2: Tumor associated antigens.

Introduction

Since the initial description of dendritic cells (DCs) more than 40 years ago [1], their role in T cell mediated immunity in particular in anti-tumor immunity have been deeply studied [2]. The clinical use of autologous DCs for therapy in cancer patients have shown that DCs are a secure therapeutic strategy that elicit variable clinical responses with low adverse effects in treated patients[3]. This strategy aims the recovery of the immune system unresponsiveness promoted by the tumor microenvironment that ends up with the reestablishing of the anti-tumor capacity of cytotoxic T cells (CTLs) [4-10]. Characterizing the phenotype of monocyte-derived DCs after maturation continue being a valuable tool to examine *in vitro* the potential benefits of these cells in generating protective immunity against tumors in cancer patients.

In humans, there are two groups of primary DCs, the myeloid DCs characterized by the expression of CD11c and CD33, and lymphoid derived or plasmacytoid DCs which express CD123 and CD45RA. While the number of myeloid DCs in peripheral blood or infiltrating DCs in tumors is decreased, the number of plasmacytoid DCs is not altered. Robust evidence suggests that myeloid DCs in cancer patients have an immature phenotype [11, 12] that induce immune tolerance within tumor microenvironment[13, 14]. That DCs isolated from patients recover responsiveness to maturation stimuli *in vitro* or that DCs from normal individuals express an immature phenotype when exposed to tumor cells supernatant, suggests that in cancer patients a wide variety of stimuli secreted by tumors hampers functionality of myeloid DCs[15]. Therefore, vaccines based on DCs has been actively explored for the last several years to surmount both the poor presentation of tumor antigens by tumor cells likewise the deficient performance as APCs of primary DCs in cancer patients [15].

The ability of DCs to activate T cells capable of recognizing and destroying tumor cells in an antigen-specific manner has been demonstrated in clinical protocols carried out in cancer patients

in which DCs pulsed with tumor antigens has been used as vaccines [16]. It has been observed that this type of vaccine is safe and more tolerable than other treatments such as chemotherapy or radiation therapy[3], with variable clinical and immunological responses [5, 17-19]. The clinical evidence suggests that immune stimulation of cancer patients with autologous DCs pulsed in vitro with tumor antigens is possible and that the use of this class of therapeutic vaccines in a variety of invasive tumors opens the possibility of prolonging the life expectancy of treated patients while improving their quality of life.

Because DCs are in a very low amount in peripheral blood, during the last decade it has been described several methods for their generation in vitro from peripheral blood monocytes cultured with IL-4 and GM-CSF and matured with various combinations of pro-inflammatory cytokines and/or Toll-Like Receptors (TLRs) agonists [20]. Most of clinical trials conducted to date have used monocyte-derived DCs generated in seven days (7d-DCs): five days in the presence of GM-CSF and IL-4 followed by the addition of the maturation stimuli for two days. Additionally, there are some reports proposing the generation of DCs in a shorter period of time: DC induction from monocytes treated with GM-CSF and IL-4 for 24 hours is followed by 24 hours incubation with a pro-inflammatory stimulus (2d-DCs), a timing that allows to achieve competent DCs that elicits antigen-specific Th1 immune responses[21, 22]. Translation of this modification in timing into the clinic would make DC production less laborious and will drop the costs of mass production of DCs, two features of DC production that must be considered to make DC-based immunotherapy more accessible to cancer patients in undeveloped countries. Finally, a newly described combination of cytokines for maturation of DCs that includes type I interferons and TLR ligands [23] that induces mature DCs denominated Type I alpha DCs or alpha-DCs, that are characterized by high production of IL-12 and the efficient activation of CD8+ T cells against tumors.

Given the importance of implementing new alternatives for the management of cancer in Colombia, in this work, we evaluated yield of production, phenotypic and functional characteristics of matured 2d-DCs from healthy Colombian individuals obtained through two different combinations of maturation cytokines. Our results demonstrate that DCs derived in two days, have a clear maturation phenotype and the capacity of activating T cells (both cytotoxic and follicular helper - TFH cells), suggesting that 2d-DCs are suitable to be used in Colombian individuals for cancer immunotherapy.

Materials and Methods

Patients and monocyte enrichment: This study was approved through the Ethics Committee of the Medical School – Universidad Nacional de Colombia (CE-14, 9 August 2012, Act. 107). All participants provided informed consent before the blood samples were collected. Heparinized blood samples (60 mL) were obtained from healthy volunteers or latent *Mycobacterium tuberculosis* (*M. tb.*) infected (LTBI) donors (QuantiferON TB Gold test in tube positive and Tuberculin Skin Test positive) and a blood sample (20 mL) was obtained from a breast cancer patient

diagnosed with ductal breast cancer (HLA-A*02:01) before chemotherapy. PBMCs were purified using density gradient ficoll and cryo-preserved in freezing medium (50% RPMI + 40% FCS + 10% DMSO). Monocytes were enriched after the adherence to plastic for 2 hours or by negative selection (RosetteSep - STEMCELL Technologies).

Dendritic cell generation: Immature DCs (iDCs) were differentiated from purified monocytes or total PBMCs using 1000 UI/mL of GM-CSF and 750 UI/mL of IL-4 (Cellgenix - Germany) for 24 hours (for 2d-aDCs or 2d-stDCs generation) based on the methodology described by Dauer et al.[21] or 5 days (for 7d-stDCs generation) as described by Jonuleit et al. [24]. iDCs were matured using two different cytokine cocktails: the standard cocktail, containing IL-1 β , IL-6, TNF- α (all from Cellgenix) and PGE2 (Sigma-Aldrich) for 24 (2d-stDCs) or 48 hours (7d-stDCs); or the Type I alpha cocktail, containing IFN- α (Intron-A; Schering Plough Corp., Kenilworth, NJ), IFN- γ (R&D Systems), Poly I:C (Sigma-Aldrich), TNF- α , IL-6, and IL-1 β (Cellgenix - Germany) for 24 hours (2d-aDCs) as previously described by Mailliard et al.[23]. All cells (fresh or after cryopreservation in liquid nitrogen) were cultured in AIM-V medium (Life Technologies).

Mixed Leukocyte Reaction (MLR) and proliferation assays: Highly purified CD4+ T cells by magnetic beads system (Miltenyi Biotec – Germany) were obtained from PBMCs of healthy donors and stained with 2 μ M. CFSE (Life technologies); labeled cells were stimulated with autologous 2d-stDCs or 7d-stDCs, pulsed with tetanus toxoid or stimulated with 10 μ M phytohemagglutinin (PHA)-M (Sigma-Aldrich). After 6 days of cell culture, CD4+ T cells were labeled with anti-CD69 (BD). For MLR, purified CD4+ T cells from three different donors were labeled with CFSE and co cultured with allogeneic 2d-stDCs for 6 days, after harvesting the cell T cells were labeled with antiCD69 and analyzed by flow cytometry in a FACS Aria II (BD).

T cells stimulation and cytotoxicity assays: Two different T cell stimulation methods were used [Figure S1]. Total PBMCs were enriched with 2d-stDCs or 2d-aDCs based on the methodology of Martinuzzi et al.[25]. Briefly, PBMCs were cultured with IL-4 and GM-CSF (as described above) for 24 hours in the presence of 5 μ M of Tumor-Associated Antigens (TAAs) Her2/neu, Melan-A (MART-1), NY-ESO-1, Telomerase, *M. tb.* peptides as described by Goletti et al.[26], purified ESAT-6 protein or *M. tb.* H37Rv sonicate, and *L. major* peptide as control. After 24 hours the iDCs were subsequently matured using either 2d-stDCs or 2d-aDCs maturation cocktails, with or without the addition of 5 μ M of the corresponding peptide(s) for 6 days [Figure S1A]. The second method is based on the methodology of Moser et al.[27]; briefly, frozen PBMCs were sorted (FACS Aria II - BD) into three different populations, CD14+ (monocytes), CD4+ and CD8+ T cells, using the BD FACS Aria II System (BD Biosciences). The monocytes were differentiated into 2d-stDCs or 2d-aDCs, pulsed or unpulsed with corresponding peptides or proteins (5 μ M each) and subsequently cultured with purified CD4+ or CD8+ T cells for 14 days at a ratio of 50:1 (T cell: DCs) in AIM-V culture media (Life Technologies), for CD8+ T cell culture 30 UI/mL IL-2 was added. After priming, CD4+ or CD8+ T cells were stimulated with

corresponding peptide-pulsed 2d-stDCs or 2d-aDCs and cultured for 6 additional days [Figure S1B] For cytotoxicity assays, CD8+ T cells from healthy donors were stimulated as described above, and labeled with CD107a or CD107b for 12 hours before flow cytometry analysis.

Peptide synthesis: All peptides were generated through solid phase peptide synthesis (21st Century Biochemicals, CPC Scientific and in the Fundación Instituto de Inmunología de Colombia - FIDIC), with high purity >85%. The lyophilized peptides were dissolved in DMSO and diluted in PBS to a working concentration of 2 mM each.

Flow cytometry and cytokine quantification: The DCs were labeled with CD80 PE, CD83 PE-Cy5, CCR7 FITC, HLA-DR APC, CD14 Alexa Fluor 700, CD209 FITC, CD123 PE or CD11c APC (all from BD). Purified T cells or total PBMCs were stained with CD3 Pacific Blue, CD4 ECD (Beckman coulter) or CD8 PE-Texas Red (eBiosciences), CD45RO FITC, CD45RA PE-Cy5, CD62-L PE (BD), CD154 APC (eBiosciences), CD95 APC, or CCR7 FITC (R&D Systems). The intracellular staining of IFN- γ PE, TNF- α APC, and IL-2 PE (BD biosciences) was performed using cytofix/cytoperm and perm/wash reagents from BD Biosciences. Biotinylated HLA-A*02:01 tetramers were synthesized at the Lawrence Stern Laboratory, University of Massachusetts Medical school by CP, Melan-A tetramer was kindly gifted by Professor Pedro Romero, Ludwig Cancer Research Institute – Switzerland, and the tetramers were labeled with streptavidin-PE (Invitrogen) at a 4:1 molar ratio before use. Cytokine secretion (TNF- α , IFN- γ , IL-6 or IL-12p70) was measured in the culture supernatants using human Th1/Th2 and Inflammatory CBA kits (BD Biosciences). The samples were acquired using the FACS Aria II System at the Universidad Nacional de Colombia - Medical School. The flow cytometry data were exported in FCS format v3 and analyzed using Flow Jo software (Treestar Inc.). The graphics were generated using Prism v5 software (Graph Pad).

Microscopy: The images of iDCs, 2d-aDCs and 2d-stDCs were obtained using an inverted microscope (Nikon Eclipse TS100) coupled to a digital camera (Canon Powershot S120) at 20x magnification. The pictures were cropped in Photoshop CS5 (Adobe).

Statistical analysis: The data was analyzed by Two-way ANOVA with Bonferroni posttest to compare the mean between groups, and Mann-Whitney test for non-parametric analysis between immature and mature cells. p value was significant if below 0.05 (*), 0.01 (**), 0.001 (***) or 0.0001 (****). Data was analyzed in Prism v5 software (Graph Pad).

