



UNIVERSIDAD
NACIONAL
DE COLOMBIA

**EVALUACIÓN DE LA INMUNOGENICIDAD DE ANTÍGENOS
FORMULADOS EN MINIGENES TRANSFECTADOS A CÉLULAS
PRESENTADORAS DE ANTÍGENO**

María Alejandra Villota Álava

Universidad Nacional de Colombia

Facultad de Medicina

Bogotá, Colombia

2024

EVALUACIÓN DE LA INMUNOGENICIDAD DE ANTÍGENOS FORMULADOS EN MINIGENES TRANSFECTADOS A CÉLULAS PRESENTADORAS DE ANTÍGENO

Proyecto de tesis para optar el título de
Magister en Inmunología – Investigación.

Presentado por
MARÍA ALEJANDRA VILLOTA ALAVA

Línea de Investigación:
Medicina Traslacional

Grupo de Investigación:
Inmunología y Medicina Traslacional

Dirigido por
CARLOS ALBERTO PARRA LÓPEZ M.D., Ph.D.

Codirigido por
MANUEL ALFONSO PATARROYO GUTIÉRREZ M.D., Dr.Sc.

Universidad Nacional de Colombia
Facultad de Medicina
Bogotá, Colombia

2024

Agradecimientos

Quiero expresar mi sincero agradecimiento a todas las personas que contribuyeron de alguna manera a la culminación de este trabajo, que me apoyaron y acompañaron en el camino. En primer lugar, quiero agradecer a mi mamá y a mi papá por enseñarme lo que es el amor incondicional, por quererme e impulsarme siempre hacia adelante, por apoyarme en todos mis proyectos y por ser mi ejemplo que seguir, no estaría aquí de no ser por ustedes. A mi hermano, el mejor regalo que mis papás me han dado, gracias por ser mi compañero de la vida, por las charlas interminables en donde, aunque no sepas de que estoy hablando, siempre me escuchas y me aconsejas. Gracias a los tres por nunca dudar que lo iba a lograr y por acompañarme en todos los momentos difíciles dándome el aliento que necesitaba para seguir. Quiero agradecerles a mis abuelitos por siempre estar orgullosos de mí, por consentirme y darme ese abrazo o esa palabra de aliento en el momento perfecto. A mis tías, tíos, primas y primos gracias por acompañarme en los buenos y malos momentos de la vida, y enseñarme que el amor de familia todo lo puede. Le doy gracias a Dios por la familia tan hermosa que tengo.

Quiero agradecerle también a Alejandro, por ser mi mejor amigo, mi confidente y ese apoyo incondicional durante tanto tiempo. Gracias por contenerme y no dejar que me rindiera, por ayudarme a crecer como persona y por amarme incondicionalmente. Gracias por todas las veces que me escuchaste quejarme de lo mismo una y otra vez, por ayudarme a ver la salida cuando me sentía estancada y por caminar a mi lado todos estos años.

También quiero darles las gracias infinitas a María Alejandra, a Laura, a Manuela y a Nicolás por ser esos amigos que no sabía que necesitaba en mi vida, por sanarme el corazón, por ser incondicionales y por hacer que esta maestría haya sido una de las experiencias más duras, pero más lindas de mi vida. A Ivon, Nathaly y Oscar por ser tan generosos conmigo, por escucharme y acompañarme en momentos de crisis y ayudarme a salir adelante.

A mi amiga de la vida, Catalina, por seguir conmigo después de todos estos años, por escuchar mis interminables notas de voz contándole mi vida y darme siempre el consejo perfecto y las palabras que necesito oír. A mis amigas del colegio Camila, Ana María y Cindy, por permanecer unidas a pesar de los años, gracias por chismear conmigo y contenerme cuando lo he necesitado. A KaMe, por ser la amiga más amorosa y echada para adelante, gracias por impulsarme siempre a ser mejor persona, a nunca conformarme con lo que tengo hoy y a ir por más. A Maria Fernanda, mi amiga la más soñadora, que a pesar de la distancia siempre la he sentido cerca, gracias por mostrarme que detrás de las nubes el cielo es siempre azul.

Quiero agradecer a mi director de tesis, Carlos Alberto Parra López, por su orientación, apoyo, comprensión y sabios consejos a lo largo de este proceso. Gracias por compartirme sus conocimientos y darme un lugar en su gran escuela de inmunología, de la cual me siento muy orgullosa de pertenecer. Su experiencia y dedicación fueron fundamentales para la finalización satisfactoria de esta maestría. También quiero agradecer a mi codirector de tesis, Manuel Alfonso Patarroyo Gutiérrez, por su valiosa asesoría, su disposición para ayudarme en lo que necesitara y por abrirme las puertas de la Fundación Instituto de Inmunología de Colombia (FIDIC) en donde tuve la oportunidad de trabajar con él y con Carolina, Diana, Kewin y Cristian, personas brillantes que desinteresadamente me brindaron su ayuda y fueron indispensables para el desarrollo de este trabajo.

Le agradezco al profesor Carlos Arturo Clavijo, por ofrecernos su invaluable apoyo y colaboración en un momento en el que el trabajo estaba estancado y acompañarme hasta el final con la mejor disposición, por compartirme su conocimiento y tenerme paciencia. Gracias también a David Bernal y a la Fundación Salud de los Andes, por su apoyo a lo largo de este proyecto, por explicarme siempre todo con detalle y con la mejor actitud; y por el apoyo financiero. A las profesoras del departamento de Microbiología por su compañía en mi camino de la docencia, especialmente a Myriam Navarrete y a Sandra Henao por confiar en mi potencial desde el primer día, por nunca dudar que lo podía lograr, por darme la oportunidad de ser docente de la universidad, por su paciencia y su cariño incondicional.

Quiero agradecer a la Universidad Nacional de Colombia, por abrirme las puertas y mostrarme otra realidad que no sabía que necesitaba ver. Gracias por enseñarme a tener más empatía y ser más consciente del entorno en el que vivo. Finalmente, quiero reconocer el respaldo y apoyo de financiero proporcionado por la Universidad Nacional de Colombia y MinCiencias, los cuales hicieron posible llevar a cabo esta investigación.

A todos ustedes y a los que tal vez no mencioné, mi más sinceras gracias.

Resumen

Evaluación de la inmunogenicidad de antígenos formulados en minigenes transfectados a células presentadoras de antígeno

La deficiente presentación del antígeno por parte de las células tumorales juega un papel importante en la evasión de la respuesta inmune antitumoral por parte de los linfocitos T, siendo, de hecho, un factor primordial del origen de los tumores. Por esta razón distintos tipos de células presentadoras de antígeno (APCs) han sido ampliamente utilizadas para la inmunoterapia del cáncer debido a su capacidad de procesar y presentar eficientemente antígenos a los linfocitos T en pacientes con cáncer. Frecuentemente las APCs son pulsadas con el antígeno en forma de péptidos, sin embargo, este enfoque puede resultar en la presentación de epítopes que no son generadas producto del procesamiento natural por las células tumorales, afectando la efectividad de este tipo de inmunoterapia.

En este contexto, el uso de minigenes, que corresponden a secuencias de antígenos concatenados, emerge como una alternativa propicia para la selección de antígenos procesados naturalmente por las APCs. Se espera que esta estrategia simule el procesamiento y presentación natural de los antígenos a los linfocitos T y aumente la probabilidad de identificar antígenos inmunogénicos, evitando así la selección de epítopes que no son procesados y presentados naturalmente como candidatos a vacuna para la inmunoterapia.

Para hacer entrega de estos minigenes a las APCs, se han explorado distintos métodos, siendo la electroporación, la administración mediante liposomas catiónicos y la transducción por vectores virales los más comunes. Aunque se reconocen las ventajas y desventajas inherentes a cada método, pocos estudios han comparado el rendimiento en la estimulación de los linfocitos T por parte de APCs transfectadas con diferentes sistemas.

En este sentido, el presente trabajo propuso la evaluación de la capacidad que tienen las APCs transfectadas con un constructo de minigen que codifica para antígenos inmunogénicos restringidos al haplotipo HLA-A*0201, de estimular precursores de linfocitos T-CD8+ (LT-CD8+) antígeno-específicos *in vitro*. Además de la transfección con el minigen, también se diseñaron APCs artificiales (en adelante denominaremos aAPCs), cotransfectando las líneas celulares HEK293 y K562 con plásmidos que codifican para moléculas co-estimuladoras (CD80, CD83, CD137L) y en el caso de las K562 también con un plásmido que codifica para la molécula HLA-A*0201, con el fin de evaluar la eficiencia de activación de LT-CD8+ por estas aAPCs, en términos de la producción de citoquinas intracelulares, la actividad citotóxica, la expresión de marcadores de activación y agotamiento; y el perfil de las subpoblaciones de memoria de los LT-CD8+ estimulados.

Los resultados de este trabajo permitieron implementar una metodología de transfección con el uso de lipofectamina y electroporación en células HEK293 de un minigen codificante para epítopes HLA-A*0201. Estas células se emplearon como aAPCs para analizar el fenotipo de poblaciones de LT-CD8+ antígeno-específicas. Considerando que el uso de las células HEK293 como aAPCs no ha sido explorado, y debido a su alta eficiencia de transfección y transducción con minigenes, la metodología implementada en este trabajo posibilita su uso para la identificación de neoantígenos inmunogénicos naturalmente procesados. Consideramos que nuestros hallazgos pueden contribuir con la selección y el diseño de vacunas personalizadas basadas en neoantígenos tumorales útiles para la inmunoterapia del cáncer.

Palabras clave: Minigenes, Neoantígenos, inmunogenicidad, Células presentadoras de antígeno artificiales, transfección, transducción, antígenos virales, antígenos tumorales, Linfocitos T CD8+, tetrámero, citoquinas, respuesta efectora, citometría de flujo, inmunoterapia.

Abstract

Assessment of the Immunogenicity of Antigens Formulated in Minigenes Transfected into Antigen-Presenting Cells

The deficient antigen presentation by tumor cells plays a significant role in the evasion of the anti-tumor immune response by T lymphocytes, being, in fact, a primordial factor in tumor genesis. For this reason, various types of antigen-presenting cells (APCs) have been widely used for cancer immunotherapy due to their ability to efficiently process and present antigens to T lymphocytes in cancer patients. APCs are often pulsed with antigenic peptides; however, this approach may result in the presentation of epitopes that are not naturally processed by tumor cells, affecting the effectiveness of this type of immunotherapy.

In this context, the use of minigenes, which correspond to concatenated antigen sequences, emerges as a promising alternative for the selection of antigens naturally processed by APCs. It is expected that this strategy mimics the natural processing and presentation of antigens to T lymphocytes, increasing the probability of identifying immunogenic antigens, thus avoiding the selection of epitopes that are not naturally processed and presented as vaccine candidates for immunotherapy.

To deliver these minigenes to APCs, various methods have been explored, with electroporation, administration via cationic liposomes, and transduction by viral vectors being the most common. Although the advantages and disadvantages of each method are recognized, few studies have compared the performance in T lymphocyte stimulation by APCs transfected with different systems.

In this regard, the present work proposed the evaluation of the capacity of APCs transfected with a minigen construct encoding for HLA-A0201-restricted immunogenic antigens to stimulate antigen-specific CD8⁺ T lymphocyte (CD8⁺ LT) precursors *in vitro*. In addition to transfection with the minigen, artificial APCs (hereinafter referred to as aAPCs) were also designed, co-transfecting the HEK293 and K562 cell lines with plasmids encoding co-stimulatory molecules (CD80, CD83, CD137L), and in the case of K562 also with a plasmid encoding the HLA-A0201 molecule, in order to evaluate the efficiency of CD8⁺ LT activation by these aAPCs, in terms of intracellular cytokine production, cytotoxic activity, expression of activation and exhaustion markers, and the profile of stimulated CD8⁺ LT memory subpopulations.

The results of this work allowed the implementation of a transfection methodology using lipofectamine and electroporation in HEK293 cells of a minigen encoding HLA-A*0201 epitopes. These cells were used as aAPCs to analyze the phenotype of antigen specific CD8⁺ LT populations. Considering that the use of HEK293 cells as aAPCs has not been explored, and due to their high transfection and transduction efficiency with minigenes, the methodology implemented in this work enables their use for the identification of naturally processed immunogenic neoantigens. We believe that our findings can contribute to the selection and design of personalized vaccines based on tumor neoantigens useful for cancer immunotherapy.

Keywords: Minigenes, Neoantigens, Immunogenicity, Artificial antigen-presenting cells, Transfection, Transduction, Viral antigens, Tumor antigens, CD8⁺ T lymphocytes, Tetramer, Cytokines, Effector response, Flow cytometry, Immunotherapy.

Tabla de contenido

Agradecimientos.....	3
Resumen.....	5
Abstract.....	7
Tabla de contenido	9
Índice de Figuras.....	11
Índice de Tablas	13
Índice de Figuras suplementarias	13
Índice de Tablas suplementarias	14
Anexos.....	15
Lista de abreviaturas	16
1. Introducción.....	17
2. Planteamiento del problema y justificación	19
3. Marco teórico	23
3.1 Inmunoterapia	23
3.2 Antígenos asociados a tumor.....	24
3.3 Antígenos virales.....	26
3.4 Métodos de transfección	27
3.5 Construcción de células presentadoras de antígeno artificiales	30
3.6 Genes reporteros.....	32
3.7 Respuesta citotóxica de LT-CD8+	33
3.8 Inmunofenotipo de LT-CD8+ activados	35
4. Objetivos	37
4.1 General.....	38

4.2	Específicos	38
5.	Metodología.....	38
5.1	Objetivo 1: Implementar distintos sistemas de transfección de minigenes a células presentadoras de antígeno.	39
5.2	Objetivo 2: Demostrar la inmunogenicidad para linfocitos T de epítopes transfectadas con minigenes a células presentadoras de antígeno.....	45
6.	Resultados	50
6.1	Diseño de minigenes y selección de los vectores.....	50
6.2	Estandarización de transfección de DNA en PBMCs y DCs utilizando Lipofectamina.....	55
6.3	Estandarización de transfección de DNA en PBMCs y DCs utilizando Electroporación	57
6.4	Estandarización de transfección de DNA en HEK293T utilizando Lipofectamina	60
6.5	Estandarización de transfección de DNA en células HEK293T utilizando Electroporación	64
6.6	Estandarización de transducción de DNA en células HEK293T utilizando Adenovirus Ad5.RGD	68
6.7	Construcción de APCs artificiales (aAPCs).....	70
6.8	Western blot de APCs con distintos sistemas de entrega del minigen	75
6.9	Detección y expansión mediante tetrámero de precursores de LT-CD8+ que reconoce antígenos virales y tumorales en donantes sanos HLA-A*0201..	77
6.10	Evaluación de la producción de citoquinas intracelulares de LT-CD8+ de donantes sanos co-cultivados con APCs transfectadas con el minigen...	79
6.11	Evaluación de la producción de citoquinas intracelulares por LT CD8+ CMV+ co-cultivados con APCs transfectadas con el minigen	89
6.12	Evaluación del inmunofenotipo de LT CD8+ co-cultivados con APCs transfectadas	97
6.13	Análisis automatizado de linfocitos T con fenotipos definidos, evaluados por identificación, caracterización y regresión de clústeres (CITRUS)	105
6.14	Células presentadoras artificiales presentan de manera más eficiente epítopes a LT-CD8+ antígeno-específicos presentes en sangre de donantes sanos.....	110
6.15	Células presentadoras artificiales presentan de manera más eficiente epítopes a LT-CD8+ antígeno-específicos.....	114

7.	Discusión	116
8.	Perspectivas	127
9.	Consideraciones éticas	130
10.	Apropiación social del conocimiento	131
11.	Referencias	132
12.	Figuras suplementarias	140
13.	Tablas Suplementarias	161

Índice de Figuras

Figura 1.	Diagrama de flujo de la metodología detallada	388
Figura 2.	Producto de PCR para insertar sitios de enzimas de restricción.	52
Figura 3.	Producto de PCR de colonia luego de transformar JM109 con el plásmido pcDNA.3.1 - N- eGFP-minigen.....	53
Figura 4.	Producto de PCR de colonia luego de transformar JM109 con el plásmido pcDNA.3.1 - N-eGFP-minigen	54
Figura 5.	Transfección de PBMCs con Lipofectamina.....	55
Figura 6.	Transfección de células dendríticas con Lipofectamina.	56
Figura 7.	Transfección de PBMCs frescas con electroporación.....	58
Figura 8.	Transfección de DCs con electroporación	59
Figura 9.	Evaluación de marcadores expresados por las células HEK293T	60
Figura 10.	Células HEK293T expresan HLA-A2..	61
Figura 11.	Transfección de células HEK293T utilizando diferentes concentraciones de lipofectamina.....	62
Figura 12.	Transfección utilizando lipofectamina de células HEK293T con plasmido pcDNA 3.1-N-eGFP.....	63
Figura 13.	Optimización del tiempo de electroporación en células HEK293T	64
Figura 14.	Optimización del voltaje de electroporación en células HEK293T	65
Figura 15.	Electroporación del minigen en células HEK293T	66

Figura 16. Estandarización del MOI de 0 a 2000 del vector Adenoviral en células HEK293T.	67
Figura 17. Estandarización del MOI de 0 a 10 del vector adenoviral en células HEK293T.	708
Figura 18. Estandarización de transfección de células K562 con lipofectamina y electroporación.	719
Figura 19. Expresión de moléculas coestimuladoras en células K562 transfectadas utilizando lipofectamina.....	72
Figura 20. Expresión de moléculas coestimuladoras en células HEK293 co-transfectadas condiferentes plásmidos utilizando lipofectamina	73
Figura 21. Western blot de células HEK293 transfectadas por lipofectamina con GFP-Minigen y GFP en condiciones denaturantes y nativas.....	75
Figura 22. Identificación de LT CD8+ antígeno-específicos para la epítotope HLA-A*0201 de CMV	76
Figura 23. Identificación de LT CD8+ antígeno-específicos para NY-ESO-1 y MART-1.....	78
Figura 24. Evaluación de la producción de citoquinas intracelulares de LT CD8+ en cocultivo con APCs transfectadas/transducidas	80
Figura 25. Expresión de citoquinas intracelulares de LT CD8+ de LAND 33 cocultivados con APCs autólogas o artificiales.....	84
Figura 26. Expresión de citoquinas intracelulares de LT CD8+ de LAND 42 re-estimulados con APCs autólogas o artificiales.....	86
Figura 27. Expresión de citoquinas intracelulares de LT CD8+ de donantes sanos cocultivados con células HEK293 como APCs	87
Figura 28. Expresión de IFN- γ + TNF- α + de LT-CD8-CMV+ en cocultivo con APCs transfectadas con Minigen y moléculas coestimuladoras.	89
Figura 29. Expresión de IFN- γ + TNF- α + de LT-CD8-Mart-1+ en cocultivo con APCs transfectadas con Minigen y moléculas coestimuladoras.....	91
Figura 30. Expresión de IFN- γ + TNF- α + en el clono BC-25 de LT-CD8-Mart-1+ en cocultivo con APCs transfectadas con Minigen y moléculas.....	92
Figura 31. Expresión de IFN- γ + TNF- α + de LT-CD8-NY-ESO-1+ en cocultivo con APCs transfectadas con Minigen y moléculas coestimuladoras.....	94
Figura 32. Expresión de citoquinas intracelulares de LT CD8+ de donantes sanos cocultivados con células HEK293 como APCs.....	95
Figura 33. Evaluación de la expresión de Granzima B en LT CD8+ Mart-1+ cocultivados con células HEK293 transfectadas.....	96
Figura 34. Expresión de marcadores de activación y agotamiento de LTCD8+ del donante LAND42 cocultivados con aAPCs transfectadas con el minigen.	98

Figura 35. Expresión de marcadores de activación y agotamiento de LTCD8+ de donantes sanos HLA-A*02:01 cocultivados con aAPCs transfectadas con el minigen.	100
Figura 36. Perfil de memoria de LT CD8+ del donante LAND42 cocultivados con células HEK293 transfectadas.	101
Figura 37. Expresión de marcadores de activación y agotamiento de LT-CD8+ MART-1+ cocultivados con aAPCs transfectadas con el minigen.	103
Figura 38. Perfil de memoria de LT-CD8+ Mart-1 cocultivados con células HEK293 transfectadas.	1094
Figura 39. Estructura de resultados del análisis CITRUS del donante LAND42.	1098
Figura 40. Expresión de citoquinas intracelulares de LT CD8+ de donantes sanos cocultivados APCs autólogas o artificiales.	1091
Figura 41. Expresión de marcadores de activación de LT-CD8+ de donantes sanos cocultivados con aAPCs transfectadas con el minigen	1093
Figura 42. Expresión de citoquinas intracelulares de LT CD8+ Mart-1+ cocultivados APCs autólogas o artificiales	1095
Figura 43. Nuevo diseño de Minigenes. Rutas de procesamiento proteolítico anticipadas	1098
Figura 44. Diseño de vectores lentivirales	1090

Índice de Tablas

Tabla 1. Secuencias de péptidos largos y péptidos cortos utilizados en los ensayos inmunológicos.....	42
Tabla 2. Epítopes CD8 seleccionados y diseño final del minigen con espaciador de la furin proteasa.....	51

Índice de Figuras suplementarias

Figura Suplementaria 1 Productos de digestión del vector pcDNA 3.1-N-eGFP con Bam-HI – Xho-I y Bam-HI – Xba-I.	139
Figura Suplementaria 2 Productos de digestión del vector pcDNA 3.1-N-eGFP con la enzima Msc-I.	140
Figura Suplementaria 3 Secuenciación del plásmido pdDNA 3.1-N-EGFP-Minigen en MacroGen 141	

Figura Suplementaria 4 Estrategia de gating de la transfección de PBMCs.....	142
Figura Suplementaria 5 Estrategia de gating de transfección de células HEK293.....	143
Figura Suplementaria 6 estrategia de “gating” para la identificación de LT CD8 antígeno específico mediante la marcación doble de tetrámero	144
Figura Suplementaria 7 Estrategia de gating de análisis de citoquinas intracelulares mediante citometría de flujo para la detección de LT CD8+ secretores de IFN- γ y/o TNF- α	145
Figura Suplementaria 8 Estrategia de gating de análisis del inmunofenotipo de LT CD8+ mediante citometría de flujo	146
Figura Suplementaria 9 Viabilidad de células HEK293T 48 horas después de ser electroporadas con diferentes voltajes con el plásmido pcDNA 3.1-N-EGFP	147
Figura Suplementaria 10. Evaluación de la producción de citoquinas intracelulares de LT CD8+ del donante LAND13 en cocultivo con APCs transfectadas/transducidas.....	148
Figura Suplementaria 11 Expresión de GFP en mDCs del donante LAND-33 transfectadas con el minigen por lipofectamina	149
Figura Suplementaria 12 Expresión de citoquinas intracelulares de LT CD8+ de LAND 42 re-estimulados con APCs artificiales.....	150
Figura Suplementaria 13 Expresión de marcadores de activación y agotamiento de LT-CD8+ de donantes sanos cocultivados con células K562 transfectados.....	151
Figura Suplementaria 14 Estructura de resultados del análisis CITRUS del donante LAND42 de LT-CD8-..	153
Figura Suplementaria 15 Expresión de citoquinas intracelulares de LT CD8+ de donantes sanos cocultivados APCs autólogas o artificiales	155
Figura Suplementaria 16 Expresión de citoquinas intracelulares de LT CD8+ CMV+ cocultivados APCs autólogas o artificiales.....	157
Figura Suplementaria 17 Expresión de citoquinas intracelulares de LT CD8+ Mart-1+ cocultivados APCs autólogas o artificiales	158
Figura Suplementaria 18. Mapas de vectores plasmídicos utilizados para expresión de minigen y moléculas coestimuladoras.....	160

Índice de Tablas suplementarias

Tabla Suplementaria 1. Donantes sanos HLA-A*02:01 cribados para poblaciones de LT CD8 CMV+ mediante doble marcación de tetramero	161
Tabla Suplementaria 2. Revisión bibliográfica del uso de células HEK293 y K562 como APCs artificiales para la identificación y expansión de LT-CD8+ antígeno-específicos	163

Anexos

Anexo I	Nueva estrategia de producción de APCs artificiales y del diseño para el procesamiento del minigen.
Anexo II	Aval del comité de ética de la Facultad de Medicina.
Anexo III	Certificado de ponencia presencial VI Encuentro de Investigaciones Asociación Colombiana de Inmunología (ACOI).
Anexo IV	Certificado de presentación en modalidad de poster virtual en el 21° Día de la Investigación: Sistemas de salud e investigación de la Fundación Cardio Infantil.
Anexo V	Aceptación al Curso IUIS-SMI-ALACI-Immuno-Mexico 2024, titulado "Mecanismos de Inmunoterapias".
Anexo VI	Página Web del grupo de Inmunología y Medicina Traslacional
Anexo VII	Infografía Importancia de preservar los tumores en el desarrollo de la inmunoterapia del cáncer.
Anexo VIII	Infografía interactiva sobre la inmunoterapia contra el cáncer.
Anexo IX	Folleto Inmunoterapia contra el cáncer dirigido a pacientes.
Anexo X	Folleto Inmunoterapia en el tratamiento del cáncer: información básica para personal de salud.
Anexo XI	Artículo publicado como coautora titulado: Effect of neoadjuvant chemotherapy on tumor immune infiltration in breast cancer patients: Systematic review and meta-analysis.

Lista de abreviaturas

APC	Célula(s) Presentadora(s) de Antígeno (Antigen Presenting Cells)
CFSE	Carboxifluoresceína-succinimidil éster
CTLA-4	Antígeno de LT citotóxico 4 (Cytotoxic T-Lymphocyte Antigen 4)
DCs	Células Dendríticas (Dendritic Cells)
DMSO	Dimetilsulfóxido
FITC	Isotiocianato de fluoresceína (Fluorescein IsoTioCyanate)
GM-CSF	Factor estimulante de colonias granulocito-macrófago (Granulocyte-macrophage colony stimulating factor)
HLA	Antígeno Leucocitario Humano (Human leukocyte antigen)
IFN	Interferón
LAG3	Gen de activación linfocitaria 3 (Lymphocyte-activation gene 3)
IL	Interleuquina
LPS	Lipopolisacárido
LT-CD4+	Linfocito T CD4+
LT-CD8+	Linfocito T CD8+
MFI	Intensidad Media de fluorescencia (Mean fluorescence intensity)
MHC	Complejo Mayor de Histocompatibilidad (Major Histocompatibility complex)
MoDCs	Células dendríticas derivadas de monocitos

PB	Pacific Blue (Fluorocromo para citometría de flujo)
PBMCs Cells)	Células mononucleares de sangre periférica (Peripheral Blood Mononuclear Cells)
PD-1	Proteína de muerte celular programada 1 (Programmed cell death protein 1)
PE	Ficoeritrina (Phycoerythrin)
PRRs	Receptores de reconocimiento en patrón (Pattern Recognition Receptor)
SFB	Suero Fetal Bovino
TAAAs	Antígenos asociados a tumor (Tumor-Associated Antigens)
TCM	Linfocito T de memoria central (Central Memory)
TEM	Linfocito T de memoria efectora (Effector Memory)
TEMRA	Linfocito T efectores terminales (Terminal Effector CD45RA+)
TILs	Linfocitos T infiltrantes de tumor (Tumor Infiltrating Lymphocytes)
TN	Linfocito T vírgen (Naive)
TLR	Receptor tipo toll (Toll-like receptor)
TNF	Factor de necrosis tumoral (Tumor necrosis factor)
TSA	Antígenos específicos de tumor

1. Introducción

La inmunoterapia ha emergido como una estrategia prometedora en el tratamiento del cáncer destacándose por su capacidad de potenciar la respuesta inmune específica contra el tumor. Las limitaciones de los enfoques tradicionales, como la cirugía, la radioterapia y la quimioterapia, han generado que la inmunoterapia surja como un nuevo pilar del tratamiento contra el cáncer, aumentando la esperanza y calidad de vida de los pacientes [1]. El objetivo principal de la inmunoterapia es potenciar o restaurar la habilidad del sistema inmune de detectar y destruir células cancerígenas, superando los mecanismos de evasión que estas han desarrollado para suprimir la respuesta inmune [2]. El enfoque principal de este nuevo pilar del tratamiento del cáncer ha sido aumentar la frecuencia de los linfocitos T (LT) específicos para antígenos tumorales a través de la administración de vacunas terapéuticas basadas en células dendríticas, el tratamiento

adyuvante con citoquinas como la IL-2 y transferencia adoptiva de Linfocitos Infiltrantes de Tumor (TILs) [3].

Considerando particularmente las vacunas terapéuticas, el objetivo principal de estas es mejorar la calidad de la presentación de antígenos asociados a tumor o propios del tumor a los LT para activarlos y estimular una respuesta anticancerígena [4]. Las vacunas terapéuticas basadas en células dendríticas (DCs) o en otras células presentadoras de antígenos (APCs) sirven como vehículo para estimular los LT antitumorales [5]. Estas células no solo presentan antígenos en el contexto del complejo principal de histocompatibilidad (MHC), sino que también actúan como neoadyuvantes, liberando citoquinas y quimioquinas para estimular respuestas más completas por parte de los LT [6].

Si bien los ensayos que emplean DCs en vacunas contra el cáncer han demostrado utilidad terapéutica limitada, resultados recientes de su uso con neoantígenos tumorales como vacuna en el modelo de melanoma puede representar una nueva oportunidad en la inmunoterapia del cáncer [7, 8]. Sin embargo, los altos costos de producción, corta vida útil de las DCs, dificultades de almacenamiento y transporte; y la variabilidad de las DCs entre pacientes son factores que continúan afectando la implementación de estas vacunas [9].

Por otro lado, la estrategia de entrega de antígenos es un aspecto crucial en el diseño de vacunas basadas en DCs. Con frecuencia las DCs se utilizan en inmunoterapia luego de ser pulsadas con péptidos sintéticos de antígenos tumorales debido a la relativa simplicidad de su síntesis. Esta metodología es muy común para identificar tanto *ex vivo* como *in vitro* linfocitos T que los reconocen. Sin embargo, el uso de péptidos sintéticos como antígeno obvia el procesamiento y la presentación en el contexto del MHC ejercido de forma natural por las APCs o por las células tumorales que hacen presentación cruzada de antígenos tumorales *in vivo*. Por lo que no se puede asegurar que los LT que reconocen estos péptidos sintéticos se generen *in vivo* [10]. Esta limitación puede sesgar la selección de neoantígenos inmunogénicos para su uso en formato de péptido sintético como vacuna.

Esto podría explicar el por qué la identificación de linfocitos T específicos de neoantígenos *in vivo* en pacientes vacunados con péptidos representativos de estos neoantígenos alcanzan solo el 6% de los utilizados como vacuna. Esto sugiere que la mayoría de los neoantígenos tumorales predichos mediante herramientas bioinformáticas no se procesen ni se presenten en moléculas MHC de forma natural.

En este contexto, los minigenes, los cuales son secuencias de ADN que codifican para epítopes mínimos de linfocitos T citotóxicos (LTC) organizadas en tándem, han surgido como una alternativa para obviar las limitaciones del uso de péptidos como antígeno antes mencionadas. A diferencia de las proteínas completas o péptidos sintéticos, los minigenes permiten la inclusión de múltiples epítopes inmunogénicas con alta afinidad y buena estabilidad de unión al MHC, cuya presentación depende de su procesamiento natural por las APCs transfectadas con el minigen [11].

Además, los minigenes ofrecen la posibilidad de evaluar un mayor número de candidatos para la inmunoterapia y la ventaja de que se puedan producir múltiples copias del antígeno procesado de manera natural [12]. Asimismo, las APCs activadas por minigenes pueden inducir la producción de citoquinas, estimulando receptores de reconocimiento de patrón intracelulares (PRRs) [13], lo que favorecerá la expresión de moléculas co-estimuladoras, las cuales son esenciales para inducir una respuesta antitumoral robusta. En este contexto, en este trabajo se persiguió construir un estuche de minigenes que codifique para antígenos asociados a tumor y antígenos virales, que fue cotransfectado con plásmidos que codifican para moléculas co-estimuladoras, con el propósito de evaluar la capacidad de las células transfectadas utilizadas como aAPCs de estimular de manera efectiva LT antígeno-específicos [14].

En conjunto, este estudio permitió examinar el rendimiento de aAPCs transfectadas con un minigen multi-epítope como herramienta de entrega de antígeno a APCs y el monitoreo de LT-CD8+ específicos de antígenos naturalmente procesados.

2. Planteamiento del problema y justificación

El cáncer constituye una de las causas más importantes de morbilidad y mortalidad en el mundo, generando un impacto considerable a nivel personal, social y económico [15]. A pesar de los notables avances logrados en el tratamiento de esta enfermedad, las estadísticas de GLOBOCAN registraron 10 millones de muertes por cáncer y 19,3 millones de nuevos casos solo en 2020 [16].

La inmunoterapia ha surgido como el cuarto pilar de tratamiento contra el cáncer junto con la cirugía, la quimioterapia y la radioterapia en tumores en etapas avanzadas. Su objetivo es potenciar o fortalecer el sistema inmune del paciente con el fin de desencadenar respuestas antitumorales efectivas. La inmunoterapia presenta ventajas sobre las terapias convencionales, como la posibilidad de eliminar microlesiones no susceptibles de ser removidas mediante abordajes quirúrgicos, además de tener menos efectos secundarios [17].

Dentro de las metodologías desarrolladas para la inmunoterapia del cáncer se encuentran la administración de anticuerpos monoclonales, como los inhibidores de puntos de control, la transferencia adoptiva de células y la vacunación con péptidos o células presentadoras de antígeno (APCs), siendo esta última estrategia una de las más importantes. Este tipo de vacunas implican el uso de APCs como vehículo de entrega de epítopes tumorales al sistema inmune, con el fin de estimular la producción de citoquinas y quimioquinas que fomenten respuestas antitumorales completas y eficientes [18]. A su vez, las APCs deben ser cargadas con los antígenos blanco, para lo cual se han desarrollado distintos sistemas de entrega antigénica, siendo uno de los métodos más utilizados pulsar APCs con péptidos sintéticos. Esta ha sido tradicionalmente una estrategia fácil y económica, dado que los péptidos son estables químicamente y no poseen potencial oncogénico [19].

En los últimos 10 años, el Grupo de Inmunología y Medicina Traslacional (I&MT) en alianza con la Fundación Salud de los Andes (FSA) ha adelantado investigación traslacional y explorado estrategias de medicina personalizada en pacientes con cáncer de mama. En 2014-2017, se llevó a cabo un primer Estudio Clínico Fase I titulado **"Inmunogenicidad y seguridad de células dendríticas autólogas en pacientes con cáncer de mama tratadas con quimioterapia neoadyuvante"** (*ClinicalTrials: NCT03450044*). En

este estudio se utilizó transferencia de células como estrategia de inmunoterapia y fue el primer estudio clínico de este tipo realizado en Colombia. Los resultados de este trabajo permitieron demostrar la inmunogenicidad y seguridad de las DCs para la inmunoterapia en pacientes con cáncer de mama; señaló que se podría utilizar esta inmunoterapia en pacientes con cáncer tratados con quimioterapia neoadyuvante. Esto permitiría capitalizar el carácter de vacuna críptica de los tumores [20].

Entre 2018 y 2021 el grupo I&MT adelantó un segundo estudio titulado "**Estudio clínico Fase I de inmunoterapia con vacunas sintéticas personalizadas en pacientes con cáncer de mama triple negativo**" (*ClinicalTrials: NCT04105582*). Este proyecto demostró la seguridad y la inmunogenicidad de vacunas personalizadas basadas en neoantígenos tumorales formulados en DCs en pacientes con este tipo de cáncer. Para dar continuidad a este trabajo, entre 2019-2024 el grupo I&MT se encuentra adelantando el proyecto titulado "**Implementación de una planta piloto para la producción de vacunas personalizadas para la inmunoterapia del cáncer en Colombia**" dentro del cual se adelanta un nuevo estudio clínico de vacunación con neoantígenos tumorales de un nuevo grupo de pacientes con cáncer de mama (*ClinicalTrials: NCT06195618*). El objetivo a largo plazo de este proyecto es implementar el uso de vacunas personalizadas basadas en DCs pulsadas con neoantígenos tumorales para la inmunoterapia del cáncer en el país.

A pesar del progreso importante de las vacunas personalizadas basadas en neoantígenos tumorales para la inmunoterapia del cáncer que se han llevado a cabo en el grupo, la inmunogenicidad *in vivo* de los neoantígenos seleccionados para el diseño de estas vacunas con base en algoritmos predictivos es muy limitada. Por ejemplo, en 2017 Karpanen et al. encontraron que solo el 1,2% de los neoantígenos con potencial inmunogénico eran reconocidos de manera espontánea por LT de pacientes [21]. Además, en 2020 el consorcio TESLA (Tumor Neoantigen Selection Alliance) reportó que la cantidad de precursores en pacientes es muy baja, pues solo el 6% de los neoantígenos evaluados resultaron tener precursores [22].

Una de las razones por las que se ha intentado explicar la respuesta insuficiente de los LT es la posibilidad de que los péptidos sintetizados representen regiones que no son

procesadas y presentadas de manera natural, lo que podría resultar en datos falsos positivos sin utilidad a nivel clínico [23]. Además, los péptidos pulsados permiten probar un antígeno a la vez, lo que hace la búsqueda del blanco de la terapia más dispendiosa y extensa [11]. Por esta razón, se ha propuesto que el desarrollo de minigenes podría ser una herramienta útil para ensayar simultáneamente distintos antígenos, aumentando las probabilidades de estimular respuestas inmunes de LT antitumorales. Además, los minigenes abren la posibilidad de que los antígenos sean aquellos que las células presentadoras tengan la capacidad de procesar y presentar naturalmente [12]. Teniendo en cuenta lo anterior, se hace necesario explorar un nuevo enfoque que permita mejorar la identificación de precursores de neoantígenos inmunogénicos.

En este trabajo se utilizaron antígenos modelo con inmunogenicidad comprobada y que han sido objeto de ensayos en el diseño de minigenes [24-27], con el fin de estudiar diferentes métodos de transfección de APCs, evaluar si éstas tienen la capacidad de activar LT-CD8+ antígeno-específicos y comparar la eficiencia de presentación de estas células con APCs co-transfectadas con plásmidos que codifican para moléculas coestimuladoras y con el minigen.

Por lo tanto, el objetivo del proyecto fue diseñar un constructo de minigenes que codificaba antígenos virales y antígenos asociados a tumor, el cual fue entregado a APCs autólogas y aAPCs basadas en células K562 y HEK293 mediante distintos sistemas de transfección, luego de lo cual fueron utilizarlas como aAPCs para estimular LT-CD8+ antígeno-específicos. Resultados a favor de que aAPCs son eficientes presentadoras de antígenos naturalmente procesados por estas células, promovería el uso de estas aAPCs transfectadas con minigenes codificantes para neoantígenos tumorales como parte del proceso de optimizar la identificación de LT-CD8+ específicos. Esto optimizaría la selección de neoantígenos que harían parte de las vacunas actualmente en evaluación en estudios clínicos fase I adelantados por el grupo I&MT.

En consecuencia, en este trabajo de maestría se plantean las siguientes preguntas de investigación:

¿Cuál método de entrega antigénica evidencia una estimulación más eficaz de la respuesta de LT-CD8 específicos de antígenos naturalmente procesados?

¿El uso de aAPCs representa una ventaja para estimular LT-CD8+ que reconocen eficientemente antígenos naturalmente procesados?

3. Marco teórico

3.1 Inmunoterapia

La inmunoterapia es un tratamiento innovador que modula la respuesta del sistema inmune para atacar las células tumorales. Los primeros reportes de este tipo de terapia se evidenciaron en 1891 cuando William Coley, llamado el padre de la inmunoterapia, intentó estimular la respuesta del sistema inmune para tratar un sarcoma utilizando una mezcla de *Streptococcus pyogenes* y *Serratia marcescens* vivos e inactivados y obtuvo una respuesta clínica del 10%, sin embargo, la falta de conocimiento sobre el mecanismo de acción y los altos riesgos de infección obstaculizaron su progreso [3].

A partir de esto, se han desarrollado distintas inmunoterapias que se concentran en diferentes blancos para atacar las células tumorales. Dentro de ellas se encuentran los anticuerpos anti-puntos de control, las terapias inmunomoduladoras, los virus oncolíticos modificados, la transferencia adoptiva de células y las vacunas contra el cáncer [28].

Las vacunas contra el cáncer utilizan antígenos producidos por las células tumorales o antígenos inmunogénicos para desencadenar una respuesta inmune mediada por los linfocitos T. Estas vacunas se han investigado ampliamente en melanoma, debido a que es uno de los tumores no inducidos por virus más inmunogénicos, utilizando antígenos asociados a este tipo de tumor codificados por la familia de genes MAGE (antígenos asociados a melanoma por sus siglas en inglés) que pueden ser reconocidos por LTCs y activar una respuesta antitumoral. Algunos de estos epítopes han arrojado resultados prometedores en términos de destrucción de células cancerígenas [29-32].

Además de los antígenos tumorales, en las vacunas contra el cáncer se pueden utilizar células presentadoras de antígeno (APCs), particularmente células dendríticas, como vehículo para los epítopes. Estas células son presentadoras profesionales, lo que significa que además de presentar el antígeno, liberan citoquinas y quimioquinas que permiten activar una respuesta más completa contra el tumor [31]. Se ha demostrado que estas vacunas basadas en células dendríticas tienen resultados positivos, un ejemplo de esto es la vacuna sipuleucel-T, la cual fue aprobada para el tratamiento del cáncer de próstata avanzado [33].

3.2 Antígenos asociados a tumor

Los antígenos asociados a tumor (TAA por sus siglas en inglés) son antígenos que se sobre expresan en células tumorales por mutaciones, modificaciones postraduccionales o por cambios conformacionales, que no se presentan en las células sanas. Estos se han utilizado como blanco para las vacunas, esperando que sean capaces de inducir una respuesta inmune sistémica a los TAA resultando en la eliminación del tumor del paciente [33, 34].

Dentro de los TAA más utilizados para estas vacunas se encuentra el receptor de la proteína quinasa erB-2 (HER-2); éste es un receptor del factor de crecimiento epidérmico que está compuesto por un dominio extracelular y un dominio intracelular. HER-2 se expresa débilmente en la superficie epitelial del tejido normal en la adultez, pero se sobre expresa en la superficie tumoral de muchos tipos de cáncer [35, 36]. Éste se ha utilizado en diferentes vacunas, por ejemplo, Disis y colaboradores vacunaron a 64 pacientes con cáncer de mama, ovario y de pulmón de célula no pequeña con epítopes pertenecientes a ambos dominios del receptor. Luego de la vacunación, se encontró que en el 92% de los pacientes, se desarrolló una inmunidad mediada por células T específica para los péptidos de HER-2 incluidos en la vacuna y esta inmunidad permaneció por un año en el 38% de los pacientes [37].

Otros TAAs muy bien estudiados son los que están asociados con melanoma. Se han utilizado tres grupos de estos en vacunas, los antígenos de diferenciación de melanocitos (Melan A/MART-1), gp100 y tirosinasa, los cuales se expresan en

melanocitos y tumores de melanoma, pero no en tumores de otro origen [35]. Particularmente, la proteína MART-1 (Antígeno de melanoma reconocido por células T 1 por sus siglas en inglés) fue descrita por Kaeakami y colaboradores encontrando que está compuesta por 118 aminoácidos y que comprende un epítipo de unión a HLA-A2 entre los residuos 27 y 47 [37]. Investigaciones posteriores permitieron identificar que MART-127-35 es el epítipo que logra estimular una mejor respuesta por parte de los LTCs en modelos de melanoma, por encima de los antígenos gp100 y tirosinasa [38].

Otro tipo de antígenos que se presentan en las células tumorales son los antígenos de cáncer de testículos (CTAs por sus siglas en inglés). Su expresión se encuentra restringida a células germinales testiculares y a trofoblastos de placenta, en células somáticas adultas su expresión es muy baja o incluso nula [39]. Un ejemplo de estos es el antígeno de carcinoma de células escamosas de esófago de Nueva York 1 (NY-ESO-1); éste se expresa en distintos tipos de cáncer. Durante el desarrollo embrionario, NY-ESO-1 puede ser detectado a las 13 semanas de vida y se encuentra en su pico más alto de expresión a las 22-24 semanas. Éste se presenta mayoritariamente en espermatozoides comparado con su expresión en óvulos, sin embargo, se ha encontrado ARN de NY-ESO-1, pero no expresión de la proteína en tejido endometrial y ovarios. Su función o importancia biológica no es clara en la actualidad, no obstante, gracias a su estructura y patrón de expresión, se cree que puede estar involucrado en el crecimiento y progresión del ciclo celular [40].

NY-ESO-1 ha sido ampliamente utilizado en vacunas contra el cáncer, gracias a que ha demostrado ser altamente inmunogénico y se encuentra en un gran número de tumores distintos, por lo que podría ser aplicado a una mayor cantidad de pacientes. De NY-ESO-1 se han logrado identificar 21 epítopes distintos restringidos a, por lo menos, 5 HLA clase II diferentes. De éstos, los péptidos NY-ESO-1 180-190 y NY-ESO-1157-165, asociados con respuestas T CD4+ y T CD8+, respectivamente, han demostrado ser los más inmunogénicos. Una investigación usando pacientes con cáncer metastásico que expresaban esta proteína, demostró que al vacunarlos con un péptido largo que contenía varios epítopes, se obtenía una estimulación de la respuesta inmune. Particularmente, en 3 de los 10 pacientes se logró una estabilidad en la enfermedad [41].

3.3 Antígenos virales

Dentro de los antígenos virales más estudiados se encuentra el péptido pp65 del Citomegalovirus (CMV). Este virus hace parte de la familia de los herpesvirus y de la subfamilia Betaherpesvirinae, que se caracterizan por tener una cápside, un tegumento y una envoltura compuesta por glicoproteínas y ADN como material genético. Además de esto, se caracterizan por tener un rango reducido de hospederos, un ciclo de replicación largo, un estadio de latencia que puede ser establecido en diferentes tipos de células y tejidos, además de ser de progresión de infección más lenta. Su ADN codifica para más de 100 proteínas distintas y posee el genoma más largo entre todos los herpesvirus [42]. Éste puede causar morbilidad severa en pacientes inmunocomprometidos y en recién nacidos que son infectados por la placenta de la madre. En personas inmunocompetentes, esta infección es asintomática en su mayoría, pero en adultos jóvenes es una de las causas principales de mononucleosis. Comúnmente se encuentran con alta frecuencia LTCs específicos para CMV en el torrente sanguíneo de individuos seropositivos [43].

Uno de los antígenos predominantes reconocidos por los LTCs es la fosfoproteína de la matriz inferior de 65 kDa o pp65, la cual es una de las proteínas estructurales más abundantes del virus [44]. Los epítopes presentes en esta proteína se han utilizado para desarrollar vacunas que estimulen la activación de LTCs específicos para estos antígenos. En un estudio en el que se vacunaron 22 pacientes seropositivos y 22 seronegativos con la proteína pp65 modificada, se encontró que no se presentaban efectos adversos en los individuos inmunizados y, además, en las personas seronegativas se estimuló la respuesta de células T específicas para pp65 y la producción de anticuerpos contra la glicoproteína B del virus. En el grupo de los seropositivos, se encontró un incremento únicamente de las células T específicas para pp65 [45].

El virus de la influenza A pertenece a la familia Orthomyxoviridae, cuyos miembros se caracterizan por tener genomas de ARN- segmentados. En esta familia también se encuentran los virus de influenza B y C, sin embargo, la influenza A es el que más se ha

estudiado y caracterizado junto con las glicoproteínas de su superficie, hemaglutinina (HA) y neuraminidasa (NA). Este virus se clasifica dependiendo de los subtipos de las glicoproteínas. Solo tres subtipos de HA (H1, H2 y H3) y dos de NA (N1 y N2) han causado epidemias humanas gracias a su capacidad de reordenamiento del ARN cuando infecta una célula, pues esto le da la posibilidad de mutar más rápidamente [46].

La proteína de matriz M1 se ha estudiado ampliamente debido a su capacidad inmunogénica y, por lo mismo, se ha utilizado en el desarrollo de vacunas, particularmente, el péptido comprendido entre los residuos 58-66. Éste ha demostrado ser capaz de activar los LTCs y se presenta en el contexto del HLA-A2, el cual es uno de los alelos más comunes en la población. Se ha encontrado que este epítipo puede estimular una respuesta de memoria mucho mayor comparada con los otros epítipes restringidos a HLA-A2 [47]. En un estudio clínico fase 1, se llevó a cabo una vacunación de 15 individuos con antígenos de la proteína M1 y de la nucleoproteína NP, encontrando que la vacuna no representaba ningún riesgo para los voluntarios y que se evidenciaba un incremento en las células T específicas para los antígenos y de moléculas efectoras luego de una sola dosis de la vacuna [48].

3.4 Métodos de transfección

Comúnmente, para que las APCs puedan activar la respuesta de LTCs, se cargan con antígenos pulsados directamente al MHC de la célula. Esto se ha utilizado por muchos años gracias a la estabilidad química de los péptidos sintéticos, su relativa facilidad de ser sintetizados y su esterilidad. Sin embargo, estos tienen que ser compatibles con el HLA del paciente para que puedan ser presentados y, en algunos casos, estos antígenos se acomodan en el bolsillo del MHC de manera incorrecta representando epítipes que no se presentarían naturalmente. Otro inconveniente para tener en cuenta es que las células tumorales pueden dejar de producir el epítipo, por lo que la inmunoterapia quedaría obsoleta. Una alternativa es el uso de métodos de transfección para entregar a las APCs secuencias que codifiquen para varios antígenos una detrás de la otra, llamados minigenes. De esta manera, las células podrán presentarlos en el contexto del MHC del paciente, con la certeza de que los antígenos que demuestren ser

inmunogénicos son epítopes naturales y se aumenta la probabilidad de encontrar algún epítoto capaz de desencadenar una respuesta anti-tumoral efectiva [49].

Para esto, se han estudiado varias metodologías de transfección de APCs, divididas entre métodos virales y no virales. Los métodos virales se basan en la transducción del antígeno por medio de la maquinaria viral y empaquetado en su cápside. Dentro de los virus más empleados se encuentran los adenovirus, los retrovirus y los lentivirus. El lentivirus presenta varias ventajas, una de ellas es su facilidad para ingresar a las células y la baja probabilidad de que el paciente tenga anticuerpos contra este virus [50]. Algunos estudios recientes han demostrado que, por encima de los demás métodos virales y no virales, la transducción de genes con lentivirus es la más efectiva pues se evidencia mayor expresión de proteínas [51]. Sin embargo, una de las desventajas más importantes de usar virus como vectores es que las APCs transfectadas pueden reducir la producción de anticuerpos y, como consecuencia, reducir la eficiencia de la terapia contra el cáncer. Además de esto, se puede desencadenar una respuesta inmune contra el virus o mutaciones en los péptidos que provoquen enfermedades autoinmunes. Para esto, se eliminan los genes importantes para la replicación y se modifica la cápside para que el virus pierda su capacidad virulenta y no interfiera con las funciones normales de las APCs [52].

Aunque los vectores virales han demostrado tener alta efectividad, su uso en inmunoterapias es limitado debido a los efectos secundarios impredecibles que podrían llegar a causar. Por esto, fue necesario estudiar métodos no virales que, como su nombre lo indica, son aquellos que transportan los minigenes en moléculas no virales o métodos físicos que ayudan a introducir el constructo directamente a las APCs. En primer lugar, se encuentran los liposomas, vesículas cerradas conformadas por una bicapa lipídica, que en su superficie pueden tener receptores de manosa que reconocen lectinas, receptores de APCs y proteínas cargadas negativamente [53]. Estos han sido usados para encapsular ADN o ARN y transfectarlo a macrófagos o células dendríticas satisfactoriamente, logrando estimular una respuesta inmune efectiva [54, 55]. Adicional a esto, se ha encontrado que, al exponer las burbujas de liposomas a ultrasonido, la eficacia de la transfección aumenta [50].

En segundo lugar, se encuentran las partículas complejas, éstas pueden transportar ADN en su interior e interactuar electrostáticamente con la membrana de la célula para facilitar la endocitosis. Las más empleadas son de quitosano porque gracias a su naturaleza presenta una buena biocompatibilidad y su eficiencia en la transfección se puede modular dependiendo de varios factores como su peso molecular, pH, tipo de células y tamaño. Sin embargo, exhibe baja solubilidad, baja tasa de liberación del ADN y baja eficiencia de la transfección [50]. Teniendo en cuenta esto, se han intentado desarrollar modificaciones para obtener mayor efectividad; dentro de éstas, se puede destacar un quitosano manosilado que se usó para inducir endocitosis por medio del receptor de manosa en las células dendríticas y transportaba el gen para IL-12. Este procedimiento presentó baja toxicidad, demostró ser más eficiente que el quitosano sin modificaciones y se suprimió el crecimiento tumoral en el modelo murino usado, no obstante, su eficiencia de transfección es menor a los métodos de transfección virales [56].

En tercer lugar, se encuentran las micropartículas biodegradables que generalmente se componen de polímeros como el ácido poliláctico (PLA) o polieterimida (PEI). Estas pueden ser eliminadas fácilmente por el organismo, por lo que se disminuye la posibilidad de citotoxicidad. Además, estas micropartículas no se fusionan con núcleo de la célula, por lo cual no existen los problemas relacionados con los vectores virales. Las micropartículas de PEI son las más efectivas debido a su facilidad de combinarse con el ADN, de incorporarse con las células y de escapar a la endosoma. No obstante, las investigaciones se han centrado en disminuir su citotoxicidad, debido a que, al aumentar el peso molecular del polímero, aumenta la eficacia de la transfección, pero también aumenta su toxicidad [57]. Recopilando esta información, los métodos no virales mencionados anteriormente tienen como ventaja que no estimulan una respuesta inmune tan fuerte en comparación con los virales y son fáciles de sintetizar y modificar bajo condiciones controladas. No obstante, presentan baja eficiencia al transducir los minigenes, baja expresión proteica y algunos pueden ser altamente tóxicos.

Dentro de los métodos no virales también se encuentra la electroporación, que consiste en usar un pulso eléctrico que debilita las interacciones de la bicapa fosfolipídica de las

células, para abrir un canal por el tiempo necesario para introducir el minigen sin comprometer la integridad de la célula. Estudios han demostrado que usar esta técnica con plásmidos como vectores es confiable y se puede replicar; y usarla con ADN linealizado puede resultar en líneas celulares estables capaces de producir los antígenos. Frente a los otros métodos, éste ha sido ampliamente utilizado en los estudios de inmunoterapia contra el cáncer, puesto que tiene la capacidad de transfectar casi cualquier tipo de células, tiene alta eficiencia, bajos requerimientos para el ADN a transfectar y buena eficiencia de transfección. Sin embargo, no es posible controlar el transporte de las moléculas transfectadas dentro o fuera de las células y puede producir daños irreparables en las células [58].

3.5 Construcción de células presentadoras de antígeno artificiales

En la terapia adoptiva de células y en general en las inmunoterapias que se basan en la activación inmune es indispensable el rol de las APCs profesionales, éstas son las encargadas de activar y estimular la respuesta específica de los linfocitos T. La eficacia de estimulación de LT lograda con los distintos tipos de APCs no es la misma. Por ejemplo, las APCs profesionales, como las células dendríticas, los macrófagos y los linfocitos B, además de expresar moléculas MHC, deben expresar una serie de moléculas coestimuladoras en su superficie que favorecen la producción de citoquinas y potencian la capacidad de estimulación de LT. Si la estimulación no es óptima, los LT podrían entrar en un estado de anergia o un estado de no respuesta al antígeno que interfiere con la funcionalidad efectora esperada [59].

Para diferentes tipos de inmunoterapia se emplean APCs profesionales, pero el aislamiento, producción y expansión de estas células es un procedimiento dispendioso y costoso. La sobre estimulación de los LT puede llevar a la diferenciación terminal de estas células, aspecto que es poco deseado en la inmunoterapia dada la baja funcionalidad efectora y su alta propensión a la muerte. Considerando esto, los investigadores han diseñado células presentadoras de antígeno artificiales (aAPCs) en las que se trata de que haya un control óptimo de la señal presentada [60].

Las aAPCs se construyen utilizando como base una línea celular y el uso de micro/nano partículas construidas con biomateriales [61]. Es muy importante que las aAPCs no induzcan una respuesta alogénica a los LT por lo que las células base que se empleen no deben expresar ninguna clase de moléculas HLA clase I ni clase II. Además de esto, es indispensable que las aAPCs sean fácilmente manipulables genéticamente y que su expresión sea estable para que la activación de LT sea uniforme a través del tiempo. Finalmente, las células o biomateriales a utilizar no deben ser tóxicos o dañinos de alguna manera para el paciente.

Las aAPCs pueden ser modificadas para expresar moléculas de MHC de clase I y II, moléculas coestimuladoras como CD80, CD83, CD86, CD137L y CD70 [62]. Adicionalmente, las aAPCs pueden ser transfectadas o pulsadas con los antígenos de interés para que actúen como presentadoras profesionales y activen de manera óptima la respuesta antígeno específica de los LT [60].

La línea celular más utilizada como aAPCs es la K562, esta fue la primera línea celular humana de leucemia mielógena establecida. Estas son células linfoblásticas aisladas de la médula ósea de un paciente de 53 años [63]. La línea celular K562 no expresa moléculas de MHC clase I ni clase II y tampoco moléculas coestimuladoras, pero sí expresan moléculas de adhesión como ICAM-1 y LFA-3 que juegan un papel importante en la interacción LT-APC y expresan B-2 microglobulina que permite la expresión estable del MHC clase I. Además, estas células no expresan moléculas inhibitorias como PD-L1 y PD-L2 ni secretan citoquinas proinflamatorias como IL-12 e IFN- γ [60].

Estas células son genéticamente modificables de manera sencilla utilizando vectores lentivirales o electroporación para incorporar moléculas de HLA y coestimuladoras. Butler, Hirano y colaboradores modificaron estas células para que expresaran HLA-A*02:01, CD80 y CD83 llamándose clon 33, estas lograron expandir LT CD8+ específicos para MART-1 en donantes sanos y en pacientes con melanoma metastásico de manera muy similar a la expansión que estimularon las DCs autólogas. Además de esto, lograron mantener LT CD8+ antígeno específicos durante un año y medio *in vitro* sin expresión de marcadores de agotamiento [64].

A pesar del gran potencial de estas células, no se han utilizado con frecuencia por ser producto de una línea celular maligna. Sin embargo, tiene un alto potencial gracias a que son fácilmente modificables genéticamente, puede servir como plataforma para combinar otros tratamientos y sus resultados son reproducibles [63].

Por su parte, las células HEK293 (Human Embryonic Kidney 293 cells) fueron derivadas de células embrionarias primarias de riñón modificadas con el ADN de un adenovirus tipo 5 [65]. Estas células han sido ampliamente utilizadas en distintos ensayos gracias a su versatilidad, facilidad de cultivo y modificación genética. Estas células expresan moléculas MHC de clase I y II a diferencia de las K562. Por esta razón, al ser utilizadas como aAPCs se silencian los genes que codifican para estas moléculas para evitar una activación policlonal de linfocitos T [66].

