



UNIVERSIDAD
NACIONAL
DE COLOMBIA

Evaluación de la inmunogenicidad de células dendríticas pulsadas con diferentes formulaciones del antígeno con fines de inmunoterapia

María Alejandra Alfaro Marengo

Universidad Nacional de Colombia
Facultad de Medicina, Grupo de Inmunología y Medicina Traslacional
Bogotá, Colombia
2024

Evaluación de la inmunogenicidad de células dendríticas pulsadas con diferentes formulaciones del antígeno con fines de inmunoterapia

María Alejandra Alfaro Marengo

Tesis de investigación presentada como requisito para optar al título de
Magíster en Inmunología

Director:

DAVID ANDRÉS BERNAL ESTÉVEZ M.D., PhD.

Grupo de Investigación en Inmunología y Oncología Clínica,
Fundación Salud de los Andes.

Codirector:

CARLOS ALBERTO PARRA LÓPEZ M.D., PhD.,

Profesor Titular, Departamento de Microbiología, Facultad de Medicina,
Universidad Nacional de Colombia. Grupo de Inmunología y Medicina Traslacional.

Universidad Nacional de Colombia
Facultad de Medicina
Bogotá, Colombia
2024

Declaración de obra original

Yo declaro lo siguiente:

He leído el Acuerdo 035 de 2003 del Consejo Académico de la Universidad Nacional. «Reglamento sobre propiedad intelectual» y la Normatividad Nacional relacionada al respeto de los derechos de autor. Esta disertación representa mi trabajo original, excepto donde he reconocido las ideas, las palabras, o materiales de otros autores.

Cuando se han presentado ideas o palabras de otros autores en esta disertación, he realizado su respectivo reconocimiento aplicando correctamente los esquemas de citas y referencias bibliográficas en el estilo requerido.

He obtenido el permiso del autor o editor para incluir cualquier material con derechos de autor (por ejemplo, tablas, figuras, instrumentos de encuesta o grandes porciones de texto).

Por último, he sometido esta disertación a la herramienta de integridad académica, definida por la universidad.

MARIA ALEJANDRA ALFARO MARENCO

31 de enero de 2024

Agradecimientos

Quiero expresar mi más profundo agradecimiento a todas las personas que, a pesar de la adversidad, me acompañaron hasta el final de este camino.

En primer lugar, a mi mamá, Edith Marengo España, por soportar mis días de estrés y procurar siempre hacerme la vida más sencilla, a pesar del dolor infinito por el que ambas hemos tenido que pasar en los últimos años. A mi tía y segunda madre, Manuela Marengo España, por respaldarme en cada proyecto a pesar de su enfermedad, resaltando siempre cada uno de mis logros. A mi abuelo Damaso Marengo Cantillo, por brindarme sus sonrisas y estar siempre orgulloso de mí, impulsándome a seguir adelante a pesar de saber que pronto nos despediríamos. A mi papá Félix Alfaro Rodríguez, por su generosidad y cariño, que hizo que mis preocupaciones diarias fueran más livianas. A mi hermano, Sergio Andrés Alfaro Marengo, por recordarme que hacemos cosas que merecen la pena. A Pablo José Caballero Blanco, mi compañero de vida, por aguantar mis llantos profundos y ser la mano que me levantó cada vez que me rendí. A mis perritas Gotita y Toña, por acompañarme y calentarme los pies en las frías noches de traspasado; y a mi bebé Lolito, mi guerrera favorita, por recordarme que ningún motivo de la academia es más importante ni más urgente que la familia. A todos ellos les dedico este trabajo.

A mis amigas del alma, María Guerrero García y Laura Rivera Delgado, por creer siempre en mí y escuchar mis notas de voz todas las veces que fue necesario. A la escuela de Artes Plásticas de la Universidad Nacional, que fue mi alivio y mi motivación en tiempos difíciles y dolorosos; especialmente a las profesoras Martha Morales y Vanessa Nieto, que nunca se cansaron de escuchar mi retahíla sobre la magia y la ciencia.

A David Santiago Becerra Tovar, por alentarme a continuar con mi proyecto profesional y a Alejandra del Pilar Infante Cruz por animarme a seguir adelante desde la distancia. A Erika Vanessa Diaz, Nathaly Poveda y María Paula Aulestia, por responder pacientemente mis preguntas y proporcionarme algunos de los insumos necesarios para el desarrollo de este proyecto. Al GI&MT, especialmente a Laura Camila Martínez Enríquez y Nicolas Lalinde Ruíz, por su apoyo y disposición permanente en el laboratorio y el desarrollo de experimentos y análisis de datos; a Oscar Mauricio Rodríguez Bohórquez por tenderme su mano en mis momentos de crisis, y a María Alejandra Villota Álava, por ser mi compañera leal en este reto y la amiga incondicional que permitió que este proyecto fuera una realidad.

A Ricardo Alfredo González Cristancho, asistente administrativo del GI&MT por acompañar siempre de buen agrado cada proceso complejo en la Universidad. A mi tutora, la profesora Myriam Lucía Navarrete Jiménez, por su cariño y su guía durante toda la maestría. A las profesoras Aura Lucía Leal, Angélica Knudson y Sandra Consuelo Henao Riveros del departamento de Microbiología, por confiar en mi trabajo y compartir conmigo la experiencia de la docencia.

Al profesor Carlos Alberto Parra López, por su comprensión y por enseñarme con rigor una pequeña parte del vasto mundo de la inmunología y del trabajo serio en investigación, concediéndome un lugar especial en el laboratorio de Inmunología y Medicina Traslacional. A David Andrés Bernal Estévez, por su paciencia en este proceso de aprendizaje, su guía constante en el desarrollo de este trabajo y su amistad, sin las que hubiese sido posible el cumplimiento de esta meta.

A la Fundación Instituto de Inmunología de Colombia (FIDIC), especialmente al profesor Manuel Alfonso Patarroyo, por abrirme las puertas para el desarrollo de actividades fundamentales en este trabajo. Al IDCBIS por proporcionar las unidades de sangre que permitieron obtener las PBMCs con las cuales se realizaron la mayoría de los ensayos inmunológicos. A la Fundación Salud de los Andes (FSA) por ser la semilla de este proyecto y apoyar una parte muy importante de este trabajo, brindándome el espacio para dar mis primeros pasos.

A Minciencias, que por medio de los proyectos: i) Optimización de las células dendríticas autólogas como estrategia de inmunoterapia en pacientes con cáncer, Proyecto 6952080763382, Convocatoria 807 (Contrato 840 – 2018); ii) Implementación de una Planta Piloto para la producción de Vacunas Personalizadas para la Inmunoterapia del Cáncer en Colombia, Proyecto 110184168973 Convocatoria 841 (Contrato 903 – 2019); Y a la Universidad Nacional de Colombia que mediante los proyectos: i) Optimización de células presentadoras de antígeno para la detección y análisis de linfocitos T antígeno específicos con fines de inmunoterapia, Código Hermes: 57494, Convocatoria Nacional para el Fortalecimiento de la Formación a través del Apoyo a Proyectos de Investigación, Creación Artística o Innovación de la Universidad Nacional de Colombia 2022-2024; ii) Identificación de biomarcadores y diseño de vacunas personalizadas para el manejo del cáncer mediante el uso de ciencias ómicas y bioinformática, Código Hermes: 57457, Convocatoria Nacional para el Fomento de Alianzas Estratégicas interdisciplinarias que articulen los procesos misionales de la Universidad Nacional de Colombia 2022-2024; financiaron este proyecto.

Finalmente, a la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional de Colombia, mi casa y mi refugio, que nunca se ha negado a permitirme ser lo que anhelo ser.

1 TABLA DE CONTENIDO

2	RESUMEN	10
3	ABSTRACT	12
4	LISTA DE FIGURAS.....	14
5	LISTA DE FIGURAS SUPLEMENTARIAS	18
6	LISTA DE TABLAS.....	19
7	LISTA DE SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS.....	20
8	INTRODUCCIÓN	22
9	PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACIÓN	24
10	MARCO TEÓRICO.....	25
10.1	Biología de las células dendríticas	25
10.2	Derivación y maduración de MoDCs <i>ex vivo</i>	27
10.3	El rol de las DCs en el cáncer	29
10.4	CMV humano como antígeno modelo.....	29
10.5	Antígenos tumorales modelo	30
10.6	Presentación de antígenos y formulación de vacunas para el cáncer.....	32
10.7	Muerte Celular Inmunogénica	33
10.8	Respuesta efectora de LT CD8+ de memoria.....	34
10.9	Fenotipo de activación y agotamiento de LT CD8+	35
10.10	Presentación Cruzada.....	37
11	OBJETIVOS	39
11.1	Objetivo General.....	39
11.2	Objetivos específicos	39
12	MATERIALES Y MÉTODOS.....	40
12.1	Equipos, insumos y reactivos.....	40
12.1.1	Cultivos celulares	40
12.1.2	Líneas celulares	41
12.1.3	Citoquinas y estímulos	41
12.1.4	Formatos del antígeno	41
12.1.5	Citometría de flujo multiparamétrica	42
12.1.6	Tetrámero	43
12.1.7	Equipos y paquetes ofimáticos	43
12.1.8	Colección y análisis de datos.....	43

12.2	Metodología detallada.....	44
12.2.1	Aislamiento de PBMCs a partir de concentrados leucocitarios de donantes sanos	44
12.2.2	Tipificación de HLA y selección de donantes para ensayos inmunológicos.....	44
12.2.3	Enriquecimiento de monocitos por el método de rosetas	44
12.2.4	Derivación y maduración de MoDCs.....	45
12.2.5	Estimulación de MoDCs con distintos formatos del antígeno	46
12.2.6	Líneas de 9 días de PBMCs para la expansión de LT antígeno-específicos	46
12.2.7	Identificación de LT antígeno-específicos por citometría de flujo mediante tetrámero	47
12.2.8	Protocolo de tinción de citoquinas intracelulares (ICS)	47
12.2.9	Evaluación de marcadores de activación, agotamiento y memoria	48
12.2.10	Identificación y caracterización de clústeres por el algoritmo CITRUS.....	48
12.2.11	Expansión de líneas tumorales MALME-3M, CRL2338 y SKMEL-37	50
12.2.12	Expresión de mRNA de los antígenos MART-1 y NY-ESO-1 en líneas tumorales....	50
12.2.13	Evaluación de la citotoxicidad <i>in vitro</i> mediante el ensayo MTT	50
12.2.14	Ensayos de sinergia con agentes quimioterapéuticos	53
12.2.15	Evaluación de traslocación de CLR a la membrana celular en líneas tumorales	54
12.2.16	Ensayo de fagocitosis	56
13	RESULTADOS	57
13.1	Expansión de LT CD8+ antígeno-específicos de donantes HLA-A*02:01.....	57
13.1.1	Expansión de LT CD8+ T-CMV+ en seis donantes	57
13.1.2	Expansión de precursores MART-1+ en el donante LAND33.....	58
13.2	Maduración de MoDCs de donantes sanos estimuladas con coctel LPS.....	59
13.3	Péptidos de CMV cargados en MoDCs conduce a la activación y respuesta efectora de LT CD8+ antígeno-específicos en tres donantes.....	60
13.3.1	Péptidos de CMV en LPS-mDCs inducen la producción de citoquinas por LT CD8+	60
13.3.2	CD137 se correlaciona positivamente con la producción de citoquinas en LT CD8+	64
13.3.3	Estimulación con distintos formatos del antígeno no evidencia la diferenciación de subpoblaciones de memoria de LT CD8+	67
13.3.4	Poblaciones CD3+CD8- incrementan marcadores de activación sin producción de citoquinas	69
13.4	Pobre respuesta efectora de LT CD8+ específicos para antígenos tumorales del donante LAND33	71
13.5	Clones de LT CD8+ antígeno-específicos responden a MoDCs alogénicas estimuladas con la epítotope blanco.....	72

13.5.1	Clones de LT CD8+ específicos para CMV generan potente respuesta a la estimulación con péptidos presentados en MoDCs alogénicas.....	72
13.5.2	Clones de LT CD8+ MART-1-específicos responden a la presentación de péptidos y no de proteína.....	77
13.6	Cocteles de maduración generan diferencias en las respuestas de LT CD8+ del donante LAND42	79
13.6.1	Coctel LPS favorece la mayor expresión de marcadores de maduración en MoDCs	79
13.6.2	Std-mDCs estimuladas con péptidos favorecen la mayor producción de citoquinas por LT CD8+ del donante LAND42.....	80
13.6.3	Incremento de CD137 se asocia a la estimulación con péptidos cargados en α 1-mDCs y Std-mDCs.....	85
13.6.4	Expresión de PD-1 y CTLA-4 se relaciona con el formato del antígeno empleado mientras que expresión de LAG-3 sea asocia al coctel de maduración de MoDCs.....	89
13.6.5	CD154 se incrementa en poblaciones CD3+CD8- luego del estímulo con proteína recombinante en células del donante LAND42.....	94
13.7	Respuesta efectora de clones de LT CD8+ específicos de MART-1 no se influido por el coctel de maduración utilizado.....	96
13.7.1	Coctel Std favorece la expresión de CD80, CD83 y CD54 en MoDCs del donante LAND43	96
13.7.2	Cocteles de maduración no influyen en la respuesta efectora de clones de LT CD8+ específicos de MART-1 a péptido largo.....	97
13.7.3	Expresión de PD-1 en clones de LT CD8+ no se asocia con estímulo antigénico reciente	98
13.8	mRNA de las proteínas MART-1 y NY-ESO-1 es expresado en las líneas tumorales MALME-3M y SKMEL-37 respectivamente.....	101
13.9	Agentes quimioterapéuticos ejercen efecto citotóxico sobre líneas tumorales tratadas	103
13.10	Combinación de fármacos no evidencia efecto sinérgico.....	104
13.11	Líneas tumorales tratadas expresan CRL y Anexina V en superficie.....	106
13.12	Carboplatino y paclitaxel favorecen la fagocitosis de células MALME-3M por iDCs y el incremento en la expresión de marcadores de maduración.....	108
13.13	Clones de LT CD8+ MART-1-específicos estimulados con mDCs cargadas con células tumorales no evidencian presentación cruzada el antígeno.....	111
14	DISCUSION.....	115
15	PERSPECTIVAS.....	126
16	CONSIDERACIONES ÉTICAS.....	128
17	POSTER Y PONENCIAS.....	129
18	REFERENCIAS.....	130

19	DATOS SUPLEMENTARIOS.....	142
19.1	Tipificación de HLA-A de alta resolución de muestras de donantes sanos	142
19.2	Análisis de LT CD8+ productores de IFN- γ + mediante el protocolo ICS en el donante LAND13143	
19.3	Evaluación de marcadores de agotamiento en LT CD8+ del donante LAND33.....	143
19.4	Evaluación de marcadores de activación en las subpoblaciones de memoria en LT CD8+ del donante LAND42	144
19.4.1	CD25	144
19.4.2	CD137.....	145
19.4.3	CD154.....	145
19.4.4	CD69	146
19.4.5	PD-1.....	147
19.4.6	LAG-3.....	148
19.5	Diseño de cebadores para RT-PCR.....	149
19.6	Gel de Integridad del mRNA de las líneas tumorales MALME-3M, CRL2338 y SKMEL-37 150	
19.7	Concentración y pureza del mRNA de las líneas tumorales MALME-3M, CRL2338 y SKMEL-37.....	151
19.8	Análisis de regresión no lineal para cálculo de IC ₅₀ en líneas tumorales tratadas con agentes quimioterapéuticos	152
19.9	Expresión de CRL y Anexina V en líneas tumorales tratadas.....	154
19.10	Tasa de Error de Validación Cruzada de los modelos en CITRUS	155
19.10.1	Coctel LPS VS STD en análisis de producción de citoquinas.....	155
19.10.2	Péptido largo VS proteína para marcadores de activación y agotamiento	156

2 RESUMEN

Evaluación de la inmunogenicidad de células dendríticas pulsadas con diferentes formulaciones del antígeno con fines de inmunoterapia

Las vacunas basadas en células dendríticas (DCs) se han proyectado como una importante alternativa para la inmunoterapia del cáncer. Su diseño típicamente se fundamenta en la estimulación *ex vivo* de DCs derivadas de monocitos (MoDCs) utilizando diferentes formulaciones de antígenos y condiciones de maduración. Sin embargo, no hay consenso frente a la formulación óptima del antígeno a la hora de diseñar vacunas basadas en DCs. Por otro lado, se ha descrito que el estímulo de maduración en las MoDCs podría influir en su capacidad para presentar determinados formatos del antígeno (1).

Por lo anterior, el presente trabajo se propuso explorar las implicaciones de diversas formulaciones del antígeno en el desarrollo de respuestas inmunes antitumorales por LT CD8+ cultivados con MoDCs tratadas bajo distintas condiciones. Para ello, se identificaron donantes sanos con LT CD8+ específicos contra epítopes modelo, utilizando el método de citometría basado en tetrámero. De forma paralela, se derivaron MoDCs que fueron estimuladas con dichos antígenos, bajo las formulaciones de péptido corto, péptido largo, proteína recombinante y célula tumoral, todas portadoras de la epítope inmunogénica de cada antígeno. Las MoDCs fueron maduras empleando diferentes cocteles de citoquinas y se analizó la expresión diferencial de marcadores de maduración (2). Las líneas tumorales fueron tratadas con agentes quimioterapéuticos, a fin de determinar la expresión de calreticulina (CLR) como indicador de muerte celular inmunogénica (ICD) y su capacidad de favorecer su fagocitosis por MoDCs. Finalmente, se estableció un cocultivo de MoDCs y LT CD8+ autólogos antígeno-específicos o clones de LT CD8+ alogénicos específicos para las epítopes de interés; cuya respuesta efectora fue evaluada por medio de la producción de citoquinas y la expresión de marcadores de activación, agotamiento y memoria, utilizando citometría de flujo multiparamétrica.

Se logró la expansión de LT CD8+ HLA-A*02:01 tetrámero-positivos para una epítope viral y una tumoral, con los cuales se realizaron los ensayos de comparación entre formatos del antígeno y cocteles de maduración. Como se ha reportado clásicamente en la literatura, las formulaciones sencillas y directas basadas en péptidos promovieron respuestas robustas de activación y

producción de citoquinas. Por el contrario, las formulaciones complejas como la proteína recombinante y las células tumorales tratadas mostraron respuestas efectoras menos evidentes. Los fenotipos de activación y agotamiento exhibieron una expresión dependiente principalmente del formato del antígeno utilizado, aunque se observó heterogeneidad entre los individuos. Adicionalmente, el marcador LAG-3 se vio influenciado por el coctel de maduración utilizado en las MoDCs. Por último, se logró inducir la expresión de CRL en las líneas tumorales tratadas y su fagocitosis por iDCs, aunque no se evidenció presentación cruzada del antígeno. Los resultados de este proyecto proporcionan información valiosa para el diseño de vacunas basadas en DCs y su potencial en inmunoterapia del cáncer.

Palabras clave: Células dendríticas derivadas de monocitos (MoDCs), formulaciones del antígeno, antígenos modelo, Linfocitos T CD8+, líneas tumorales, muerte celular inmunogénica (ICD), citometría de flujo.

3 ABSTRACT

Assessment of the immunogenicity of dendritic cells pulsed with different antigen formulations for immunotherapy purposes

Dendritic cell (DC)-based vaccines have been projected as a significant alternative for cancer immunotherapy. Typically, these vaccines are designed by stimulating monocyte-derived dendritic cells (MoDCs) *ex vivo*, employing diverse antigen formulations and maturation conditions. However, there is no consensus regarding the optimal antigen formulation when designing DC-based vaccines. On the other hand, it has been noted that the maturation stimulus in MoDCs could influence their ability to present specific antigen formats (1).

This project aimed to investigate the effects of various antigen formulations on the development of anti-tumor immune responses by CD8⁺ T cells cultured with monocyte-derived dendritic cells (MoDCs) treated under different conditions. To achieve this, healthy donors with antigen-specific CD8⁺ T cell precursors for model epitopes were identified using tetramer-based flow cytometry. Simultaneously, MoDCs were derived and stimulated employing short peptide, long peptide, recombinant protein, or tumor cell formulations, all carrying the immunogenic epitope of each antigen. The MoDCs were matured using different cytokine cocktails, and the differential expression of maturation markers was analyzed (2). Tumor cell lines were treated with chemotherapeutic agents to determine calreticulin (CLR) expression as an indicator of immunogenic cell death (ICD). The ability of treated tumor cells to enhance phagocytosis by MoDCs was also assessed. Finally, a co-culture of autologous MoDCs and antigen-specific CD8⁺ T cells or allogeneic CD8⁺ T cell clones specific for the target epitopes was established. Their effector response was evaluated through cytokine production and the expression of activation, exhaustion, and memory markers, utilizing multiparametric flow cytometry.

The expansion of HLA-A*02:01 tetramer-positive CD8⁺ T cells was achieved for a viral and a tumor epitope. Using these, comparative assays were carried out between antigen formats and maturation cocktails. As classically reported in the literature, peptide-based formulations promoted robust activation and cytokine production responses. In contrast, more complex formulations such as recombinant protein and treated tumor cells exhibited less evident effector responses. The activation and exhaustion phenotypes showed expression primarily dependent on the antigen format used, although heterogeneity was observed among individuals. Additionally, LAG-3 was

influenced by the maturation cocktail used in MoDCs. Finally, the induction of calreticulin (CRL) expression in treated tumor cell lines and their phagocytosis by iDCs was achieved, although no evidence of antigen cross-presentation was observed. The findings of this project provide valuable insights for the design of DC-based vaccines and their potential in cancer immunotherapy.

Keywords : Monocyte-derived dendritic cells (MoDCs), antigen formulations, model antigens, CD8+ T cells, tumor cell lines, immunogenic cell death (ICD), flow cytometry.

4 LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Maduración de células dendríticas

Figura 2. Derivación de MoDCs y manipulación *ex vivo* con fines de inmunoterapia

Figura 3. Antígenos asociados a tumor

Figura 4. Procesamiento de antígenos por MoDCs

Figura 5. Muerte celular inmunogénica

Figura 6. Presentación cruzada del antígeno

Figura 7. Metodología general del proyecto

Figura 8. Estrategia de selección de poblaciones CD11c+ para la evaluación del fenotipo de iDCs y mDCs

Figura 9. Estrategia de selección de las poblaciones CD3+CD8+Tetrámero+.

Figura 10. Clústeres de poblaciones celulares identificadas en un análisis CITRUS

Figura 11. Análisis de regresión no lineal con el modelo de dosis-respuesta: inhibición para la línea SKMEL-37 tratada con doxorrubicina por 48 horas

Figura 12. Diluciones de dos fármacos en plato de 96 pozos para ensayo de sinergia

Figura 13. Estrategia de selección de células vivas CLR+ y Anexina V+.

Figura 14. Estrategia para la selección de eventos de fagocitosis

Figura 15. Expansión de LT T-CMV+ en donantes HLA-A*0201.

Figura 16. Expansión de LT T-MART-1+ y T-NYESO1+ en donantes HLA-A*0201.

Figura 17. Expresión de marcadores de maduración en MoDCs de donantes HLA-A*0201 maduras con el coctel LPS.

Figura 18. Evaluación de LT CD8+ productores de citoquinas (protocolo ICS) en donantes individuales.

Figura 19. ICS en poblaciones de LT CD8+ de 3 donantes

Figura 20. Poblaciones de LT CD8+ productores de citoquinas en células del donante LAND42.

Figura 21. Evaluación de marcadores de activación en LT CD8+ en los donantes LAND13, LAND33, LAND38 y LAND42.

Figura 22. Evaluación de marcadores de activación en LT CD8+ en el donante LAND42

Figura 23. Evaluación de subpoblaciones de memoria de LT CD8+ de los donantes LAND13, LAND33 y LAND42.

Figura 24. Evaluación de producción de citoquinas y expresión de marcadores de activación en poblaciones CD3+CD8- de los donantes LAND13, LAND33, LAND38 y LAND42.

Figura 25. Producción de citoquinas y expresión de marcadores de activación, agotamiento y memoria en LT CD8+ del donante LAND33 estimulados con la epítotope inmunogénica de MART-1.

Figura 26. Evaluación por tetrámero de clones CD8+ CMV+ HLA-A*0201.

Figura 27. ICS en clones CD8+ CMV-específicos

Figura 28. Marcadores de activación en clones CD8+ CMV-específicos.

Figura 29. Evaluación de marcadores de agotamiento en clones de LT CD8+ CMV+ estimulados con diferentes formatos del antígeno

Figura 30. Tetrámero de clones CD8+ MART-1-específicos y evaluación de la producción de citoquinas luego de la estimulación con diferentes formatos del antígeno.

Figura 31. Tetrámero de clones CD8+ NY-ESO-1-específicos y evaluación de la producción de citoquinas luego de la estimulación con diferentes formatos del antígeno.

Figura 32. Marcadores de maduración en MoDCs del donante LAND42 estimuladas con diferentes cocteles de maduración.

Figura 33. Ensayo de ICS del donante LAND42 cultivadas con MoDCs estimuladas con diferentes formatos del antígeno y maduras bajo distintas condiciones

Figura 34. LT CD8+ productores de IFN- γ y TNF α del donante LAND42 cultivadas con MoDCs estimuladas con diferentes formatos del antígeno y maduras bajo distintas condiciones.

Figura 35. Comparación de cocteles de maduración respecto al formato del antígeno utilizado para la producción de citoquinas

Figura 36. Clúster de células CD8+ IFN- γ + TNF α + en los cultivos Std VS LPS identificado mediante el análisis CITRUS.

Figura 37. Expresión de CD137 en LT CD8+ de LAND42 cultivadas con MoDCs estimuladas con diferentes formatos del antígeno y maduras bajo distintas condiciones

Figura 38. Expresión de CD154 en LT CD8+ de LAND42 cultivadas con MoDCs estimuladas con diferentes formatos del antígeno y maduras bajo distintas condiciones

Figura 39. Expresión de CD69 en LT CD8+ del donante LAND42 cultivadas con MoDCs estimuladas con diferentes formatos del antígeno y maduras bajo distintas condiciones.

Figura 40. Expresión de CD69 en LT CD8+ CM de LAND42 cultivadas con MoDCs estimuladas con diferentes formatos del antígeno y maduras bajo distintas condiciones.

Figura 41. Expresión de PD-1 en LT CD8+ de LAND42 cultivadas con MoDCs estimuladas con diferentes formatos del antígeno y maduras bajo distintas condiciones

Figura 42. Expresión de PD-1 en LT CD8+CD45RO+CD62L- (EM) del donante LAND42 cultivadas con MoDCs estimuladas con diferentes formatos del antígeno y maduras bajo distintas condiciones.

Figura 43. Expresión de CTLA-4 en LT CD8+ de LAND42 cultivadas con MoDCs estimuladas con diferentes formatos del antígeno y maduras bajo distintas condiciones

Figura 44. Expresión de LAG-3 en LT CD8+CD45RO+CD62L+ (CM) del donante LAND42 cultivadas con MoDCs estimuladas con diferentes formatos del antígeno y maduras bajo distintas condiciones.

Figura 45. Expresión de LAG-3 en LT CD8+ CM del donante LAND42 cultivadas con MoDCs estimuladas con diferentes formatos del antígeno y maduras bajo distintas condiciones.

Figura 46. Expresión de CD154 en LT CD8- del donante LAND42 cultivadas con MoDCs estimuladas con diferentes formatos del antígeno y maduras bajo distintas condiciones

Figura 47. Clúster de células CD3+CD8- en los cultivos de péptido largo VS proteína

Figura 48. Evaluación de marcadores de maduración en MoDCs del donante LAND43 estimuladas con diferentes cocteles.

Figura 49. Clones CD8+ MART-1-específicos productores de citoquinas cultivados con MoDCs estimuladas con diferentes formatos del antígeno y maduras bajo distintas condiciones.

Figura 50. Evaluación de marcadores de activación de clones CD8+ MART-1-específicos cultivados con MoDCs estimuladas con diferentes formatos del antígeno y maduras bajo distintas condiciones

Figura 51. Evaluación de marcadores de agotamiento de clones CD8+ MART-1-específicos cultivados con MoDCs estimuladas con diferentes formatos del antígeno y maduras bajo distintas condiciones.

Figura 52. RT-PCR de punto final revelada en gel de agarosa al 2%.

Figura 53. Efecto citotóxico de agentes quimioterapéuticos sobre líneas tumorales y determinación de IC_{50} .

Figura 54. Análisis dosis-respuesta de la combinación carboplatino + paclitaxel como tratamiento sobre la línea tumoral SKMEL-37.

Figura 55. Expresión de CRL y Anexina V en líneas tumorales tratadas con agentes quimioterapéuticos.

Figura 56. Ensayo de fagocitosis de células MALME-3M por iDCs.

Figura 57. Expresión de marcadores de maduración en la población CD11c+HLA-DR+CTFR+.

Figura 58. Evaluación de la producción de citoquinas en el ensayo de presentación cruzada del antígeno.

Figura 59. Evaluación de marcadores de activación en el ensayo de presentación cruzada del antígeno.

Figura 60. Evaluación de marcadores de agotamiento en el ensayo de presentación cruzada del antígeno.

Figura 61. Evaluación de subpoblaciones de memoria en el ensayo de presentación cruzada del antígeno.

5 LISTA DE FIGURAS SUPLEMENTARIAS

Figura suplementaria 1. Evaluación de poblaciones de LT CD8+ productores de IFN- γ del donante LAND13.

Figura suplementaria 2. Evaluación de marcadores de agotamiento en LT CD8+ del donante LAND33

Figura suplementaria 3. Evaluación del marcador CD25 en la población general y sobre las subpoblaciones de memoria CM y EM

Figura suplementaria 4. Evaluación del marcador CD137 en la subpoblación de LT CD8+ CM

Figura suplementaria 5. Evaluación del marcador CD154 en la subpoblación de LT CD8+ EM

Figura suplementaria 6. Evaluación del marcador CD69 en la subpoblación de LT CD8+ EM

Figura suplementaria 7. Expresión de PD-1 en LT CD8+ del donante LAND42 y comparación entre los cocteles de maduración respecto al formato del antígeno

Figura suplementaria 8. Expresión de PD-1 en LT CD8+CD45RO+CD62L+ (CM) del donante LAND42 cultivadas con MoDCs estimuladas con diferentes formatos del antígeno y maduras bajo distintas condiciones

Figura suplementaria 9. Expresión de LAG-3 en LT CD8+ EM de LAND42 y comparación entre los cocteles de maduración respecto al formato del antígeno

Figura suplementaria 10. Gel de integridad de RNA líneas tumorales humanas.

Figura suplementaria 11. Curvas dosis-respuesta: inhibición para cálculo de IC₅₀ en líneas tumorales tratadas con agentes quimioterapéuticos.