Results

Two-day monocyte-derived dendritic cells (2d-DCs) have similar characteristics than Dendritic cells derived in seven days (7d-DCs)

The optimization process of generating DCs involves the reduction of cultivation time, usually DCs are generated within 7 days, but reducing the time to two-day culture, reduces costs, increases cell viability and the total number of DCs that can be

recovered to be used in immunotherapy. Initially, we compared side by side the immune phenotype and functional characteristics of immature DC (iDC) and after treatment for 24 or 48 hours in the presence of the standard cytokine cocktail (IL-1 β , IL-6, TNF- α , and PGE2) based on the methodology described by Dauer et al. [21, 28]. Monocytes purified from healthy donors were cultured for 24 hours or 5 days in the presence of IL-4 (1000 IU/mL) and GM-CSF (750 IU/mL). Subsequently, to induce maturation of 2d-stDCs and 7d-stDCs, the iDCs were cultured in the presence of the maturation cocktail containing IL-1 β , IL-6, TNF- α and PGE2 [10]. As shown in Figure 1A, changes in cell morphology were evident by direct observation under microscope, initially noted that 7d-DCs have a larger size compared with the size of 2d-DCs despite the maturation state, however, after 24 hours of maturation, DCs change from a round shape to present elongated dendrites in 2d-stDCs, and present multiple dendrites in 7d-stDCs. This difference of size and complexity was confirmed by Flow Cytometry (FC) using SSC-A vs. FSC-A analysis [Figure 1B], where 7d-DCs have the greatest distribution of light dispersion in contrast to 2d-stDC or monocytes. Subsequently, multi-parametric FC was used to compare the expression of CD83, CD209, CD14, CCR7, CD80, HLA-DR, and CD86 in iDCs, and mature DCs 2d-stDCs and 7d-stDCs. The standard cocktail of cytokines in 7d-stDCs clearly induces a maturation phenotype as expected [Figure 1C], with increased expression of CD80, CD83, CCR7, CD86 and HLA-DR and decreased expression of CD14 and CD209. This phenotype was consistent with previous studies [29, 30]. In particular, treating iDCs with maturation stimuli for 24 hours generates 2d-stDCs with a phenotype very similar to that of 7d-stDCs maturation in terms of increase, CD80, CD86, CCR7, CD83, and HLA-DR and decreasing of CD209 and CD14 expression [Figure 1C]. These results suggest that the time reduction necessary to generate mature DCs *in vitro* does not affect the phenotype of mature DCs.

2d-stDCs have a similar mature phenotype in comparison to 7d-stDCs regardless of monocyte purification system

Despite several procedures available to obtain monocytes from peripheral blood such as (i) positive or negative selection of CD14 cells (either by flow cytometry or magnetic beads) and (ii) cell adhesion to plastic, plastic adherence of monocytes has been the procedure most widely used to produce DCs from monocytes *in vitro*. During the optimization process of DC production, we compared two procedures to obtain monocytes from peripheral blood, first, by negative selection and second, by adherence to plastic that is a low-cost procedure and a rather “standard method” for monocyte enrichment. Additionally, we evaluated if the cryopreservation of purified monocytes compared to freshly isolated monocytes (isolated by negative selection or adherence to plastic) did affect maturation of DCs.

We evaluated the effect of pro-inflammatory cytokines standard cocktail to induce mature DCs (Figure 2). Initially, we evaluate the phenotype of DCs derived from monocytes purified by negative selection, as expected the pro-inflammatory cytokines induce a significant increase in the expression of CCR7,

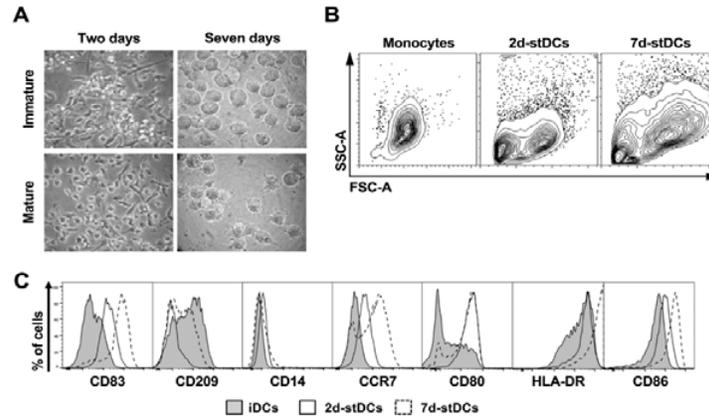


Figure 1: Morphological and phenotypic differences between dendritic cells matured in seven days (7d) and two days (2d). A. Microscopic view (40X) of the DC-derived in vitro from purified monocytes, mature or immature 2d, and 7d (2d-iDCs, 7d-iDC). B. Contour plots of FSC-A vs. SSC-A of purified monocytes, dendritic cells matured in 2d and 7d-DCS (from left to right respectively). C. Histograms representing the expression of maturation markers, CD83, CD209, CD14, CCR7, CD80, HLA-DR, and CD86 on immature dendritic cells (gray histogram), two days mature DCs (empty histogram) and seven days mature DCs (Histogram with dashed line).

CD86, CD83, and CD80 with the expected reduction of CD209 in 2d-stDCs and 7d-stDCs [Figure 2, panels A and E, respectively]. When we evaluate the phenotype of DCs derived in two and seven days from adherent cells suitable for clinical use, we found that the purification method does not affect the phenotype in mature DCs. Interestingly, 2d-stDCs have a more pronounced difference between immature and mature cells than 7d-stDCs [Figure 2, panels B and F, respectively]. Finally, it is important to compare the effect of monocyte cryopreservation in the phenotype of mature DCs, to evaluate this, we analyze the same phenotype as described before in freshly isolated and cryopreserved monocytes in either two days and seven days DCs (Figure 2), panels C, D, G, and H. The phenotype found in these cells evidence that the cryopreservation of monocytes does not affect the capacity of monocytes to respond to pro-inflammatory cytokines, even more, 2d-stDCs have a more significant difference between immature and mature DCs compared to 7d-stDCs. These results also show that the quantification of HLA-DR and CD14 are not suitable for maturation markers of 2d-stDCs or 7d-stDCs. Finally, the mechanism for obtaining and preservation of monocytes does not affect their ability to respond adequately to the cocktail of cytokines.

Based in FDA approved Sipuleucel-T (Provenge®) that consist of a fusion of GM-CSF with the Prostatic Acid Phosphatase (PAP) specific antigen of prostate cancer, used in total cells to induce antigen presentation by Antigen Presenting Cells (APC) thanks to the function of GM-CSF, we wanted to evaluate the advantages of inducing the differentiation and maturation of DCs from total PBMC without prior purification process of monocytes using a similar approach to that described by Martinuzzi et al., who evaluated the ability of IL-4 and GM-CSF followed by a maturation stimulus to amplify memory T cells in total PBMC [25]. Using two-days DCs, we compared the expression of CCR7,

CD80, CD83, and CD14, in CD11c+ cells in adherent and non-adherent fraction, exposed or not to the cocktail of cytokines [Figure S2], after collecting the cells we found that in the non-adherent fraction there are cells that have a phenotype of mature DCs with similar phenotype to cells that remain attached to plastic [Figure S2].

Finally, when we analyze the phenotype of 2d-stDCs in comparison to immature DCs, our results confirm that 2d-stDCs [Figure 2D] have a similar phenotype compared to 7d-stDCs [Figure 2H]. This phenotype is characterized by a marked reduction of CD209 and increased expression of CCR7, CD80, and CD83 in 2d-stDCs. Despite differences in the morphology of DC [Figure 1], we found that DCs derived in two days, have a more pronounced difference between immature and mature DCs compared to DCs derived in seven days.

Multiparametric analysis of DCs maturation markers confirms a similar phenotype between 2d- and 7d-stDCs

The study of DCs phenotype includes the expression of different profiles that includes up regulation of co-stimulatory and MHC class II molecules, chemokine receptors, among others, that make the definition of a mature DC difficult to compare between studies. In order to determine the value of the analysis of one or more maturation markers in the phenotype of 2d- and 7d-stDCs we performed a multivariable analysis of two or more parameters to define the mature phenotype of DCs. Initially, we compared the phenotype of immature and 7d-stDCs to establish the combination that describes the best difference between immature and mature DC. Notably, combinations of three parameters that includes CD80, CD209 negative, and HLA-DR or two parameters: CCR7 and CD83 or CD83 and CD86 expression, exhibited the most significant difference [Figure 3A]. The same

analysis process was also done with 2d-stDCs; In this case, most combination of markers (including two, or four parameters simultaneously), showed significant differences between mature and immature DCs [Figure 3B]. Finally, when comparing mature 2d-stDCs with 7d-stDCs [Figure 3C], we evidenced that most of the combinations of markers (except for CD80 and CD209 negative cells) were not statistically different between these two types of DCs suggesting that monocyte derived DCs obtained in either two and or seven days have a very similar maturation phenotype.

Mature 2d-stDCs are capable of inducing specific T cell activation and proliferation

Based on the DCs phenotype obtained in 2d-stDCs we assess the capacity of these cells to induce T cell responses. To achieve this, mature 2d-stDCs from healthy individuals vaccinated against tetanus were pulsed with Tetanus Toxoid (TT) recombinant protein (5µM) and PHA-M (5µM) was added to a control culture

as positive control, the pulsed 2d-stDCs were co-cultured with autologous purified CD4+ T cells (positive selection - Miltenyi Biotec) labeled with CFSE (2µM), after 6 days of co-cultivation, proliferation and expression of CD69 by T cells were assessed by FC and IFN-γ was measured by ELISA in culture supernatants. 2d-stDCs showed to be efficient in inducing proliferation of CD4+ T cells [Figure S3] This figure shows that 50% of T cells proliferate in response to the stimulus compared to the unpulsed 2d-stDCs (19.6%). Besides, 2d-stDCs were able to activate CD4+ cells in response to a nonspecific stimulus such as PHA-M (92.9% in cell proliferation). A slight difference in CD69 expression when CD4+ T cells were stimulated with 2d-stDCs pulsed with TT in comparison to negative control (13.4 vs. 8.29% respectively) and a high CD69 expression when stimulated with PHA-M (43.5%) were observed. Compared with negative control, TT specific CD4+ T cells produced more IFN-γ after 40 hours of co-culture (10 and 93pg/mL, respectively, Figure S4A); CD4+ T cells stimulated with 2d-stDCs pulsed with PHA-M, showed an IFN-γ production more than five hundred times greater than the control (5400 pg/mL, Figure S4A). These results evidence the capacity of 2d-stDCs to activate and induce proliferation of CD4+ T cells in response to specific stimuli.

Similarly, to TT assay, we use a Mixed Leukocyte Reaction (MLR) in the presence of 2d-stDCs as a model to study the ability of 2d-stDCs to initiate primary immune responses and to induce the proliferation and CD69 expression in purified CD4+ T cells in an in vitro assay using 2d-stDCs co-cultured with syngeneic CD4+ T cells (control) or with CD4+ T cells from different individuals (allogenic) previously labeled with CFSE, during 6 days. As could be shown by FC [FigureS3B], allogenic CD4+ T cells proliferated around 30% in response to allogeneic stimulation, compared to control, which showed only a 0.7% of cells growing. The percentage of CD69 positive cells was higher in the allogeneic co-culture (6-9%), compared to 2.7% in the control culture [Figure S3B]. In cultured 2d-stDCs with autologous CD4+ T cells no production of IFN-γ was evidenced, contrary to cultures containing heterologous lymphocytes with a production of 566, 338 and 430 pg/mL of cytokine on each of the tested individuals [Figure S4B]. Altogether the results of proliferation, expression of activation markers and cytokine secretion in cells stimulated with 2d-stDCs let us to argue for a high capacity of these cells to stimulate CD4+ T cells.