Las HEK293, al igual que las K562, permiten ser modificadas genéticamente de manera sencilla, por lo que el grupo de Mark N. Lee en el 2021 transduce a las células para que expresen anticuerpos anti-citoquinas secretadas por LT, moléculas de HLA clase I y II y un pool de neoepítopes. A partir de esto, ellos logran identificar epítopes inmunogénicas del pool de péptidos y, además, logran identificar las epítopes de TCRs huérfanos, escalando así, la identificación de antígenos inmunogénicos a un nivel mayor con un menor costo [67]. No obstante, las HEK293 no han sido utilizadas en contextos más amplios debido a la complejidad que implica el silenciamiento de genes. En la tabla suplementaria 2 se evidencia una búsqueda bibliográfica que se realizó para el desarrollo de este proyecto, en donde se utilizan células HEK293 o células K562 para la identificación de LT-CD8+ antígeno-específicos.

3.6 Genes reporteros

Un gen reportero es un gen no endógeno que codifica para una enzima o una proteína fluorescente y se expresa gracias a la acción de un promotor que va a iniciar la transcripción del gen de interés [68]. Estos permiten detectar o medir la expresión de genes contiguos. Los más utilizados son el gen lacZ y la proteína GFP. El gen lacZ, proveniente de *E. coli*, se emplea para examinar patrones espaciales de expresión génica de un promotor. Este gen codifica para la Beta-galactosidasa, la cual cataliza el

clivaje de la lactosa para formar galactosa y glucosa. Su detección se puede hacer *in vitro* o *in vivo* cultivando las células en un medio con X-gal; si este gen se transcribe, la Beta-galactosidasa hidrolizará el X-gal y se evidenciará una tinción azul en el medio, lo que se interpreta como una expresión positiva [69]. Por su parte, la GFP es una proteína de 238 aminoácidos que por su naturaleza fluorescente emite una longitud de onda específica que puede ser detectada por luz UV a 365 nM, microscopios de fluorescencia o citometría de flujo. Esta proteína es estable y se ha convertido en el gen reportero más usado porque no requiere transformación bioquímica o el uso de radiación para visualizarlo, además, se ha reportado que, con un promotor adecuado, ésta se puede expresar en un tejido o en una célula. Con el uso de este gen, se puede monitorear procesos bioquímicos y fisiológicos *in vivo* en tiempo real [70-72].

3.7 Respuesta citotóxica de LT-CD8+

Los linfocitos T CD8+ (LT-CD8+) juegan un rol fundamental en la respuesta inmune adaptativa, por lo que las investigaciones sobre todo en la terapia adoptiva de células se han centrado en la expansión de poblaciones de LT-CD8+ para amplificar la magnitud de la respuesta y optimizar la presentación de antígenos para mejorar la calidad de la respuesta [73]. La magnitud de la respuesta se puede monitorear de forma directa por la tecnología basada en multímeros [74, 75] o de forma indirecta evaluando la funcionalidad de los LT mediante la producción de una o más citoquinas proinflamatorias como Interferón gamma (IFN- γ) y factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α); o la expresión de marcadores de activación como CD69, CD137 y CD25 [76].

Para realizar la evaluación *in vitro* de estas características de los LT-CD8+ se necesita imitar el proceso de presentación. Para esto, se han detectado varias citoquinas que afectan el desarrollo de los linfocitos T *in vitro*, como por ejemplo la IL-2, IL-7, IL15 e IL-21, todas estas hacen parte de la familia de las citoquinas de la familia γ y común y se sabe que juegan un papel fundamental en la proliferación, tiempo de vida media y función efectora de los LT [77, 78]. La más utilizada ha sido IL-2 pues se ha encontrado que, a diferencia de las demás citoquinas, juega un papel muy importante en el mantenimiento de los linfocitos T reguladores [79]. La IL-7 ayuda a mediar la

homeostasis de los LT naive y de memoria y la IL-15 apoya el mantenimiento del fenotipo de memoria en los LT-CD8+ [80]. Por su parte la IL-21 se sabe que está involucrada con la función no solo de los LT, pero también de los LB y las células NK [81].

Los linfocitos T CD8+ (LT-CD8+) Naive (LTN) son los precursores de los subset de memoria de los LT. Fenotípicamente estos LT expresan marcadores como CD45RA, CCR7 y CD62L y no expresan marcadores de activación como CD25, CD49, CD45RO o HLA-DR. Estas se caracterizan por tener un metabolismo bajo y ser incapaces de producir citoquinas proinflamatorias. Los LTN migran a los órganos linfoides secundarios para interactuar con las células dendríticas (DCs), activados en la paracorteza de los tejidos linfoides secundarios por las células dendríticas (DCs), acompañado de señales coestimuladoras. Para esto, las DCs activadas presentan un péptido en el complejo del MHC-I que va a ser reconocido por el TCR del LT-CD8+ [82].

Dentro de las señales coestimuladoras se encuentra CD80, esta es una glicoproteína transmembranal de tipo 1, uno de sus ligandos es CD28 que hace parte de la señal 2 para la activación de LT. Su señalización es vital para el desarrollo de la respuesta de LT [83]. Esta molécula ha sido encontrada en la superficie de células presentadoras de antígeno profesionales como DCs y LB activados [84]. Otra molécula coestimuladora importante es CD83, esta hace parte de la superfamilia de las inmunoglobulinas y se puede encontrar en la membrana de mDCs principalmente. Tiene como rol la regulación de la maduración, la activación de otras células inmunes y la homeostasis [85]. Este marcador ha sido utilizado canónicamente para identificar DCs maduras/activadas, aunque también se ha documentado su presencia en macrófagos, células NK, neutrófilos y linfocitos B [85]. No se conoce mucho del ligando de CD83, sin embargo, se sabe que este enriquece y amplifica el número de LT-CD8+ naive y permite estimular funciones citotóxicas [86].

CD137L, es otra molécula coestimuladora que hace parte de la superfamilia de los receptores del factor de necrosis tumoral (TNF), es el ligando de CD137 y su interacción lleva a la activación de NFκB. Su función se relaciona con la coestimulación de la activación de LT-CD4+ y LT-CD8+, esta es igual de potente que el que se presenta con

CD28:CD80/86 para inducir producción de IL-2 [87]. Además, propicia un ambiente anti apoptótico que permite mantener una respuesta inmune por más tiempo. Particularmente en LT-CD8+ se sabe que este sistema aumenta la proliferación, la producción de IFN- γ , su función citotóxica y supervivencia [88]. Su expresión es inducible y se encuentra en diferentes tipos de ACPs, incluyendo macrófagos, linfocitos B y DCs. La señal CD137/CD137L es importante sobre todo cuando hay una activación potente del TCR [89].

3.8 Inmunofenotipo de LT-CD8+ activados

La activación de los LT es una cascada de eventos que desencadena en la expresión de receptores de citoquinas, secreción de citoquinas intracelulares y la expresión de moléculas en su superficie que ayudan a dirigir la respuesta inmune en diferentes direcciones. La medición de estos marcadores de superficie permite evaluar su funcionalidad y monitorear la respuesta específica a antígenos de interés en el desarrollo de inmunoterapias.

Dentro de los marcadores utilizados para medir activación de los LT se encuentra CD154, (también conocido como CD40L). CD154 es una glicoproteína de membrana tipo II miembro de la familia TNF, se ha documentado su presencia en linfocitos T CD4 activados, en monocitos, en natural killers (NK), en basófilos, algunas DCs y en LT-CD8 activados en un tiempo de 6 a 12 horas de estímulo [90]. Su función está muy relacionada a activar y estimular una respuesta humoral por parte de linfocitos B puesto que su receptor (CD40) se encuentra en la superficie de estas células [91]. CD40 también se encuentran en APCs profesionales con las DCs y el sistema CD154:CD40 es una potente señal de maduración y producción de IL-2. Adicionalmente, se ha reportado que la expresión de este marcador juega un papel importante en la expansión de LT-CD8+ en respuesta a antígenos virales [92].

Otro marcador de activación que se utiliza es CD137 (4-1BB), este es un miembro de la superfamilia de los receptores de TNF que se ha demostrado que se encuentra en la superficie de LT-CD4+ y LT-CD8+ activados al igual que en los LT- $\gamma\delta$ + luego de 16-24 horas de estimulación [93]. El CD137 funciona como molécula co-estimuladora

promoviendo la proliferación de LT activados [94]. Se sabe que su expresión se da en LT que ya han sido expuestos a la señal 1 (TRC-MHC) y se beneficia de la señal 2 (CD28-CD80/86) para aumentar su expresión. El sistema CD137/CD137L provee señales anti-apoptosis, de proliferación y secreción de citoquinas. Este se encuentra relacionado sobre todo con LT citotóxicos antivirales [95].

CD25, marcador correspondiente a la cadena alfa del receptor de alta afinidad de la IL-2 es considerado uno de los marcadores de activación más importante [96]. Su función se relaciona con la respuesta a IL-2, por lo que estimula la activación de LT CD8 y producción de IL-2 [96]. Se expresa en la superficie linfocitos T activados en donde estimula la capacidad citotóxica, la producción de IL-2 y la diferenciación de LT-CD4 TH1. También se expresa en la superficie de LT-CD4 reguladores pues este marcador ayuda a mantener la homeostasis en la respuesta inflamatoria [96, 97]. Se sabe, además, que se expresa a las 24 horas de la señal 1 y se mantiene por algunos días [98].

CD69 es un marcador de activación temprano, este es una glicoproteína transmembranal tipo II con un dominio de lectina tipo C en la porción extracelular de la molécula. Se puede encontrar de manera constitutiva en la superficie de monocitos, plaquetas y células epiteliales de Langerhans, y se puede inducir su expresión en linfocitos T, B, células NK, macrófagos y eosinófilos [99]. Este es catalogado como un marcador de activación de LT temprano, debido a que su expresión puede ser detectada entre 3 a 14 horas después de la activación luego de la unión TCR/CD3. Su función se ha asociado con un efecto regulador complejo de la respuesta inmune, pues se ha demostrado que afecta la diferenciación celular, la síntesis de citoquinas y modula la respuesta inflamatoria [100]. Un aspecto importante es que este se ha asociado con una estimulación mitogénica policlonal luego de la activación del TCR/CD3 [101]. También se ha asociado con regulación de la respuesta inmune, pues se ha reportado su expresión en linfocitos T CD8 y CD4 naive y LT reguladores [102].

Otro marcador de activación importante es OX40 (CD134), este es miembro de la superfamilia de TNF y se expresa en LT-CD8+ y CD4+ activados [103]. Cuando se une con su ligando OX40L pueden promover la división y supervivencia de los LT, además de

aumentar la expansión clonal de poblaciones de memoria o efectoras y suprimir la diferenciación y actividad de las células T reguladoras [104]. El pico de expresión de OX40 va de 24 horas a 4-5 días después de la estimulación inicial [105]. La interacción de CD28:CD80/CD86 determina la inducción de CD40L, como se mencionó anteriormente, y también se ve involucrada en la señalización de la expresión de OX40L [105, 106].

Además de estos marcadores, la activación de los LT desencadena la expresión de marcadores de agotamiento como el marcador de muerte celular programada-1 (PD-1). Este es un punto de control inmunológico que regula a la baja la actividad de los LT durante una respuesta inmunológica para prevenir una respuesta sostenida en el tiempo, que ocasione daño en el tejido y problemas autoinmunes [107]. La unión a su receptor PD-L1 o PD-L2 inhibe la proliferación celular, la producción de IFN- γ , TNF α y de IL-2 [108].

Otro marcador de agotamiento importante es el antígeno 4 asociado a linfocitos T citotóxicos (CTLA-4), este también se considera un punto de control inmunológico que tiene la misma función que se describió para PD-1. Este es un homólogo de CD28 por lo que se une a CD80/86 con una afinidad 20 veces mayor que CD28 y si la proporción de CTLA-4:CD80/86 es mayor que CD28:CD80/86 se encarga de inhibir la proliferación interrumpiendo la señalización del TCR [109, 110]. En células en reposo CTLA-4 se encuentra en el compartimiento intracelular y la señal CD28:CD80/86 resulta en la regulación al alza de este marcador en la superficie celular [111].

LAG-3 (CD223) es otro marcador de agotamiento que se expresa en la superficie de LT activados, en células NK, en linfocitos B y DCs [112]. Este marcador interactúa con el MHC-II y al igual que los otros dos marcadores de agotamiento, este tiene como función regular la homeóstasis de la proliferación y activación de LT CD8, así como la respuesta in vivo a los superantígenos [113].

4. Objetivos

4.1 General

Evaluar la inmunogenicidad para linfocitos T de epítopes transfectados en forma de minigenes a células presentadoras de antígeno.

4.2 Específicos

1. Estandarizar e implementar distintos sistemas de transfección de minigenes a células presentadoras de antígeno.
2. Evaluar la eficacia de procesamiento y presentación a los linfocitos T de epítopes CD8 codificados en minigenes.

5. Metodología

En la figura 1 se presenta el diagrama de flujo de la metodología y posteriormente las actividades detalladas por objetivo.

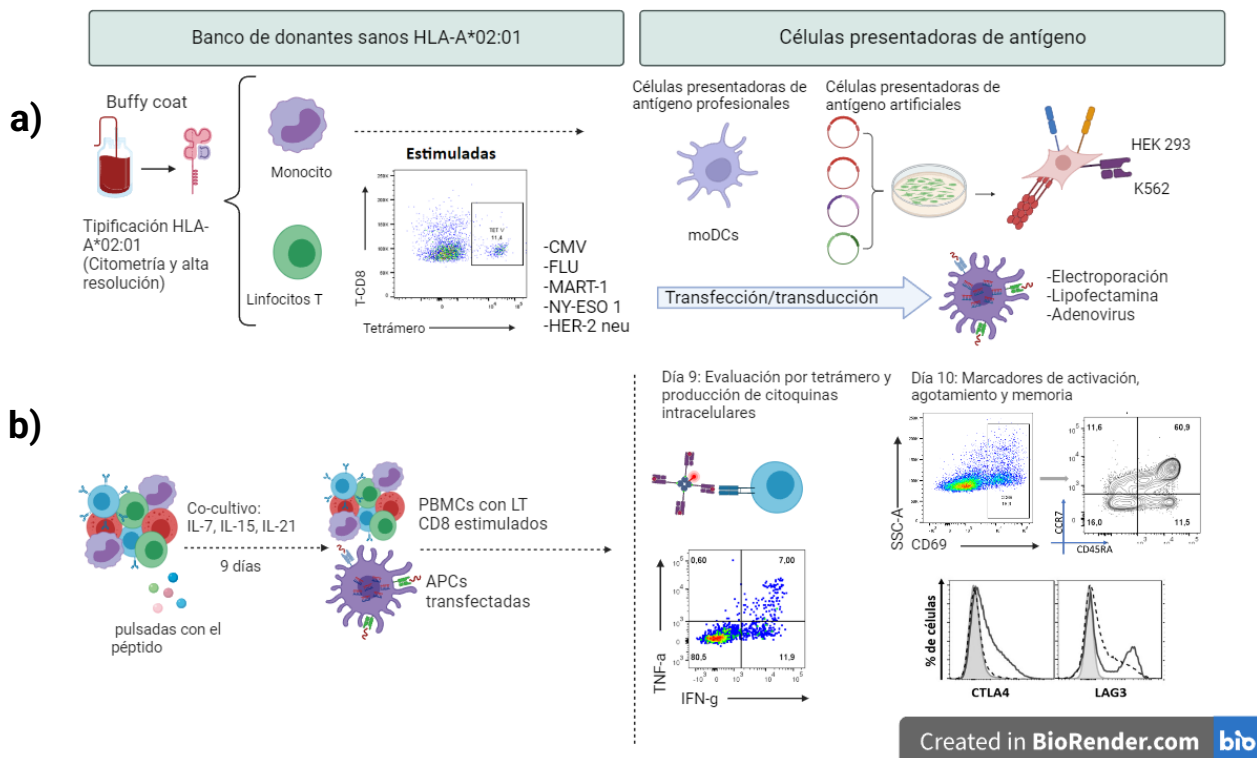


Figura 1 Diagrama de la metodología detallada. Esquema de la metodología del a) objetivo específico 1 en donde se construyó un banco de donantes HLA-A*02:01 para identificar cuales tenían

LTCD8+ precursores para los antígenos presentes en el minigen; y se construyeron APCs y aAPCs transfectadas/transducidos con el minigen. En el b) objetivo específico 2 se comprobó la capacidad de las APCs y aAPCs de estimular una respuesta antígeno específica de LTCD8+

5.1 Objetivo 1: Implementar distintos sistemas de transfección de minigenes a células presentadoras de antígeno.

Actividad 1: Diseño de minigenes y selección de los vectores

Se realizó una búsqueda en la literatura para seleccionar antígenos altamente estudiados y se seleccionaron aquellos antígenos que son HLA*A:0201 y que en la literatura reportaron una buena inmunogenicidad. De estos antígenos, se seleccionaron 6 virales o tumorales que van a ser distribuidos en el constructo: FLU⁽⁵⁸⁻⁶⁶⁾, CMV⁽⁴⁹⁵⁻⁵⁰³⁾, Mart-1⁽²⁶⁻³⁵⁾, NY-ESO⁽¹⁵⁷⁻¹⁶⁵⁾, Her2-neu^(369-377/435-443).

Además de los antígenos, en el constructo se agregó una secuencia de espaciadores que es reconocida por proteínas como la furin proteasa que separen un antígeno del otro para que pudieran ser hidrolizados correctamente [8]. Cuando se tuvo el diseño del constructo, se realizó una optimización de codón con el software EMBOSS Backtranseq, se analizó con el programa ProP 1.0 para determinar el orden óptimo de los antígenos que maximiza la probabilidad de que la furin proteasa reconozca el espaciador y lo hidrolice específicamente. Seguido a esto, se analizó con el programa Addgene's Sequence Analyzer para determinar qué sitios de restricción estaban presentes en la secuencia del minigen. Finalmente, en los extremos del minigen se posicionaron las secuencias de restricción de las enzimas BamHI y XbaI para poder clonar el constructo.

Por otro lado, se seleccionaron los vectores para ser usados en los diferentes métodos de transfección de células presentadoras de antígeno. Para esto, se identificaron vectores que contienen un origen de replicación acorde con las células en las que se va a insertar dicho vector, en este caso, para la lipofectamina y la electroporación se necesita que éste tenga un origen de replicación bacteriano para multiplicar el vector y un origen de replicación eucariótico para que se pueda replicar al ser insertado en las APCs. Además de esto, el vector debía tener un marcador de selección para discriminar aquellas bacterias que han logrado internalizar el plásmido de las que no, como un gen

de resistencia a un antibiótico. De la misma manera, es importante que contenga una secuencia de poliadenilación y un promotor debido a que estos confieren las características necesarias para que el transcrito se asemeje al ARN maduro de la APC.

De igual manera, el plásmido debe incluir los mismos sitios de corte de enzimas de restricción que el minigen para insertarlo de manera específica y en la dirección correcta. En este caso, fue importante que las enzimas de restricción seleccionadas tuvieran solo un sitio de corte en el plásmido y ninguno en el minigen, para evitar que los péptidos se hidrolizaran en lugares no deseados. Finalmente, este plásmido debe incluir “enhancers” que son secuencias que aumentan la tasa de transcripción y expresión de las proteínas. El vector seleccionado fue el pcDNA 3.1-N-eGFP y su mapa se muestra en la figura suplementaria 12.

Actividad 2: Amplificación de los plásmidos

Se realizó una transformación bacteriana con la cepa *E. coli* JM109, las bacterias se sometieron a un choque térmico para que la membrana sea más permeable al ingreso de los plásmidos. Después, se sembraron en agar LB con ampicilina e incubaron por 24 horas para seleccionar las colonias que crecieron en este medio selectivo pues esto significa que el plásmido ingresó a las bacterias. Las colonias obtenidas se pasaron a agar LB con ampicilina nuevamente para aislarlas e incubarlas por 24 horas más. Finalizado este tiempo, se inocularon en medio LB ON (Over Night) para almacenarlas en glicerol al 30% a -80°C para tener una reserva de bacterias productoras del plásmido.

Actividad 3: Extracción de ADN plasmídico

Para la extracción del material genético se utilizó el kit QIAprep Miniprep de Qiagen. Brevemente, se emplearon columnas de sílice en presencia de altas concentraciones de sal; por estas columnas se pasó el lisado celular para que el ADN quede atrapado en esta columna y las proteínas y demás compuestos se descartan en lo que fluye a través de la columna. Luego de esto, se eluyó con buffer Tris o con agua libre de DNAsas el ADN plasmídico.

Actividad 4: Clonación del minigen en el vector pcDNA 3.1-N-eGFP

Para insertar el minigen dentro del plásmido pcDNA 3.1-N-eGFP se utilizaron las enzimas de restricción BamHI y XbaI (New England Biolabs), la cuales tiene un sitio de reconocimiento en los extremos del minigen y en el sitio múltiple de clonación del plásmido para que se formen extremos cohesivos. Luego se realizó la digestión del minigen y del plásmido por aparte, durante 4 horas con las dos enzimas a 37°C y se inactivaron las enzimas durante 20 minutos a 80°C. Luego de esto, se llevó a cabo la ligación con la ADN ligasa T4 (Invitrogen) durante 1 hora a temperatura ambiente y se corroboró su inserción por medio de PCR utilizando un cebador directo que anilla a una sección del plásmido y un cebador reverso que va a anillar al final del minigen. Se realizó otra PCR con un cebador directo que anilla al inicio del minigen y un cebador reverso que va a anillar a una sección del plásmido que se encuentra posterior al minigen. De esta manera, se corroboró que el minigen se insertó en el plásmido en la orientación correcta.

Actividad 5: Producción de células dendríticas maduras derivadas de monocitos

La obtención de monocitos a partir de buffy coat se realizó por medio de una selección negativa utilizando el kit RosetteSep™ (STEMCELL™ Technologies) como se describe en la actividad 3 del objetivo 2. Para la derivación, se cultivaron los monocitos en una concentración de 200.000 células/pozo en placa de 96 pozos fondo U en medio AIM-V suplementado con 800 U/mL de GM-CSF y 40 U/mL de IL-4 (CellGenix®) y esto se incubó a 37°C por 48 horas. A continuación, se adicionó medio AIM-V nuevo suplementado con 800 U/mL de GM-CSF y 40 U/mL de IL-4 por 48 horas más. Finalmente, se añadió medio AIM-V nuevo suplementado con IFN- γ y LPS para inducir la maduración y se incubó por 24-48 horas a 37°C.

Actividad 6: Estimulación de células dendríticas derivadas de monocitos con diferentes formulaciones del antígeno

Para estimular mDCs con diferentes formulaciones del antígeno, éstas se cultivaron en placa de 96 pozos con medio AIM-V como se menciona en la actividad anterior. Los antígenos se incorporaron al medio de cultivo de acuerdo con el siguiente protocolo: el péptido corto (10 μ g/mL) se añadió dos horas después de iniciar el estímulo de maduración; en cambio, tanto el péptido largo (20 μ g/mL) como la proteína

recombinante (30 µg/mL) se incorporaron 24 horas antes de la aplicación del estímulo de maduración. Como control negativo un cultivo de mDCs no fueron expuestas a ningún formato del antígeno. En los ensayos específicos, se emplearon péptidos cortos, péptidos largos y proteínas recombinantes correspondientes a los antígenos pp65 de CMV y MART1, según se detalla en cada experimento. En la tabla 1 se presentan las secuencias de los péptidos cortos y largos utilizados.

Tabla 1. Secuencias de péptidos largos y péptidos cortos utilizados en los ensayos inmunológicos

Antígeno	Secuencia péptido corto ¹	Secuencia péptido largo ²
CMV pp65	NLVPMVATV ₄₉₅₋₅₀₃	LARNLVPMVATVQQG ₄₉₂₋₅₀₆ [114]
MART-1	ELAGIGILTV ₂₆₋₃₅	GHGHSYTTAEELAGIGILTVILGVL ₁₆₋₄₀ [115]

¹Fabricados por la compañía 21st century Biochemicals (USA)

²Fabricados por la fundación Salud de los Andes

Las proteínas completas utilizadas para estimular las DCs fueron:

- Recombinant Cytomegalovirus pp65 full length protein (Abcam Cat # ab43041) – 63kDa
- Recombinant Human MelanA protein (Abcam Cat # ab114312) – 39kDa

Actividad 7: Transfección del minigen a células presentadoras de antígeno mediante electroporación

Para realizar la transfección del minigen mediante electroporación, se utilizó el vector pcDNA 3.1-N-eGFP para clonarlo, ya que este cumplió las características mencionadas con anterioridad. Para llevar a cabo este ensayo, se siguió el protocolo de Van Camp, K et al con pequeñas modificaciones [58]. Brevemente, se descongelaron las PBMCs y se realizaron dos lavados con PBS, seguido por un lavado con OptiMEM, luego de los lavados, se resuspendieron las células en una concentración de 5-20x10⁶ en 200 µL de OptiMEM (Gibco). Luego de esto, se adicionó 1µg de ADN por 10⁶ PBMCs y se realizó la electroporación en el electroporador GenePulse Xcell. Para esto, se transfirieron 100 µL de la solución a cubetas de electroporación de 2 mm (Biorad), con un pulso de onda cuadrada a 500V durante 5 ms. Pasado este tiempo, las PBMCs se resuspendieron en

medio AIM-V (Gibco) suplementado con HEPES (25mM), gentamicina (10 mg/L) y anfotericina B (1 mg/L); y se incubaron a 37°C en una atmosfera húmeda suplementada con 5% de CO₂. Para el control negativo, no se adicionó ADN a las células.

Actividad 8: Transfección del minigen a células presentadoras de antígeno mediante lipofectamina

Otro sistema de transfección que se utilizó fueron los lípidos catiónicos, los cuales se unen a las proteínas de superficie de la membrana celular y activan la cascada de señalización que resulta en endocitosis. Para realizar la transfección, se utilizó la lipofectamina 3000 de Invitrogen. Se cultivaron las APCs con una confluencia del 70-90% en placas de 24 o 48 pozos. En un tubo de polipropileno de 1,5 ml (Eppendorf) se diluyó 3 µL o 1,5 µL de lipofectamina en 50 µL o 25 µL de medio OptiMEM. En otro tubo, se realizó la dilución de 2 µg o 1,5 µg de ADN y 3 µL o 1,5 µL del reactivo p3000 contenido en el kit en 50 µL o 25 µL de medio OptiMEM y esto se mezcló con la anterior dilución 1:1. Esta solución se incubó durante 30 minutos y se adicionó el complejo lipídico-ADN en los pozos.

Actividad 9: Transducción del minigen a células presentadoras de antígeno mediante adenovirus

Para este método de transducción se utilizó el vector adenoviral Ad5.RGD. CMV.minigene-6xHis.CMVeGFP (Ad5.RGD en adelante) construido en la Universidad de Washington. El vector se encontraba en un título de $5,5 \times 10^8$ pfu/µL y para ser empleado fue diluido en AIM-V para utilizar una multiplicidad de infección de 8. Luego de esto, se agregó a las células y se dejó en incubación en condiciones normales de cultivo durante 8 horas. Pasado este tiempo se retiró el medio, se agregó medio fresco y se devolvió a incubación para completar 24 horas.

Actividad 10: Construcción de células presentadoras de antígeno artificiales

Las células presentadoras artificiales (aAPCs) se generaron transfectando por lipofectamina las células K562 y células HEK293 con cDNAs que codifican para HLA-A*02:01, para las moléculas cosestimuladoras CD137-L, CD80 y CD83 (Figura suplementaria 15); y con el minigen. Se transfectaron con los mismos parámetros

descritos en la actividad 8. Una vez transfectadas, se corroboró la expresión de la proteína GFP en las células por microscopía de fluorescencia. Adicionalmente, se monitoreo la expresión de las moléculas y de la GFP por citometría de flujo utilizando los anticuerpos anti-HLA-A2-PE, CD80-PE, CD83-APC-Cy7 y CD137L-APC (BioLegend).

Actividad 11: Análisis de las células presentadoras de antígeno transfectadas con minigenes mediante detección del gen reportero GFP

Una vez se transfectó el minigen a las células presentadoras de antígeno, se aprovechó la presencia de la GFP en el constructo para controlar el ingreso del constructo a las 24 horas. Para esto, primero se utilizó un microscopio de fluorescencia para verificar la expresión de la proteína y morfología de las células para luego utilizar citometría de flujo para detectar la intensidad media de fluorescencia de la GFP. La estrategia de *gating* se encuentra en las figuras suplementarias 4 y 5.

Actividad 12: Verificación del procesamiento del minigen mediante la detección de la proteína verde fluorescente

Para verificar que los antígenos codificados en el minigen se transcriben a mRNA y se traducen a proteínas para ser presentados por las APCs se realizó un Western blot. 24 horas después de la transfección de las APCs, se realizó un lisado celular con buffer RIPA 1X con inhibidor de proteasas 1X. Se retiró el medio de las células, se realizó un lavado con PBS a temperatura ambiente y se agregaron 250 µL de buffer RIPA para plato de 24 pozos y 350 µL para plato de 33 mm. Luego de esto se homogenizó con un cell scraper y se transfirió a un tubo de polipropileno de 1,5 mL (eppendorf). Seguido a esto, se sonicó el lisado por 2 segundos 3 veces con amplitud de 50%, incubando durante 1 minuto en hielo entre cada proceso de sonicación (hasta que el lisado no se viera viscoso). Se pasó a incubar en hielo durante 15 minutos y se centrifugó a 13.000 gravedades (g) durante 5 minutos a 4°C. Finalmente, se transfirió el sobrenadante a un tubo eppendorf y se almacenó a -20°C hasta su uso. Luego de esto, se separaron las proteínas del lisado con una electroforesis de SDS-PAGE al 12% y se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa previamente bloqueada para reacciones inespecíficas con una solución de albúmina de suero bovino (BSA) al 5%. Luego se incubó el anticuerpo primario anti-GFP por 2 horas en agitación constante. Inmediatamente después, se

incubó la membrana con el anticuerpo secundario anti-ratón IgG marcado con Peroxidasa de rábano y producido en cabra durante 1 hora en agitación constante, lo que permite determinar si la proteína de fusión GFP-Minigen se encuentra en el citosol y se puede observar si los antígenos son procesados por el peso de la banda resultante.

5.2 Objetivo 2: Demostrar la inmunogenicidad para linfocitos T de epítopes transfectadas con minigenes a células presentadoras de antígeno.

Actividad 1: Aislamiento de PBMCs a partir de buffy coat de donantes sanos

Para el aislamiento de PBMCs de donantes sanos se solicitaron los concentrados leucoplaquetarios (en inglés buffy coat) en el marco del Convenio de cooperación interinstitucional entre la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional de Colombia y el Instituto Distrital de Ciencia, Biotecnología e Innovación en Salud (IDCBIS) (2019), provenientes del hemocentro. Estos representan el excedente del proceso normal de donación de sangre. El concentrado leucoplaquetario se distribuye en tubos de polipropileno de 50 mL que contenían 25 mL de solución salina estéril al 0,9% y se centrifugó a 700 g por 10 minutos, sin freno, este proceso se repitió 3 o 4 veces, con el fin de eliminar el anticoagulante. Las PBMCs fueron aisladas utilizando el reactivo Lymphoprep™ Density Gradient Medium (STEMCELL™ Technologies) que implementa el método de separación por gradiente de densidad. Una vez separadas, se realizó recuento y se evaluó viabilidad celular en cámara de Neubauer utilizando la tinción por azul de tripán. Las células fueron criopreservadas en medio de congelación (RPMI-1640 50%, Suero Fetal Bovino (SFB) 40% y dimetilsulfóxido (DMSO) 10%) y almacenadas a -70°C durante 48 horas. Transcurrido este tiempo, fueron transferidas a tanque de nitrógeno líquido hasta su posterior uso en los ensayos inmunológicos. Las fracciones celulares remanentes se descartaron siguiendo la normativa técnica de disposición de residuos biológicos.

Actividad 2: Tipificación de HLA-A*02:01 y selección de donantes para ensayos inmunológicos

Los Buffy coats procesados fueron sometidos a un tamizaje para el haplotipo HLA-A2 por citometría de flujo. Para esto se tomaron 100 μ L, se agregó el anticuerpo anti-HLA-A2-PE (BioLegend) y se llevó a incubar a 4°C sin luz. Luego se agregó 1 ml del reactivo de lisis celular (BD FACS Lysing solution) diluido, se incubó durante 5 minutos a temperatura ambiente y se lavó con PBS 5% SFB a 700 g por 7 minutos. De cada muestra positiva se tomaron 125 μ L de buffy coat, que fueron depositados en tarjetas Protein Saver 903 Whatman®. Las tarjetas fueron enviadas para tipificación HLA-A de alta resolución (2x Exones 2 y 3) a la compañía Histogenetics LLC. Los donantes portadores del haplotipo HLA-A*02:01 homocigotos o heterocigotos fueron seleccionados para los ensayos inmunológicos.

Actividad 3: Enriquecimiento de monocitos por el método de rosetas

La obtención de monocitos a partir de buffy coat se realizó por medio de una selección negativa utilizando el kit RosetteSep™ (STEMCELL™ Technologies). Este protocolo emplea anticuerpos tetraméricos (TAC) contra células no monocíticas y eritrocitos. Para esto, se incubó el buffy coat con 50 μ L/mL del reactivo y se realizó la separación por gradiente de densidad con el reactivo Lymphoprep™. El porcentaje de pureza de los monocitos aislados fue estimado por citometría de flujo con el marcador CD14-FITC (BioLegend). Las células obtenidas fueron criopreservadas en medio de congelación como se describió previamente.

Actividad 4: Cultivo de 9 días de PBMCs totales para expansión de LT antígeno-específicos de donantes sanos

Con el fin de obtener LT específicos contra los antígenos presentes en el minigen, se tomaron las PBMCs obtenidas de donantes sanos del banco HLA-A*02:01 y se empleó un sistema de cultivo de 9 días utilizando IL-21, IL-7 e IL-15 (CellGenix®) para estimular la expansión de LT-CD8+ antígeno-específicos, esta metodología fue estandarizada en el GI&MT (4, 53).

Para esto, se cultivaron 1×10^6 células/pozo de PBMCs totales en platos de 96 pozos fondo en U en medio AIM-V suplementado con IL-21 al día 0 y pulsadas (estimuladas) o no (no estimuladas) con el péptido. La placa se incubó por 72 h en condiciones

normales de cultivo, y se realizó cambio de medio de cultivo cada 2 o 3 días con AIM-V fresco suplementado con IL-7 e IL-15. Al día 9 las células se evaluaron por citometría de flujo para detectar LT CD8+ antígeno-específicos o fueron utilizadas para la evaluación de producción de citoquinas intracelulares o de expresión de marcadores de activación y agotamiento.

Actividad 5: Identificación de LT antígeno-específicos por citometría de flujo mediante tetrámero

Luego de 9 días de cultivo, las PBMCs fueron recolectadas de la placa de cultivo y lavadas a 700 g durante 7 minutos. Luego fueron marcadas con Zombie Aqua (BioLegend) (1:1000 en PBS) durante 30 minutos a temperatura ambiente. Pasado este tiempo se marcaron durante 15 minutos a 37°C con el tetrámero ensamblado cargado con los antígenos de interés y lavadas a 700 g durante 7 minutos en PBS 2% SFB. Para seleccionar los linfocitos, estos fueron marcados con CD3-PB y CD8- PE-Texas Red, resuspendidos en 100 µL de PBS, y analizados por citometría de flujo. Cada lectura de muestra contó con un mínimo de 30.000 eventos por experimento, utilizando el equipo FACS Aria IIIu y los resultados se analizaron con el software FlowJo v10.0.7 (Treestar Inc). La estrategia de *gating* utilizada se muestra en la figura suplementaria 6.

Actividad 6: Medición de citoquinas intracelulares (ICs) por citometría de flujo producidas por LT-CD8+ presentes en PBMCs de donantes sanos

Las PBMCs de la línea se recolectaron el día 9, se evaluó su viabilidad por azul de tripano y se cocultivaron en una relación 1:1 con: i) PBMCs autólogas re congeladas y estimuladas con el péptido corto del antígeno o PBMCs no estimuladas; ii) células HEK293 transfectadas con Moléculas-GFP-Minigen, células HEK293 transfectadas con GFP-Minigen, células HEK293 transfectadas con GFP y células HEK293 sin transfectar; iii) células K562 transfectadas con Moléculas-GFP-Minigen, células K562 transfectadas con GFP-Minigen, células K562 transfectadas con GFP y células K562 sin transfectar; y iv) mDCs autólogas transfectadas GFP-Minigen, mDCs autólogas transfectadas con GFP y mDCs autólogas sin transfectar.

Las PBMCs presentadoras fueron descongeladas y pulsadas por 16h con los péptidos de interés a una concentración de 10 µg/mL y marcadas con CFSE (dilución 1:5000) o CellTrace™ Far Red (dilución 1:1000), para diferenciarlas de la población de PBMCs derivadas de la línea de 9 días durante la lectura de las muestras por citometría. El cocultivo se estableció en placas de 96 pozos fondo en U, a una densidad de entre 125.000 y 500.000 células, según el número recolectado de la línea.

1,5 horas después de iniciado el cocultivo, se adicionó Brefeldina A 1X (BioLegend) a cada pozo y se incubó la placa por 4,5 h. Pasado este tiempo, las células fueron recolectadas, se marcó viabilidad con Zombie Aqua y marcadores de superficie CD3-PB y CD8-PE-Texas Red (BioLegend). Luego, se fijaron y permeabilizaron las células para la tinción intracelular con el kit IntraStain de Dako, y se marcaron las citoquinas intracelulares con anticuerpos anti-TNF-α-FITC e IFN-γ-PE (BioLegend). En la citometría de flujo se contó con un mínimo de 30.000 eventos por experimento. La estrategia de gating utilizada para el análisis es similar al descrito en la figura suplementaria 7.

Actividad 7: Medición de citoquinas intracelulares (ICs) por citometría de flujo producidas por LT-CD8+ antígeno-específicos

Los clones de LT-CD8+ antígeno-específicos (CMV+, Mart-1+ o NY-ESO-1) fueron descongelados un día antes de ser utilizados para permitir su recuperación ON en medio AIM-V. Al día siguiente, éstos fueron cocultivados en relación 6:1 (células presentadora:clono) con: i) PBMCs autólogas recongeladas y estimuladas con el péptido corto del antígeno o PBMCs no estimuladas y ii) células HEK293 transfectadas con Moléculas-GFP-Minigen, células HEK293 transfectadas con GFP-Minigen, células HEK293 transfectadas con GFP y células HEK293 sin transfectar.

Las PBMCs presentadoras fueron descongeladas y pulsadas por 16h con los péptidos de interés a una concentración de 10 µg/mL y marcadas con CFSE (dilución 1:5000) o CellTrace™ Far Red (dilución 1:1000), para diferenciarlas de la población de PBMCs derivadas de la línea de 9 días durante la lectura de las muestras por citometría. El cocultivo se estableció en placas de 96 pozos fondo en U, a una densidad de entre 125.000 y 500.000 células, según el número recolectado de la línea.

1,5 horas después de iniciado el cocultivo, se adicionó Brefeldina A 1X (BioLegend) a cada pozo y se incubó la placa por 4,5 h. Pasado este tiempo, las células fueron recolectadas, se marcó viabilidad con Zombie Aqua y marcadores de superficie CD3-PB y CD8-PE-Texas Red (BioLegend). Luego, se fijaron y permeabilizaron las células para la tinción intracelular con el kit IntraStain de Dako, y se marcaron las citoquinas intracelulares con anticuerpos anti-TNF- α -FITC e IFN- γ -PE (BioLegend). En la citometría de flujo se contó con un mínimo de 30.000 eventos por experimento. La estrategia de gating utilizada para el análisis es similar al descrito en la figura suplementaria 7.

Actividad 8: Evaluación del fenotipo de activación, memoria y agotamiento producidas por LT-CD8+ presentes en PBMCs de donantes sanos

Las PBMCs de la línea se recolectaron el día 9, se evaluó su viabilidad por azul de tripan y se cocultivaron en una relación 1:1 con: i) PBMCs autólogas re congeladas y estimuladas con el péptido corto del antígeno, PBMCs no estimuladas; ii) células HEK293 transfectadas con Moléculas-GFP-Minigen, células HEK293 transfectadas con GFP-Minigen, células HEK293 transfectadas con GFP y células HEK293 sin transfectar; y iii) células K562 transfectadas con Moléculas-GFP-Minigen, células K562 transfectadas con GFP-Minigen, células K562 transfectadas con GFP y células K562 sin transfectar.

Luego de 24 h de cultivo, las PBMCs se recolectaron, se marcaron con Zombie Aqua para evaluar la viabilidad y para los marcadores de superficie CD3-PB, CD8-PE/Texas-Red, CD137-PE-Cy5, CD25-APC-Cy7, CD69-BV-650, OX40-BV-711, CTLA-4-PE-Cy7, PD-1-PerCP-Cy5.5, LAG-3-BV786, CD62L-AF700, CD45RO-FITC. El marcador CD154-PE se añadió al medio de cultivo en los pozos correspondientes en el momento de establecer el cocultivo. Cada lectura de muestra contó con un mínimo de 30.000 eventos por experimento. La estrategia de gating utilizada para el análisis se observa en la figura suplementaria 8.

Actividad 9: Evaluación del fenotipo de activación, memoria y agotamiento en LT-CD8+ antígeno-específicos

Los clones de LT-CD8+ antígeno-específicos (CMV+, Mart-1+ o NY-ESO-1) fueron descongelados un día antes de ser utilizados para permitir su recuperación ON en

medio AIM-V. Al día siguiente, se evaluó su viabilidad por azul de tripano y se cocultivaron en una relación 6:1 con: i) PBMCs autólogas re congeladas y estimuladas con el péptido corto del antígeno, PBMCs no estimuladas y ii) células HEK293 transfectadas con Moléculas-GFP-Minigen, células HEK293 transfectadas con GFP-Minigen, células HEK293 transfectadas con GFP y células HEK293 sin transfectar.

Luego de 24 h de cultivo, los clones se recolectaron, se marcaron con Zombie Aqua para evaluar la viabilidad y se utilizaron los marcadores de superficie CD3-PB, CD8-PE/Texas-Red, CD137-PE-Cy5, CD25-APC-Cy7, CD69-BV-650, OX40-BV-711, CTLA-4-PE-Cy7, PD-1-PerCP-Cy5.5, LAG-3-BV786, CD62L-AF700, CD45RO-FITC (BioLegend). El marcador CD154-PE (BioLegend) se añadió al medio de cultivo en los pozos correspondientes en el momento de establecer el cocultivo. Cada lectura de muestra contó con un mínimo de 30.000 eventos por experimento. La estrategia de gating utilizada para el análisis se observa en la figura suplementaria 8.

6. Resultados

6.1 Diseño de minigenes y selección de los vectores

Para diseñar el minigen, de acuerdo con lo descrito en la metodología, se optó por un minigen codificante de varios epítopes restringidos para el alelo HLA-A*02:01, cuya inmunogenicidad para LT-CD8+ humanos ha sido ampliamente demostrada. En la tabla 2 se presentan las secuencias de aminoácidos de las epítopes seleccionadas separados por la secuencia de reconocimiento de la furin proteasa y la posición de cada antígeno utilizado en el minigen. El producto final de minigen fue sintetizado en el plásmido pUC-IDT (Integrated DNA Technologies IDT) y en éste, las secuencias de cada epítope se repiten por lo menos una vez. Previo a su síntesis, el constructo fue analizado con el programa ProP.1.0 de la universidad de Dinamarca para identificar el patrón de clivaje de la proteína furin proteasa. En la tabla 2 se señalan los 10 sitios de clivaje, los cuales corresponden exactamente con los lugares en donde se encuentran los espaciadores.

restricción Bam-HI - Xho-I y Bam-HI - Xba-I, como alternativas para la clonación del minigen en el vector pcDNA 3.1-N-eGFP. Las reacciones fueron preparadas por duplicado y el producto de PCR se corrió en un gel de agarosa al 1,5 %. Como se puede observar en la Figura 2, la presencia de una banda del peso esperado (450 pb) confirmó que con la PCR realizada se amplificó exitosamente las secuencias de interés, y dado que las secuencias de reconocimiento de las enzimas de restricción se añadieron en los cebadores, se espera que éstas hubiesen sido incorporadas.

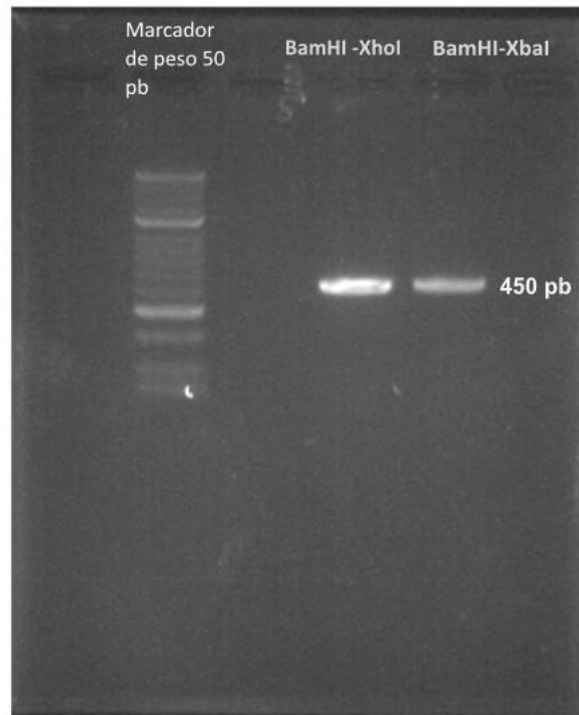


Figura 2 Producto de PCR para insertar sitios de enzimas de restricción. Gel de agarosa al 1,5% en que se evidencia el tamaño del producto de PCR del plásmido pUC-IDT en que fueron incorporados mediante PCR los sitios de restricción de las enzimas Bam-HI en el extremo 5' y Xho-I en el extremo 3' (Bam-HI - Xho-I) y Bam-HI en el extremo 5' y Xba-I en el extremo 3' (Bam-HI - Xba-I) (líneas BamHI- XhoI y BamHI-XbaI de la figura). Se utilizó el marcador de peso "Hyper Ladder" (Bioline) de 50 pares de bases que cubre un rango de peso de 2000 a 50 pares de bases.

Posteriormente, para insertar la secuencia del minigen en el plásmido pcDNA 3.1-N-eGFP, se realizó la digestión del producto de PCR y la digestión del plásmido con cada una de las dos combinaciones de enzimas seleccionadas para ser ligados en un paso posterior. Antes de la ligación se realizó un gel de agarosa para corroborar la integridad de los vectores y productos de PCR. Se encontró que el plásmido que se digirió con las enzimas Bam-HI - Xho-I resultó en la presencia de 7 bandas, mientras que el plásmido

digerido con las enzimas Bam-HI - Xba-I sólo resultó con una banda. Se observó también que el producto de PCR flanqueado con el sitio de reconocimiento de las enzimas Bam-HI - Xho-I y el producto de PCR flanqueado por los sitios de reconocimiento de las enzimas Bam-HI - Xba-I solo arrojaron una banda (Figura suplementaria 1). Por este motivo, se continuó la ligación del minigen partiendo del segundo producto de digestión, ya que con éste se mantuvo la integridad del vector posterior al clivaje enzimático.

La ligación se llevó a cabo con la enzima T4 ligasa (Invitrogen) en donde se incubó durante 15 minutos a temperatura ambiente el vector linearizado con el producto de PCR digerido con las enzimas Bam-HI y Xba-I en dos proporciones diferentes 4:1 y 6:1 (producto de PCR:plásmido receptor), junto con la enzima.

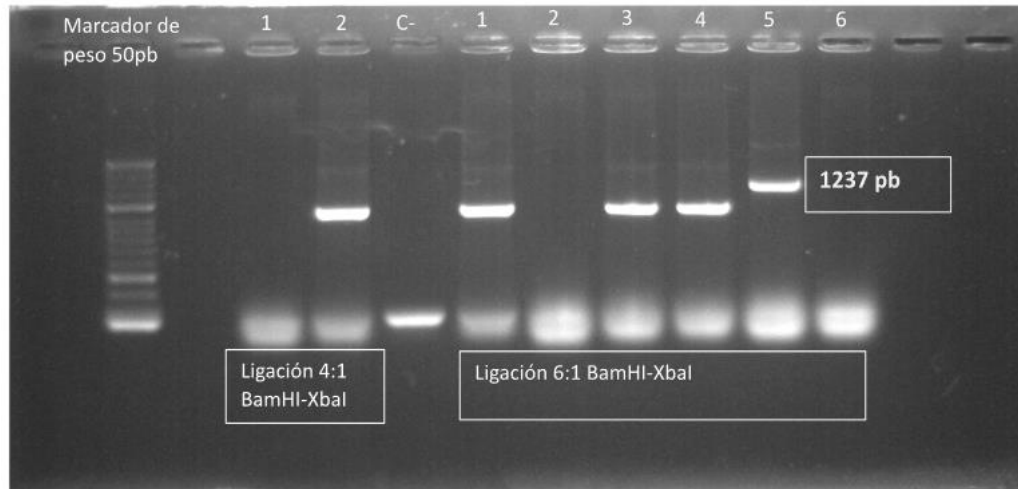


Figura 3 Producto de PCR de colonia luego de transformar JM109 con el plásmido pcDNA.3.1 -N-eGFP-minigen. Gel de agarosa al 1,5% de los productos de PCR de colonia del plásmido pcDNA.3.1 -N-eGFP ligado en dos diferentes proporciones (4:1 y 6:1 producto de PCR:plásmido receptor) con la digestión Bam-HI – XbaI. Se utilizó el marcado de peso de 50 pb que comprende pesos desde 2000 a 50 pb.

Para la amplificación del plásmido resultante, células JM109 competentes fueron transformadas con 5 μ L del producto de ligación seleccionado, utilizando dos proporciones distintas de ligación inserto: vector (4:1 y 6:1). Después de 24 horas del cultivo bacteriano, se cosecharon aquellas colonias que crecieron visiblemente sin colonias satélite. Para la PCR de colonias recombinantes, se partió con tan sólo dos colonias en el caso de la proporción 4:1, mientras que de los cultivos con la proporción

6:1 se encontraron seis. Como se observa en la Figura 3, de las colonias que crecieron con la primera proporción inserto: vector, en ninguna se obtuvo la banda del peso esperado. En contraste, para una de las seis colonias resultantes de la transformación con la proporción 6:1 se encontró la banda con peso esperado (1237 pb) para el constructo final vector-minigen. Por esta razón, esta colonia fue seleccionada como base para la amplificación y purificación del plásmido recombinante que contenía el minigen. Por último, para corroborar la presencia del minigen en el plásmido se realizó la digestión del vector con la enzima de restricción Msc-I. Se seleccionó esta enzima debido a que el plásmido pcDNA 3.1-N-EGFP tiene solo un sitio de reconocimiento de esta enzima (Figura Suplementaria 2), mientras que, el plásmido producto de la ligación pcDNA 3.1-N-EGFP-Minigen tiene dos sitios de reconocimiento enzimático (Figura 4). También se realizó una secuenciación de este plásmido, lo que permitió comprobar con mayor robustez que la secuencia del minigen era la esperada y que, además, éste se encontraba en el marco de lectura esperado (Figura suplementaria 2).

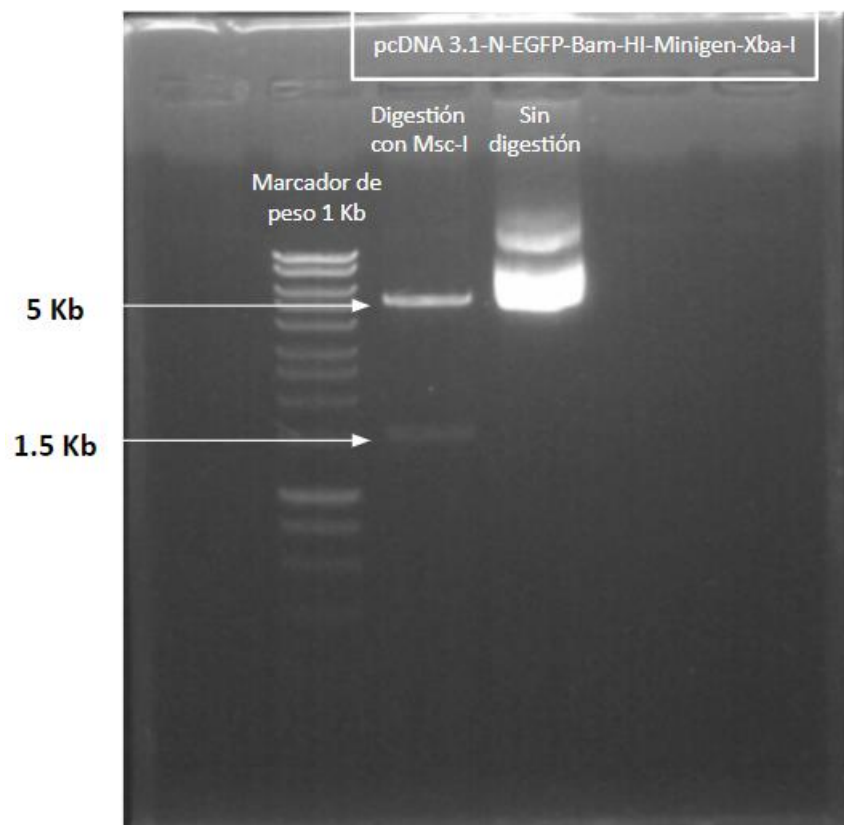


Figura 4 Producto de PCR de colonia luego de transformar JM109 con el plásmido pcDNA.3.1 -N-eGFP-minigen. Gel de agarosa al 1,5% de los productos de PCR de colonia del plásmido

pcDNA.3.1 -N-eGFP ligado en dos diferentes proporciones (4:1 y 6:1 producto de PCR:plásmido receptor) con la digestión Bam-HI – XbaI. Se utilizó el marcado de peso de 50 pb que comprende pesos desde 2000 a 50 pb.

6.2 Estandarización de transfección de DNA en PBMCs y DCs utilizando Lipofectamina

Para la estandarización del uso de lipofectamina como método de transfección de ADN plasmídico, las primeras células presentadoras de antígeno que se utilizaron fueron PBMCs obtenidas a partir de separación por densidades de “*buffy coat*” de donantes sanos. Para esto se tomaron tanto PBMCs criopreservadas en nitrógeno líquido (-140°C), como PBMCs frescas, obtenidas el mismo día de obtención del “*buffy*”. Las PBMCs se transfectaron con el plásmido pcDNA 3.1-N-eGFP, que codifica para la proteína verde fluorescente como control (en adelante llamado GFP). Un día después de la transfección (24 h), se midió por citometría de flujo la Intensidad Media de Fluorescencia (MFI) de GFP con el fin de evidenciar el porcentaje de eficiencia de transfección. Sin embargo, no se encontró diferencia significativa en el MFI entre células transfectadas con el plásmido pcDNA 3.1-N-eGFP con el uso de lipofectamina, células sometidas al tratamiento con solo lipofectamina sin plásmido, y células sin transfectar (Figura 5).

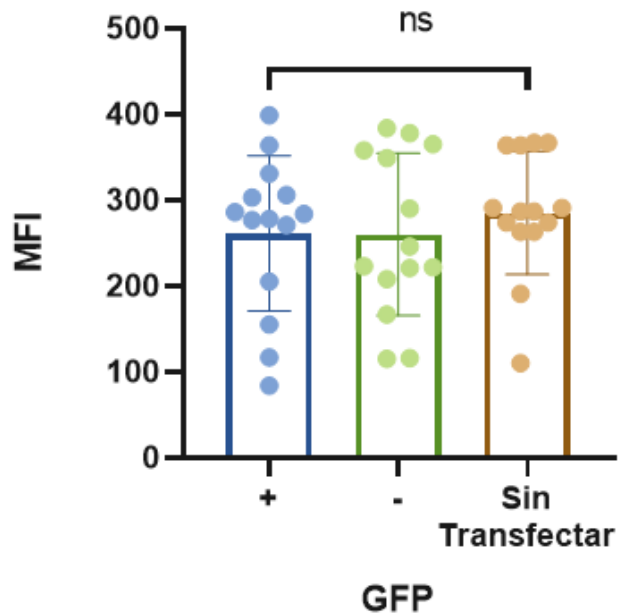


Figura 5 Transfección de PBMCs con Lipofectamina. Diagrama de barras representativo de la Intensidad Media de fluorescencia (MFI) luego de la transfección de PBMCs frescas o criopreservadas (n frescas = 12 y n criopreservadas = 2) con pcDNA 3.1-N-eGFP (GFP+), utilizando lipofectamina y reactivo P3000, esto se comparó con PBMCs transfectadas sin pcDNA 3.1-N-eGFP (GFP-) y células sin transfectar. Cada punto es representativo de una réplica. Las barras corresponden a promedio + SEM, ns = no significativo.

En vista de este resultado, se decidió hacer la transfección del vector en células dendríticas derivadas de monocitos puesto que estas células, al ser presentadoras profesionales, tienen una capacidad de procesamiento antigénico significativamente mayor a la del grueso de las PBMCs, excluyendo a los LB. Partiendo de monocitos de donantes sanos, se derivaron las células dendríticas y se hizo la transfección tanto en DCs inmaduras (iDCs) como DCs maduras (mDCs). Para esto, los monocitos obtenidos de cada donante fueron tratados por cinco días con GM-CSF e IL-4 para obtener iDCs; aquí las iDCs fueron transfectadas en presencia de lipofectamina. Por su lado, para la transfección de las mDCs, concomitante a la lipofectamina y el vector, a las células se les suministró los inductores de la maduración (LPS e IFN- γ).

Pasadas 24 horas de la transfección, el rendimiento de la transfección de iDCs y mDCs se evaluó por citometría de flujo con la medición de la MFI de GFP. Como lo muestra la figura 6, utilizando tanto iDCs como mDCs, tampoco fue posible encontrar diferencias significativas en la expresión de GFP entre células transfectadas y no transfectadas, lo

cual sugiere un deficiente rendimiento de la transfección del plásmido pcDNA 3.1-N-eGFP en DCs cuando se utiliza lipofectamina.