Figura suplementaria 12. Porcentajes de células CRL+ y Anexina V+ en líneas tumorales tratadas

Figura suplementaria 13. Tasa de error de validación cruzada de los modelos utilizados para el análisis de comparación entre los cocteles LPS y Std en la producción de citoquinas intracelulares

Figura suplementaria 14. Tasa de error de validación cruzada de los modelos utilizados para el análisis de comparación entre péptido largo VS proteína en la expresión de marcadores de activación y agotamiento. Los modelos con la menor tasa de error corresponden a 1se y min.

6 LISTA DE TABLAS

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

Tabla 2. Matriz dosis-respuesta de la línea MALME-3M tratada con la combinación de los agentes carboplatino y paclitaxel para el análisis de sinergias

Tabla 3. Donantes utilizados para la obtención de LT CD8+ CMV+

Tabla 4. IC_{50} calculada para cada línea tumoral tratada con distintos agentes quimioterapéuticos

Tabla 5. Evaluación del efecto sinérgico de la combinación de agentes quimioterapéuticos sobre líneas tumorales

Tabla suplementaria 1. Donantes sanos tipificados para el haplotipo HLA-A

Tabla suplementaria 2. Cebadores utilizados para RT-PCR

Tabla suplementaria 3. Concentración y pureza de RNA obtenido de líneas tumorales

Tabla Suplementaria 4. Resultados de ensayo MTT para determinación de IC_{50}

7 LISTA DE SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS

aa	Aminoácidos
APC	Célula(s) Presentadora(s) de Antígeno (<i>Antigen Presenting Cells</i>)
CFSE	Carboxifluoresceína-succinimidil éster
CLR	Calreticulina
CMV	Citomegalovirus humano
CT	Cancer Testis
CTL	Linfocito T citotóxico (<i>Cytotoxic T-Lymphocyte</i>)
CTLA-4	Antígeno de LT citotóxico 4 (<i>Cytotoxic T-Lymphocyte Antigen 4</i>)
DAMPs	Patrones moleculares asociados a daño (<i>Damage Associated Molecular Patterns</i>)
DCs	Células Dendríticas (<i>Dendritic Cells</i>)
DMSO	Dimetilsulfóxido
FITC	Isotiocianato de fluoresceína (<i>Fluorescein IsoTioCyanate</i>)
GM-CSF	Factor estimulante de colonias granulocito-macrófago (<i>Granulocyte-macrophage colony stimulating factor</i>)
HLA	Antígeno Leucocitario Humano (<i>Human leukocyte antigen</i>)
IC ₅₀	Concentración Inhibitoria media
ICD	Muerte celular inmunogénica (<i>Immunogenic cell death</i>)
ICS	Tinción de citoquinas intracelulares (<i>Intracelullar cytokine staining</i>)
iDCs	Células dendríticas Inmaduras
IFN	Interferón
LAG-3	Gen de activación linfocitaria 3 (<i>Lymphocyte-activation gene 3</i>)
IL	Interleuquina
LPS	Lipopolisacárido
LT	Linfocito T
LT _h	Linfocitos T colaboradores
MART-1	Antígeno de melanoma reconocido por LT (<i>Melanoma antigen recognized by T cells</i>)
mDCs	Células dendríticas maduras
MFI	Intensidad Media de fluorescencia (<i>Mean fluorescence intensity</i>)
MHC	Complejo Mayor de Histocompatibilidad (<i>Major Histocompatibility complex</i>)
MoDCs	Células dendríticas derivadas de monocitos

MTT	3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl tetrazolium bromide
NY-ESO-1	<i>New York Esophageal Squamous Cell Carcinoma 1</i>
PB	Pacific Blue (Fluorocromo para citometría de flujo)
PBMCs	Células mononucleares de sangre periférica (<i>Peripheral Blood Mononuclear Cells</i>)
PD-1	Proteína de muerte celular programada 1 (<i>Programmed cell death protein 1</i>)
PE	Ficoeritrina (<i>Phycoerythrin</i>)
PGE2	Prostaglandina E2
Poly I:C	Ácido poliinosinico:policitidílico (<i>Polyinosinic:polycytidylic acid</i>)
PRRs	Receptores de reconocimiento en patrón (<i>Pattern Recognition Receptor</i>)
SFB	Suero Fetal Bovino
Std	Coctel de maduración estándar
TAAAs	Antígenos asociados a tumor (<i>Tumor-Associated Antigens</i>)
T _{CM}	Linfocito T de memoria central (<i>Central Memory</i>)
TCR	Receptor de LT (<i>T cell receptor</i>)
T _{EM}	Linfocito T de memoria efectora (<i>Effector Memory</i>)
T _{EMRA}	Linfocito T efectores terminales (<i>Terminal Effector CD45RA+</i>)
T _N	Linfocito T vírgen (<i>Naive</i>)
TLR	Receptor tipo toll (<i>Toll-like receptor</i>)
TNF	Factor de necrosis tumoral (<i>Tumor necrosis factor</i>)
TSA	Antígenos específicos de tumor

8 INTRODUCCIÓN

Las células dendríticas (DCs) son un grupo heterogéneo de células presentadoras de antígeno (APC) capaces de inducir potentemente la activación y diferenciación efectora de linfocitos T (LT) (3). Fueron descritas por Ralph Steinman en 1973, más tarde ganador del Premio Nobel de Medicina y Fisiología en 2011 por este hallazgo, y desde entonces han sido postuladas como importante alternativa en inmunoterapia del cáncer. En su mayoría, las DCs son células de presencia tisular, y en sangre periférica comprenden una población relativamente escasa (< 0.1%) (4). Esto ha dificultado su obtención en números suficientes para la elaboración de estrategias de inmunoterapia basadas en DCs naturales. Por esta razón, con el tiempo comenzaron a desarrollarse protocolos para la derivación de DCs a partir de otras poblaciones celulares como monocitos o precursores hematopoyéticos (HSC) CD34+ (5). El desarrollo de estos protocolos favoreció la implementación de la inmunoterapia basada en DCs como una alternativa importante en la inmunoterapia del cáncer.

Los abordajes que emplean DCs han sido particularmente atractivos, esencialmente debido a su baja toxicidad, a que no requieren procedimientos demasiado invasivos y a su potencial de inducir memoria inmunológica (6). La mayoría de las estrategias de diseño de estas vacunas se fundamenta en la administración de DCs autólogas derivadas de monocitos (MoDCs) pulsadas *ex vivo* con diferentes formulaciones de los antígenos de interés, como lo son péptidos y polipéptidos sintéticos, proteínas recombinantes y lisados tumorales (6) para su captura y procesamiento *in vitro*. También han sido descritos otros métodos de entrega antigénica como la transducción con vectores lentivirales, o transfección de mRNA por electroporación (7).

Dentro de la extensa gama de antígenos descritos, se pueden establecer tres grupos. En primer lugar, están los antígenos asociados a tumor (TAAs), que corresponden a proteínas presentes en tejido sano, pero sobreexpresadas en las células tumorales. En este grupo, HER2 o MART-1 (Melan-A) (*Melanoma antigen recognized by T cells*) cuentan con una larga trayectoria en la conducción de ensayos clínicos, además de inmunogenicidad comprobada a distintos niveles (8). No obstante, se ha detectado frecuentemente baja afinidad por estas epítopes, posiblemente debido a la selección negativa en el timo de LT de alta afinidad por estos antígenos. A raíz de esto, se estudiaron los antígenos Cancer-Testis (CT), que en condiciones normales se restringen a línea germinal, pero que se han visto expresados en gran variedad de tumores. Particularmente NY-ESO-1 (*New York Esophageal Squamous Cell Carcinoma 1*) ha exhibido resultados prometedores en estudios de cáncer de esófago y ovario (9).

Por otro lado, los antígenos específicos de tumor (TSAs) son antígenos expresados únicamente por células tumorales y en esta categoría se clasifican los neoantígenos, derivados de mutaciones somáticas como producto de la inestabilidad genética de algunos tumores (7). Una de las desventajas del uso de antígenos únicos es que se pueden desarrollar rápidamente variantes del tumor que pierden la expresión de estas epítopes (10).

La búsqueda de alternativas a este inconveniente ha conducido a proponer los lisados tumorales como una opción para el reconocimiento de múltiples epítopes (11). Esta opción ha sido probada en pacientes con diagnóstico de glioma (12) y cáncer de ovario (11) con resultados esperanzadores. El amplio rango de antígenos blanco en este abordaje podría reducir la probabilidad que tiene el tumor de mutar el antígeno blanco y escapar a la acción inmunitaria. Adicionalmente, podría favorecer tanto respuestas T CD8+ citotóxicas como respuestas T CD4+ 'helper' (11), permitiendo superar la barrera de haplotipo HLA específico del paciente (8). Sin embargo, uno de los obstáculos de esta formulación es la dilución de los antígenos más inmunogénicos entre los demás que componen el lisado.

Actualmente existe una gran heterogeneidad de criterios al momento de elegir la formulación óptima del antígeno, y a esto se suma la falta de consenso en otros aspectos relevantes para el diseño de vacunas, como las condiciones de maduración de las DCs. Tanto los modelos preclínicos como los ensayos clínicos han hecho uso de múltiples estrategias de formulación, así como de condiciones de maduración, siendo escasos los estudios comparativos entre las distintas metodologías (6-8).

Este proyecto surge a partir de la necesidad de ampliar el conocimiento sobre los diversos factores implicados en el diseño de vacunas basadas en DCs, continuando con las líneas de investigación desarrolladas por la Fundación Salud de los Andes (FSA) y el Grupo de Inmunología y Medicina Traslacional (GI&MT). Para ello se propuso explorar y comparar las diversas formulaciones del antígeno y su efecto sobre la respuesta efectora de LT CD8+, en relación con el coctel de maduración utilizado para la maduración de MoDCs. La influencia de estos elementos se midió en términos de la producción de citoquinas, y la expresión de un fenotipo de activación y agotamiento, tanto en células autólogas de individuos sanos, como en clones de LT CD8+ antígeno-específicos. Si bien este proyecto no busca evaluar aspectos relacionados con mecanismos moleculares de la respuesta inmune, si busca expandir la información disponible sobre las características de la respuesta generada por células efectoras luego del estímulo con distintas MoDCs y formatos. Lo anterior tiene el potencial de impactar en los enfoques y planes utilizados para el diseño de vacunas basadas en MoDCs.

9 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACIÓN

Pese a la extensa investigación en inmunoterapia, no se cuenta con un acuerdo general sobre los factores que guían la creación de vacunas basadas en DC. Un punto importante en esta discusión ha sido el formato del antígeno utilizado para la entrega a las DCs. Tanto modelos preclínicos como ensayos clínicos han hecho uso de péptidos cortos (8 a 15 aa), péptidos largos (25 a 35 aa) o proteínas recombinantes completas, con resultados heterogéneos (7). Incluso con los recientes abordajes de medicina personalizada, sigue siendo motivo de debate la formulación de los antígenos, por lo que se han probado distintos métodos (10). Por otro lado, los ensayos clínicos en distintos tipos de tumores también han recurrido a variadas condiciones de manipulación *ex vivo* de estas APC.

Aun con los esfuerzos por identificar el rol de los distintos estímulos en la habilidad de las MoDCs para secretar perfiles de citoquinas o promover respuestas antitumorales efectivas, no hay claridad sobre los criterios de selección del estímulo de maduración adecuado. Tampoco se dispone de los estudios suficientes que investiguen de forma detallada la relación entre las distintas variables del diseño de vacunas (3, 13). Por esta razón es frecuente encontrar que la literatura insiste en la necesidad de estudios que comparen las distintas metodologías del diseño de vacunas para el cáncer, como lo es la correlación que pueda existir entre las condiciones de maduración y la formulación del antígeno utilizada.

Por lo anterior, el presente trabajo exploró las implicaciones de la formulación del antígeno en combinación con distintos estímulos de maduración y sus repercusiones en el desarrollo de respuestas inmunes efectoras por parte de LT CD8+. El proyecto se desarrolló en función de la siguiente pregunta de investigación:

- ¿Cómo afecta el tipo de formulación del antígeno al desarrollo de respuestas inmunes efectoras por LT CD8+ estimulados con MoDCs pulsadas y tratadas bajo distintas condiciones de maduración?

10 MARCO TEÓRICO

10.1 Biología de las células dendríticas

Las DCs tienen presencia prácticamente en todos los tejidos humanos, a excepción de la sangre periférica, donde constituyen una población escasa típicamente categorizada en dos grandes grupos: las DCs plasmacitoides (pDCs) y las DCs convencionales (cDCs). Estos grupos se distinguen por la expresión de marcadores de superficie, patrones de migración y funciones específicas (4, 14). Carecen de marcadores de linaje monocito-macrófago (CD3, CD19, CD14, CD20, CD56 y glicoforina A), y expresan de manera constitutiva el MHC II (15).

Las pDCs (BDCA-2+/CD303+; BDCA-4+/CD304+) se caracterizan por la producción de interferones (IFN) de tipo I en respuesta a infecciones virales, encontrándose mayoritariamente en el área T de nódulos linfoides (16), amígdalas, bazo, timo, médula ósea, placas de Peyer, sangre y tejidos periféricos como hígado o mucosa nasal (7). En el contexto del cáncer, la mayoría de los estudios coinciden en su actividad predominantemente tolerogénica, que favorece la anergia de LT (17). La presencia de pDCs infiltrantes de tumor se asocia con un pobre pronóstico de supervivencia.

Las cDCs se caracterizan por ser MHC II+ CD11c+ y típicamente se dividen en dos subgrupos: las DCs convencionales tipo 1 (cDC1) (BDCA3+/CD141+; Clec9A+) y las DCs convencionales tipo 2 (cDC2) (BDCA1/CD1c+) (3). Las cDC1 son una población rara (0.1% de las células de sangre periférica) reconocida por su capacidad de hacer presentación cruzada del antígeno. Expresan receptores endocíticos que mejoran su capacidad de capturar antígenos derivados de células necróticas como Clec9a y XCR1 (18, 19). Por su parte, las cDC2 componen una subpoblación presente tanto en tejidos linfoides como no linfoides. Expresan TLRs (1 – 8), producen IL-12, TNF α , IL-8 e IL-10, y polarizan respuestas Th1, Th2 o Th17 (7). Su rol en la inmunidad del cáncer aun es controvertido.

Las DCs se encuentran en dos estadios funcionales principales: DCs inmaduras (iDCs) y DCs maduras (mDCs). Las iDCs residen en los sitios de entrada de los antígenos como la piel o las superficies mucosas del tracto respiratorio y gastrointestinal (20), actuando como centinelas encargadas de la captura de patógenos invasores o células muertas. Esta eficiencia en la captura está dada por mecanismos como la fagocitosis, macropinocitosis y endocitosis mediada por receptores como

lectinas tipo C o Fc (20). En contraste, son pobres inductoras de respuestas de LT efectoras, debido a la baja expresión de moléculas coestimuladoras y de receptores de quemoquinas.

Tras la exposición a estímulos como ligandos de receptores de reconocimiento en patrón (PRRs) (especialmente TLRs), citoquinas como el Factor de necrosis tumoral (TNF) α e Interleuquina (IL) 1, u otras perturbaciones de la homeostasis tisular, las DCs experimentan la activación de programas transcripcionales, genéticos, metabólicos y de ciclo celular, que en conjunto constituyen lo que se denomina la maduración de las DCs (3). Este proceso se encuentra fuertemente asociado con la adquisición de antígenos, y se caracteriza por la regulación al alta de receptores de quemoquinas como CCR7, moléculas de adhesión como CD54, moléculas coestimuladoras como CD80, CD83 y CD86, y alta expresión del MHC II. Estos marcadores son objeto de análisis por citometría de flujo.

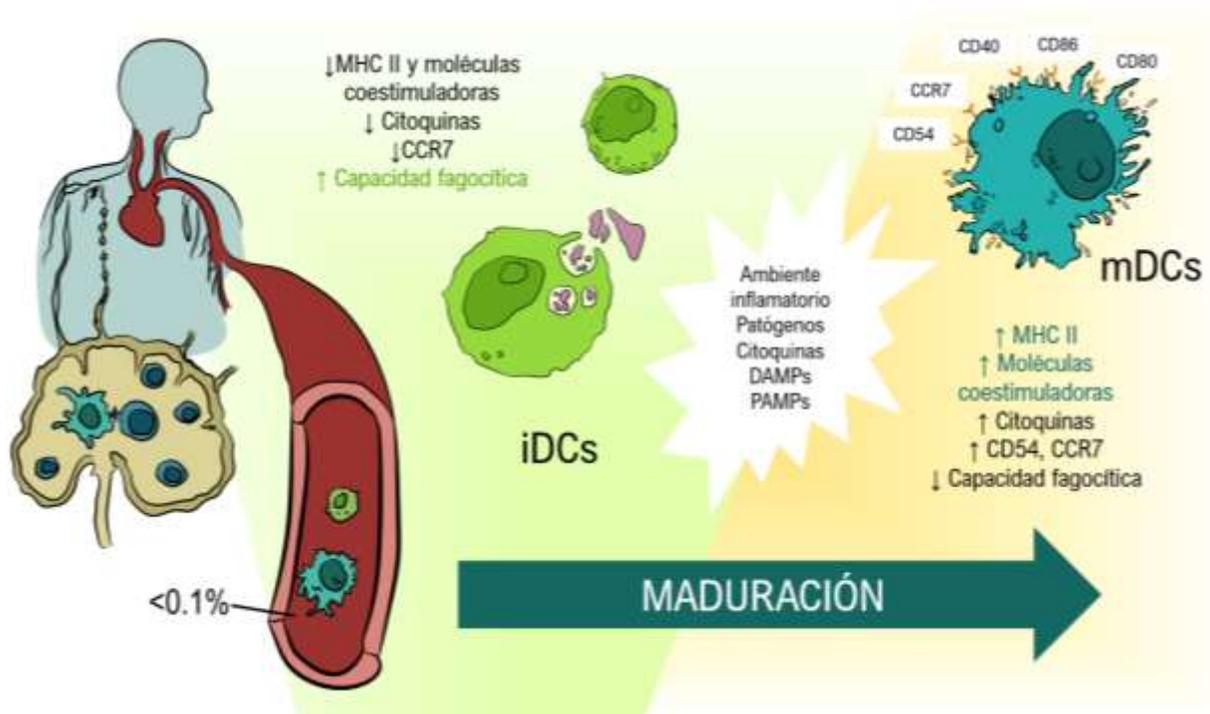


Figura 1. Maduración de células dendríticas. Imagen elaborada por María Alejandra Alfaro y Pablo José Caballero Blanco.

Aunque las mDCs reducen su capacidad fagocítica, mejoran el procesamiento y la presentación de antígenos. Asimismo, reorganizan su citoesqueleto incrementando la motilidad y capacidad de migrar a los tejidos linfoides secundarios, donde entran en contacto con LT y LB, un proceso que es

dependiente de CCR7. La interacción entre las mDCs y los LT es el factor impulsor de las respuestas inmunes adaptativas antígeno específicas. En particular, estas APC pueden inducir la diferenciación de los LT CD4+ en los distintos subtipos de LT colaboradores (LT_h) (Th1, Th2 o Th17) dependiendo del patrón de citoquinas liberado (3, 21). La IL-12 secretada por las DCs también puede activar y mejorar la capacidad citolítica de las células NK (22).

10.2 Derivación y maduración de MoDCs *ex vivo*

Gran parte del conocimiento de la biología de las DCs fue posible gracias al desarrollo de un método de derivación *in vitro* de estas poblaciones (5). Los primeros reportes de una diferenciación exitosa de DCs humanas surgieron a principios de la década de 1990, con la demostración de que citoquinas como GM-CSF, TNF α e IL-4 pueden dirigir este proceso a partir de células madre hematopoyéticas (HSC) CD34+ (23) y monocitos circulantes clásicos. El uso de estos protocolos ha favorecido el estudio de las funciones básicas de las DCs, así como la constitución de una fuente importante de estas APC para su uso en terapia adoptiva de células y diseño de vacunas.

El estudio pionero de Frederica Sallusto y Antonio Lanzavecchia de 1994 describe como la fracción adherente de las células mononucleares de sangre periférica (PBMCs) puede diferenciarse en células con características fenotípicas y funcionales de las DCs en un periodo de 7 días. Estas MoDCs son capaces de activar respuestas alogénicas de LT y presentar de forma eficiente antígenos solubles a LT CD4+ (23). Se ha documentado la presencia de células con un perfil transcripcional muy similar al de las MoDCs en el líquido ascítico de pacientes con cáncer de ovario y en líquido sinovial de pacientes con artritis reumatoide (3). A pesar de estar más próximas a la línea monocito-macrófago que a las auténticas DCs, las MoDCs han demostrado estimular el desarrollo de respuestas antígeno-específicas tanto en estudios preclínicos como clínicos (7).

Una vez hecha la derivación, las DCs resultantes son sometidas a un proceso de maduración que les permite la correcta estimulación y activación de LT. Comúnmente, los estímulos de maduración comprenden agonistas de TLRs (como LPS, poly I:C, resiquimod, entre otros) y citoquinas proinflamatorias. Durante mucho tiempo se ha empleado en ensayos clínicos el denominado coctel '*gold standard*' (Std) que utiliza TNF α , IL-1 β e IL-6, y PGE2. Este coctel favorece la regulación al alta de moléculas HLA-I y HLA-II, CD40, CD83 y CCR7, pero no induce efectivamente la producción de IL-

12p70. A raíz de esto, surgieron diversas combinaciones de estímulos, cada uno propiciando ciertos fenotipos de maduración. Los cocteles a base de LPS, se caracterizan por generar potentes respuestas Th1 con amplia proliferación de LT (24). Por su parte, el coctel $\alpha 1$ polarizadas, que incluye Poly I:C, TNF α , IL-1 β , IFN α e IFN- γ , promueve la producción de IL-12p70 y la inducción de respuestas citotóxicas (25, 26). Moléculas como CD40-L también se han integrado a los estímulos de maduración, ampliando el repertorio de cocteles disponible para la maduración de DCs tanto *in vitro* como *in vivo*. La literatura ha reportado una extensa heterogeneidad en los procesos de manipulación de DCs *ex vivo*, y a la fecha no se cuenta con criterios claros respecto a la elección de los estímulos de maduración, siendo escasos los estudios comparativos (1, 8).

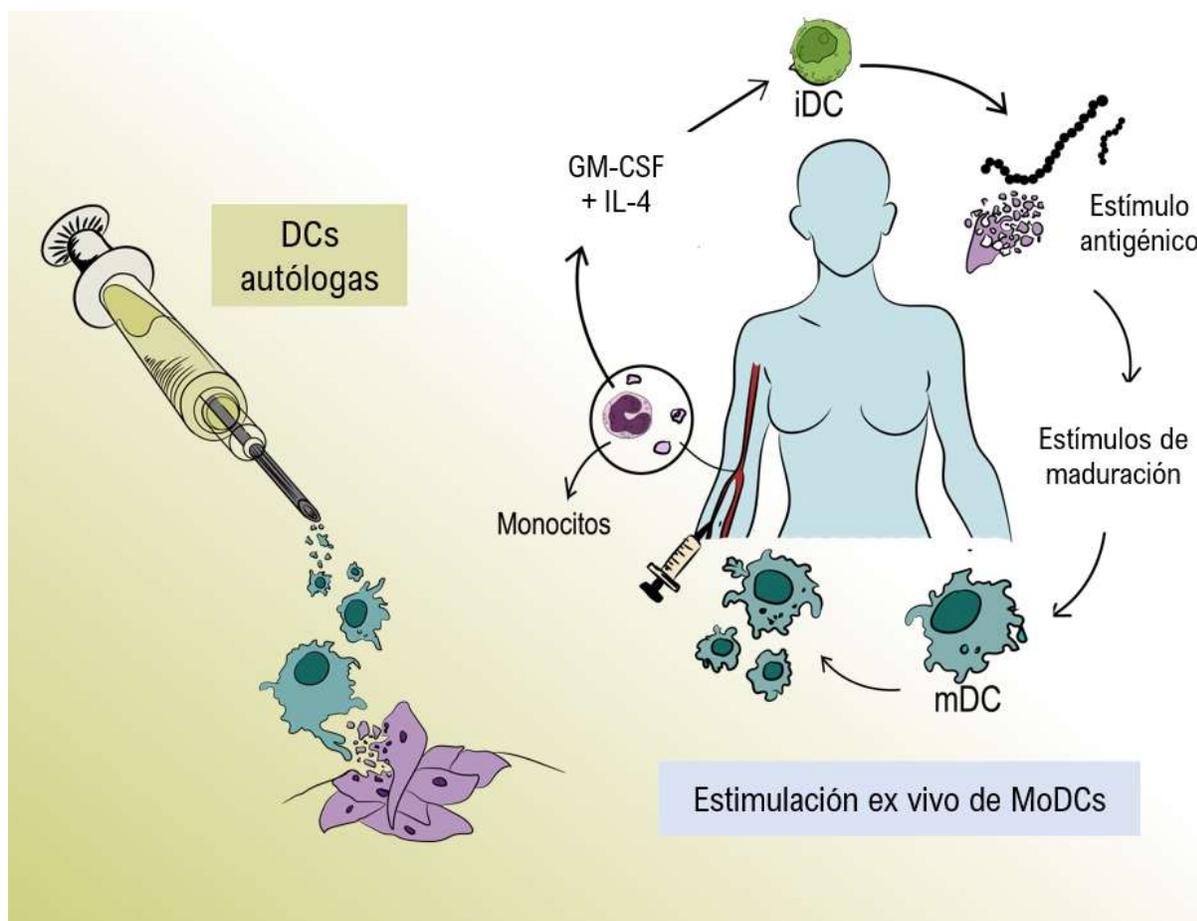


Figura 2. Derivación de MoDCs y manipulación *ex vivo* con fines de inmunoterapia. Imagen elaborada por María Alejandra Alfaro y Pablo José Caballero Blanco.

10.3 El rol de las DCs en el cáncer

El uso de las DCs en la inmunoterapia del cáncer siempre estuvo en el radar de la investigación, y ya desde los estudios clínicos tempranos se utilizaron MoDCs que demostraron generar respuestas inmunes antitumorales *in vivo*. No obstante, los procesos inmunes en el contexto del cáncer se encuentran sometidos a presiones supresoras del microambiente tumoral. Las fallas frecuentes en las señales 1, 2 o 3 impiden el desarrollo de una respuesta efectiva por parte de LT CD8+.

Se han descrito alteraciones funcionales y fenotípicas de las MoDCs en pacientes con distintos tipos de cáncer, hecho que refleja los efectos sistémicos de la enfermedad en el sistema inmune. Esto reviste gran importancia por cuanto gran parte de los estudios utilizan DCs autólogas, que podrían no cumplir con las expectativas durante su entrenamiento y activación *ex vivo* (6). Por fortuna, la reciente aparición de los inhibidores de puntos de control, como PD1 o CTLA-4, han vindicado el rol de las DCs infiltrantes del tumor (27). Ya se había observado que la elevada infiltración de estas células, especialmente de las cDC1 en modelos de cáncer de mama y pulmón se considera un predictor de buen pronóstico y se correlaciona con una mejora en la supervivencia (28). Actualmente, la vacunación con DCs en combinación con los inhibidores de puntos de control ha mostrado resultados satisfactorios en tumores como melanoma, posiblemente debido a la capacidad de estos anticuerpos de revertir parte de los efectos inmunosupresores del microambiente tumoral (3, 7).

10.4 CMV humano como antígeno modelo

El modelo antigénico del citomegalovirus humano (CMV) es frecuentemente utilizado para el estudio de respuestas inmunes celulares, principalmente debido a las altas tasas de infección por este virus en la población general, con seroprevalencias entre el 50 – 90% (29). La inmunidad canónica de CMV, extensamente estudiada en la década de 1990 estaba orientada a la respuesta de LT CD8+ citotóxicos ante proteínas inmunodominantes de la fase lítica como pp65 (fosfopéptido de matriz; *phosphoprotein 65*) e IE-1 (*Immediate-early 1*) (30). Actualmente se conoce un rango más amplio de antígenos y se ha vindicado el papel de la respuesta T CD4+, gracias a su actividad ‘*helper*’ y al reconocimiento de proteínas expresadas en la fase de latencia de la infección viral. Se ha descrito que los LT CD4+ tienden a reconocer proteínas estructurales, mientras que los LT CD8+ reconocen proteínas no estructurales, aunque parece haber una gran superposición entre ambas respuestas (30).

Esto se ve condicionado por el haplotipo HLA individual, por cuanto determina la inmunogenicidad de epítopes relevantes de este virus según la afinidad de unión al MHC (31) .

Durante la infección aguda de CMV, las poblaciones de LT específicas para antígenos inmunodominantes experimentan expansión, contracción y formación de una memoria estable (32). De esta manera, durante la reactivación de la infección, se observa una expansión considerable de este repertorio de memoria, especialmente de LT de alta avidéz (31). Siendo pp65 una proteína derivada de la replicación viral (31), se cree que durante el periodo de latencia de la infección esta proteína se estaría expresando en episodios líticos poco frecuentes (33). Esto podría explicar la persistencia de poblaciones de LT específicas para epítopes derivadas de esta proteína. Por otra parte, se han caracterizado extensamente las respuestas a epítopes presentadas en el contexto de haplotipos frecuentes en la población general, como el HLA-A*02:01. La epítope inmunodominante NLVPMVATV, inmersa en la secuencia de la proteína pp65, se encuentra restringida a este haplotipo (34). Por lo anterior, CMV tiene un papel importante como antígeno modelo que permite el estudio de respuestas inmunes amplias y relativamente bien caracterizadas.

10.5 Antígenos tumorales modelo

Como en el caso de CMV, algunos antígenos tumorales han sido extensamente caracterizados debido a su relevancia clínica en la generación de respuestas inmunes contra ciertos cánceres prevalentes. MART-1 es un TAA ampliamente expresado en melanoma y comúnmente asociado a respuestas de LT CD8+ (**figura 3**), especialmente dirigidas a la epítope EAAGIGILTV (MART-1₂₆₋₃₅). Esta es derivada del dominio transmembrana de la proteína y es reconocida en el contexto del HLA-A*02:01 (35, 36).

A diferencia de otros antígenos tumorales, se ha observado una alta frecuencia de LT CD8+ MART-1-específicos, no solo en el tumor y nódulos linfoides de pacientes con diagnóstico de melanoma, sino también en sangre periférica de individuos sanos (35). A su vez, la presencia de estos LT CD8+ puede ser cerca de 10 veces mayor que LT CD8+ específicos para otros antígenos tumorales (37, 38). Se ha sugerido que hasta 1 de cada 1000 LT CD8+ es específico para MART-1 en sangre periférica de individuos sanos portadores del haplotipo HLA-A*02:01. Esta alta frecuencia se ha explicado en un *priming* y expansión *in vivo*, siendo la fuente del antígeno los melanocitos de la piel y el ojo (35). Dado

que estos LT MART-1-específicos exhibieron un fenotipo de LT_N , Pittet et al. (2002) demostraron que en el timo se producía un gran pool de LT MART-1-específicos en individuos HLA-A*0201 (35).