To assess the ability of 2d-stDC to induce an immune response in CD8+ T cells specific for tumor associated antigens (TAA), the expansion of CD8+ T cell precursors labeled by fluorescent tetramers was assessed in healthy donors that express the HLA-A*02:01 allele (determined by SSP-PCR). To do this, TAA peptides restricted to HLA-A2 (Melan-A and NY-ESO 1 at 10µM) were used to pulse 2d-stDCs that were co-cultured with autologous CD8+ T cells for 10 days in the presence of IL-2 and IL-7. After 10 days of cell culture, the T cells were restimulated with 2d-stDC pulsed with peptide for an additional 72 hours and stained with tetramers to identify populations of CD8+ T cells specific for the corresponding TAA. As shown in Figure 4A, the 2d-stDCs pulsed with peptides Melan-A and NY-ESO1 were

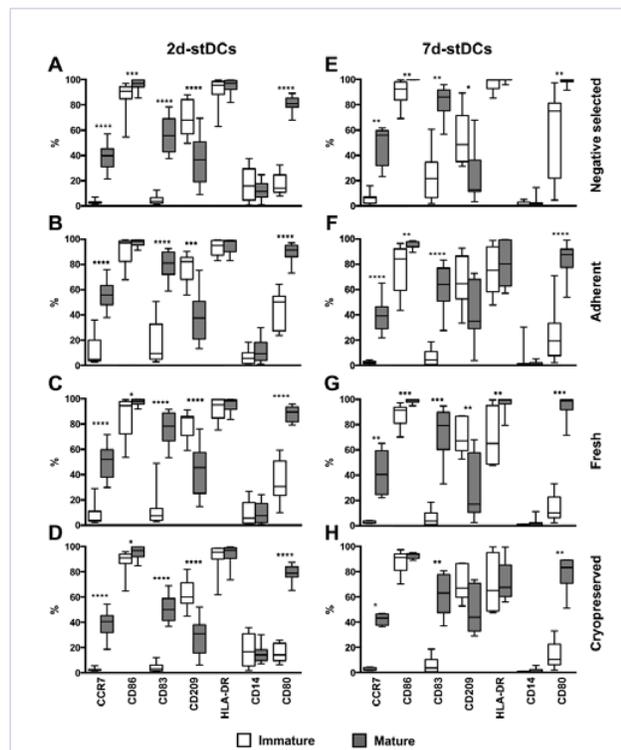


Figure 2: Monocyte collection system and preservation system do not affect the generation of dendritic cells. Comparative expression percentage by flow cytometry analysis of CCR7, CD86, CD83, CD209, HLA-DR, CD14 and CD80 in immature (white box) and mature DCs (gray box) derived in two or seven days (left and right columns respectively). Panel A (n=18 vs. 18) and E (n=11 vs 11), corresponds to DCs derived from negative selected monocytes; B (n=9 vs. 14) and F (n=7 vs. 7), DCs derived from adherent monocytes; C (n= 15 vs. 20) and G (n=6 vs.12), DCs derived from fresh monocytes; D (n=12 vs.12) and H (n=6 vs. 6), DCs derived from cryopreserved monocytes. Data showed in box and whiskers (top and bottom whiskers 90% and 10%), the comparison between immature and mature DCs done with Mann-Whitney test *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001, **** p<0.0001.

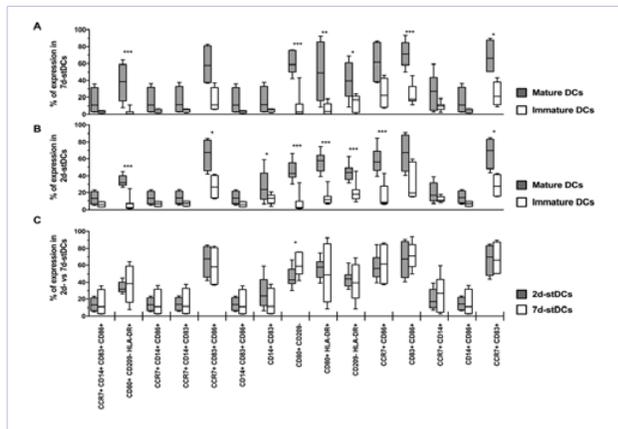


Figure 3: Use of multiple maturation markers for dendritic cells confirms that 2d-stDCs and 7d-stDCs have a similar phenotype. Analysis of multiple markers for characterization of dendritic cell maturation (two to four markers) and 2d-stDCs and 7d-stDCs monocyte-derived was analyzed by multiparametric flow cytometry. The statistical analysis of mature (gray box) and immature (white box) cells in 7d-stDCs (A) and 2d-stDCs (B). C. Comparison between mature 7d-stDCs (gray box) and 2d-stDCs (white box) derived from adherent and cryopreserved monocytes. The data showed the box and whisker (95% and 5%), Mann-Whitney * p <0.05, ** p <0.01, *** p <0.001.

efficient in the expansion of specific CD8⁺ precursor cells against these tumor antigens (11 and 5.15% respectively) compared to control (unstimulated cells, 0.067%). Subsequently the cytotoxic capacity of CTLs against tumor antigens were evaluated for CD8⁺ T cells cultured with 2d-stDCs pulsed with TAA-A2 and co-cultured with DCs pulsed with the corresponding peptide, as a control non-specific peptide of *Leishmania major* (*L. major*) and DCs pulsed with nopeptide were used in three healthy donors. To quantitate cytotoxicity the cells were incubated for 5 hours in the presence of anti-CD107a, CD107b and analyzed by flow cytometry. As shown in Figure 4B, a cytotoxic response (CD107a and CD107b positive cells) increased in cells specific against Melan-A antigen (8.36%) compared to control culture (1.22%) and culture with peptide *L. major* (1.31%). Subsequently, the cytotoxicity (CD107a) of CD8⁺ T cells in response to different TAAs such as Her-2/neu, NY-ESO1, telomerase and Melan-A in healthy donors expressing HLA-A2 was evaluated; it was observed an increase in positive CD107a cells (1.3, 4.45, 1.46, and 2.74% respectively) compared to the control culture (0.43%) [Figure 4C]. Finally, it was assessed expression of multiple intracellular cytokines (IFN- γ , TNF- α , and IL-2) in CD8⁺ T cells, after 20 hours of re-stimulation of T cells with mature 2d-stDC pulsed or not with a cocktail of TAA peptides were determined by flow cytometry multifunctional [Figure 4D] Compared to the control CD8⁺ T cells and DCs stimulated without peptide, DCs stimulated with peptide cocktail showed increased expression of cells expressing at least one cytokine is 3.5% vs 2.2%, however, the frequency of T cells that produce two or more cytokines is higher in cells stimulated with peptides compared to control [Figure 4E], the total percentage of cytokine-producing cells stimulated with peptide that are multifunctional is 3.4%

compared to 0.58% of unstimulated T cells. These results support the idea that 2d-stDCs have the adequate functional capacity to stimulate CD4⁺ and CD8⁺ T cells.

Type I alpha DCs that produce IL-12 can be induced and matured in two days

Type I alpha DCs, have been recently described by Mailliard et al.[23] using a specific combination of pro-inflammatory cytokines, type I interferons and a TLR3 ligand. So far, the needed time to induce mature alpha DCs (aDCs) has been 7d similar to 7d-stDCs, with few descriptions done in 5 days. To characterize the immune phenotype in 2d-aDCs we performed a side-by-side comparison of the immune phenotype and functional characteristics of immature DCs (iDCs) after treatment for 24 hours with either standard or alpha DC maturation cocktails (2d-stDCs and 2d-aDCs, respectively) based on the methodology of Dauer et al.[21, 28]. Purified monocytes from healthy donors were cultured for 24 hours in the presence of IL-4 (1000 UI/mL) and GM-CSF (750 UI/mL). Subsequently, to induce the maturation of 2d-aDCs or 2d-stDCs, iDCs were cultured in maturation cocktails containing IL-1 β , IL-6, TNF- α , IFN- α , IFN- γ and Poly I:C [23] or IL-1 β , IL-6, TNF- α and PGE2 [10], respectively. As shown in Figure 5A, we observed changes in the cell morphology and number of dendrites in response to the maturation stimuli. Consistently in several experiments performed, after 24 hours of maturation the round-shaped iDCs transformed into elongated 2d-aDCs which showed a higher number of thin dendrites than 2d-stDCs. Subsequently, we used multi-parametric Flow Cytometry (FC) to compare the expression of CD83, CD209, CD14, CCR7, CD80, HLA-DR, and CD86 in iDCs, 2d-aDCs, and 2d-stDCs. The standard cytokine cocktail for 2d-stDCs clearly induces a maturation phenotype in iDCs [Figure 5B], evidenced by the increased expression of CD80, CD83, CD86, CCR7 and HLA-DR and the decreased expression of CD209 and CD14; this phenotype was consistent with the maturation found in Figure 1C and standard studies describing 7d-stDCs [29, 30]. Notably, treating iDCs with maturation stimuli for 24 hours generates mature 2d-aDCs with a maturation phenotype similar to that of 2d-stDCs in terms of increased HLA-DR, CD80, CCR7 and CD83 expression and decreased CD209 and CD14 expression in both cell types [Figure 5B]. One of the main characteristics of Type I alpha DCs is the secretion of IL12p70 (IL-12), a key cytokine for the enhancement of tumor-specific T cell responses in mouse models [31]. To assess IL-12 secretion levels, we used the CBA kit (BD Biosciences) to quantify the pro-inflammatory cytokines in the supernatants of immature and mature DCs. The results revealed an important difference in the secretion of IL-12, which was only produced in 2d-aDCs (294 pg/mL) compared with the background levels induced in iDCs and the low levels of 2d-stDCs (34.5 and 35.1 pg/mL, respectively; Figure 5C). These results show that the induction of mature aDCs in two days is possible and have a compatible phenotype of a mature DCs similar to the phenotype of 7d-stDCs and 2d-stDCs with the clear advantage of the high production of IL-12.

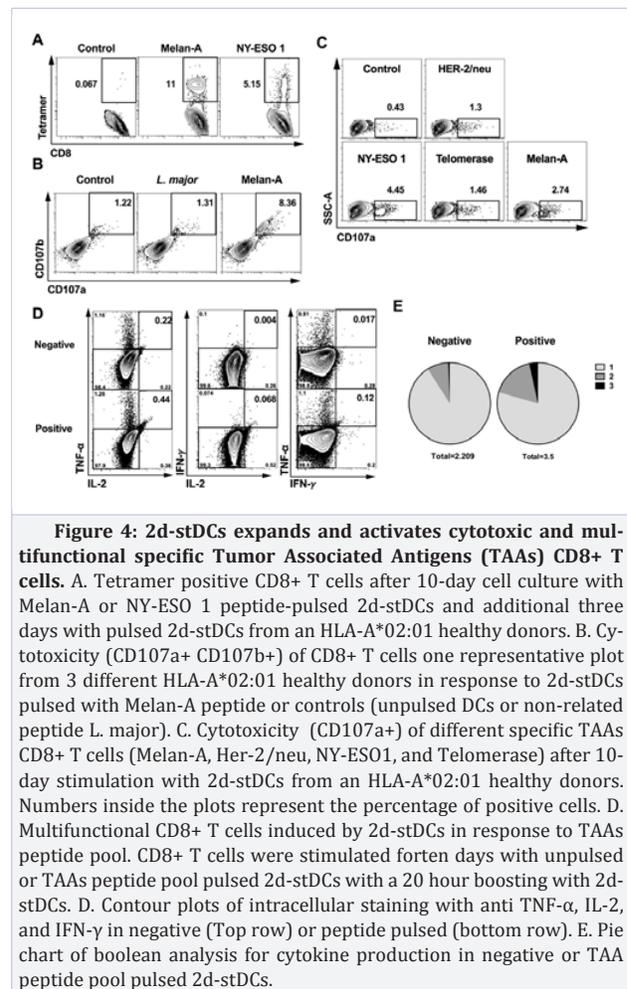
2d-aDCs activates CD4⁺ T cells with a stem-like phenotype that produce IFN- γ

Recently Gattinoni et al. described a human stem cell-like memory (scm) T cell population characterized by a naïve

phenotype (CD45RA+ CCR7+ CD62-L+ CD28+ CD27+) and the expression of CD95, IL-2R β , and CXCR3. This population exhibits a superior capacity for proliferation and antitumor activity compared to other memory subsets[32]. Thus, we evaluated the presence and response of scm T cells after stimulation with either 2d-aDCs or 2d-stDCs using an in vitro model for infectious diseases. We pulsed each DCs with a combination of *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb) peptides described before[33] that are responsible for a specific in vitro response in tuberculosis-infected donors. For this purpose, we use PBMCs from a latent TB-infected donor (determined by a positive Tuberculin Skin Test – TST> 10mm, and a positive QuantiFERON TB Gold® test - Cellestis). We induced 2d-aDCs or 2d-stDCs pulsed with or without Mtb peptides. After stimulation for 6 days, the difference in the expansion of naïve, scm, memory or effector CD4+ T cell subpopulations were analyzed on each cell culture through FC subtracting the percentage of each population in peptide pulsed DCs minus the unpulsed DCs [Figure 6A] The IFN- γ production in each sub-population (percentage of IFN- γ + CD4+ T cells pulsed minus unpulsed DCs) demonstrated that the scm compared to central memory (CM), Effector Memory (EM) or terminal effector (EF) T cell subpopulations produced higher amount of this cytokine only when the culture was stimulated with 2d-aDCs but not upon stimulation with 2d-stDCs [Figure 6B].