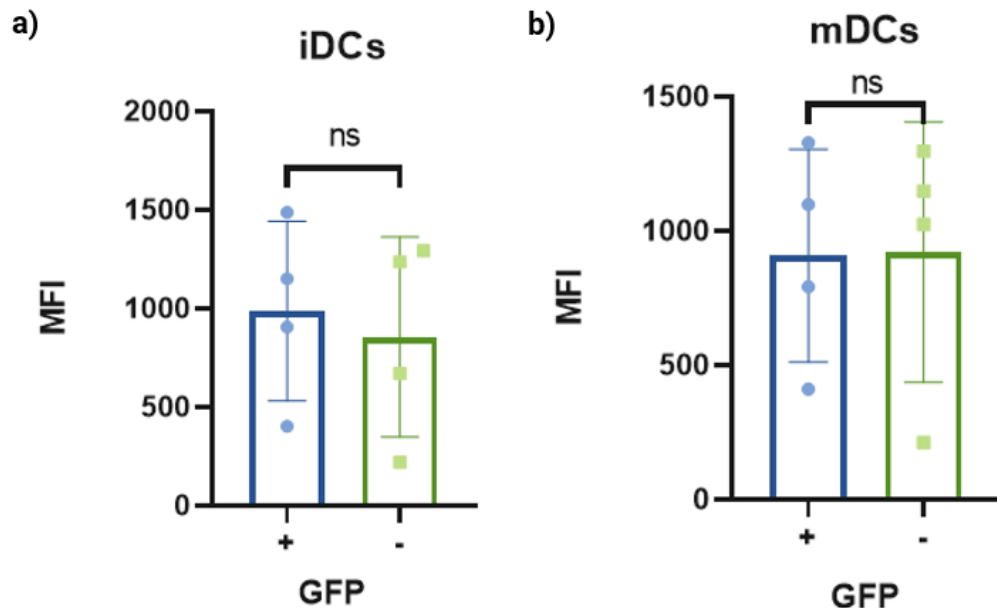


Figura 6 Transfección de células dendríticas con Lipofectamina. Diagrama de barras representativo de la MFI de la transfección de a) células dendríticas inmaduras (iDCs) y b) células dendríticas maduras (mDCs) utilizando lipofectamina y el plásmido pcDNA3.1-EGFP (GFP+) y células sin transfectar. Cada punto representa una réplica. Las barras corresponden a promedio + SEM, ns = no significativo ($p > 0.05$).

6.3 Estandarización de transfección de DNA en PBMCs y DCs utilizando Electroporación

Debido a que no fue posible estandarizar la transfección de PBMCs o DCs utilizando lipofectamina, el siguiente paso que se intentó fue realizar la transfección de estas células por medio de electroporación. Para estandarizar este método de transfección se decidió utilizar en una primera instancia PBMCs frescas, obtenidas el mismo día de la transfección a partir de separación por densidades de "buffy coat" de donantes sanos. Las PBMCs fueron electroporadas con 1 μ g del plásmido pcDNA 3.1-N-eGFP en cubetas de 2 mm, con un pulso de onda cuadrada de 500V durante 5 ms utilizando un electroporador GenePulse Xcell (Bio-Rad™).

Después de la electroporación, las células fueron cultivadas durante 24 horas en las condiciones mencionadas anteriormente. Pasado este tiempo, las células fueron

cosechadas y al igual que en la transfección por Lipofectamina se determinó el porcentaje de eficiencia de transfección a través de la medición por MFI del GFP. En la figura 7 se presentan las dos concentraciones de células electroporadas que se incluyeron en el proceso de estandarización. Como se evidencia en la figura, aunque hay un aumento de la intensidad de fluorescencia de las células GFP+ comparadas con las células no transfectadas, este incremento también se observa en las células GFP- par ambas concentraciones de células, por lo que se puede sospechar que el proceso de electroporación aumenta la autofluorescencia basal de las células y, por ende, se puede concluir que la transfección no fue exitosa.

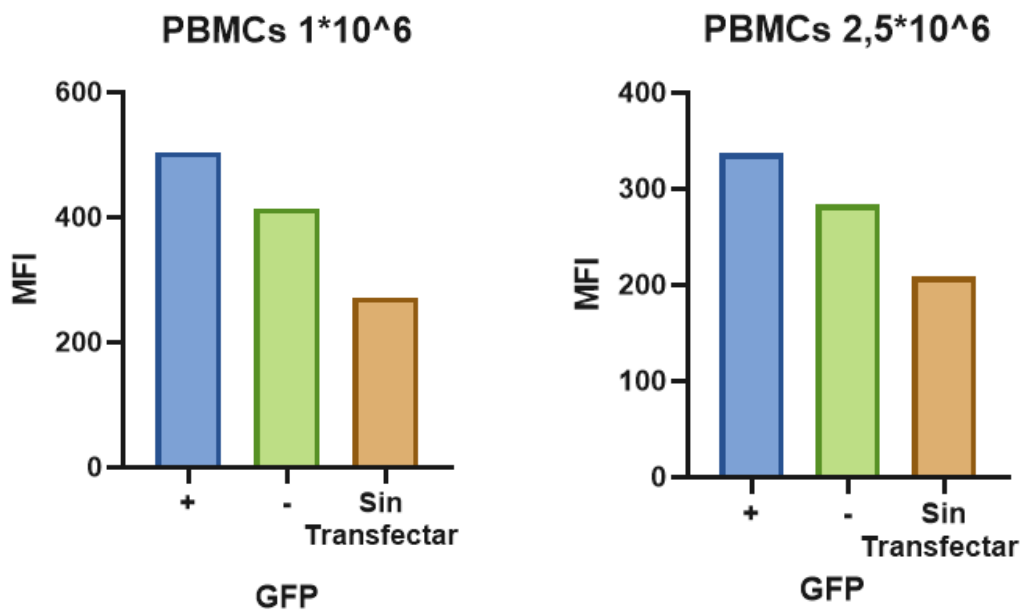


Figura 7 Transfección de PBMCs frescas con electroporación Diagrama de barras representativo de la transfección de PBMCs con a) 1×10^6 células y b) $2,5 \times 10^6$ células con electroporación en cubetas de 2 mm con un pulso de 500 V durante 5 ms. Por citometría de flujo se evidencia la intensidad media de fluorescencia (MFI) de la proteína verde fluorescente (GFP) en células electroporadas con el plásmido pcDNA 3.1-N-eGFP (GFP+), electroporadas sin plásmido (GFP -) y células sin transfectar.

En cuanto a la electroporación de las DCs derivadas de monocitos, al igual que como se hizo con la transfección usando lipofectamina, monocitos obtenidos de donantes sanos fueron tratados con GM-CSF e IL-4 durante 5 días, y posterior a esto, las iDCs resultantes se despegaron gentilmente con un cell scrapper agregando PBS frío y manteniendo el plato en hielo todo el tiempo. Las células fueron resuspendidas en 100

μ L de medio OptiMEM y se llevaron a una cubeta de 2 mm para ser electroporadas con un pulso de 250 V durante 2 ms. Inmediatamente se recolectaron las células de la cubeta y se cultivaron nuevamente en condiciones normales de cultivo. Para las mDCs, adicional a este proceso, dos horas después de ser recolectadas post-electroporación, al medio de cultivo se agregaron IFN- γ y LPS para madurar las DCs.

48 horas posterior a la electroporación, las células fueron analizadas por citometría de flujo para determinar la MFI de la GFP. En la figura 8 se puede observar que en las iDCs electroporadas hay un aumento de 1,6 veces de la MFI de la GFP, comparado con las células sin transfectar, contrario a lo que sucede con las mDCs en las que no se ve ninguna diferencia entre la MFI de las células transfectadas y la de la de las células sin transfectar.

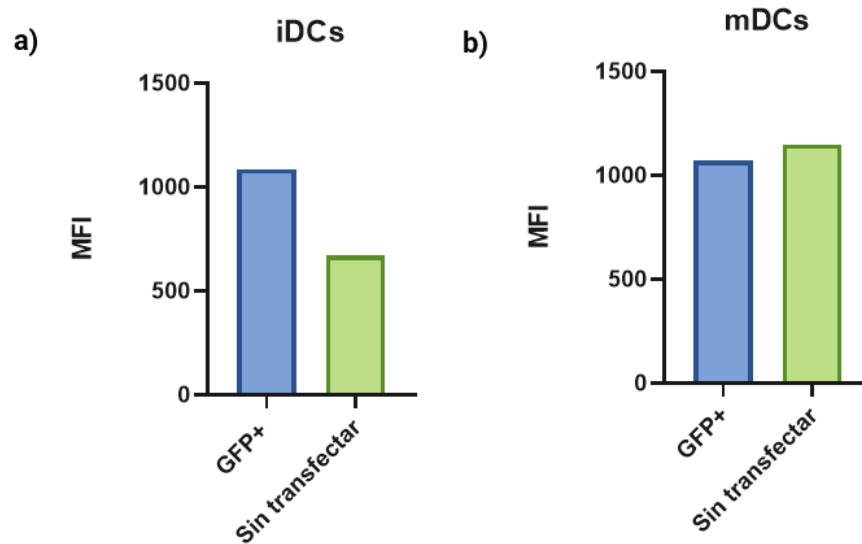


Figura 8 Transfección de DCs con electroporación Diagrama de barras representativo de la transfección de a) iDCs y b) mDCs con electroporación en cubetas de 2 mm con un pulso de 250 V durante 2 ms. Por citometría de flujo se evidencia la intensidad media de fluorescencia (MFI) de la proteína verde fluorescente (GFP) en células electroporadas con el plásmido pcDNA 3.1-N-eGFP (GFP+) y células sin transfectar.

Aunque la electroporación de las iDCs fue el primer ensayo en donde se pudo ver un aumento de la eficiencia de la transfección, para lo que se persigue con este trabajo, las DCs transfectadas idealmente deberían ser células maduras, ya que las mDCs tienen una alta expresión de moléculas presentadoras y co-estimuladoras, las cuales son necesarias para inducir la activación de LTs. Considerando que en los resultados de

transfección tanto con lipofectamina como con electroporación, las PBMCs y las DCs no demostraron una eficiencia de transfección de al menos un 60%, se decidió explorar ambos métodos de transfección en células HEK293T, las cuales han sido ampliamente descritas como células con una alta eficiencia de transfección y representarían un control de las condiciones de transfección establecidas.

6.4 Estandarización de transfección de DNA en HEK293T utilizando Lipofectamina

Las células HEK293T (del acrónimo en inglés **H**uman **E**pithelial **K**idney) son células de origen epitelial que fueron aisladas de células embrionarias de riñón humano. Estas células son ampliamente utilizadas para la replicación y producción de vectores virales gracias a su alta eficiencia de transfección y capacidad de traducir fielmente las proteínas codificadas en DNA transfectado.

La evaluación por citometría de flujo del inmunofenotipo de células HEK293T mostró la expresión de la molécula de co-estimulación CD80, la expresión HLA-DR y CD14, proteínas expresadas habitualmente en la membrana de APCs de origen mieloide como monocitos y macrófagos. En contraste, la evaluación de la expresión de CD83 y CD40 marcadores de APCs profesionales como DCs, fue negativo (Figura 9). Además de la expresión de estas moléculas, la evaluación por citometría de flujo, del patrón de tinción con el anticuerpo BB7, un anticuerpo que reconoce un importante grupo de alelos HLA A*0201 (que en adelante denominaremos HLA-A2), evidenció un importante patrón de tinción de la superficie celular de las células HEK293T con este anticuerpo (Figura 10).

Este patrón de expresión de moléculas en superficie nos llevó a considerar el uso de las células HEK293T, como célula base para la prueba de concepto del uso de líneas tumorales como base para el diseño de APC "artificiales". Para evaluar este concepto, dado el conocido alto rendimiento de transfección de DNA en estas células, procedimos a realizar con ellas pruebas de transfección con lipofectamina y electroporaciones evaluadas sin éxito en PBMCs y DCs, con el fin de identificar las condiciones que nos permitiesen alcanzar la mejor eficiencia de transfección de ADN con el uso de estas dos metodologías, para luego ser utilizadas como APCs.

En primer lugar, se estandarizó la transfección de las HEK293T utilizando distintas concentraciones de lipofectamina. Para ello, 5×10^5 células fueron sembradas en un plato de 24 pozos con 1 mL de medio completo, las células se dejaron 24 horas en condiciones normales de cultivo hasta alcanzar una confluencia entre el 70-90%. Pasado este tiempo, las células se transfectaron en una relación 1:1,5 p/v de ADN: lipofectamina (i.e., 1,5 μ L) y una relación 1:3 de ADN: lipofectamina (i.e., 3 μ L). Adicionalmente, debido a que estas células son eucariotas, es necesario asegurar que el vector no se quede en el citosol, en donde sería degradado por nucleasas, sino que llegue efectivamente hasta el núcleo de la célula. Por esta razón, se agregó en las mismas relaciones de DNA: reactivo el potenciador P3000 (Invitrogen), el cual señala la movilización de las vesículas que son endocitadas por la célula hasta la membrana nuclear.

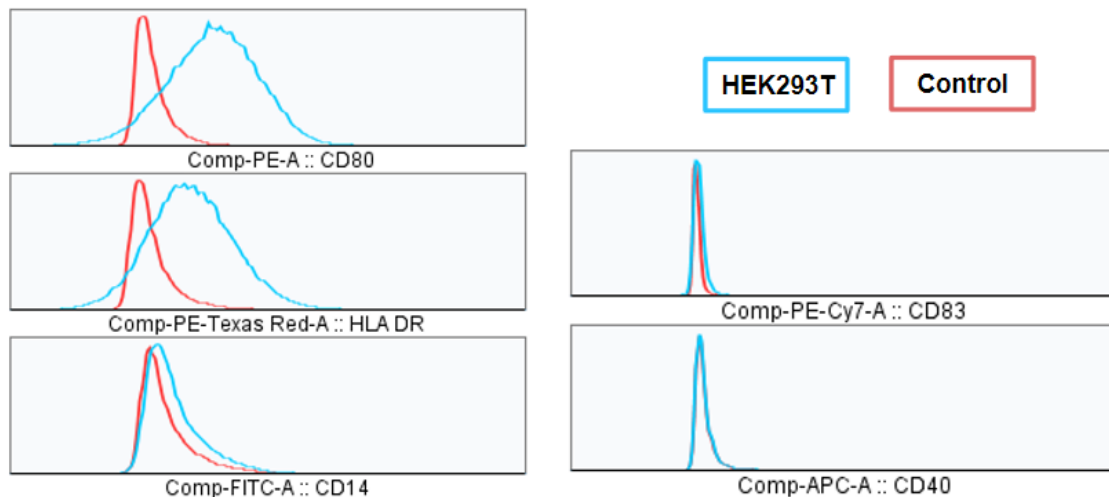


Figura 9 Evaluación de marcadores expresados por las células HEK293T La expresión de HLA-DR y moléculas coestimuladoras como CD80, y CD83, marcadores CD14 y CD40 se evaluó por citometría de flujo con anticuerpos específicos (Azul) comparados con células sin marcar (rojo).

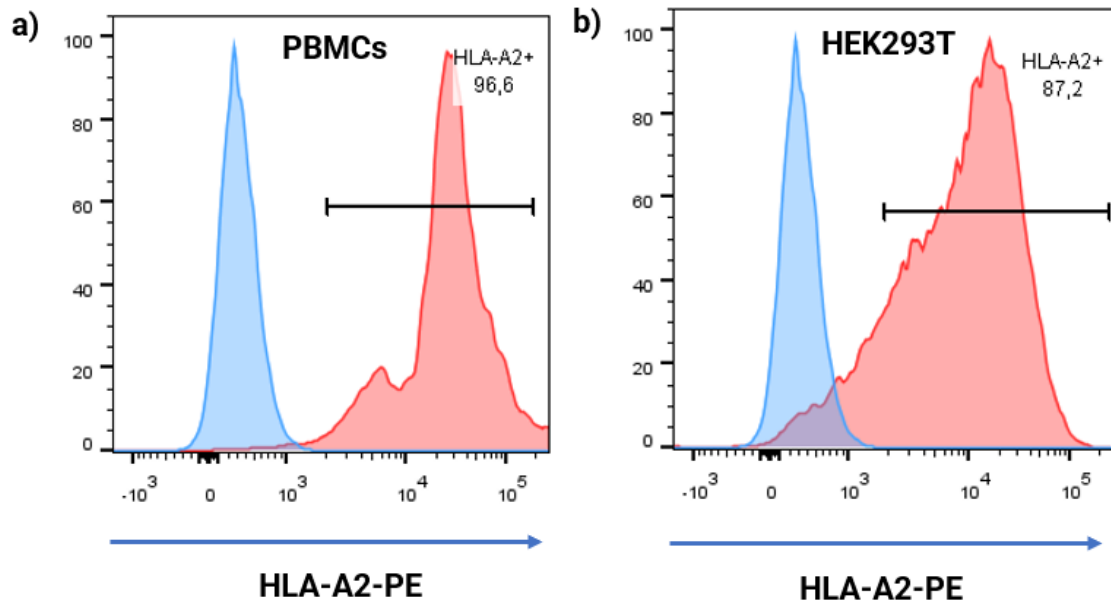


Figura 10 Células HEK293T expresan HLA-A2. Histogramas representativos del patrón de expresión de HLA-A2 en a) PBMCs y b) células HEK293T marcadas con el anticuerpo BB7 (anti-HLA-A2) marcado con PE (histograma en rojo) y células sin marcar (azul).

Como se muestra en la Figura 11, la eficiencia de transfección de las células HEK293T es significativamente mayor cuando se usó la concentración más alta de lipofectamina (3 μ L), en comparación a las células no transfectadas. Esto deja en evidencia que una concentración más alta de lipofectamina favorece una mayor eficiencia de transfección y sugiere que el minigen codificado en el plásmido podría expresarse de la misma manera que la GFP.

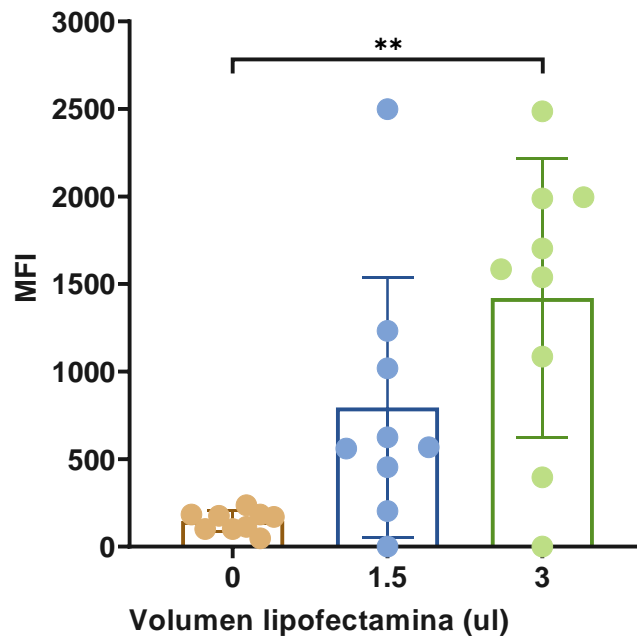


Figura 11 Transfección de células HEK293T utilizando diferentes concentraciones de lipofectamina Diagrama de barras representativo de la transfección de células HEK293T con a) 1,5 µL y b) 3 µL de Lipofectamina 3000 con el plásmido pcDNA 3.1-N-eGFP. Se compara la Intensidad Media de Fluorescencia de GFP en células transfectadas y células sin transfectar. Las barras corresponden a promedio + SEM de 8 réplicas p-Value = 0,025 Test Kruskal Wallis

Para probarlo, se comparó la eficiencia de transfección del plásmido que sólo codifica para la proteína GFP y el constructo pcDNA 3.1-N-eGFP-Minigen, el cual codifica para la proteína de fusión compuesta por la GFP y el constructo de minigen (GFP-Minigen), utilizando la relación 1:3 de ADN: lipofectamina. En la figura 12 se observa el resultado de esta transfección, en que se evidenció que cuando las células fueron transfectadas con el plásmido tanto solo (GFP) como con el minigen, se detectó un aumento en la media de expresión de la GFP. Sin embargo, la transfección del plásmido que codifica para GFP-minigen no indujo una expresión tan marcada de la GFP como el plásmido pcDNA 3.1-N-eGFP. Este resultado sugirió un efecto tóxico en la expresión de la GFP de la presencia del minigen en el constructo GFP-Minigen.

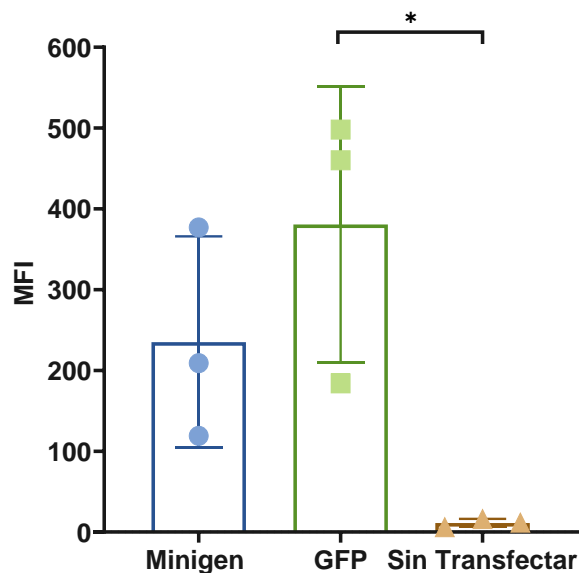


Figura 12 Transfección utilizando lipofectamina de células HEK293T con plásmido pcDNA 3.1-N-eGFP. Diagrama de barras de niveles MFI de células HEK293T transfectadas con a) el plásmido pcDNA 3.1-N-eGFP-Minigen que codifica para la proteína de fusión GFP-Minigen; b) el plásmido pcDNA 3.1-N-eGFP que codifica solo para la GFP y c) células HEK293T sin transfectar. Las barras corresponden a promedio + SEM de 3 réplicas, * p -Value = 0,0046 (test de Kruskal-Wallis).

6.5 Estandarización de transfección de DNA en células HEK293T utilizando Electroporación

Las células HEK293T también se utilizaron para estandarizar la transfección del minigen mediante electroporación. Para esto, el primer parámetro que se estandarizó fue el tiempo del pulso de la electroporación; partiendo de un voltaje de 110V se electroporaron las células durante 10, 25 o 50 milisegundos. Al igual que con la lipofectamina, se inició la transfección con el plásmido pcDNA 3.1-N-eGFP y se midió la MFI de la GFP por citometría de flujo.

De esta primera fase de estandarización, se realizaron tres réplicas y se observó que, con un mayor tiempo de electroporación, se alcanzaba una mayor eficiencia de transfección, por lo que escogimos un pulso de 50 ms como el tiempo para lograr una transfección eficiente de nuestras células en los siguientes experimentos (Figura 13).

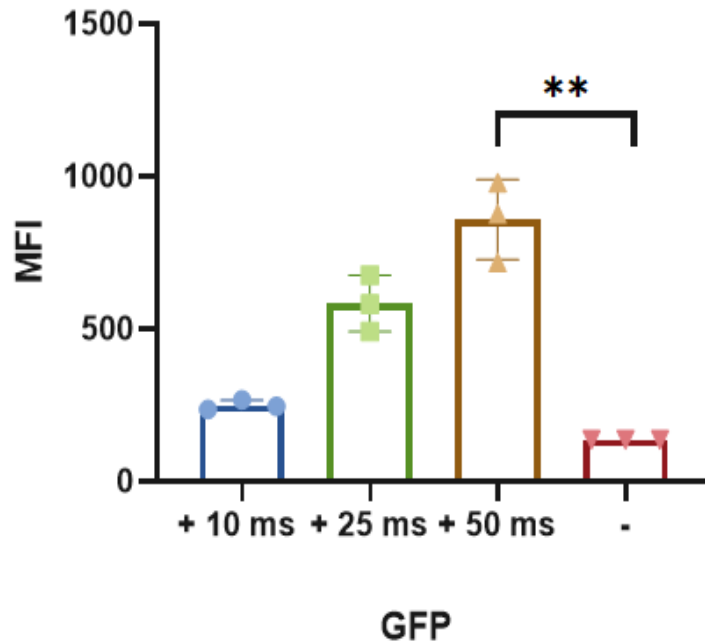


Figura 13 Optimización del tiempo de electroporación en células HEK293T Diagrama de barras representativo de la electroporación del plásmido pcDNA 3.1-N-eGFP en células HEK293T con diferentes duraciones del pulso de electroporación, 10 milisegundos (ms), 25 ms y 50 ms. En comparación con células electroporadas sin presencia del plásmido. Las barras corresponden a promedio + SEM de 3 réplicas ** p-Value = 0,0036 test de Kruskal-Wallis.

Una vez se determinó la variable del tiempo, continuamos con la estandarización el voltaje de transfección utilizando tres valores de voltaje: 110V, 220V y 600V. En este caso, se observó que el menor voltaje fue el que produjo una eficiencia de transfección mayor, en términos de la MFI de la GFP (Figura 14). Cuando se utilizan voltajes muy altos, existe el riesgo de comprometer la viabilidad de las células, lo que podría estar explicando por qué a mayores voltajes, hay una disminución proporcional de la eficiencia de transfección.

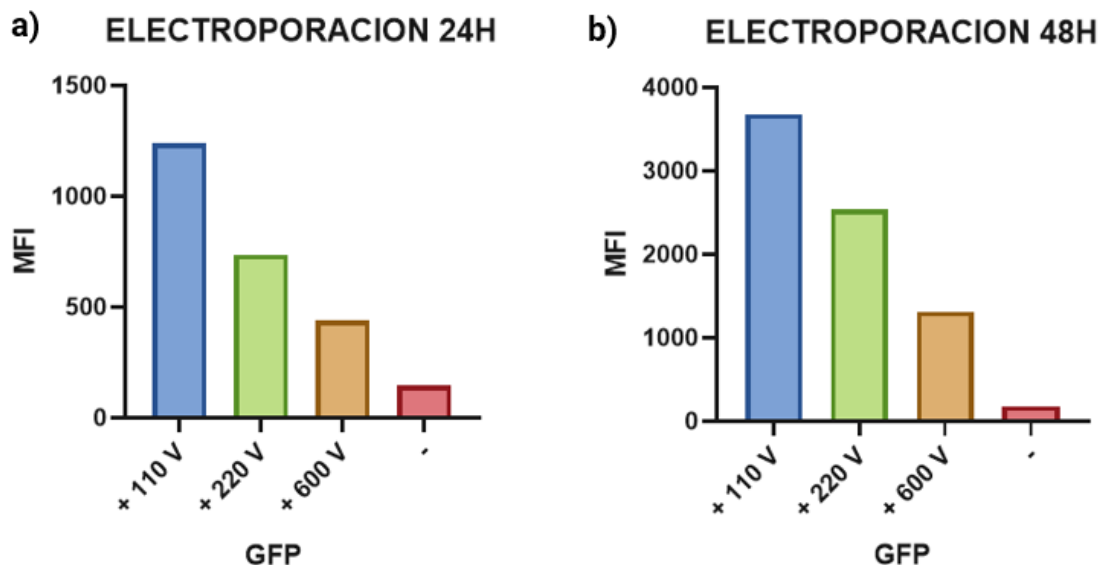


Figura 14 Optimización del voltaje de electroporación en células HEK293T Diagrama de barras representativo del MFI alcanzado con la electroporación del plásmido pcDNA 3.1-N-eGFP en células HEK293T con diferentes voltajes, 110 V, 220 V y 600 V. En comparación con el MFI de células electroporadas sin presencia del plásmido. Estas células se mantuvieron a) 24 horas en y b) 48 horas en cultivo luego de la transfección en medio completo.

Por último, debido a que el estrés celular inducido por el choque eléctrico probablemente afecta la vitalidad de las células HEK293T, se monitoreó la expresión de la proteína GFP dependiendo del tiempo de cultivo de las células posterior a la electroporación. Después de la electroporación, las células fueron incubadas a 37°C durante 24 y 48 horas, y posteriormente se monitoreó por citometría de flujo el nivel de expresión de GFP mediante el MFI. Como se muestra en la Figura 14 b, las células electroporadas y cultivadas durante 48 horas expresaron un mayor incremento del MFI de la GFP, en comparación con el cultivo por 24 horas luego de la transfección, sin embargo, la viabilidad en el cultivo a las 48 horas fue tan sólo del 12% (Figura Suplementaria 9), por lo que se decidió establecer para los siguientes experimentos de electroporación de las HEK293T el uso de un pulso de 110V durante 50 ms y un cultivo de 24 horas.

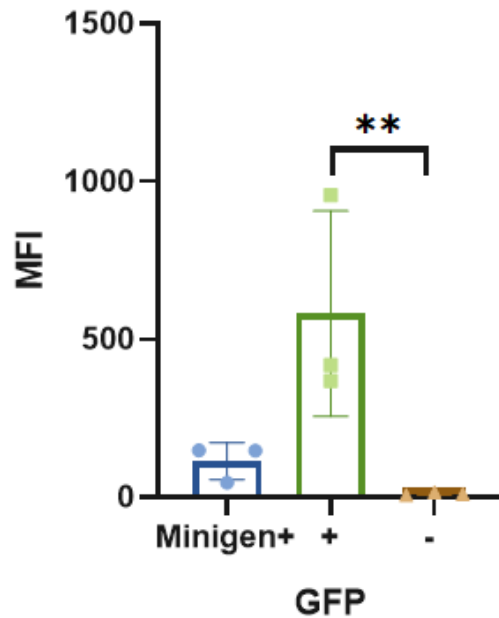


Figura 15 Electroporación del minigen en células HEK293T Diagrama de barras representativo de MFI luego de la electroporación de células HEK293T con el plásmido pcDNA 3.1-N-eGFP - Minigen (Minigen+) y con el plásmido pcDNA 3.1-N-eGFP (+). En comparación con células electroporadas sin presencia del plásmido (-). Las barras corresponden a promedio + SEM de 3 réplicas ** *p-value* = 0,003 (test de Kruskal-Wallis).

Una vez se establecieron estos tres parámetros para la electroporación de las células, al igual que con la lipofectamina, se comparó la eficiencia de transfección del plásmido pcDNA 3.1-N-eGFP, el cual sólo expresa la GFP, versus el plásmido pcDNA 3.1-N-eGFP - Minigen, que expresa el constructo diseñado por nosotros. Como se observa en la Figura 15, y de forma similar a lo reportado con la lipofectamina, la expresión de la GFP es considerablemente mayor cuando se hace la transfección del plásmido que únicamente expresa la GFP, y que la incorporación al constructo del plásmido del minigen disminuye el MFI de la GFP expresada. Sin embargo, aunque la expresión de la GFP inducida por el plásmido pcDNA 3.1-N-eGFP fue similar utilizando los dos métodos de transfección, la expresión de esta proteína cuando se hacía la transfección del plásmido pcDNA 3.1-N-eGFP -Minigen fue mayor utilizando lipofectamina, por lo que concluimos que este método genera una mayor eficiencia de transfección en las condiciones establecidas en este trabajo.

6.6 Estandarización de transducción de DNA en células HEK293T utilizando Adenovirus Ad5.RGD

Otro método de entrega del minigen que se utilizó en este trabajo fue el vector adenoviral Ad5.RGD. CMV.minigene-6xHis.CMVeGFP (Ad5.RGD en adelante) construido por el Dr. Carlos Parra con el apoyo de la Dra. Reka Lorincz del laboratorio del Dr. David Curiel de la Universidad de Washington en Saint Louis MO (Estados Unidos) (Figura suplementaria 15). Este vector contiene el minigen y la GFP como gen reportero, el cual fue monitoreado por microscopía de fluorescencia y citometría de flujo. Para esto, primero se optimizó la multiplicidad de infección (MOI) en las células HEK293T utilizando 5 MOI distintos: 2000, 1000, 100, 50 y 25. Como se esperaba, un MOI más alto se correlacionó con una mejor eficiencia de transfección, sin embargo, esto también fue acompañado por una menor viabilidad, por lo que se decidió disminuir el MOI (Figura 16).

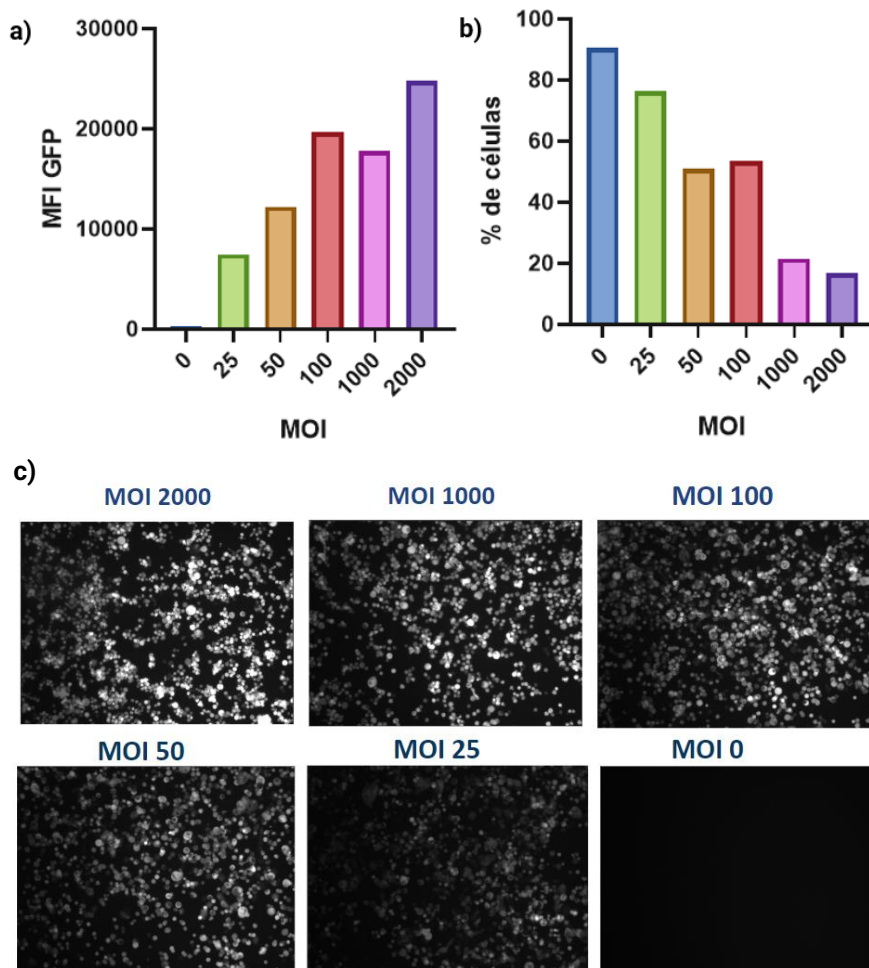
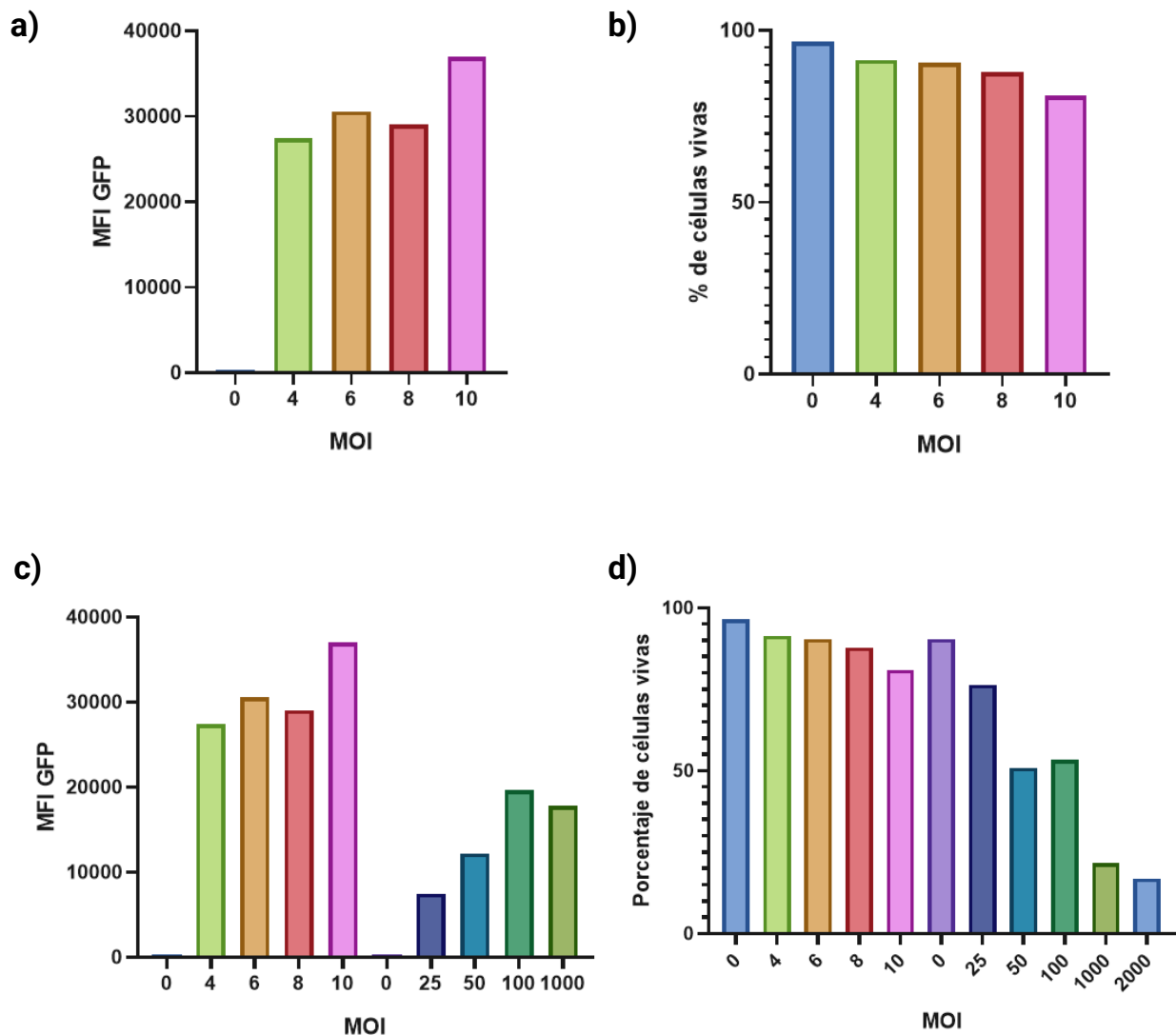


Figura 16 Estandarización del MOI de 0 a 2000 del vector Adenoviral en células HEK293T. a) Diagrama de barras representativo de la transducción de células HEK293T con el vector adenoviral Ad5.RGD con diferentes multiplicidades de infección (MOI) desde 25 a 2000. b) Porcentaje de células HEK293T vivas transducidas con los diferentes MOI. c) Imágenes de microscopía de fluorescencia de los MOI evaluados.

Se decide disminuir el MOI debido a la alta mortalidad de las células por lo que se cocultivan las células HEK293T con MOI 4, 6, 8 y 10, luego de 24 horas se monitoreó el nivel de rectifica la transducción por microscopía de fluorescencia y se recolectan las células para mirar por citometría de flujo viabilidad y expresión de GFP. Se observó que la eficiencia de transducción en este caso es más alta que el caso anterior (Figura 17 c) y la integridad de las células se vió menos comprometida (Figura 17 d). A partir de estos resultados, se seleccionaron los MOIs 6, 8 y 10 para trabajar en el ensayo funcional de los LT CD8+ debido a que presentan alta eficiencia de transducción y baja mortalidad.



e)

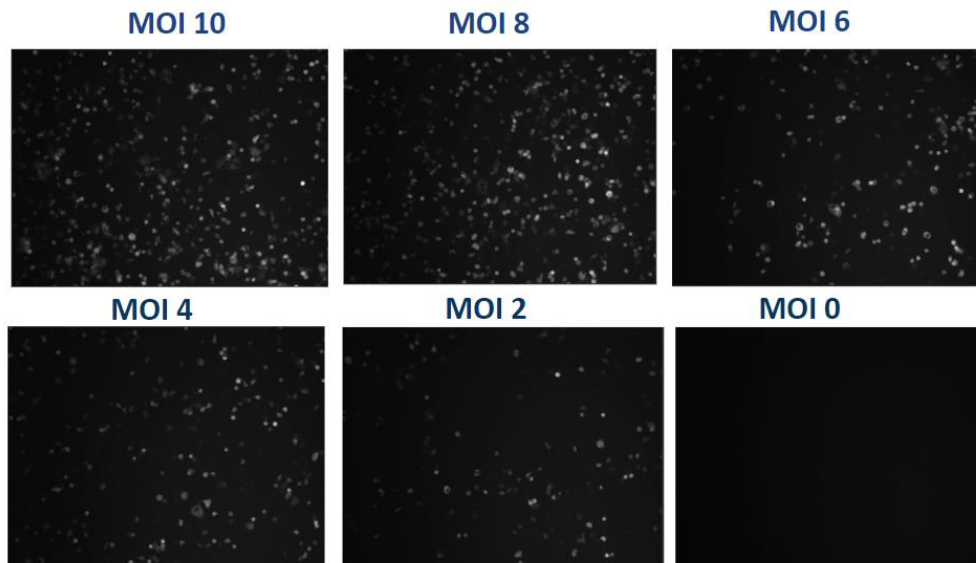


Figura 17 Estandarización del MOI de 0 a 10 del vector adenoviral en células HEK293T. a) Diagrama de barras representativo de la Intensidad Media de Fluorescencia (MFI) de GFP luego de la transducción de células HEK293T con el vector adenoviral Ad5.RGD con diferentes multiplicidades de infección (MOI) desde 2 a 10. b) Diagrama de barras representativo del porcentaje de células HEK293T vivas transducidas con los diferentes MOI. c) Diagrama de barras representativo de la MFI de GFP luego de la transducción de células HEK293T con el vector adenoviral Ad5.RGD con MOI de 4 a 1000. d) Diagrama de barras representativo del porcentaje de células HEK293T vivas transducidas con los diferentes MOI. e) Imágenes de microscopía de fluorescencia de los MOI evaluados.

6.7 Construcción de APCs artificiales (aAPCs)

Con el fin de optimizar la presentación del antígeno a los LT CD8+ se decidió construir células presentadoras de antígeno artificiales (aAPCs) a partir de células HEK 293 y K562, las cuales fueron transfectadas con el minigen y constructos codificantes de las moléculas MHC-I HLA-A*02:01 y las moléculas coestimuladoras CD80, CD83 y CD37L, características de células presentadoras de antígeno profesionales. También se transfectaron las células con el plásmido pcDNA 3.1-N-EGFP (GFP) que solo codifica para la proteína GFP, y esto permitió determinar si la expresión de estas moléculas se veía afectada por la transfección *per se*.

Las células K562 se transfectaron por lipofectamina y por electroporación con cada una de las moléculas por separado (Figura 18 a). A partir de esto se pudo evidenciar que la lipofectamina permitió alcanzar una mayor eficiencia de transfección a juzgar por los

niveles de expresión de las distintas moléculas, exceptuando a CD83. Asimismo, se encontró que la integridad de las células se conserva con la lipofectamina, mientras que con la electroporación las células experimentaban una mortalidad cercana al 60% (Figura 18 b).

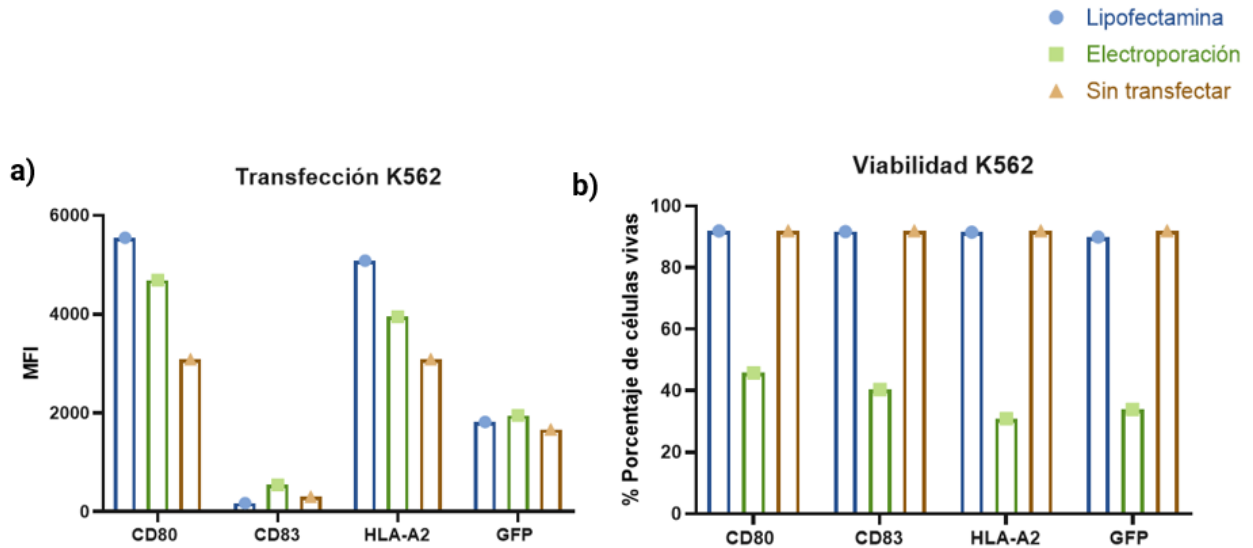


Figura 18 Estandarización de transfección de células K562 con lipofectamina y electroporación.

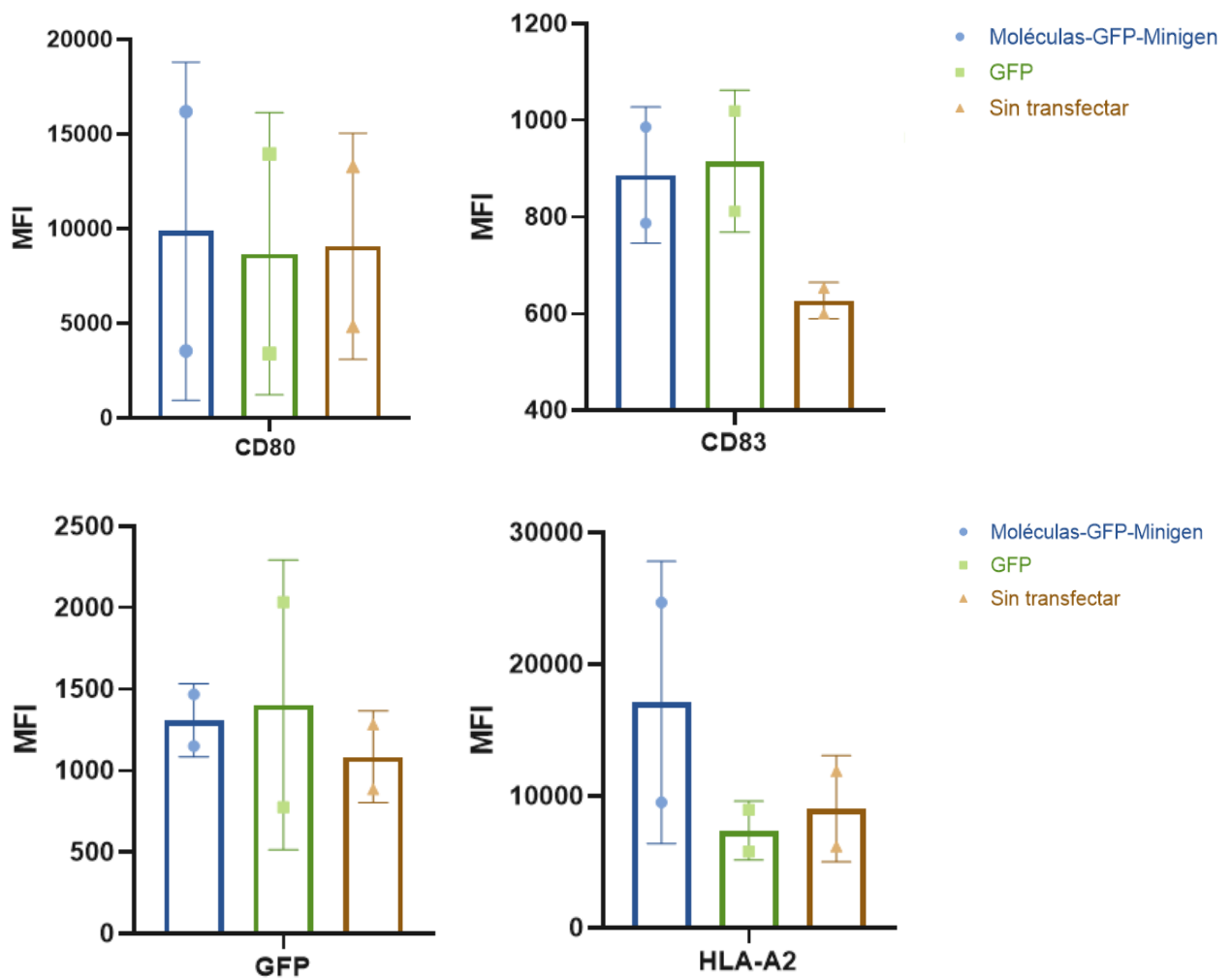
a) Transfección de células K562 con moléculas CD80, CD83, HLA-A*02:01 y GFP. b) Viabilidad de las células K562 luego de ser transfectadas con lipofectamina y electroporación.

Teniendo en cuenta estos resultados, se decidió utilizar la lipofectamina para estandarizar la transfección de constructos codificantes para estas moléculas tanto en células K562 como en células HEK293. Primero se estandarizó la transfección en las células K562. Se llevaron a cabo dos réplicas por ensayo y en el primer caso no se encontraron diferencias en la expresión de CD80, CD83 y GFP entre las células transfectadas comparadas con las células no transfectadas (Figura 19 a). En contraste, para las moléculas de HLA-A2 sí se observó un aumento de la MFI en las células transfectadas con las moléculas versus las células sin transfectar (Figura 19 a).

Luego se intentó estandarizar la transfección CD80, CD83, HLA-A2, CD137L y el minigen simultáneamente. En este caso se observó un comportamiento similar al anteriormente mencionado, mientras en la expresión de los marcadores CD80, CD137L, CD83 y GFP no se observaron diferencias, en el caso de HLA-A2 se pudo evidenciar un aumento en la expresión en células transfectadas con todas las moléculas pero que no fue muy distinta a las células que se encuentran transfectadas solo con GFP (Figura 19 b). A

pesar de esto resultados, se decidió utilizar las células K562 transfectadas con las tres moléculas coestimuladoras, la molécula de HLA-A*02:01 y el minigen en los ensayos funcionales de LT CD8+, para evidenciar si la expresión de las moléculas HLA-A*02:01 y las epítopes codificadas en el minigen son suficientes para estimular una respuesta contra los antígenos.

a)



b)

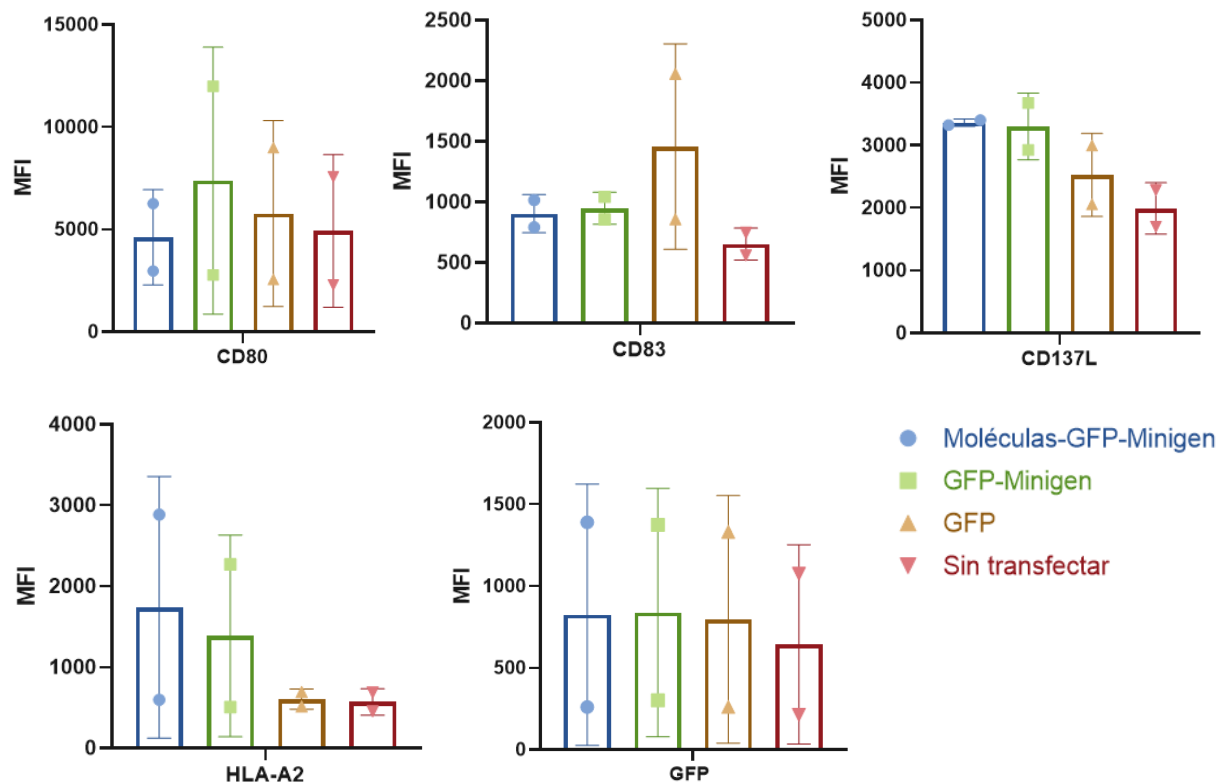


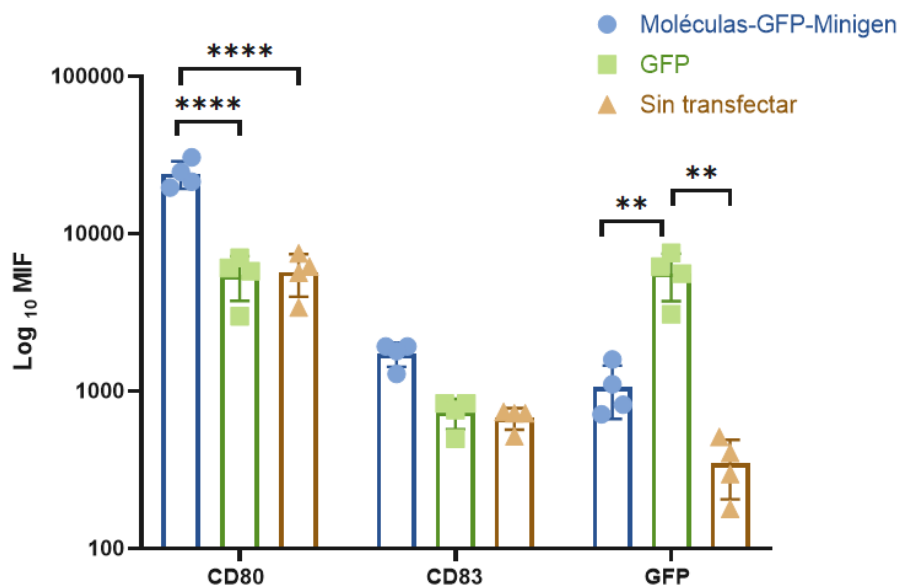
Figura 19 Expresión de moléculas coestimuladoras en células K562 transfectadas utilizando lipofectamina. Células K562 transfectadas con el plásmido pcDNA 3.1 - N-eGFP (GFP) utilizando lipofectamina con y sin el minigen simultáneamente con plásmidos codificantes para las moléculas a) CD80, CD83, HLA-A2 o b) CD80, CD83, CD137L, HLA-A22. La expresión de cada marcador y GFP en las células transfectadas y sin transfectar fue monitoreada por citometría de flujo. Las barras corresponden a promedio + SEM del MFI de dos réplicas.

Para las células HEK293 se realizó la misma metodología utilizada con las K562. En primer lugar, se estandarizó la co-transfección simultánea de tres plásmidos codificando sendas moléculas y luego la co-transfección de cuatro plásmidos codificando las moléculas y el plásmido que codifica GFP con o sin el minigen. En el primer caso se encontraron diferencias significativas en la expresión de CD80 de las células que fueron transfectadas con las Moléculas-GFP-Minigen, comparadas con las que fueron transfectadas solo con GFP o no transfectadas (Figura 20 a). También se encontró que hay mayor expresión de GFP en las células transfectadas solo con esta

proteína, comparado con las células transfectadas con las Moléculas-GFP-Minigen, esto se alinea con lo que se encontró anteriormente (Figura 20 a).

En el segundo caso, se encontró una diferencia estadísticamente significativa en la expresión de CD80, CD83 y CD137L en las células co-transfectadas con plásmidos que codifican a estas moléculas. En cuanto a la expresión de GFP, se observó una diferencia estadísticamente significativa en las células transfectadas solo con GFP, como se encontró en el caso anterior, pero también hubo una diferencia significativa en la expresión de GFP en las células transfectadas con el constructo GFP-Minigen versus las células sin transfectar (Figura 20 b). Teniendo en cuenta estos resultados, se utilizan las HEK293 como células presentadoras de antígeno para los ensayos funcionales subsecuente con LT CD8+.

a)



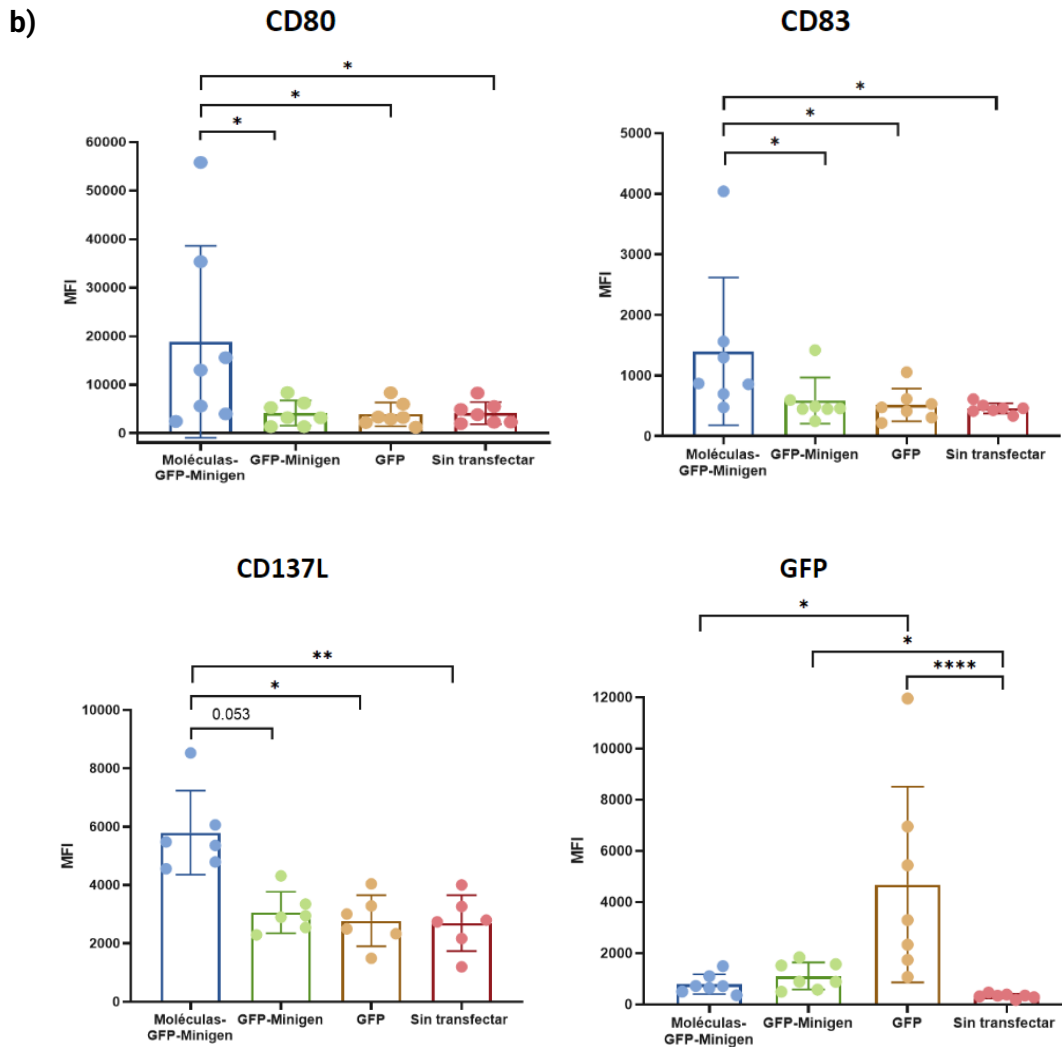


Figura 20 Expresión de moléculas coestimuladoras en células HEK293 co-transfectadas con diferentes plásmidos utilizando lipofectamina. Células HEK293 co-transfectadas simultáneamente por lipofectamina con plásmidos que codifican a) CD80, CD83 (Moléculas-GFP-Minigen), solo GFP y sin transfectar, y b) CD80, CD83, CD137L, con el plásmido pcDNA 3.1 - N-eGFP (GFP) con y sin el minigen. Se muestra la expresión de cada marcador en las células co-transfectadas con todos los marcadores y el minigen (Moléculas-GFP-Minigen), las células co-transfectadas solo con el minigen (GFP-Minigen), las células transfectadas solo con el plásmido GFP (GFP) y las células sin transfectar. Las barras corresponden a promedio + SEM de 4 réplicas para a) y 6 réplicas para b). Análisis estadístico con Anova de dos vías p -Value < 0,05 para a) y p -Value < 0,05 para b) (test de Friedman). Datos representativos de 4 y 6 réplicas respectivamente.