Por otra parte, Valmori et al. (1998) también estudiaron secuencias análogas a la epítotope inmunodominante de MART-1, por cuanto esta carecía de uno de los residuos de aminoácidos ancla dominantes del MHC I: leucina o metionina en la posición 2. Por este motivo, realizaron sustituciones de aminoácidos individuales para esta posición, encontrando que el análogo ELAGIGILTV se unió de forma más estable al MHC. Asimismo, este péptido fue reconocido más eficientemente que el péptido natural por clones de LT CD8+ derivados de nódulo linfoide infiltrado por el tumor (39). Lo anterior hizo de MART-1 un blanco prometedor para el diseño de vacunas para el cáncer por mucho tiempo, convirtiéndolo en un antígeno modelo para diversos estudios que incluyeron DCs (40, 41).

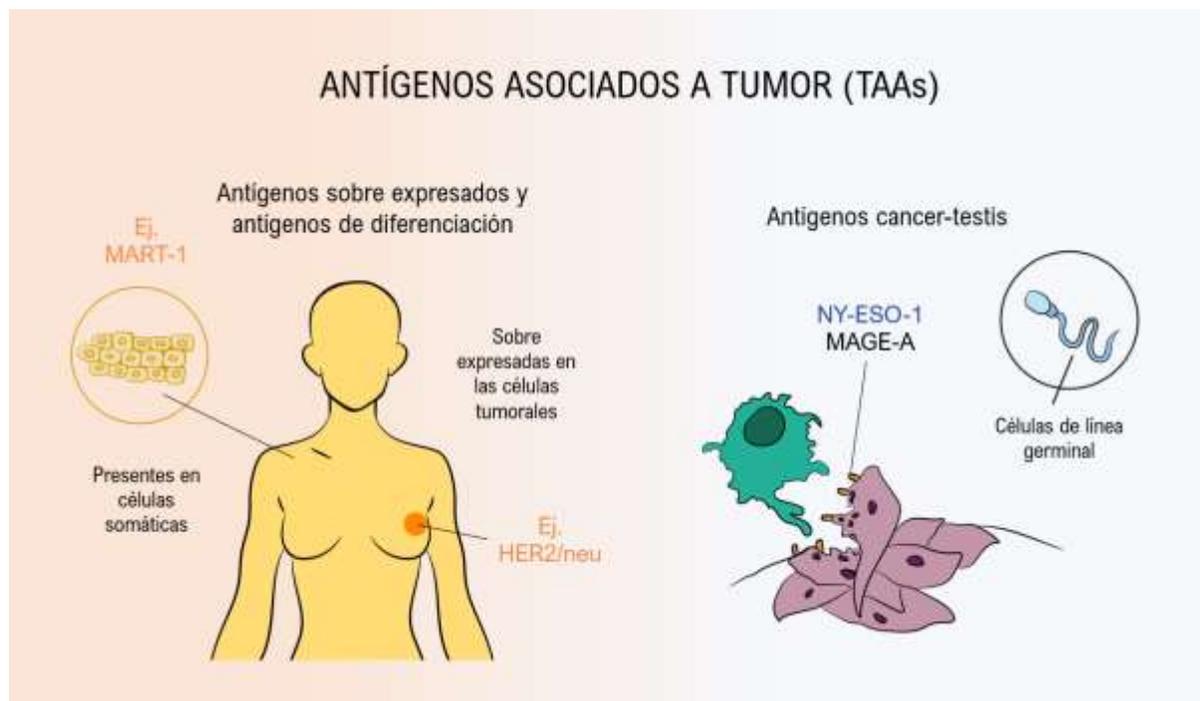


Figura 3. Antígenos asociados a tumor. Antígenos sobreexpresados en tejidos (izquierda) y antígenos cancer-testis (derecha). Imagen elaborada por María Alejandra Alfaro y Pablo José Caballero Blanco.

NY-ESO-1 también hace parte del conjunto de los antígenos tumorales más estudiados. Descubierta en el Ludwig Institut for Cancer Research, ha sido considerado un modelo para el estudio de distintas formulaciones, con evidencia predominantemente inmunológica (42, 43), y resultados heterogéneos

a nivel clínico (42, 44). Las preparaciones de estas vacunas han incluido tanto péptidos largos como la proteína recombinante completa, obteniéndose para ambos casos resultados positivos (9, 42, 45). Esta trayectoria estructurada permite seleccionar a NY-ESO-1 como un buen candidato para la comparación de las formulaciones en el diseño de vacunas para el cáncer.

10.6 Presentación de antígenos y formulación de vacunas para el cáncer

Las DCs capturan antígenos a través de distintos mecanismos dependiendo de su tamaño y características. Los péptidos cortos (entre 8 y 12 aa) son presentados en moléculas MHC I a LT CD8+; mientras que los péptidos largos (12 a 30 aa), las proteínas y otros antígenos complejos son procesados a través de la vía exógena para la presentación en moléculas MHC II a LT CD4+ (7) (**figura 4**). Adicionalmente, las DCs pueden presentar fosfopéptidos, antígenos citrulinados y moléculas lipídicas en CD1, que actualmente se exploran como nuevos blancos de inmunoterapia (7).

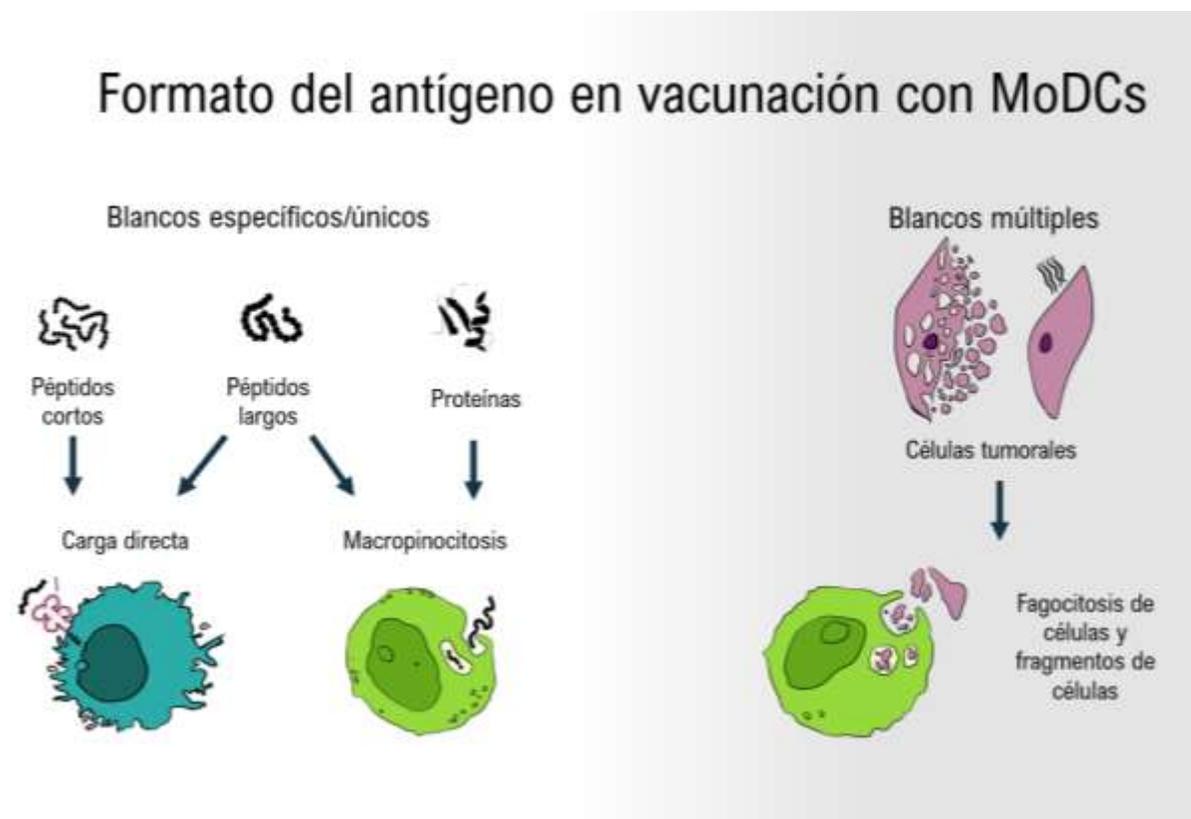


Figura 4. Procesamiento de antígenos por MoDCs. Imagen elaborada por María Alejandra Alfaro y Pablo José Caballero Blanco.

Una vez en el nódulo linfoide, las DCs estimulan el receptor de LT (TCR o *T cell Receptor*) a través del complejo MHC – péptido (Señal 1) y la unión de moléculas de co-estimulación (CD80, CD83 y CD40L) a los receptores en los LT (CD28 y CD40) (Señal 2). La activación de los LT es dependiente de la intensidad y de la duración de la sinapsis inmunológica, proceso que se configura como el resultado de la reorganización de su citoesqueleto, conduciendo un agrupamiento dinámico de receptores y moléculas de señalización en la superficie (7). La señal 3 corresponde a la polarización y diferenciación de LT hacia un fenotipo efector y a la liberación de citoquinas como IFN- γ , IL-2, IL-4, entre otras (5).

Los péptidos cortos sintéticos constituyen uno de los primeros abordajes empleados para el diseño de vacunas contra el cáncer. Estos corresponden a epítopes clase I que por su tamaño se unen directamente al MHC I en las APC (46). En las décadas de 1990 y 2000 se evidenció que estos péptidos desencadenaban potentes respuestas de LT CD8+ *in vitro*, especialmente en melanoma (46-48). No obstante, algunos trabajos también señalaron que la unión directa de estos péptidos cortos a células presentadoras no profesionales, podría generar tolerancia debido a la ausencia de una co-estimulación óptima (49, 50). Adicionalmente, estos péptidos cortos no suelen poseer una estructura terciaria, por lo que estarían sujetos a la rápida degradación en suero o tejidos por peptidasas (46).

Por otro lado, los estudios de la época también subrayaron la necesidad de activar respuestas LT_H, fundamentales en el mantenimiento de una memoria de largo plazo (51). Es así como comenzaron a usarse péptidos largos sintéticos (12 a 35 aa) que contienen las epítopes clase I conocidas. Esto abrió la posibilidad del procesamiento y generación de nuevas epítopes en el bolsillo del MHC II (52). Su uso también se soporta en la teoría de la presentación cruzada de antígenos. Los estudios demostraron que los péptidos largos fomentan respuestas de memoria de LT CD8+, mejorando el control tumoral en comparación con los péptidos cortos (53). Se han probado péptidos largos en estudios de cáncer cervical, cáncer de ovario y cáncer colorrectal con evidencia de respuestas T CD4+ y CD8+ (7).

10.7 Muerte Celular Inmunogénica

Una de las limitantes más importantes de los péptidos es la necesidad de conocer los haplotipos HLA del paciente, lo que restringe su aplicación y resulta en grados de éxito variable a nivel clínico. Trabajos desarrollados en las últimas décadas demostraron que algunos agentes de quimioterapia modifican la inmunogenicidad del tumor, provocando muerte celular inmunogénica (ICD) (5). Moléculas como

HMGB1, ATP o CLR (**figura 5b**), normalmente restringidas al interior de las células vivas, son liberadas o expuestas en la superficie en condiciones de estrés celular, daño o muerte. Los agentes de quimioterapia promueven estrés del retículo endoplasmático (RE), conduciendo a la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS) (17). Estos patrones moleculares asociados a daño (DAMPs) interactúan con PRRs presentes en las membranas de las DCs (**figura 5b**) (5) potenciando su maduración y el desarrollo de respuestas inmunes antitumorales (54, 55). Se ha sugerido que este efecto propicia la sinergia entre quimioterapia y los nuevos abordajes de inmunoterapia.

De este modo, el enfoque actual en la construcción de vacunas involucra el uso de terapias combinadas. Esto contribuye, por un lado, a la activación de DCs que mejoren las funciones de los LT; y por otro, a evitar la evasión inmune del tumor. Las DCs cargadas con proteínas o lisados tumorales se han utilizado en el diseño de vacunas para el cáncer, y se cuenta con evidencia clínica en glioma (12) y tumor de ovario (11).

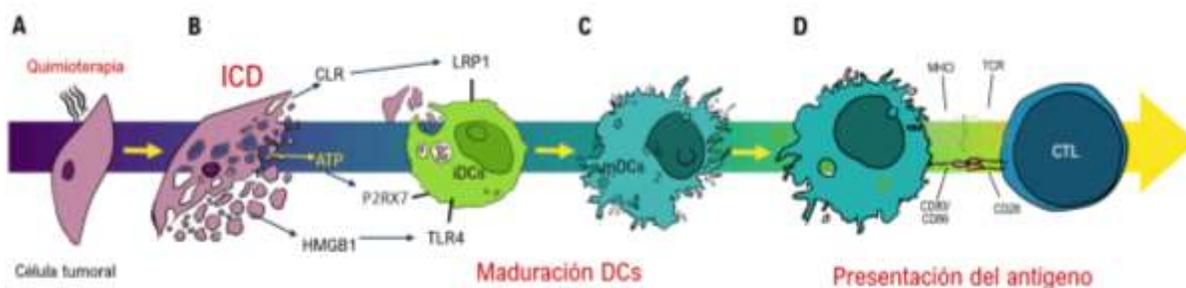


Figura 5. Muerte celular inmunogénica (ICD). Imagen elaborada por María Alejandra Alfaro y Pablo José Caballero Blanco.

10.8 Respuesta efectora de LT CD8+ de memoria

En términos generales, el número de células respondedoras a un estímulo antigénico es un indicador de la magnitud de la respuesta. No obstante, la calidad de la respuesta también puede ser evaluada mediante la diversidad de las respuestas funcionales generadas (56). Las funciones efectoras de LT se ponen de manifiesto en la liberación de una o más citoquinas que impulsan la proliferación, inflamación y citólisis de otras células, entre otras funciones. El IFN- γ es una citoquina esencial para combatir infecciones virales y tumores (57) y aumenta notablemente la capacidad citotóxica de los LT

CD8⁺ (58). Se sabe que es producido rápidamente por LT CD8⁺ de CM, EM y EMRA, en contraste con lo observado en LT_N (57, 59-61).

Por su parte, el TNF α corresponde a una citoquina pleiotrópica involucrada en actividades antitumorales y homeostáticas (62), y la presencia de LT CD8⁺ productores de TNF α se asocia a una mejor inmunidad antiviral (57). Al igual que el IFN- γ , el TNF α es producido de forma simultánea por LT CD8⁺ luego del encuentro con el antígeno. Sin embargo, a diferencia del IFN- γ , los LT_N tienen una rápida producción de TNF α luego de la unión al TCR (63).

Los LT CD8⁺ han sido clasificados como monofuncionales o polifuncionales, según su capacidad de producir una o más citoquinas (64). Los LT CD8⁺ monofuncionales suelen expresar IFN- γ , mientras que los polifuncionales suelen expresar IFN- γ e IL-2 de forma simultánea (64). La presencia de LT polifuncionales se asocia con una actividad citolítica mejorada y mejor acción contra patógenos (65), y se sabe que las subpoblaciones de LT CD8⁺ de memoria son potencialmente polifuncionales (66).

A diferencia de los LT_{EMRA} efectores de corta vida, las células de memoria tienen una larga duración y constituyen la reserva de LT que permiten una rápida respuesta y diferenciación a estados efectores terminales (57). Los LT_{CM} exhiben receptores de 'homing' (direccionamiento) a órganos linfoides secundarios como CD62L y CCR7, y proliferan a consecuencia del encuentro antigénico. Los LT_{EM} y LT_{EMRA} tienen funciones citotóxicas y suelen encontrarse en el sitio de la inflamación (57).

10.9 Fenotipo de activación y agotamiento de LT CD8⁺

Los LT pueden ser fenotipados usando marcadores de activación y agotamiento (67). CD69, un receptor de lectina C de tipo II expresado en la superficie de algunos leucocitos, ha sido considerado un marcador clásico de activación linfocitaria (67, 68), predominante en LT CD4⁺ pero también en LT CD8⁺ (69). Se trata de una proteína preformada en el citoplasma (70) que suele aparecer en la superficie entre 2-3h después de la interacción TCR/CD3 (71). Por lo tanto, corresponde a un marcador temprano de activación linfocitaria (72). CD69 también se relaciona con la adquisición del fenotipo efector, regulando la producción de IFN- γ , IL-17 e IL-22 (71, 73). Se ha identificado a Galectin-1 como su ligando específico, siendo esta una proteína de unión a carbohidratos expresada en DCs (71, 74).

CD25 corresponde a la cadena α del receptor de IL-2 (75), fundamental para la proliferación de LT y muerte celular inducida por activación en célula efectoras (76, 77). También se ha considerado un

marcador clásico de activación (67, 68), y puede ser inducido por las citoquinas liberadas por monocitos y macrófagos (78). Es un marcador más tardío que CD69, con una aparición progresiva luego de 24 horas de estímulo (67).

CD137 (4-1BB) pertenece a la familia de receptores TNF (TNFR) (79) y posee una función coestimuladora que desencadena señales de supervivencia en LT activados (80-82). Su expresión se restringe a la señal que emite el TCR, lo que permite la identificación y selección de LT CD8+ antígeno-específicos (80). CD137 es un indicador en LT activados que ya han experimentado la unión TCR-CD3 (señal 1) y pueden beneficiarse de la unión de CD28 (señal 2) (83). Su ligando CD137L/4-1BBL, presente en las DCs, fomenta la emisión de señales coestimuladoras para la proliferación, supervivencia y secreción de citoquinas (84). CD137 está especialmente asociado a LT CD8+ citotóxicos (CTL) con funciones antivirales (85), expansión de LT_{EM} (86) y regresión tumoral en modelos murinos (87). Dependiendo del estímulo, la regulación al alta de CD137 se da entre 12 horas hasta 5 días (79), más temprana e intensamente en LT CD8+ (81).

CD154 (CD40L) es un marcador canónico de LT CD4+ relacionado con la modulación de respuestas inmunes celulares y humorales (88), siendo una de sus funciones principales la activación de DCs y monocitos mediada por LT (89). Su interacción con CD40, presente en DCs, es clave en la respuesta efectora de LT CD8+ (90, 91), la activación de DCs (92) y la producción de IL-12 de forma antígeno-específica por estas APCs (93, 94). Pese a la asociación clásica de CD40L con los LT CD4+, se ha descrito su relevancia para el desarrollo de memoria en respuestas de LT CD8+ (92, 95-97). Esto se da gracias a la 'licencia' dependiente de LT CD4+CD154+ que se le da a las DCs (98), que en algunos modelos de infección viral aumenta la expresión de CD154 y el *priming* eficiente de CTL. La expresión de CD154 en LT CD8+ es transitoria, y requiere de la activación del TCR para la formación del complejo de activación supramolecular de la sinapsis inmunológica (99). También se ha planteado que la señalización de CD40L es necesaria para la presentación cruzada de algunas subpoblaciones de DCs (100) y la expresión de moléculas coestimuladoras como CD80/CD86 (92).

El agotamiento de LT se da como consecuencia de la exposición persistente al antígeno y la estimulación crónica del TCR. Se caracteriza por una proliferación reducida, y una expresión persistente y elevada de receptores inhibitorios (101). Uno de los marcadores más importantes de este fenotipo es PD-1 (*Programmed Cell Death-1*), un punto de control inmunológico que regula el agotamiento de LT CD8+ durante las infecciones virales persistentes y el cáncer (102-104). PD-1 se asocia a la inhibición de la señalización del TCR y de la molécula coestimuladora CD28 (105, 106),

siendo PD-L1 (107) y PD-L2 (108) sus ligandos naturales. La interacción PD-1/PDL-1 contribuye a mantener la tolerancia periférica (109), y su bloqueo restaura la función de los LT CD8+ (102).

Junto con CTLA-4 (*Cytotoxic T lymphocyte associated protein 4*) y LAG-3 (Lymphocyte-activation gene 3), PD-1 hace parte de blancos de los inhibidores de puntos de control, que han demostrado eficacia clínica en diversos tipos de cáncer (110). Además de su rol como marcador de agotamiento, se ha reportado que PD-1 se expresa de forma transitoria en la fase temprana de activación LT CD8+, durante el proceso de diferenciación hacia el fenotipo efector (102). Sin embargo, disminuye a niveles basales en unos pocos días debido a la disminución transcripcional y degradación mediada por ubiquitinación y proteasoma (111).

CTLA-4 (CD152) también se ha descrito como una molécula de coestimulación que regula negativamente la activación de LT (112). Hace parte de la superfamilia de inmunoglobulinas (113) y tiene una homología significativa con CD28, por lo cual también se une a CD80 y CD86 (114, 115). CTLA-4 se expresa principalmente en LT activados y reguladores (Tregs)(116). Contrario al efecto de CD80/CD86 (señal 2), la unión de CTLA-4 a CD28 frena la activación y proliferación tanto en CD4+ como en CD8+ (117). CTLA-4 se expresa 2 a 3 días posterior a la activación de LT e inhibe la progresión del ciclo celular y la producción de IL-2 (116, 118).

Por último, LAG-3 corresponde a una molécula de superficie con diversos efectos en la función linfocitaria. Se considera un homólogo de la molécula CD4+ (119) que regula negativamente la señalización de LT mediante la interacción con el complejo CD3 del TCR (120-122). Se ha sugerido que controla el tamaño del pool de LT de memoria (120) y comienza a detectarse 24 h posterior al estímulo, alcanzando su punto máximo al día 2 (123, 124). Se ha observado una elevada expresión de LAG-3 en LT CD8+ activados, además de una co-localización con la molécula CD8 en estas células (124). Algunos estudios han confirmado el papel de LAG-3 en la regulación de la proliferación de LT CD8+ (120), y se ha descrito en modelos de infección viral crónica, regularmente co-expresado con PD-1 (125).

10.10 Presentación Cruzada

Históricamente se ha planteado que uno de los pilares fundamentales de la inmunidad antitumoral está relacionado con la captura y procesamiento de polipéptidos, proteínas y otros antígenos complejos en la vía endocítica, que luego son presentados en moléculas clase I para estimular respuestas de CTL (126, 127). Este fenómeno, denominado presentación cruzada, se considera una

capacidad especial de las DCs que promueve la inmunidad antitumoral (20), y se ha descrito especialmente para la población de cDC1s.

Los mecanismos que respaldan este fenómeno no se conocen en detalle, aunque se han propuesto modelos como el de la vía citosólica y el de la vía vacuolar para explicarlo (128). En el modelo citosólico, los antígenos son traslocados del lumen de los compartimentos fagocíticos al citoplasma, donde son procesados en péptidos cortos por el proteasoma. Esta vía se asocia con los transportadores TAP1/TAP2, que facilitan la carga de los péptidos a las MHC I. Por el contrario, en la vía vacuolar los antígenos extracelulares son internalizados y degradados en los compartimentos endosómicos por las enzimas lisosomales. Los péptidos resultantes son cargados en moléculas MHC I en los endosomas, de forma similar a la presentación en MHC II (127). Pese a que existe alguna evidencia de este fenómeno en modelo murino, es escasa la información que se tiene sobre su ocurrencia en humanos, y lo poco que se sabe se restringe a modelos *in vitro* (129-131). A la fecha, la evidencia sigue siendo heterogénea.

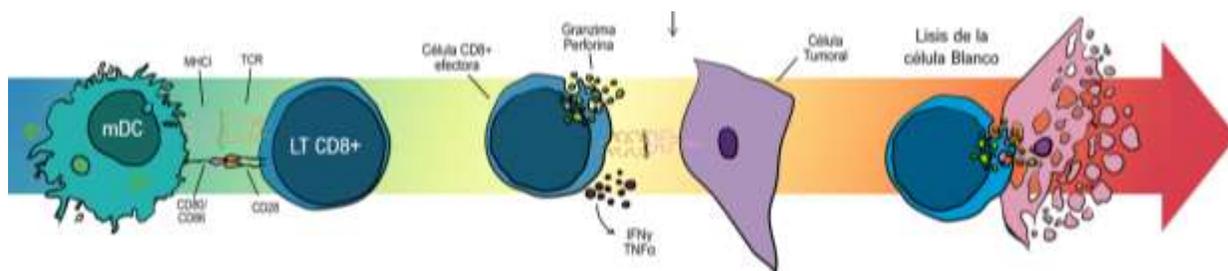


Figura 6. Presentación cruzada del antígeno. Imagen elaborada por María Alejandra Alfaro y Pablo José Caballero Blanco.

11 OBJETIVOS

11.1 Objetivo General

Comparar la eficacia de la presentación antigénica por MoDCs estimuladas con diferentes formulaciones del antígeno

11.2 Objetivos específicos

1. Evaluar la activación de Linfocitos T por diferentes tipos de MoDCs estimuladas con péptidos y polipéptidos sintéticos representativos de antígenos tumorales.
2. Determinar la capacidad de MoDCs para presentar antígenos de células tumorales completas a linfocitos T CD8+

12 MATERIALES Y MÉTODOS

A continuación, se presenta un diagrama con la metodología general del proyecto (**figura 7**).

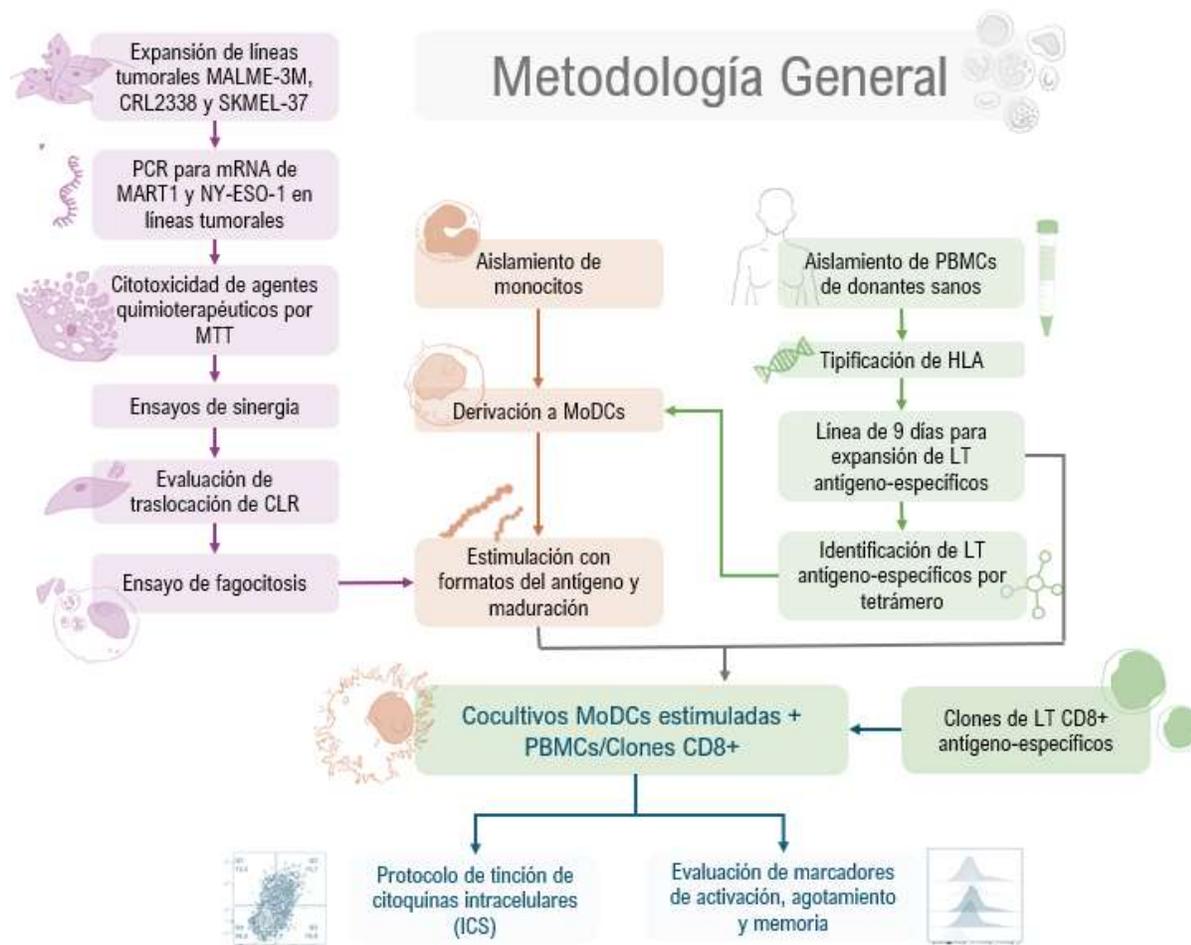


Figura 7. Metodología general del proyecto.

12.1 Equipos, insumos y reactivos

12.1.1 Cultivos celulares

Los cultivos de las líneas tumorales MALME-3M, CRL2338 y SKMEL-37 se hicieron utilizando los medios Roswell Park Memorial Institute 1640 (RPMI 1640) y Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM), suplementados con Suero Fetal Bovino (SFB) al 10%. Los cultivos de monocitos, MoDCs, PBMCs y

clones de LT CD8+ se llevaron a cabo en medio AIM-V libre de suero. Todos los lavados se llevaron a cabo utilizando RPMI 1640 con 10% de SFB, a menos que se indique lo contrario en la sección correspondiente. PBMCs, monocitos, MoDCs y LT CD8+ fueron centrifugados a 700g durante 10 min, mientras que las células tumorales fueron centrifugadas a 300g durante 5 min. Todos los cultivos fueron incubados a 37°C CO₂ 5%, a menos que se indique lo contrario en la sección correspondiente.

12.1.2 Líneas celulares

Para la estimulación de MoDCs se utilizaron células MALME-3M (MART-1+ NYESO1(-)) (132-134) y SKMEL-37 (MART-1(-) NYESO1+) (135-138), dos líneas de melanoma que expresan los antígenos de interés de este proyecto. La línea de cáncer de mama CRL2338 (MART-1(-) NYESO1(-)) se usó como control negativo para los ensayos de presentación del antígeno a LT CD8+ antígeno-específicos. Por otro lado, se utilizaron clones de LT CD8+ específicos para las epítopes inmunogénicas de la proteína pp65 de CMV, MART-1 y NY-ESO-1, donados al laboratorio de I&MT por el Dr. Pedro Romero.