IL-12 produced by 2d-aDCs favors the expansion of circulating T follicular helper cells (TFH)

In the process of differentiation of TFH, the secretion of cytokines such as IL-23, TGF- β , and IL-12 by APC such as DCs, plays an important role in the differentiation process of naïve T cells into pre-TFH and from there to GC-TFH or resident memory TFH, with their function as helper cells in antibody production by B lymphocytes[34, 35]. Based on the high production of IL-12 by the 2d-aDCs [Figure 5C], we evaluated the ability of these DCs to induce expansion and activation of circulating TFH. To do this, we established an in vitro assay using 2d-aDCs and 2d-stDCs derived in PBMCs from healthy donors to characterize by FC the frequency of TFH (CD4+ CXCR5+ PD1+) in CD4+ T cells. Strikingly, we observed in PBMCs from four healthy donors a significant expansion of TFH favored by 2d-aDCs (mean 2.54%) compared with immature DCs (1.29%) and even 2d-stDCs (1.64%) as shown in figure 6C. We also evaluated in the TFH the expression of ICOS and IL-21 as functional markers of these cells in response to stimulation by DCs in combination with TCR activation by beads coupled with anti-CD3/CD28/CD2. In PBMCs from healthy donors, we assessed the expression of ICOS in TFH (CD4+ CXCR5+ PD1+) in response to stimulation of the TCR and we observed a significant increase in the presence of DCs, however 2d-aDCs induce an increased expression of ICOS in TFH (mean 77%) compared to 2d-iDCs (mean 61%) and 2d-stDCs (mean 58%) [Figure 6D left panel]. Finally, we evaluate the intracellular production of IL-21 in the TFH, and as expected, we observe a significant increase in IL-21 MFI in TFH cells when stimulated with 2d-aDCs (mean 31.28) compared to 2d-iDCs (mean -5.31) and 2d-stDCs (mean 18.7) [Figure 6D right panel]. Together, these results show that 2d-aDCs can induce IFN- γ



producing CD4+ T cells and they can be used as a tool to evidence the activity of TFH circulating in peripheral blood probably due to its capacity to produce IL-12 in just 48 hours of culture.

Two-day derived DCs induce expansion and activation of tumor-specific T cells in vitro in a breast cancer patient

In order to characterize antigen specific T cells present in peripheral blood of cancer patients, it is necessary to employ in vitro systems that allow amplifying TAA specific cells that are probably anergic and present at very low-frequencies. There are different methodologies to increase the number of cells, however, most methodologies require a large volume of blood to obtain the required cells; to address this we use two in vitro systems that not only can expand the antigen specific T cells with a restricted blood volume, but also can evaluate the behavior of naïve repertoire and the generation of memory cells specific to known TAA antigens. The first in vitro system is based on the method described by Martinuzzi et al.[25]. Briefly, iDCs were induced from PBMCs using IL-4 and GM-CSF for 24 hours in the presence of HER2/neu₃₆₉₋₃₇₇ peptide (KIFGSLAFL) and matured

for an additional 24 hours using 2d-aDCs or 2d-stDCs maturation cocktails in the presence of additional HER2/neu peptide (5 μ M), followed by stimulation for 6 days [Figure S1A]. The expansion of HER2-specific CD8⁺ T cells was analyzed through FC using the HER2 dextramer (Immudex), and the memory phenotype (CD45RO vs. CD62-L) was compared between T cells stimulated with iDCs, 2d-aDCs, and 2d-stDCs. We observed an increase in HER2-specific CD8⁺ T cells in response to stimulation with 2d-stDCs (3.6%) or 2d-aDCs (3.91%) compared with unpulsed DCs (0.94%) [Figure 7A], suggesting that stimulation with 2d-stDCs and 2d-aDCs induces the expansion of HER2-specific CD8⁺ T cells more than 3-fold compared with unpulsed DCs in the breast cancer patient.

Using naïve T-cells cells from the same patient sample, we used a second in vitro system based on the methodology of Moser et al.[27]. Briefly, naïve CD4⁺ and CD8⁺ T cells were sorted and cultured for 14 days with 2d-stDCs or 2d-aDCs in the presence of HER2/neu KIFGSLAFL peptide or the 20-mer HER2/neu peptide pool, followed by boosting with 2d-stDCs or 2d-aDCs for an additional 6 days [Figure S1B]. After stimulation, HER2-specific CD8⁺ T cells showed a 3 to 5-fold expansion [Figure 7B] compared with unpulsed DCs (from 0.38 to 1.39% with 2d-aDCs and 0.41 to 1.98% with 2d-stDCs, respectively). To analyze the activation of CD4⁺ T cells stimulated with 20-mer HER2/neu peptides, we measured CD154 (CD40-L) expression through FC [Figure 7C] and observed that only 2d-aDCs were able to induce high CD154 expression (MFI 8434 vs. 5190, pulsed vs. unpulsed DCs) compared with CD4⁺ T cells stimulated with 2d-stDCs (MFI 723 vs. 3543, pulsed vs. unpulsed DCs). We quantified the secretion of IFN- γ from the supernatants of CD4⁺ and CD8⁺ T cells pulsed and unpulsed with 2d-aDCs or 2d-stDCs using a CBA kit (BD biosciences). The results showed higher levels (>2 logs) of IFN- γ in CD4⁺ and CD8⁺ T cells stimulated with 2d-aDCs (delta

between pulsed minus unpulsed DCs) compared with CD4⁺ and CD8⁺ T cells stimulated with 2d-stDCs [Figure 7D]. These results led us to conclude that 2d-aDCs have a higher capacity than 2d-stDCs to expand and activate specific CD4⁺ and CD8⁺ T cells in response to HER2 peptides in a breast cancer patient before treatment.

Discussion

Since 1973 when Steinman and Cohn gave the name to the cells described by Paul Langerhans “dendritic cells” these cells have been used in different clinical trials as adjuvants to induce specific immune responses against different tumor antigens [1]. From the first study published in 1996 [6], where patients with B-cell lymphoma were vaccinated with autologous DCs (generated in 7 days know as Standard-DCs 7d-stDCs), these cells have been traditionally used as APCs in numerous clinical vaccination protocols [16] with a recently FDA approved therapeutic use for prostate cancer. In 2003, Dauer et al.[21] obtained in only 48 hours of in vitro culture, mature DCs from peripheral blood monocytes of healthy donors, called Fast-DCs (named here 2d-stDCs). Such cells, upon activation by pro-inflammatory mediators, expressed surface markers of mature DCs, and secrete IL-12p70 when stimulated only with CD40L and IFN- γ . Additionally, 2d-stDCs were capable of stimulate antigen specific Th1 immune responses [21]. Since then, the role of 2d-stDCs as APCs has been used in various in vitro assays [36-40] and in some clinical trials with breast cancer patients, who received 4 weekly vaccinations of 2d-stDCs pulsed with Her-2/neuropeptides [41]; in this study, seven of eleven patients showed a marked decrease in the expression of Her-2/neu in tumor specimens. This study demonstrated the potential of 2d-stDCs in the treatment of early breast cancer.

In order to determine possible changes in the phenotype of the cells in this study we derived 7 and 2 days DCs from monocytes and matured with pro-inflammatory cocktail from of fresh or frozen peripheral blood monocytes, purified by adherence to plastic or by negative selection (rosette formation with red blood cells and CD14 negative cells). In all methods used for their differentiation, DCs (2d and 7d) stimulated with standard pro-inflammatory cytokines cocktail showed significantly increased expression of CCR7, CD83 and CD80, surface markers important molecules for their performance as professional APCs as compared to unstimulated cells with the cocktail, we even compare the effect of several cytokine combinations including standard cocktail, IFN- γ , and IL-15 in the maturation phenotype of DCs [Figure S5].

The expression of CD83, a member of the immunoglobulin superfamily, is described as a characteristic marker for mature DCs and correlates with optimal mediated activation of T cells by DCs[42]. Also, studies in mice have shown that deficiencies in the expression of CD83 reduce the expression of MHC class II on the surface of 25 to 50% of splenic B cells, DCs, thymic epithelial cells, and peritoneal macrophages[43]. The interaction of the co-stimulatory molecules CD80 and CD86 (B7.1 and B7.2) with CD28 on T cells, provides a substantial activation and survival

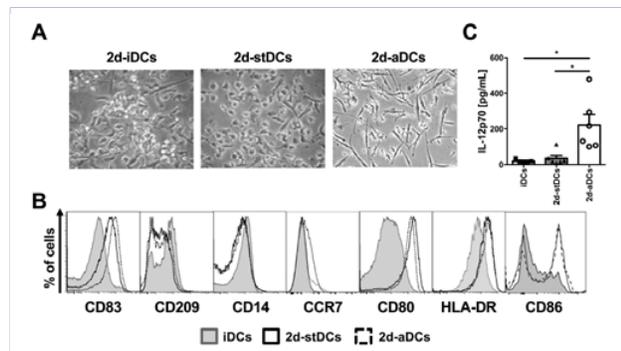


Figure 5: Two-day monocyte-derived dendritic cells using alpha cocktail have a phenotype of mature DCs and secrete high amounts of IL-12p70. A. Microscopic view (40X) of the monocyte-derived DCs 2d-iDCs, 2d-stDCs, and 2d-aDCs (left to right respectively). B. Histograms of the expression of maturation markers CD83, CD209, CD14, CCR7, CD80, HLA-DR, and CD86 of immature dendritic cells (gray histogram), 2d-stDCs (empty histogram), and 2d-aDCs (histogram with dashed line). C. The supernatant quantification of IL-12p70 secreted by 2d-iDCs, 2d-stDCs, and 2d-aDCs. IL-12 secretion is shown in bars (+/- SEM), Mann-Whitney * p < 0.05.

of T cells, together with binding MHC/peptide - TCR. Different studies have demonstrated that CD80 is more efficient than CD86 in the activation and proliferation of CD8+ T cells and the production of IL-12 by DCs [44-46] but the basis of these associations are unknown. Based on the results obtained in this work is interesting to note that CD80 acted as a differentiation marker of mature DCs compared to CD86 which, like HLA-DR, showed a high percentage of expression in mature and immature DCs (both 2d and 7d-stDCs).