6.8 Western blot de APCs con distintos sistemas de entrega del minigen

Para verificar que los antígenos codificados en el minigen se traducen a proteína se realizó un Western blot utilizando como blanco la proteína verde fluorescente (GFP) que se encuentra en fusión con el minigen (figura 21). En un primer momento se realiza un Western blot de células HEK293 transfectadas con GFP-Minigen y con GFP solamente utilizando Lipofectamina 3000 en ambos casos. Esto se realizó en condiciones denaturantes y nativas, en la primera condición se observaron dos bandas positivas a la altura de 27 kDa, más concentrada en el lisado de células transfectadas solo con GFP y más tenue en las células transfectadas con la proteína de fusión. No se observa banda en 41 kDa que es el peso aproximado de la proteína de fusión.

En la condición nativa se evidencian 4 bandas positivas en las células transfectadas solo con GFP y no se observan bandas positivas en las células transfectadas con GFP-Minigen. La GFP forma oligómeros en su forma nativa, lo que podría estar explicando las cuatro bandas que se observan en esta condición, tal y como ha sido reportado en [119]. Por su parte, la ausencia de bandas esperadas en el peso de la proteína de fusión se puede deber a que para el momento en el que se cosecharon las células para el lisado, la proteína ya hubiese sido degradada razón por la cual no se observan los productos esperados.

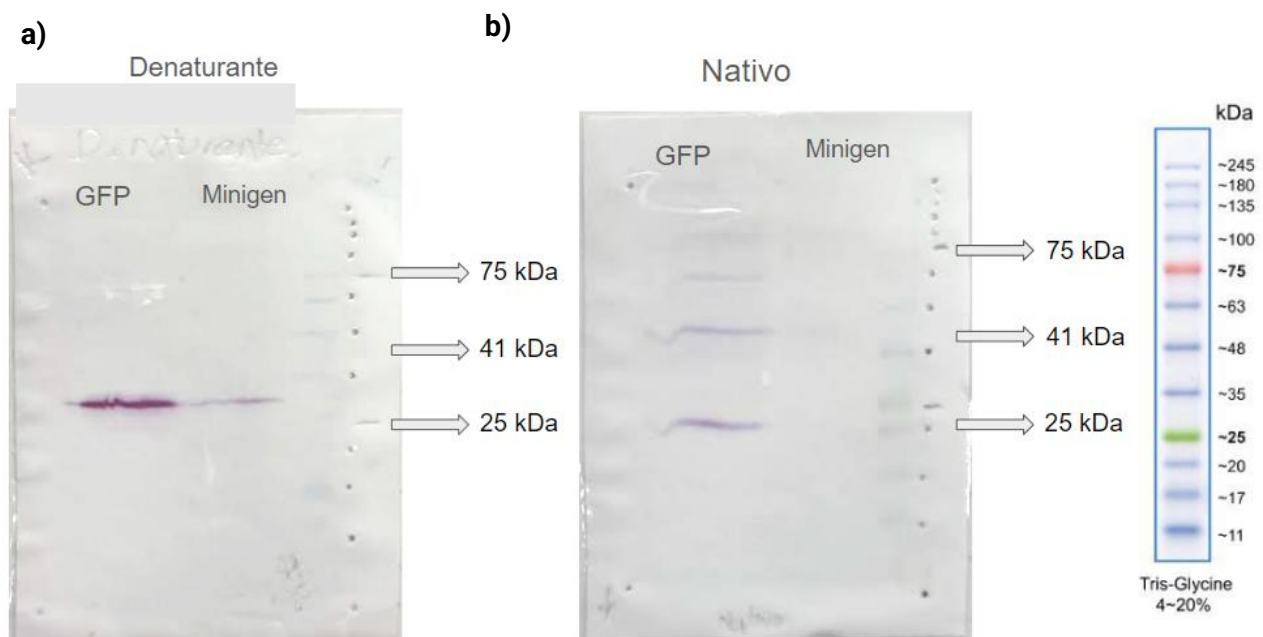
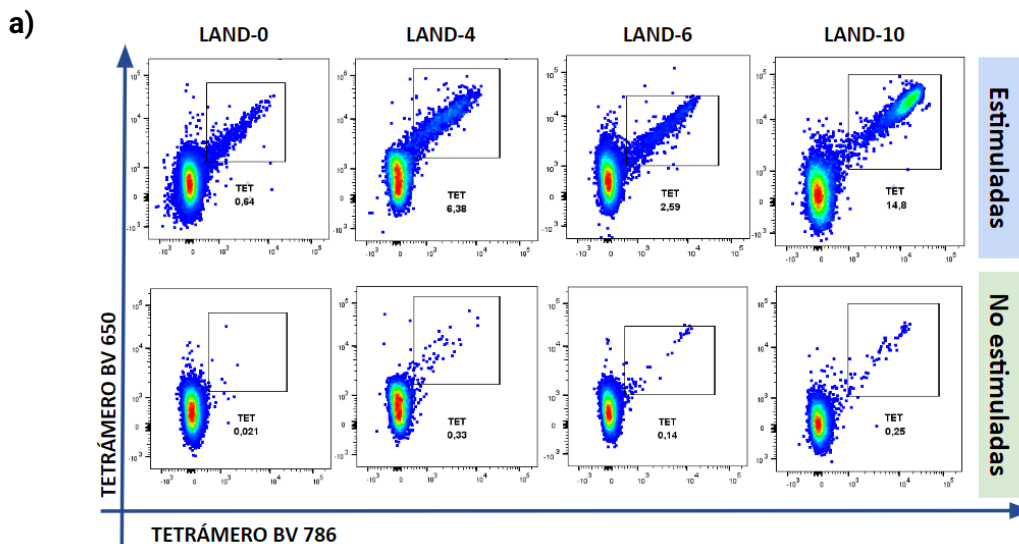


Figura 21 Western blot de células HEK293 transfectadas por lipofectamina con GFP-Minigen y GFP en condiciones denaturantes y nativas. a) Lisado celular de células HEK293 transfectadas con GFP-Minigen y con GFP en condición a) denaturante y b) nativa.

6.9 Detección y expansión mediante tetrámero de precursores de LT-CD8+ que reconoce antígenos virales y tumorales en donantes sanos HLA-A*0201.

Se realizó un tamizaje de PBMCs de un banco de donantes HLA-A*02:01 con el fin de identificar donantes que tuvieran precursores LT CD8+ para epítopes CD8 incluidas en el minigen. Para esto se cultivaron PBMCs en placa de 96 pozos fondo redondo y se realizó un cultivo de 9 días con IL-21, IL-7 e IL-15. Al día 9 se recolectó la fracción no adherente de las PBMCs y se marcaron con un tetrámero cargado con el péptido correspondiente. Para estandarizar esta metodología, se utilizó un péptido de CMV (una epítope de 9 aminoácidos de la proteína pp65, cuyo reconocimiento por LT-CD8+ es HLA-A*0201 restringida). De los 17 donantes sanos HLA-A*02:01 en los que se realizó el tamizaje, en 10 de ellos se evidenció una población de LT-CD8+ tetrámero positiva para la epítope pp65 de CMV (tabla suplementaria 1). Para identificar la población positiva de una manera más específica, se emplearon para la tinción dos tetrámeros cargados con el mismo antígeno, pero con dos fluorocromos distintos. En la Figura 22 se muestra un resultado representativo de cuatro donantes procesados en los que se puede observar la expansión de una población de LT-CD8+ tetrámero-positivo en respuesta al estímulo de PBMCs cultivados por nueve días *in vitro* en la presencia del péptido y citoquinas, tal y como se describió en materiales y métodos. En la Figura 22 b se evidencia la media del porcentaje de expansión significativa de una población de LT-CD8+ CMV+ de 10 donantes cribados.



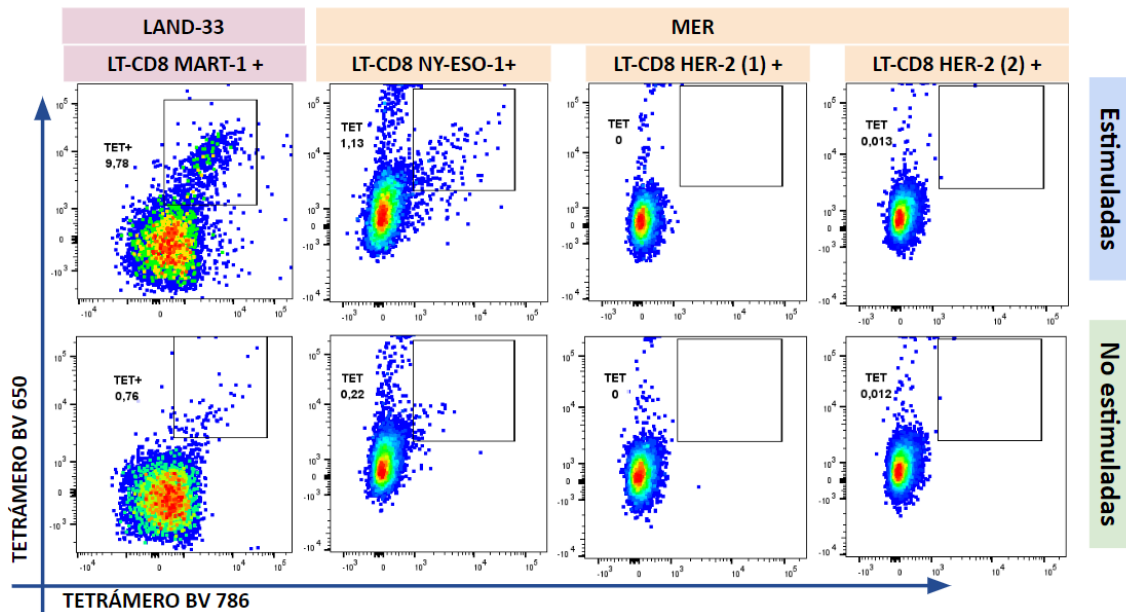


Figura 23 Identificación de LT-CD8+ antígeno-específicos para NY-ESO-1 y MART-1. Población de LT CD8+ Mart-1+ (en el costado izquierdo en rojo) NY-ESO-1+ (en el centro en amarillo) y HER-2 + (en el costado derecho en amarillo) luego de 9 días de estimulación con el péptido corto de CMV e IL-21, IL-7 e IL-15, comparado con células sin estimular (fila inferior en verde).

6.10 Evaluación de la producción de citoquinas intracelulares de LT-CD8+ de donantes sanos co-cultivados con APCs transfectadas con el minigen

Los donantes sanos a los cuales se les identificaron precursores para antígenos presentes en el minigen se utilizaron para evaluar la producción de IFN- γ y TNF α intracelular por parte de los LT-CD8+. Para esto, las PBMCs fueron estimuladas durante 9 días las PBMCs pulsándolas con el péptido corto del antígeno en medio AIM-V suplementado con IL-21, IL-7 e IL-15 seguido de la re-estimulación al día 9 con APCs transfectadas/transducidas con el minigen durante 6 horas en presencia de brefeldina A, con el fin de evitar el transporte de estas citoquinas del retículo endoplasmático al complejo de Golgi evitando así su secreción al medio extracelular. Luego de este tiempo se recolectaron las células y por citometría de flujo se cuantificaron los LT-CD8+ que expresan estas dos citoquinas intracelulares.

Se evaluaron 3 donantes sanos HLA-A*02:01 en los que se comparó la producción de citoquinas intracelulares por parte de los LT-CD8+ al estimularlos con células HEK293T, células HEK293, células K562 y mDCs autólogas. Estas células se utilizaron como APCs

bien sea artificiales o autólogas según corresponda y se les entregó el minigen por diferentes métodos. Adicionalmente, se corroboró que la transfección de por sí, no tuviera un efecto inmunogénico intrínseco, cocultivando LT-CD8+ estimulados con APCs transfectadas con el plásmido pcDNA 3.1-N-eGFP y con APCs sin transfectar. Cabe resaltar que no contamos con la contraparte del vector adenoviral que solo contuviese la GFP, por lo que con este método de entrega no fue posible realizar esta comparación.

El primer donante utilizado fue LAND 13, pasados los 9 días se evaluó la expansión de la población LT-CD8 tetrámero positiva para CMV (Figura 24 a) que pasó de ser 0,49% a 5,96 %. Luego de esto se comprobó la eficiencia de transfección/ transducción de las células HEK293T, que fueron utilizadas como APCs artificiales. En la figura 24 b se observa que las células transfectadas por lipofectamina con GFP-Minigen expresan 12,7% más GFP que las células electroporadas con el plásmido que codifica para la proteína de fusión (GFP-minigen). En contraste, y en concordancia con lo que se mencionó anteriormente, la transducción exhibió 23,4% más expresión de GFP comparada con las células transfectadas con lipofectamina.

En la figura 24 c, se presenta la reactividad de los LT-CD8+ reestimulados con las APCs transfectadas/transducidas con el minigen. En este donante se observó una población IFN- γ de 4,8 veces mayor en los LT-CD8+ cocultivados con células HEK293T electroporadas con el minigen y una población 5,5 veces mayor de células IFN- γ + en LT-CD8+ cocultivados con células HEK transfectadas con el minigen utilizando lipofectamina, comparados con los LT CD8+ que estuvieron en cocultivo con células sin transfectar o transfectadas solo con GFP. Estas poblaciones son similares a las que se presentan en el control positivo (2,11%) que corresponden a LT-CD8+ cocultivados con PBMCs autólogas pulsadas con el péptido de CMV. Adicionalmente, se observó que no hay LT-CD8+ secretores de IFN- γ en el cocultivo con células transducidas con el adenovirus. Este grupo de resultados demuestra que las células HEK293T transfectadas con el minigen se encuentran procesando y presentando la epítotope CD8 de CMV codificada en el minigen a los LT CD8+ y que la eficiencia de presentación fue similar a la inducida por APCs presentes en PBMCs. Por el contrario, las HEK293T transducidas con el adenovirus recombinante no parecen procesar correctamente esta

epítope ya que no fue posible evidenciar una población productora de citoquinas en tres réplicas realizadas con resultados similares (Figura suplementaria 10).

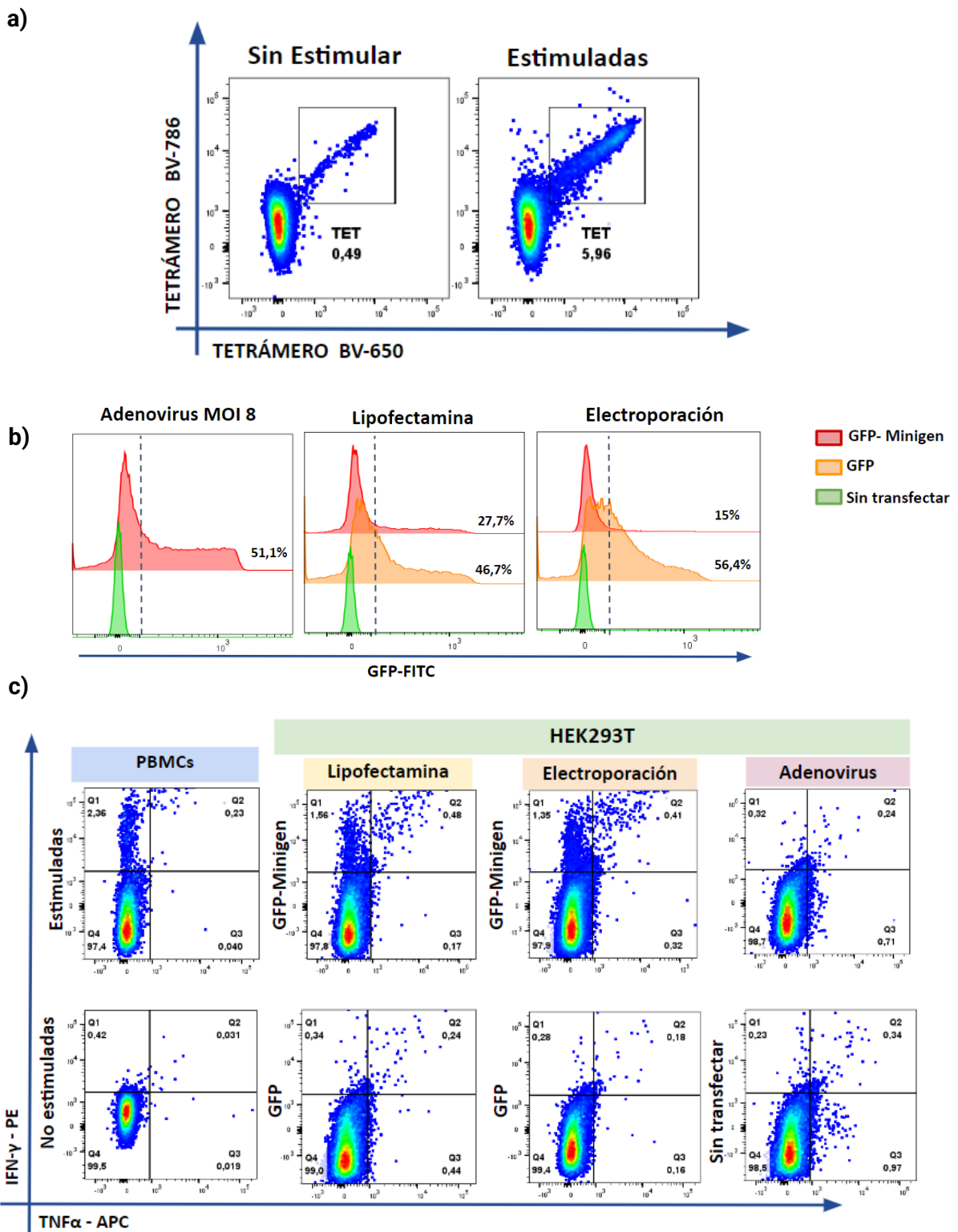


Figura 24 Evaluación de la producción de citoquinas intracelulares de LT CD8+ en cocultivo con APCs transfectadas/transducidas. a) Tinción doble de tetrámero de PBMCs del donante LAND-13 estimuladas con el péptido HLA-A2 de la proteína pp65 de CMV y PBMCs sin estimular en cultivo de 9 días. b) Histograma de la MFI de GFP en células HEK293T transfectadas con Lipofectamina, Electroporación y transducidas con el vector adenoviral, se muestra la expresión de GFP de células con la proteína de fusión GFP-Minigen (rojo), células solo con GFP (amarillo) y células sin transfectar/transducir (verde). c) Expresión de IFN- γ y TNF α en LT CD8+ estimulados durante 9 días con el péptido corto pp65 de CMV cocultivados con células HEK293T transfectadas por electroporación o lipofectamina con GFP-Minigen, solo con GFP o cocultivados con células HEK293T transducidas por el vector adenoviral que expresa el GFP-Minigen. Como control positivo se utilizaron PBMCs autólogas pulsadas con el péptido pp65 de CMV, como control negativo se utilizaron PBMCs autólogas sin estimular y células HEK293T sin transfectar.

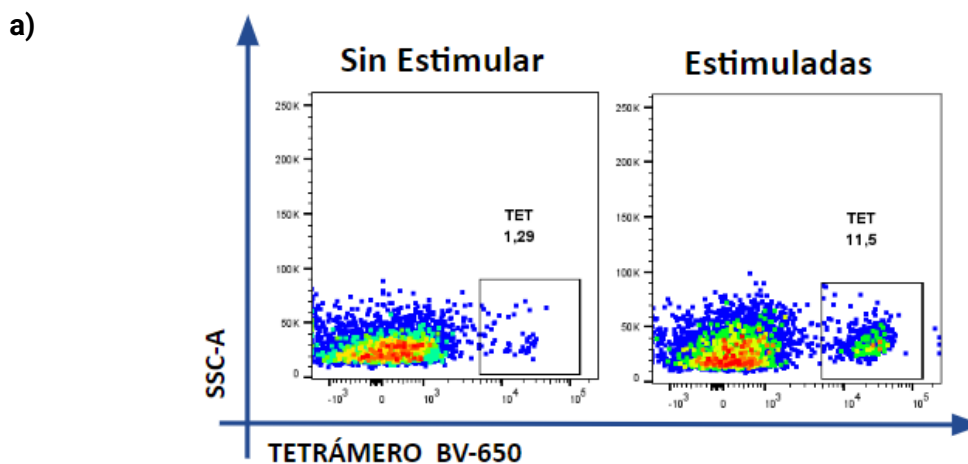
Se realizó este mismo procedimiento en diferentes donantes para identificar la variabilidad entre donantes. El segundo donante que se evaluó fue LAND-33 el cual es homocigoto para HLA-A*02:01. Primero se evaluó si existían precursores para el péptido de CMV (Figura 25 a) y se encontró una población de 11,5% de LT CD8+ CMV+ luego de la estimulación durante 9 días. Se llevó a cabo la misma metodología ya descrita para el donante anterior, pero a diferencia de LAND-13, con el donante LAND-33 se decidió incluir como células presentadoras de antígeno las APCs artificiales en espera de que la inclusión de moléculas coestimuladoras propias de APCs profesionales favoreciese la producción de citoquinas intracelulares. Además de esto, se incluyeron mDCs autólogas transfectadas para comparar su rendimiento con respecto a las APCs artificiales.

En el cocultivo de las DCs autólogas transfectadas por lipofectamina con el minigen se encontró una población de LT-CD8+ productoras de IFN- γ inespecífica, que se presenta en el cocultivo con mDCs transfectadas con la quimera GFP-Minigen, solo transfectadas con GFP y sin transfectar. Se observa solo un aumento de LT CD8+ de 1,2 veces más cuando está presente el minigen (Figura 25 c). El bajo rendimiento de presentación se puede explicar por la baja eficiencia de transfección de mDCs (Figura suplementaria 11). En este caso no se utilizó electroporación debido a las complicaciones asociadas a la recolección de DCs maduras y la baja viabilidad

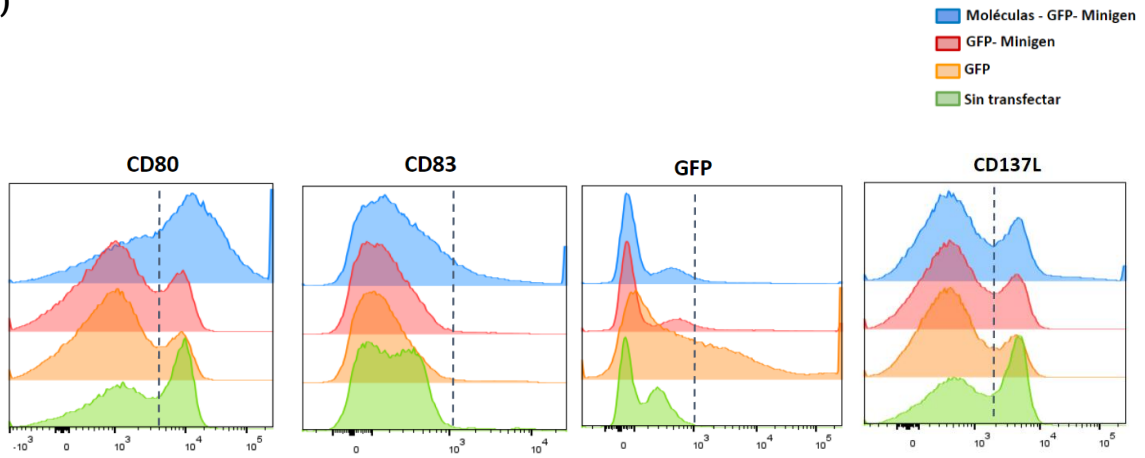
resultante luego de la electroporación que fue evaluada por azul de tripano (Datos no mostrados).

Se utilizaron también células HEK293 transfectadas con las Moléculas-GFP-Minigen, con GFP-Minigen, solo con GFP o sin transfectar (Figura 25 b). Se observó que las células HEK293 transfectadas con las Moléculas-GFP-Minigen estimularon una mayor expansión de LT CD8+ productores de IFN- γ (2,42%) con respecto al control positivo (2,02%), y que las células transfectadas con GFP-Minigen (2,22%). Además de esto, se observa que los cocultivos en donde está presente el minigen hay una población de LT CD8+ IFN- γ + TNF α + 4 veces mayor que la que se observa en el cocultivo con las células HEK sin transfectar o transfectadas solo con GFP. Cabe resaltar que en el control positivo de este experimento no se evidenció población de LT-CD8+ doble positiva (IFN- γ + / TNF- α +). Finalmente, no fueron detectados LT-CD8+ TNF- α +. Es importante resaltar que, en el control negativo, PBMCs sin estimular, hay una población de LT-CD8+ IFN- γ + cercana al 3% que es inespecífica, por lo que no se puede afirmar que esta población observada en cocultivo con las células HEK293 sea antígeno específica, sin embargo, es probable que parte de la población doble positiva pudiese ser antígeno-específica (Figura 25 d).

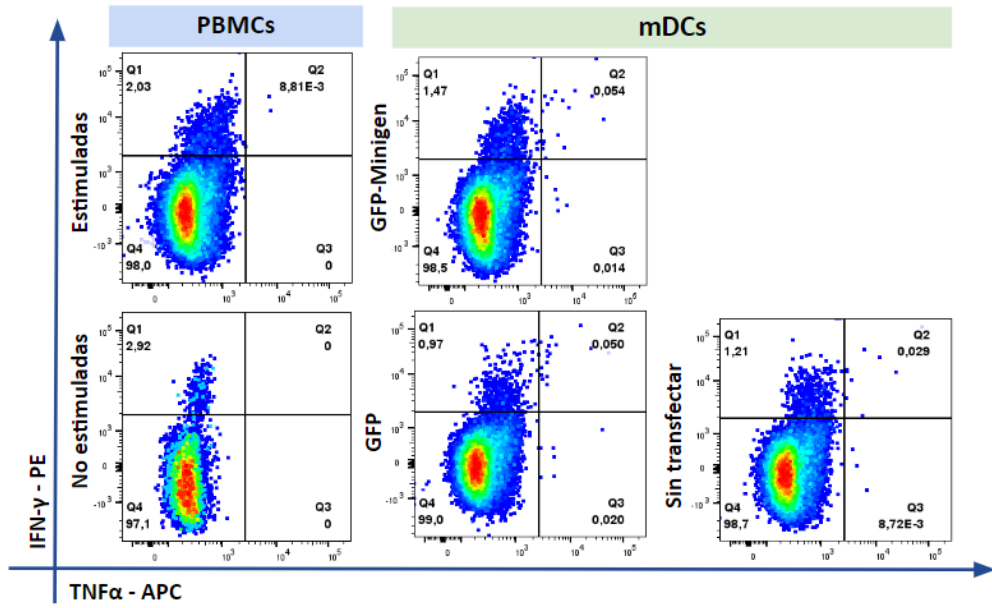
En cuanto a las células K562 (Figura 25 e), no se observaron poblaciones de LT-CD8+ productores de las citoquinas antígeno específicas en ninguno de los casos. Esto, al igual de lo observado con el uso de las DCs puede deberse a la baja eficiencia de transfección alcanzada con esta línea celular (figura 19).



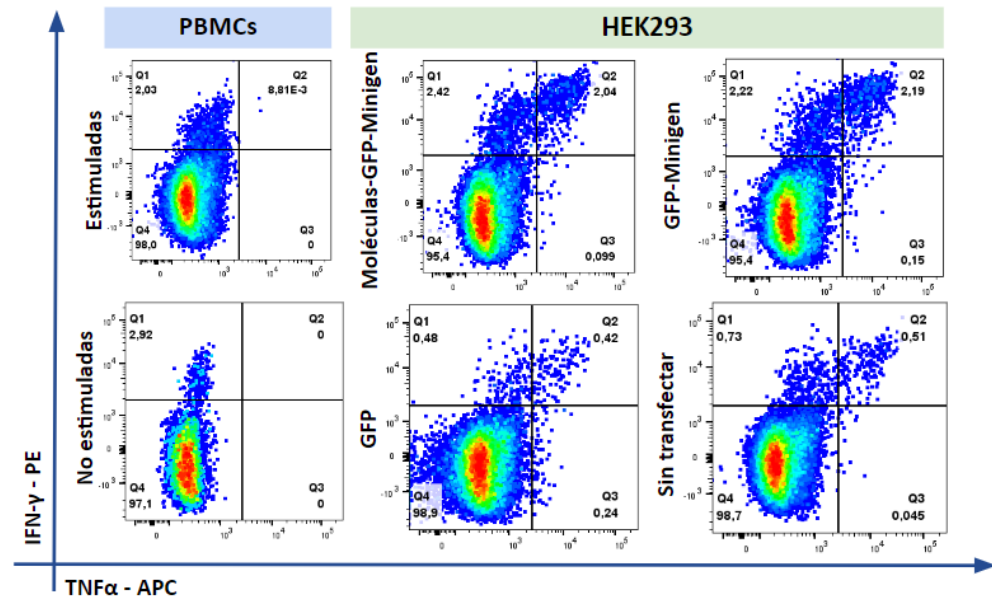
b)



c)



d)



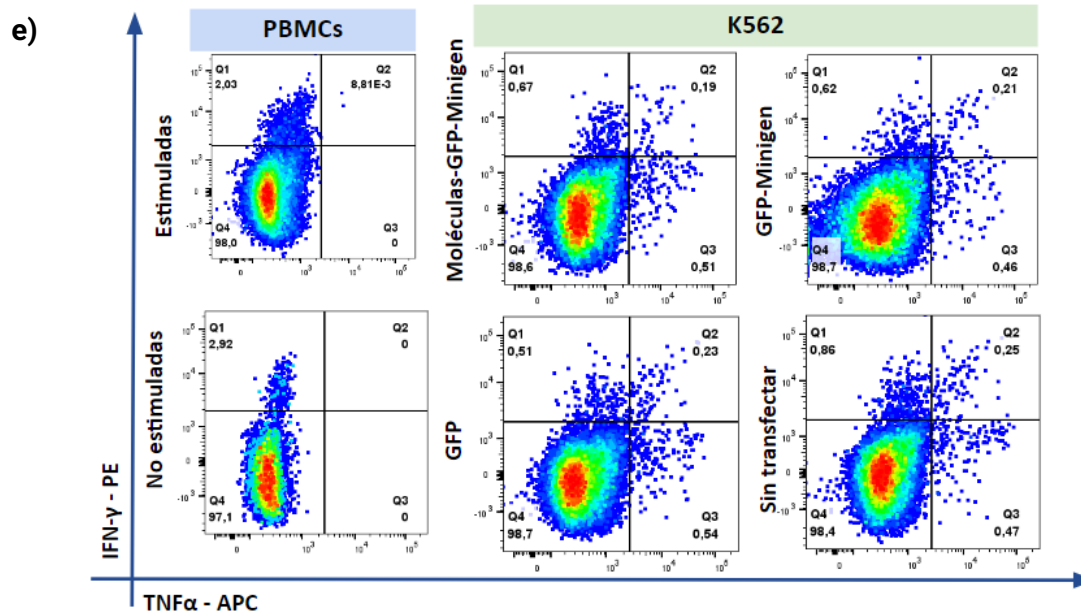


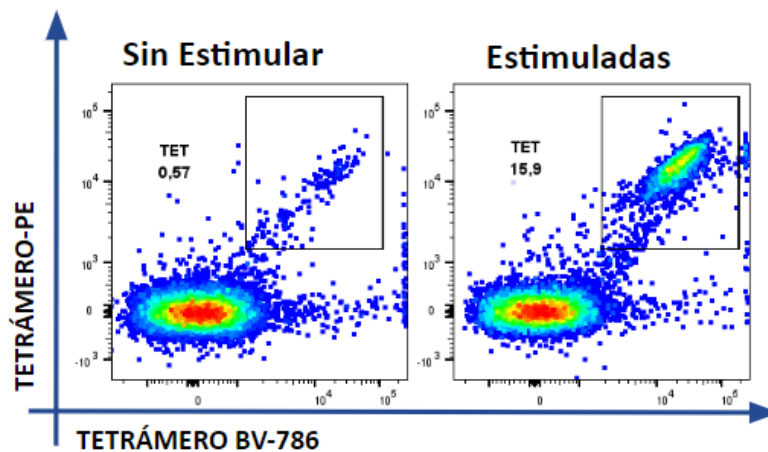
Figura 25 Expresión de citoquinas intracelulares de LT CD8+ de LAND 33 cocultivos con APCs autólogas o artificiales. A) Población tetrámero-positiva de LT CD8+ estimulados durante 9 días con el péptido corto pp65 de CMV comparado con células sin estimular. b) Expresión de CD80, CD83, CD137L y GFP en células HEK293 transfectadas por lipofectamina con estas moléculas, GFP-Minigen y GFP. c) Expresión de citoquinas intracelulares de LT-CD8 + cocultivos con DCs autólogas transfectadas por lipofectamina con GFP-Minigen y solo GFP. d) Expresión de citoquinas intracelulares de LT-CD8+ cocultivos con HEK293 transfectadas por lipofectamina con las Moléculas-GFP-Minigen, con GFP-Minigen y solo con GFP. e) Expresión de citoquinas intracelulares de LT-CD8 + cocultivos con K562 transfectadas por lipofectamina con las Moléculas-GFP-Minigen, solo con GFP-Minigen y solo con GFP. Como control positivo se utilizaron PBMCS autólogas pulsadas con el péptido corto pp65 de CMV, como control negativo se utilizaron PBMCS sin estimular y células HEK293T sin transfectar.

Luego de observar las diferencias presentadas en estos dos donantes se decidió evidenciar la producción de las citoquinas en un tercer donante. Se evaluó LAND-42, que al igual que el anterior es homocigoto para HLA-A*02:01 y se encontró una población de LT-CD8+ CMV+ del 15,9% por marcación con tetrámero (Figura 26 a). En este caso se utilizaron como aAPCs células HEK293 y células K562. Se evidenció que el uso de las moléculas estimula una población de LT-CD8+ IFN- γ + TNF α + 1,4 veces menor a la estimulada por las HEK293 GFP-Minigen. Asimismo, se evidenció que la población de LT-CD8+ IFN- γ + estimulada por las células transfectadas con GFP-Minigen es 1,2 veces mayor que la estimulada con las células transfectadas con las Moléculas-GFP-Minigen. Así como en los casos anteriores, no se evidencia población de LT-CD8+ TNF α +.

Además de esto, se utilizaron células HEK293 transducidas con el vector adenoviral; en este caso, se observaron poblaciones muy similares a las que se presentaron en el cocultivo con células sin transfectar o solo transfectadas con GFP. Este resultado, que concuerda con lo encontrado con el donante LAND-13, nos lleva a concluir que células HEK293 transducidas con el adenovirus recombinante no presentan antígenos codificados en el minigen. En el caso de los cocultivos con las células transfectadas, se observó que la producción de las citoquinas está condicionada a la presentación del antígeno, ya que en los cocultivos en donde las células HEK293 no fueron transfectadas con el minigen, no se evidenció expansión de LT-CD8+ reactivos para las epítopes codificadas en el minigen.

Para el caso de las células K562, con este donante ocurrió lo mismo que con el donante anterior cuando se utilizaron estas células transfectadas como APCs, no se observaron poblaciones de LT-CD8+ que expresaran alguna citoquina o poblaciones doble positivas. Esto puede deberse a la baja eficiencia de transfección que se alcanza con esta línea celular. El donante LAND-42 se utilizó para realizar 3 réplicas en donde se encontraron resultados similares a los descritos anteriormente (figura suplementaria 12).

a)



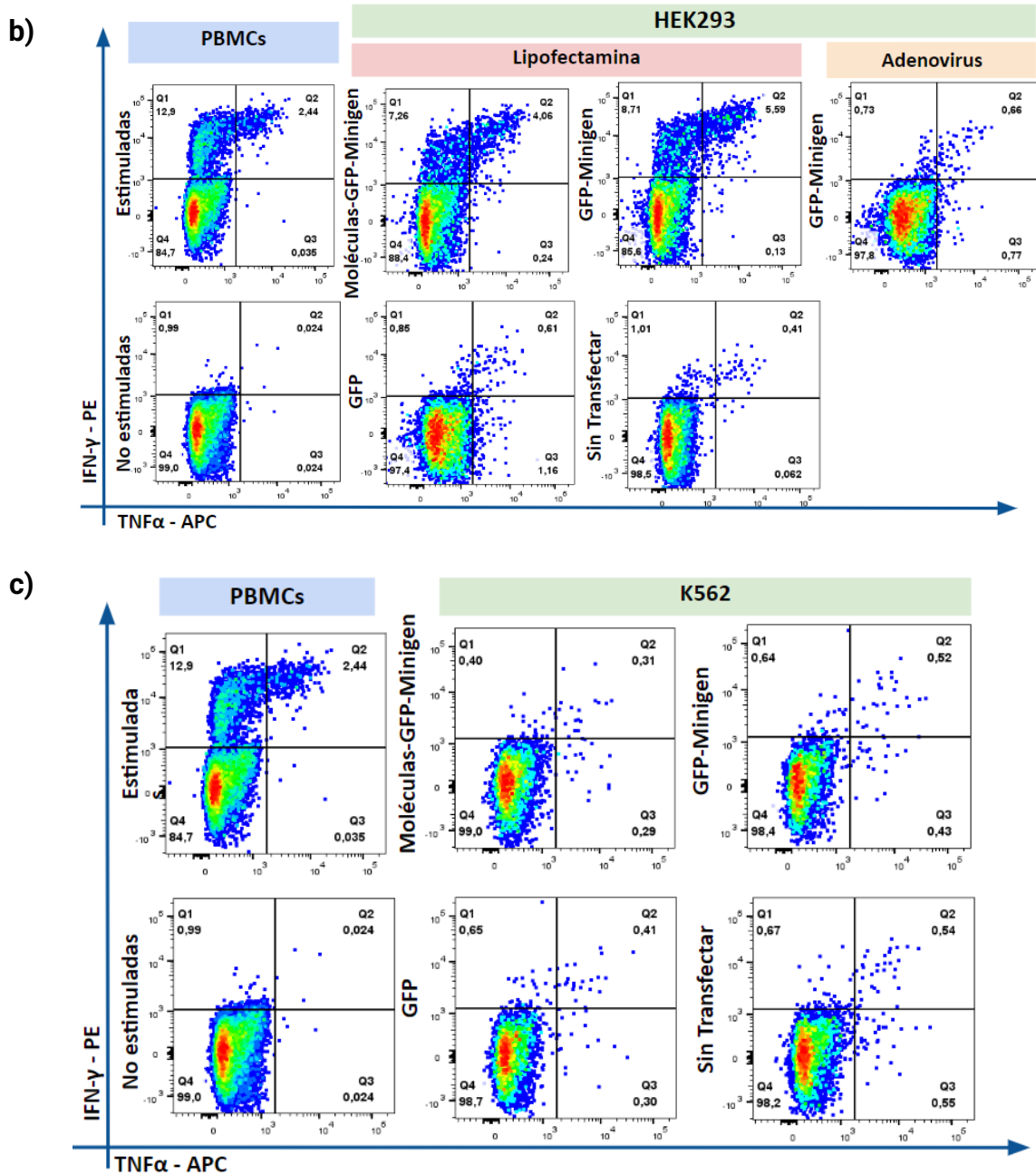


Figura 26 Expresión de citoquinas intracelulares de LT CD8+ de LAND 42 re-estimulados con APCs autólogas o artificiales. a) Población tetrámero-positiva de LT CD8+ estimulados durante 9 días con el péptido corto pp65 de CMV comparado con células sin estimular. b) Expresión de citoquinas intracelulares de LT-CD8 + cocultivados con HEK293 transfectadas por lipofectamina con las Moléculas-GFP-Minigen, con GFP-Minigen y solo con GFP; y células HEK293 transducidas con el vector adenoviral que expresa GFP-Minigen. c) Expresión de citoquinas intracelulares de LT-CD8 + cocultivados con K562 transfectadas por lipofectamina con Moléculas-GFP-Minigen, con GFP-Minigen y solo con GFP. Como control positivo se utilizaron PBMCs autólogas pulsadas con el péptido corto pp65 de CMV, como control negativo se utilizaron PBMCs sin estimular y células HEK293T sin transfectar.

La figura 27 muestra resultados de las veces de incremento (fold change) de las poblaciones de LT-CD8⁺ productoras de IFN- γ + TNF α +, IFN- γ + o TNF- α + del donante LAND-33 y las tres réplicas del donante LAND-42 con respecto a las células HEK293 sin transfectar. Para las dos primeras poblaciones, se evidencia una expresión de estas citoquinas específica de la presencia del antígeno, pues se observan diferencias significativas con las células transfectadas solo con GFP. También se observa que no hay diferencias significativas entre el cocultivo con células transfectadas con las Moléculas-GFP-Minigen y el cocultivo con GFP-Minigen, lo que sugiere que para donantes sanos la transfección de las moléculas coestimuladoras no confiere una ventaja en cuanto a expresión de citoquinas intracelulares. Es importante anotar que tampoco se presentan diferencias significativas entre los cocultivos que tienen el minigen y las PBMCs estimuladas, sin embargo, se observa una tendencia de una mayor producción de estas citoquinas por parte del control positivo. Finalmente, se presenta la mayor producción de TNF- α + en el cocultivo de células transfectadas solo con GFP.

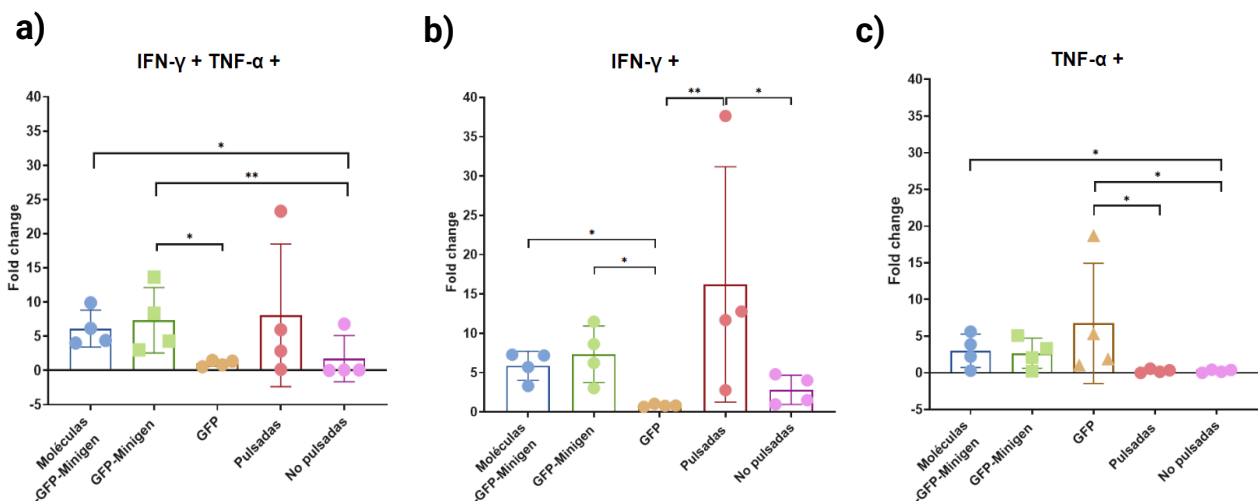


Figura 27 Expresión de citoquinas intracelulares de LT CD8⁺ de donantes sanos cocultivados con células HEK293 como APCs. Diagramas de barras representativos de las veces de incremento o fold change de poblaciones de LT CD8⁺ IFN- γ +TNF α + (a), IFN- γ +TNF α - (b) e IFN- γ -TNF α + (b) de 4 donantes sanos cocultivados con células HEK293 transfectadas con las Moléculas-GFP-Minigen, GFP-Minigen, solo GFP, sin transfectar y comparados con el control positivo, PBMCs estimuladas con la epítotope CD8 de CMV, y el control negativo, PBMCs sin estimular. El análisis estadístico de los grupos se llevó a cabo utilizando la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis, n=4, (p<0.05). Las barras representan réplicas experimentales independientes + SEM.

6.11 Evaluación de la producción de citoquinas intracelulares por LT CD8+ CMV+ co-cultivados con APCs transfectadas con el minigen

Luego de utilizar las células HEK293 transfectadas como aAPCs para estimular precursores de LT presentes en PBMCs de donantes sanos, se decidió partir de clones de LT CD8+ antígeno específicos para CMV, MART-1 y NY-ESO-1. Esto para evaluar el impacto que puedan tener las moléculas coestimuladoras en una población más grande de LT-CD8+ antígeno específicos.

Con estos clones se llevó a cabo una metodología distinta, estos fueron descongelados un día antes de ser utilizados, se dejaron en medio de cultivo AIM-V toda la noche y al día siguiente se llevó a cabo la evaluación de citoquinas intracelulares como se mencionó anteriormente. Luego de realizar la tinción con tetrámero de LT-CD8+ específicos contra la epítotope de CMV, se encontró una población cercana al 80% de LT-CD8+ CMV+ (Figura 28 a). Cuando estas células fueron utilizadas en cocultivo con las aAPCs co-transfectadas con plásmidos codificantes para las moléculas coestimuladoras CD80, CD83, CD137L y la fusión de GFP con el minigen (Moléculas-GFP-Minigen), se evidenció una expansión 1,19 veces mayor de IFN- γ + (15%) comparado con el cocultivo de las APCs transfectadas con GFP-minigen (13%). Por el contrario, la población IFN- γ + TNF- α + estimulada por las APCs GFP-Minigen fue mayor (52,9%) que la población estimulada por las APCs Moléculas-GFP-Minigen (28,5%). La población de LT-CD8+ TNF- α + es discreta comparada con las dos poblaciones anteriormente descritas, sin embargo, se observa un aumento de la expresión de esta citoquina en los cocultivos que tienen presencia del minigen versus el control positivo. Un aspecto importante es que no se observa una respuesta inespecífica por la presencia de las células HEK293 debido a que no se evidencian LT-CD8+ CMV+ que expresen alguna de las citoquinas o ambas simultáneamente (Figura 28 b).

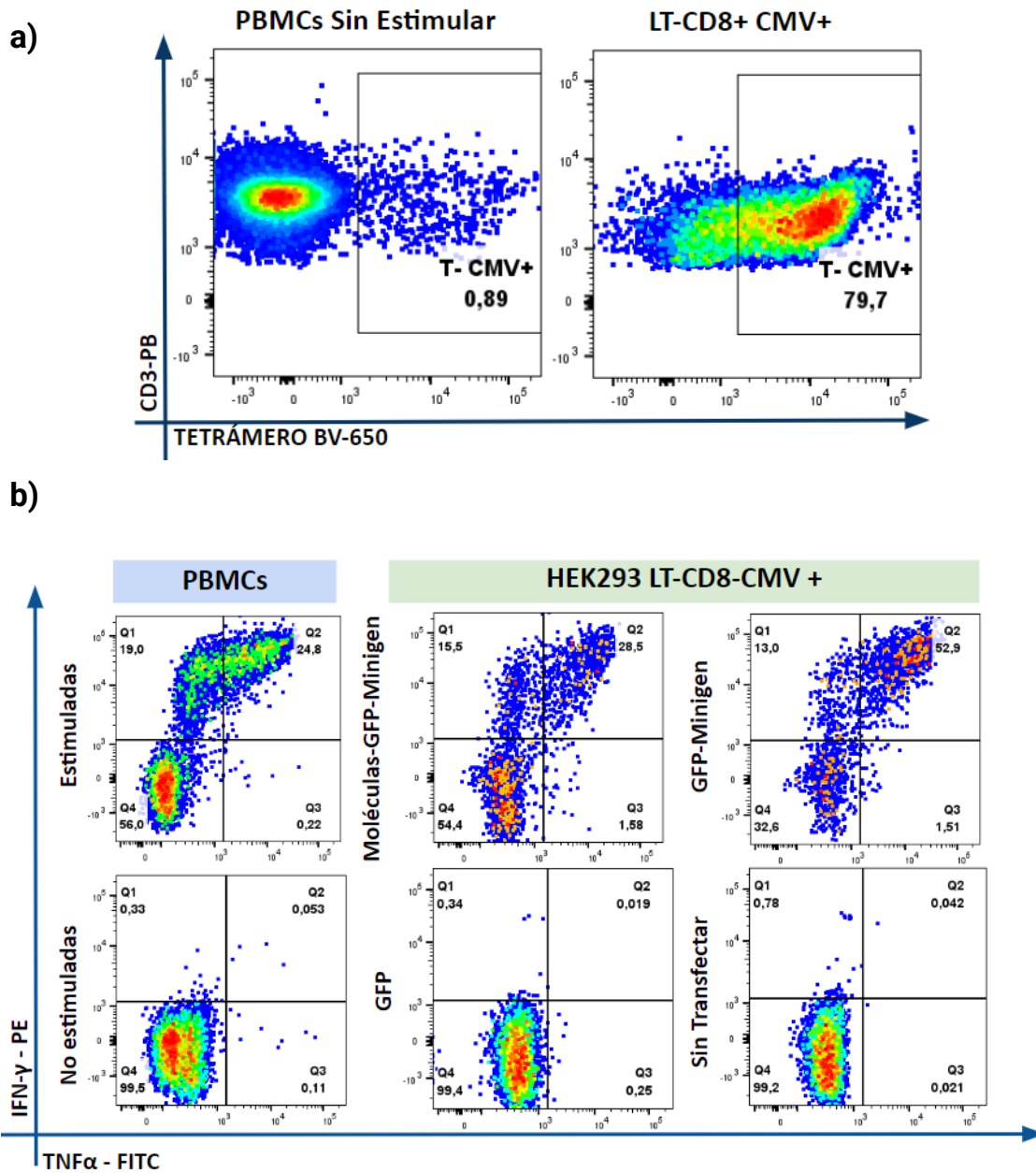
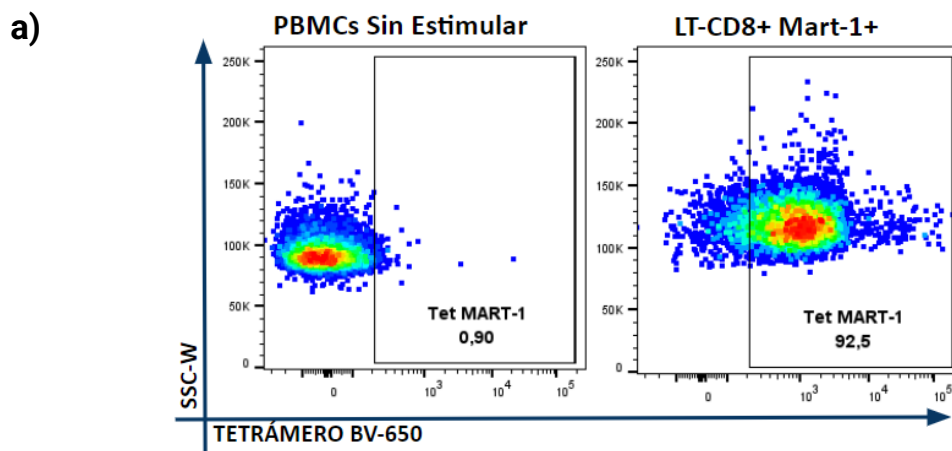


Figura 28 Expresión de IFN- γ + TNF- α + de LT-CD8-CMV+ en cocultivo con APCs transfectadas con Minigen y moléculas coestimuladoras. a) Población tetrámero-positiva de clones de LT CD8+ CMV + comparado con PBMCs sin estimular. b) Expresión de citoquinas intracelulares de LT CD8 + CMV + cocultivados con HEK293 transfectadas por lipofectamina con Moléculas-GFP-Minigen, con GFP-Minigen y solo con GFP. Como control positivo se utilizaron PBMCs autólogas pulsadas con el péptido corto pp65 de CMV, como control negativo se utilizaron PBMCs sin estimular.

Adicionalmente, se utilizaron clones de LT-CD8-MART-1+ para comprobar que otros antígenos presentes en el minigen son presentados por las APCs transfectadas. Al seguir el protocolo que se mencionó con los clones para CMV, se observó que las

aAPCs transfectadas con las Moléculas-GFP-Minigen estimulan una población de IFN- γ + menor (21,1%) que las APCs GFP-Minigen (32,6%), al igual que la población TNF α +, (2,61% vs 4,10%) contrario a lo que se observó en con los LT-CD8-CMV+. Además, la población IFN- γ + en ambos casos fue mayor a la observada cuando se utilizaron como control positivo las PBMCs pulsadas con péptido. La población doble positiva permanece similar en ambos casos (aproximadamente 15 %) y es mayor a la que se evidencia en el control positivo (12,5%) (Figura 29). Esto sugiere que las células HEK293 presentan una mayor eficiencia de presentación que las APCs presentes en PBMCs, pero como ya fue observado en resultados de experimentos previos, midiendo la expansión de LT-CD8+ específicos de antígeno, no fue posible atribuirle un claro beneficio a la co-transfección de las HEK293 con plásmido codificante de las moléculas coestimuladoras cuando se les utiliza como aAPCs.

Por otro lado, no se encontró respuesta inespecífica con el uso de las células HEK293 transfectadas, puesto que, en el cocultivo de las APCs transfectadas con GFP ni con las APCs sin transfectar se evidenció población reactiva de LT-CD8+ a los antígenos codificados en el minigen.



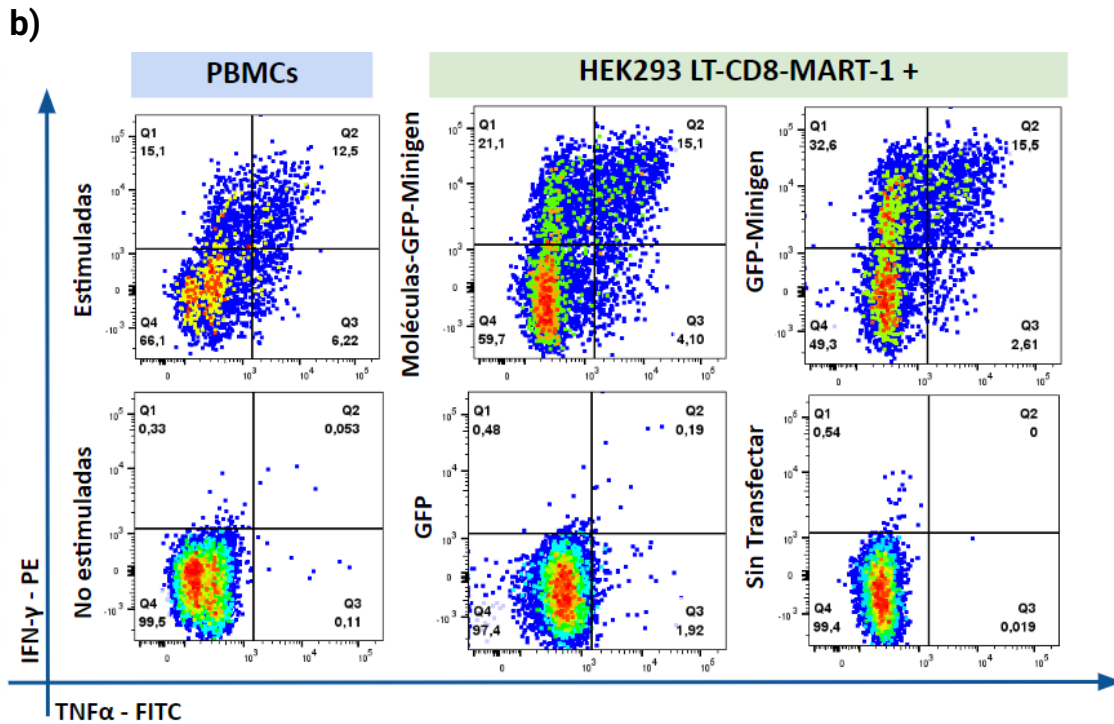


Figura 29 Expresión de IFN- γ + TNF- α + de LT-CD8-Mart-1+ en cocultivo con APCs transfectadas con Minigen y moléculas coestimuladoras. a) Población tetrámero-positiva de clones de LT CD8+ Mart-1 + comparado con PBMCs sin estimular. b) Expresión de citoquinas intracelulares de LT CD8 + Mart-1 + cocultivados con HEK293 transfectadas por lipofectamina con Moléculas-GFP-Minigen, con GFP-Minigen y solo con GFP. Como control positivo se utilizaron PBMCs autólogas pulsadas con el péptido corto de Melan-A, como control negativo se utilizaron PBMCs sin estimular.

Este experimento se repitió una segunda vez con resultados similares (Figura 30), se encontró una población de 92% de LT-CD8+ Mart-1+. Al igual que en caso anterior la expresión de IFN- γ + y de IFN- γ + y TNF- α + simultáneamente es mayor en ambos tratamientos que contienen el minigen comparados con el control positivo. En este experimento se comprobó una vez más que la expresión de citoquinas intracelulares depende de la transfección del minigen codificando el antígeno, pues en cocultivos de LT-CD8+ estimulados con células no transfectadas con el minigen, no se observaron poblaciones de LT CD8+ productores de citoquinas. Algo a resaltar es que la población de LT-CD8+ Mart-1+ en este caso fue 14 veces mayor que la réplica anterior en los cocultivos de células HEK293 transfectadas con el minigen y 11 veces mayor en PBMCs estimuladas. Esto se le puede atribuir a que se utilizaron diferentes clones en la réplica de este experimento.