12.1.3 Citoquinas y estímulos

Los cultivos de monocitos – MoDCs fueron suplementados con rhIL-4 (1000 U/mL) y GM-CSF (1000U/mL) (CellGenix®) (139). La maduración de MoDCs se realizó empleando las citoquinas rhIL-6, rhIL-1β, TNFα, IFN-γ, IFNα y Poly I:C para el coctel α1 polarizadas (25); rhIL-6, rhIL-1β, TNFα y PGE2 para el coctel Std (140); IFN-γ y LPS para el coctel LPS (141); como se ha estandarizado en el laboratorio I&MT. Los cultivos de PBMCs/LT CD8+ fueron suplementados con IL-21 (30ng/mL), IL-7 (5ng/mL) e IL-15 (5ng/mL) (CellGenix®). La estimulación policlonal de las PBMCs se realizó utilizando PMA (25ng/mL) e ionomicina (1μg/mL).

12.1.4 Formatos del antígeno

En la **tabla 1** se relacionan los péptidos empleados para la estimulación de las MoDCs. Los péptidos cortos corresponden a la epítope inmunogénica conocida para cada antígeno, restringidas al haplotipo HLA-A*02:01. Los péptidos largos albergan la epítope inmunogénica flanqueada por aminoácidos propios de la secuencia original de la proteína. La epítope de MART-1 (*) corresponde a la secuencia

modificada, con el cambio de una alanina (A) por una leucina (L) (en negrilla) en la posición 27, reportada como más inmunogénica que la secuencia original (40, 41).

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

Antígeno	Secuencia péptido corto ¹	Secuencia péptido largo ²	aa ³	Ref.
CMV pp65	⁴⁹⁵ NLVPMVATV ⁵⁰³	⁴⁹² LARNLVPMVATVQGG ⁵⁰⁶	15	(142)
MART-1	²⁶ ELAGIGILTV ^{35*}	¹⁶ GHGHSYTTAEELAGIGILTVILGVL ⁴⁰	25	(129)
NY-ESO-1	¹⁵⁷ SLLMWITQC ¹⁶⁵	¹⁵³ LQQLSLLMWITQCFLPVF ¹⁷⁰	18	(143)

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

²Fabricados por la Fundación Salud de los Andes

³Número de aminoácidos (aa) que constituyen la secuencia del péptido largo

Las proteínas utilizadas para estimular las MoDCs fueron:

- *Recombinant Cytomegalovirus pp65 full length protein* (Abcam Cat # ab43041) – 63kDa
- *Recombinant Human MelanA protein* (Abcam Cat # ab114312) – 39kD
- *Recombinant Human CTAG1A protein* (NY-ESO-1) (Abcam Cat # ab267995) – 48kD

Los péptidos cortos se administraron a una concentración de 10 µg/mL, los péptidos largos a 20 µg/mL y las proteínas a 30 µg/mL.

12.1.5 Citometría de flujo multiparamétrica

Se utilizaron los siguientes anticuerpos monoclonales fluoromarcados (*Biolegend*) dirigidos contra CD11c – APC, CD11c – PE, CD80 – PE, CD80 – PerCP-Cy5.5, CD83-APC-Cy7, CD54-PB, HLA-DR – PE/TexasRed, CD3-Pacific Blue (PB), CD8-PE/Texas Red, IFN-γ – PE, TNFα – FITC, CD25 – APC-Cy7, CD69 – BV 650, CD137 – PE-Cy5, CD154 – PE, PD-1-PerCP-Cy5.5, CTLA-4-PE-Cy7, LAG-3 – BV786, CD45RA – APC, CD62L – AF700, CCR7 – FITC, CD45RO-FITC, CCR7 – AF700, Anexina V – APC y CRL-AF488 (Abcam). Los anticuerpos se utilizaron a las concentraciones estandarizadas en el laboratorio de I&MT y en todos los casos la incubación fue a 4°C por 30 min, luego de lo cual se realizó un lavado con 1mL de PBS con 2% SFB para reducir la unión inespecífica del anticuerpo.

La fijación y permeabilización de las células para el protocolo de tinción de citoquinas intracelulares (ICS) se realizó utilizando el kit *Intrastain* (DAKO). De forma sistemática se marcó viabilidad celular utilizando los kits Zombie AQUA™ (1:1000) o Zombie Violet™ Fixable Viability Kit (1:500) (Biolegend) por 30 min a temperatura ambiente. Para el rastreo de células se utilizó Carboxifluoresceína succinimidil-éster (CFSE) (Biolegend) (1:5000) o CellTrace™ Far Red (ThermoFisher) (dilución 1:1000 para PBMCs y 1:400 para células tumorales) por 20 min. Los lavados se hicieron utilizando PBS con SFB (2-5%). Todas las lecturas de citometría se hicieron utilizando el equipo FACS Aria IIIu.

12.1.6 Tetrámero

La identificación de LT CD8+ antígeno-específicos se hizo por medio de tinción con tetrámeros HLA-A*02:01 (Tetramershop), ensamblados *in vitro* con los antígenos de interés (péptidos cortos de pp65 CMV, MART-1 y NY-ESO-1). Los tetrámeros vacíos fueron cargados con los péptidos correspondientes individuales a una concentración de 200 μ M por 30 min a temperatura ambiente. Seguidamente, se añadieron a las PBMCs a evaluar y se continuó con el protocolo de tinción de anticuerpos.

12.1.7 Equipos y paquetes ofimáticos

Para el desarrollo de este proyecto se utilizó: equipo de agua Millipore, balanza analítica, cabina de flujo laminar (Labconco), cabina de extracción de gases, incubadora de CO₂, baño serológico, centrífuga, microscopio de luz, cámara de Neubauer, lector de ELISA, cámara de electroforesis, espectrofotómetro NanoDrop™ 2000, termociclador (Bio-rad), citómetro de flujo FACS Aria IIIu (BD). Para el análisis de datos se utilizaron los programas FlowJo V10.8 y Graph Pad Prism V8 para la graficación de resultados y análisis estadístico.

12.1.8 Colección y análisis de datos

Los resultados fueron organizados de acuerdo con el porcentaje de las poblaciones de interés y la intensidad de fluorescencia media (MFI) con la media geométrica de cada marcador. Los datos se analizaron con base en los cultivos de control en cada caso. Los análisis estadísticos incluyeron ANOVA de dos vías, y las pruebas no paramétricas de Kruskal-Wallis y test de Friedman para datos pareados, según se indique en cada experimento.

12.2 Metodología detallada

12.2.1 Aislamiento de PBMCs a partir de concentrados leucocitarios de donantes sanos

Los concentrados leucoplaquetarios (en inglés *buffy coat*) fueron suministrados por el hemocentro 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)*, como excedentes del proceso normal de donación de sangre. El concentrado leucoplaquetario se lavó 4 veces con solución salina estéril al 0.9% (700 g por 10 min, sin freno), a fin de eliminar el anticoagulante. Las PBMCs fueron aisladas por el método de separación por gradiente de densidad, con el reactivo Lymphoprep™ Density Gradient Medium (STEMCELL™ Technologies). Una vez separadas, se realizó recuento y viabilidad celular en cámara de Neubauer por tinción con azul de tripán. Las células fueron criopreservadas en medio de congelación (RPMI-1640 50%, SFB 40% y dimetilsulfóxido (DMSO) 10%) y almacenadas a -80°C durante 48 h. Transcurrido este tiempo, fueron transferidas a nitrógeno líquido hasta su uso en ensayos inmunológicos. Las fracciones celulares remanentes se descartaron siguiendo la normativa técnica de disposición de residuos biológicos.

12.2.2 Tipificación de HLA y selección de donantes para ensayos inmunológicos

Las muestras procesadas fueron sometidas a una tamización rápida para el haplotipo HLA-A2 por citometría de flujo. De cada muestra positiva en este cribado preliminar se tomaron 25µL, que fueron añadidos en tarjetas *Protein Saver 903 Whatman®*. Estas 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 fueron seleccionados para los ensayos inmunológicos.

12.2.3 Enriquecimiento de monocitos por el método de rosetas

La obtención de monocitos se realizó por selección negativa basada en rosetas, utilizando el kit RosetteSep™ (STEMCELL™ Technologies). Este protocolo utiliza anticuerpos tetraméricos (TAC) contra células no monocíticas y eritrocitos, posteriormente eliminados mediante el paso de centrifugado en el protocolo de aislamiento de PBMCs. La pureza de los monocitos aislados se evaluó por citometría de flujo usando el marcador CD14. Las células obtenidas fueron criopreservadas como se describió previamente, distribuidos en viales de entre 3 y 6x10⁶ células.

12.2.4 Derivación y maduración de MoDCs

Para los cocultivos, se sembraron monocitos en placa de 96 pozos que fueron derivados a iDCs en AIM-V suplementado con rhIL-4 y GM-CSF por 5 días (139). El cambio de medio se hizo cada 2 o 3 días utilizando AIM-V fresco suplementado. El día 5 las células se maduraron con cocteles de citoquinas: LPS, α 1-polarizadas (25) o Std (140), según se indique en cada ensayo, y se incubaron por 48 h. Para cada experimento se sembró de forma paralela una placa de 48 pozos fondo plano, destinada al control de maduración. La recolección de las células se hizo utilizando un raspador (Corning® *cell scraper*), y la evaluación fenotípica se hizo por medio de la expresión diferencial de CD11c-APC, CD80-PE, CD83-APC-Cy7 y CD54-PB, como se implementó en el laboratorio de I&MT (2). Cada lectura de muestra contó con un mínimo de 30.000 eventos por condición experimental. La estrategia de *gating* (de ahora en adelante ‘selección de poblaciones’) utilizada se muestra en la **figura 8**.

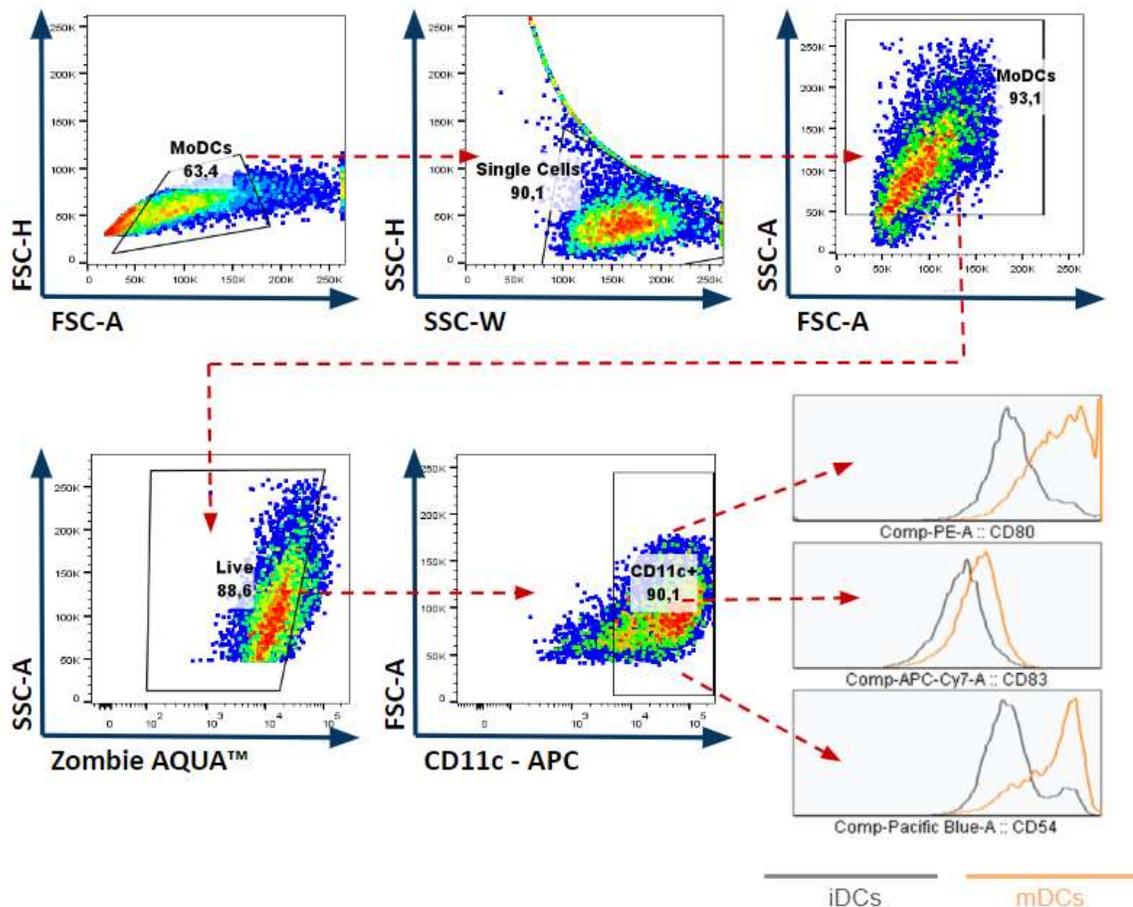


Figura 8. Estrategia de selección de poblaciones CD11c+ para la evaluación del fenotipo de iDCs y mDCs.

Diagramas de puntos representativos de la estrategia de selección de las poblaciones de iDCs (histograma naranja) y mDCs (histograma verde) CD11c+. En los dos primeros diagramas (de izquierda a derecha), se seleccionan las poblaciones según tamaño y complejidad, con el fin de eliminar eventos de dupletas o agregados. Posteriormente se selecciona la población de mDCs por morfología, utilizando los parámetros SSC-A vs FSC-A (señalado *MoDCs* en el diagrama). Finalmente, se escoge la población de células vivas (AQUA -), CD11c+, sobre la cual se evaluó la expresión de los marcadores de maduración.

12.2.5 Estimulación de MoDCs con distintos formatos del antígeno

Los formatos del antígeno fueron añadidos al medio de cultivo correspondiente de la siguiente forma: el péptido corto (10 µg/mL) se añadió 2 h después del estímulo de maduración; el péptido largo (20 µg/mL) y la proteína recombinante (30 µg/mL) fueron añadidos 24 h antes del estímulo de maduración. Las células tumorales vivas o tratadas fueron administradas 36 – 48 h antes del estímulo de maduración. Los controles de mDCs no estimuladas no recibieron ninguno de los formatos del antígeno. Para los ensayos se utilizó péptido corto, péptido largo y proteína recombinante de los antígenos pp65 de CMV, MART-1 y NY-ESO-1, según se indica en cada ensayo.

12.2.6 Líneas de 9 días de PBMCs para la expansión de LT antígeno-específicos

Se establecieron líneas de PBMCs de donantes sanos del banco HLA-A2, empleando un sistema de cultivo estandarizado en el GI&MT (2, 144). Este permite la identificación de donantes portadores de LT CD8+ antígeno-específicos que puedan utilizarse para los ensayos de presentación antigénica. La fase inicial utilizó el péptido corto de la proteína pp65 de CMV, dada la mayor probabilidad de identificar donantes que contaran con LT CD8+ específicos contra este antígeno (145, 146). Este sistema inicia con el cultivo de PBMCs totales en platos de 96 pozos fondo en U, a una densidad de 1×10^6 células/pozo. Las células fueron cultivadas 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, y el medio de cultivo se cambió 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+ tetrámero positivas para CMV+ (T-CMV+). Se usó la misma metodología para la identificación de LT CD8+ contra MART-1 y NY-ESO-1.

12.2.7 Identificación de LT antígeno-específicos por citometría de flujo mediante tetrámero

Las células de la línea fueron recolectadas de la placa de cultivo y marcadas durante 15 min a 37°C con el tetrámero cargado. Luego, se marcaron para CD3-PB y CD8- PE-Texas Red, y fueron analizadas por citometría de flujo. Cada lectura de muestra contó con un mínimo de 30.000 eventos por condición experimental. La estrategia de selección de las poblaciones tetrámero+ se muestra en la **figura 9**.

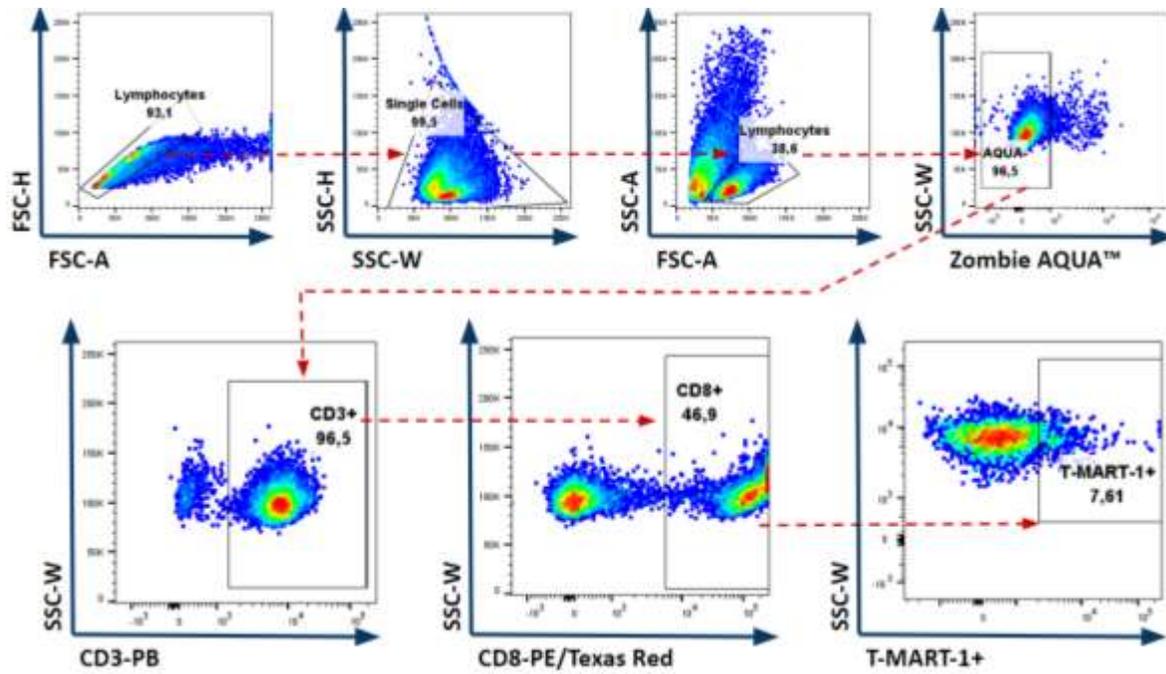


Figura 9. Estrategia de selección de las poblaciones CD3+CD8+Tetrámero+. Diagramas de puntos representativos de la estrategia de selección de LT CD8+ antígeno-específicos. Primero se seleccionan las poblaciones según tamaño y complejidad (FSC-H VS FSC-A y SSC-H VS SSC-W), para eliminar eventos de dupletas o agregados. Posteriormente se selecciona la población de linfocitos por morfología, utilizando los parámetros SSC-A vs FSC-A. Finalmente, se escoge la población de células vivas (AQUA -), CD3+ CD8+ T-MART-1+.

12.2.8 Protocolo de tinción de citoquinas intracelulares (ICS)

PBMCs de la línea se recolectaron el día 9 y se cocultivaron con MoDCs autólogas derivadas *ex vivo* y tratadas bajo distintas condiciones de maduración, como se indica en cada experimento. Se usaron los siguientes controles: i) control positivo: PBMCs de la línea que recibieron estímulo policlonal con PMA/Ionomicina; ii) control de funcionalidad: PBMCs autólogas no derivadas de la línea, pulsadas con

el péptido (según método del GI&MT (144)). Este control valida que la línea responda efectivamente; iii) control negativo: PBMCs autólogas sin estímulo antigénico, ante las cuales las células de la línea no deberían responder; iv) control negativo de mDCs: MoDCs maduras sin estímulo antigénico.

Las PBMCs presentadoras fueron descongeladas, pulsadas por 16h con los péptidos de interés a una concentración de 10µg/mL y marcadas con CFSE o CellTrace™ Far Red, para diferenciarlas de las PBMCs derivadas de la línea durante la lectura por citometría. El cocultivo se hizo en placas de 96 pozos fondo en U a una proporción de 1:1 PBMCs línea: PBMCs presentadoras y a una proporción de entre 1:4 y 1:10 MoDCs:PBMCs, a una densidad de entre 125.000 y 500.000 células. Se adicionaron 5µL/mL de Brefeldina A 100X (Biolegend) a cada pozo 1.5 h después de iniciado el cultivo y se incubó por 4.5 h. Transcurrido este tiempo, las células fueron recolectadas, se marcó viabilidad y se tiñó para CD3-PB y CD8-PE-Texas Red. Se realizó fijación, permeabilización, y se marcaron las células para TNF- α e IFN- γ . En la citometría de flujo se contó con un mínimo de 30.000 eventos por condición experimental. La estrategia de selección de las poblaciones CD3+CD8+ corresponde a la descrita en la **figura 9**, y la producción de citoquinas se evaluó dentro de la población CD3+CD8+ – CFSE – o CTRF-.

12.2.9 Evaluación de marcadores de activación, agotamiento y memoria

PBMCs de la línea recolectadas el día 9 fueron cocultivadas con: i) PBMCs autólogas marcadas con un rastreador y pulsadas o no con el péptido; ii) MoDCs autólogas maduras. Luego de 24 h de cultivo, las células fueron recolectadas, y marcadas para viabilidad, CD3-PB, CD8-PE/Texas-Red, CD25-APC-Cy7, CD69 – BV650, CD137-PE-Cy5, OX40-BV711, CTLA-4-PE-Cy7, PD-1-PerCP-Cy5.5, LAG-3-BV786, CD62L-AF700 y CD45RO-FITC. El marcador CD154-PE se añadió al medio al inicio del cultivo. Cada lectura de muestra contó con un mínimo de 30.000 eventos. La estrategia de selección de las poblaciones CD3+CD8+ corresponde a la descrita en la **figura 9**, y los marcadores evaluados se analizaron dentro de la población CD3+CD8+ – CFSE – o CTRF-.

12.2.10 Identificación y caracterización de clústeres por el algoritmo CITRUS

Para las réplicas del donante LAND42 se llevó a cabo un análisis de identificación y caracterización de clústeres utilizando el algoritmo CITRUS (*Cluster identification, characterization, and regression*) (147). Este análisis busca el descubrimiento automatizado de firmas biológicas estadísticamente significativas, a partir de conjuntos de datos de células individuales, para este caso: células

productoras de citoquinas y células que expresan marcadores de activación y agotamiento. El algoritmo CITRUS utiliza un método de múltiples pasos que comienza por el agrupamiento jerárquico no supervisado para la identificación de clústeres de poblaciones celulares. Desde FlowJo se exportaron a un archivo FCS las células viables que expresaran el marcador CD3, como insumo para el análisis mediante el algoritmo.

Una vez identificadas las poblaciones agrupadas, se calcularon sus características biológicamente relevantes por muestra, según la abundancia relativa de las células que expresan una determinada combinación de marcadores respecto a todo el conjunto CD3+ (Ej. IFN- γ , CD137etc.). Posteriormente, CITRUS utiliza un algoritmo supervisado para determinar las poblaciones y las características que mejor se ajusten al grupo final al que pertenece una muestra dada. Como resultado de este análisis se obtienen clústeres que se diferencian en su abundancia relativa de la muestra entre los grupos definidos (Ej. Std vs LPS), y establece las características fenotípicas de dichas agrupaciones celulares (**figura 10**). El análisis por CITRUS se utilizó con el fin de comparar si las condiciones de cultivo afectan las poblaciones celulares en cuanto a los parámetros evaluados.

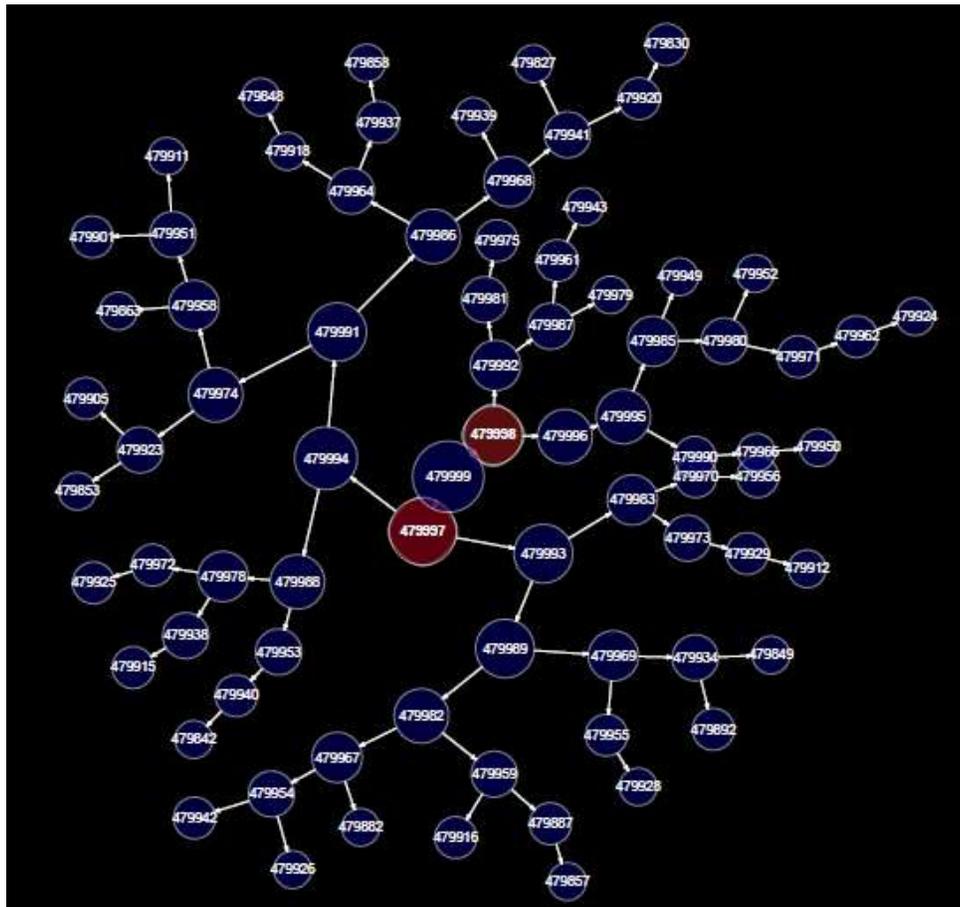


Figura 10. Clústeres de poblaciones celulares identificadas en un análisis CITRUS. La figura muestra un resultado representativo del análisis del algoritmo CITRUS. Los círculos en rojo señalan las poblaciones celulares que difieren en abundancia relativa respecto a la producción de citoquinas del conjunto general de células CD3+. Los números corresponden a la identificación de cada agregado celular.

12.2.11 Expansión de líneas tumorales MALME-3M, CRL2338 y SKMEL-37

Se descongelaron viales de 1×10^6 células pases 2 o 3 de las líneas tumorales MALME-3M, CRL2338 y SKMEL-37, que fueron sembradas en frascos de 25cm^2 en medio DMEM (Gibco™) con 10% SFB. Luego de la fase de expansión celular, se retiró el medio del frasco, se añadió 1mL de TrypLE™ (ThermoFisher), enzima recombinante sustituta de la tripsina. El frasco se incubó por 3 minutos a 37°C , y transcurrido este tiempo se verificó el desprendimiento de las células adheridas por microscopía óptica. Se añadió 1mL de medio frío para inactivar la enzima, y se recolectaron y lavaron las células. Se hizo recuento celular en cámara de Neubauer y se continuó con los experimentos planeados.

12.2.12 Expresión de mRNA de los antígenos MART-1 y NY-ESO-1 en líneas tumorales

Se evaluó la expresión del mRNA de los antígenos tumorales MART-1 y NY-ESO-1 en las líneas tumorales humanas MALME-3M, CRL2338 y SKMEL-37, mediante el método de amplificación de ácidos nucleicos por reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Para esto se hizo extracción de RNA con tiocianato de guanidina/fenol-cloroformo (TRIzol™/Cloroformo), empleando entre 1×10^6 y 2×10^6 células para este procedimiento. El mRNA fue evaluado en un gel de integridad a fin de verificar la calidad del material genético extraído (**figura suplementaria 10**). La concentración y pureza del mRNA obtenido fueron analizadas utilizando el espectrofotómetro NanoDrop™ 2000 (Thermo Scientific™).

La RT-PCR se realizó utilizando el kit SuperScript™ III Platinum™ One-Step qRT-PCR de Invitrogen™, y los resultados de amplificación fueron revelados en un gel de agarosa al 2%. En la **sección 18.5** de datos suplementarios se describe el proceso de diseño de los cebadores y la **tabla suplementaria 2** muestra las secuencias utilizadas y el tamaño de los productos de amplificación.

12.2.13 Evaluación de la citotoxicidad *in vitro* mediante el ensayo MTT

Se realizó la evaluación *in vitro* del efecto citotóxico de los agentes doxorrubicina, carboplatino y paclitaxel sobre células MALME-3M, CRL2338 y SKMEL-37. Para esto se utilizó el ensayo MTT (3-(4,5-

dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio), técnica colorimétrica basada en la adición de una sal soluble al medio de cultivo. Esta sal es reducida por células metabólicamente activas, formando cristales de formazan. Esto permite determinar la viabilidad celular de las células tratadas con las distintas diluciones del fármaco. Los cristales fueron disueltos con DMSO (148), y se midió la absorbancia de cada pozo. Cuanto mayor sea la absorbancia, mayor será la actividad metabólica y la viabilidad celular.

Con este ensayo se determinó la IC₅₀ para cada fármaco en cada línea tumoral. Se realizaron diluciones seriadas de los fármacos en placa de 96 pozos fondo plano, con un mínimo de 4 réplicas por condición. Una vez establecidas las diluciones, se sembraron 6000 células por pozo y se incubaron por 48 h. Como control positivo de viabilidad se sembraron pozos con células vivas no tratadas, y como control negativo se reservaron pozos con medio sin células. Pasada la incubación, se retiró el medio y se añadieron 100 µL de medio fresco más 10 µL de reactivo MTT por pozo. El plato se incubó por 4 h, luego de lo cual se retiraron 75 µL de medio y se añadieron 50 µL de DMSO por pozo. La placa se incubó por 10 min y se analizó en un lector de microplacas (Bio-Rad) a una longitud de onda de 550nm.

Una vez obtenidos los datos crudos en el lector de microplacas, el análisis se llevó a cabo con el software GraphPad Prism v8.0. La viabilidad se calculó para cada pozo utilizando la siguiente fórmula:

$$\%Viabilidad = \frac{\text{Absorbancia de la muestra}}{\text{Promedio de la absorbancia de células no tratadas}} \times 100$$

La mortalidad se calculó con la siguiente fórmula:

$$\%Mortalidad = 100 - \%Viabilidad$$

Los resultados de viabilidad y mortalidad fueron representados gráficamente utilizando el Log₁₀ de la concentración del agente quimioterapéutico en función del porcentaje de la viabilidad. Para el cálculo de la IC₅₀, se hizo un análisis de regresión no lineal con el modelo de dosis-respuesta: inhibición, utilizando las curvas *log(inhibidor) vs respuesta* y *log(inhibidor) vs respuesta (pendiente variable)*. En la **figura 11** se muestra un ejemplo de este análisis.