CD14 expression was significantly increased in immature and mature cells derived in 2 days compared to 7 days DCs. This result contrasts with the observations of Dauer et al.[21]

and could be explained by an internalization of CD14 antibody induced by the anti-CD14 beads used in Dauer's study for isolation of monocytes (positive selection). The expression of CD14 in 2d-stDCs suggest that these DCs are similar to dermal interstitial DCs as suggested by the work of Klechevsky et al., who have identified special properties of DCs expressing CD14 which preferentially initiate humoral immunity [47, 48]. We observed a significant decrease in CD209 (DC-SIGN) in 2d-stDCs in response to maturation cocktail and independently of the purification or preservation process of monocytes. This molecule is often described as a phagocytic receptor with an important role in the acquisition and processing of the antigen on immature DCs,

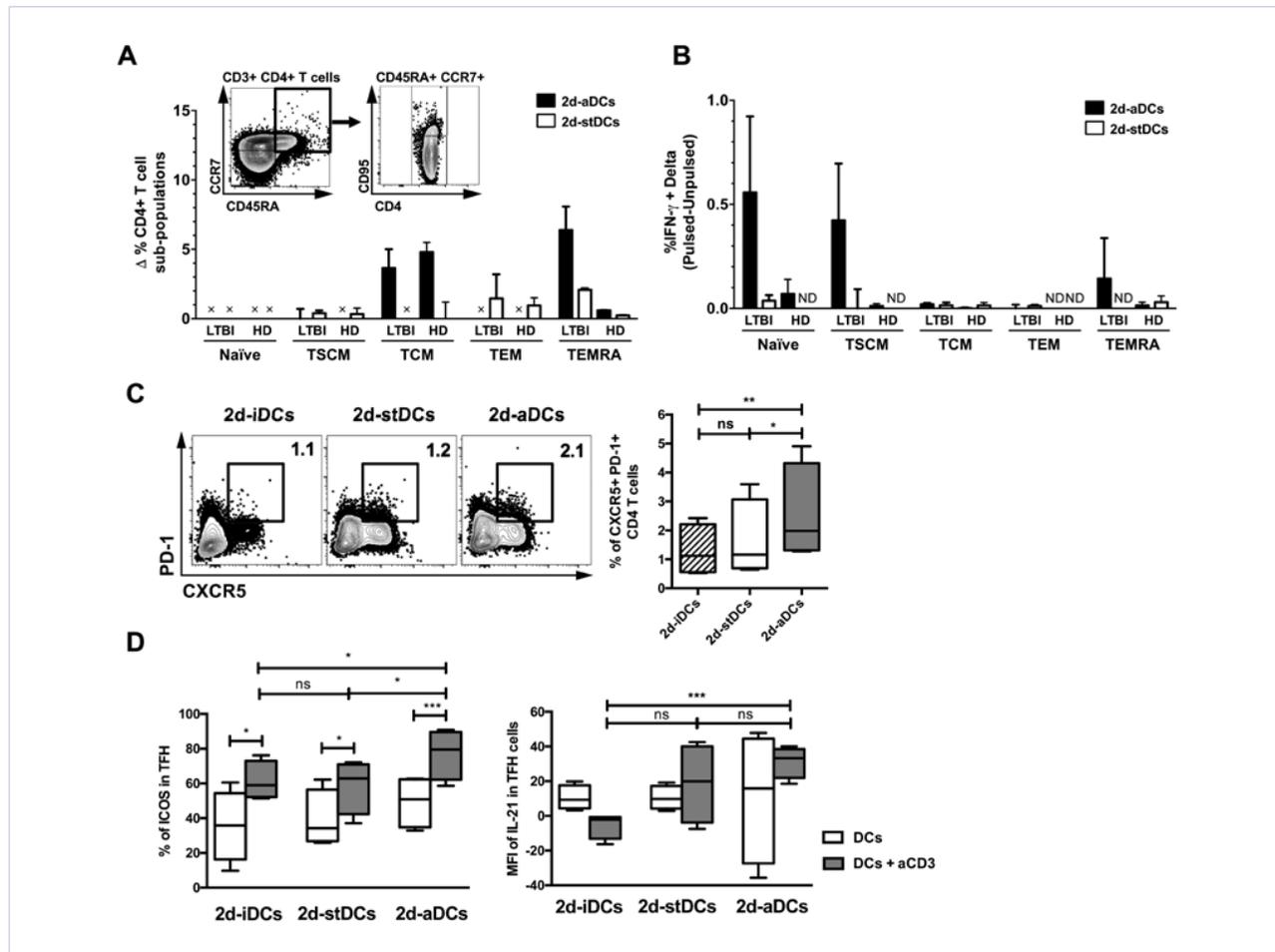


Figure 6: 2d-aDCs induce greater differentiation of memory T cells and expansion of TFH compared with 2d-stDCs. Phenotype characterization of CD4+ T cells stimulated with 2d-aDCs (black bars) or 2d-stDCs (white bars) pulsed with *Mtb* peptides minus unpulsed DCs (delta of the percentage) for two days in PBMCs from healthy donors (n=4) or latent tuberculosis infected (LTBI) donors (n=4), the insert represents contour plots of memory subpopulations (CD45RA vs. CCR7) and CD95+ in naive cells for TSCM. B. Delta of the percentage of IFN- γ producing cells in each memory sub-population quantified in panel A stimulated by 2d-aDCs (black bars) or 2d-stDCs (white bars). C. Quantification of CD4+ T follicular helper (Tfh) cells (CXCR5+ PD1+) in response to 2d-iDCs, 2d-stDCs or 2d-aDCs (left to right panels respectively) and analysis of the quantification of Tfh percentage in healthy donors stimulated with corresponding DCs (n=4). D. Quantification of ICOS+ in Tfh cells in response to stimulation with beads coupled to antibodies against CD3 / CD28 / CD2 in combination with DCs. Quantification of Tfh expansion in response to *Mtb* antigens (ESAT-6, QTF peptide pool or H37Rv sonicate) in healthy donors and LTBI donors. Nonparametric t test analysis and paired t-test were done, * p<0.05, **** p<0.0001.

characterized with a large capacity of endo-phagocytosis [49, 50]. Since initially described in Human Immunodeficiency Virus (HIV), DC-SIGN has an important role in the immune modulatory response by this lectin in T cells and it has been demonstrated in multiple models of host-pathogen interaction [51, 52], suggesting that some pathogens have immune-evasive properties or immunosuppressant through DC-SIGN.

Overall, the use of fresh or cryopreserved monocytes to derive DCs does not affect the phenotype of the mature DCs derived in two or seven days. These results are of particular importance for immunotherapy considering the possibility of cryopreserving the cells usually obtained in large quantities by leukapheresis, and then used for later generations of DCs.

Besides achieving the expansion of TAA specific T cell precursors, is important to determine the functionality of these cells, for which CD8+ T cells generated in a specific line of peptide were re-stimulated with 2d-stDCs pulsed with peptide (target cells) and determined the fusion of the granules with the plasma membrane of the CD8+ T cells that results in the release of perforin and granzyme and surface expression of the membrane glycoproteins associated with the lysosome (LAMPs) CD107a (LAMP-1) and CD107b (LAMP-2). The expression of CD107a and CD107b was determined by FC in CD8+ T cells from four healthy individuals, in response to a given stimulus with 2d-stDCs pulsed with Melan-A peptide. Similarly, CD8+ T cells generated peptide specific lines NY-ESO1, Her-2/neu, and Telomerase showed expression of CD107a on the surface by FC, demonstrating the functional capabilities of 2d-stDCs as antigen-presenting cells.

Mature 2d-stDCs pulsed with peptides were capable to stimulate peptide-specific CD8+ CTLs (specific T cell expansion and cytotoxic functionality by CD107a/b expression). Furthermore, substantial production of IFN- γ by specific CD4+ T cell in response to Tetanus Toxoid (TT) and in a Mixed Leukocyte Reaction (MLR), suggests that antigen presentation by 2d-stDCs to T cells can induce the secretion of IL-12p70 by the DCs necessary to facilitate the stimulation of Th1 immune responses [Figure S4]. This is important if we consider that IL-12p70 production by DCs has become a key marker of competent DCs that will be used with immunotherapy purposes [53]. Recently, Mailliard et al. [23], described a type I alpha DCs, using a modification of the standard cocktail by adding Type I/II interferons and Poly I:C in order to obtain mature DCs capable of producing high amounts of IL-12p70 and activate Th1 cells responses. But similar to 7d-stDCs, the type I alpha DCs were produced after seven days of cell culture. These 7d-aDCs cells are able to load tumor specific antigens and activate breast cancer specific CTL responses [54]. In this work we take the advantage of producing mature DCs in 48 hours and analyzed the functional capability of Type I alpha DCs derived in two days (2d-aDCs) for activation of CD4 and CD8 antigen specific T cells.

The IL-12p70 production in culture supernatants of mature DCs was determined by CBA. As expected, and according to previous studies where the use of PGE2 in combination with the cocktail of pro-inflammatory cytokines inhibit the production of

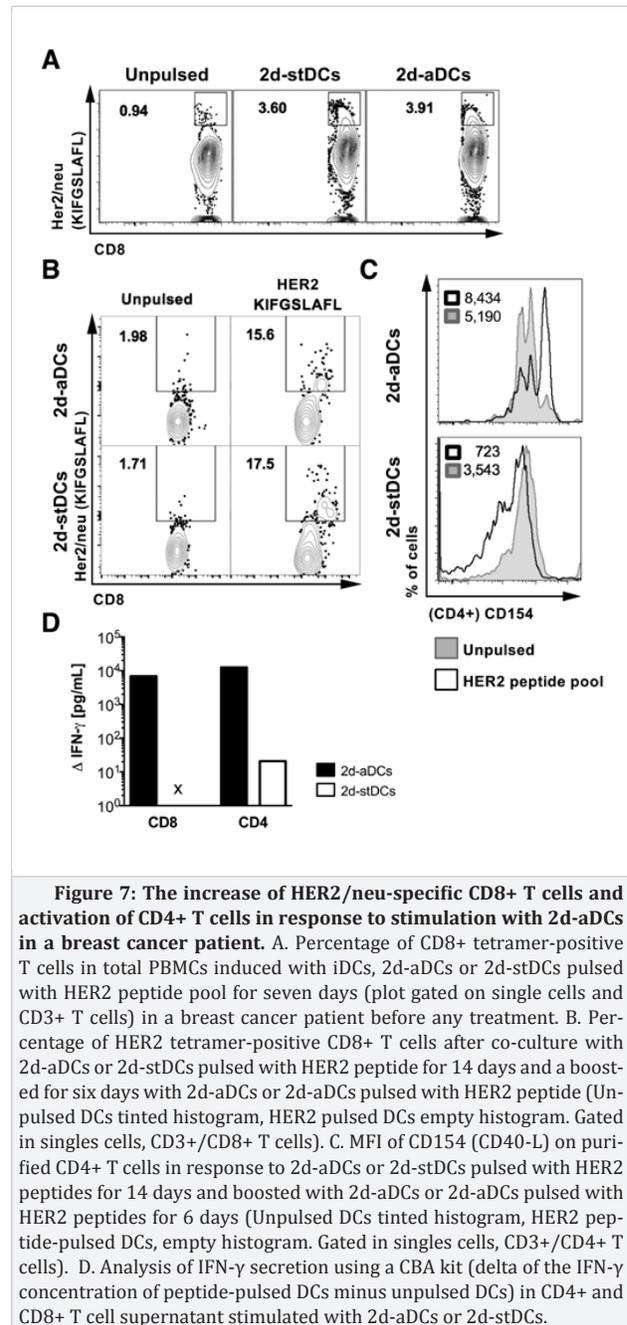


Figure 7: The increase of HER2/neu-specific CD8+ T cells and activation of CD4+ T cells in response to stimulation with 2d-aDCs in a breast cancer patient. A. Percentage of CD8+ tetramer-positive T cells in total PBMCs induced with iDCs, 2d-aDCs or 2d-stDCs pulsed with HER2 peptide pool for seven days (plot gated on single cells and CD3+ T cells) in a breast cancer patient before any treatment. B. Percentage of HER2 tetramer-positive CD8+ T cells after co-culture with 2d-aDCs or 2d-stDCs pulsed with HER2 peptide for 14 days and a boosted for six days with 2d-aDCs or 2d-aDCs pulsed with HER2 peptide (Unpulsed DCs tinted histogram, HER2 pulsed DCs empty histogram. Gated in singles cells, CD3+/CD8+ T cells). C. MFI of CD154 (CD40-L) on purified CD4+ T cells in response to 2d-aDCs or 2d-stDCs pulsed with HER2 peptides for 14 days and boosted with 2d-aDCs or 2d-aDCs pulsed with HER2 peptides for 6 days (Unpulsed DCs tinted histogram, HER2 peptide-pulsed DCs, empty histogram. Gated in singles cells, CD3+/CD4+ T cells). D. Analysis of IFN- γ secretion using a CBA kit (delta of the IFN- γ concentration of peptide-pulsed DCs minus unpulsed DCs) in CD4+ and CD8+ T cell supernatant stimulated with 2d-aDCs or 2d-stDCs.