Al comparar el rendimiento de las células HEK293 con respecto al control positivo, PBMCs estimuladas con la epítpe HLA-A*0201 de Mart-1, se observa que el cocultivo con las células HEK293 transfectadas con GFP-Minigen estimula una población de células polifuncionales mayor que las PBMCs al igual que una población de LT-CD8 IFN- γ +. Adicionalmente, se encontró que los clones son productores mayoritariamente de TNF- α + contrario a lo que se ha observado en los resultados anteriores.

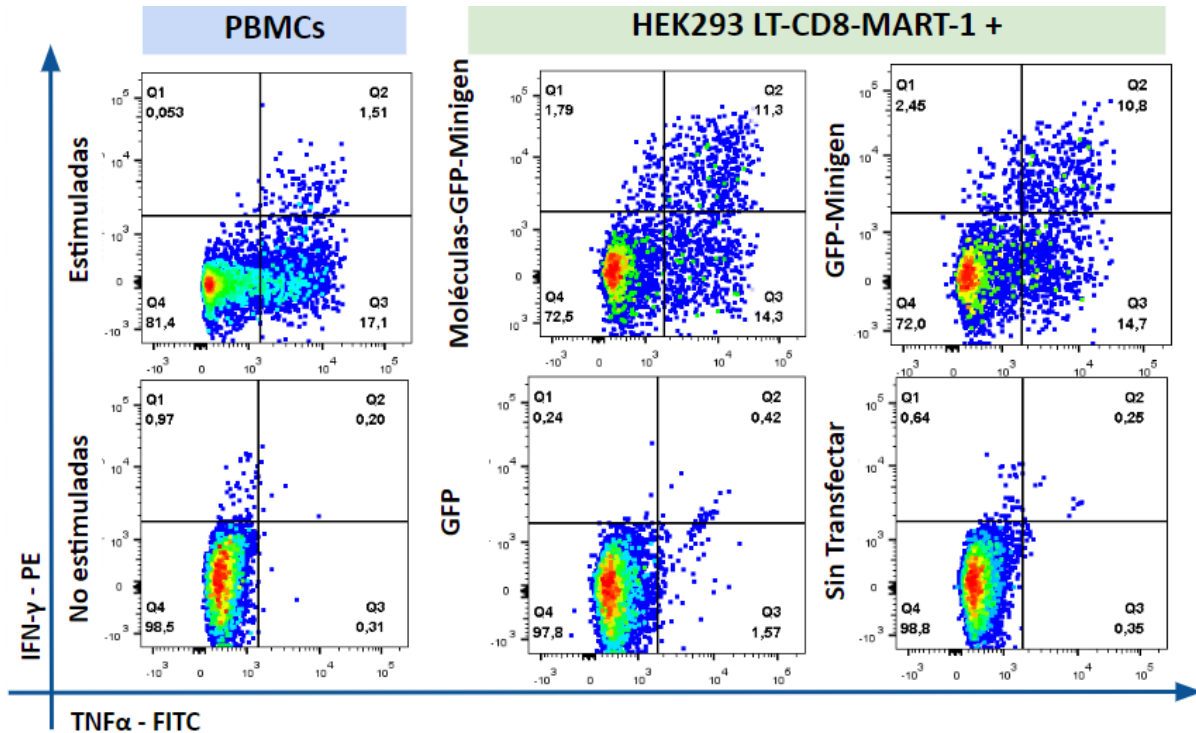
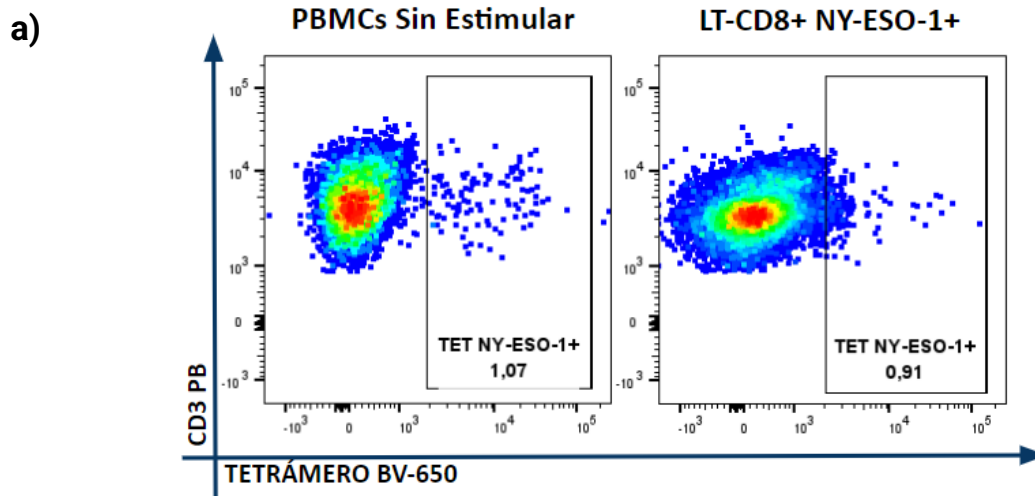


Figura 30 Expresión de IFN- γ + TNF- α + en el clono BC-25 de LT-CD8-Mart-1+ en cocultivo con APCs transfectadas con Minigen y moléculas. Expresión de citoquinas intracelulares del clono BC 25 de LT CD8 + Mart-1 + cocultivados con HEK293 transfectadas por lipofectamina con Moléculas-GFP-Minigen, con GFP-Minigen y solo con GFP. Como control positivo se utilizaron PBMCs autólogas pulsadas con el péptido corto de Melan-A, como control negativo se utilizaron PBMCs sin estimular.

Finalmente, se utilizaron clones de LT-CD8 específicos para la epítpe HLA-A2 de NY-ESO-1+ utilizando la misma metodología. En este caso, no se encontró una población de LT-CD8 tetrámero positiva (Figura 31 a) y tampoco se observaron poblaciones de LT-CD8+ productores de citoquinas intracelulares en el cocultivo con aAPCs que contienen

el minigen. Se evidenció una población de LTCD8+ IFN- γ + inespecífica, que está presente incluso en el cocultivo con células HEK293 sin transfectar. En el control positivo, que corresponden a PBMCs pulsadas con el péptido corto de NY-ESO-1 y en el control negativo, PBMCs sin estimular se observa el mismo fenómeno, una población de LT-CD8 + productores de IFN- γ + independientemente de la presencia del antígeno (Figura 31).

Algo interesante a destacar es que al cocultivar los LT-CD8 NY-ESO-1+ con mDCs estimuladas con el péptido de NY-ESO-1 (que corresponde a la misma secuencia que se encuentra en el minigen) no se observaron poblaciones productoras de citoquinas intracelulares, pero cuando se realizó el cocultivo con mDCs estimuladas con un péptido largo, que contiene la secuencia de la epítotope CD8, sí se evidenciaron poblaciones productoras de una y dos citoquinas. Esto permite inferir que el clono utilizado no es reactivo al nonamero utilizado (codificado en el minigen), por el contrario, responde al estímulo de una epítotope CD8+ que se encuentra comprendida dentro del péptido de 25 aminoácidos.



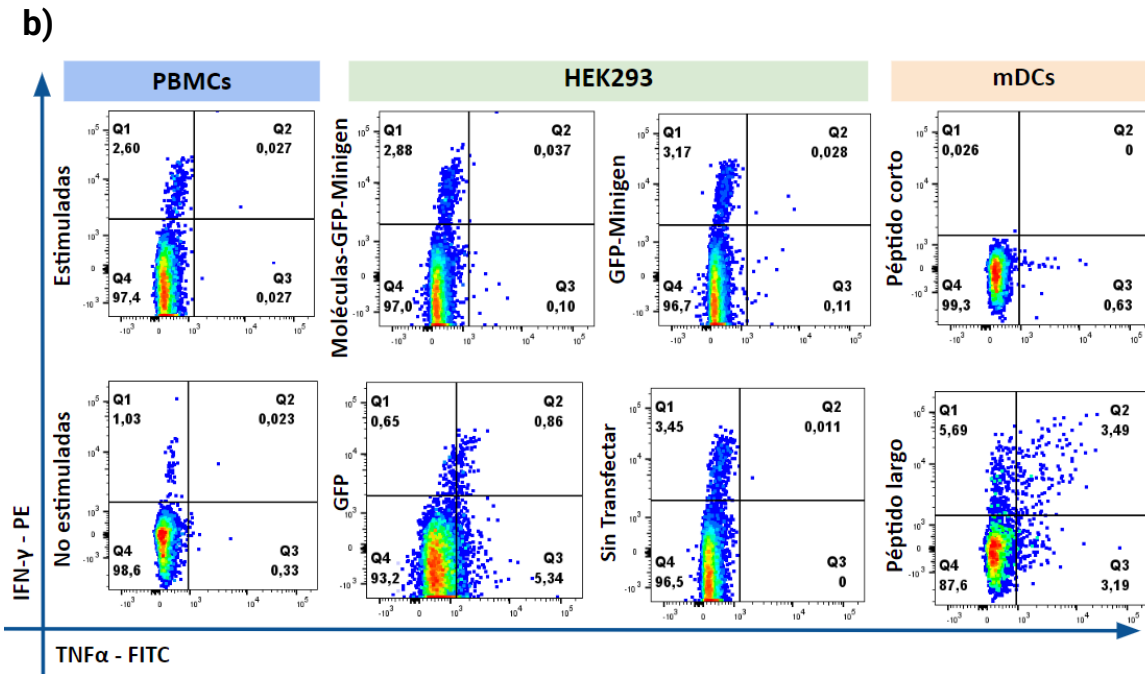


Figura 31 Expresión de IFN- γ + TNF- α + de LT-CD8-NY-ESO-1+ en cocultivo con APCs transfectadas con Minigen y moléculas coestimuladoras. a) Población tetrámero-positiva de clones de LT CD8+ NY-ESO-1 + comparado con PBMCs sin estimular. b) Expresión de citoquinas intracelulares de LT CD8 + Mart-1 + cocultivados con HEK293 transfectadas por lipofectamina con Moléculas-GFP-Minigen, con GFP-Minigen y solo con GFP. Como control positivo se utilizaron PBMCs autólogas pulsadas con el péptido corto de NY-ESO-1, como control negativo se utilizaron PBMCs sin estimular.

La figura 32 muestra las veces de incremento (fold change) de las poblaciones de LT-CD8+ productoras de IFN- γ + TNF α +, IFN- γ + o TNF- α + de los clones de LT-CD8+ mostrados anteriormente, con respecto a las células HEK293 sin transfectar. En ninguno de los casos se encontraron estadísticamente significativas, pero se observa para las tres poblaciones se evidencia una expresión de estas citoquinas dependientes de la presencia del minigen.

Al igual que con los donantes sanos, no hay diferencias significativas entre el cocultivo con células transfectadas con las Moléculas-GFP-Minigen y el cocultivo con GFP-Minigen, lo que sugiere que con los clones al igual que con la expansión de LT-CD8+ específicos de antígeno presentes en PBMCs, la cotransfección de las moléculas

coestimuladoras no confiere ventaja a las aAPCs para promover la producción de citoquinas intracelulares.

Es importante anotar que tampoco se observaron diferencias significativas entre los cocultivos que de APCs transfectadas con el minigen y las PBMCs pulsadas con el péptido, no obstante, se observa una tendencia en las dos primeras poblaciones (Figura 32 a y b) de una mayor producción de estas citoquinas por parte de LT-CD8+ cocultivados con células HEK293 transfectadas con GFP-Minigen que el control positivo. En cuanto a la población de LT-CD8+ TNF- α + se evidencia una tendencia de mayor expresión en el control positivo.

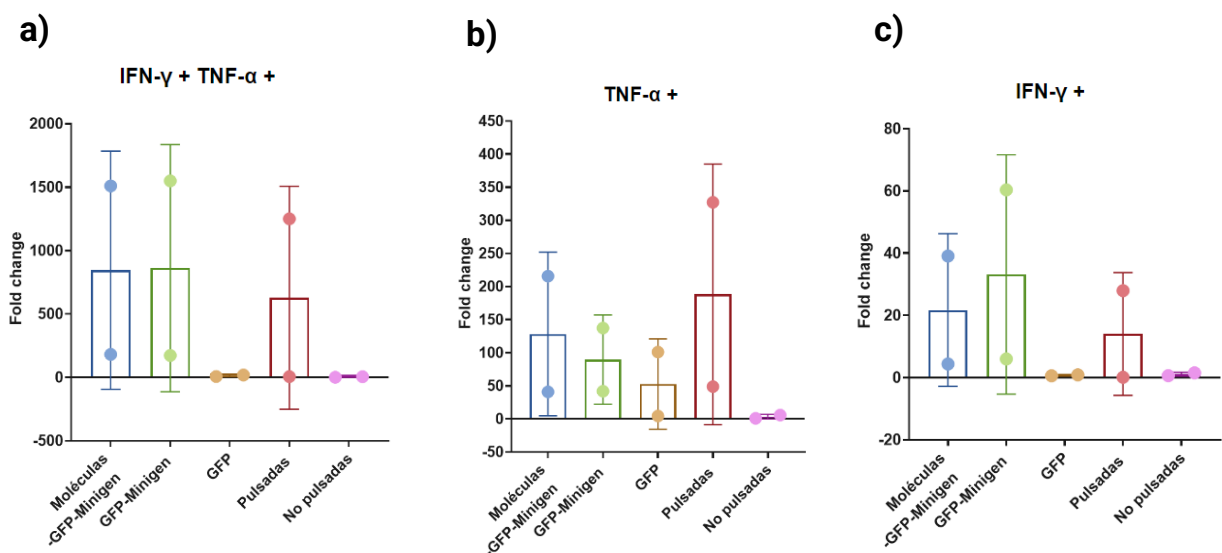


Figura 32 Expresión de citoquinas intracelulares de LT CD8+ Mart-1 cocultivados con células HEK293 como APCs. Diagramas de barras representativos de las veces de incremento o fold change de poblaciones de LT CD8+ IFN- γ +TNF α + (a), IFN- γ +TNF α - (b) e IFN- γ -TNF α + (b) de LT-CD8+ Mart-1 + cocultivados con células HEK293 transfectadas con las Moléculas-GFP-Minigen, GFP-Minigen, solo GFP, sin transfectar y comparados con el control positivo, PBMCs estimuladas con la epítote CD8 de Mart-1, y el control negativo, PBMCs sin estimular. El análisis estadístico de los grupos se llevó a cabo utilizando la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis, n=4, ($p < 0.05$). Las barras representan réplicas experimentales independientes + SEM.

Adicionalmente, se evaluó la capacidad citotóxica de los LT CD8+ Mart-1 en cocultivo a partir de la producción de Granzima B. Se identificó una población de LT CD8+ Granzima B+ del 40% en aquellos que se cocultivaron con células HEK293 transfectadas con las Moléculas-GFP-Minigen y de un 49% en los LT-CD8+ cocultivados

con células transfectadas con GFP-Minigen. Estos resultados sugieren que el fenotipo citotóxico de este clon evidenciado en estos experimentos fue dependiente del antígeno ya que hubo 6,9 veces y 9,3 veces más producción de GRANZIMA B en los cocultivos que tienen con células HEK293 transfectadas con el minigen, comparado con células transfectadas solo con GFP o sin transfectar (Figura 33).

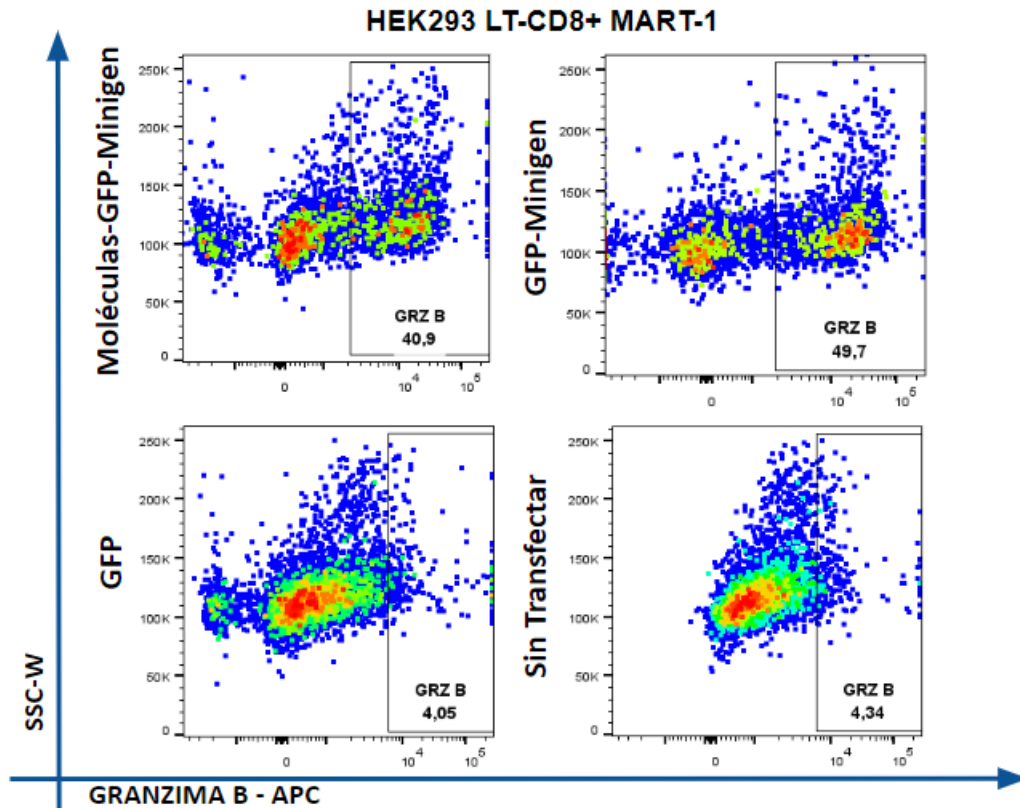


Figura 33 Evaluación de la expresión de Granzima B en LT CD8+ Mart-1+ cocultivos con células HEK293 transfectadas. Población de LT-CD8+ Mart-1+ que luego de ser cocultivadas con células HEK293 transfectadas con las Moléculas-GFP-Minigen, con GFP-Minigen y solo con GFP expresan Granzima B evaluada de manera intracelular por citometría de flujo. Esto se comparó con LT-CD8+ Mart-1+ cocultivos con células HEK293 sin transfectar.

6.12 Evaluación del inmunofenotipo de LT CD8+ co-cultivos con APCs transfectadas

Los donantes LAND-33 y LAND-42 que fueron utilizados para evaluar la producción de citoquinas intracelulares se emplearon para evidenciar el inmunofenotipo de los LT-CD8+ en cocultivo durante 24 horas con las aAPCs transfectadas con las Moléculas-GFP-Minigen, APCs transfectadas con GFP-Minigen, APCs transfectadas con GFP y se

comparó este inmunofenotipo con el de LTD-CD8+ estimulados con APCs sin transfectar. En este caso se utilizaron células HEK293 y células K562. Mientras el inmunofenotipo de activación fue evaluado mediante la expresión de los marcadores de activación CD25, CD137, CD154, OX40 y CD69, para evaluar el inmunofenotipo de agotamiento se monitoreó la expresión de CTLA-4, PD-1 y LAG-3. El cocultivo con las células K562, al igual que se observó en la sección anterior, reveló ausencia de la expresión diferencial de estos marcadores en respuesta a los antígenos presentes en el minigen (figura suplementaria 13).

En la figura 34 a, se muestra el porcentaje de células que expresan marcadores de activación y agotamiento en diferentes cocultivos de 3 réplicas realizadas con LT-CD8+ presentes en PBMCs del donante LAND42, que fueron cocultivados con células HEK293 transfectadas con las moléculas-GFP-Minigen y células HEK293 transfectadas solamente con el plásmido que codifica la proteína de fusión GFP-Minigen. Los resultados mostraron que la expresión de marcadores de activación como CD25, CD154 y OX40; y de agotamiento como LAG-3 fueron estimulados en mayor medida por las aAPCs que contenían las moléculas coestimuladoras. En el caso de los otros marcadores como CD69, PD-1 y CTLA-4, se observó que no hubo una tendencia clara en su expresión favorecida por la presentación del antígeno.

En cuanto a la expresión de CD137 fue muy similar en los LT-CD8+ que fueron cocultivados con células HEK293 transfectadas con las Moléculas-GFP-Minigen y aquellas que fueron transfectadas con GFP-Minigen, con tendencia a ser mayor comparado a su expresión en los LT-CD8+ de los cocultivos control. En cuanto a la expresión de CD25, se evidenció que su expresión es ligeramente mayor en células T cocultivadas con HEK293 transfectadas con los genes codificantes para las moléculas coestimuladoras. Esto mismo se observó con la expresión del marcador CD154, pues en el cocultivo con células HEK293 transfectadas con las Moléculas-GFP-Minigen, se estimuló una mayor expresión que con células transfectadas con GFP-Minigen, GFP o células sin transfectar.

La figura 34 b muestra que hubo una tendencia a una mayor expresión del marcador de agotamiento LAG-3 en el cocultivo con células HEK293 transfectadas con las

Moléculas-GFP-Minigen comparado con los demás cocultivos. En cuanto a los marcadores PD-1 y CTLA-4, hubo una mayor expresión en cocultivos con células transfectadas, comparado con las no transfectadas, pero no hubo una expresión diferencial dependiente de antígeno.

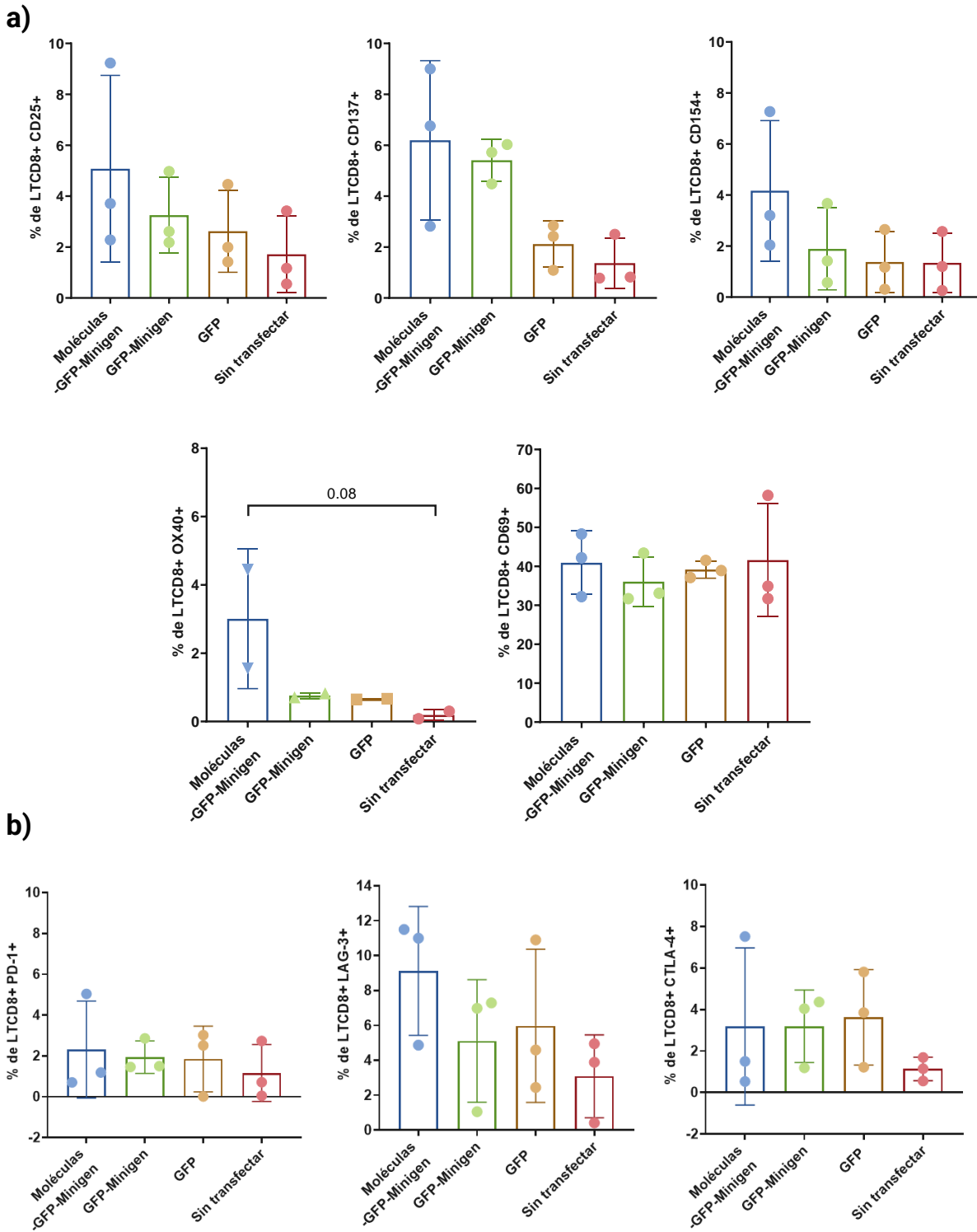


Figura 34 Expresión de marcadores de activación y agotamiento de LTCD8+ del donante LAND42 cocultivados con aAPCs transfectadas con el minigen. Caracterización del fenotipo de a) activación (Marcadores CD25, CD137, CD154, OX-40, CD69) y b) de agotamiento (Marcadores PD-1, CTLA-4 y LAG-3) de los LTCD8+ que fueron cocultivados con células HEK293 transfectadas con las moléculas-GFP-Minigen y células HEK293 transfectadas con la proteína de fusión GFP-Minigen, representado en el porcentaje de linfocitos T CD8+, Las barras representan réplicas experimentales independientes + SEM. Como control se utilizaron células HEK293 para determinar la expresión basal estimulada por la presencia de estas células heterólogas.

También se evaluó la expresión de estos marcadores en LT-CD8+ de los donantes LAND13 y LAND33 analizados con anterioridad a nivel de la expresión de citoquinas intracelulares. En la figura 35 se presenta el análisis de poblaciones de LT-CD8+ de los donantes LAND13, LAND33 y LAND42 en los marcadores que fueron medidos en común. Primero, en la figura 35 a) se pudo observar que las células HEK293 transfectadas con las Moléculas-GFP-Minigen estimularon una población CD137+ significativamente mayor con respecto a las células sin transfectar. Esto mismo se observó con las células transfectadas solo con la proteína de fusión GFP-Minigen. El análisis de la población LT-CD8+ CD154+ en estos tres donantes evidenció que, si bien no hubo diferencias con significancia estadística, si se observó una tendencia de una mayor expansión de esta población cuando los linfocitos fueron estimulados con células HEK293 transfectadas con plásmidos codificantes de moléculas coestimuladoras (CD80, CD83, CD137L), comparado con los demás tratamientos. En cuanto al marcador de activación temprana CD69, no se observó que su expresión fuera dependiente de la expresión del antígeno.

Por otro lado, se evaluó la expresión de los marcadores de agotamiento PD-1 y CTLA-4 (Figura 35 b). No se observó un aumento de la expresión de ninguno de estos dos marcadores por la presencia de las moléculas coestimuladoras ni del minigen, sin embargo, si se observó una menor población de LT-CD8+ que expresan estos marcadores en presencia solo de las células HEK293 sin transfectar.

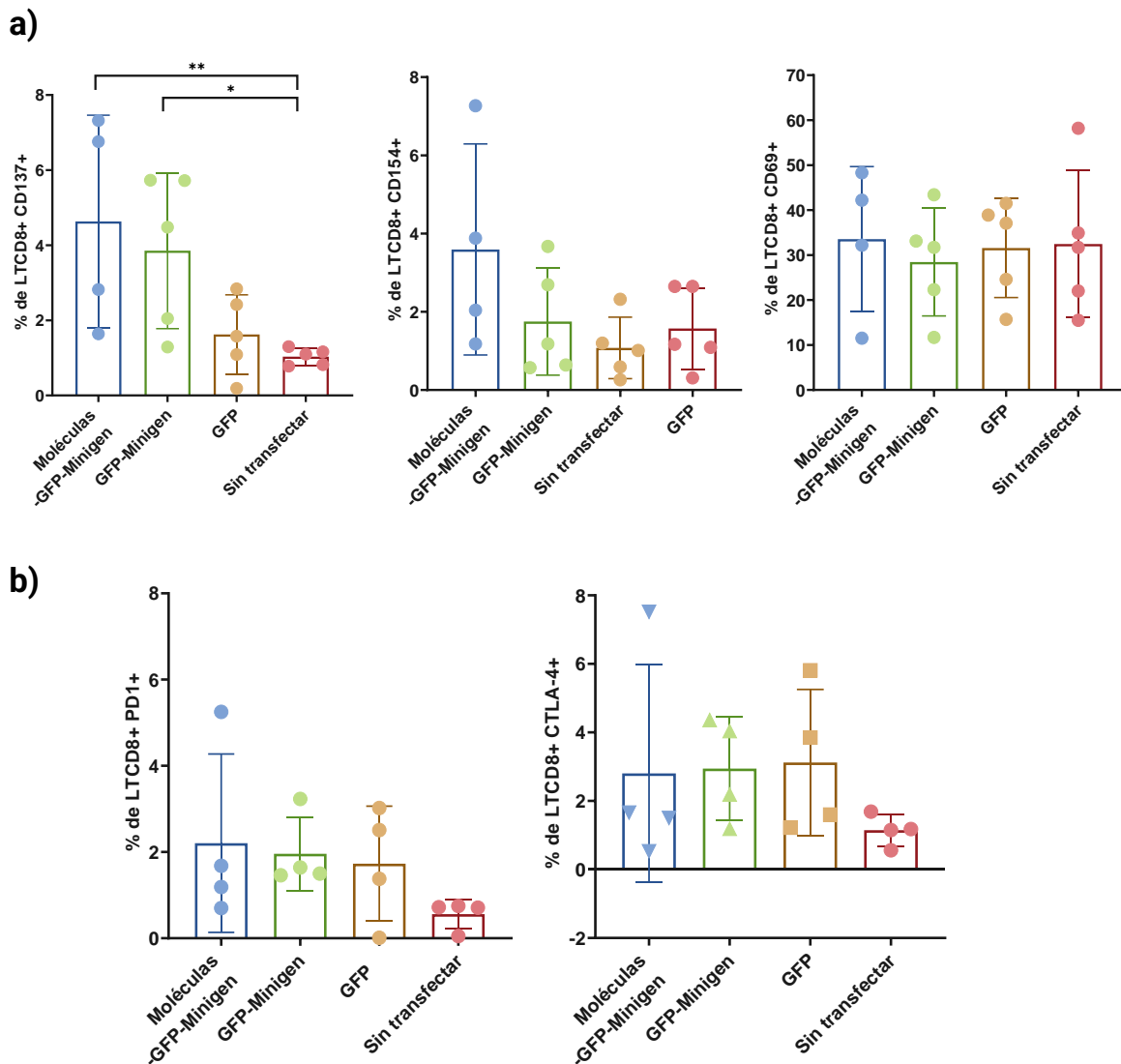


Figura 35 Expresión de marcadores de activación y agotamiento de LTCD8+ de donantes sanos HLA-A*02:01 cocultivados con aAPCs transfectadas con el minigen. Caracterización del fenotipo de a) activación (marcadores CD137, CD154, CD69) y b) agotamiento (Marcadores PD-1 y CTLA-4) de los LT-CD8+ que fueron cocultivados con células HEK293 transfectadas con las moléculas-GFP-Minigen y células HEK293 transfectadas con la proteína de fusión GFP-Minigen, representado en el porcentaje de linfocitos T CD8+, Las barras representan réplicas experimentales independientes + SEM. Como control se utilizaron células HEK293 para determinar la expresión basal estimulada por la presencia de estas células heterólogas.

Como parte del fenotipo de las células estimuladas se evaluó el perfil de subpoblaciones de memoria de LT-CD8+ expandidos con diferentes tipos de presentadoras en los diferentes donantes. Los LT-CD8+ muestran un perfil

mayoritariamente naive, en todos los casos, observándose que en el caso del cocultivo con células HEK293 transfectadas solo con GFP o sin transfectar disminuye la población naive y aumentan los linfocitos de memoria efectora y terminalmente diferenciados respectivamente (Figura 36).

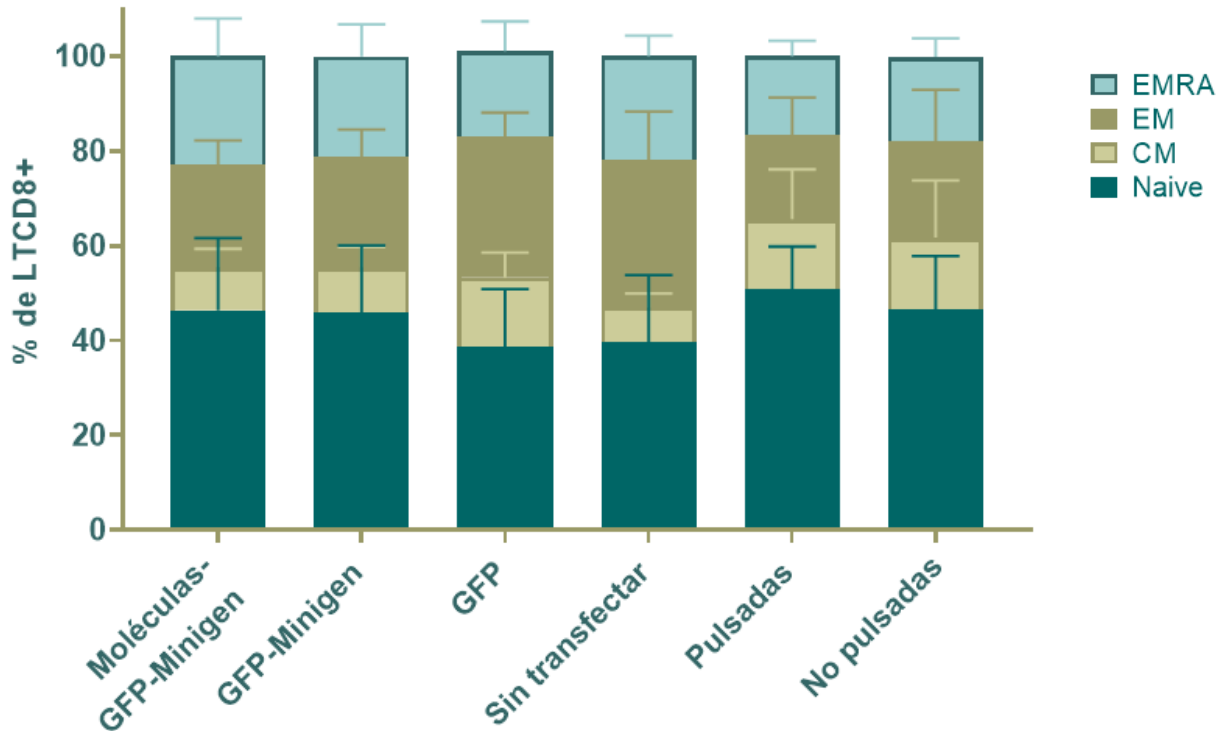
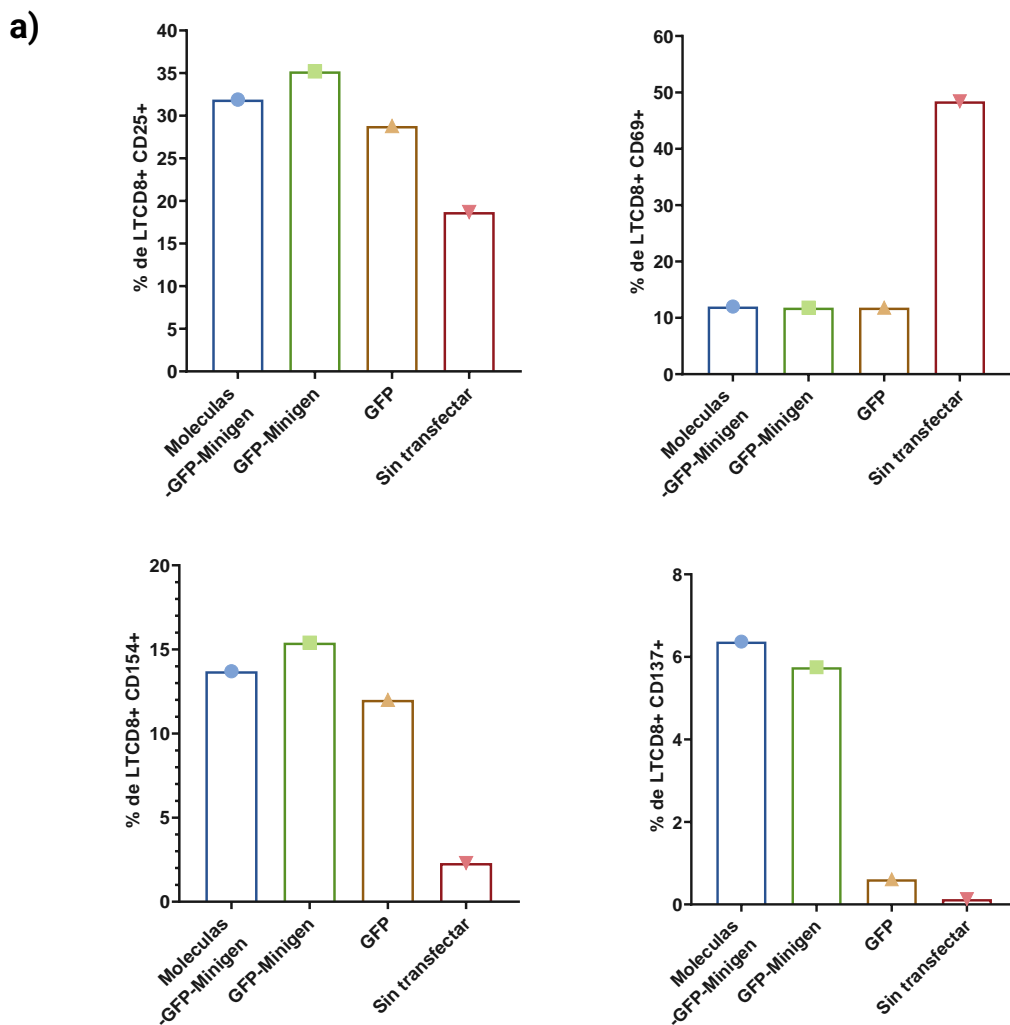


Figura 36 Perfil de memoria de LT CD8+ del donante LAND42 cocultivados con células HEK293 transfectadas. Los linfocitos T CD8+ fueron cocultivados con células HEK293 transfectadas con las Moléculas coestimuladoras CD80, CD83, CD137L y el minigen (Moléculas-GFP-Minigen), con el minigen (GFP-Minigen), con el plásmido pcDNA 3.1 – N-eGFP (GFP) y se comparan con las células sin transfectar, PBMCs autólogas estimuladas con el péptido y PBMCs sin estimular. Se analiza la expresión de CD45RO y CD62L para definir cuatro poblaciones Naive CD45RO – CD62L+, Memoria central CD45RO+ CD62L+ (CM), Efectoras de memoria CD45RO + CD62L- (EM) y terminalmente diferenciadas CD45RO – CD62L- (EMRA). Las barras corresponden a promedio + SEM.

Por otro lado, se evaluó el perfil de activación, memoria y agotamiento de los clones de linfocitos T CD8+ Mart-1+ cocultivados con las células HEK293 transfectadas y PBMCs pulsadas como control. Para el perfil de activación se probaron los marcadores CD25, CD137, CD154 y CD69, se observó que el cocultivo con células sin transfectar estimuló mayor expresión de CD69. Por otro lado, el cocultivo con células HEK293 transfectadas

con Moléculas-GFP-Minigen o transfectadas con solo GFP-Minigen evidenciaron una mayor expresión de CD137.

Por su parte, se monitoreó el fenotipo de agotamiento de estas células específicas de MART-1 midiendo cambios en la expresión de PD-1, CTLA-4 y LAG-3 en respuesta a los distintos tipos de células HEK293. Se evidenció que las células HEK293 sin transfectar estimulan la expansión de LT-CD8+ PD-1+. En cuanto al análisis de la expresión de CTLA-4 y LAG3 en estos linfocitos, los resultados sugieren que su expresión es estimulada de manera no específica por células HEK293 transfectadas con todos los constructos (Figura 37).



b)

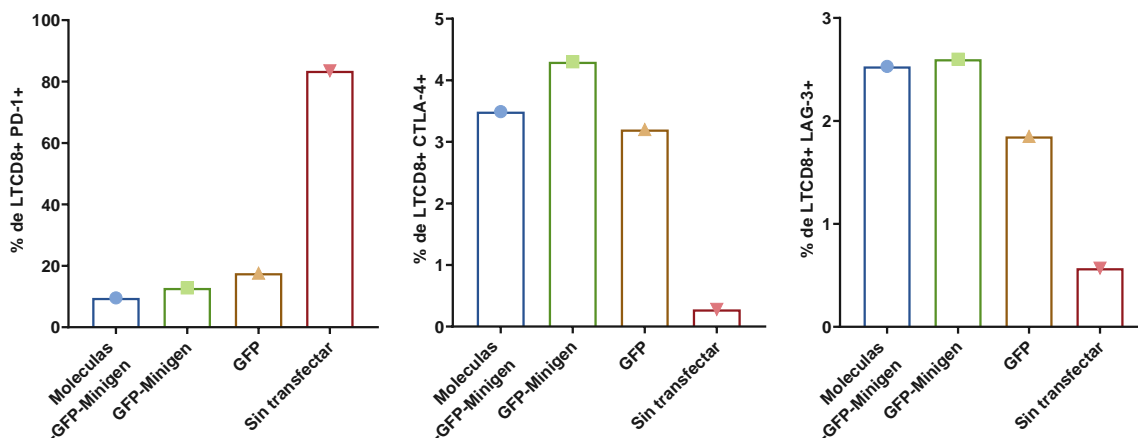


Figura 37 Expresión de marcadores de activación y agotamiento de LT-CD8+ MART-1+ cocultivos con aAPCs transfectadas con el minigen. Diagrama de barras que representa el porcentaje de LTCD8+ que fueron cocultivos con células HEK293 transfectadas con las moléculas-GFP-Minigen, células HEK293 transfectadas con GFP-Minigen y células transfectadas con GFP. Como control se utilizaron células HEK293 sin transfectar para determinar la expresión basal estimulada por la presencia de estas células heterólogas.

El análisis en condiciones basales del perfil de memoria del clon de LT CD8+ Mart-1+ analizado reveló que son células efectoras de memoria (ver células EM No pulsadas en figura 38). En respuesta al estímulo, se observó que las células cocultivos con células HEK293 transfectadas solo con GFP experimentaron la expansión de estas células EM. En contraste, las células transfectadas con las Moléculas-Minigen-GFP experimentaron una importante contracción de esta sub-población y se favoreció la expansión de células efectoras terminalmente diferenciadas sin cambio en el porcentaje de linfocitos vírgenes (ver porcentajes de TEMRA y Naive en figura 38), comparado con los demás tratamientos. Se evidenció también que el perfil de memoria de las células transfectadas solo con el minigen fue muy similar al que presentan estos linfocitos en cocultivo con las células sin transfectar.

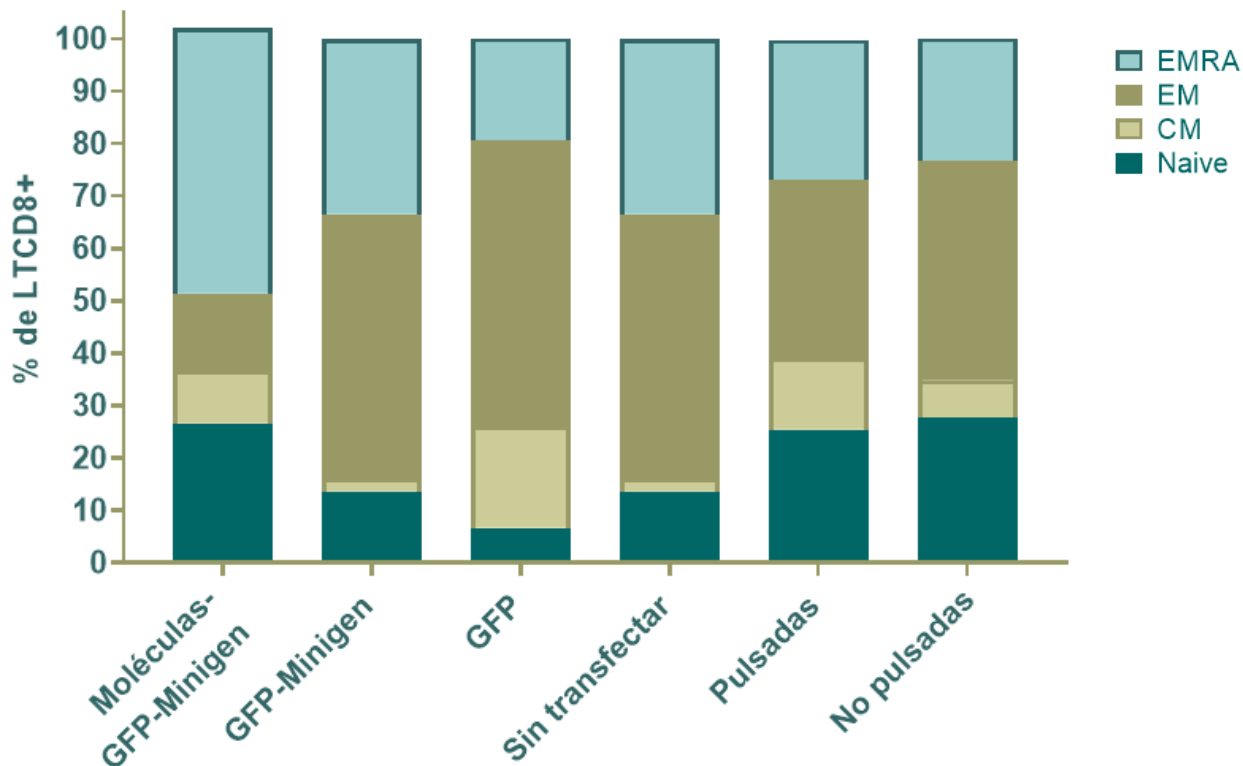


Figura 38 Perfil de memoria de LT-CD8+ Mart-1 cocultivados con células HEK293 transfectadas. Los linfocitos T CD8+ Mart-1 fueron cocultivados con células HEK293 transfectadas con las Moléculas coestimuladoras CD80, CD83, CD137L y el minigen (Moléculas-GFP-Minigen), con el minigen (GFP-Minigen), con el plásmido pcDNA 3.1 – N-eGFP (GFP) y se comparan con las células sin transfectar, PBMCs autólogas estimuladas con el péptido y PBMCs sin estimular. Se analiza la expresión de CD45RO y CD62L para definir cuatro poblaciones Naive CD45RO – CD62L+, Memoria central CD45RO+ CD62L+ (CM), Efectoras de memoria CD45RO + CD62L- (EM) y terminalmente diferenciadas CD45RO – CD62L- (EMRA).

6.13 Análisis automatizado de linfocitos T con fenotipos definidos, evaluados por identificación, caracterización y regresión de clústeres (CITRUS)

El análisis de identificación, caracterización y regresión de clústeres (CITRUS) es un sistema de análisis multidimensional para datos de citometría de flujo diseñado con el fin de descubrir poblaciones con firmas biológicas estadísticamente significativas. Este agrupa poblaciones celulares fenotípicamente similares utilizando un análisis jerárquico. Dentro de estos clústeres se calculan las características biológicas y se emplean algoritmos de aprendizaje para determinar las poblaciones que mejor predicen

el grupo de criterios que se le otorga a una muestra determinada. CITRUS a diferencia de otros algoritmos permite identificar si existen diferencias estadísticas entre los grupos de clusters de células con fenotipos definidos por la coextrusión simultánea de varios marcadores utilizando los modelos estadísticos PAM (prediction analysis microarray) y SAM (significance analysis of microarrays).

Se realizó este análisis para la expresión de marcadores de activación y agotamiento en los LT-CD8+ del donante LAND-42 debido a que, como se mencionó anteriormente, con este donante se realizaron 3 réplicas. Para esto, se analizaron las diferencias entre el cocultivo con células HEK293 transfectadas con las Moléculas-GFP-Minigen versus las células transfectadas con GFP-Minigen para evaluar si el uso de moléculas coestimuladoras favorecía la activación de LT-CD8+ de manera distinta a como lo hacen las células que no expresan estas moléculas.

Se encontraron tres poblaciones de LT-CD8+ CD3+CD8+ que presentan diferencias estadísticamente significativas teniendo en cuenta el modelo PMA. El análisis arrojó una gráfica que indica la calidad de predicción del modelo (Figura 39 a), en este se observa en rojo la tasa de error estimada para cada modelo a medida que se utilizan diferentes umbrales que puede tomar valores de 0 a 100% en donde 0 % significa un valor predictivo perfecto; y la tasa de error del descubrimiento de falsos positivos que en este caso requiere 8 o más agrupaciones para comenzar a descubrir falsos positivos en el modelo.

Además se observan tres modelos, cv.min (punto verde) que indica los clústeres que se diferencian con la menor tasa de error, cv,1se (diamante naranja) que representa el modelo más simple con una tasa de error de 1; y cv.fdr.constrained (triángulo amarillo) es el modelo con mayor número de clústeres con una tasa de falsos positivos menor a 1. En este caso solo se observan los resultados de este último modelo porque los otros dos tuvieron un valor de cero. Adicionalmente, se obtuvo el fenotipo de todos los grupos celulares en cuanto a marcadores de activación y agotamiento (Figura 39 b) en donde el color amarillo corresponde a una alta expresión de los marcadores, el verde es una expresión media y el azul es una baja o nula expresión. En la figura 39 c se evidencia en

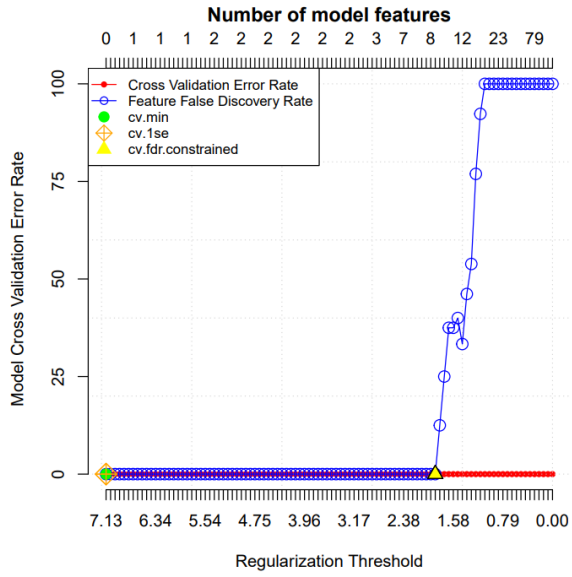
rojo las poblaciones que demostraron tener diferencia significativa, particularmente se van a discutir las poblaciones 291107, 291100 y 291110.

En la figura 39 d) se muestran las abundancias de estas tres poblaciones en una escala logarítmica en base 10, en donde se observa en cajas y bigotes que los LT-CD8+ cocultivados con células HEK293 transfectadas con las Moléculas-GFP-Minigen (azul) expresan más marcadores de activación y agotamiento que los LT-CD8+ cocultivados con células HEK293 transfectadas con GFP-Minigen (rojo), aunque es importante anotar que en dos poblaciones (291107 y 291110) los linfocitos también se encuentran activados.

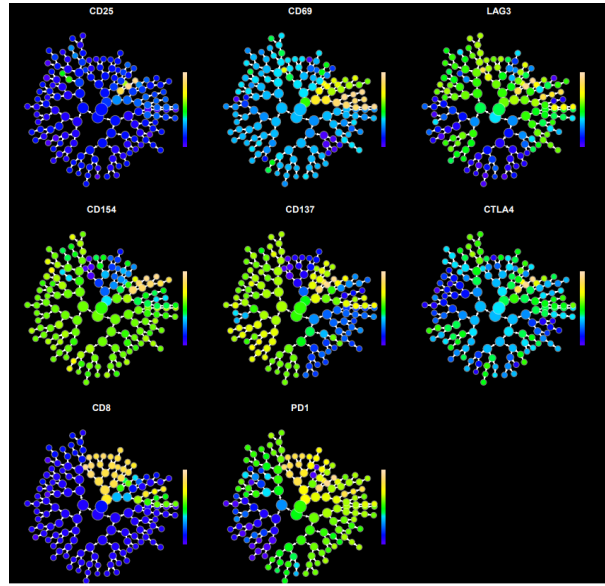
En la figura 39 e) se muestra el fenotipo de estas tres poblaciones de LT-CD8+, el primero (291107) son linfocitos T CD3+CD8+CD69+LAG-3+CD154+, el segundo (291100) son linfocitos T CD3+CD8+CD25+CD69+LAG-3+CD154+CD137+CTLA-4+ y el tercero (291110) son linfocitos T CD3+CD8+CD69+LAG-3+PD-1+. Estas poblaciones exhibieron la expresión diferencial de marcadores de activación y agotamiento señaladas. Resultó interesante que el marcador LAG-3 está presente en los tres clústeres. Según lo reportado en la literatura este es un marcador que se expresa luego de la expresión de PD-1 o CTLA-4. También las tres poblaciones expresaron CD69 que es un marcador de activación temprana de linfocitos T.

Es interesante que los resultados del análisis automatizado permitieran evidenciar que, como era lo esperado, el uso de moléculas co-estimuladoras inducen una mayor estimulación de los linfocitos, esto contrasta con los resultados del análisis manual con los cuales no fue posible inferir claramente un beneficio de utilizar moléculas coestimuladoras para alcanzar una mayor activación de LT-CD8+. Esto se puede explicar porque el análisis jerárquico manual no permite analizar más de dos marcadores al tiempo mientras que el análisis multidimensional permite identificar poblaciones que expresan muchos marcadores al mismo tiempo.

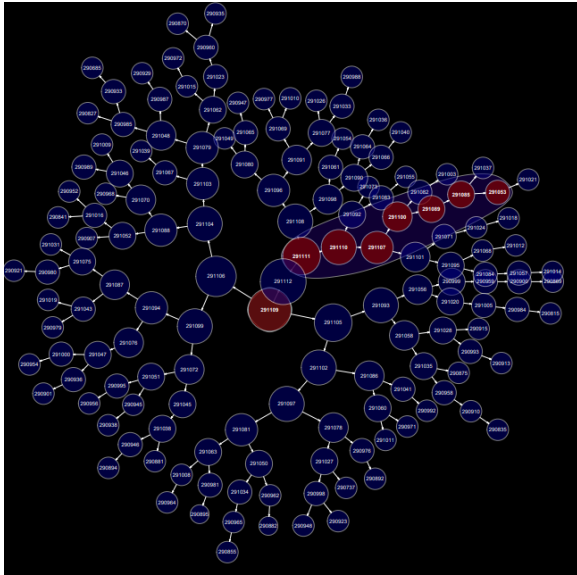
a)



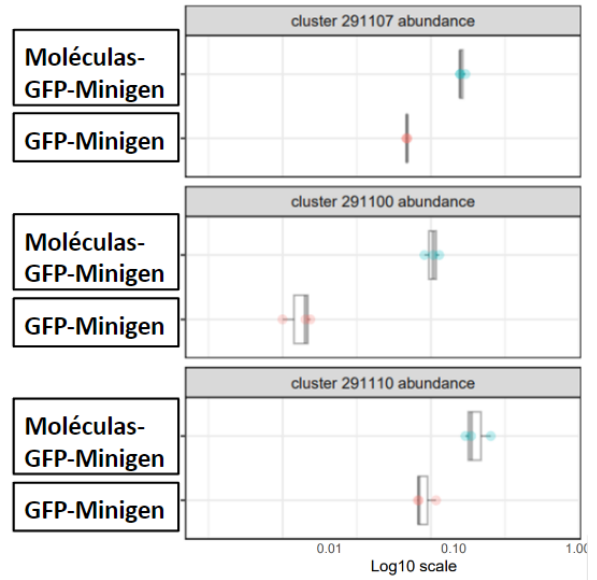
b)



c)



d)



e)

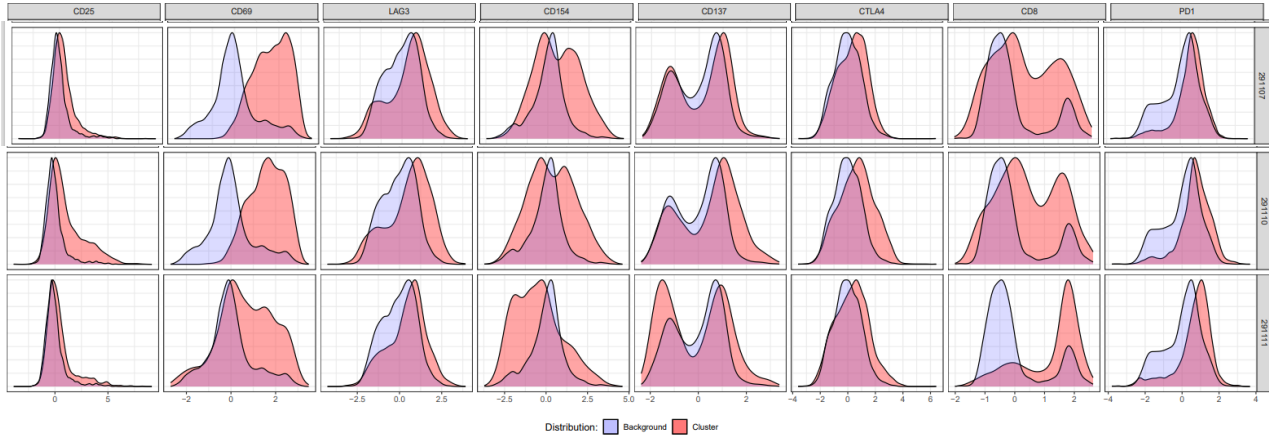


Figura 39 Estructura de resultados del análisis CITRUS del donante LAND42. A) Tasa del modelo de error predictivo que evidencia la tasa de error estimado (rojo) y la tasa de descubrimientos falsos (azul) para el modelo PAM. Se resaltan tres modelos (cv.min, círculo verde; cv.1se, diamante naranja; y cv.fdr.constrained, triángulo amarillo). B) Árbol de expresión de marcadores de activación y agotamiento. C) Árbol de agrupaciones que señala las poblaciones identificadas como diferentes por el programa (rojo). D) Gráfica de caja y bigotes de la abundancia de cada población CD3CD8+ de los LT-CD8+ presentes en las PBMCs cocultivados con células HEK293 transfectados con las Moléculas-GFP-Minigen (azul) y de LT-CD8+ presentes en las PBMCs cocultivados con células HEK293 transfectados con GFP-Minigen (rojo). E) Histogramas de expresión de los marcadores en las poblaciones identificadas en el panel c (rojo), comparando la expresión de fondo (azul).