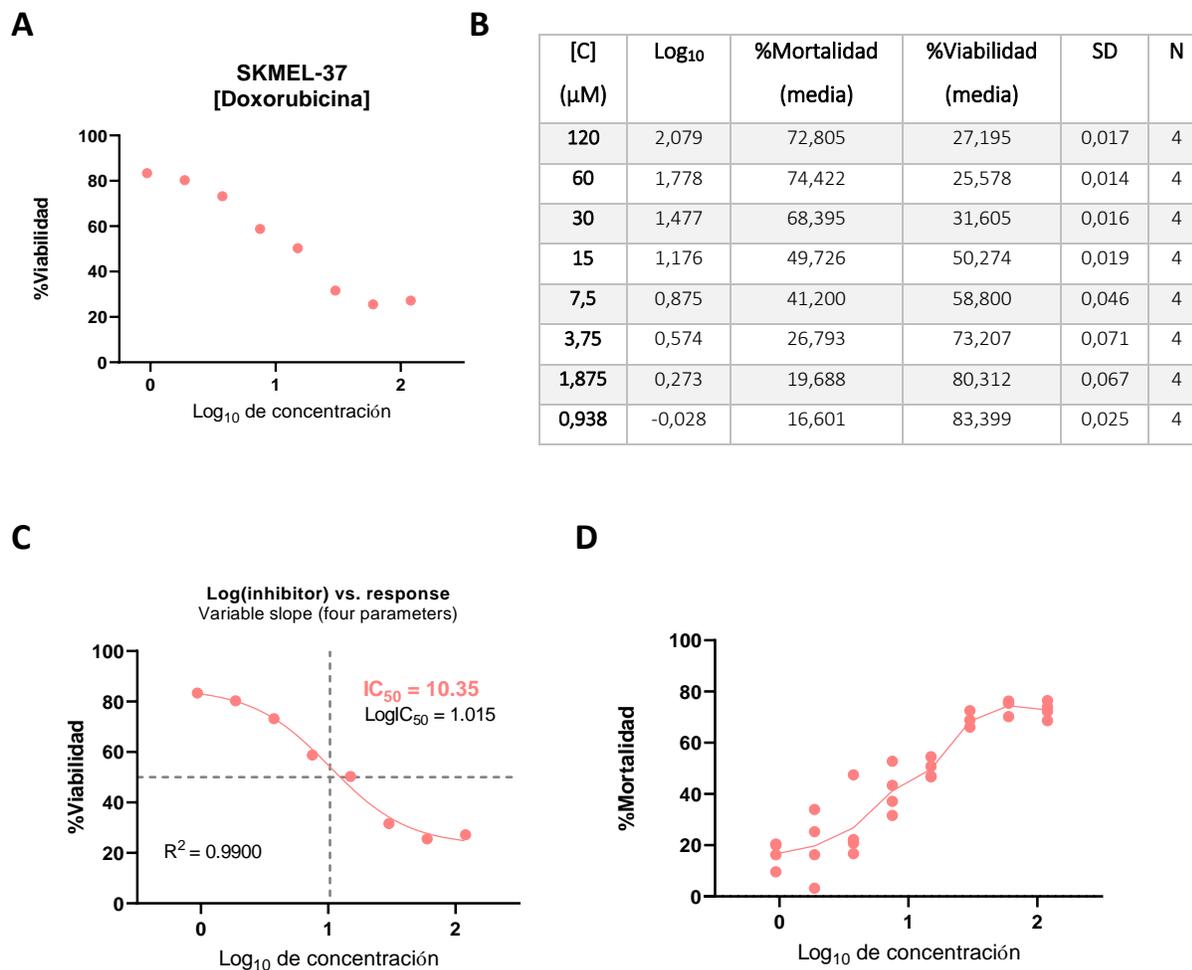


Figura 11. Análisis de regresión no lineal con el modelo de dosis-respuesta: inhibición para la línea SKMEL-37 tratada con doxorrubicina por 48 horas. Análisis representativo para el cálculo de la IC_{50} de una línea tumoral tratada con el agente quimioterapéutico. **A.** Curva de viabilidad vs Log_{10} de las concentraciones. **B.** Porcentajes de mortalidad media, viabilidad media y desviación estándar para cada concentración del fármaco. **C.** Aplicación del modelo dosis-respuesta: inhibición. El R^2 y la congruencia visual de los datos reflejan un ajuste adecuado de este modelo. La IC_{50} se representa en la intersección entre el Log_{10} y el 50% de la viabilidad. **D.** Representación gráfica del porcentaje de mortalidad de las réplicas individuales para cada concentración utilizada.

El cálculo de la IC_{50} se basa en el porcentaje de mortalidad, la desviación estándar y el n de cada condición/tratamiento. Una vez aplicado el modelo, se verifica el ajuste visual de la curva con los datos experimentales graficados y el valor de R^2 . Se realizaron al menos 3 experimentos independientes para cada línea con cada fármaco con un n mínimo de 4 en cada experimento. Las concentraciones empleadas se establecieron conforme a resultados previos del GI&MT (149).

12.2.14 Ensayos de sinergia con agentes quimioterapéuticos

Se exploró el efecto sinérgico de los agentes quimioterapéuticos sobre las líneas tumorales utilizando la técnica MTT. El ensayo consiste en la elaboración de una matriz de diluciones entre dos fármacos, con el fin de determinar el efecto de su combinación sobre las células tratadas. Para ello, se prepararon 7 diluciones seriadas, con 8 réplicas cada una, utilizando concentraciones equivalentes a cuatro veces la IC₅₀ previamente establecida para cada fármaco.

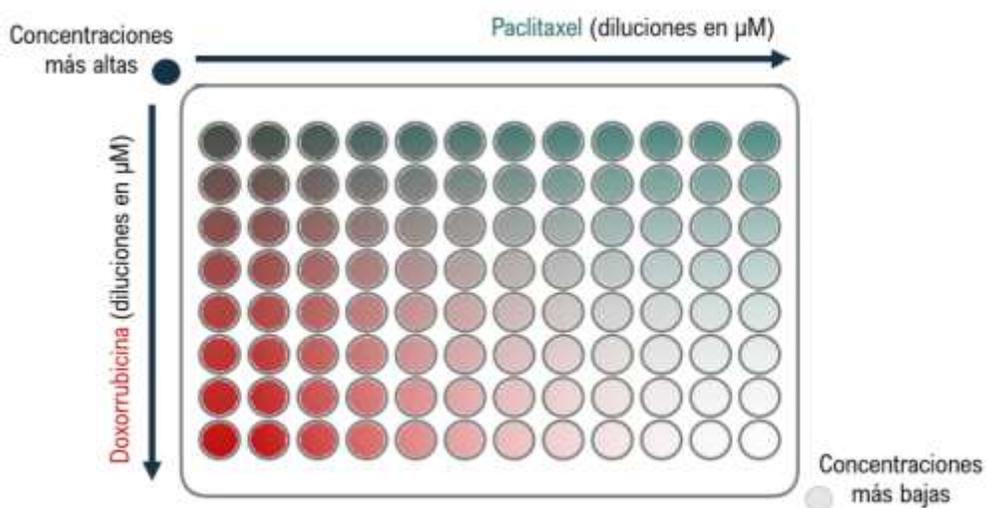


Figura 12. Diluciones de dos fármacos en plato de 96 pozos para ensayo de sinergia. Las diluciones de cada fármaco se orientan de forma perpendicular. En la parte superior izquierda de la placa se ubicaron las concentraciones más altas de ambos fármacos y en la parte inferior derecha las concentraciones más bajas. Figura elaborada por María Alejandra Alfaro.

El esquema de diluciones se preparó en una placa independiente para cada fármaco. La orientación de las diluciones en el fármaco 1 fue perpendicular a la orientación de las diluciones en el fármaco 2, como se muestra en la **figura 12**. Se pasaron 50uL de cada pozo de una placa a la otra, conservando la orientación. Esto resultó en la construcción de una matriz de diluciones de 7x7 que albergó todas las combinaciones de dosis posibles entre los dos fármacos. Se reservó una columna adicional para cada fármaco individual. Una vez construida esta matriz, se añadieron 100uL de la suspensión celular a una concentración de 6000 células/pozo, y el plato se incubó a 37°C 5% de CO₂ durante 48 h. Posteriormente se realizó el revelado de la placa como se explicó en la sección previa.

Posteriormente se realizó el revelado, la obtención de datos crudos en el lector de microplacas y el análisis de viabilidad como se explicó en la sección anterior. Con esta información se determinó la presencia de sinergia entre los fármacos evaluados, utilizando la aplicación web gratuita <https://synergyfinder.fimm.fi>. Los datos se organizaron en el formato matriz dosis-respuesta, según los requisitos de la plataforma. La **tabla 2** muestra un ejemplo de esta organización de los datos.

Tabla 2. Matriz dosis-respuesta de la línea MALME-3M tratada con la combinación de los agentes carboplatino y paclitaxel para el análisis de sinergias

Drug1:	Carboplatin							
Drug2:	Paclitaxel							
ConcUnit:	μM							
	100	50	25	12,5	6,25	3,12	1,56	0
2500	15,50	11,92	14,16	11,03	14,16	13,71	12,07	6,11
1250	15,20	12,22	12,37	11,62	15,05	13,11	12,97	12,82
625	13,71	13,41	15,20	13,56	12,82	18,33	21,16	19,08
312,5	11,33	12,22	12,52	11,77	18,78	25,78	40,39	54,84
156,25	12,22	12,52	15,05	12,67	22,06	43,82	109,09	61,55
78,13	12,22	11,33	12,07	18,93	33,98	45,45	88,08	79,88
39,06	11,92	11,48	11,77	19,08	69,60	36,07	64,68	80,92
0	12,82	12,52	12,97	53,65	84,05	43,37	73,77	113,41

La matriz se carga en la plataforma y se ejecuta el análisis dosis-respuesta y el cálculo de la sinergia, que utiliza el modelo Zero interaction potency (ZIP)(150). Este determina la respuesta individual de cada fármaco y posteriormente calcula la respuesta esperada de su efecto combinado. Como resultado del análisis se obtiene el ZIP synergy score, cuyos valores indican efecto antagónico (< -10); efecto aditivo (entre -10 y 10) y efecto sinérgico (>10). Este ensayo se realizó para las combinaciones: i) doxorubicina – carboplatino; ii) carboplatino – paclitaxel; iii) doxorubicina – paclitaxel, con 3 ensayos independientes para cada combinación, esto es, un ensayo independiente para cada línea.

12.2.15 Evaluación de traslocación de CLR a la membrana celular en líneas tumorales

Se evaluó la traslocación de CLR a la membrana celular de las líneas tumorales tratadas con quimioterapéuticos. Se utilizaron como dosis de partida las IC₅₀ establecidas para los tratamientos individuales en cada línea. La exposición de esta proteína en las células tratadas se consideró un

indicador de ICD, según lo descrito en la literatura (5). Las células fueron tratadas por 36 h, posteriormente recuperadas, lavadas y fijadas. Se marcaron con el anticuerpo anti-calreticulina Alexa Fluor®488 (Abcam) (1:100) en buffer de bloqueo (PBS 1X con 2% SFB) y se incubaron por 1 hora a 4°C en oscuridad. Luego se lavaron con 1mL de PBS 1X con 2% de SFB a 700g durante 5 min.

Las muestras fueron resuspendidas en 100uL de buffer de unión Anexina V (*Annexin V binding buffer* 1X (BD Biosciences)) y marcadas con 5uL de Anexina V-APC. Se incubaron durante 15 minutos a temperatura ambiente en la oscuridad y se lavaron. La estrategia de selección se muestra en la **figura 13**, donde fueron seleccionadas células vivas en las que se estableció el incremento en el porcentaje CLR+, o la MFI respecto células vivas no tratadas y células tratadas no marcadas.

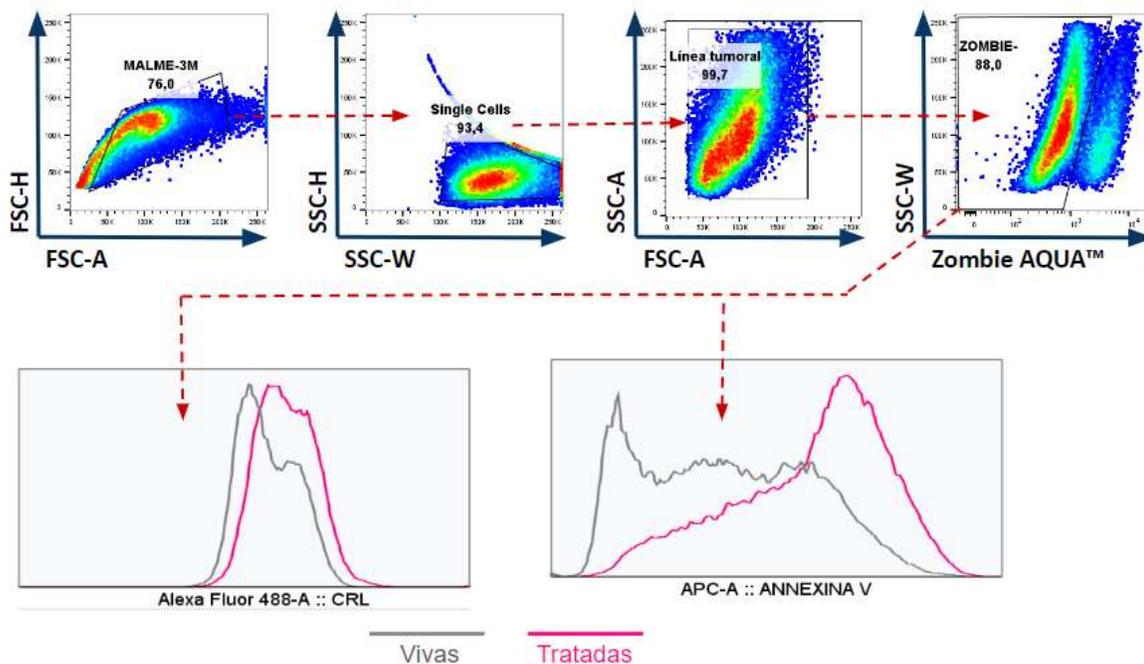


Figura 13. Estrategia de selección de células vivas CLR+ y Anexina V+. Diagramas de puntos representativos de la estrategia selección de células MALME-3M tratadas con carboplatino (histograma naranja) y células vivas no tratadas (control) (histograma gris), AQUA - que expresan CLR y Anexina V en la superficie. Se seleccionaron las poblaciones según tamaño y complejidad (FSC-H VS FSC-A y SSC-H VS SSC-W), con el fin de eliminar eventos de dupletas o agregados. Posteriormente se escoge la población de células vivas (AQUA -), Anexina V+ y CRL+

12.2.16 Ensayo de fagocitosis

Células MALME-3M, CRL2338 y SKMEL-37 fueron marcadas con CellTrace™ Far Red (1:400) y tratadas con las dosis establecidas de carboplatino y paclitaxel por un periodo de 36 h, como se describió previamente. Transcurrido este tiempo las células fueron recolectadas, lavadas y cocultivadas con iDCs por 36 – 48 horas. Posteriormente, las iDCs fueron recolectadas utilizando un raspador. Se marcó viabilidad, CD11c-PE, HLA-DR-PE, CD80-PerCP-Cy5.5 y CD83-APC-Cy7. El marcador CD54-PB no se marcó para este ensayo, dado que, como molécula de adhesión celular, se expresa en células tumorales (151). La fagocitosis fue evaluada en la población CD11c+ como los eventos HLA-DR+ CTRF+. La estrategia de selección de células vivas (AQUA -) utilizada para el análisis se muestra en la **figura 14**. La evaluación fenotípica de las MoDCs se hizo por medio de la expresión de CD80, CD83 y HLA-DR en cada condición de cultivo. Cada lectura de muestra contó con un mínimo de 30.000 eventos.

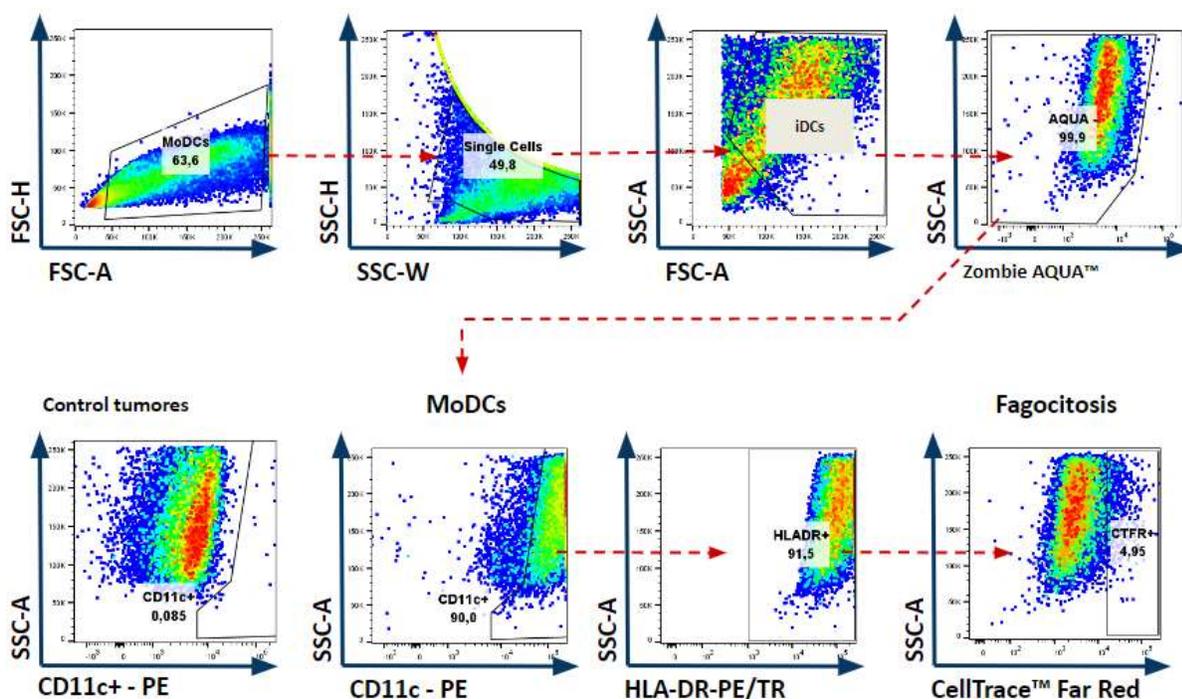


Figura 14. Estrategia para la selección de eventos de fagocitosis. Diagramas de puntos representativos de la estrategia de selección de poblaciones empleada para la identificación de MoDCs CD11c+HLA-DR+. La selección de eventos CTRF+ dentro de esta población es representativo de fagocitosis de células tumorales marcadas con este rastreador fluorescente. En la esquina inferior derecha se presenta el control de células MALME-3M no cultivadas con MoDCs, las cuales son negativas para el marcador CD11c.

13 RESULTADOS

13.1 Expansión de LT CD8+ antígeno-específicos de donantes HLA-A*02:01

13.1.1 Expansión de LT CD8+ T-CMV+ en seis donantes

En el laboratorio del G&MT, se hizo una tamización de cerca de 45 unidades de concentrado leucoplaquetario de individuos sanos de entre 18 y 39 años, utilizando el anticuerpo anti-HLA-A2. Las unidades positivas en este cribado preliminar, detectadas por citometría de flujo, fueron sometidas a tipificación HLA-A de alta resolución. De las unidades tipificadas, 33 portaban el haplotipo HLA-A*02:01 (ver **tabla suplementaria 1**). De estas, 17 presentaron expansión de LT CD8+ T-CMV+ luego de 9 días de cultivo estimuladas con el péptido corto de CMV. En la **tabla 3** se ven los porcentajes LT CD8+TCMV+ de los donantes positivos, empleados en los ensayos inmunológicos del presente trabajo.

Tabla 3. Donantes utilizados para la obtención de LT CD8+ CMV+

Donante	Edad	Sexo	HLA-A		Población T-CMV+ ¹	Población T-CMV+ ¹
					NE ² (%)	E ³ (%)
LAND13	24	M	01:01:01G	02:01:01G	0,45	5,47
LAND33	27	F	02:01:01G	02:01:01G	1,47	12,1
LAND38	24	M	02:01:01G	24:02:01G	0,15	2,47
LAND42	31	M	02:01:01G	02:01:01G	0,51	6,09
LAND43	39	M	02:01:01G	24:02:01G	0,45	11,6

¹Células tetrámero positivas detectadas por citometría de flujo

² PBMCs evaluadas luego de 9 días de cultivo que no recibieron estimulación con péptido

³ PBMCs estimuladas con el péptido NLVPMVATV el día 0 y evaluadas el día 9 por citometría de flujo

En la **figura 15** se muestran diagramas de puntos representativos de tres donantes, cuya expansión fue de al menos 3 veces la población de LT CD8+ T-CMV+ luego de 9 días de cultivo (**figura 15B**).

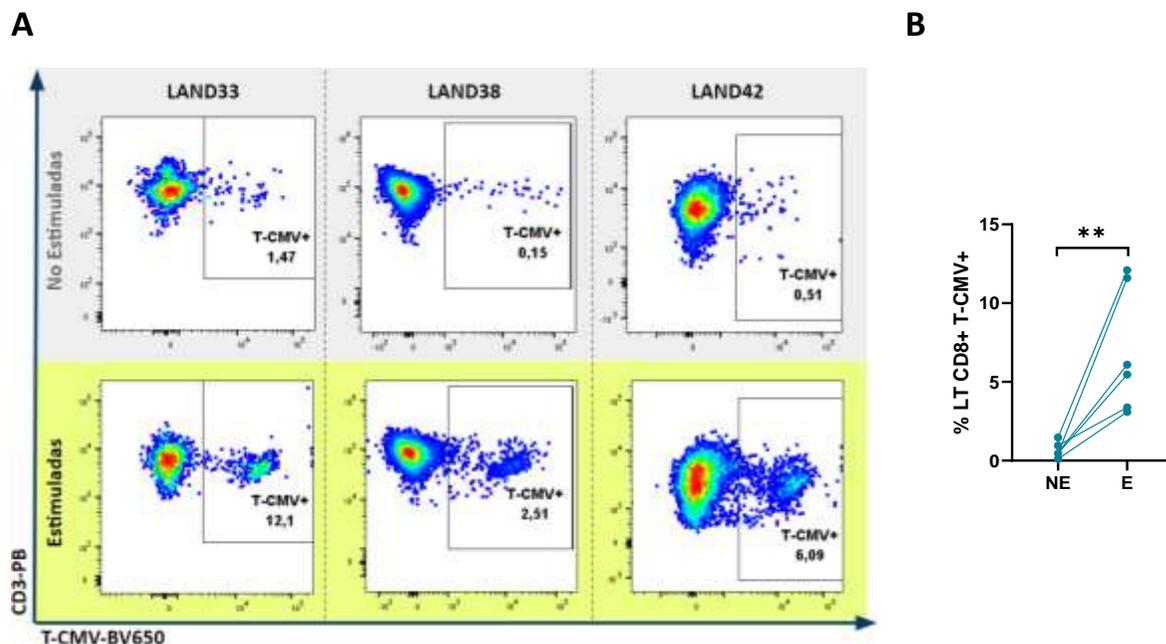


Figura 15. Expansión de LT CD8+ T-CMV+ en donantes HLA-A*02:01. A. Diagramas de puntos del análisis de LT CD8+ T-CMV+ de los donantes LAND33, LAND38 y LAND42, en células de la línea de cultivo de 9 días no estimuladas (arriba, franja gris) o estimuladas (abajo, franja amarilla). **B.** Análisis pareado de los porcentajes de LT CD8+ T-CMV+ de 6 donantes del banco (incluyendo los evaluados en la **tabla 3**), en líneas de 9 días no estimuladas (NE) vs estimuladas (E). El análisis por grupos se llevó a cabo utilizando la prueba de Mann-Whitney, $n = 6$; $p < 0.05$.

13.1.2 Expansión de precursores MART-1+ en el donante LAND33

Tomando en consideración la prevalencia de donantes con LT CD8+ MART-1 específicos (37), se tamizaron al menos tres donantes (JCM, LAND12 y LAND33) para la epítotope ELAGIGILTV por el método de tetrámero (datos no mostrados). Se detectaron precursores para MART-1+ en el donante LAND33, que pasaron del 0.96% en línea no estimulada al 7.61% en línea estimulada por 9 días con el péptido corto de MART-1 (**figura 16A**).

Por otro lado, el donante MER, evaluado en un trabajo previo del GI&MT y GIIOC, era conocido por ser portador del haplotipo HLA-A*02:01 y tener LT CD8+ T-NY-ESO-1+ (152). Con base en esta información, se estableció una línea de 9 días con células de este donante, estimuladas con la epítotope SLLMWITQC de NY-ESO-1. Se observó una expansión de 3,5 veces el porcentaje de LT CD8+ T-NYESO1+ en comparación con la línea no estimulada (**figura 16B**).

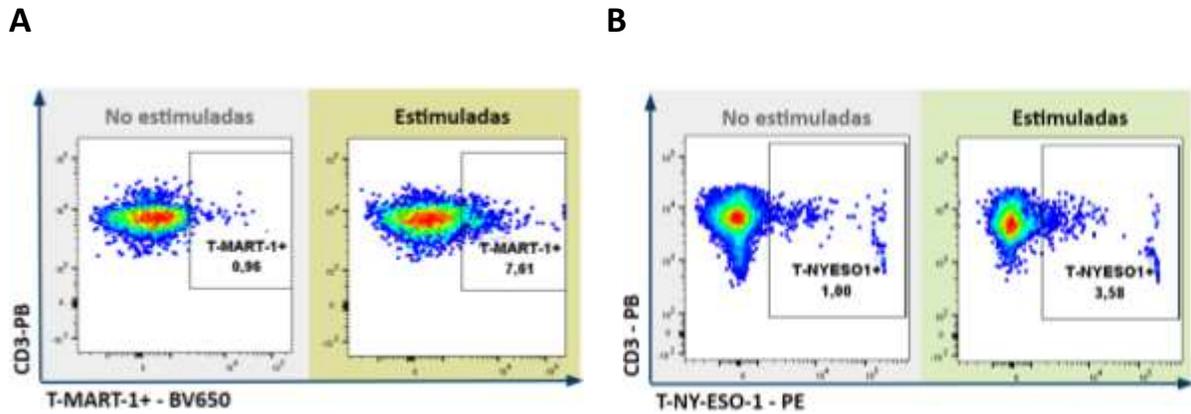


Figura 16. Expansión de LT CD8+ T-MART-1+ y T-NYESO1+ en donantes HLA-A*02:01. **A.** Diagramas de puntos del análisis de la expansión de LT CD8+ T-MART-1+ del donante LAND33 en línea de 9 días no estimulada (izquierda, en gris) y estimulada con el péptido ELAGIGILTV (derecha, en ocre). **B.** Diagramas de puntos del análisis de la expansión de LT CD8+ T-NYESO1+ del donante MER en línea de 9 días no estimulada (izquierda, en gris) y estimulada con el péptido SLLMWITQC (derecha, en verde).

En consecuencia, el sistema de cultivo implementado puede ser utilizado para la identificación de donantes portadores de LT CD8+ específicos de antígenos tanto virales como tumorales, y permite la obtención de números de células suficientes para los experimentos posteriores.

13.2 Maduración de MoDCs de donantes sanos estimuladas con coctel LPS

Se analizó la expresión de los marcadores de maduración CD80, CD83 y CD54 en MoDCs de seis donantes sanos HLA-A*02:01 del banco del GI&MT, como se estableció en trabajos previos (2). La derivación a MoDCs se hizo empleando el método descrito en la **sección 12.2.4**, y se maduraron utilizando el coctel LPS. Posteriormente, se determinó la expresión diferencial de estos marcadores entre iDCs y mDCs (**figura 17**).

Para todos los donantes se elevaron al menos dos marcadores en las LPS-mDCs, comparadas con las iDCs sin estimulación (**figura 17**). Aunque la magnitud del aumento es heterogénea entre los individuos, en conjunto este incremento es significativo para todos los marcadores (**figuras 17 D-F**). Los resultados obtenidos respaldan la efectividad del coctel LPS en la maduración de MoDCs.

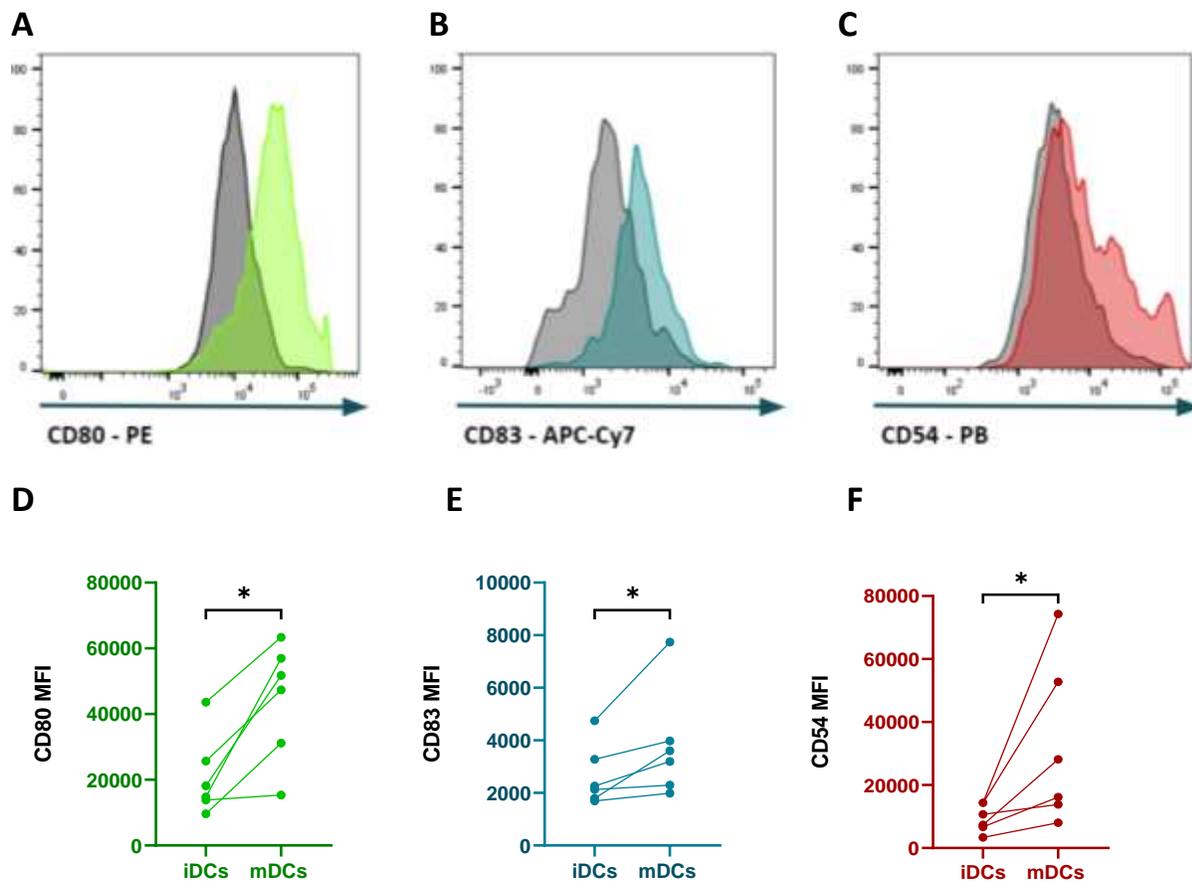


Figura 17. Expresión de marcadores de maduración en LPS-MoDCs de donantes HLA-A*02:01. A, B y C. Histogramas representativos del análisis de CD80, CD83 y CD54 por citometría de flujo en iDCs (histograma gris) y mDCs (histogramas en color para cada marcador). D, E y F. Análisis pareado de las MFI de los marcadores de maduración en iDCs vs mDCs para los donantes LAND28, LAND33, LAND38, LAND42, LAND43 y JCM. El análisis por grupos se llevó a cabo utilizando la prueba de rangos de Wilcoxon para datos pareados. n = 6; p < 0.05.