IL-12 [21, 55], even after additional activation with IFN- γ [56], in DCs matured in 2 days with cocktail of pro-inflammatory cytokines produced no substantial amounts of IL-12p70, in contrast to the high production of IL-12 by 2d-aDCs [Figure 5C]. Taking altogether our results, the use of 2d-aDCs reinforces the benefits of this cytokine combination for differentiation and activation of T cells. We evaluated the functional capacity of 2d-aDCs and 2d-stDCs for both CD4 and CD8 T cell activation. For Th1 T cell differentiation, we used Mtb. peptides previously

described to induce IFN- γ secretion in immune TB donors [26, 57, 58]. In the present study, we compared the capacity of peptide-pulsed DCs to induce a Th1 phenotype with that of latent-infected donor cells cultured with purified CD4 T cells. After incubation for 6 days, we observed the increased production and secretion of IFN- γ , TNF- α and IL-6 compared with unpulsed DCs (data not shown). The analysis of the phenotype of responding cells showed that only stimulation with 2d-aDCs induced an increase in IFN- γ production in scm CD4+ T cells [Figure 6] and not in other memory, naïve or effector sub-populations. This result suggest the interesting possibility that the scm CD4+ T cell memory population is responsible of the IFN- γ production in individuals in which Mtb latency has been diagnosed with one of the common IGRA tests available (TB ELISPOT or QuantiFERON TB®).

Another important role of IL-12 is the stimulation of T follicular helper cells, a specific population of T cells involved in the antibody production by plasma cells by the release of IL-21. Recent studies show that IL-12 produced by DCs is important to expand and activate TFH cells [35]. We evaluate this possibility using our 2d-aDCs, and as expected we found a significant increase in the percentage of circulating CD4+ TFH cells (CXCR5+ and PD1+) in healthy donors, and more importantly, stimulating these cells with anti-CD3/CD28/CD2 beads we were able to induce the activation of TFH determined by the increase ICOS and IL-21 in TFH cells. With these results, we propose that the “in situ” induction of 2d-aDCs in PBMCs it may became a useful tool to study the phenotype and behavior of memory TFH present in peripheral blood and furthermore to evaluate the relationship between the detection of these cells in peripheral blood and the production of antigen specific high antibodies titers by B cells.

The functional capacity of 2d-aDCs to induce the expansion of CD8 T cells was evaluated in samples from breast cancer patients before chemotherapy to determine the degree of expansion and activation of specific T cells that recognize different TAAs. The results suggested that 2d-aDCs generated from total PBMCs (as described by Martinuzzi et al. [25]) or from purified monocytes as described by Moser et al. [27], [Figure 7A and 7B, respectively] induce the expansion of tumor antigen-specific CD8+ T cells against HER2 peptide and activate the effector function of these cells, evidenced by HER2-dependent IFN- γ secretion [Figure 7D] and the expression of CD154 in CD4 T cells obtained from breast cancer patients [Figure 7C]. These results suggest that 2d-aDCs induce the specific response and expansion of T cells in breast cancer similar to 2d-stDCs but with an increased Th1 cytokine production. Taken together, the data in the present study suggest that 2d-stDCs and 2d-aDCs are efficient short-term APCs and useful in vitro tools to induce TAA specific CD8+ and CD4+ T cell responses (TFH and stem cell like memory T cells) that are suitable for immunotherapy settings, reducing time and cost of DCs development. Further studies should evaluate the combination of 2d-stDCs and 2d-aDCs for cancer immunotherapy.

Acknowledgments

This study was supported through funding from the Universidad Nacional de Colombia. DIB, Vicedecanatura de Investigación Universidad Nacional Medical School; funds from

a joint grant between Fundación Salud de los Andes, Univesidad Nacional and COLCIENCIAS. The authors express their gratitude to Dr. Fabio Méndez CEO at the Fundación Salud de los Andes (FSA) and to FSA for their generous support. The authors would also like to thank Dr. Bernardo Camacho and to personnel at the Hemocentro Distrital for their kind assistance in obtaining blood buffy coats from volunteers. We are very thankful to Dr. Larry Stern, Dr. Mauricio Calvo-Calle and personnel at their laboratories at the University of Massachusetts for their generous support in providing reagents, infrastructure and knowledge required for building up HLA-A2 tetramers. We thank Dr. Manuel Patarroyo and personnel at the Fundación Instituto de Inmunología de Colombia (FIDIC) for assistance with peptide synthesis. Finally, our deepest gratitude to patients (especially to the patient FLB001) and healthy volunteers for their generous denotation of blood samples used in this study.

Funding

This work was funded through Dirección de Investigación de Bogotá (DIB)-HERMES Grants (Numbers 13245, 12543, 33317, 33290, 32181 and 14976) from the Universidad Nacional de Colombia and funds from the joint grant between Fundación Salud de los Andes, Universidad Nacional and COLCIENCIAS (Contract No. 110150227509). DBE was supported by the Fundación Salud de los Andes, Bogotá-Colombia South America.

Author contribution

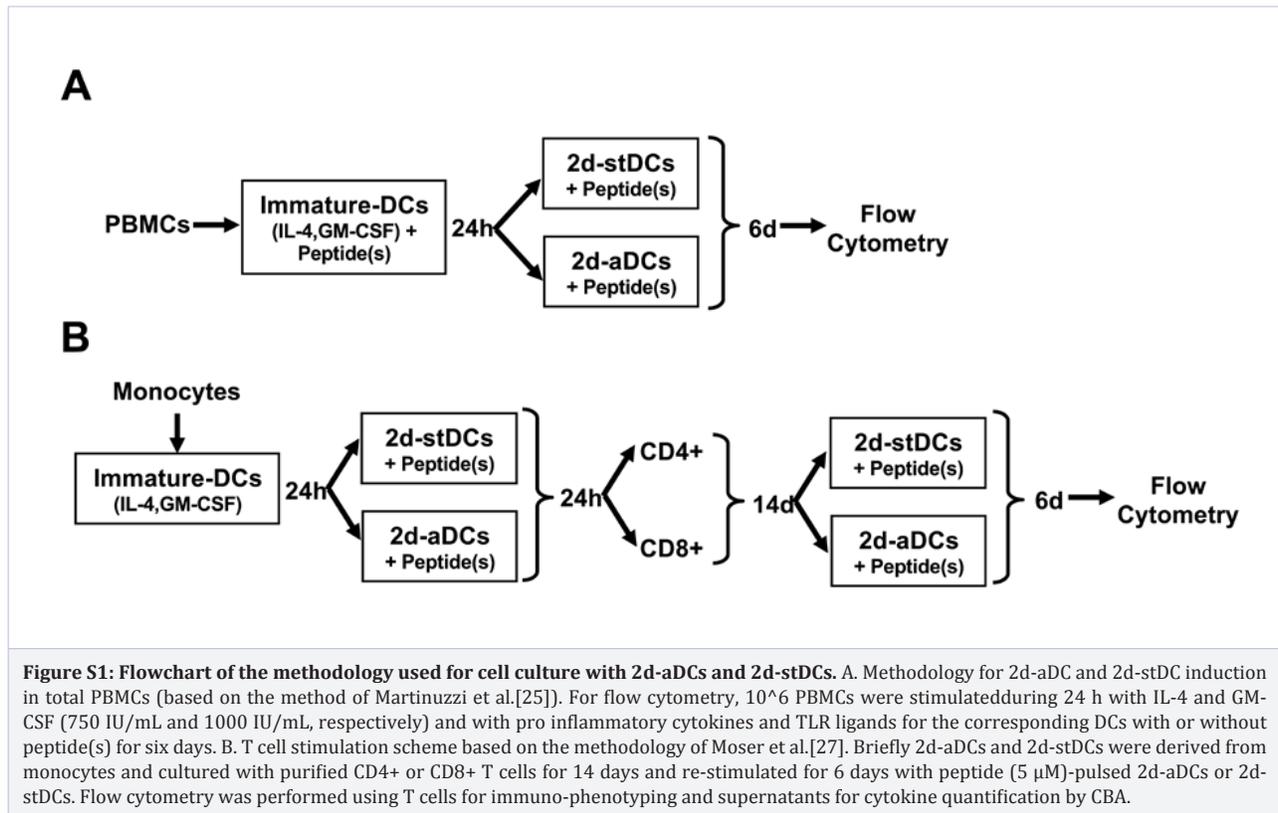
Experimental work: DB, and DRTM. Data analysis: DB, DTRM and CP. Wrote the manuscript: DB, DRTM and CP.

References

1. Steinman, R.M. and Z.A. Cohn, *Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. I. Morphology, quantitation, tissue distribution.* J Exp Med. 1973;**137**(5):1142-1162.
2. Palucka, K. and J. Banchereau, *Cancer immunotherapy via dendritic cells.* Nat Rev Cancer. 2012;**12**(4): 265-277.
3. Draube, A., et al., *Dendritic cell based tumor vaccination in prostate and renal cell cancer: a systematic review and meta-analysis.* PLoS One. 2011;**6**(4). doi.org/10.1371/journal.pone.0018801.
4. Avigan, D., *Dendritic cells: development, function and potential use for cancer immunotherapy.* Blood Rev. 1999;**13**(1): 51-64.
5. Banchereau, J, et al., *Immune and clinical responses in patients with metastatic melanoma to CD34(+) progenitor-derived dendritic cell vaccine.* Cancer Res. 2001;**61**(17): 6451-6458.
6. Hsu, F.J., et al., *Vaccination of patients with B-cell lymphoma using autologous antigen-pulsed dendritic cells.* Nat Med. 1996;**2**(1):52-58. doi:10.1038/nm0196-52.
7. Melief, C.J., *Cancer immunotherapy by dendritic cells.* Immunity. 2008;**29**(3):372-383.
8. Motta, M.R., et al., *Generation of dendritic cells from CD14+ monocytes positively selected by immunomagnetic adsorption for multiple myeloma patients enrolled in a clinical trial of anti-idiotype vaccination.* Br J Haematol. 2003;**121**(2):240-250.
9. Osada, T., et al., *Dendritic cell-based immunotherapy.* Int Rev Immunol. 2006;**25**(5-6):377-413.