El fenotipo de las demás poblaciones descritas en la figura 39 c se muestra en la Figura Suplementaria 14. Estos clústeres tuvieron un fenotipo de LT-CD3+CD8-CD69+CD154+PD-1+ en su mayoría que fueron estimulados por las células HEK293 transfectadas con las Moléculas-GFP-Minigen. Esto también se evidenció en el árbol de expresión de marcadores, pues casi todos los clústeres CD8 – tuvieron una expresión media a alta de CD154+. El hecho de que estas poblaciones fuesen estimuladas preferencialmente por el cocultivo de linfocitos T con células HEK293 transfectadas con genes codificantes para moléculas coestimuladoras y además minigenes que codifique epítopes CD8 sugiere una ventaja en favor de utilizar estas células para monitorear la presencia de precursores CD8+ específicos para estas epítopes en muestras de PBMCs de sangre periférica como las muestreadas en este trabajo.

6.14 Células presentadoras artificiales presentan de manera más eficiente epítopes a LT-CD8+ antígeno-específicos presentes en sangre de donantes sanos

Además de los resultados obtenidos en los donantes LAND42 y LAND 33, se evaluó la capacidad de DCs autólogas pulsadas con el péptido corto, largo y la proteína recombinante (Ver especificaciones en Tabla 1) que contiene la epítope HLA-A*0201 de CMV de estimular poblaciones de LT-CD8+ productores de citoquinas intracelulares; y esto se comparó con el rendimiento de las células HEK293 transfectadas con el minigen y cotransfectadas con los plásmidos codificantes para las moléculas coestimuladoras. Para esto, los monocitos obtenidos como se describe en la metodología se cultivaron en medio AIM-V suplementado con GM-CSF e IL-4 durante 5 días realizando un cambio de medio para derivar las DCs. Este día se pulsaron las iDCs con el péptido largo y la proteína completa pp65 de CMV, luego se agregó medio AIM-V fresco suplementado con LPS e IFN- γ para lograr la maduración de las DCs, y 2 horas después de pulsaron con el péptido corto.

Una vez se tuvieron las mDCs, se cocultivaron durante 6 horas con la fracción no adherente de las PBMCs estimuladas durante 9 días con el péptido corto de CMV, en presencia de Brefeldina A. Pasado este tiempo se recolectaron y se evaluó por citometría de flujo la expresión de marcadores de superficie CD3 y CD8, y producción de IFN- γ y TNF α intracelular.

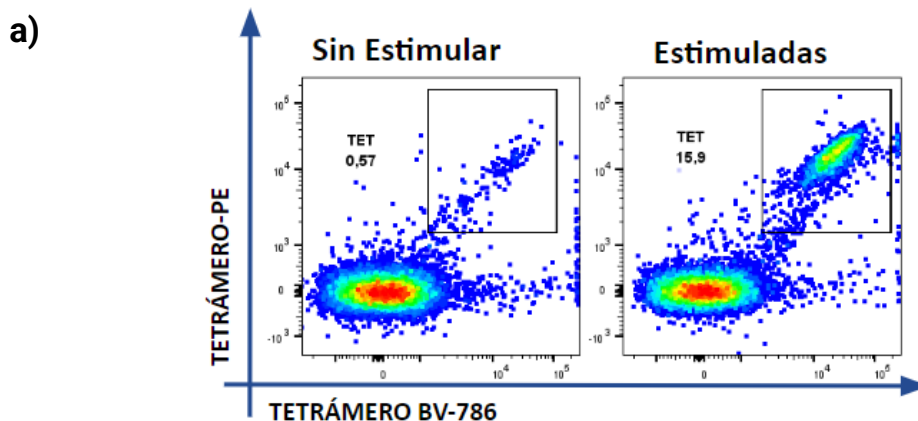
Como control positivo se utilizaron PBMCs autólogas estimuladas con el péptido corto de CMV y como control negativo se utilizaron PBMCs autólogas sin estimular, mDCs sin estimular, células HEK293 transfectadas con el plásmido pcDNA 3.1-N-EGFP (GFP) codificante para la proteína GFP y células HEK293 sin transfectar.

En el donante LAND42 se observó que las células HEK293 transfectadas con la proteína de fusión GFP-Minigen y las células HEK293 co-transfectadas los plásmidos codificantes para las moléculas coestimuladoras CD80, CD83, CD137L y con el minigen (Moléculas-GFP-Minigen) estimularon una población de LT-CD8+ polifuncionales casi 9

veces mayor que la población de LT-CD8+ estimulados por las mDCs pulsadas con la proteína completa pp65 de CMV (Figura 40 b). Además, las poblaciones de LT-CD8+ productores de una sola citoquina en estimulados por el cocultivo con células HEK293 transfectadas también son mayores que aquellos estimulados por mDCs pulsadas con el péptido corto y largo de CMV (Figura 40 b). Cabe resaltar que la presencia de las células HEK293 sin transfectar o solo transfectadas con el plásmido que codifica para GFP no estimularon poblaciones de LT-CD8+ inespecíficas.

Para los donantes LAND 42 y LAND 33 (Figura 40 c) se observó algo similar, se encontró que el cocultivo con las células HEK293 transfectadas con GFP-Minigen y con Moléculas-GFP-Minigen estimularon poblaciones de LT-CD8+ IFN- γ + TNF α + mayores, estadísticamente significativos, que las estimuladas con las mDCs pulsadas con la proteína. Además, se encontró que no hay diferencias significativas entre las poblaciones de LT-CD8+ dobles positivos estimulados por las células HEK293 como aAPCs y las mDCs pulsadas con péptido corto y largo. La población de LT-CD8+ TNF α + y LT-CD8+ IFN- γ + se encuentran en la figura suplementaria 15.

Recopilando estos resultados, se puede afirmar que la eficiencia de presentación de las mDCs no superó significativamente aquella de las aAPCs y que las células HEK293 transfectadas con el minigen favorecen el procesamiento natural de epítopes, en este caso CMV, sobre el procesamiento de la proteína completa por las mDCs.



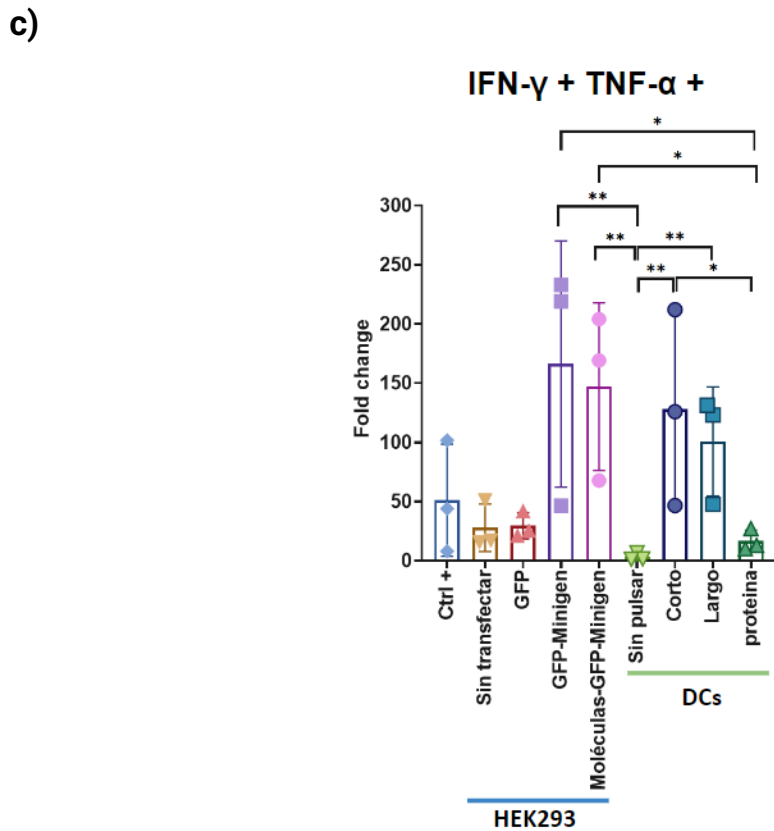
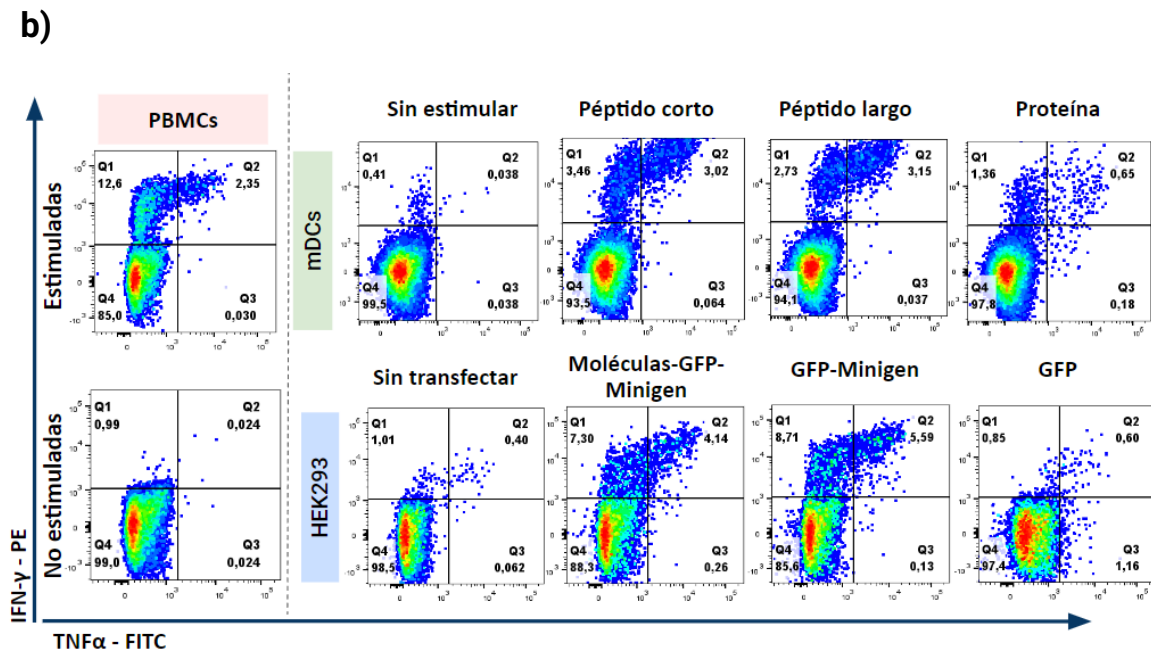


Figura 40. Expresión de citoquinas intracelulares de LT CD8+ de donantes sanos cocultivados APCs autólogas o artificiales. a) Población tetrámero-positiva de los LT CD8+ de la fracción no adherente de las PBMCs del donante LAND42 estimulados durante 9 días con el péptido corto pp65 de CMV comparado con PBMCs sin estimular. b) Expresión de citoquinas intracelulares de LT CD8 + del donante LAND42 cocultivados con mDCs autólogas (recuadro verde superior) estimuladas con el péptido corto, largo y proteína pp65 de CMV y con mDCs sin estimular.

También se cocultivaron con células HEK293 (recuadro azul inferior) transfectadas por lipofectamina con Moléculas-GFP-Minigen, con GFP-Minigen, solo con GFP y con células sin transfectar. Como control positivo se utilizaron PBMCs autólogas (Recuadro rojo) pulsadas con el péptido corto de CMV, como control negativo se utilizaron PBMCs sin estimular. b) Diagramas de barras representativos de las veces de incremento o fold change de poblaciones de LT CD8+ IFN- γ + TNF α + de 3 donantes sanos cocultivados con las células mencionadas en la sección a de la figura. El análisis estadístico de los grupos se llevó a cabo utilizando la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis, n=3, (p<0.05). Las barras representan réplicas experimentales independientes + SEM.

En estos donantes también se evaluó la expresión de los marcadores de activación CD137, CD154 Y OX40. Al comparar las poblaciones de LT-CD8+ cocultivados con las células HEK293 co-transfectadas con los plásmidos que codifican para las moléculas coestimuladoras y el minigen (Moléculas-GFP-Minigen) con las poblaciones de LT-CD8+ cocultivados con mDCs estimuladas con la proteína recominante de CMV se encontró una tendencia de mayor expresión de los tres marcadores en el cocultivo de células HEK293 con las Moléculas-GFP-Minigen. Esto complementa el resultado obtenido al medir la expresión de citoquinas intracelulares, pues significa que el procesamiento y presentación natural de la epítope de CMV codificada en el minigen resultó en una mejor estimulación de los LT-CD8+ en el cocultivo, por encima de las mDCs (Figura 41).

En la figura 41 también se observa que la expresión de CD154 y de OX40 en los LT-CD8+ que fueron estimulados con las células HEK293 transfectadas con las Moléculas-GFP-Minigen tienden a ser mayor que en aquellos que fueron estimulados con las mDCs pulsadas cualquier versión del antígeno de CMV. En el caso de CD137, la expresión de este marcador en los LT-CD8+ es muy similar al comparar los que fueron estimulados con las células HEK293 transfectadas con las Moléculas-GFP-Minigen y las mDCs pulsadas con el péptido corto y largo. Esto sugiere que las células HEK293 son capaces de estimular una respuesta, en algunos casos similar y en otros mayor, que las mDCs autólogas.

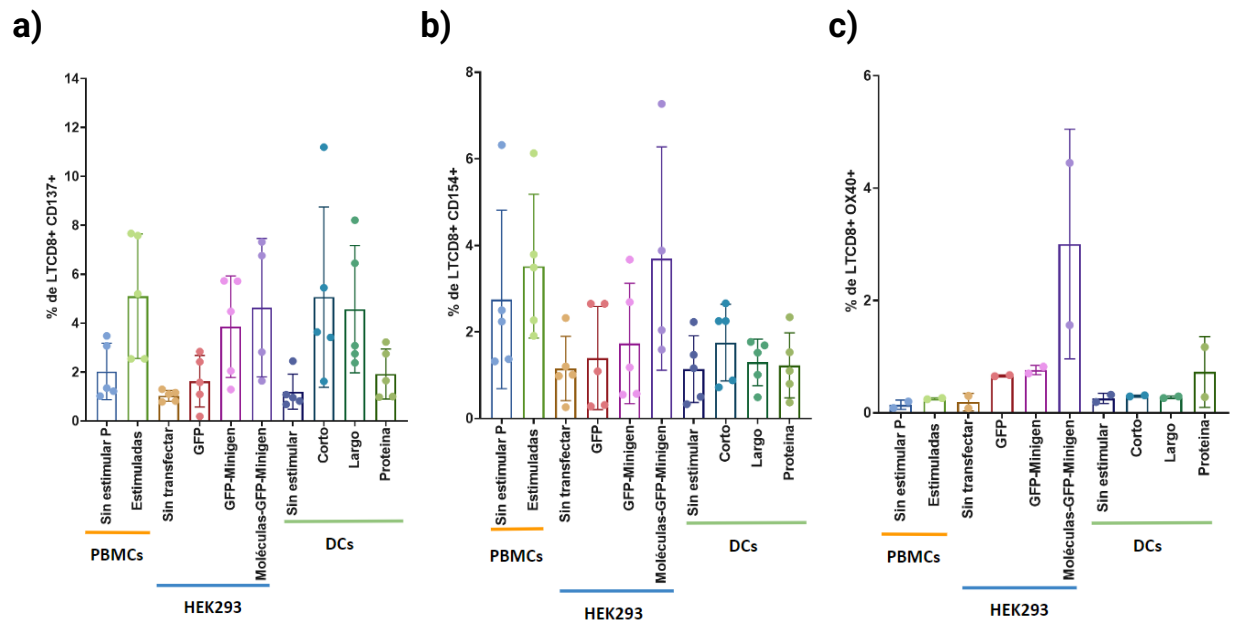


Figura 41. Expresión de marcadores de activación de LT-CD8+ de donantes sanos cocultivados con aAPCs transfectadas con el minigen. Diagrama de barras que representa el porcentaje de a) LT-CD8+ CD137+ b) LT-CD8+ CD154+ y c) LT-CD8+ OX40+ que fueron cocultivados con PBMCs pulsadas o no con el péptido corto de CMV (barra inferior naranja), con células HEK293 co-transfectadas con los plásmidos codificantes para las moléculas coestimuladoras, células HEK293 transfectadas con GFP-Minigen, células transfectadas con GFP y células sin transfectar (barra inferior azul) y c) con mDCs estimuladas con el péptido corto, largo y la proteína recombinante del antígeno HLA-A*0201 de CMV y mDCs sin estimular. El análisis estadístico de los grupos se llevó a cabo utilizando la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis, $n=2$, ($p<0.05$). Las barras representan réplicas experimentales independientes + SEM.

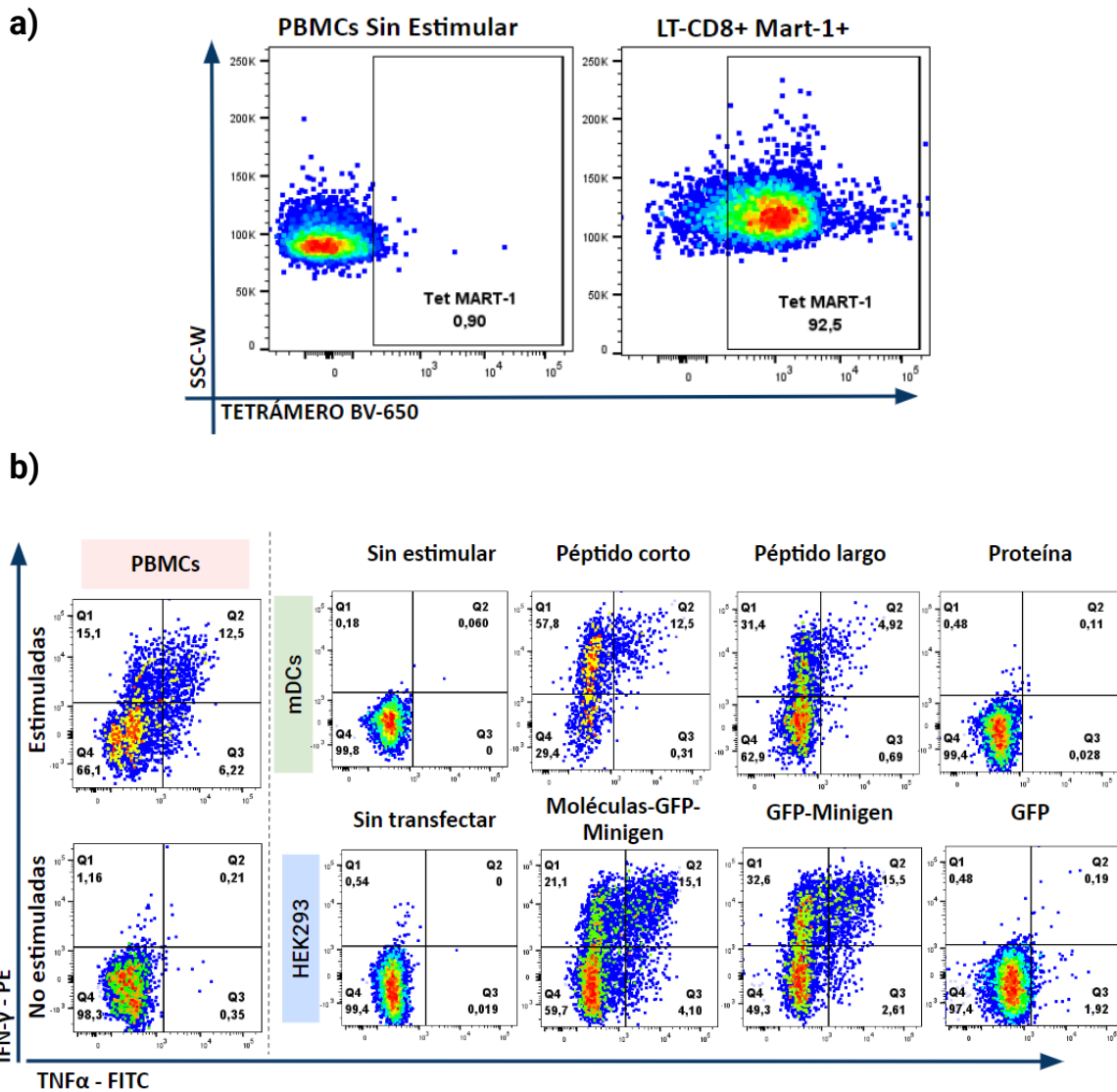
6.15 Células presentadoras artificiales presentan de manera más eficiente epítopes a LT-CD8+ antígeno-específicos

Luego de utilizar PBMCs de donantes sanos para comparar la capacidad de procesamiento y presentación de epítopes de las aAPCs basadas en células HEK293 transfectadas con las mDCs autólogas para estimular precursores de LT productores de citoquinas intracelulares, se decidió partir de clones de LT CD8+ antígeno-específicos para CMV y MART-1 para evaluar en un modelo más refinado cual APC es más eficiente.

Los clones fueron descongelados un día antes de ser utilizados, se dejaron en medio de cultivo AIM-V toda la noche y al día siguiente se llevó a cabo la evaluación de citoquinas intracelulares como se mencionó anteriormente. Estos se cocultivaron con células

HEK293 transfectadas como se describió anteriormente y con mDCs pulsadas con el péptido corto, largo y proteína pp65 de CMV (Figura suplementaria 16) y con el péptido corto, largo y proteína completa de Mart-1 (Figura 41). Se evidenció en el caso de la población de LT-CD8+ IFN- γ + TNF- α + que las células HEK293 transfectadas con las Moléculas-GFP-Minigen y con GFP-Minigen estimularon una mayor población, estadísticamente significativa, comparada con la que fue estimulada por mDCs estimuladas con la proteína (Figura 41 b).

Al igual que en el caso de las PBMCs de donantes sanos, no se evidenció que las mDCs fueran significativamente mejores células presentadoras de antígeno que las células HEK293.



c)

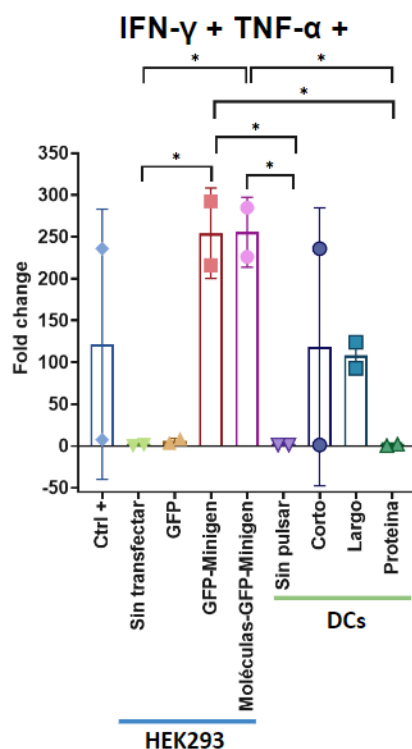


Figura 42. Expresión de citoquinas intracelulares de LT CD8+ Mart-1+ cocultivados APCs autólogas o artificiales. a) Población tetrámero-positiva de clones de LT CD8+ Mart-1 + comparado con PBMCs sin estimular. b) Expresión de citoquinas intracelulares de LT CD8 Mart-1+ cocultivados con mDCs autólogas (recuadro verde superior) estimuladas con el péptido corto, largo y proteína de Mart-1 y con mDCs sin estimular. También se cocultivaron con células HEK293 (recuadro azul inferior) transfectadas por lipofectamina con Moléculas-GFP-Minigen, con GFP-Minigen, solo con GFP y con células sin transfectar. Como control positivo se utilizaron PBMCs autólogas (Recuadro rojo) pulsadas con el péptido corto de CMV, como control negativo se utilizaron PBMCs sin estimular. c) Diagramas de barras representativos de las veces de incremento o fold change de poblaciones de LT CD8+ IFN- γ + TNF α + de 2 réplicas cocultivados con las células mencionadas en la sección a de la figura. El análisis estadístico de los grupos se llevó a cabo utilizando la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis, $n=2$, ($p<0.05$). Las barras representan réplicas experimentales independientes + SEM.

7. Discusión

La identificación de antígenos tumorales de importancia inmunológica para la inmunoterapia del cáncer es altamente dependiente de la detección de LT antitumorales que los reconozcan. Este es un proceso que se dificulta por varias razones, entre ellas: (i) el bajo número de precursores en el repertorio de LT que los reconocen [120] y (ii)

mecanismos de tolerancia en los LT promovidos por el microambiente tumoral [121]. A lo largo del tiempo, han sido empleadas diversas estrategias que permiten expandir LT específicos para los antígenos tumorales a niveles detectables por diferentes ensayos como: proliferación celular, medición de actividad citolítica y producción de citoquinas intracelulares [122].

En los LT esta expansión depende en gran medida de la calidad de la señal de activación. La activación de las células T funcionales requieren de tres señales: (i) la estimulación del TCR por un MHC cargado con un antígeno, (ii) la co-estimulación que comprende una serie de interacciones entre moléculas presentes en la superficie de las APCs y de los LT [123] y (iii) la secreción de citoquinas solubles que juegan un papel crucial en la señalización, proliferación y diferenciación de LT activados en células efectoras [124]. Particularmente la señal ii puede activar LT, cuando es mediada por moléculas co-estimuladoras como CD28:CD80/86 o puede inhibir las funciones efectoras de estas células cuando es mediada por receptores co-inhibitorios tales como CTLA-4:CD80/86; PD1:PDL1, TIM3, LAG3.

Para evidenciar la estimulación de LT-CD8+ antígeno-específicos con frecuencia se utilizan DCs autólogas como APCs ya que estas expresan moléculas co-estimuladoras que juegan un papel fundamental en la supervivencia y expansión de los linfocitos. Sin embargo, su derivación *in vitro* es un proceso demorado y los rendimientos de estas células no son muy altos. Con el fin de expandir LT-CD8+ específicos contra antígenos tumorales algunos autores han propuesto la creación de APCs artificiales utilizando líneas celulares fácilmente co-transfectables con haplotipos de MHC-I altamente frecuentes en la población caucásica (por ejemplo, HLA-A*02:01, HLA-A*24:02 y HLA-A*03:01), plásmidos que codifican para una o varias moléculas co-estimuladoras y minigenes que codifican para antígenos de interés (Tabla suplementaria 2) [125].

En este trabajo, se utilizaron diferentes células presentadoras de antígeno: (i) PBMCs, (ii) mDCs, (iii) aAPCs transfectadas/transducidas con un minigen codificando epítopes y (iv) co-transfectadas con plásmidos codificantes de moléculas co-estimuladoras y con el minigen. Se realizó una comparación con el fin de evaluar aquellas que estimulasen más eficientemente LT-CD8+ específicos para antígenos virales y

tumorales. Para esto, se utilizó la evaluación de la expresión de citoquinas intracelulares y marcadores de activación y agotamiento tanto en LT-CD8+ presentes en PBMCs de donantes sanos como en clones de LT-CD8+ antígeno-específicos. Para la entrega del minigen se utilizaron liposomas catiónicos, electroporación y adenovirus como vector de entrega. Para corroborar la entrega del minigen se monitoreó la expresión de GFP como gen reportero.

En las PBMCs y las mDCs la eficiencia de transfección resultó ser notablemente baja. Las PBMCs son una población heterogénea compuesta por monocitos, linfocitos T y B, células NK y granulocitos [126]. La dificultad de transfectar estas células puede atribuirse a la gran cantidad de tipos celulares que la componen. Cuando se analizó poblaciones individuales por citometría de flujo no fue posible evidenciar un enriquecimiento de GFP en ninguna población examinada (monocitos, Linfocitos, células NK y granulocitos) (datos no mostrados). Para la electroporación se utilizaron los parámetros establecidos por el autor Van Camp en el 2010, sin embargo, éste utilizó mRNA codificante para CMV pp65 [127]. En nuestro caso el uso de mRNA no estuvo dentro de los alcances del trabajo y al utilizar DNA no se lograron replicar los resultados alcanzados por el autor.

Similar a lo obtenido por electroporación, la transfección de GFP por lipofectamina tampoco evidenció una eficiente transfección de PBMCs y mDCs. Estos resultados podrían atribuirse al hecho de que la Lipofectamina ha sido preferencialmente utilizada para transfectar células adherentes [128] (una fracción no bien representada en la preparación de las células utilizadas).

En cuanto a las mDCs, es posible que la baja eficiencia de transfección se deba a su intrínseca resistencia a la entrada de material genético extraño o a la rápida degradación de dicho material en el citosol [129]. Además, luego de ser transfectadas se puede ver afectada su viabilidad, como se observó con la electroporación, que perdieron su capacidad adherente. La pérdida de su capacidad adherente se puede traducir en la dificultad de madurar, lo que compromete también su funcionalidad.

Por su parte, para construir las APCs artificiales se utilizaron dos tipos de líneas celulares, las células HEK293 y las células K562. Las células HEK293 se co-

transfectaron con los plásmidos que codifican para CD80, CD83, CD137L y con el minigen; y en el caso de las células K562 con HLA-A*02:01, CD80, CD83, CD137L y con el minigen. Al igual que con las PBMCs y las mDCs, en las células K562 no se evidenció expresión de GFP ni de las moléculas co-estimuladoras luego de ser co-transfectadas por lipofectamina y por electroporación. Cabe resaltar que la transfección de K562 utilizando la electroporación resultó en una muy baja viabilidad de éstas. A pesar de que la revisión bibliográfica revela datos en favor de la eficiencia de transfección de estas células (Tabla suplementaria 2), en nuestras manos no fue posible replicar resultados utilizando metodologías publicadas por algunos autores referenciados en la Tabla 2 (datos no mostrados).

Las células HEK293 y HEK293T, por el contrario, demostraron una alta eficiencia de transfección y expresión tanto de las moléculas coestimuladoras, como del minigen y de GFP (Figura 20). Comparando los sistemas de transfección en estas células se encontró que la electroporación y la lipofectamina generan una expresión de GFP similar, sin embargo, al igual que lo observado en PBMCs y DCs, la electroporación tuvo un efecto negativo en la viabilidad de las HEK293 y HEK293T luego de 48 horas de transfección (Figura suplementaria 9). Un aspecto importante para resaltar es que se observó que al transfectar la proteína de fusión GFP-Minigen hubo una consistente disminución de la capacidad de la GFP de emitir fluorescencia lo cual atribuimos a la presencia del minigen que se traduce como una proteína de fusión a GFP (Figura 12 y 15). No obstante, el uso de la GFP como gen reportero en fusión con el minigen permitió monitorear su transfección ya que no se perdió completamente su expresión. En cuanto a la transducción, se observó la mayor expresión de GFP en los tres sistemas de entrega (Figura 24 b), sin embargo, como no se cuenta con la contraparte del vector que exprese solo GFP, no se pudo realizar la misma comparación que con los sistemas de transfección.

Para comprobar la eficiencia de presentación de las APCs y aAPCs se utilizaron PBMCs de donantes sanos en un principio y luego clones de LT-CD8+ antígeno-específicos que permitieron controlar la variabilidad relacionada con el número de precursores presentes en las PBMCs. Se observó que las mDCs y las células K562 transfectadas no estimularon una expresión de citoquinas intracelulares en los LT-CD8+ co-cultivados

con estas APCs, como era de esperarse por la baja expresión de las moléculas co-estimuladoras en el caso de K562 y de la indetectable expresión de GFP en ambos casos. A diferencia de lo obtenido con K562 como aAPCs, el uso de células HEK293 como aAPCs mostró claramente la producción de citoquinas intracelulares por linfocitos estimulados con estas aAPCs transfectadas utilizando lipofectamina con el minigen y plásmidos codificando moléculas co-estimuladoras y transfectadas por electroporación solo con el minigen.

Dentro de las citoquinas intracelulares evaluadas estaba el TNF- α (factor de necrosis tumoral alfa), esta es una citoquina inflamatoria muy potente capaz de inducir una respuesta inmune compleja y efectos antitumorales al promover la apoptosis de células cancerígenas y la destrucción de la vascularización tumoral [130, 131]. También se evaluó la secreción de IFN- γ (Interferon gama), esta es una citoquina que hace parte del grupo de los interferones de tipo II, juega un papel importante en las infecciones virales cuando el mecanismo viral logra inhibir la función de los interferones de tipo I, en la prevención de infecciones y en la regulación de una respuesta inflamatoria [132-134]. Dentro de las poblaciones de LT-CD8⁺ encontradas se observaron linfocitos polifuncionales que expresan IFN- γ y TNF- α . Esto en miras de inmunoterapia resulta favorecedor debido a que tienen una mayor eficacia antitumoral o antiviral al poder ejercer múltiples funciones efectoras [135]. También se encontraron poblaciones de LT-CD8⁺ productores solo de IFN- γ dependientes de la presencia de células HEK293 transfectadas con el minigen en el cocultivo tanto en LT-CD8⁺ provenientes de PBMCs como de los clones antígeno-específicos. Cabe resaltar que la co-transfección de plásmidos que codificaban para moléculas coestimuladoras no representó una mayor expresión de citoquinas intracelulares con respecto a las células HEK293 que fueron transfectadas solo con el minigen.

En cuanto a poblaciones de LT-CD8⁺ antígeno-específicos productores solo de TNF- α , se observó una diferencia entre la respuesta de LT-CD8⁺ expandidos en PBMCs de donantes sanos y en los clones de LT-CD8⁺ antígeno-específicos. Mientras que en LT presentes en PBMCs hubo una expansión no específica la población LT-CD8⁺ TNF- α al ser estimulados tanto con células HEK293 transfectadas solo con GFP y en algunos casos en el cocultivo con células HEK293 sin transfectar, los clones de LT-CD8⁺ CMV+

y Mart-1+ mostraron una expansión de LT-CD8+ específicos de antígeno inducida por aAPCs transfectadas con el minigen +/- moléculas coestimuladoras no observada cuando los clones fueron cocultivados con células HEK293 sin transfectar o transfectadas solo con GFP. El hecho de que la expansión no específica del antígeno de LT-CD8+TNF- α + fuese detectada solo en LT-CD8+ presentes en sangre de donantes sanos y no en clones de LT-CD8+ antígeno-específicos, quizá sea atribuible a la presencia de poblaciones celulares presentes en PBMCs que indujeron la expresión de TNF- α solo en LT-CD8+ (no en LT-CD4+, datos no mostrados) en respuesta a las HEK293, que no estuvieron presentes en el cocultivo de las células HEK293 con clones de LT-CD8+ puros.

Por su parte, en las poblaciones de LT-CD8+ Mart-1+ estimuladas por las células HEK293 transfectadas se evaluó, además de la expresión de citoquinas intracelulares, secreción de Granzima B. Esta proteasa tiene como función eliminar células infectadas por virus y células tumorales [136]. La expresión combinada de citoquinas intracelulares, activación (ver más adelante) y producción de Granzima B por parte de clones de LT-CD8+ purificados confirma la utilidad del uso de clones como herramienta para evidenciar la alta inmunogenicidad de aAPCs con base en HEK293 transfectadas con el minigen.

Cuando se evaluó la producción de citoquinas con el método de transducción, no se encontraron poblaciones productoras de citoquinas, posiblemente por falencias en la presentación de las epítopes codificadas en el minigen. En este caso, la proteína GFP y el minigen no se encontraban en fusión, como si sucede en el vector usado para los sistemas de transfección, por lo que no podemos comprobar que el minigen se exprese como proteína y que sea presentado en el contexto del MHC-I.

Dentro de las moléculas utilizadas para la coestimulación se encuentra CD80, el cual es el ligando de CD28 y hace parte de la señal 2 para la activación de LT. Su señalización es vital para el desarrollo de la respuesta de LT [83]. Otra de las moléculas usadas fue CD83, ésta se puede encontrar en la membrana de mDCs principalmente, cuando se encuentra con su ligando se relaciona con la estimulación de funciones citotóxicas, con la regulación de la maduración, la activación de otras células inmunes y la homeostasis

[85, 86]. La última de las moléculas utilizadas fue CD137L que es el ligando de CD137 (4-1BB). En LT-CD8+ se sabe que CD137/CD137L aumenta la proliferación, la producción de IFN- γ , la función citotóxica y la supervivencia [88].

La inclusión de las moléculas coestimuladoras suponía una mejora en la estimulación de LT-CD8+ antígeno-específicos, no obstante, la adición de estas no representó una ventaja para la respuesta citotóxica de los linfocitos. Este resultado, puede ser explicado debido a que la señal 2 de activación de los LT, es decir la interacción entre CD28:CD80/86 es la que inicia el proceso de activación y respuesta [137], y teniendo en cuenta que las células HEK293 expresan algo de CD80 (Figura 9) es probable que una mayor expresión de CD80 no se traduzca necesariamente en una mayor estimulación de LT-CD8+, en otras palabras, es probable que la señal de las células HEK293 sea suficiente para activar una respuesta.

Hirano, N y colaboradores (2006) mencionan que moléculas coestimuladoras como CD80/86, ICOS, 4-1BBL y OX40L son inducidas luego de la activación de los LT y pueden pasar varios días luego de la activación del LT para alcanzar su pico máximo. Esta demora en su expresión apoya la hipótesis de que estas no están tan relacionadas en el *priming* pero si con el mantenimiento en el tiempo de la respuesta, apoyando la supervivencia de las células efectoras [86]. Teniendo en cuenta que el co-cultivo en el que se evalúa la producción de citoquinas intracelulares es apenas de 6 horas, puede que se requiera un seguimiento mayor para evidenciar el impacto de la co-estimulación, no obstante, hay que considerar que un cultivo más largo tendría repercusiones en las óptimas condiciones de cultivo de los LT-CD8+ debido a que las células HEK293 tienen una tasa de replicación muy alta y pueden tomar control del cocultivo.

Además de medir la expresión de citoquinas intracelulares, se evaluó la expresión de marcadores de activación y agotamiento. Uno de los marcadores que se estudió fue CD154, (también conocido como CD40L), éste se caracteriza por inducir una potente señal de producción de IL-2 [92] y por lo tanto, se ha reportado que la expresión de este marcador juega un papel importante en la expansión de LT-CD8+ en respuesta a antígenos virales [92].

Está bien documentado que el sistema CD28:CD80/86 es dependiente de la expresión de CD154 y regula al alza la expresión de marcadores como CD25, CD137 y OX40 [112, 138], marcadores de estimulación de LT activados por el antígeno necesarios para la función efectora de los LT luego del estímulo y para el establecimiento de LT de memoria [139]. En este trabajo, mediante herramientas de análisis automatizado, se comprobó lo que ha sido sugerido por algunos autores [140] en el sentido de que el uso de moléculas coestimuladoras en el cocultivo favorece la expresión de CD154 en LT-CD8+, lo cual también se pudo comprobar en el análisis jerárquico manual del donante LAND42 (Figura 39 y Figura 35).

Otro marcador de activación que se utilizó fue CD137 (4-1BB), su unión con CD137L funciona como señal co-estimuladora, estimulando la proliferación de LT activados, secreción de citoquinas y señales anti-apoptosis [94]. Estas funciones se encuentran relacionadas sobre todo con LT citotóxicos antivirales [95]. Teniendo en cuenta que su ligando fue una de las moléculas co-estimuladoras utilizadas para transfectar las células HEK293, tiene sentido que se encontrara en una mayor proporción en LT-CD8+ presentes en PBMCs de donantes sanos que fueron cocultivados con células HEK293 cotransfectadas con plásmidos codificantes para las moléculas coestimuladoras y el minigen, sin embargo, como la expresión de este marcador es dependiente de la activación del TCR también tiene sentido que se haya encontrado en LT-CD8+ estimulados con células HEK293 transfectadas con el minigen [141].

También se utilizó CD25, el cual es considerado uno de los marcadores de activación más importante [96]. Su función se relaciona con la activación de LT-CD8+ y la producción de IL-2 [96]. Se sabe, además, que se expresa a las 24 horas de la señal 1 y se mantiene por algunos días [98]. Gracias al análisis automatizado, se encontró que los LT no expresaban una gran cantidad de CD25, puede que por el momento en el que se evaluó el cocultivo (24 horas después del reestímulo), no se encontrara el pico de expresión de éste.

También se evaluó CD69 como marcador de activación temprano, su función se ha asociado con un efecto activador/regulador complejo de la respuesta inmune. En este caso, CD69 no permitió diferenciar LT-CD8+ antígeno-específicos pues se encontró

expresión en todos los cocultivos; esto se puede deber a la compleja función de CD69 que involucra la regulación de la respuesta y su expresión basal en linfocitos no activados. Adicionalmente, el pico se alcanza rápidamente, por lo que es probable que a las 24 horas se observara una respuesta no específica debido a la presencia de las células HEK293 y no por el estímulo antigénico.

Finalizando los marcadores de activación, se midió la expresión de OX40 (CD134). Como se mencionó anteriormente, la interacción de CD28:CD80/CD86 y de CD40/CD40L se ve involucrada en la señalización de la expresión de OX40L [105, 106], es por esto que en el cocultivo de los LT-CD8+ con células HEK293 co-transfectadas con los plásmidos que codifican para las moléculas coestimuladoras y con el minigen se evidencia una mayor producción de OX40 comparado con solo la presencia del minigen.

Pasando al fenotipo de agotamiento de los LT-CD8+, se evaluó la expresión del marcador de muerte celular programada-1 (PD-1). Este es un punto de control inmunológico que regula a la baja la actividad de los LT [107]. Se ha demostrado que éste también se expresa en etapas tempranas de la activación en infecciones virales, lo que está relacionado con la regulación de la respuesta inmune de las células T [142]. Otro marcador de agotamiento evaluado fue el antígeno 4 asociado a linfocitos T citotóxicos (CTLA-4), el cual también se considera un punto de control inmunológico. Este es un homólogo de CD28, por lo que se une a CD80/86 pero con una afinidad 20 veces mayor que CD28 y se encarga de inhibir la proliferación celular interrumpiendo la señalización del TCR [109, 110]. Así como se evidenció con PD-1, CTLA-4 también se expresa de manera transiente en células T-CD8+ activadas *in vitro* pues al inducir una deficiencia de este marcador de agotamiento se produce una linfoproliferación fatal en ratones [143], esto demuestra que su expresión temprana es necesaria para regular la potencia de la respuesta inmune [144].

El último marcador de agotamiento evaluado fue LAG-3 (CD223). Este marcador, al igual que los otros dos marcadores de agotamiento, tiene como función regular la homeóstasis de la proliferación y activación de LT-CD8+ [113]. Su ligando es el MHC-II y considerando que las células HEK293 lo expresan en su superficie, los LT-CD8+ que

fueron estimulados con estas células transfectadas con el minigen +/- las moléculas coestimuladoras, presentaron un aumento de este marcador. Esta molécula, al igual que las otras dos descritas previamente, se expresa de manera temprana luego de la activación de los LT-CD8+, lo cual se evidenció en ratones transfundidos con LT-CD8+ knockout de LAG-3 los cuales demostraron tener mayor proliferación de LT-CD8+ y producción de citoquinas [145].

Los marcadores de agotamiento se han descrito clásicamente como indicadores de disfunción de los LT por representar células que se encuentran agotadas y no podrían desencadenar una respuesta efectora efectiva. No obstante, recientemente se ha demostrado que la expresión de estos marcadores puede estar asociada con factores de transcripción involucrados en la activación y diferenciación de LT [146]. Esto explica por qué en un cocultivo de 24 horas se observa su presencia. Se evidenció que las células HEK293 sin transfectar estimulan una población de PD-1, lo que se podría explicar por la naturaleza alogénica del cocultivo [147]. La expresión de los otros dos marcadores si demostró ser dependiente de la presencia del antígeno.

Es importante recalcar que se utilizaron solo los antígenos CMV y Mart-1, de los 6 presentes en el minigen, para comprobar la capacidad de las APCs y aAPCs transfectadas de estimular poblaciones de LT-CD8+ antígeno-específicos y caracterizarlos. El antígeno de la Influenza A (FLU) fue utilizado anteriormente por otro integrante del grupo de Inmunología y Medicina Traslacional, quien reportó dificultades para identificar donantes sanos del banco HLA-A*02:01 con LT-CD8+ precursores para este antígeno, pues logro expandir poblaciones tetrámero-positivas de apenas 0,65%.

En cuanto a los antígenos asociados a tumor, se añadieron en el minigen dos epítopes CD8 de HER-2, sin embargo, debido a que el trabajo del grupo se ha centrado en cáncer de mama triplenegativo se dificultó el reclutamiento de pacientes con este tipo de cáncer de mama. Solo se contaba con un paciente trabajado anteriormente en el grupo con el cual se intentó expandir una población de LT-CD8+ para estos antígenos, sin éxito (Figura 23) [148]. Con este mismo paciente, se logró expandir una población de LT-CD8+ NY-ESO-1+ pero fue solo de un 1,3 % y teniendo en cuenta esta baja expansión, no

se utilizaron estas epítopes para la evaluación de la expresión de citoquinas intracelulares ni la expresión de marcadores.

Al evaluar las subpoblaciones de memoria de LT-CD8+, no se encontraron diferencias significativas, indicando que ni la presencia del minigen, ni la combinación de las moléculas y el minigen, ni la presencia solo de las HEK293 en el cocultivo afectan de manera drástica la diferenciación de los LT-CD8+. Esto se puede deber al poco tiempo que pasaron las células en cocultivo, debido a que la diferenciación de los LT-CD8+ en los diferentes fenotipos de memoria requiere entre 2 a 3 días de estimulación [149].

Por otro lado, se realizó una comparación entre el rendimiento de mDCs estimuladas con el péptido corto, largo y la proteína recombinante de los antígenos HLA-A*0201 de CMV y Mart-1 con las aAPCs basadas en células HEK293 co-transfectadas con el minigen y con plásmidos codificantes para las moléculas coestimuladoras. Se encontró que las aAPCs presentan una mayor eficiencia de presentación de antígenos procesados de manera natural, comparados con el uso de mDCs estimuladas con la proteína recombinante de CMV o Mart-1. Además, las mDCs estimuladas con el péptido corto o largo de estos antígenos no resultaron tener un mayor desempeño en la presentación que las APCs o aAPCs. Esto sugiere que la metodología propuesta en este trabajo, que implica la modificación de las células HEK293 para ser empleadas como APCs artificiales, podría ser beneficiosa para la identificación de precursores de linfocitos T CD8+ para neoantígenos inmunogénicos debido a la eficiencia de estas células en presentar antígenos procesados de manera natural.

En resumen, este estudio presenta una plataforma innovadora basada en células HEK293 transfectadas mediante lipofectamina con un minigen codificante para epítopes inmunogénicos restringidos al haplotipo HLA-A*0201. El propósito principal de esta plataforma es la identificación de poblaciones de LT-CD8+ antígeno-específicos. Resulta interesante que la transfección de plásmidos codificantes para moléculas coestimuladoras no conllevó un aumento significativo en la expresión de citoquinas intracelulares, lo que sugiere que la presentación de los antígenos es suficiente para estimular una respuesta citotóxica. Sin embargo, estas moléculas desempeñaron un

papel importante en la estimulación de la expresión de marcadores de activación y agotamiento tanto de linfocitos T CD8 como de linfocitos T CD4.

A pesar de los desafíos y limitaciones encontrados en este estudio, la plataforma propuesta ofrece un enfoque prometedor para la identificación y expansión de LT-CD8 específicos de antígenos naturalmente procesados por la maquinaria de las células presentadoras de antígeno. Este método tiene implicaciones significativas en la identificación de neoantígenos inmunogénicos para la inmunoterapia del cáncer, especialmente para el grupo de Inmunología y Medicina Traslacional. La identificación de LT-CD8+ mediante el uso de aAPCs transfectadas con minigenes en los pacientes en muestras de sangre o de tumor durante el proceso de selección de neoantígenos tumorales es probable que conduzca a una mejor selección de candidatos para hacer parte de vacunas terapéuticas personalizadas utilizando mDCs pulsadas con neoantígenos actualmente en curso en nuestro laboratorio (***ClinicalTrials: NCT06195618***).

8. Perspectivas

Con el desarrollo del presente trabajo, se considera que los resultados obtenidos permiten acercarse al desarrollo de APCs artificiales que permiten analizar y caracterizar LT-CD8+ antígeno-específicos, y para robustecer esta metodología se recomienda que se tengan en fases futuras del proyecto los siguientes aspectos:

Nuevo diseño para el procesamiento del minigen: Aunque durante el desarrollo del trabajo se evidenció la presentación de los antígenos codificados en el minigen por parte de las células HEK293 transfectadas, controlar el direccionamiento del clivaje del minigen podría mejorar la eficiencia de presentación de las epítopes. Por esto, se sugiere mejorar el diseño del minigen, incluyendo secuencias que dirijan el clivaje hacia la vía endocítica o la vía del proteosoma para lograr un procesamiento más preciso. Además, se incluye una marca de Hemaglutinina (HA) en el extremo amino terminal del minigen y una marca FLAG en el extremo carboxilo terminal del minigen (Figura 42). También se plantea utilizar epítopes de 15-25 aminoácidos que contengan tanto la

epítope que es reconocida por los LT-CD8+ como la epítope que es reconocida por los LT-CD4+ teniendo en cuenta que en el análisis automatizado se encontraron poblaciones de LT-CD4+ expresando marcadores de activación que podrían potenciar la respuesta a la presentación de estos antígenos. En el anexo I se encuentra una descripción detallada del nuevo diseño para el procesamiento del minigen.

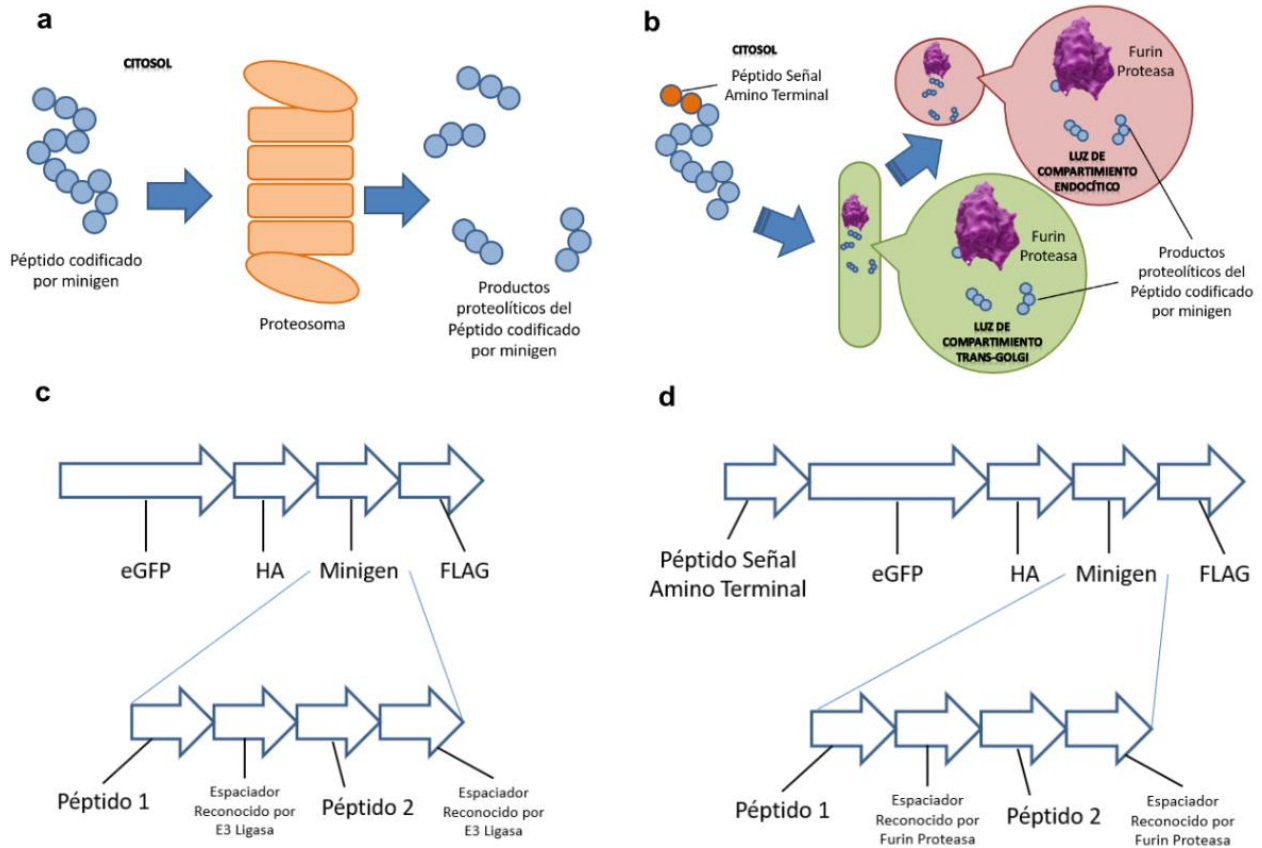


Figura 43. Nuevo diseño de Minigenes. Rutas de procesamiento proteolítico anticipadas. a). Procesamiento del minigen vía proteosoma: esto involucra la poli-ubiquitinación (no mostrada) para su direccionamiento al proteosoma para que las proteínas sean de-ubiquitinadas y degradadas a nivel del citosol y posteriormente puedan ser cargadas en moléculas de MHC (proceso no mostrado). b). Procesamiento del minigen vía Furin Proteasa: el minigen incluye señales de ingreso del polipéptido a la ruta de secreción (Péptido señal amino-terminal) y segmentos reconocidos por la Furin proteasa, la cual tiene la capacidad de la localización subcelular. c). Secuencia codificante para la proteína Quimérica con las señales necesarias para el procesamiento proteolítico anticipado en la Vía Furin Proteasa. Todos los componentes deben estar en el mismo marco de lectura para inducir la síntesis de un polipéptido que ingresa a la ruta de secreción (Péptido señal amino terminal), GFP, tiene una marca HA en el extremo amino terminal del minigen y una marca FLAG en el extremo carboxilo terminal del minigen. El minigen a su vez, está conformado de varios péptidos antigénicos (10-30 péptidos diferentes) separados por secuencias de aminoácidos reconocidas por la Furin proteasa. (d). Secuencia

codificante para la proteína Quimérica con las señales necesarias para el procesamiento proteolítico anticipado en la Vía Proteosoma. Todos los componentes deben estar en el mismo marco de lectura para inducir la síntesis de un polipéptido que es sintetizado en su totalidad en el citosol, GFP, tiene una marca HA en el extremo amino terminal del minigen y una marca FLAG en el extremo carboxilo terminal del minigen. El polipéptido codificado por el minigen, está conformado de varios péptidos antigénicos (10-30 péptidos diferentes) separados por secuencias de aminoácidos reconocidas por la maquinaria de poli-ubiquitinación (E3 ligasa).

Construcción de APCs artificiales estables: Teniendo en cuenta las dificultades presentadas en la transfección de las células K562 es importante optimizar las condiciones de transfección para garantizar la expresión del minigen y de las moléculas coestimuladoras. Para esto, se plantea la posibilidad de generar APCs artificiales estables transducidas por vectores lentivirales que contengan el minigen y las moléculas coestimuladoras para luego ser seleccionadas aprovechando el gen de resistencia a la puomicina presente en el constructo con el que se va a construir el vector lentiviral (Figura 43 y Anexo I).

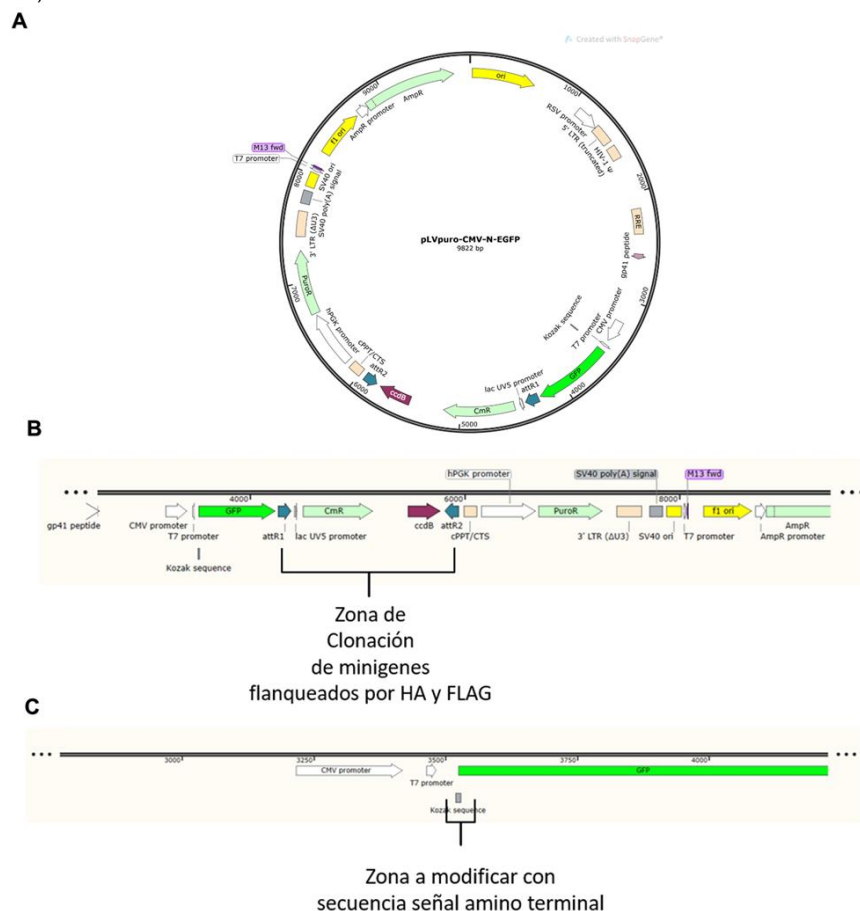


Figura 44. Diseño de vectores lentivirales. a). Para la construcción del vector lentiviral se empleará un plásmido como el ilustrado en el esquema. Este es un plásmido lentiviral que permite insertar secuencias de interés en el extremo C terminal de la proteína eGFP. b). Se indica la región de recombinación del sistema de clonación Gateway, en el que se insertarán las secuencias codificantes para los minigenes, flanqueadas por marcas en su extremo amino terminal (HA) y carboxilo terminal (FLAG). Este constructo induce la expresión de la proteína quimérica vía proteosoma. c). Se indica la región que tendrá que ser modificada por los vectores codificantes para la proteína quimérica con minigenes a ser procesados por la vía Furin proteasa. Esta región será modificada para insertar una región codificante para un péptido señal amino terminal, dirigiendo de esta manera el polipéptido quimérico a la ruta de secreción y eventualmente alcanzando a la Furin proteasa.

Evaluación de las metodologías *in vitro* en cohortes más grandes y distintos antígenos:

Una limitación importante del trabajo fue el número de donantes y antígenos evaluados. Sería importante aumentar la cantidad de donantes evaluados para los demás antígenos presentes en el minigen pues en este caso los donantes fueron evaluados para CMV solamente.

Ensayos de citotoxicidad: En este trabajo se realizó solo un ensayo de producción de Granzima B en los LT-CD8+ Mart-1+ con resultados favorables, por lo que se sugiere realizar esta medición con PBMCs de donantes sanos, con otros antígenos y otros clones de LT-CD8+ antígeno-específicos para determinar la capacidad citotóxica de estos LT activados. Además, sería interesante llevar a cabo ensayos que evalúen la funcionalidad de los LT-CD8+ activados para reconocer células tumorales que expresan el o los antígenos, evidenciando así su capacidad citotóxica.