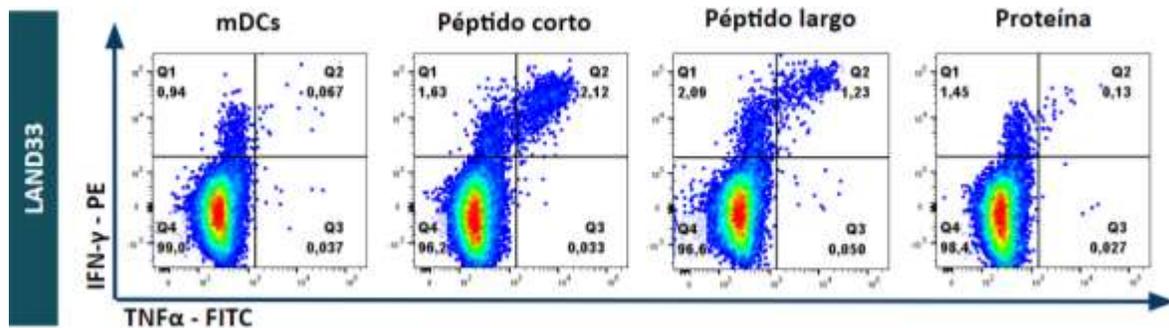
13.3 Péptidos de CMV cargados en MoDCs conduce a la activación y respuesta efectora de LT CD8+ antígeno-específicos en tres donantes

13.3.1 Péptidos de CMV en LPS-mDCs inducen la producción de citoquinas por LT CD8+

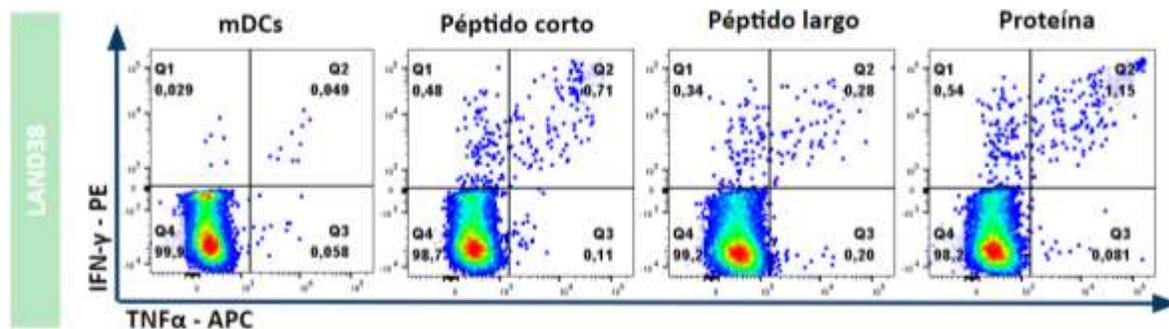
Con base en los porcentajes de LT CD8+T-CMV+, se escogieron cuatro donantes para evaluar la producción de IFN- γ y TNF α mediante el protocolo de ICS (**figura 18**). Se cultivaron células de la línea

de 9 días con MoDCs autólogas estimuladas con los distintos formatos del antígeno de CMV por un periodo de 6 h (como se describió en la sección **12.2.8**). Para tres donantes se observó una respuesta efectora con predominio en la producción de IFN- γ (cuadrantes Q1 y Q2) (**figura 18**). Las poblaciones IFN- γ -TNF α ⁺ representaron el menor porcentaje de LT CD8⁺ para todos los donantes (cuadrantes Q3) y en general, la producción de TNF α dependió casi en su totalidad de las células IFN- γ ⁺ TNF α ⁺.

A



B



C

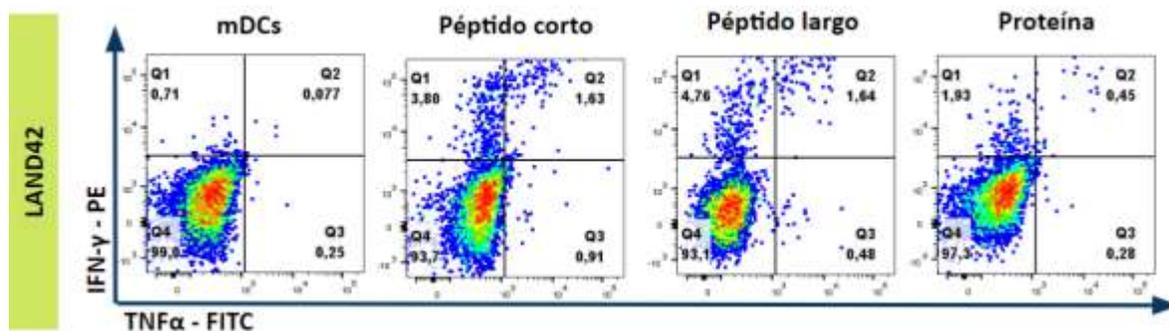


Figura 18. Evaluación de LT CD8+ productores de citoquinas (protocolo ICS) en donantes individuales. Análisis de las poblaciones de LT CD8+ productores de citoquinas, derivados de la línea de 9 días de los donantes LAND33 (A), LAND38 (B) y LAND42 (C) y cultivados con MoDCs estimuladas con diferentes formulaciones del antígeno de CMV. Los cuadrantes están distribuidos así: Q1 IFN- γ +TNF α -; Q2 IFN- γ +TNF α +; Q3 IFN- γ -TNF α +; Q4 no productoras de citoquinas.

LAND33 tuvo la mayor población de LT CD8+ IFN- γ +TNF α + con el péptido corto, seguida del péptido largo (figura 18A), mientras que para LAND42 esta población tuvo porcentajes similares con ambos péptidos (figura 18C). Sin embargo, su población predominante fueron las células IFN- γ +TNF α -, con un ligero incremento en el caso del péptido largo (Q1 4,76% péptido largo vs Q1 3,8% péptido corto). LAND38 tuvo un predominio de la población doble positiva con la proteína, aunque en general la magnitud de la respuesta efectora en este donante fue escasa (porcentajes <1%) (figura 18B).

El donante LAND13 no se incluyó en este análisis debido a un defecto en el anticuerpo dirigido a TNF α (figura suplementaria 1). No obstante, exhibió un aumento del IFN- γ con péptido corto (3,15%) vs el control de mDCs (0,15%). El péptido largo y la proteína mostraron una menor expansión (1,62 y 1,57%, respectivamente).

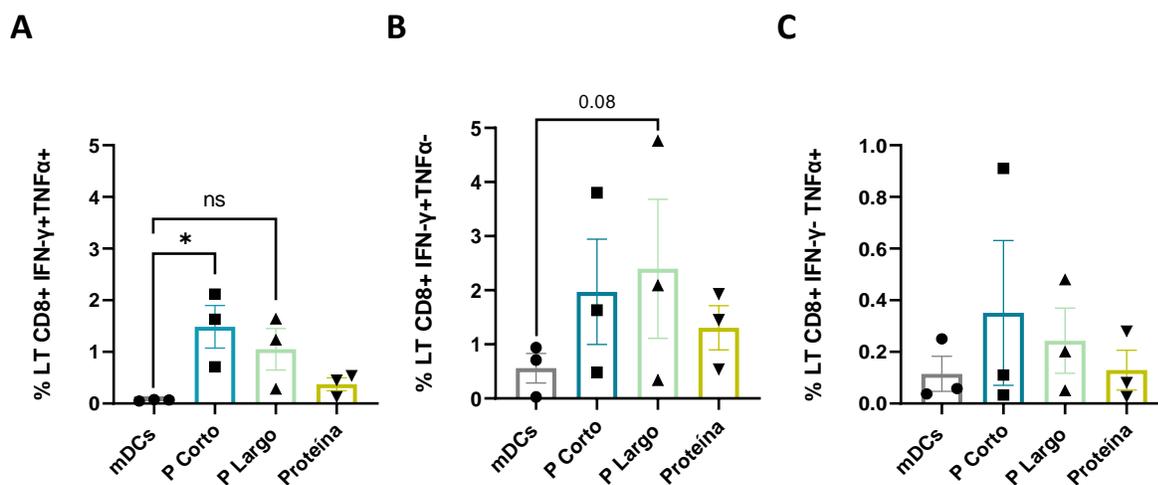


Figura 19. ICS en poblaciones de LT CD8+ de 3 donantes. Los diagramas de dispersión con barras representan los porcentajes de LT CD8+ IFN- γ +TNF α + (A), IFN- γ +TNF α - (B) y IFN- γ -TNF α + (C) según el formato de antígeno utilizado. mDCs corresponde al control de células no estimuladas con ninguno de los formatos. El análisis estadístico por grupos se llevó a cabo utilizando la prueba no paramétrica de Friedman de datos pareados, n=4, (p <0.05). Las barras representan réplicas biológicas independientes + SEM.

Se realizó un análisis conjunto de los donantes LAND33, 38 y 42, mostrado en la **figura 19**. El péptido corto favoreció una expansión significativa de la población de LT CD8+ IFN- γ +TNF α + comparado con los otros formatos (**figura 19A**). El péptido largo mostró una tendencia a promover el aumento en las poblaciones de LT CD8+ IFN- γ +TNF α - (**figura 19B**), cuya estadística posiblemente se vio afectada por el ruido de fondo considerable en el cultivo de mDCs no estimuladas (media de 0,55%). Debido a los bajos porcentajes de poblaciones IFN- γ -TNF α +, no se observaron diferencias significativas entre los formatos (**figura 19C**).

Se seleccionó uno de los donantes evaluados para realizar réplicas experimentales y evaluar la consistencia y reproducibilidad de los datos. Con base en los resultados obtenidos y la disponibilidad de viales de PBMCs y monocitos enriquecidos, se escogió al donante LAND42 (**figura 20**). En total se realizaron 4 réplicas experimentales, que, similar a lo observado en el anterior conjunto de ensayos, revelaron un incremento significativo en las poblaciones de los LT CD8+ IFN- γ +TNF α + e IFN- γ +TNF α - en todos los formatos (**figura 20 A y B**). Dados sus bajos porcentajes, las poblaciones IFN- γ -TNF α + no mostraron diferencias significativas entre los formatos evaluados. Así mismo, la producción de TNF α + estuvo supeditada a las poblaciones doble positivas, como se observó anteriormente (**figuras 18 y 19**).

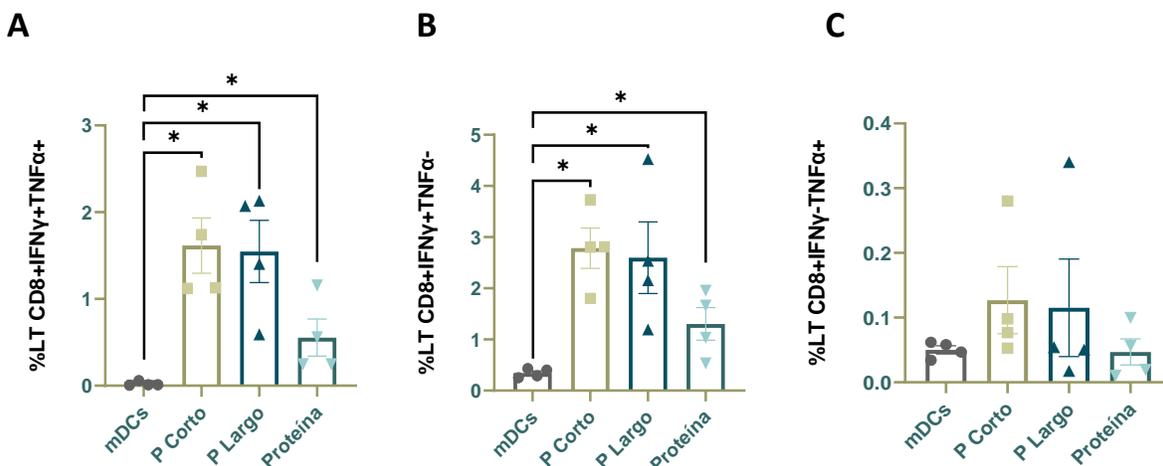


Figura 20. Poblaciones de LT CD8+ productores de citoquinas en células del donante LAND42. Diagramas de dispersión con barras representativas de los porcentajes de LT CD8+ IFN- γ +TNF α + (**A**), IFN- γ +TNF α - (**B**) e IFN- γ -TNF α + (**C**) del donante LAND42, según el formato del antígeno empleado en cada cultivo. El análisis estadístico de los grupos se llevó a cabo utilizando la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis. Adicionalmente, se utilizó la prueba de prueba de Mann-Whitney para comparar mDCs vs proteína. n=4, (p<0.05). Las barras representan réplicas experimentales independientes + SEM.

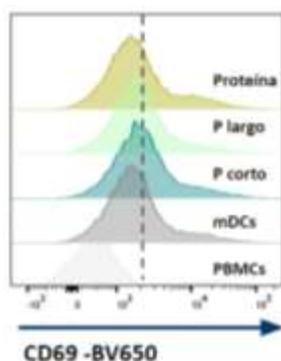
En conjunto, los resultados obtenidos con el donante LAND42 se correlacionan con lo observado en el análisis de las réplicas biológicas, donde los péptidos son el formato que mejor fomenta una respuesta de LT CD8+ evidente, mientras que la respuesta de la proteína recombinante es discreta pero significativa respecto al control.

13.3.2 CD137 se correlaciona positivamente con la producción de citoquinas en LT CD8+

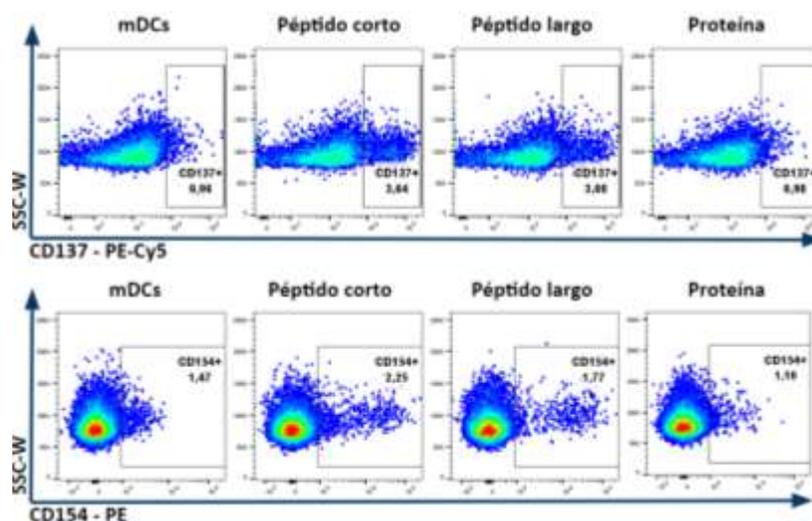
Se tomaron células derivadas de las líneas de 9 días de cuatro donantes: LAND13, LAND38, LAND33 y LAND42, y se evaluó la expresión de marcadores de activación celular luego de 24 horas de cultivo con MoDCs estimuladas con los distintos formatos del antígeno (**figura 21**). Para el marcador CD69, se tuvo en cuenta la MFI de las poblaciones CD3+CD8+ (**figura 21A**); mientras que la expresión de los marcadores CD137 y CD154 se determinó por medio de los porcentajes CD137+ y CD154+ en las poblaciones CD3+CD8+ (**figura 21B**).

El análisis mostró una MFI incrementada para el marcador CD69 en todos los cultivos que emplearon MoDCs como presentadoras (incluyendo las mDCs sin estímulo antigénico), con respecto a los cultivos que utilizaron PBMCs pulsadas (**figuras 21 A y C**). Este resultado se acentuó en el análisis sobre la proteína recombinante, que mostró una tendencia estadística. Sin embargo, el ruido de fondo incrementado en las mDCs sin estímulo antigénico dificultó la observación de alguna influencia del formato del antígeno sobre la expresión de este marcador (**figura 21C**).

A



B



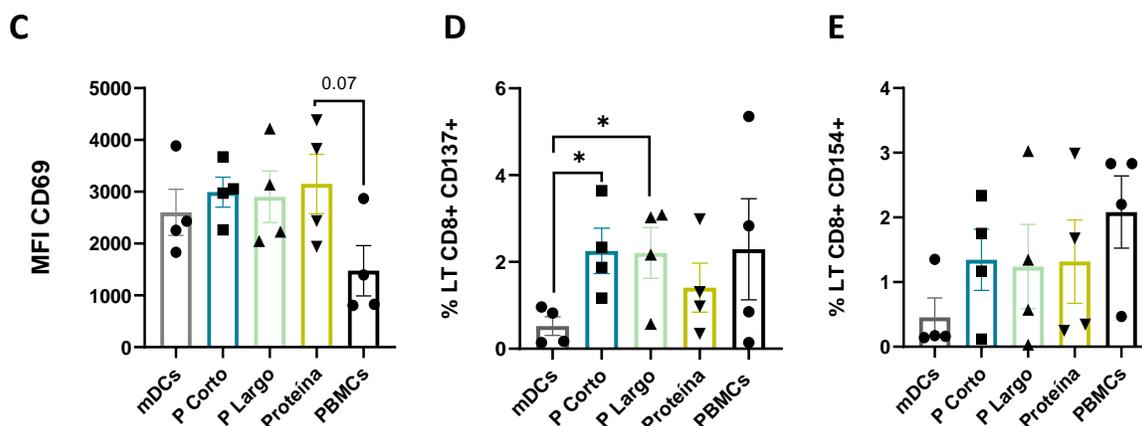
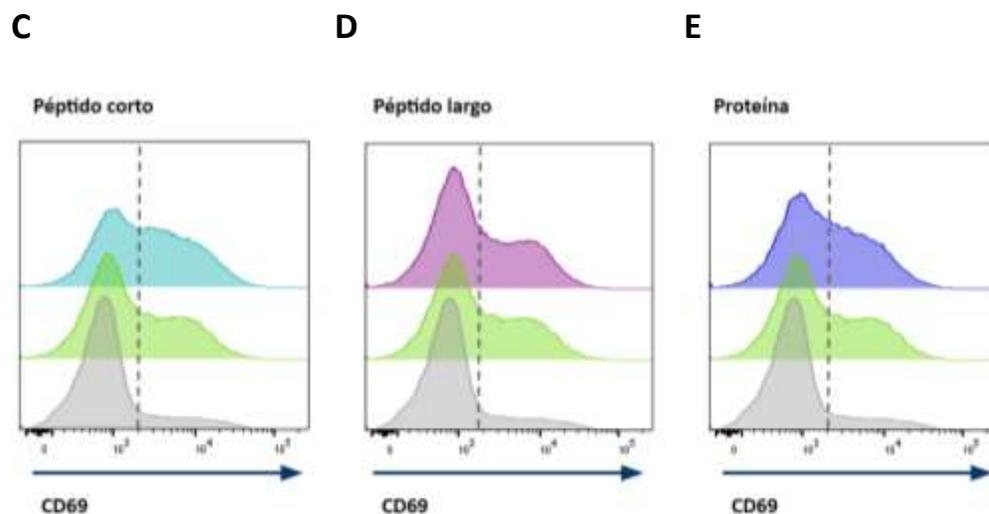
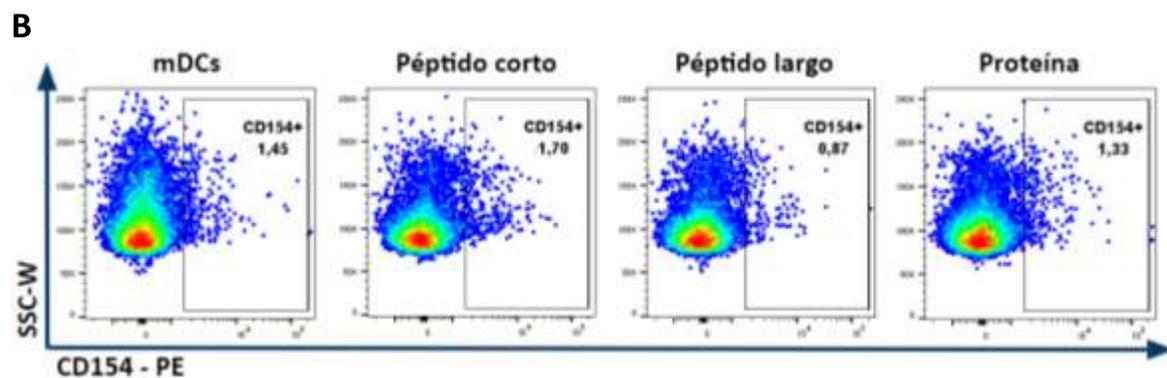
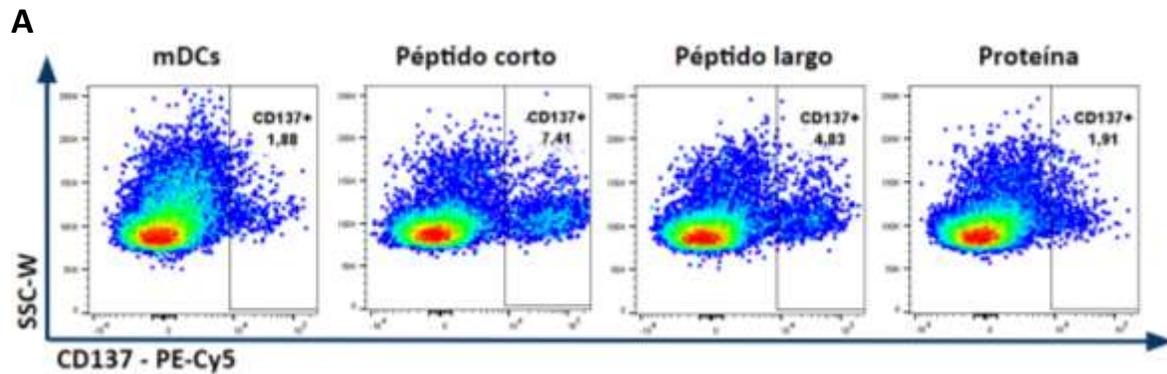


Figura 21. Evaluación de marcadores de activación en LT CD8+ en los donantes LAND13, LAND33, LAND38 y LAND42. **A.** Histograma representativo de la expresión del marcador CD69 en LT CD8+ del donante LAND33. **B.** Diagramas de puntos representativos del análisis de LT CD8+ CD137+ y CD154+ del donante LAND33. **C, D y E.** Diagramas de dispersión con barras representativos de la MFI de CD69 (**C**), porcentaje de LT CD8+ CD137+ (**D**) y CD154+ (**E**). El análisis estadístico se llevó a cabo utilizando la prueba no paramétrica de Friedman de datos pareados. Adicionalmente, se utilizó la prueba de prueba de Mann-Whitney para comparar mDCs vs péptido corto, $n=4$, ($p<0.05$). Las barras representan réplicas biológicas independientes + SEM.

CD137 se aumentó de forma significativa en los cultivos estimulados con péptidos (**figura 21D**), hecho que puede correlacionarse con la respuesta efectora observada en la ICS. No obstante, los cultivos que utilizaron PBMCs pulsadas mostraron una amplia heterogeneidad en la expresión de CD137 entre los donantes. En el mismo sentido, el marcador CD154 también presentó un comportamiento heterogéneo entre los donantes evaluados, y no se observaron diferencias entre los cultivos estimulados con los distintos formatos del antígeno empleados (**figura 21E**).

Como se describió previamente, también se realizó una evaluación de los marcadores de activación en cuatro réplicas independientes del donante LAND42 (**figura 22**). Se observó que CD69 presentó un comportamiento similar a lo observado en el análisis de las réplicas biológicas, con aumento significativo de la MFI en los cultivos que emplearon MoDCs como presentadoras, respecto a los que usaron PBMCs pulsadas (**figura 22C - F**). Nuevamente, el formato del antígeno no ejerció ninguna influencia en la expresión de este marcador.

En contraste con los resultados obtenidos en el análisis previo, el marcador CD137 no exhibió diferencias significativas entre los formatos ni respecto a los controles, por lo que no se correlaciona con lo observado en la ICS (**figura 22G**). Por el contrario, CD154 sí tuvo una expresión significativamente aumentada en los cultivos estimulados con péptido corto (tanto PBMCs como mDCs), respecto al estímulo del péptido largo (**figura 22H**). Estos resultados refuerzan la noción de que la expresión de estos marcadores es ‘donante-dependiente’.



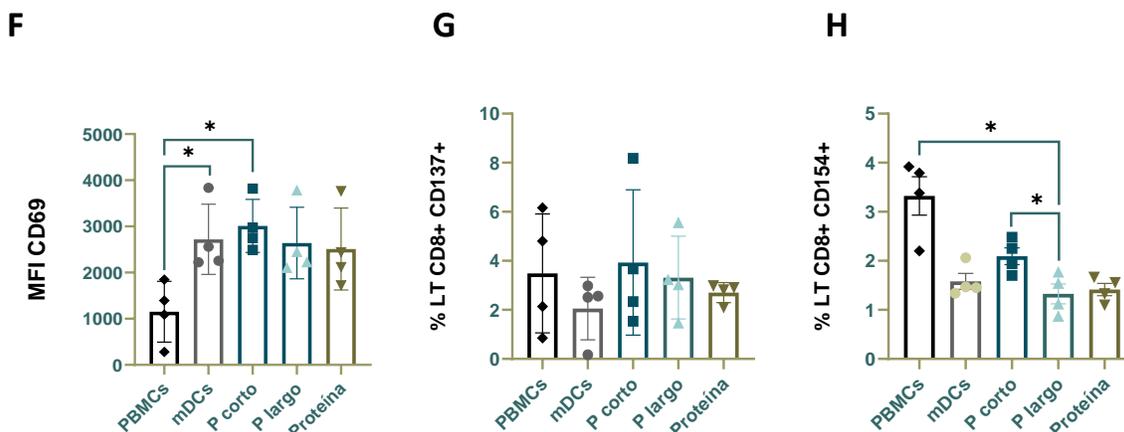


Figura 22. Evaluación de marcadores de activación en LT CD8+ en el donante LAND42. Diagramas de puntos representativos del análisis de LT CD8+ CD137+ (A) y CD154+ (B) del donante LAND33. C, D Y E. Histogramas comparativos de PBMCs pulsadas (histograma gris) y LPS-mDCs (histograma verde) contra péptido corto (histograma azul claro) (C), péptido largo (histograma violeta) (D) y proteína (histograma azul oscuro) (E). F, G y H. Diagramas de dispersión con barras representativas de la MFI de CD69 (F), porcentaje de LT CD8+ CD137+ (G) y CD154+ (H). El análisis estadístico se llevó a cabo utilizando la prueba no paramétrica de Friedman de datos pareados, n=4, (p<0.05). Las barras representan réplicas experimentales independientes + SEM.

La evaluación de marcadores de agotamiento se llevó a cabo de forma preliminar en el donante LAND33, en quien se midió la expresión de PD-1 y CTLA-4. Estos datos se encuentran representados en la **figura suplementaria 2**. Se evidenció un ligero aumento del marcador CTLA-4 en los cultivos estimulados con péptido corto (PBMCs (1,94%) y LPS-mDCs (2,29%)) y péptido largo (1,72%) (**figura suplementaria 2A**). Por su parte, PD-1 se incrementó en todos los cultivos estimulados LPS-mDCs, independientemente de la estimulación antigénica (**figura suplementaria 2B**). En términos generales, los niveles de expresión de estos marcadores fueron bajos.

13.3.3 Estimulación con distintos formatos del antígeno no evidencia la diferenciación de subpoblaciones de memoria de LT CD8+

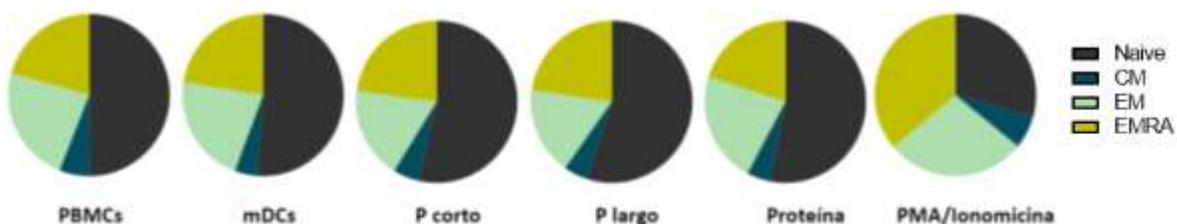
La evaluación de las subpoblaciones de memoria se realizó en los donantes LAND13, LAND33 y LAND42, empleando los marcadores CD62L-AF700 y CD45RA-APC en el caso de LAND13 y LAND 42 y

CCR7-APC-Cy7 y CD45RO-FITC en el caso de LAND33. Las subpoblaciones de memoria se clasifican, según la expresión de estos marcadores, de la siguiente manera:

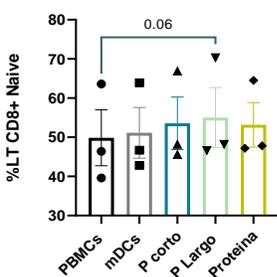
- 1) LT vírgenes (*Naive*) (T_N): CD62L+/CCR7+, CD45RA+/CD45RO-
- 2) LT de memoria central (*Central Memory*) (T_{CM}): CD62L+/CCR7+, CD45RA-/CD45RO+
- 3) LT de memoria efectora (*Effector Memory*) (T_{EM}): CD62L-/CCR7-, CD45RA-/CD45RO+
- 4) LT efectores terminales (*Terminal Effector CD45RA+*) (T_{EMRA}): CD62L-/CCR7-, CD45RA+/CD45RO-

La distribución de las subpoblaciones de memoria tuvo un comportamiento similar para los tres donantes evaluados y en términos generales no hubo un cambio en los porcentajes de las subpoblaciones para los distintos cultivos (**figura 23**). Solo el estímulo policlonal intenso de la PMA/ionomicina logró la diferenciación de las poblaciones en todos los donantes (**figura 23A**). El análisis estadístico no mostró diferencias entre los distintos formatos del antígeno empleados y su influencia sobre la distribución de las subpoblaciones de LT CD8+ (**figuras 23B-E**). Solo las PBMCs pulsadas mostraron una tendencia a diferenciar LT CD8+ T_N (**figura 23B**) y aumentar T_{EM} (**figura 23D**). Con base en estos resultados, ninguno de los formatos del antígeno utilizados favoreció la diferenciación de subpoblaciones de memoria de LT CD8+ de forma evidente.