10. Schuler, G., B. Schuler-Thurner, and R.M. Steinman, *The use of dendritic cells in cancer immunotherapy*. *Curr Opin Immunol*. 2003;**15**(2):138-147.
11. Lenahan, C. and D. Avigan, *Dendritic cell defects in patients with cancer: mechanisms and significance*. *Breast Cancer Res*. 2006;**8**(1):101. doi:10.1186/bcr1375.
12. Pinzon-Charry, A., et al., *Numerical and functional defects of blood dendritic cells in early- and late-stage breast cancer*. *Br J Cancer*. 2007;**97**(9):1251-1259. doi:10.1038/sj.bjc.6604018.
13. Curiel, T.J., et al., *Dendritic cell subsets differentially regulate angiogenesis in human ovarian cancer*. *Cancer Res*. 2004;**64**(16):5535-5538.
14. Fricke, I. and D.I. Gabrilovich, *Dendritic cells and tumor microenvironment: a dangerous liaison*. *Immunol Invest*. 2006;**35**(3-4):459-483.
15. Gabrilovich, D., *Mechanisms and functional significance of tumour-induced dendritic-cell defects*. *Nat Rev Immunol*. 2004;**4**(12):941-952.
16. Bloy, N., et al., *Trial watch: Dendritic cell-based anticancer therapy*. *Oncoimmunology*. 2014;**3**(11): e963424.
17. Berntsen, A., et al., *Therapeutic dendritic cell vaccination of patients with metastatic renal cell carcinoma: a clinical phase 1/2 trial*. *J Immunother*. 2008;**31**(8): 771-780. doi:10.1097/CJI.0b013e3181833818.
18. Kavanagh, B., et al., *Vaccination of metastatic colorectal cancer patients with matured dendritic cells loaded with multiple major histocompatibility complex class I peptides*. *J Immunother*. 2007;**30**(7): 762-772.
19. Wierecky, J., et al., *Immunologic and clinical responses after vaccinations with peptide-pulsed dendritic cells in metastatic renal cancer patients*. *Cancer Res*. 2006;**66**(11): 5910-5918.
20. Sallusto, F. and A. Lanzavecchia, *Efficient presentation of soluble antigen by cultured human dendritic cells is maintained by granulocyte/macrophage colony-stimulating factor plus interleukin 4 and downregulated by tumor necrosis factor alpha*. *J Exp Med*. 1994;**179**(4): 1109-1118.
21. Dauer, M., et al., *Mature dendritic cells derived from human monocytes within 48 hours: a novel strategy for dendritic cell differentiation from blood precursors*. *J Immunol*. 2003;**170**(8):4069-4076.
22. Dauer, M., et al., *FastDC derived from human monocytes within 48 h effectively prime tumor antigen-specific cytotoxic T cells*. *J Immunol Methods*. 2005;**302**(1-2):145-155.
23. Mailliard, R.B., *alpha-Type-1 Polarized Dendritic Cells: A Novel Immunization Tool with Optimized CTL-inducing Activity*. *Cancer Research*. 2004;**64**(17):5934-5937.
24. Jonuleit, H., et al., *Pro-inflammatory cytokines and prostaglandins induce maturation of potent immunostimulatory dendritic cells under fetal calf serum-free conditions*. *Eur J Immunol*. 1997;**27**(12):3135-3142.
25. Martinuzzi, E., et al., *acDCs enhance human antigen-specific T-cell responses*. *Blood*. 2011;**118**(8): 2128-2137. doi:10.1182/blood-2010-12-326231.
26. Goletti, D., et al., *Region of difference 1 antigen-specific CD4+ memory T cells correlate with a favorable outcome of tuberculosis*. *J Infect Dis*. 2006;**194**(7):984-992.
27. Moser, J.M., et al., *Optimization of a dendritic cell-based assay for the in vitro priming of naive human CD4+ T cells*. *J Immunol Methods*. 2010;**353**(1-2):8-19. doi:10.1016/j.jim.2009.11.006.
28. Dauer, M., et al., *FastDC derived from human monocytes within 48 h effectively prime tumor antigen-specific cytotoxic T cells*. *Journal of Immunological Methods*. 2005;**302**(1-2):145-155.
29. Sallusto, F. and A. Lanzavecchia, *Understanding dendritic cell and T-lymphocyte traffic through the analysis of chemokine receptor expression*. *Immunol Rev*. 2000;**177**:134-140.
30. Obermaier, B., et al., *Development of a new protocol for 2-day generation of mature dendritic cells from human monocytes*. *Biol Proced Online*. 2003;**5**:197-203. doi:10.1251/bpo62.
31. Nishioka, Y., et al., *Induction of systemic and therapeutic antitumor immunity using intratumoral injection of dendritic cells genetically modified to express interleukin 12*. *Cancer Res*. 1999;**59**(16): 4035-4041.
32. Gattinoni, L., et al., *A human memory T cell subset with stem cell-like properties*. *Nat Med*. 2011;**17**(10): 1290-1297. doi: 10.1038/nm.2446.
33. Goletti, D., et al., *Selected RD1 peptides for active tuberculosis diagnosis: comparison of a gamma interferon whole-blood enzyme-linked immunosorbent assay and an enzyme-linked immunospot assay*. *Clin Diagn Lab Immunol*. 2005;**12**(11): 1311-1316. doi:10.1128/CDLI.12.11.1311-1316.2005.
34. Vinuesa, C.G., et al., *Follicular Helper T Cells*. *Annu Rev Immunol*. 2016;**34**:335-368. doi:10.1146/annurev-immunol-041015-055605.
35. Schmitt, N., et al., *Human dendritic cells induce the differentiation of interleukin-21-producing T follicular helper-like cells through interleukin-12*. *Immunity*. 2009;**31**(1):158-169. doi:10.1016/j.immuni.2009.04.016.
36. Jarnjak-Jankovic, S., et al., *A full scale comparative study of methods for generation of functional Dendritic cells for use as cancer vaccines*. *BMC Cancer*. 2007;**7**:119.
37. Ramadan, G., et al., *Generation of cytotoxic T cell responses directed to human leucocyte antigen Class I restricted epitopes from the Aspergillus f16 allergen*. *Clin Exp Immunol*. 2005;**140**(1): 81-91.
38. Dauer, M., et al., *Combined use of toll-like receptor agonists and prostaglandin E(2) in the FastDC model: rapid generation of human monocyte-derived dendritic cells capable of migration and IL-12p70 production*. *J Immunol Methods*. 2008;**337**(2):97-105. doi:10.1016/j.jim.2008.07.003.
39. Zhu, F., et al., *Stimulation by means of dendritic cells followed by Epstein-Barr virus-transformed B cells as antigen-presenting cells is more efficient than dendritic cells alone in inducing Aspergillus f16-specific cytotoxic T cell responses*. *Clin Exp Immunol*. 2008;**151**(2):284-296.
40. Guan, X., et al., *A novel, rapid strategy to form dendritomas from human dendritic cells and hepatocellular carcinoma cell line HCCLM3 cells using mature dendritic cells derived from human peripheral blood CD14+ monocytes within 48 hours of in vitro culture*. *World J Gastroenterol*. 2004;**10**(24):3564-3568.
41. Czerniecki, B.J., et al., *Targeting HER-2/neu in early breast cancer development using dendritic cells with staged interleukin-12 burst secretion*. *Cancer Res*. 2007;**67**(4):1842-1852.
42. Kruse, M., et al., *Inhibition of CD83 cell surface expression during dendritic cell maturation by interference with nuclear export of CD83 mRNA*. *J Exp Med*. 2000;**191**(9):1581-1590.
43. Kuwano, Y., et al., *CD83 influences cell-surface MHC class II expression on B cells and other antigen-presenting cells*. *Int Immunol*. 2007;**19**(8):977-992.

44. Fields, P.E., et al., *B7.1 is a quantitatively stronger costimulus than B7.2 in the activation of naive CD8+ TCR-transgenic T cells*. J Immunol. 1998;**161**(10):5268-5275.
45. Gajewski, T.F., *B7-1 but not B7-2 efficiently costimulates CD8+ T lymphocytes in the P815 tumor system in vitro*. J Immunol. 1996;**156**(2): 465-472.
46. Pejawar-Gaddy, S. and M.A. Alexander-Miller, *Ligation of CD80 is critical for high-level CD25 expression on CD8+ T lymphocytes*. J Immunol. 2006;**177**(7): 4495-4502. doi:10.4049/jimmunol.177.7.4495.
47. Klechevsky, E., et al., *Understanding human myeloid dendritic cell subsets for the rational design of novel vaccines*. Hum Immunol. 2009;**70**(5):281-288. doi:10.1016/j.humimm.2009.02.004.
48. Klechevsky, E., et al., *Functional specializations of human epidermal Langerhans cells and CD14+ dermal dendritic cells*. Immunity. 2008;**29**(3):497-510. doi:10.1016/j.immuni.2008.07.013.
49. Geijtenbeek, T.B., et al., *Self- and nonself-recognition by C-type lectins on dendritic cells*. Annu Rev Immunol. 2004;**22**:33-54.
50. Kerrigan, A.M. and G.D. Brown, *C-type lectins and phagocytosis*. Immunobiology. 2009;**214**(7):562-575. doi: 10.1016/j.imbio.2008.11.003.
51. den Dunnen, J., S.I. Gringhuis, and T.B. Geijtenbeek, *Innate signaling by the C-type lectin DC-SIGN dictates immune responses*. Cancer Immunol Immunother. 2009;**58**(7):1149-57. doi:10.1007/s00262-008-0615-1.
52. Wu, L. and V.N. KewalRamani, *Dendritic-cell interactions with HIV: infection and viral dissemination*. Nat Rev Immunol. 2006;**6**(11):859-868.
53. DeBenedette, M.A., et al., *Priming of a novel subset of CD28+ rapidly expanding high-avidity effector memory CTL by post maturation electroporation-CD40L dendritic cells is IL-12 dependent*. J Immunol. 2008;**181**(8):5296-5305.
54. Park, M.H., et al., *Alpha-Type 1 Polarized Dendritic Cells Loaded with Apoptotic Allogeneic Breast Cancer Cells Can Induce Potent Cytotoxic T Lymphocytes against Breast Cancer*. Cancer Res Treat. 2011;**43**(1): 56-66. doi:10.4143/crt.2011.43.1.56.
55. van der Pouw Kraan, T.C., et al., *Prostaglandin-E2 is a potent inhibitor of human interleukin 12 production*. J Exp Med. 1995;**181**(2):775-779.
56. Dauer, M., et al., *IFN-alpha promotes definitive maturation of dendritic cells generated by short-term culture of monocytes with GM-CSF and IL-4*. J Leukoc Biol. 2006;**80**(2):278-286.
57. Petruccioli, E., et al., *IFN-gamma/TNF-alpha specific-cells and effector memory phenotype associate with active tuberculosis*. J Infect. 2013;**66**(6): 475-486. doi:10.1016/j.jinf.2013.02.004.
58. Goletti, D., et al., *Accuracy of an immune diagnostic assay based on RD1 selected epitopes for active tuberculosis in a clinical setting: a pilot study*. Clin Microbiol Infect. 2006;**12**(6):544-550. DOI: doi.org/10.1111/j.1469-0691.2006.01391.x.