9. Consideraciones éticas

De conformidad con la Resolución N° 008430 de 1993, que establece las normas científicas, técnicas y administrativas para la investigación en seres humanos, se determina que este estudio conlleva un riesgo mínimo tanto para la persona a cargo de la investigación como para los miembros del laboratorio. Además, no implica riesgo alguno para los donantes, ya que las células a utilizar se obtendrán del Instituto Distrital de Ciencia, Biotecnología e Innovación en Salud (IDCBIS) de la ciudad de Bogotá, y

serán estos quienes se encarguen de realizar la toma de sangre a los donantes sanos. Las muestras serán procesadas en el laboratorio del Grupo de Inmunología y Medicina Traslacional, ubicado en las instalaciones de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional de Colombia. Durante todo el proceso se garantizará la confidencialidad de los datos, se llevará a cabo una disposición adecuada de los desechos químicos y biológicos generados, y se utilizarán los equipos e instalaciones apropiados del laboratorio. Cabe destacar que este estudio recibió la aprobación del Comité de Ética de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional de Colombia el 28 de julio de 2022, bajo el aval B.FM.1.002-CE-0105-22 (Anexo II).

10. Apropiación social del conocimiento

En el transcurso de la elaboración de este trabajo de grado, se llevaron a cabo diversas actividades de apropiación social del conocimiento relacionadas tanto con los temas abordados en este proyecto como con la inmunoterapia contra el cáncer, aspectos que se consideran destacados en este documento:

1. **Eventos de difusión del conocimiento:** Se realizaron dos ponencias en eventos científicos donde se socializaron los resultados de este trabajo. Primero, se hizo una presentación de los resultados en modalidad de ponencia presencial VI Encuentro de Investigaciones Asociación Colombiana de Inmunología (ACOI) (Anexo III). Segundo, se realizó una presentación en modalidad de poster virtual en el 21° Día de la Investigación: Sistemas de salud e investigación de la Fundación Cardio Infantil (Anexo IV). También se presentó el trabajo al Curso IUIS-SMI-ALACI-Immuno-Mexico 2024, titulado "Mecanismos de Inmunoterapias", que se llevará a cabo del 8 al 12 de abril de 2024 en Oaxaca, México en donde se presentará un poster con los resultados obtenidos en este trabajo (Anexo V)

2. **Material audiovisual para la divulgación del conocimiento:** Se llevó a cabo la construcción de la página web del Grupo de Investigación en Inmunología y Medicina Traslacional de la Universidad Nacional de Colombia (I&MT) mediante la integración de

la información recopilada en la búsqueda bibliográfica y los resultados obtenidos en este trabajo, así como en colaboración con otros trabajos de grado de miembros del grupo de Inmunología. Puedes acceder a la página web del grupo de investigación a través del siguiente enlace: <http://investigacionimt.unal.edu.co/grupo-imt/> (Anexo VI).

3. Material audiovisual para personal clínico y pacientes con cáncer sobre la inmunoterapia: A partir de la revisión bibliográfica, se desarrollaron diversos recursos informativos, entre ellos: una infografía impresa que destaca la relevancia de preservar los tumores en el contexto del desarrollo de la inmunoterapia contra el cáncer (Anexo VII); una infografía interactiva que aborda los conceptos clave de la inmunoterapia contra el cáncer (Anexo VIII); dos folletos informativos, uno conciso dirigido a pacientes (Anexo IX) y otro proporcionando información fundamental destinada al personal de salud (Anexo X). Como punto culminante, se produjo un video detallado sobre la inmunoterapia contra el cáncer, accesible en el enlace siguiente: <https://www.youtube.com/watch?v=zvDr1eICQI>.

4. Artículos: En colaboración con los integrantes del Grupo de Inmunología & Medicinal Traslacional se publicó una revisión sistemática y meta-análisis con respecto al efecto de la quimioterapia neoadyuvante en el infiltrado inmune tumoral en la revista PloS como coautora (Anexo XI).

11. Referencias

1. Tan, S., D. Li, and X. Zhu, *Cancer immunotherapy: Pros, cons and beyond*. Biomed Pharmacother, 2020. **124**: p. 109821.
2. Dagher, O.K., et al., *Advances in cancer immunotherapies*. Cell, 2023. **186**(8): p. 1814-1814.e1.
3. Zhang, Y. and Z. Zhang, *The history and advances in cancer immunotherapy: understanding the characteristics of tumor-infiltrating immune cells and their therapeutic implications*. Cell Mol Immunol, 2020. **17**(8): p. 807-821.
4. Lollini, P.L., et al., *Vaccines for tumour prevention*. Nat Rev Cancer, 2006. **6**(3): p. 204-16.
5. Fu, C., et al., *DC-Based Vaccines for Cancer Immunotherapy*. Vaccines (Basel), 2020. **8**(4).
6. Devi, G.R. and S. Nath, *Delivery of Synthetic mRNA Encoding FOXP3 Antigen into Dendritic Cells for Inflammatory Breast Cancer Immunotherapy*. Methods Mol Biol, 2016. **1428**: p. 231-43.
7. Sahin, U., et al., *Personalized RNA mutanome vaccines mobilize poly-specific therapeutic immunity against cancer*. Nature, 2017. **547**(7662): p. 222-226.
8. Carreno, B.M., et al., *Cancer immunotherapy. A dendritic cell vaccine increases the breadth and diversity of melanoma neoantigen-specific T cells*. Science, 2015. **348**(6236): p. 803-8.

9. Patente, T.A., et al., *Human Dendritic Cells: Their Heterogeneity and Clinical Application Potential in Cancer Immunotherapy*. *Front Immunol*, 2018. **9**: p. 3176.
10. Lesterhuis, W.J., et al., *Immunogenicity of dendritic cells pulsed with CEA peptide or transfected with CEA mRNA for vaccination of colorectal cancer patients*. *Anticancer Res*, 2010. **30**(12): p. 5091-7.
11. Cafri, G., et al., *mRNA vaccine-induced neoantigen-specific T cell immunity in patients with gastrointestinal cancer*. *The Journal of clinical investigation*, 2020. **130**(11).
12. Aurisicchio, L., et al., *A novel minigene scaffold for therapeutic cancer vaccines*. *Oncoimmunology*, 2014. **3**(1).
13. Tateshita, N., et al., *Development of a lipoplex-type mRNA carrier composed of an ionizable lipid with a vitamin E scaffold and the KALA peptide for use as an ex vivo dendritic cell-based cancer vaccine*. *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society*, 2019. **310**.
14. Lu, Y., et al., *Efficient identification of mutated cancer antigens recognized by T cells associated with durable tumor regressions*. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*, 2014. **20**(13).
15. Gelband, H., et al., *Cancer: Disease Control Priorities, Third Edition (Volume 3)*. 2015.
16. Bray, F., et al., *Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries*. *CA Cancer J Clin*, 2018. **68**(6): p. 394-424.
17. Kennedy, L.B. and A.K.S. Salama, *A review of cancer immunotherapy toxicity*. *CA Cancer J Clin*, 2020. **70**(2): p. 86-104.
18. Igarashi, Y. and T. Sasada, *Cancer Vaccines: Toward the Next Breakthrough in Cancer Immunotherapy*. *J Immunol Res*, 2020. **2020**: p. 5825401.
19. Maus, M.V., et al., *Adoptive immunotherapy for cancer or viruses*. *Annu Rev Immunol*, 2014. **32**: p. 189-225.
20. Bernal-Estévez, D.A., et al., *Monitoring the responsiveness of T and antigen presenting cell compartments in breast cancer patients is useful to predict clinical tumor response to neoadjuvant chemotherapy*. *BMC Cancer*, 2018. **18**(1): p. 77.
21. Karpanen, T. and J. Olweus, *The Potential of Donor T-Cell Repertoires in Neoantigen-Targeted Cancer Immunotherapy*. *Front Immunol*, 2017. **8**: p. 1718.
22. Wells, D.K., et al., *Key Parameters of Tumor Epitope Immunogenicity Revealed Through a Consortium Approach Improve Neoantigen Prediction*. *Cell*, 2020. **183**(3): p. 818-834.e13.
23. Bradley, P. and P.G. Thomas, *Using T Cell Receptor Repertoires to Understand the Principles of Adaptive Immune Recognition*. *Annu Rev Immunol*, 2019. **37**: p. 547-570.
24. E, S., et al., *Targeting of cancer neoantigens with donor-derived T cell receptor repertoires*. *Science (New York, N.Y.)*, 2016. **352**(6291).
25. Ali, M., et al., *Induction of neoantigen-reactive T cells from healthy donors*. *Nat Protoc*, 2019. **14**(6): p. 1926-1943.
26. Sahin, U., et al., *Personalized RNA mutanome vaccines mobilize poly-specific therapeutic immunity against cancer*. *Nature*, 2017. **547**(7662): p. 222-226.
27. Aurisicchio, L., et al., *Poly-specific neoantigen-targeted cancer vaccines delay patient derived tumor growth*. *J Exp Clin Cancer Res*, 2019. **38**(1): p. 78.
28. Farkona, S., E.P. Diamandis, and I.M. Blasutig, *Cancer immunotherapy: the beginning of the end of cancer?* *BMC Med*, 2016. **14**: p. 73.
29. van der Bruggen, P., et al., *A gene encoding an antigen recognized by cytolytic T lymphocytes on a human melanoma*. *Science*, 1991. **254**(5038): p. 1643-7.
30. Gaugler, B., et al., *Human gene MAGE-3 codes for an antigen recognized on a melanoma by autologous cytolytic T lymphocytes*. *J Exp Med*, 1994. **179**(3): p. 921-30.
31. Banchereau, J. and R.M. Steinman, *Dendritic cells and the control of immunity*. *Nature*, 1998. **392**(6673): p. 245-52.

32. Kawakami, Y., et al., *Identification of a human melanoma antigen recognized by tumor-infiltrating lymphocytes associated with in vivo tumor rejection*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1994. **91**(14): p. 6458-62.
33. Kantoff, P.W., et al., *Sipuleucel-T immunotherapy for castration-resistant prostate cancer*. N Engl J Med, 2010. **363**(5): p. 411-22.
34. Mou, Z., Y. He, and Y. Wu, *Immunoproteomics to identify tumor-associated antigens eliciting humoral response*. Cancer Lett, 2009. **278**(2): p. 123-129.
35. Di Oto, E., et al., *Prognostic impact of HER-2 Subclonal Amplification in breast cancer*. Virchows Arch, 2017. **471**(3): p. 313-319.
36. Brinkman, J.A., et al., *Peptide-based vaccines for cancer immunotherapy*. Expert Opin Biol Ther, 2004. **4**(2): p. 181-98.
37. Disis, M.L., et al., *Generation of T-cell immunity to the HER-2/neu protein after active immunization with HER-2/neu peptide-based vaccines*. J Clin Oncol, 2002. **20**(11): p. 2624-32.
38. Rivoltini, L., et al., *Induction of tumor-reactive CTL from peripheral blood and tumor-infiltrating lymphocytes of melanoma patients by in vitro stimulation with an immunodominant peptide of the human melanoma antigen MART-1*. J Immunol, 1995. **154**(5): p. 2257-65.
39. Simpson, A.J., et al., *Cancer/testis antigens, gametogenesis and cancer*. Nat Rev Cancer, 2005. **5**(8): p. 615-25.
40. Thomas, R., et al., *NY-ESO-1 Based Immunotherapy of Cancer: Current Perspectives*. Front Immunol, 2018. **9**: p. 947.
41. Kakimi, K., et al., *A phase I study of vaccination with NY-ESO-1f peptide mixed with Picibanil OK-432 and Montanide ISA-51 in patients with cancers expressing the NY-ESO-1 antigen*. Int J Cancer, 2011. **129**(12): p. 2836-46.
42. Chamucero-Millares, J.A., D.A. Bernal-Estévez, and C.A. Parra-López, *Usefulness of IL-21, IL-7, and IL-15 conditioned media for expansion of antigen-specific CD8+ T cells from healthy donor-PBMCs suitable for immunotherapy*. Cell Immunol, 2021. **360**: p. 104257.
43. Spaete, R.R., R.C. Gehrz, and M.P. Landini, *Human cytomegalovirus structural proteins*. J Gen Virol, 1994. **75 (Pt 12)**: p. 3287-308.
44. Solache, A., et al., *Identification of three HLA-A*0201-restricted cytotoxic T cell epitopes in the cytomegalovirus protein pp65 that are conserved between eight strains of the virus*. J Immunol, 1999. **163**(10): p. 5512-8.
45. Wloch, M.K., et al., *Safety and immunogenicity of a bivalent cytomegalovirus DNA vaccine in healthy adult subjects*. J Infect Dis, 2008. **197**(12): p. 1634-42.
46. Bouvier, N.M. and P. Palese, *The biology of influenza viruses*. Vaccine, 2008. **26 Suppl 4**(Suppl 4): p. D49-53.
47. Choo, J.A., et al., *The immunodominant influenza A virus M158-66 cytotoxic T lymphocyte epitope exhibits degenerate class I major histocompatibility complex restriction in humans*. J Virol, 2014. **88**(18): p. 10613-23.
48. Lillie, P.J., et al., *Preliminary assessment of the efficacy of a T-cell-based influenza vaccine, MVA-NP+M1, in humans*. Clin Infect Dis, 2012. **55**(1): p. 19-25.
49. Dörrie, J., et al., *Therapeutic Cancer Vaccination with Ex Vivo RNA-Transfected Dendritic Cells-An Update*. Pharmaceutics, 2020. **12**(2).
50. Chen, Y.Z., et al., *Gene carriers and transfection systems used in the recombination of dendritic cells for effective cancer immunotherapy*. Clin Dev Immunol, 2010. **2010**: p. 565643.
51. Li, G.B. and G.X. Lu, *Gene delivery efficiency in bone marrow-derived dendritic cells: comparison of four methods and optimization for lentivirus transduction*. Mol Biotechnol, 2009. **43**(3): p. 250-6.
52. Mack, C.A., et al., *Circumvention of anti-adenovirus neutralizing immunity by administration of an adenoviral vector of an alternate serotype*. Hum Gene Ther, 1997. **8**(1): p. 99-109.

53. Foged, C., et al., *Interaction of dendritic cells with antigen-containing liposomes: effect of bilayer composition*. *Vaccine*, 2004. **22**(15-16): p. 1903-13.
54. Yamada, M., et al., *Tissue and intrahepatic distribution and subcellular localization of a mannosylated lipoplex after intravenous administration in mice*. *J Control Release*, 2004. **98**(1): p. 157-67.
55. Lu, Y., et al., *Development of an antigen-presenting cell-targeted DNA vaccine against melanoma by mannosylated liposomes*. *Biomaterials*, 2007. **28**(21): p. 3255-62.
56. Kim, T.H., et al., *Receptor-mediated gene delivery into antigen presenting cells using mannosylated chitosan/DNA nanoparticles*. *J Nanosci Nanotechnol*, 2006. **6**(9-10): p. 2796-803.
57. Ali, O.A. and D.J. Mooney, *Sustained GM-CSF and PEI condensed pDNA presentation increases the level and duration of gene expression in dendritic cells*. *J Control Release*, 2008. **132**(3): p. 273-8.
58. Potter, H. and R. Heller, *Transfection by Electroporation*. *Curr Protoc Mol Biol*, 2018. **121**: p. 9.3.1-9.3.13.
59. Schwartz, R.H., *T cell anergy*. *Annu Rev Immunol*, 2003. **21**: p. 305-34.
60. Butler, M.O. and N. Hirano, *Human cell-based artificial antigen-presenting cells for cancer immunotherapy*. *Immunol Rev*, 2014. **257**(1): p. 191-209.
61. Kim, J.V., et al., *The ABCs of artificial antigen presentation*. *Nat Biotechnol*, 2004. **22**(4): p. 403-10.
62. Neal, L.R., et al., *The Basics of Artificial Antigen Presenting Cells in T Cell-Based Cancer Immunotherapies*. *J Immunol Res Ther*, 2017. **2**(1): p. 68-79.
63. Klein, E., et al., *Properties of the K562 cell line, derived from a patient with chronic myeloid leukemia*. *Int J Cancer*, 1976. **18**(4): p. 421-31.
64. Butler, M.O., et al., *A panel of human cell-based artificial APC enables the expansion of long-lived antigen-specific CD4+ T cells restricted by prevalent HLA-DR alleles*. *Int Immunol*, 2010. **22**(11): p. 863-73.
65. Stepanenko, A.A. and V.V. Dmitrenko, *HEK293 in cell biology and cancer research: phenotype, karyotype, tumorigenicity, and stress-induced genome-phenotype evolution*. *Gene*, 2015. **569**(2): p. 182-90.
66. Hong, C.H., et al., *Antigen Presentation by Individually Transferred HLA Class I Genes in HLA-A, HLA-B, HLA-C Null Human Cell Line Generated Using the Multiplex CRISPR-Cas9 System*. *J Immunother*, 2017. **40**(6): p. 201-210.
67. Lee, M.N. and M. Meyerson, *Antigen identification for HLA class I- and HLA class II-restricted T cell receptors using cytokine-capturing antigen-presenting cells*. *Sci Immunol*, 2021. **6**(55).
68. Prasher, D.C., *Using GFP to see the light*. *Trends Genet*, 1995. **11**(8): p. 320-3.
69. Schmidt, A., et al., *lacZ transgenic mice to monitor gene expression in embryo and adult*. *Brain Res Brain Res Protoc*, 1998. **3**(1): p. 54-60.
70. Hoffman, R.M., *Green fluorescent protein imaging of tumor cells in mice*. *Lab Anim (NY)*, 2002. **31**(4): p. 34-41.
71. Okabe, M., et al., *'Green mice' as a source of ubiquitous green cells*. *FEBS Lett*, 1997. **407**(3): p. 313-9.
72. Yang, M., et al., *Whole-body optical imaging of green fluorescent protein-expressing tumors and metastases*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2000. **97**(3): p. 1206-11.
73. Han, Q., et al., *Polyfunctional responses by human T cells result from sequential release of cytokines*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2012. **109**(5): p. 1607-12.
74. Peng, S., et al., *Sensitive Detection and Analysis of Neoantigen-Specific T Cell Populations from Tumors and Blood*. *Cell Rep*, 2019. **28**(10): p. 2728-2738.e7.
75. Bentzen, A.K. and S.R. Hadrup, *Evolution of MHC-based technologies used for detection of antigen-responsive T cells*. *Cancer Immunol Immunother*, 2017. **66**(5): p. 657-666.
76. Zappasodi, R., et al., *In vitro assays for effector T cell functions and activity of immunomodulatory antibodies*. *Methods Enzymol*, 2020. **631**: p. 43-59.

77. Rochman, Y., R. Spolski, and W.J. Leonard, *New insights into the regulation of T cells by gamma(c) family cytokines*. Nat Rev Immunol, 2009. **9**(7): p. 480-90.
78. Jicha, D.L., J.J. Mulé, and S.A. Rosenberg, *Interleukin 7 generates antitumor cytotoxic T lymphocytes against murine sarcomas with efficacy in cellular adoptive immunotherapy*. J Exp Med, 1991. **174**(6): p. 1511-5.
79. Shevach, E.M., *Mechanisms of foxp3+ T regulatory cell-mediated suppression*. Immunity, 2009. **30**(5): p. 636-45.
80. Boyman, O., et al., *Cytokines and T-cell homeostasis*. Curr Opin Immunol, 2007. **19**(3): p. 320-6.
81. Ettinger, R., et al., *IL-21 induces differentiation of human naive and memory B cells into antibody-secreting plasma cells*. J Immunol, 2005. **175**(12): p. 7867-79.
82. van den Broek, T., J.A.M. Borghans, and F. van Wijk, *The full spectrum of human naive T cells*. Nat Rev Immunol, 2018. **18**(6): p. 363-373.
83. Melichar, B., et al., *Expression of costimulatory molecules CD80 and CD86 and their receptors CD28, CTLA-4 on malignant ascites CD3+ tumour-infiltrating lymphocytes (TIL) from patients with ovarian and other types of peritoneal carcinomatosis*. Clin Exp Immunol, 2000. **119**(1): p. 19-27.
84. Young, J.W., et al., *The B7/BB1 antigen provides one of several costimulatory signals for the activation of CD4+ T lymphocytes by human blood dendritic cells in vitro*. J Clin Invest, 1992. **90**(1): p. 229-37.
85. Li, Z., et al., *CD83: Activation Marker for Antigen Presenting Cells and Its Therapeutic Potential*. Front Immunol, 2019. **10**: p. 1312.
86. Hirano, N., et al., *Engagement of CD83 ligand induces prolonged expansion of CD8+ T cells and preferential enrichment for antigen specificity*. Blood, 2006. **107**(4): p. 1528-36.
87. Wallet, M.A., P. Sen, and R. Tisch, *Immunoregulation of dendritic cells*. Clin Med Res, 2005. **3**(3): p. 166-75.
88. Shuford, W.W., et al., *4-1BB costimulatory signals preferentially induce CD8+ T cell proliferation and lead to the amplification in vivo of cytotoxic T cell responses*. J Exp Med, 1997. **186**(1): p. 47-55.
89. Martinez-Perez, A.G., et al., *4-1BBL as a Mediator of Cross-Talk between Innate, Adaptive, and Regulatory Immunity against Cancer*. Int J Mol Sci, 2021. **22**(12).
90. Díaz, Á., et al., *CD40-CD154: A perspective from type 2 immunity*. Semin Immunol, 2021. **53**: p. 101528.
91. Alunno, A., et al., *Novel Therapeutic Strategies in Primary Sjögren's Syndrome*. Isr Med Assoc J, 2017. **19**(9): p. 576-580.
92. Hassan, G.S., J. Stagg, and W. Mourad, *Role of CD154 in cancer pathogenesis and immunotherapy*. Cancer Treat Rev, 2015. **41**(5): p. 431-40.
93. Bacher, P. and A. Scheffold, *Flow-cytometric analysis of rare antigen-specific T cells*. Cytometry A, 2013. **83**(8): p. 692-701.
94. Dawicki, W. and T.H. Watts, *Expression and function of 4-1BB during CD4 versus CD8 T cell responses in vivo*. Eur J Immunol, 2004. **34**(3): p. 743-751.
95. Otano, I., et al., *CD137 (4-1BB) costimulation of CD8*. Nat Commun, 2021. **12**(1): p. 7296.
96. Bajnok, A., et al., *The Distribution of Activation Markers and Selectins on Peripheral T Lymphocytes in Preeclampsia*. Mediators Inflamm, 2017. **2017**: p. 8045161.
97. Spetz, J., A.G. Presser, and K.A. Sarosiek, *T Cells and Regulated Cell Death: Kill or Be Killed*. Int Rev Cell Mol Biol, 2019. **342**: p. 27-71.
98. Reddy, M., et al., *Comparative analysis of lymphocyte activation marker expression and cytokine secretion profile in stimulated human peripheral blood mononuclear cell cultures: an in vitro model to monitor cellular immune function*. J Immunol Methods, 2004. **293**(1-2): p. 127-42.
99. Marzio, R., J. Mauël, and S. Betz-Corradin, *CD69 and regulation of the immune function*. Immunopharmacol Immunotoxicol, 1999. **21**(3): p. 565-82.

100. González-Amaro, R., et al., *Is CD69 an effective brake to control inflammatory diseases?* Trends Mol Med, 2013. **19**(10): p. 625-32.
101. Lim, L.C., et al., *A whole-blood assay for qualitative and semiquantitative measurements of CD69 surface expression on CD4 and CD8 T lymphocytes using flow cytometry.* Clin Diagn Lab Immunol, 1998. **5**(3): p. 392-8.
102. Gorabi, A.M., et al., *The pivotal role of CD69 in autoimmunity.* J Autoimmun, 2020. **111**: p. 102453.
103. Mallett, S., S. Fossum, and A.N. Barclay, *Characterization of the MRC OX40 antigen of activated CD4 positive T lymphocytes--a molecule related to nerve growth factor receptor.* EMBO J, 1990. **9**(4): p. 1063-8.
104. Croft, M., et al., *The significance of OX40 and OX40L to T-cell biology and immune disease.* Immunol Rev, 2009. **229**(1): p. 173-91.
105. Rogers, P.R., et al., *OX40 promotes Bcl-xL and Bcl-2 expression and is essential for long-term survival of CD4 T cells.* Immunity, 2001. **15**(3): p. 445-55.
106. Walker, L.S., et al., *Compromised OX40 function in CD28-deficient mice is linked with failure to develop CXC chemokine receptor 5-positive CD4 cells and germinal centers.* J Exp Med, 1999. **190**(8): p. 1115-22.
107. Jubel, J.M., et al., *The Role of PD-1 in Acute and Chronic Infection.* Front Immunol, 2020. **11**: p. 487.
108. Keir, M.E., et al., *PD-1 and its ligands in tolerance and immunity.* Annu Rev Immunol, 2008. **26**: p. 677-704.
109. Pentcheva-Hoang, T., et al., *B7-1 and B7-2 selectively recruit CTLA-4 and CD28 to the immunological synapse.* Immunity, 2004. **21**(3): p. 401-13.
110. Walunas, T.L., et al., *CD28 expression is not essential for positive and negative selection of thymocytes or peripheral T cell tolerance.* J Immunol, 1996. **156**(3): p. 1006-13.
111. Buchbinder, E.I. and A. Desai, *CTLA-4 and PD-1 Pathways: Similarities, Differences, and Implications of Their Inhibition.* Am J Clin Oncol, 2016. **39**(1): p. 98-106.
112. Sharpe, A.H. and G.J. Freeman, *The B7-CD28 superfamily.* Nat Rev Immunol, 2002. **2**(2): p. 116-26.
113. Workman, C.J., et al., *Lymphocyte activation gene-3 (CD223) regulates the size of the expanding T cell population following antigen activation in vivo.* J Immunol, 2004. **172**(9): p. 5450-5.
114. Ménager, J., et al., *Cross-presentation of synthetic long peptides by human dendritic cells: a process dependent on ERAD component p97/VCP but Not sec61 and/or Derlin-1.* PLoS One, 2014. **9**(2): p. e89897.
115. Aspod, C., et al., *pDCs efficiently process synthetic long peptides to induce functional virus- and tumour-specific T-cell responses.* Eur J Immunol, 2014. **44**(10): p. 2880-92.
116. Wang, M., et al., *Identification of MHC class II restricted T-cell-mediated reactivity against MHC class I binding Mycobacterium tuberculosis peptides.* Immunology, 2011. **132**(4): p. 482-91.
117. Dhanda, S.K., et al., *IEDB-AR: immune epitope database-analysis resource in 2019.* Nucleic Acids Res, 2019. **47**(W1): p. W502-W506.
118. 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.
119. Jain, R.K., et al., *Oligomerization of green fluorescent protein in the secretory pathway of endocrine cells.* Biochem J, 2001. **360**(Pt 3): p. 645-9.
120. Arnaud, M., et al., *Sensitive identification of neoantigens and cognate TCRs in human solid tumors.* Nat Biotechnol, 2022. **40**(5): p. 656-660.
121. Liu, Y., et al., *Tumor microenvironment-mediated immune tolerance in development and treatment of gastric cancer.* Front Immunol, 2022. **13**: p. 1016817.
122. Phetsouphanh, C., J.J. Zaunders, and A.D. Kelleher, *Detecting Antigen-Specific T Cell Responses: From Bulk Populations to Single Cells.* Int J Mol Sci, 2015. **16**(8): p. 18878-93.

123. Azuma, M., *Co-signal Molecules in T-Cell Activation : Historical Overview and Perspective*. Adv Exp Med Biol, 2019. **1189**: p. 3-23.
124. Curtsinger, J.M., et al., *Inflammatory cytokines provide a third signal for activation of naive CD4+ and CD8+ T cells*. J Immunol, 1999. **162**(6): p. 3256-62.
125. Tanimoto, K., et al., *Genetically engineered fixed K562 cells: potent "off-the-shelf" antigen-presenting cells for generating virus-specific T cells*. Cytotherapy, 2014. **16**(1): p. 135-46.
126. Riedhammer, C., D. Halbritter, and R. Weissert, *Peripheral Blood Mononuclear Cells: Isolation, Freezing, Thawing, and Culture*. Methods Mol Biol, 2016. **1304**: p. 53-61.
127. Van Camp, K., et al., *Efficient mRNA electroporation of peripheral blood mononuclear cells to detect memory T cell responses for immunomonitoring purposes*. J Immunol Methods, 2010. **354**(1-2): p. 1-10.
128. Chong, Z.X., S.K. Yeap, and W.Y. Ho, *Transfection types, methods and strategies: a technical review*. PeerJ, 2021. **9**: p. e11165.
129. Nastasi, C., L. Mannarino, and M. D'Incalci, *DNA Damage Response and Immune Defense*. Int J Mol Sci, 2020. **21**(20).
130. Mortara, L., et al., *Therapy-induced antitumor vaccination by targeting tumor necrosis factor alpha to tumor vessels in combination with melphalan*. Eur J Immunol, 2007. **37**(12): p. 3381-92.
131. Lejeune, F.J., et al., *Efficiency of recombinant human TNF in human cancer therapy*. Cancer Immun, 2006. **6**: p. 6.
132. Kang, S., H.M. Brown, and S. Hwang, *Direct Antiviral Mechanisms of Interferon-Gamma*. Immune Netw, 2018. **18**(5): p. e33.
133. Jouanguy, E., et al., *A human IFNGR1 small deletion hotspot associated with dominant susceptibility to mycobacterial infection*. Nat Genet, 1999. **21**(4): p. 370-8.
134. Ikeda, H., L.J. Old, and R.D. Schreiber, *The roles of IFN gamma in protection against tumor development and cancer immunoediting*. Cytokine Growth Factor Rev, 2002. **13**(2): p. 95-109.
135. Ikeda, H, R.R., A.M. Ghoneim, and N. El-Mashad, *TNF- α gene polymorphisms and expression*. Springerplus, 2016. **5**(1): p. 1508.
136. Trapani, J.A. and V.R. Sutton, *Granzyme B: pro-apoptotic, antiviral and antitumor functions*. Curr Opin Immunol, 2003. **15**(5): p. 533-43.
137. de Jong, R., et al., *Regulation of expression of CD27, a T cell-specific member of a novel family of membrane receptors*. J Immunol, 1991. **146**(8): p. 2488-94.
138. Walker, L.S., et al., *Co-stimulation and selection for T-cell help for germinal centres: the role of CD28 and OX40*. Immunol Today, 2000. **21**(7): p. 333-7.
139. Acuto, O. and F. Michel, *CD28-mediated co-stimulation: a quantitative support for TCR signalling*. Nat Rev Immunol, 2003. **3**(12): p. 939-51.
140. Kaminski, D.A., et al., *CD28 and inducible costimulator (ICOS) signalling can sustain CD154 expression on activated T cells*. Immunology, 2009. **127**(3): p. 373-85.
141. Wolf, M., et al., *Activation-induced expression of CD137 permits detection, isolation, and expansion of the full repertoire of CD8+ T cells responding to antigen without requiring knowledge of epitope specificities*. Blood, 2007. **110**(1): p. 201-10.
142. Ahn, E., et al., *Role of PD-1 during effector CD8 T cell differentiation*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2018. **115**(18): p. 4749-4754.
143. Waterhouse, P., et al., *Lymphoproliferative disorders with early lethality in mice deficient in Ctl α -4*. Science, 1995. **270**(5238): p. 985-8.
144. Steiner, K., et al., *Enhanced expression of CTLA-4 (CD152) on CD4+ T cells in HIV infection*. Clin Exp Immunol, 1999. **115**(3): p. 451-7.
145. Goldberg, M.V. and C.G. Drake, *LAG-3 in Cancer Immunotherapy*. Curr Top Microbiol Immunol, 2011. **344**: p. 269-78.
146. Fuertes Marraco, S.A., et al., *Inhibitory Receptors Beyond T Cell Exhaustion*. Front Immunol, 2015. **6**: p. 310.

147. Wang, W., et al., *PD-L1/PD-1 signal deficiency promotes allogeneic immune responses and accelerates heart allograft rejection*. *Transplantation*, 2008. **86**(6): p. 836-44.
148. Bernal-Estévez, D., et al., *Chemotherapy and radiation therapy elicits tumor specific T cell responses in a breast cancer patient*. *BMC Cancer*, 2016. **16**: p. 591.
149. Kaech, S.M., E.J. Wherry, and R. Ahmed, *Effector and memory T-cell differentiation: implications for vaccine development*. *Nat Rev Immunol*, 2002. **2**(4): p. 251-62.
150. Hsiue, E.H., et al., *Targeting a neoantigen derived from a common*. *Science*, 2021. **371**(6533).
151. Maus, M.V., et al., *Ex vivo expansion of polyclonal and antigen-specific cytotoxic T lymphocytes by artificial APCs expressing ligands for the T-cell receptor, CD28 and 4-1BB*. *Nat Biotechnol*, 2002. **20**(2): p. 143-8.
152. Zeng, W., et al., *Artificial antigen-presenting cells expressing CD80, CD70, and 4-1BB ligand efficiently expand functional T cells specific to tumor-associated antigens*. *Immunobiology*, 2014. **219**(8): p. 583-92.
153. Shao, J., et al., *Artificial antigen-presenting cells are superior to dendritic cells at inducing antigen-specific cytotoxic T lymphocytes*. *Cell Immunol*, 2018. **334**: p. 78-86.
154. Butler, M.O., et al., *Long-lived antitumor CD8+ lymphocytes for adoptive therapy generated using an artificial antigen-presenting cell*. *Clin Cancer Res*, 2007. **13**(6): p. 1857-67.

12. Figuras suplementarias

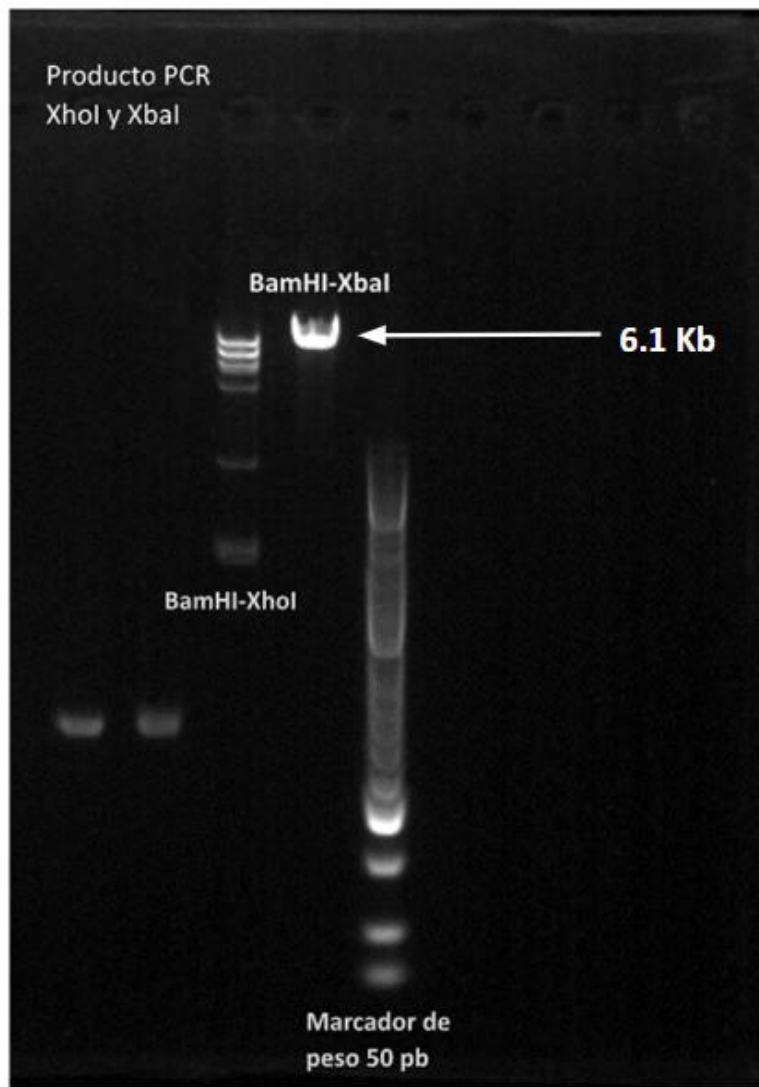


Figura Suplementaria 1 Productos de digestión del vector pcDNA 3.1-N-eGFP con Bam-HI – Xho-I y Bam-HI – Xba-I. Se digiere el vector pcDNA 3.1-N-eGFP con el par de enzimas Bam-HI – Xho-I y Bam-HI – Xba-I con la enzima de restricción PstI-HF durante 1 hora a 37°C. Se muestra el gel de agarosa de 1,5% en el que se evidencia el tamaño del producto de digestión para corroborar la integridad del vector. Se utilizó el marcador de peso “Hyper Ladder” (Bioline) de 50 pares de bases que cubre un rango de peso de 2000 a 50 pares de bases.

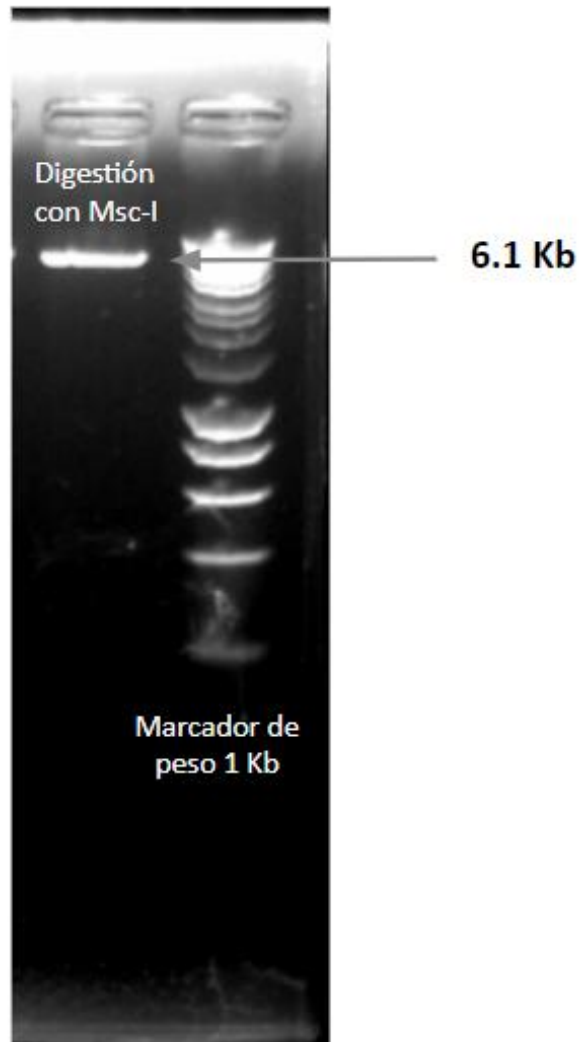


Figura Suplementaria 2 Productos de digestión del vector pcDNA 3.1-N-eGFP con la enzima Msc-I. Se digiere el vector pcDNA 3.1-N-eGFP la enzima de restricción Msc-I (New England Biolabs) durante 1 hora a 37°C. Se muestra el gel de agarosa de 1,5% en el que se evidencia el tamaño del producto de digestión (izquierda). Se utilizó el marcador de peso "Hyper Ladder" (Bioline) de 1000 pares de bases que cubre un rango de peso de 10.000 a 200 pares de bases.

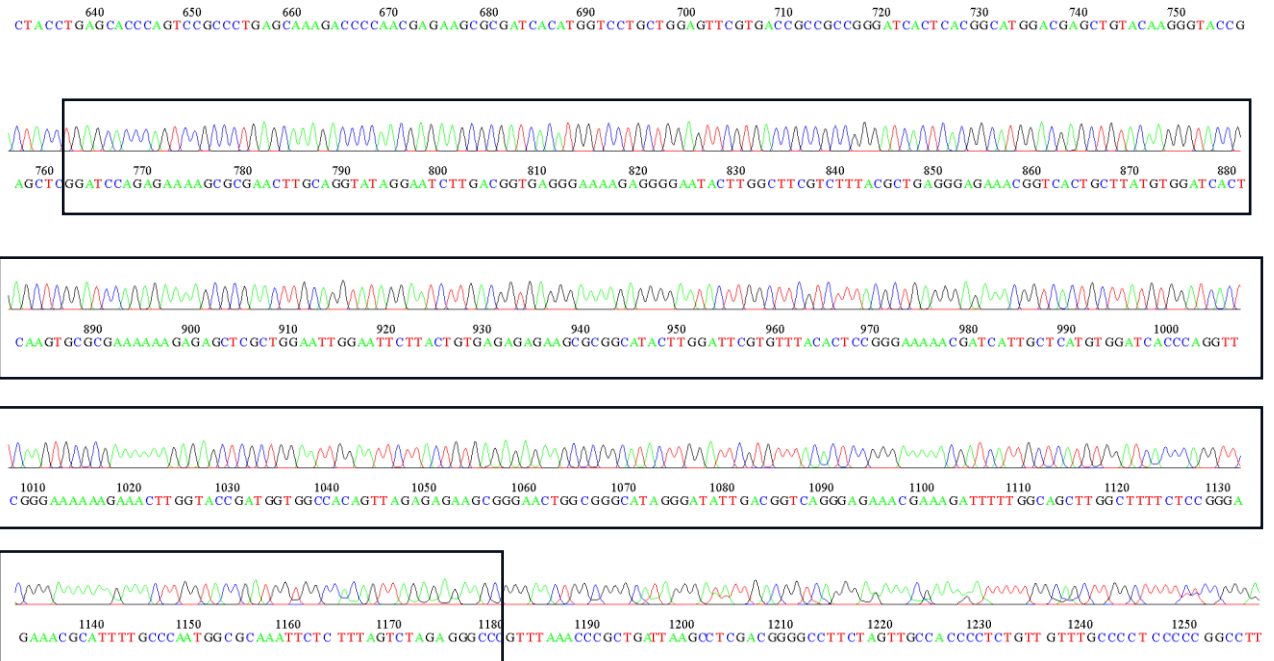
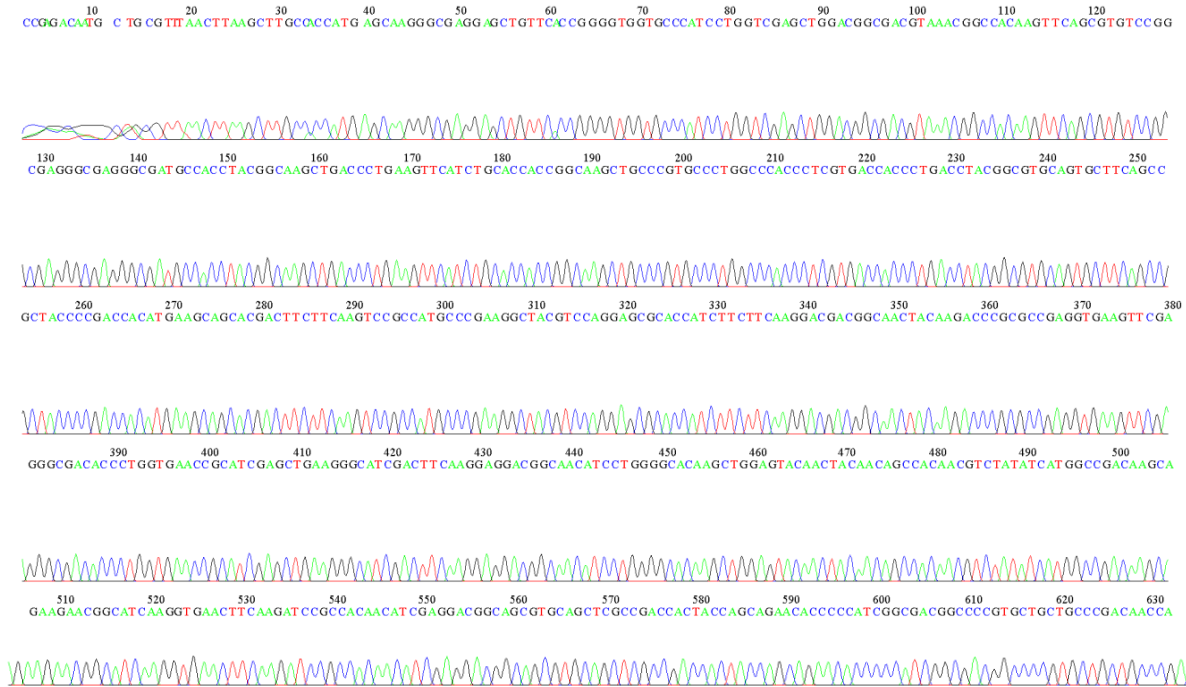


Figura Suplementaria 3. Secuenciación del plásmido pdDNA 3.1-N-EGFP-Minigen en MacroGen. 440 ng/μL del plásmido que se obtuvo luego de la ligación del minigen al vector fueron enviados a MacroGen a secuenciar por la técnica de Sanger (CES) en un tipo de secuenciación estándar. En negro se muestra la sección en la que se encuentra la secuencia del minigen.

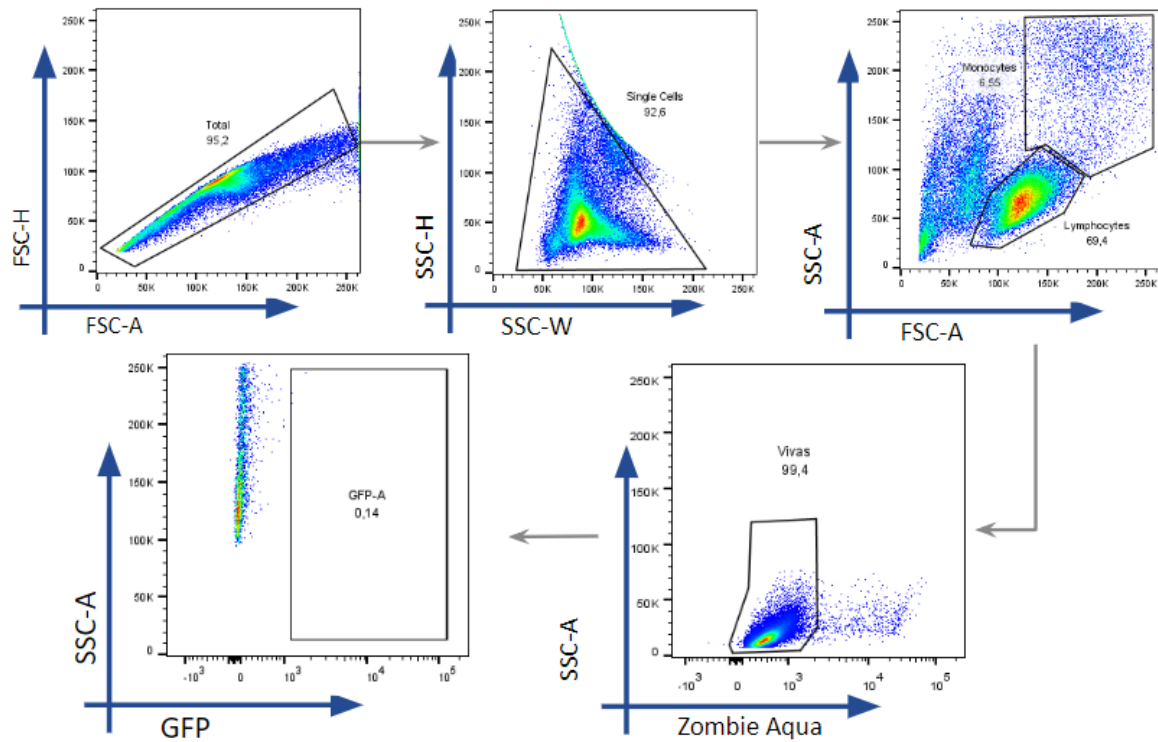


Figura Suplementaria 4. Estrategia de gating de la transfección de PBMCs Las células eran transfectadas por electroporación o lipofectamina durante 24 horas con el plásmido pcDNA 3.1-N-EGFP y luego fueron marcadas con Zombie Aqua como marcador de viabilidad. Se determinó la población monocitoide mediante SSC-A y FSC-A y una vez seleccionados los monocitos se estableció el porcentaje de células GFP +.

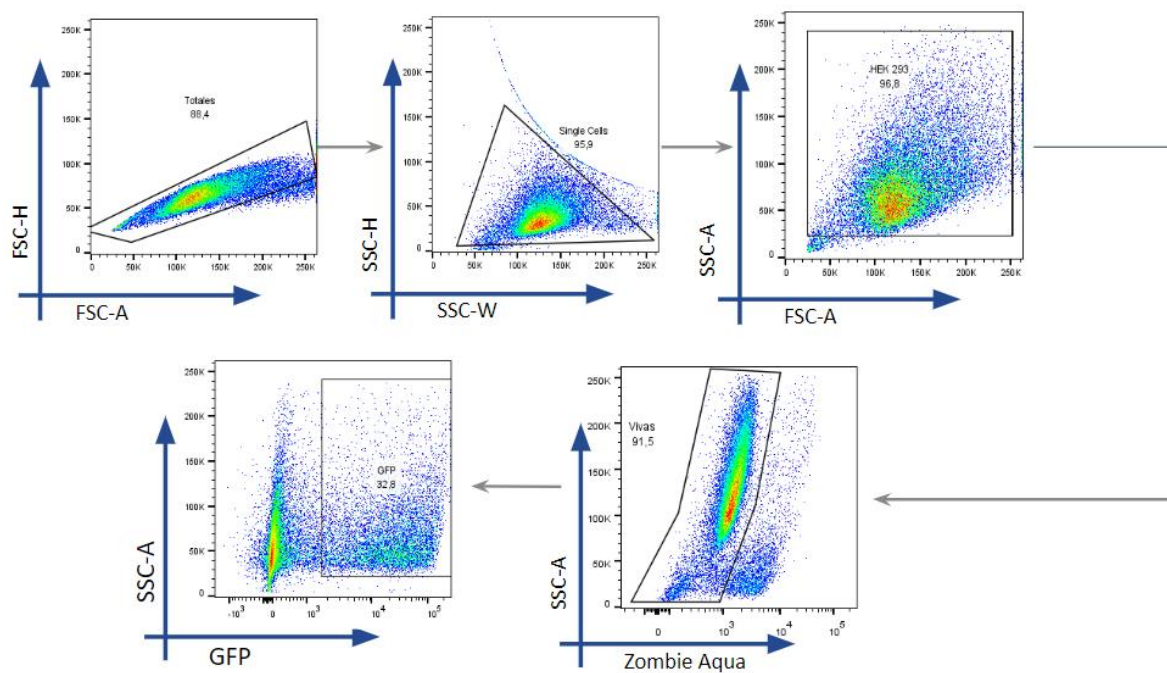


Figura Suplementaria 5 Estrategia de gating de transfección de células HEK293. Las células eran transfectadas por electroporación, lipofectamina o transducidas con el adenovirus durante 24 horas con el plásmido pcDNA 3.1-N-EGFP o el plásmido pcDNA 3.1-N-EGFP-Minigen y luego fueron marcadas con Zombie Aqua como marcador de viabilidad. Se determinó la población celular mediante SSC-A y FSC-A y una vez seleccionadas las HEK293 se estableció el porcentaje de células GFP +.

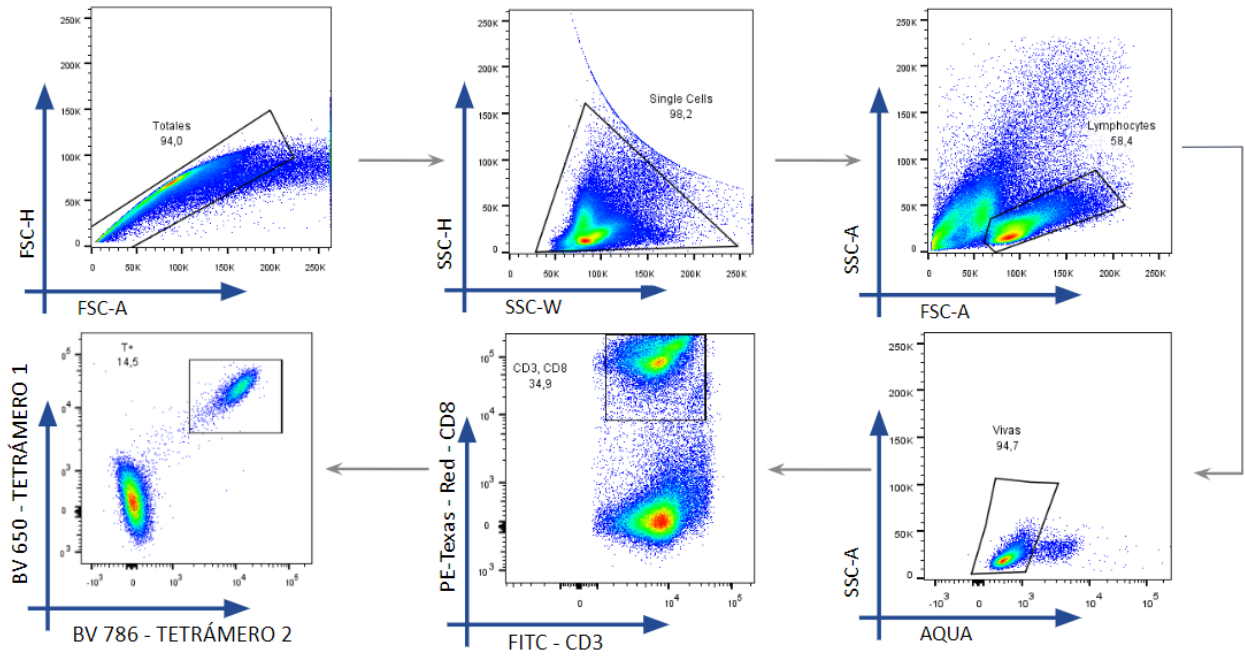


Figura Suplementaria 6 estrategia de "gating" para la identificación de LT CD8 antígeno específicos mediante la marcación doble de tetrámero. Las células eran marcadas con Zombie Aqua como marcador de viabilidad y posterior marcación doble de tetrámero y antígenos superficiales CD3 y CD8. Se determinó la población linfoide mediante SSC-A y FSC-A y una vez seleccionados los LT CD8+ se estableció el porcentaje de células tetrámero-positivas para cada uno de los tetrámero.

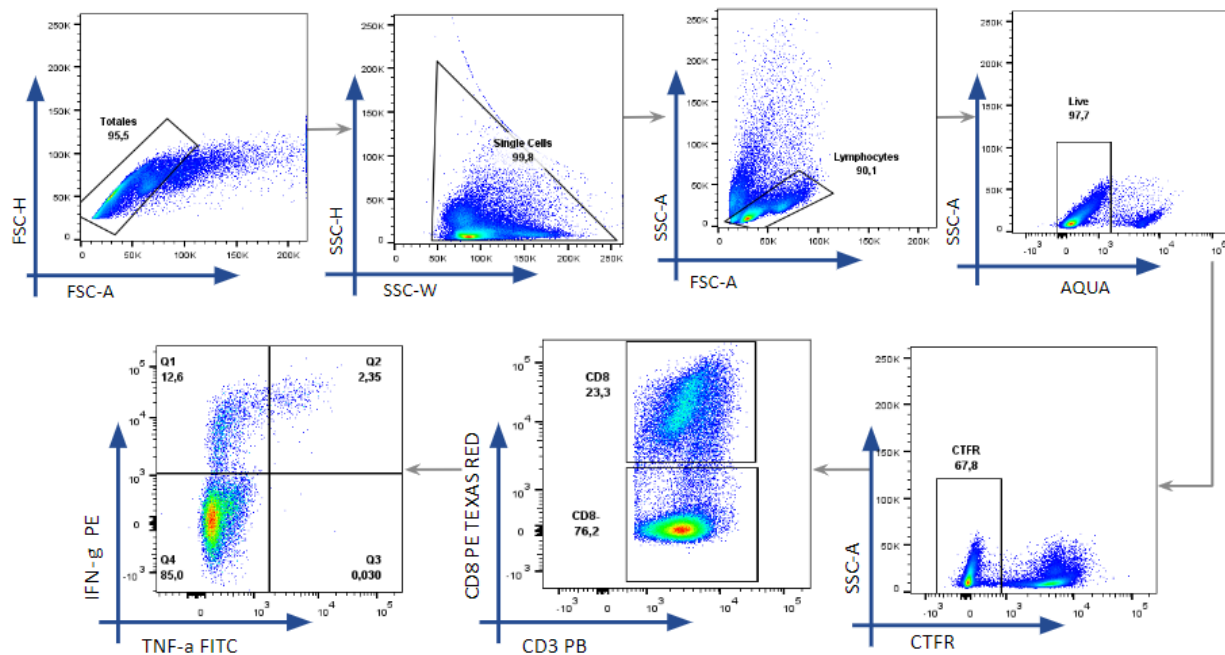


Figura Suplementaria 7 Estrategia de gating de análisis de citoquinas intracelulares mediante citometría de flujo para la detección de LT CD8+ secretoras de IFN- γ y/o TNF- α . Células HEK293 transfectadas con Moléculas-GFP-Minigen, GFP-Minigen o solo GFP fueron usadas como células presentadoras de antígeno para reestimar células provenientes del cultivo de 9 días. Además, se usaron PBMCs autólogas pulsadas o no con el péptido corto del antígeno CMV o MART-1, marcadas con CTFR fueron usadas como células presentadoras como control positivo y negativo. Estas dos poblaciones celulares eran cocultivadas por 6 horas para la presentación del antígeno y posterior secreción de citoquinas. Pasado dicho tiempo, las células eran marcadas con Zombie Aqua como marcador de viabilidad y posterior marcación de antígenos superficiales CD3 y CD8, y antígenos intracelulares IFN- γ y TNF- α . Se determinó la población linfocítica mediante SSC-A y FSC-A y una vez seleccionados los LT CD8+ se estableció el porcentaje de células secretoras de las citoquinas evaluadas.