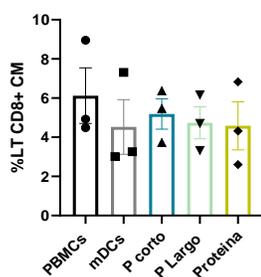
A



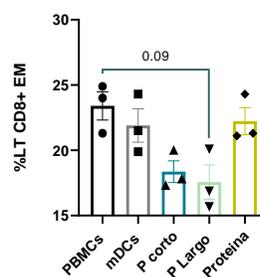
B



C



D



E

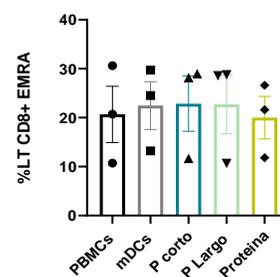
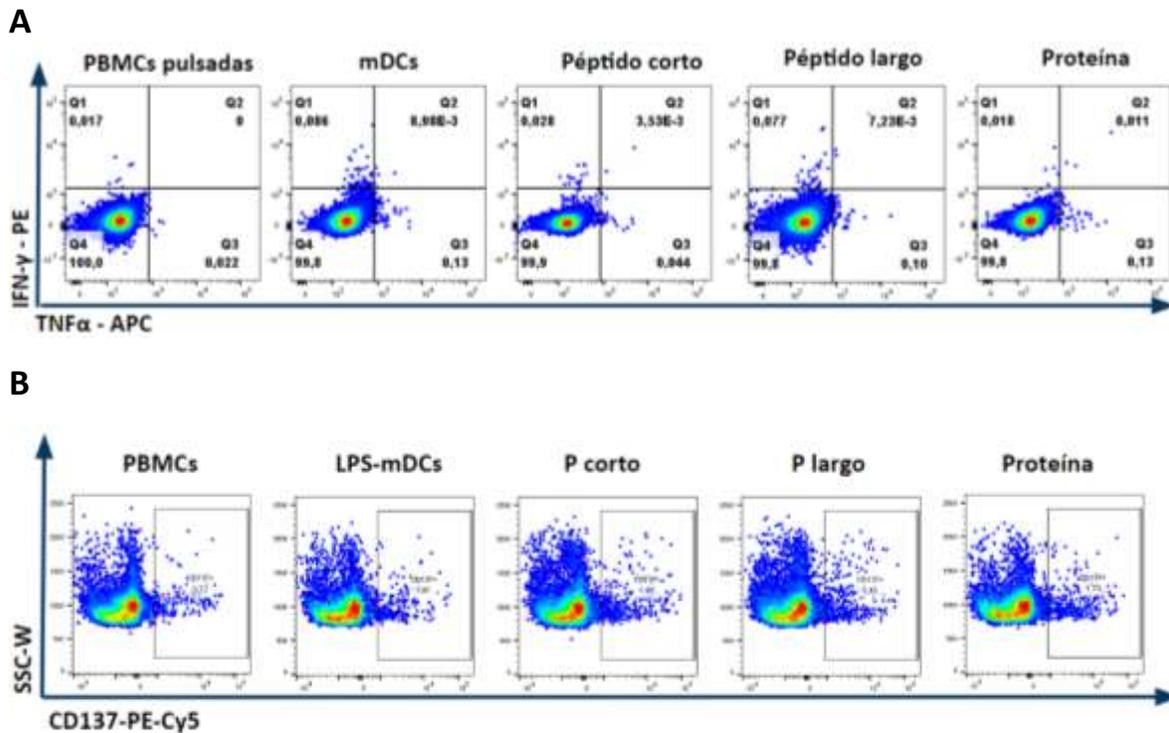


Figura 23. Subpoblaciones de memoria de LT CD8+ de los donantes LAND13, LAND33 y LAND42. A. Representación gráfica de la distribución de las poblaciones de memoria de LT CD8+ en los cultivos estimulados con los distintos formatos del antígeno. Las subpoblaciones de LT T_N , T_{CM} , T_{EM} y T_{EMRA} en cada gráfico corresponden al promedio de los porcentajes de estas poblaciones obtenidas de los 3 donantes evaluados. **B, C, D y E.** Diagramas de dispersión con barras representativos de la media de los porcentajes de LT CD8+ naive, CM, EM y EMRA, respectivamente para cada tipo de estímulo. El análisis estadístico se llevó a cabo utilizando la prueba no paramétrica de Friedman de datos pareados, $n=3$, ($p<0.05$). Las barras representan réplicas biológicas independientes + SEM.

13.3.4 Poblaciones CD3+CD8- incrementan marcadores de activación sin producción de citoquinas

Se examinaron las poblaciones CD3+CD8- dentro de las cuales consideramos los LT CD4+ colaboradores (*helper*), con el fin determinar el efecto de la estimulación con el péptido largo o proteína recombinante (**figura 24**).



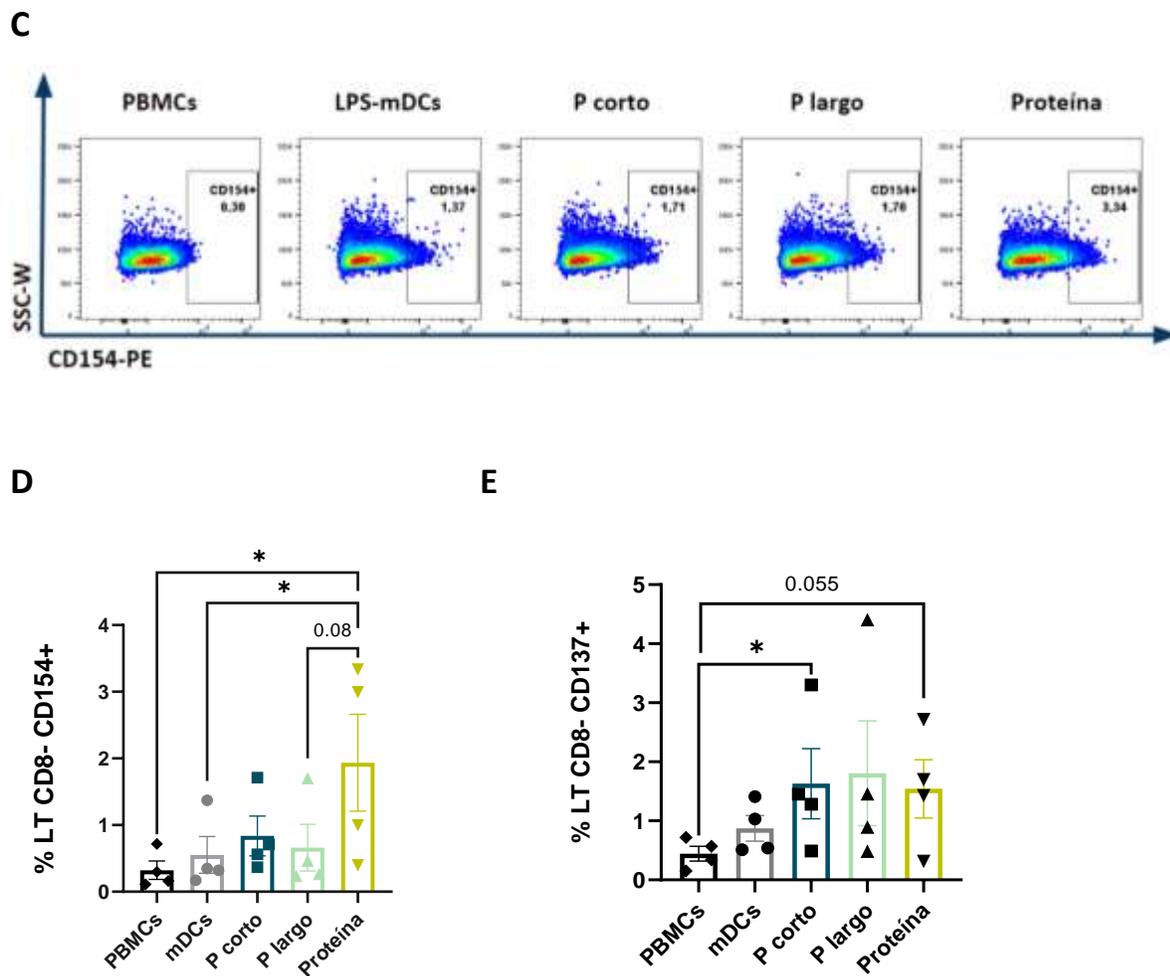


Figura 24. Evaluación de producción de citoquinas y expresión de marcadores de activación en poblaciones CD3+CD8- de los donantes LAND13, LAND33, LAND38 y LAND42. A, B y C. Diagramas de puntos representativos del análisis de LT CD8- productores de IFN- γ y TNF α del donante LAND33 (**A**), expresión de CD137 de donante LAND13 (**B**) y expresión de CD154 del donante LAND33 (**C**). **D y E** corresponden a diagramas de dispersión con barras representativas de la media de los porcentajes de LT CD8- CD154+ y CD137+ respectivamente. El análisis estadístico se llevó a cabo utilizando la prueba no paramétrica de Friedman de datos pareados, $n=3$, ($p<0.05$). Las barras representan réplicas biológicas independientes + SEM.

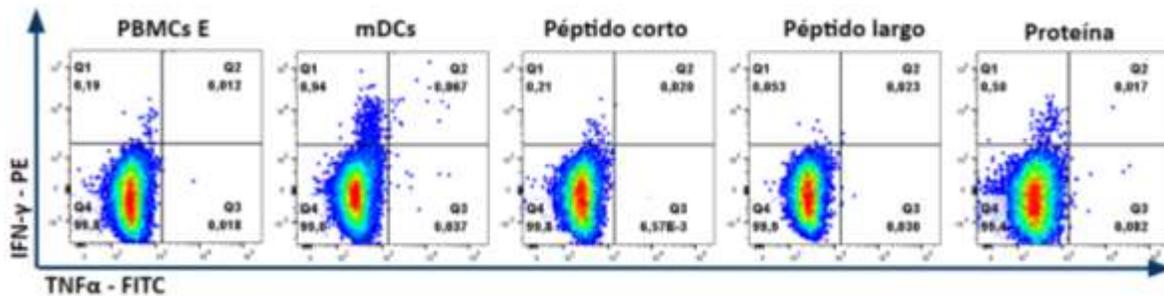
En el análisis del protocolo ICS no se observó producción de citoquinas para ninguna de las condiciones de cultivo en los cuatro donantes evaluados (LAND13, LAND33, LAND38 y LAND42). En la **figura 24A** se observan diagramas de puntos representativos del donante LAND33, los porcentajes de LT CD8+ productores de citoquinas no superan el 0.15% de las células. Respecto a los marcadores de activación, tampoco se observaron diferencias para el marcador CD69 (datos no mostrados). Sin embargo, CD154

sí presentó un incremento significativo en estas poblaciones CD3+CD8- con la proteína recombinante (**figura 24D**), respecto a los otros formatos del antígeno. De forma llamativa, el marcador CD137 también presentó una elevación significativa con el péptido corto y una tendencia al aumento con la proteína recombinante (**figura 24E**).

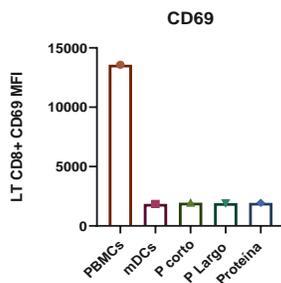
13.4 Pobre respuesta efectora de LT CD8+ específicos para antígenos tumorales del donante LAND33

Las células LAND33, en las que previamente se evidenció la expansión de LT CD8+ T-MART-1+ (**figura 16**), fueron evaluadas para la producción de citoquinas y marcadores de activación, agotamiento y memoria luego del cultivo con MoDCs estimuladas con diferentes formatos del antígeno de MART-1 (**figura 25**).

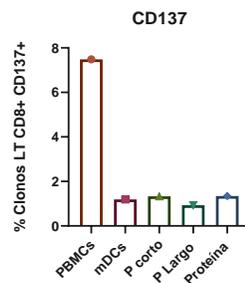
A



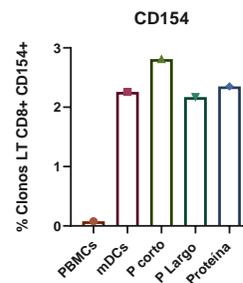
B



C



D



E

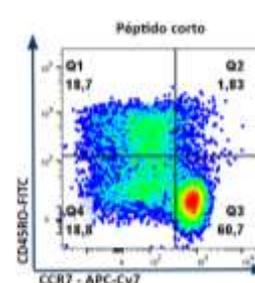


Figura 25. Producción de citoquinas y expresión de marcadores de activación, agotamiento y memoria en LT CD8+ del donante LAND33 estimulados con la epítoto inmunogénica de MART-1. A. Diagramas de puntos correspondientes al análisis de LT CD8+ productores de IFN- γ y TNF α del donante LAND33, estimulados con la epítoto inmunogénica de MART-1. Los diagramas de barras son representativos de la MFI de CD69 en LT CD8+ (A), porcentaje de LT CD8+ CD137+ (B) y LT CD8+ CD154+ (C), respectivamente. E. Diagrama de puntos representativo de las subpoblaciones de memoria distribuidas así: Q1 T_{EM}, Q2 T_{CM}, Q3 T_N y Q4 T_{EMRA}

Luego de 6 horas de cocultivo, no se evidenció una producción significativa de IFN- γ y TNF α para ninguno de los cultivos establecidos (**figura 25A**). Los marcadores de activación CD69 y CD137 solo mostraron incremento en el cultivo estimulado con PBMCs como presentadoras, no siendo así para el resto de los cultivos que utilizaron mDCs (**figura 25B y C**). CD154 presentó un comportamiento contrario, con disminución en su expresión en el cultivo de PBMCs pulsadas. Sin embargo, no se observaron diferencias entre los formatos del antígeno para ninguno de los marcadores (**figuras 25B – C**). Por último, la distribución de la memoria fue similar a la descrita en la **figura 23 (figura 25E)**.

13.5 Clones de LT CD8+ antígeno-específicos responden a MoDCs alogénicas estimuladas con la epítoto blanco

13.5.1 Clones de LT CD8+ específicos para CMV generan potente respuesta a la estimulación con péptidos presentados en MoDCs alogénicas

Además de LT CD8+ de donantes sanos derivados de línea de 9 días, para este proyecto se utilizaron clones de LT CD8+ antígeno-específicos restringidos al haplotipo HLA-A*02:01, donados por el Dr. Pedro Romero y obtenidos mediante el protocolo de cultivo de dilución límite (153). En la primera versión del experimento, se utilizaron clones específicos para la epítoto inmunogénica de CMV+, y en ellos se llevó a cabo una evaluación de la especificidad mediante tetrámero (**figura 26**) y de la producción de citoquinas por ICS (**figura 27**) en dos experimentos independientes. Por otro lado, en uno de ellos se evaluaron marcadores de activación y agotamiento (**figura 28 y 29**).

Para el marcaje con tetrámero CMV+, se utilizaron células no estimuladas (NE) del donante LAND33 como control negativo. Los resultados del análisis se muestran en la **figura 26A**, donde se observa un

porcentaje cercano al 80% de clones LT CD8+ T-CMV+ (VS 0,89% del donante LAND33). Adicionalmente estos clones fueron evaluados para marcadores de memoria, encontrando que más de un 98% corresponden a LT CD8+ T_{EM} (CD45RO+ CD62L-)(**figura 26B**).

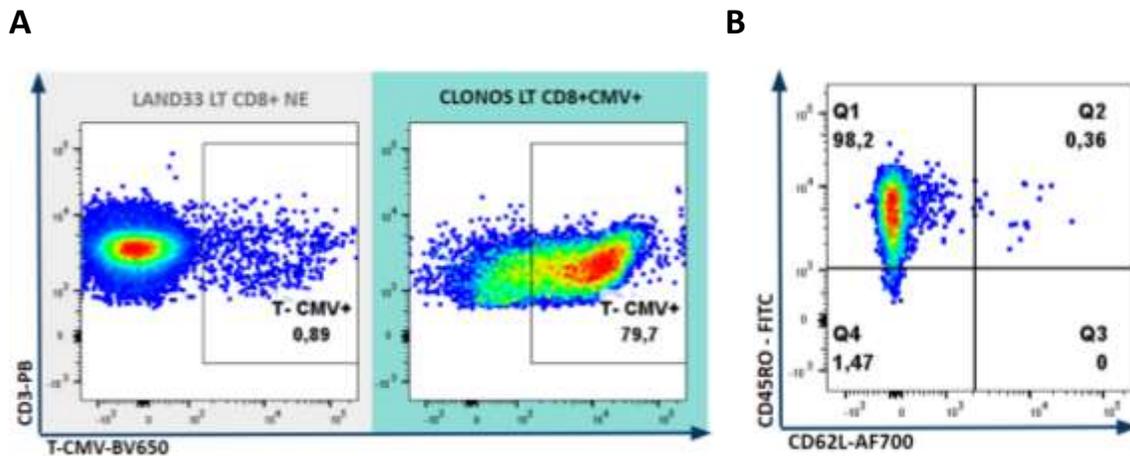
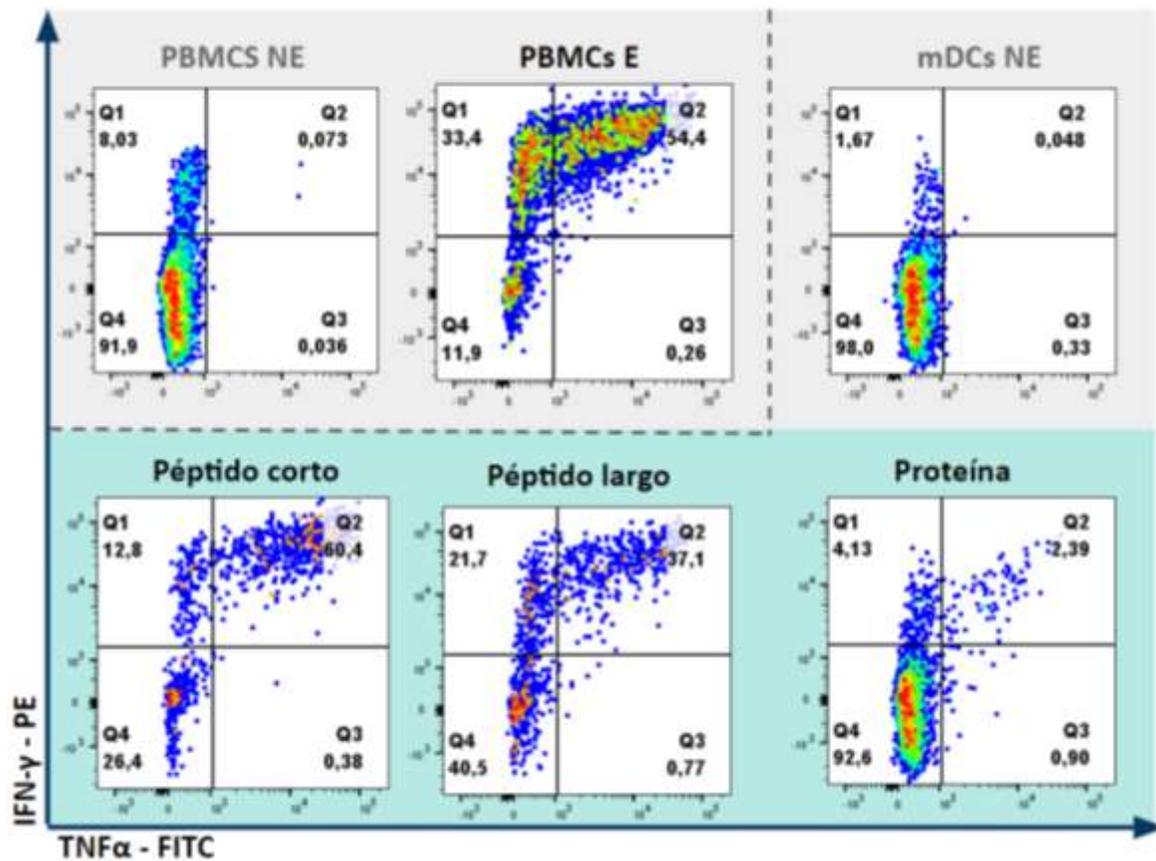


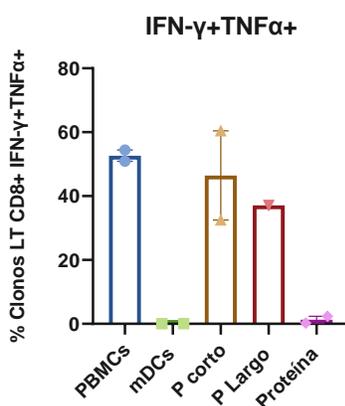
Figura 26. Evaluación por tetrámero de clones CD8+ CMV+ HLA-A*0201. A. Diagramas de puntos representativos del análisis de células T-CMV+ del donante LAND 33 (izquierda) y clones específicos para la epítotope NLVPMVATV (derecha). Imagen representativa de dos experimentos independientes. B. Diagrama de puntos representativos del análisis de marcadores de memoria en clones CD3+CD8+ específicos para la epítotope de CMV+ y estimulados con péptido largo de CMV, distribuidas así: Q1 T_{EM}, Q2 T_{CM}, Q3 T_N y Q4 T_{EMRA}.

En relación con la producción de citoquinas, los clones respondieron intensamente a la estimulación con péptido corto, tanto en el cultivo que empleó PBMCs como en el que empleó LPS-mDCs como presentadoras (**figura 27A**). En ambas condiciones se observó un predominio de la población de clones IFN- γ +TNF α +, con porcentajes que oscilaron entre el 35 y el 60% (**figura 27B**). También se evidenció una expansión considerable de clones IFN- γ +TNF α - que tuvieron una media de 17,9% para las LPS-mDCs y 29,85% para las PBMCs (**figura 27C**). Por otro lado, el péptido largo mostró una respuesta similar a la observada con el péptido corto en uno de los dos ensayos realizados (**figura 27A**). Desafortunadamente, en la réplica del experimento con el péptido largo no se recogió un número suficiente de células que permitiera evaluar adecuadamente la producción de citoquinas. Por último, aunque la proteína no favoreció el desarrollo de una respuesta efectora de la misma magnitud, sí se evidenció una población de clones IFN- γ +TNF α +, que en uno de los experimentos alcanzó el 2,39% (vs el 0.048% que mostraron las LPS-mDCs sin estímulo antigénico) (**figura 27A**).

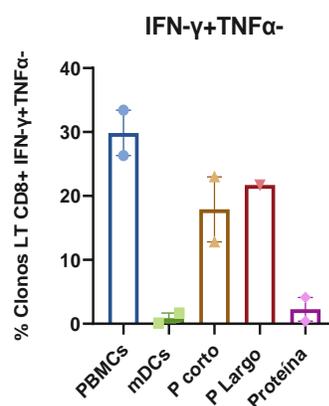
A



B



C



D

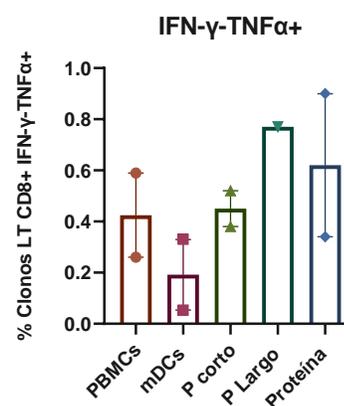


Figura 27. ICS en clones CD8+ CMV-específicos. A. Diagramas de puntos representativos de uno de los análisis realizados en clones CD8+, luego de su estimulación con distintos formatos del antígeno de CMV. B. Diagramas de dispersión con barras que representan los porcentajes de clones productores de citoquinas. Las barras representan dos experimentos independientes, excepto para el péptido largo.

Así mismo, también se observó un incremento en la población de clones IFN- γ +TNF α - que pasó del 1,57% en las LPS-mDCs a un 4,13% luego de la estimulación con proteína (**figura 27A**). El aumento de estos porcentajes en los cultivos estimulados con proteína recombinante sugiere, dada la naturaleza de estos clones, que podría estarse presentando el fenómeno de presentación cruzada del antígeno. En ninguno de los experimentos se observaron poblaciones significativas de clones IFN- γ -TNF α +, ya que estas representaban < 1% de la respuesta efectora (**figura 27D**).

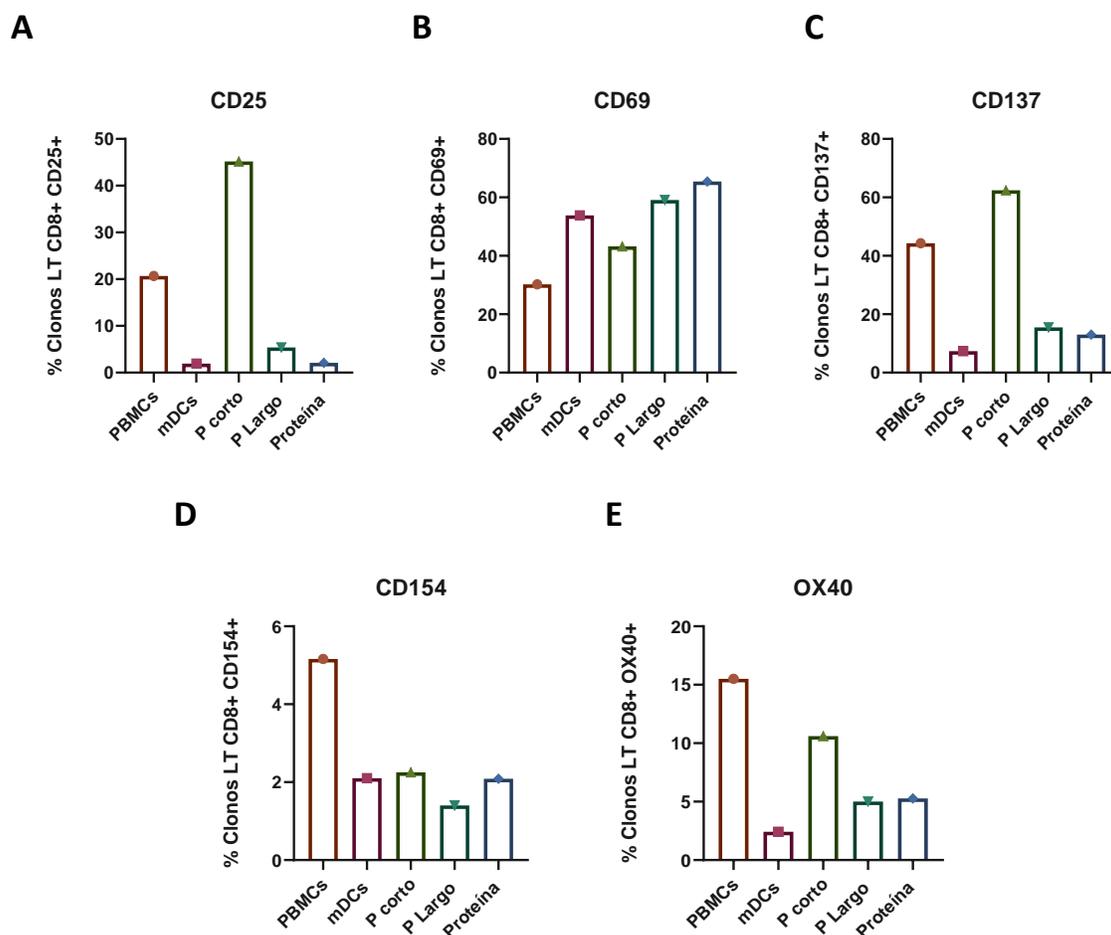


Figura 27. Marcadores de activación en clones CD8+ CMV-específicos. Diagramas de barras representan la expresión de marcadores de activación **A.** CD25, **B.** CD69, **C.** CD137, **D.** CD154 y **E.** OX40, en clones CD8+ CMV-específicos luego de la estimulación con los distintos formatos del antígeno.

El análisis de marcadores de activación mostró que CD25 y CD137 exhibieron el mayor incremento con el estímulo del péptido corto, especialmente con las LPS-mDCs como presentadoras (**figuras 28A y C**). OX40 presentó su mayor incremento con PBMCs, seguido de las LPS-mDCs (**figura 28E**), mientras que

CD154 solo se incrementó con las PBMCs (**figura 28D**). En general, no se observaron aumentos significativos con los otros formatos del antígeno para ninguno de estos marcadores. Por su parte, CD69 mostró la misma tendencia al incremento en los cultivos estimulados con mDCs como se observó previamente (**figura 28B**).

Los marcadores de agotamiento CTLA-4 y LAG-3 tuvieron una respuesta predominante luego de la estimulación con péptido corto, que no se observó en los demás formatos del antígeno y tampoco en el cultivo que utilizó PBMCs (**figura 29A y C**). Esto es llamativo por cuanto, el resultado no parece estar asociado únicamente al formato del antígeno (péptido corto), sino que pareciera estar favorecido por la presentación del antígeno en el contexto de las LPS-mDCs. En el caso de LAG-3, también se observa una ligera elevación con el péptido largo, por sobre el resto de los formatos (**figura 29C**).