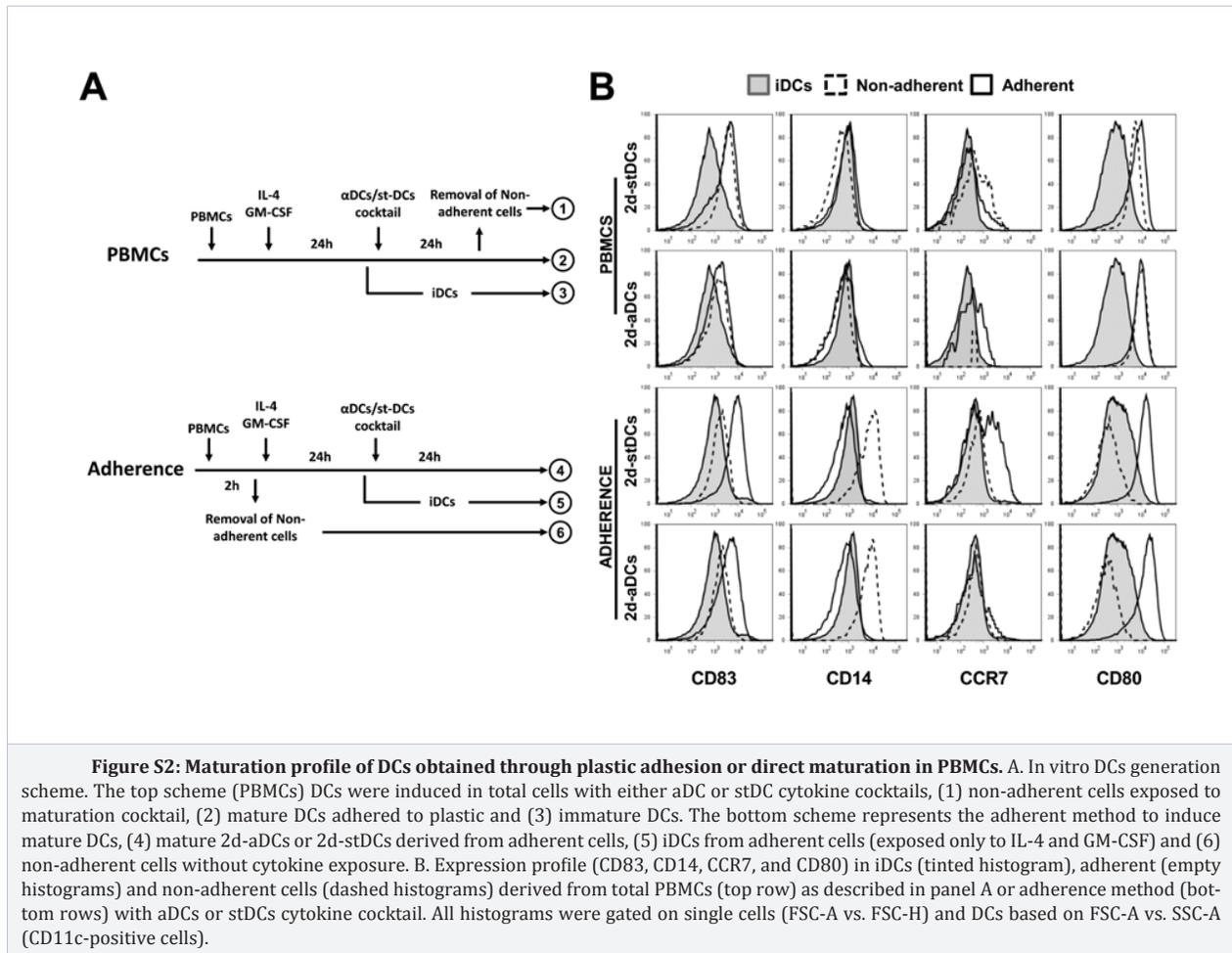


Figure S2: Maturation profile of DCs obtained through plastic adhesion or direct maturation in PBMCs. A. In vitro DCs generation scheme. The top scheme (PBMCs) DCs were induced in total cells with either aDC or stDC cytokine cocktails, (1) non-adherent cells exposed to maturation cocktail, (2) mature DCs adhered to plastic and (3) immature DCs. The bottom scheme represents the adherent method to induce mature DCs, (4) mature 2d-aDCs or 2d-stDCs derived from adherent cells, (5) iDCs from adherent cells (exposed only to IL-4 and GM-CSF) and (6) non-adherent cells without cytokine exposure. B. Expression profile (CD83, CD14, CCR7, and CD80) in iDCs (tinted histogram), adherent (empty histogram) and non-adherent cells (dashed histograms) derived from total PBMCs (top row) as described in panel A or adherence method (bottom rows) with aDCs or stDCs cytokine cocktail. All histograms were gated on single cells (FSC-A vs. FSC-H) and DCs based on FSC-A vs. SSC-A (CD11c-positive cells).

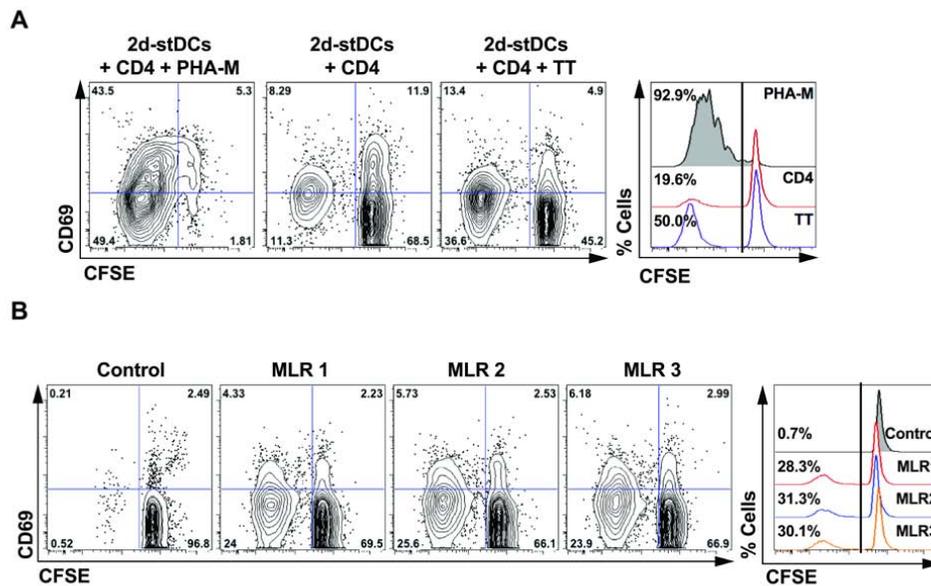
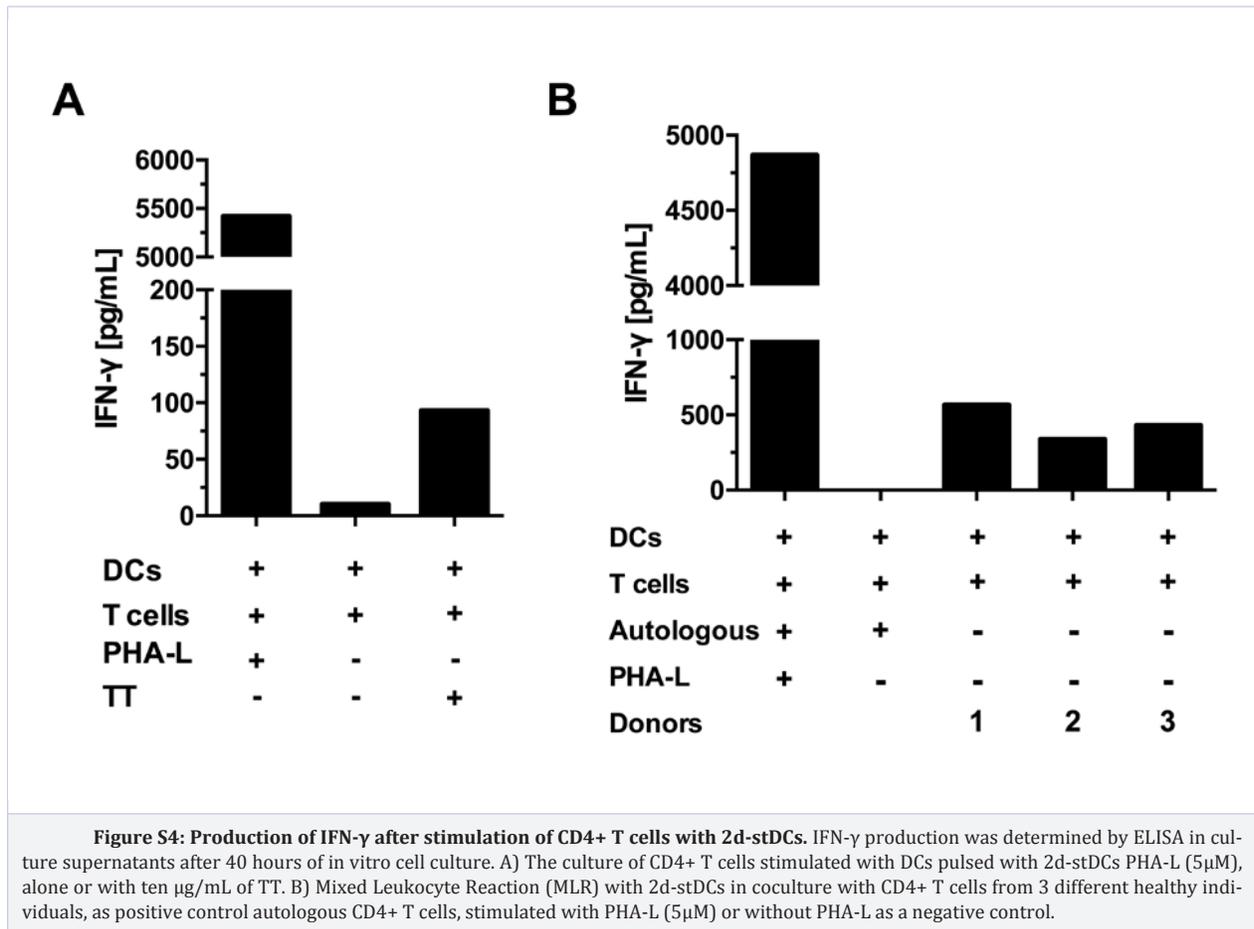


Figure S3: 2d-stDCs properly induce CD4+ T cell activation and proliferation. A. CFSE labeled CD4+ T cells were stimulated with unpulsed or pulsed 2d-stDCs with tetanus toxoid (TT) or PHA-M during 5 days. Contour plots of CFSE vs CD69 in CD4+ T cells (left panels) and overlapping histograms of CFSE dilution in CD4+ T cells (right panel). Proliferating and activated CD4+ T cells (CFSE- CD69+) in presence of PHA-M (positive control 43.5%), unpulsed (negative control 8.29%) and TT (13.4%) pulsed 2d-stDCs. Histograms (right panel) show dilution of CFSE in CD4+ T cells with PHA-M (92.9%), unpulsed (19.6%) and TT pulsed 2d-stDCs (50%). B. Activation and proliferation analysis of CD4+ T cells in a Mixed Leukocyte Reaction (MLR) with 3 different healthy donors in co-culture with 2d-stDCs, contour plots of CFSE vs CD69 in CD4+ T cells (left panels) and overlapping histograms of CFSE dilution in CD4+ T cells. Proliferating and activated CD4+ T cells (CFSE- CD69+) in presence of autologous CD4+ T cells (0.21%) or 3 different donors (4.33, 5.73 and 6.18%) and proliferation with autologous CD4+ T cells (0.7%) or with 3 different donors (28.3, 31.3 and 30.1%).



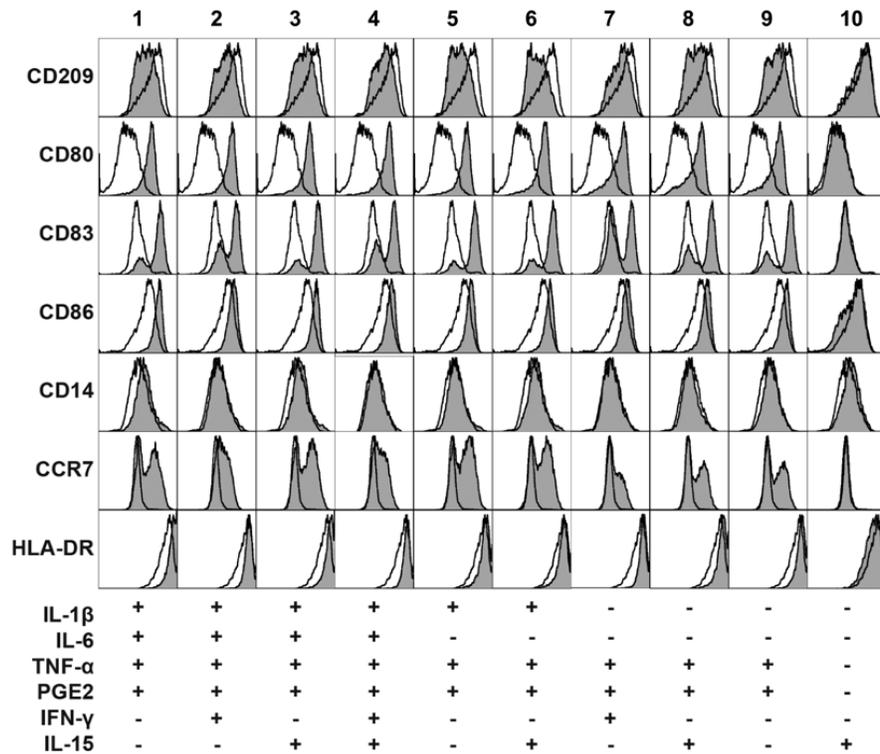


Figure S5: Different cytokine combinations can alter the phenotype of mature DCs. Ten different cytokine combinations were analyzed using IL-1 β , IL-6, TNF- α , PGE-2, IFN- γ and IL-15. Phenotype analyses were done using flow cytometry to determine the expression of CD209, CD80, CD83, CD86, CD14, CCR7 and HLA-DR, after two days of maturation culture. Empty histograms represent immature DCs (IL-4 and GM-CSF) and filled histograms represent mature DCs with corresponding cytokine combination (1-10).