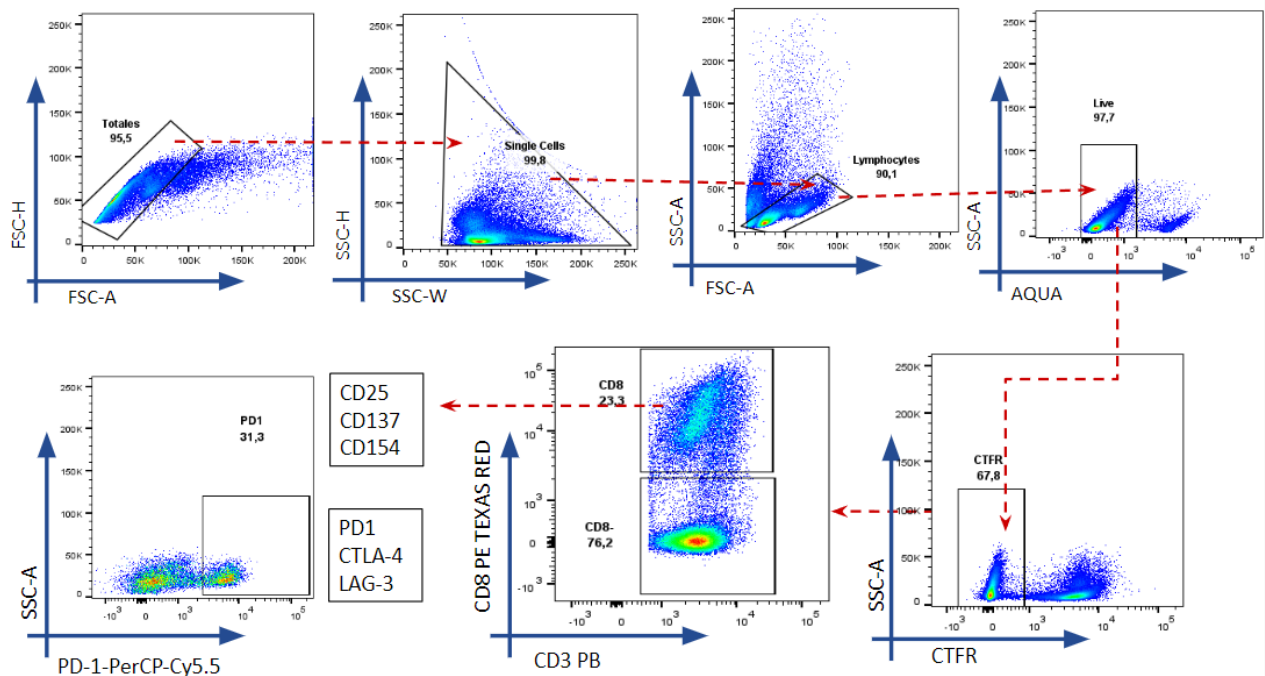


Figura Suplementaria 8 Estrategia de gating de análisis del inmunofenotipo de LT CD8+ mediante citometría de flujo. Células HEK293 transfectadas con Moléculas-GFP-Minigen, GFP-Minigen o solo GFP fueron usadas como células presentadoras de antígeno para reestimar células provenientes del cultivo de 9 días. Además, se usaron PBMCs autólogas pulsadas o no con el péptido corto del antígeno CMV o MART-1, marcadas con CTFR fueron usadas como células presentadoras como control positivo y negativo. Estas dos poblaciones celulares eran cocultivadas por 24 horas para la presentación del antígeno y posterior expresión de marcadores de activación (CD25, CD137, CD154, CD69 y OX40) y marcadores de agotamiento (PD-1, CTLA-4 y LAG-3), en el cocultivo se adicionó el anticuerpo anti-CD154. Pasado dicho tiempo las células eran marcadas con Zombie Aqua como marcador de viabilidad y posterior marcación de antígenos superficiales CD3 y CD8, CD25, CD137, CD69, OX40, PD-1, CTLA-4 y LAG-3. Se determinó la población linfoide mediante SSC-A y FSC-A y una vez seleccionados los LT CD8+ se estableció el porcentaje de células secretoras de los marcadores evaluados.

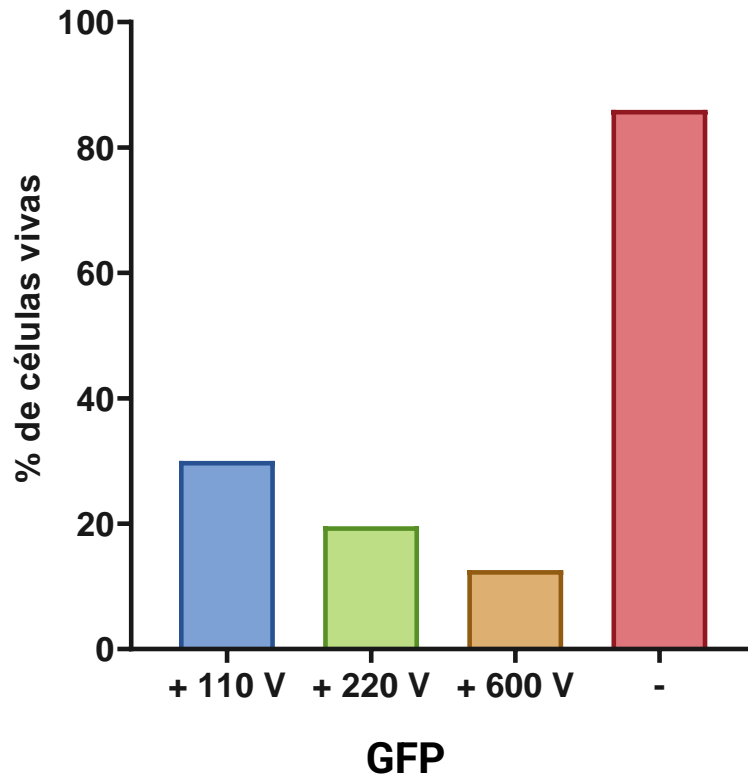
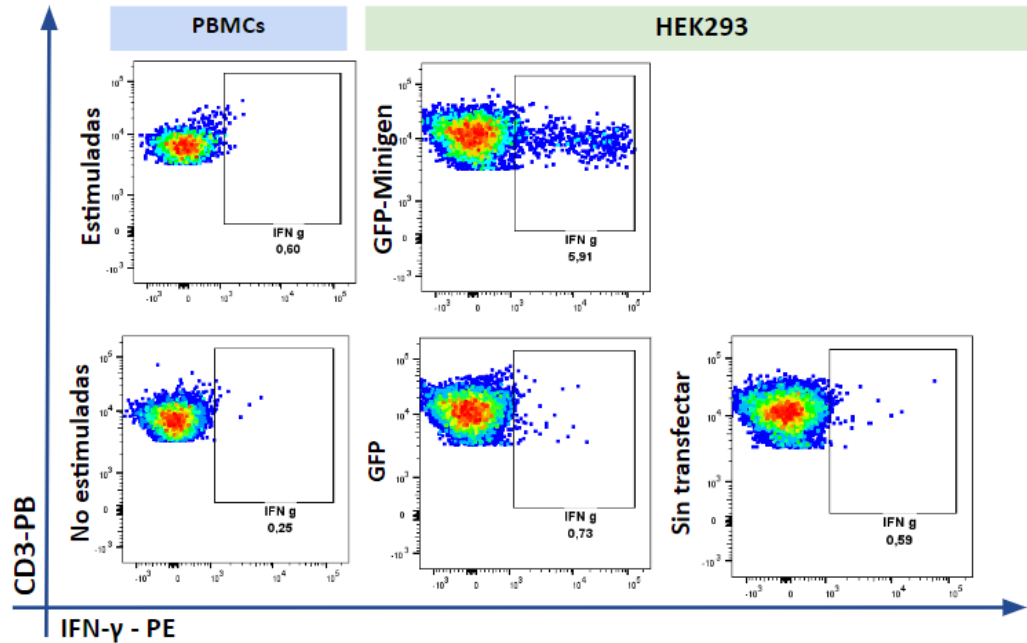


Figura Suplementaria 9. Viabilidad de células HEK293T 48 horas después de ser electroporadas con diferentes voltajes con el plásmido pcDNA 3.1-N-EGFP. Diagrama de barras representativo del porcentaje de células HEK293T vivas 48 horas después de ser electroporadas con el pcDNA 3.1-N-eGFP con diferentes voltajes, 110 V, 220 V y 600 V. Estas permanecieron en cultivo luego de la transfección en medio completo.

a)



b)

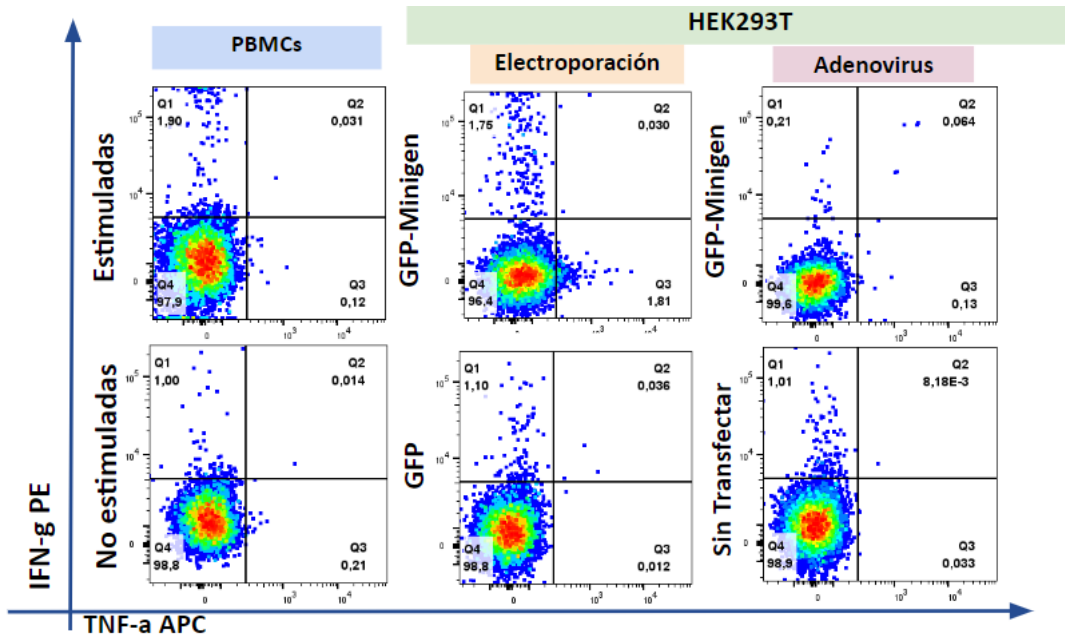


Figura Suplementaria 10. Evaluación de la producción de citoquinas intracelulares de LT CD8+ del donante LAND13 en cocultivo con APCs transfectadas/transducidas. Réplicas experimentales de expresión de a) IFN- γ y b) IFN- γ y TNF- α en LT CD8+ del donante LAND-13 estimulados durante 9 días con el péptido corto pp65 de CMV cocultivados con células HEK293T transfectadas por a) lipofectamina con GFP-Minigen, solo con GFP y b) por electroporación o cocultivados con células HEK293T transducidas por el vector adenoviral que expresa el GFP-Minigen. Como control positivo se utilizaron PBMCs autólogas pulsadas con el péptido pp65 de CMV, como control negativo se utilizaron PBMCs autólogas sin estimular y células HEK293T sin transfectar.

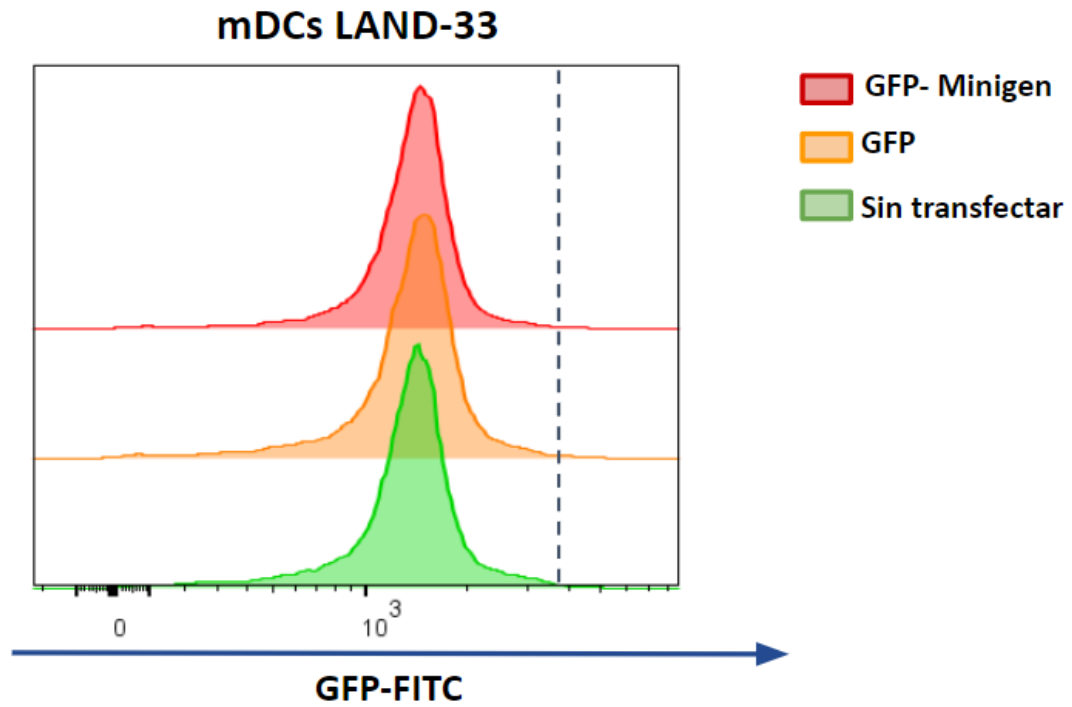


Figura Suplementaria 11 *Expresión de GFP en mDCs del donante LAND-33 transfectadas con el minigen por lipofectamina.* Las mDCs del donante LAND33 son transfectadas por lipofectamina con el plásmido pcDNA 3.1-N-EGFP-Minigen (GFP-Minigen), con el plásmido pcDNA 3.1-N-EGFP (GFP) y se compara con mDCs sin transfectar. Se presenta el histograma de la Intensidad Media de Fluorescencia (MFI) de la GFP expresada.

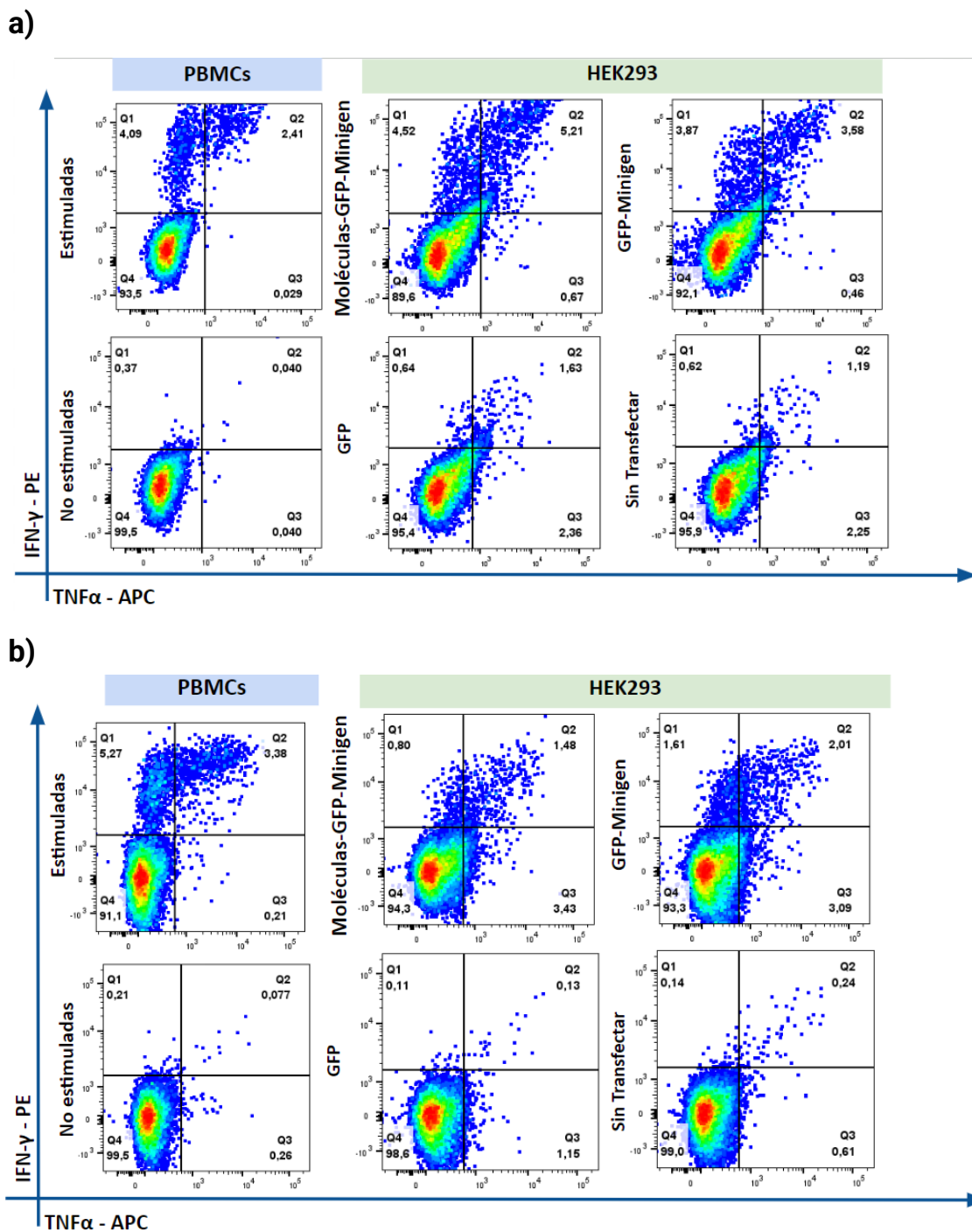


Figura Suplementaria 12. Expresión de citoquinas intracelulares de LT CD8+ de LAND 42 re-estimulados con APCs artificiales. Réplicas experimentales de la expresión de citoquinas intracelulares de LT-CD8 + del donante LAND42 cocultivados con HEK293 transfectadas por lipofectamina con las Moléculas-GFP-Minigen, con GFP-Minigen y solo con GFP; y células HEK293 transducidas con el vector adenoviral que expresa GFP-Minigen. como control negativo se utilizaron PBMCs sin estimular y células HEK293T sin transfectar.

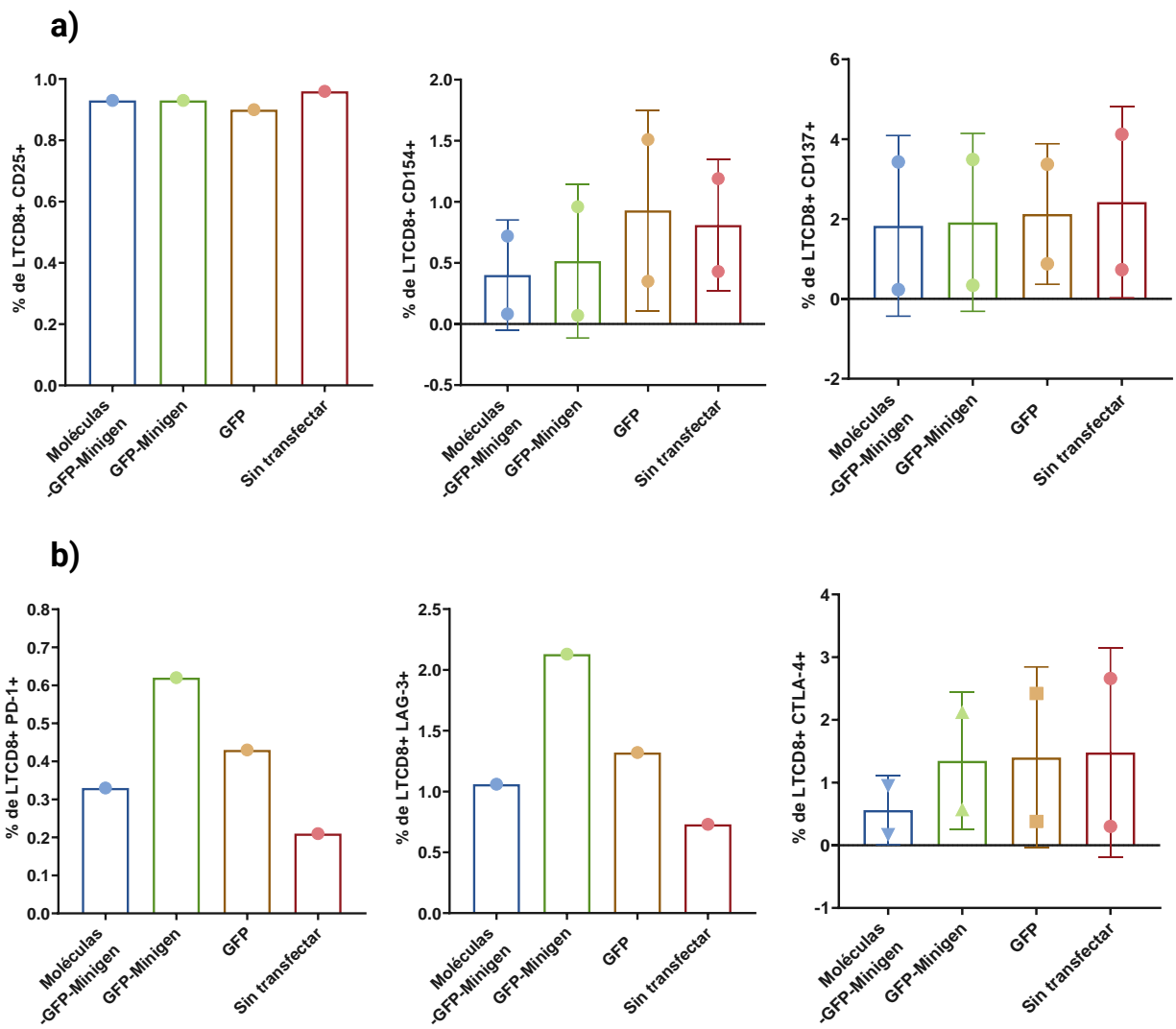
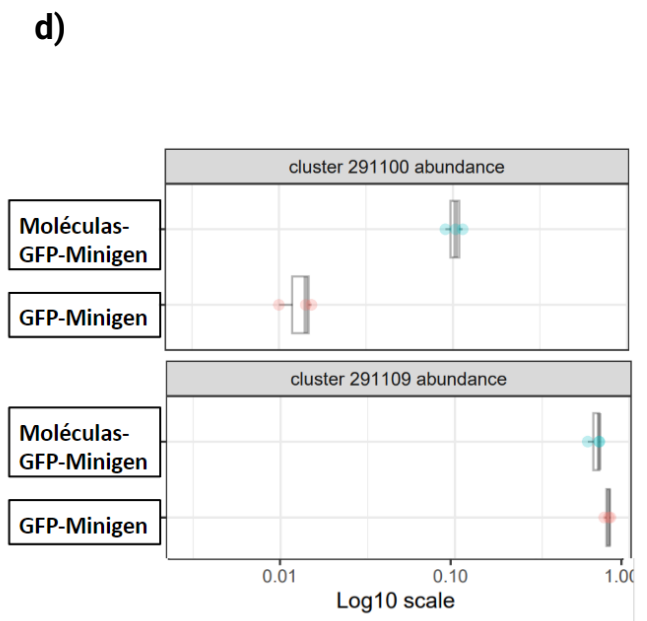
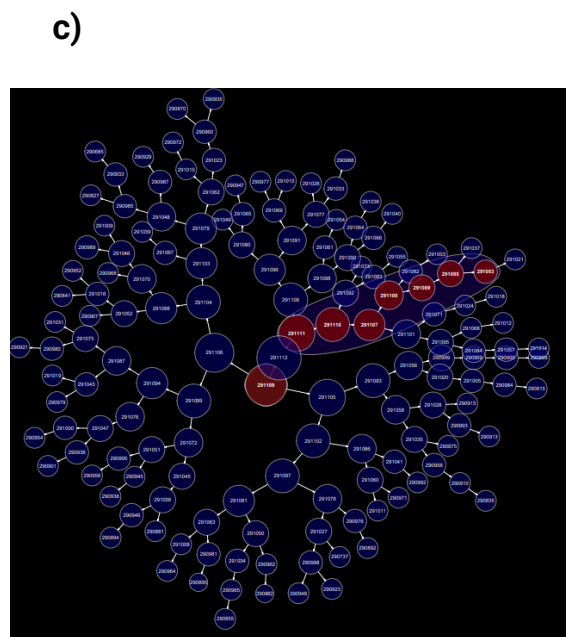
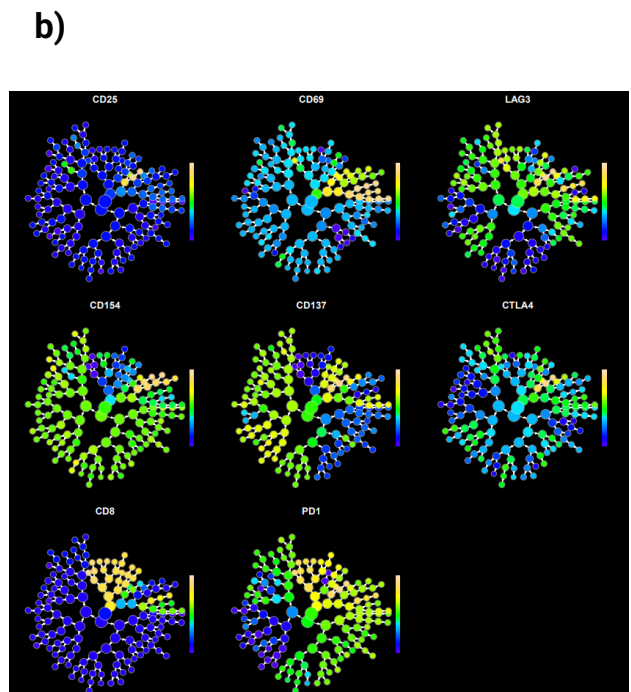
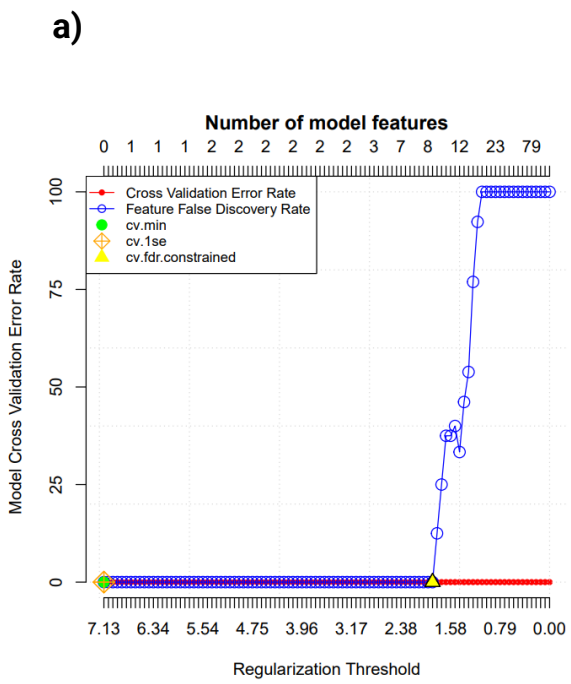


Figura Suplementaria 13. Expresión de marcadores de activación y agotamiento de LT-CD8+ de donantes sanos cocultivados con células K562 transfectados. Diagrama de barras que representan el porcentaje de LTCD8+ que expresan marcadores de a) activación y b) agotamiento luego de ser cocultivados con células K562 transfectadas con las moléculas-GFP-Minigen, con GFP-Minigen y GFP. Como control se utilizaron células K562 sin transfectar para determinar la expresión basal por la presencia de estas células.



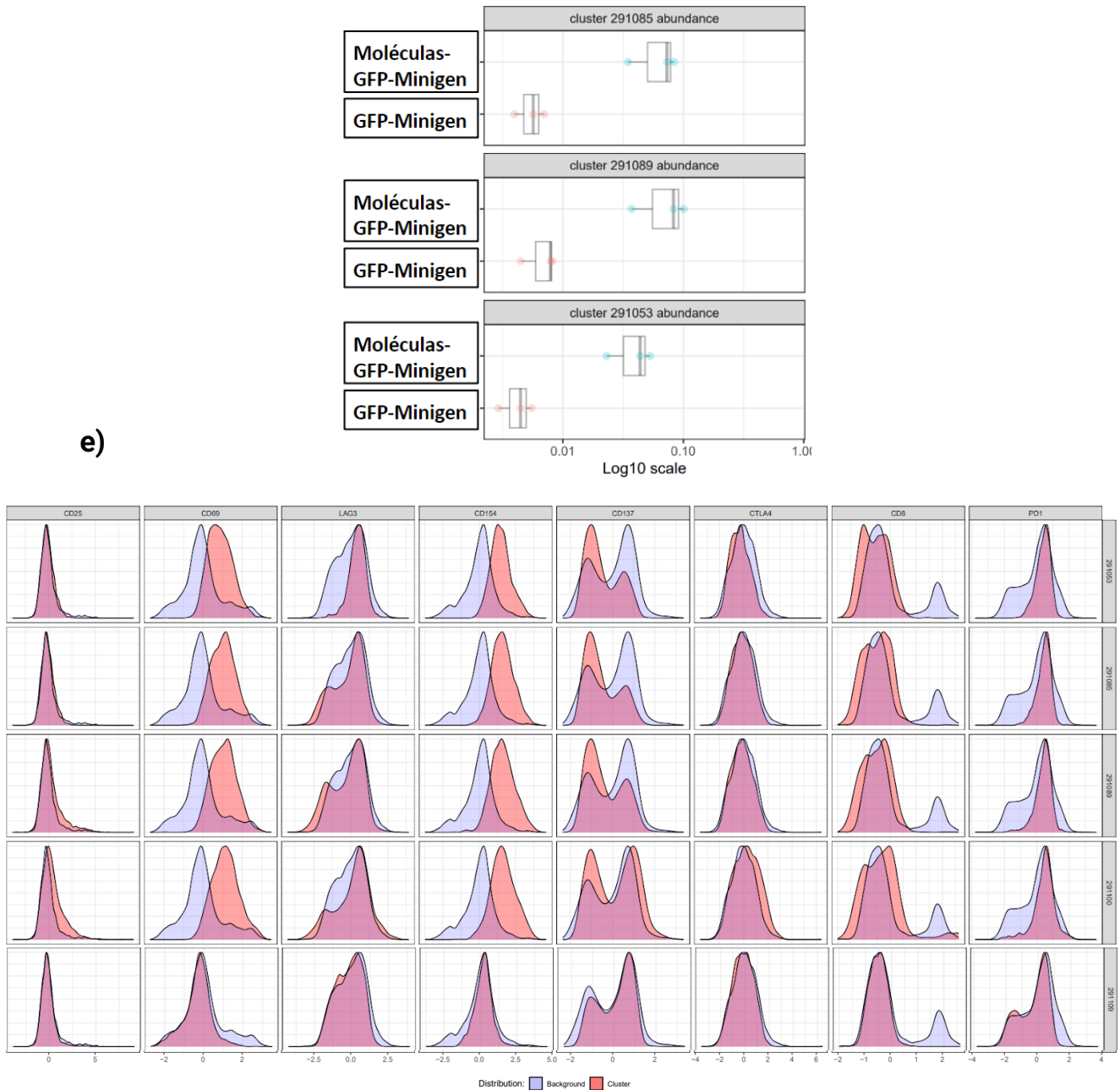
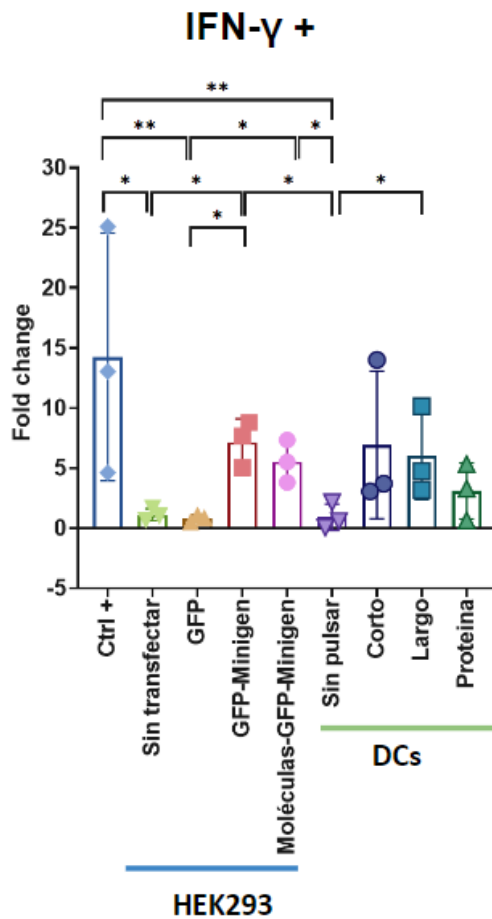


Figura Suplementaria 14. Estructura de resultados del análisis CITRUS del donante LAND42 de LT-CD8- a) Tasa del modelo de error predictivo que evidencia la tasa de error estimado (rojo) y la tasa de descubrimientos falsos (azul) para el modelo PAM. Se resaltan tres modelos (cv.min, círculo verde; cv.1se, diamante naranja; y cv.fdr.constrained, triángulo amarillo). b) Árbol de expresión de marcadores de activación y agotamiento. c) Árbol de agrupaciones que señala las poblaciones identificadas como diferentes por el programa (rojo). d) Gráfica de caja y bigotes de la abundancia de cada población CD3CD8- de las PBMCs cultivadas con células HEK293 transfectados con las Moléculas-GFP-Minigen (azul) y de PBMCs cultivadas con células HEK293 transfectados con GFP-Minigen (rojo). e) Histogramas de expresión de los marcadores en las poblaciones identificadas en el panel c) (rojo), comparando la expresión de fondo (azul).

a)



b)

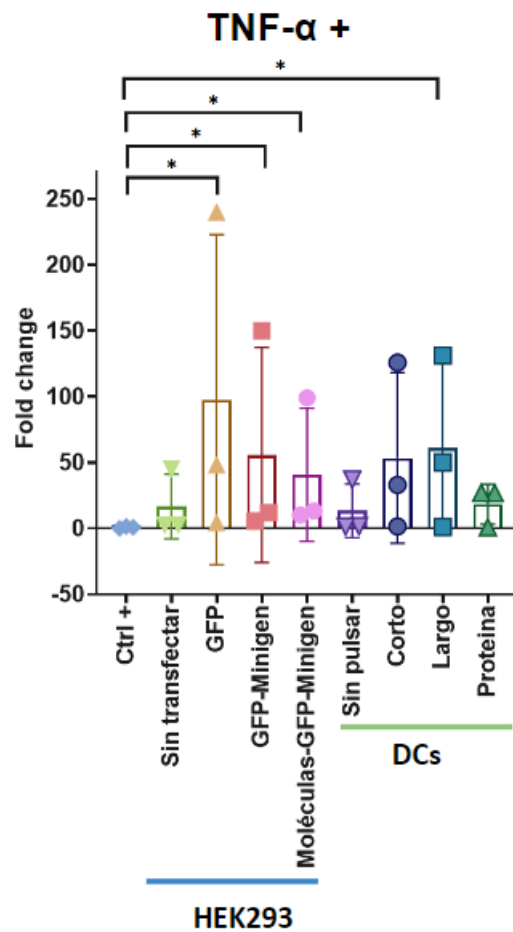
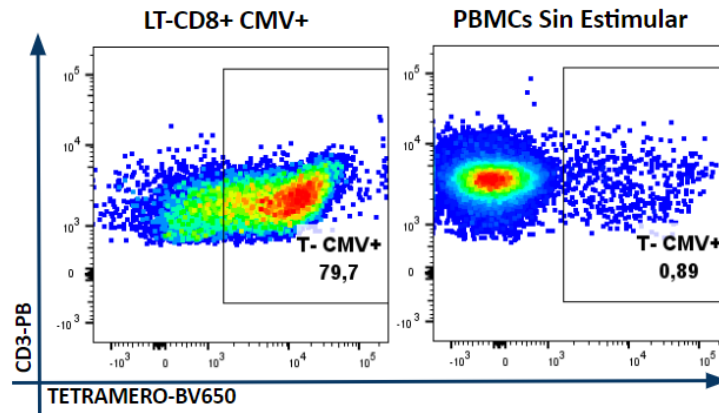
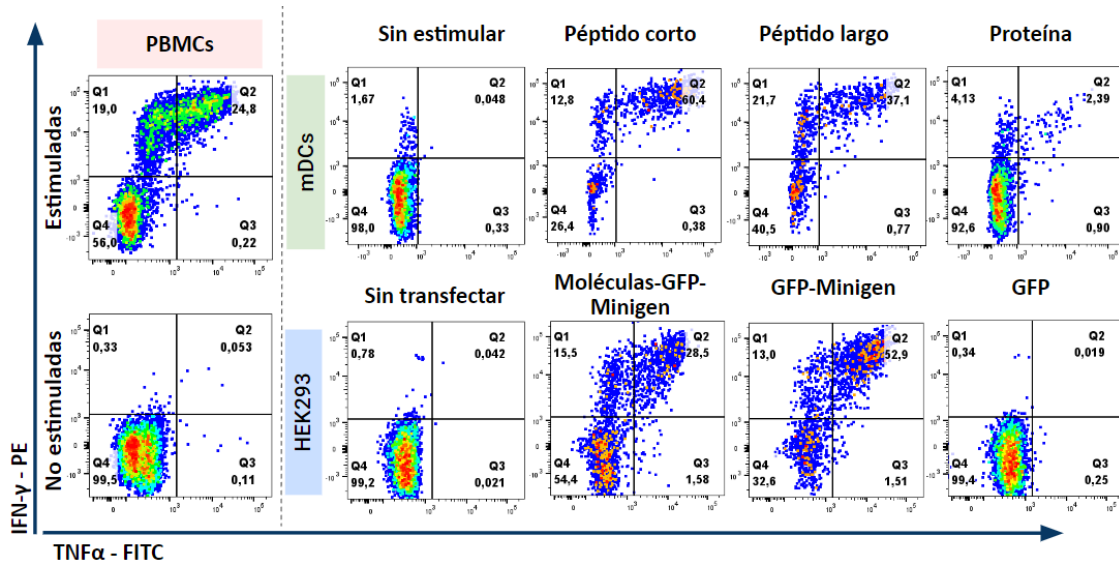


Figura suplementaria 15 Expresión de citoquinas intracelulares de LT CD8+ de donantes sanos cocultivos APCs autólogas o artificiales. Diagramas de barras representativos de las veces de incremento o fold change de poblaciones de LT CD8+ IFN- γ +TNF α - (a) e IFN- γ -TNF α + (b) de 3 donantes sanos cocultivos con células HEK293 transfectadas con las Moléculas-GFP-Minigen, GFP-Minigen, solo GFP, sin transfectar, mDCs estimuladas con el péptido corto, largo y la proteína completa de CMV y mDCs sin estimular. Como control positivo se usaron PBMCs estimuladas con la epítoto CD8 de CMV, y como control negativo, PBMCs sin estimular. El análisis estadístico de los grupos se llevó a cabo utilizando la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis, n=3, (p<0,05). Las barras representan réplicas experimentales independientes + SEM.

a)



b)



c)

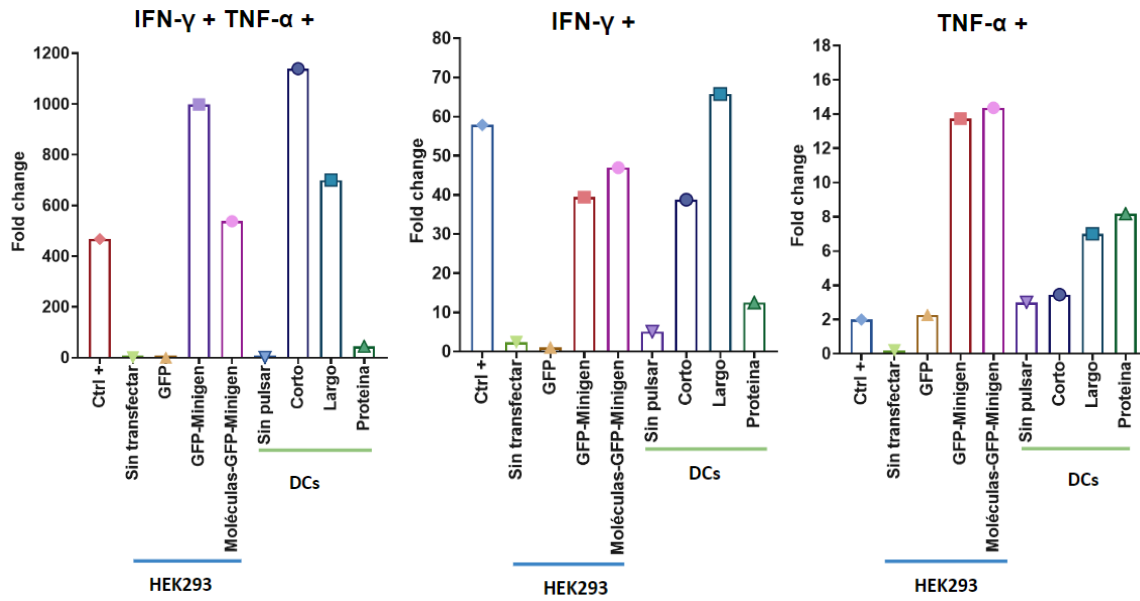


Figura suplementaria 16. Expresión de citoquinas intracelulares de LT CD8+ CMV+ cocultivados APCs autólogas o artificiales. a) Población tetrámero-positiva de clones de LT CD8+ CMV + comparado con PBMCs sin estimular. b) Expresión de citoquinas intracelulares de LT CD8 CMV+ cocultivados con mDCs autólogas (recuadro verde superior) estimuladas con el péptido corto, largo y proteína PP65 de CMV y con mDCs sin estimular. También se cocultivaron con células HEK293 (recuadro azul inferior) transfectadas por lipofectamina con Moléculas-GFP-Minigen, con GFP-Minigen, solo con GFP y con células sin transfectar. Como control positivo se utilizaron PBMCs autólogas (Recuadro rojo) pulsadas con el péptido corto de CMV, como control negativo se utilizaron PBMCs sin estimular. c) Diagramas de barras representativos de las veces de incremento o fold change de poblaciones de LT CD8+ IFN- γ + TNF α + de 3 donantes sanos cocultivados con las células mencionadas en la sección a de la figura. El análisis estadístico de los grupos se llevó a cabo utilizando la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis, $n=3$, ($p<0.05$). Las barras representan réplicas experimentales independientes + SEM.

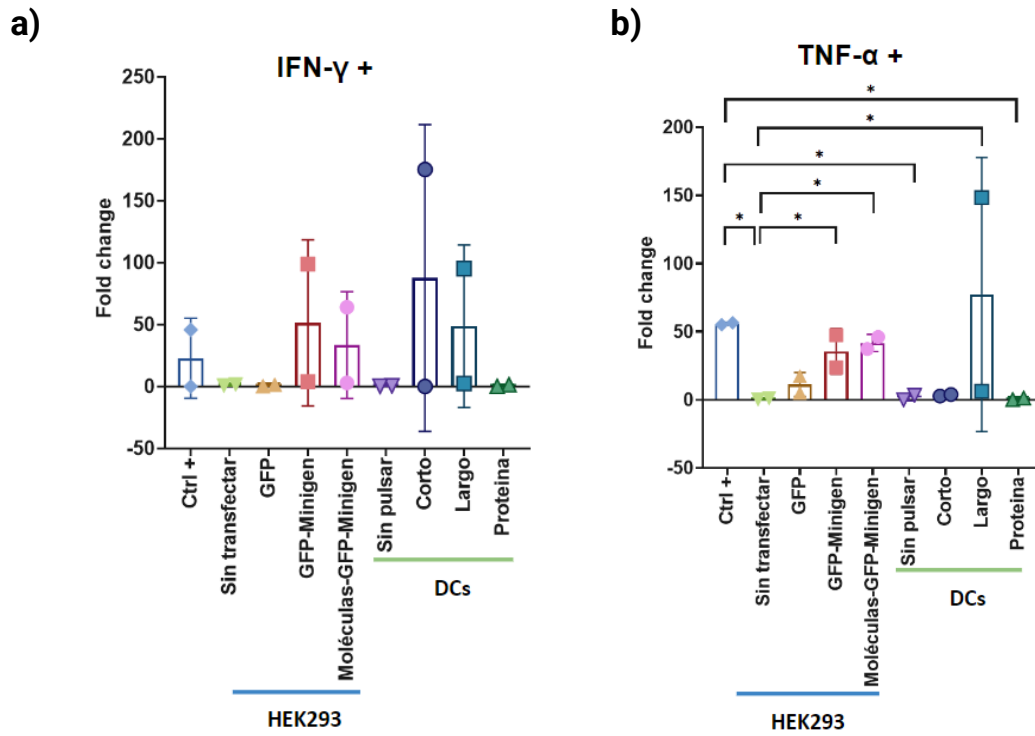
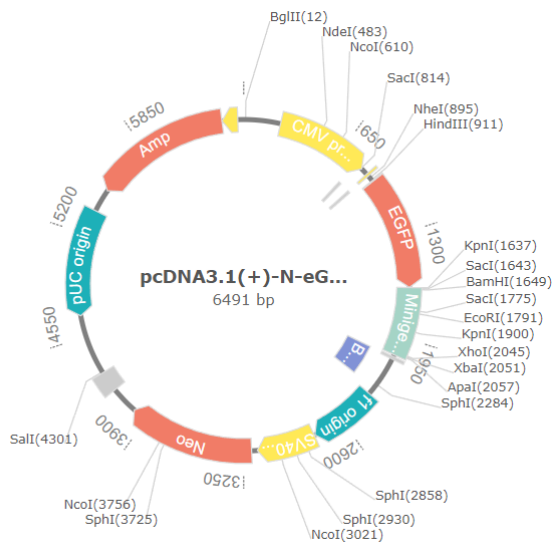


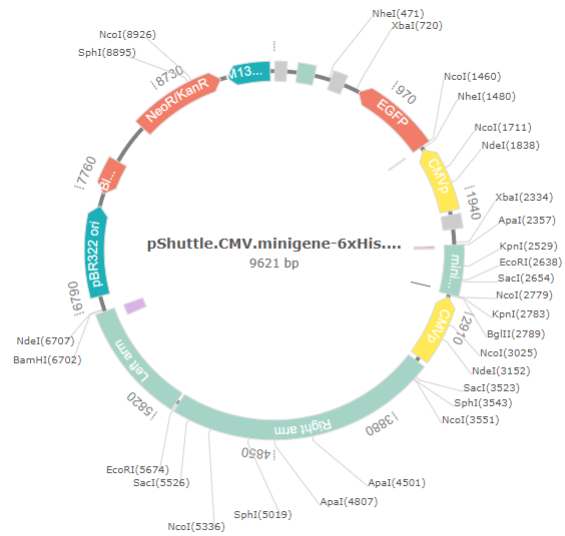
Figura suplementaria 17 Expresión de citoquinas intracelulares de LT CD8+ Mart-1+ cocultivados APCs autólogas o artificiales. Diagramas de barras representativos de las veces de incremento o fold change de poblaciones de LT CD8+ IFN- γ +TNF α - (a) e IFN- γ -TNF α + (b) clones de LT-CD8+ Mart-1+ cocultivados con células HEK293 transfectadas con las Moléculas-GFP-Minigen, GFP-Minigen, solo GFP, sin transfectar, mDCs estimuladas con el péptido corto, largo y la proteína completa de Mart-1 y mDCs sin estimular. Como control positivo se usaron PBMCs estimuladas con la epítipo CD8 de Mart-1 y como control negativo, PBMCs sin estimular. El análisis estadístico de los grupos se llevó a cabo utilizando la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis, n=3, (p<0,05). Las barras representan réplicas experimentales independientes + SEM.

Vectores utilizados para clonación del minigen y para expresión de CD80, CD83, CD137L y HLA-A2

a)

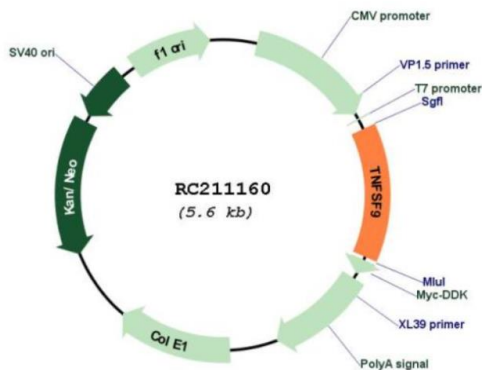


b)

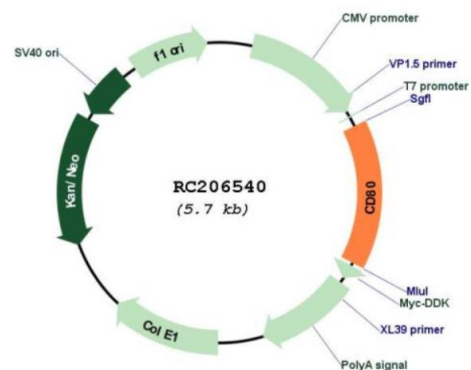


c)

TNFSF9 (NM_003811) Human Tagged ORF Clone B7-1 (CD80) (NM_005191) Human Tagged ORF Clone

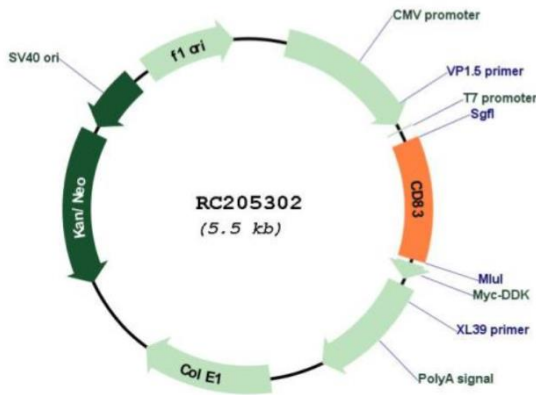


d)



e)

CD83 (NM_004233) Human Tagged ORF Clone



f)

pCEP4-myc-HLA-A2

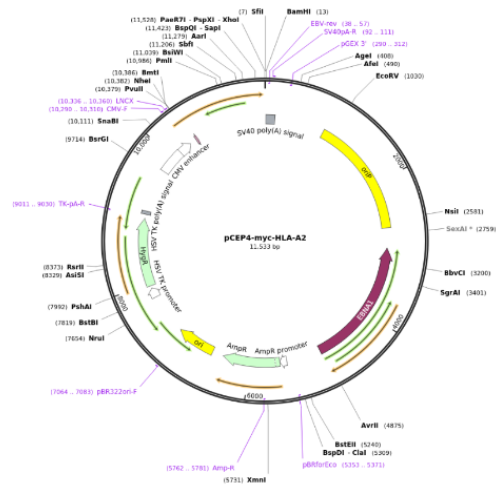


Figura Suplementaria 18. Mapas de vectores plasmídicos utilizados para expresión de minigen y moléculas coestimuladoras. a) Vector utilizado para clonar el minigen y permitir su expresión en la transfección de APCs con lipofectamina y electroporación. b) Vector utilizado para la construcción del Adenovirus Ad5.RGD. CMV.minigene-6xHis.CMVeGFP empleado para la transducción. c) Vector utilizado para la expresión de CD80 en la transfección de aAPCs. d) Vector utilizado para la expresión de CD83 en la transfección de aAPCs. e) Vector utilizado para la expresión de CD137L en la transfección de aAPCs. f) Vector utilizado para la expresión de HLA-A*0201 en la transfección de aAPCs.

13. Tablas Suplementarias

Tabla Suplementaria 1. Donantes sanos HLA-A*02:01 cribados para poblaciones de LT CD8 CMV+ mediante doble marcación de tetramero

Donante	Edad	Sexo	HLA-A	HLA-A	Población Tetramero CMV+ E (%)	Población Tetramero CMV+ NE (%)
LAND-000	26 años	Femenino	01:01:01G	02:01:01G	0,57	0,093
LAND-001	30 años	Femenino	02:01:01G	02:01:01G	0,015	0
LAND-003	23 años	Masculino	22:01:01G	02:01:01G	0,098	0,019
LAND-004	21 años	Femenino	02:01:01G	23:01:01G	2,82	0,23
LAND-006	21 años	Femenino	02:01:01G	24:02:01G	2,59	0,14
LAND-010	20 años	Masculino	02:01:01G	24:02:01G	14,5	0,1
LAND-012	30 años	Masculino	02:01:01G	23:01:01G	0,76	0,24
LAND-013	24 años	Masculino	01:01:01G	02:01:01G	5,47	0,45
LAND-018	22 años	Femenino	01:01:01G	02:01:01G	0,26	0
LAND-019	20 años	Masculino	02:01:01G	02:01:01G	0,041	0
LAND-024	33 años	Femenino	02:01:01G	26:01:01G	0,13	0,08
LAND-033	27 años	Femenino	02:01:01G	02:01:01G	11,4	1,95
LAND-038	24 años	Masculino	02:01:01G	24:02:01G	3,09	0,11
LAND-039	25 años	Masculino	02:11:01G	31:01:02G	0,027	0,071
LAND-040	23 años	Masculino	02:22:01G	03:02:01G	4,52	0,39
LAND-042	31 años	Masculino	02:01:01G	02:01:01G	16	0,38
LAND-043	39 años	Masculino	02:01:01G	24:02:01G	11,6	0,45

Tabla Suplementaria 2. Revisión bibliográfica del uso de células HEK293 y K562 como APCs artificiales para la identificación y expansión de LT-CD8+ antígeno-específicos.

Artículo	Año	Objetivo	APCs	Método de transfección	Cocultivo	Resultados importantes
[150]	2021	Identificar un anticuerpo TCRm específico para HLA-A*02:01 restringido para p53 mut, la base estructural de su especificidad y su conversión a un anticuerpo biespecífico que pueda lisar células cancerígenas en presencia de un neoantígeno	HEK293			Primero se determina si el péptido p53 mutado se presenta en el MHC de 4 líneas celulares distintas usando espectrometría de masas. Se usan las COS-7, y 3 líneas celulares tumorales humanas en donde se encuentra el péptido. Luego se realiza una librería de fagos para determinar las interacciones más fuertes de HLA0201 cargados con el péptido mutado. Se encontraron 23 secuencias que se convirtieron en mTCRs
[151]	2002	Construir una línea celular de células presentadoras de antígeno artificiales especialmente optimizada para la rápida expansión de linfocitos T citotóxicos	K562	El CD32 y el 4-1BBL fueron insertados en el plásmido pcDNA3.1, este se electroporó a las células K562	Se tomaron LT CD4 y CD8 de PBMCs de donantes sanos. Primero se irradian las K562 transfectadas, luego se marcan con el Anti-CD3 y anti-CD28. Luego, se cultivan en un radio de 1:2 K562-LT. Se usaron 5x10 ⁶ LT. Y se reestimularon al día 8 de la misma manera.	Primero se diseñan unas células presentadoras artificiales que van a estimular una respuesta policlonal de los linfocitos T y para esto cargan las presentadoras con anti-CD3 y anti-CD28. Luego determinan si estas aAPCs pueden mantener en el tiempo esta estimulación policlonal
[67]	2021	Diseñar células presentadoras de antígenos que capturan citoquinas y que son transfectadas con antígenos virales o neoantígenos para la detección de bibliotecas de ADN complejas para epítomos dirigidos a células T CD8+ y CD4+. Ellos logran identificar epítomos inmógenicas a partir de un pool muy grande de péptidos y además, logran identificar las epítomos de TCRs huérfanos	HEK293 y HeLa	Se utilizan lentivirus para transfectar las células HEK o HeLa con HLA específico, con los minigenes y con el constructo para que exprese en anticuerpo en superficie	APCs transfectadas se cultivaron en placas de 96 pozos y se mantuvieron en cultivo de 2 a 8 días, luego se añadieron células T en un radio de 2:1 y 16:1 con 25-80 ng/ml de PMA. Luego se incuban por 24 horas a 37°C. Luego de esto se lavan con PBS y se disocian con tripsina, se recolectan y se marcan con anti-IL2.	Se desarrollan unas células presentadoras que por un lado expresan un anticuerpo anti-citoquinas que va a servir como señal y por otro lado una molécula de HLA y una epitope específica para poder ser presentada. Luego de que estas sean cocultivadas con LT, las APCs se sortean gracias a las citoquinas capturadas y se realiza una secuenciación de última generación para identificar los epítomos.

[152]	2013	Emplear células K562 para generar unas células presentadoras artificiales que puedan estimular una respuesta de LT antígeno específica utilizando mRNA de las proteínas completas tanto de los antígenos, como de las moléculas coestimuladoras	K562	Se transfecta por nucleofección un plásmido con los siguientes ligandos de las moléculas coestimuladoras: CD70, CD80 y 4-1BBL (CD137). Se agregan 10 ug de cada plásmido, se nucleofectan y se cultivan las células en medio RPMI con 10% SFB para su recuperación. Luego estas células se sortean varias veces para obtener una expresión estable de las moléculas	Se obtuvieron TCD8+ de donantes sanos 0201, se sembraron 2x10 ⁶ en placas de 24 pozos con 2x10 ⁵ células presentadoras transfectadas e irradiadas. Se cultivaron en RPMI 10% Suero AB. Al cultivo se le agrega IL7 al día 0 y con IL2 al día 1	Se establecen líneas celulares con diferentes combinaciones de moléculas coestimuladoras (CD80, CD70 y 4-1BBL). De estas, se encontró que las células que expresan las tres moléculas coestimuladoras son las más eficientes en estimular una respuesta de linfocitos T antígeno específico, medido por ELISPOT. Un aspecto importante es que la adición de CD70 sin 4-1BBL se observa un alto porcentaje de apoptosis de los LT, cuando se agrega el 4-1BBL este fenómeno disminuye.
[153]	2018	Desarrollar una línea celular de APCs artificiales empleando K562 y electroporación para dirigir la expresión y secreción estable de moléculas coestimuladoras CD80 y 4-1BBL con el fin de estimular una respuesta de LT antígeno específicas que tienen un fenotipo más joven y por ende un potencial más citotóxico	K562	Se transfectan las K562 con plásmidos que codifican para HLA0201 y las moléculas de coestimulación CD80 y 41BBL. Estas células se sortean para obtener una expresión estable	Se toman PBMCs de donantes EVB+ y NY eso 1+. Las APCs o las CDs autólogas se pulsan con los péptidos y se incuban durante 4-6 horas a 37°C, son lavadas con PBS y son incubadas con LT específicas para estos antígenos a un ratio de 1:10 en AIMV con IL2, 7 y 15. Para el reestímulo se pulsa el péptido y se incuba por 4 horas a los 7 días. Se agregaron citoquinas cada 2 o 3 días.	Se establece una línea celular presentadora artificial que es mejor que las CDs autólogas en cuanto a expansión de LT antígeno específicos para EVB y para NY eso 1. También estimulan una mayor respuesta, una mayor citotoxicidad y tienen un fenotipo más de memoria central.
[154]	2007	Desarrollar una línea celular de APCs artificiales para la estimulación de LT específicos para MART-1. Estudio preclínico	K562	Para las K562 iniciales se utiliza un vector lentiviral para cada uno de los plásmidos. Para el grado GMP se realiza la transfección con lipofectamina, transfectando simultáneamente CD80, CD83, HLA 0201 los cuales fueron clonados en el plásmido PUC-MD y un gen de resistencia a la puromicina para seleccionar las	Se toman PBMCs de donantes sanos o donantes con melanoma, se obtienen los LT por selección positiva y se cocultivan con las aAPCs pulsadas e irradiadas con los péptidos correspondientes en un ratio de 1:20 en placas de 24 pozos. Al día 0 y 4 se agrega IL2 y IL15. Se realiza una ronda de reestimulación con las APCs semanal. Luego de 4 o 5	Se logra estimular múltiples veces muchos donantes con diferentes péptidos y mantenerlos en cultivo por hasta 1.5 años. Estos LT presentan fenotipo de memoria efectora o de memoria central. Nunca exhiben fenotipo de agotamiento, su capacidad de producción de IFN gamma disminuye, pero se siguen detectando LT tetámero positivos. Al estimular células de donantes con melanoma se encuentran resultados similares, indicando que podrían utilizarse estas aAPCs para realizar una terapia adoptiva de células de estos pacientes

				células. En cuanto a los péptidos utilizados, en este caso se pulsaron	rondas de estimulación se mide la producción de IFN gamma, tetrámero y citotoxicidad.	
--	--	--	--	--	---	--