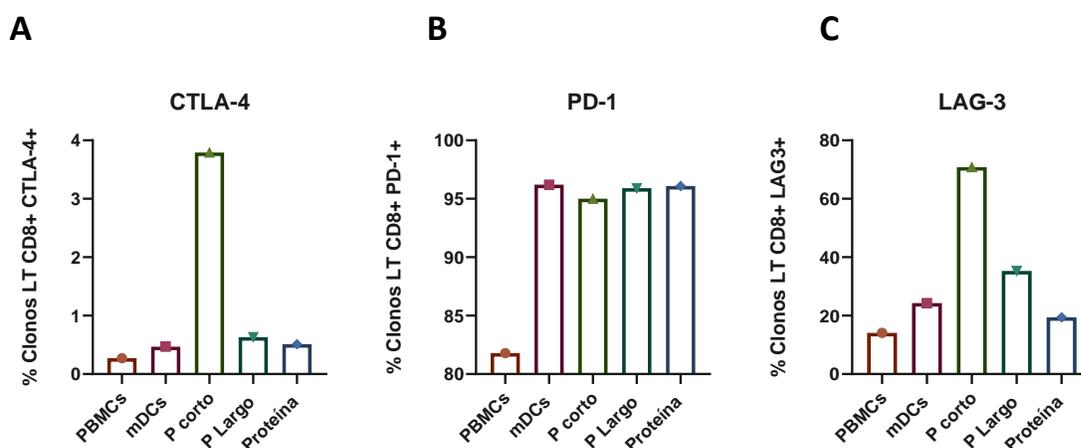


Figura 29. Evaluación de marcadores de agotamiento en clones de LT CD8+ CMV+ estimulados con diferentes formatos del antígeno. Diagramas de barras representan la expresión de marcadores de activación **A.** CD25, **B.** CD69, **C.** CD137, **D.** CD154, **E.** OX40, en clones de LT CD8+ CMV+ luego de la estimulación con los distintos formatos del antígeno.

Por otro lado, el cultivo con las LPS-mDCs sin estímulo antigénico eleva la expresión de LAG-3 en mayor proporción que las PBMCs pulsadas, lo que indica que este marcador se ve favorecido por mDCs. Del mismo modo, el marcador PD-1 presentó un incremento homogéneo en los cultivos estimulados con LPS-mDCs, tal y como se observó para CD69 (**figura 28B** y análisis previos), elevación que no se vio cuando se utilizaron PBMCs pulsadas como presentadoras (**figura 29B**). Estos resultados reflejan la asociación entre los marcadores de activación y los llamados marcadores de agotamiento celular.

13.5.2 Clones de LT CD8+ MART-1-específicos responden a la presentación de péptidos y no de proteína

Una vez realizados los ensayos con clones T-CMV+, se repitió este procedimiento sobre clones CD8+ específicos para las epítopes inmunogénicas de MART-1 (**figura 30**) y NY-ESO-1 (**figura 31**).

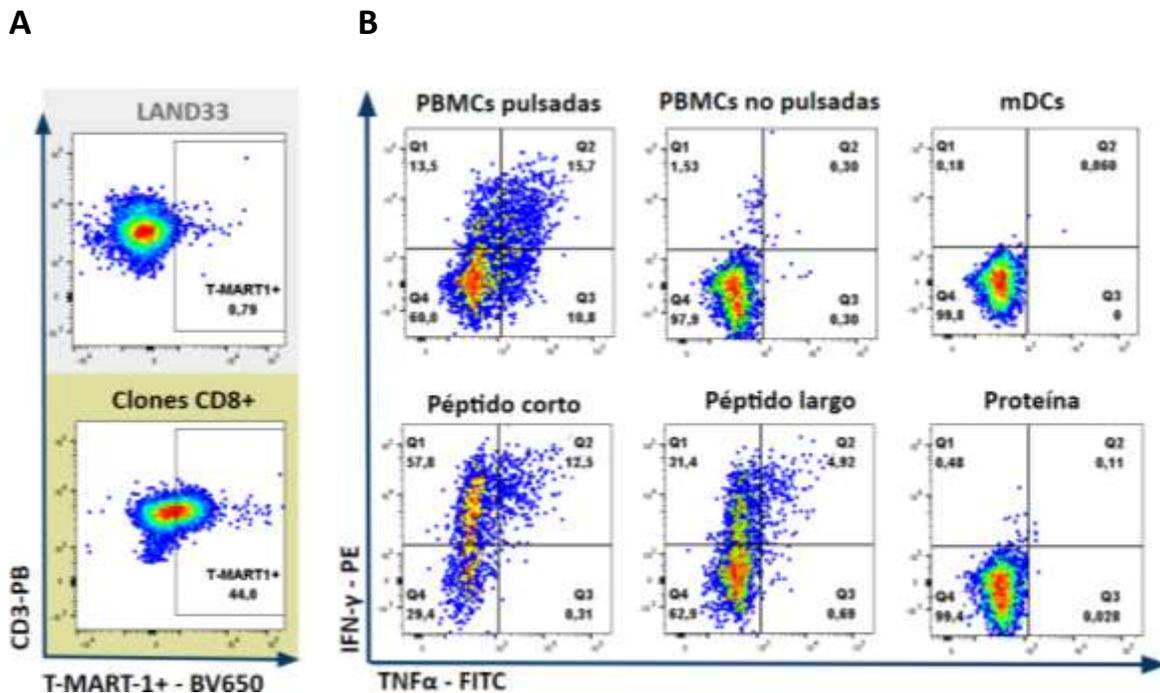


Figura 30. Tetrámero de clones CD8+ MART-1-específicos y evaluación de la producción de citoquinas luego de la estimulación con diferentes formatos del antígeno. **A.** Diagramas de puntos representativos del análisis de células T-MART-1+ del donante LAND33 (arriba) y clones específicos para la epítope ELAGIGILTV (abajo). **B.** Diagramas de puntos representativos del análisis de los clones CD8+ MART-1-específicos productores de IFN-γ y TNFα luego de la estimulación con distintos formatos de su epítopo blanco.

Para ambos clones se realizó una evaluación por tetrámero para confirmar la especificidad del clon (**figuras 30A y 31A**). Para el clon MART-1-específico se observó un porcentaje del 44% de células tetrámero-positivas (**figura 30A**), un porcentaje menor al observado en los clones CMV-específicos (79.7%) (**figura 26**). Es importante resaltar que este resultado obedece a que estos clones podrían tener algún tipo de contaminación con otras poblaciones celulares empleadas para su expansión (ej. *feeder cells* (154), APCs).

El análisis por ICS mostró una respuesta intensa en la producción de IFN- γ y TNF α luego de la estimulación con péptido corto, principalmente con las LPS-mDCs (**figura 30B**). En este cultivo se observó un porcentaje del 57,8% de células IFN- γ +TNF α - (VS 13,5% en el caso de las PBMCs), y un 12,5% de células IFN- γ +TNF α + (**figura 30B**). Con el péptido corto también se observó un porcentaje considerable de células productoras de IFN- γ (31,4%) y células doble positivas (4,92%). Por lo contrario, con la proteína recombinante de MART-1 no se vio ningún tipo de respuesta efectora por parte de los clones. Estos resultados confirman la especificidad de la respuesta por los clones evaluados, aunque también evidencia la dificultad del procesamiento de la proteína recombinante para su presentación en clase I.

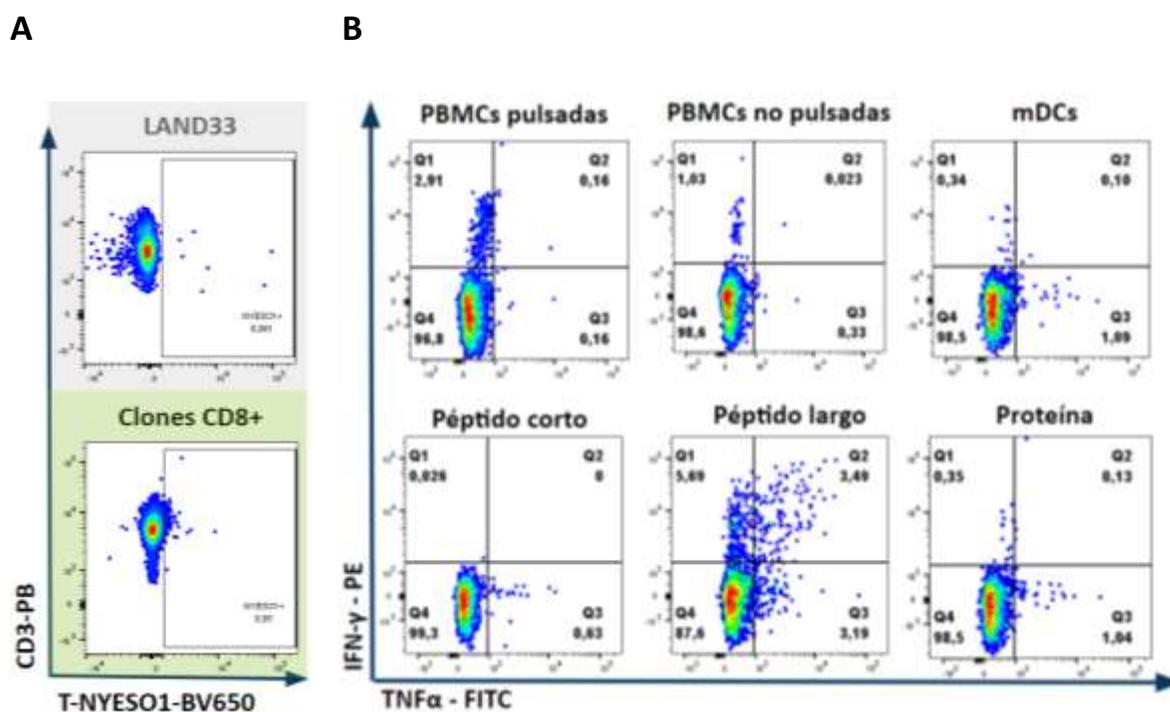


Figura 31. Tetrámero de clones CD8+ NY-ESO-1-específicos y evaluación de la producción de citoquinas luego de la estimulación con diferentes formatos del antígeno. A. Diagramas de puntos representativos del análisis de células T-NY-ESO-1 del donante LAND33 (arriba) y clones específicos para la epítote SLLMWITQC (abajo). **B.** Diagramas de puntos representativos del análisis de los clones CD8+ NY-ESO-1-específicos productores de IFN- γ y TNF α luego de la estimulación con distintos formatos de su epítote blanco.

En contraste, en el análisis de los clones NY-ESO-1-específicos no se observaron células tetrámero-positivas (**figura 31A**), y la evaluación de la producción de citoquinas no evidenció una respuesta efectora en los cultivos estimulados con péptido corto (**figura 31B**). La proteína recombinante

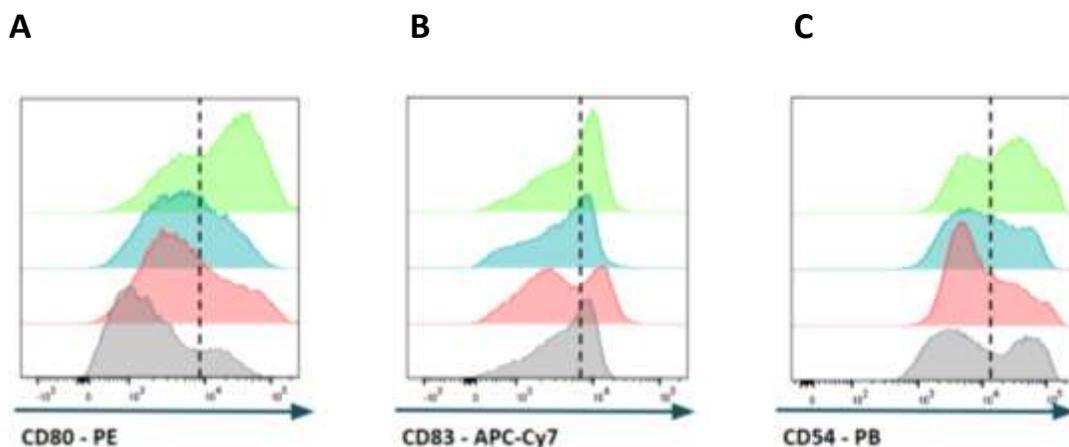
tampoco favoreció una respuesta efectora de los clones. Sin embargo, cabe destacar que el cultivo estimulado con péptido largo exhibió porcentajes considerables de células productoras de citoquinas, con un 3,49% de células doble positivas y un 5,69% de células productoras de IFN- γ (**figura 31B**). En ese sentido, es posible que el clon tuviera una especificidad distinta a la epítotope blanco cargada en el tetramero (péptido corto). Por el contrario, la especificidad del clon podría ser contra una secuencia distinta inmersa en la secuencia del péptido largo que se empleó para cargar las iDCs.

13.6 Cocteles de maduración generan diferencias en las respuestas de LT CD8+ del donante LAND42

Con base en los resultados obtenidos previamente, se escogió al donante LAND42 para determinar el efecto de 3 cocteles de maduración de MoDCs distintos: α 1-polarizadas, Std y LPS, en combinación con los tres formatos del antígeno de la proteína pp65 de CMV. Para ello se realizó el protocolo de ICS, y se evaluó la expresión de marcadores de activación, agotamiento y memoria.

13.6.1 Coctel LPS favorece la mayor expresión de marcadores de maduración en MoDCs

La evaluación de los marcadores de maduración reveló que el coctel LPS favoreció una mayor expresión de CD80, CD83 y CD54 (**figura 32 A-C**). CD83 presentó niveles elevados en iDCs, versus α 1 y Std-mDCs (**figura 32B**). Los marcadores CD80 y CD54 exhibieron un incremento significativo en las LPS-mDCs y aumentos no significativos en los cocteles α 1 y Std (**figuras 32A y C**).



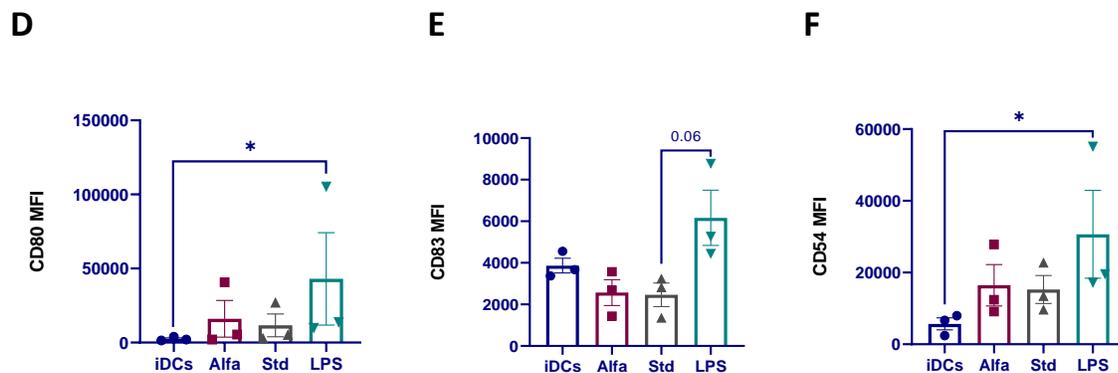


Figura 32. Marcadores de maduración en MoDCs del donante LAND42 estimuladas con diferentes cocteles de maduración. Histogramas representativos de la expresión de **A.** CD80, **B.** CD83 y **C.** CD54, en iDCs (histograma gris), α 1-DCs (histograma rojo), Std-DCs (histograma azul) y LPS-DCs (histograma verde). Diagramas de dispersión con barras representan la expresión de los marcadores **D.** CD80, **E.** CD83 y **F.** CD54 en MoDCs estimuladas con diferentes cocteles de maduración. El análisis estadístico se llevó a cabo utilizando la prueba no paramétrica de Friedman de datos pareados, $n=3$, ($p<0.05$). Las barras representan réplicas experimentales independientes + SEM.

De acuerdo con los resultados obtenidos, CD80 parece ser el mejor indicador de la maduración de las MoDCs, presentando notables incrementos en mDCs respecto a iDCs. CD54 también constituye un indicador adecuado para evaluar la maduración de MoDCs. Sin embargo, los resultados obtenidos con CD83 son indicadores de excepciones a la regla que pueden tener algunos donantes. De los tres cocteles utilizados, el coctel LPS demuestra ser el inductor más eficaz de estos marcadores, favoreciendo los mayores incrementos. En contraste, el coctel Std tuvo los menores incrementos para los tres marcadores y las α 1-mDCs tuvieron un comportamiento intermedio.

13.6.2 Std-mDCs estimuladas con péptidos favorecen la mayor producción de citoquinas por LT CD8+ del donante LAND42

PBMCs de la línea de 9 días del donante LAND42 se cultivaron con α 1-mDCs, Std-mDCs y LPS-mDCs, estimuladas con los distintos formatos del antígeno de CMV. En la **figura 33** se observan diagramas representativos del experimento. Como en análisis previos, los péptidos favorecen los mayores porcentajes de LT CD8+ IFN γ +TNF α + y IFN γ +TNF α -.

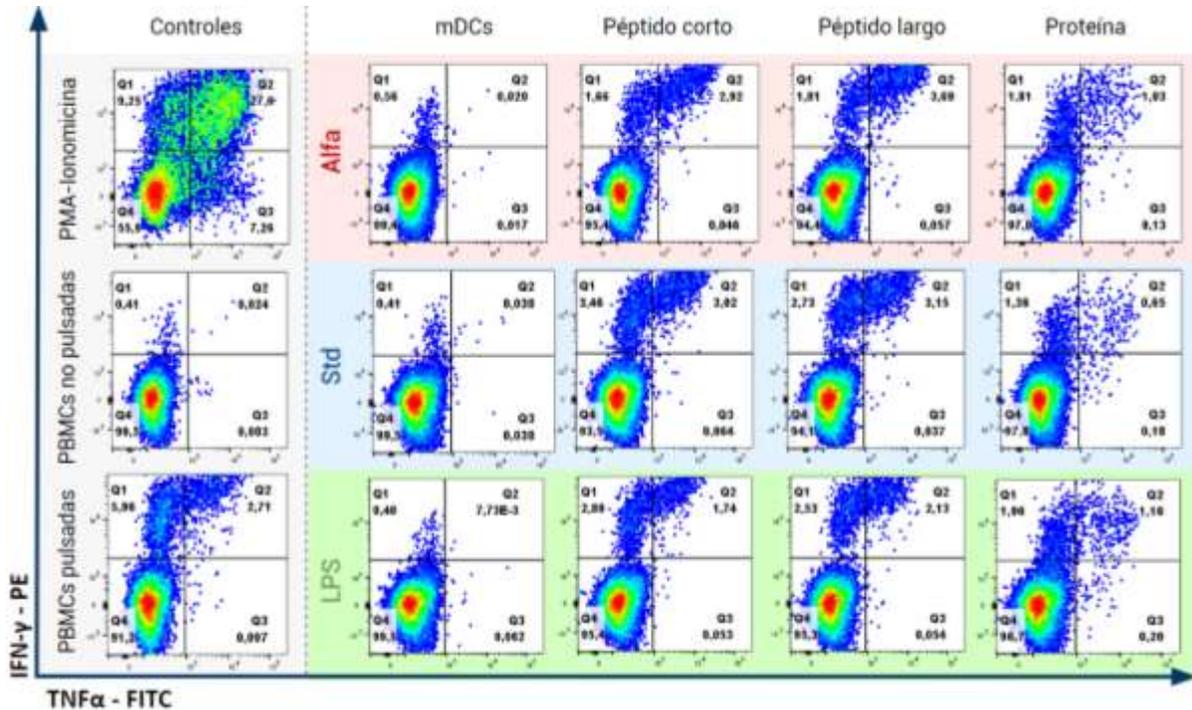


Figura 33. Ensayo de ICS del donante LAND42 cultivadas con MoDCs estimuladas con diferentes formatos del antígeno y maduras bajo distintas condiciones. Diagramas de puntos representativos del análisis de la producción de IFN- γ y TNF α por PBMCs de la línea de 9 días del donante LAND42, cultivados con MoDCs estimuladas con distintos formatos del antígeno de CMV bajo distintas condiciones de maduración.

El análisis estadístico de 3 réplicas del experimento mostró diferencias significativas en la expansión de poblaciones IFN γ +TNF α + e IFN γ +TNF α - en los cultivos estimulados con péptido corto y largo en Std-mDCs, respecto a las mDCs NE y la proteína recombinante (**figuras 34A y B**). Para el coctel LPS también se observó un incremento significativo de estas poblaciones con el péptido corto, y una tendencia al incremento en las poblaciones doble positivas luego del estímulo con el péptido largo. En contraste, las α 1-mDCs exhibieron resultados heterogéneos entre los ensayos independientes, por lo cual no hubo diferencias entre los formatos. Por último, las poblaciones IFN γ -TNF α + tuvieron porcentajes inferiores al 1%, sin diferencias entre los cocteles o los formatos (**figura 34C**).

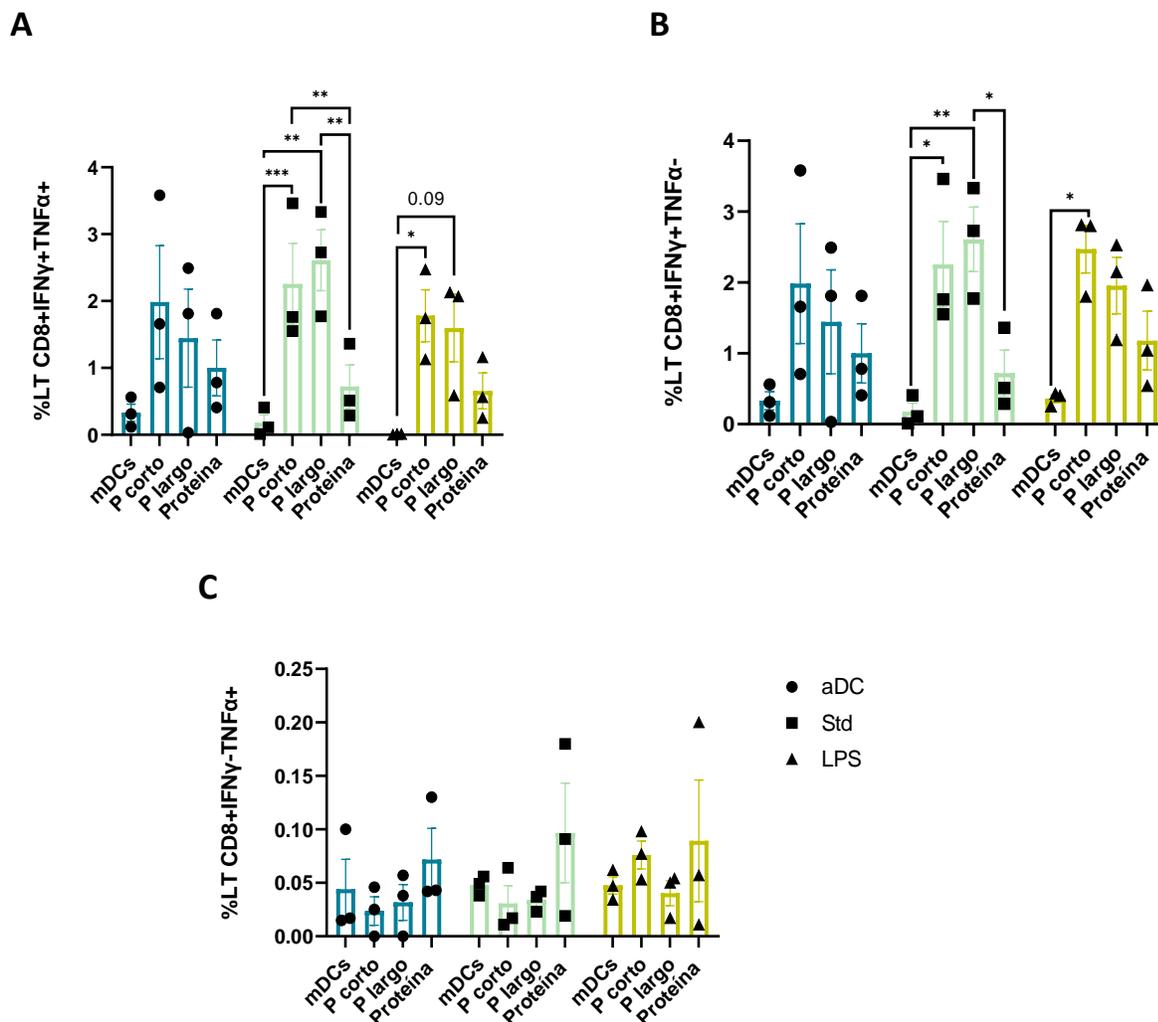


Figura 34. LT CD8+ productores de IFN- γ y TNF α del donante LAND42 cultivadas con MoDCs estimuladas con diferentes formatos del antígeno y maduras bajo distintas condiciones. Diagramas de dispersión con barras representan los porcentajes de LT CD8+ IFN- γ +TNF α + (A), IFN- γ -TNF α - (B) e IFN- γ +TNF α - (C). El análisis estadístico por grupos se llevó a cabo utilizando una prueba ANOVA de dos vías con comparación múltiple no pareada mediante la prueba de Turkey. ($p < 0.05$) $n = 3$. Las barras representan el promedio de las poblaciones de células productoras de citoquinas de 3 réplicas independientes del experimento + SEM.

También se llevó a cabo una comparación entre los cocteles respecto al formato del antígeno utilizado (figura 35). Para el péptido corto se observó una tendencia al incremento de las Std-mDCs VS las LPS-mDCs (figura 35A). Con el péptido largo no hubo diferencias (figuras 35 D – F), y la proteína mostró un aumento significativo en la producción de IFN- γ por LPS-mDCs (figuras 35 G – I). En conjunto, los cocteles de maduración no parecen influir en los LT para la producción de citoquinas en este donante.

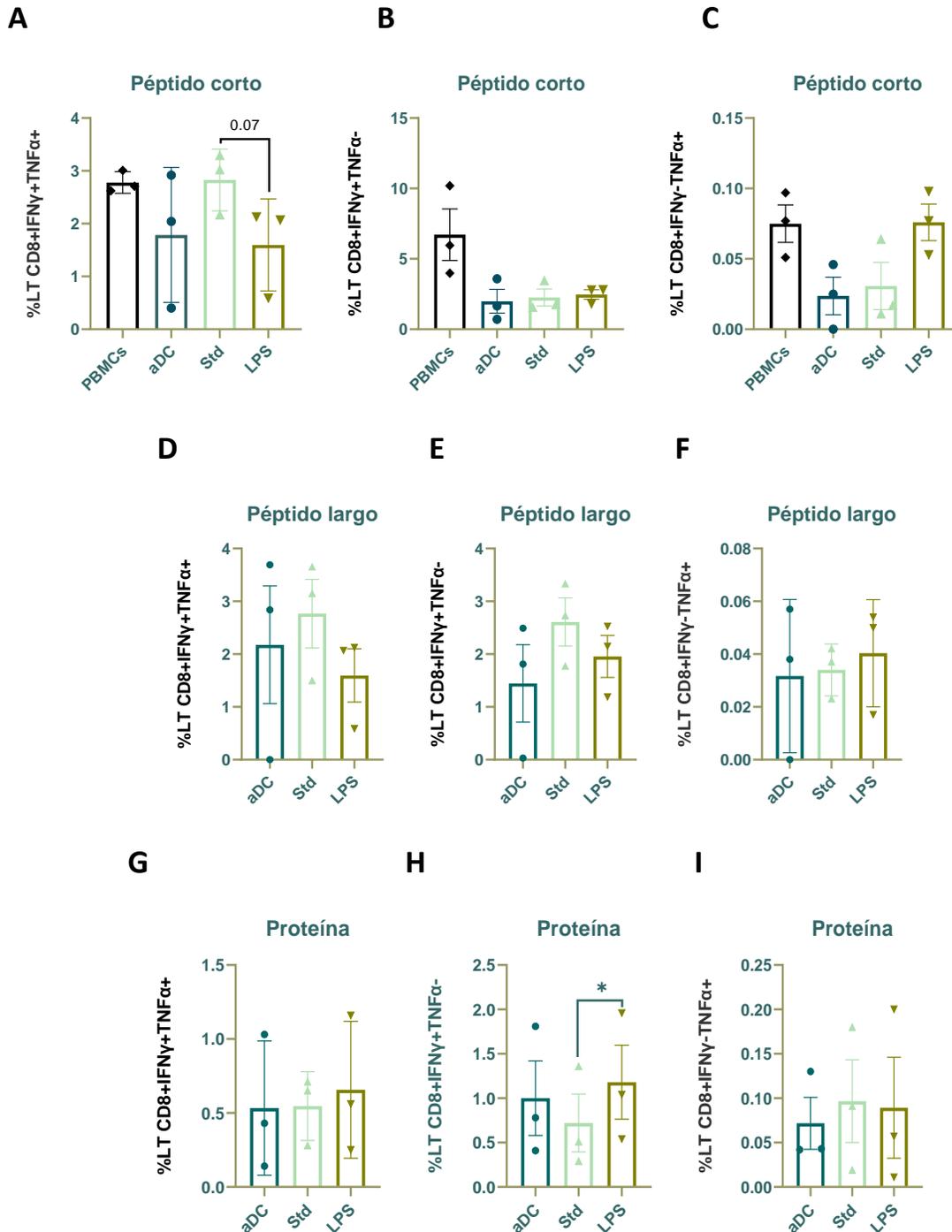
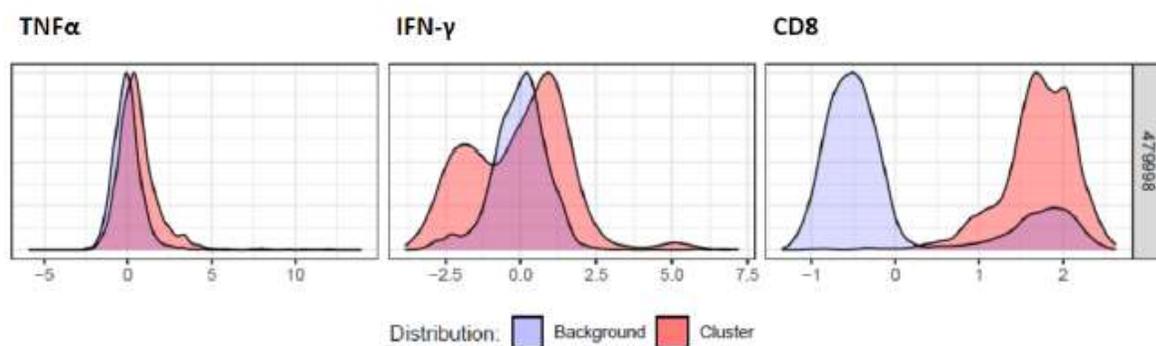


Figura 35. Comparación de cocteles de maduración respecto al formato del antígeno utilizado para la producción de citoquinas. Diagramas de dispersión con barras representan los porcentajes de LT CD8+IFN- γ +TNF α +, IFN- γ -TNF α + e IFN- γ +TNF α -. **A, B y C** representan los cultivos estimulados con el péptido corto; **D, E y F** con el péptido largo; y **G, H y I** con la proteína recombinante. El análisis estadístico para cada grupo se llevó a cabo utilizando la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis, ($p < 0.05$), $n = 3$, las barras representan la media de 3 réplicas independientes del experimento + SEM.

Finalmente, se utilizó el algoritmo CITRUS para identificar clústeres celulares que pudieran revelar diferencias entre los cocteles o los formatos del antígeno utilizado. La comparación entre los cocteles LPS y Std, considerando en conjunto todos los formatos del antígeno utilizados, identificó el clúster 479998, caracterizado por ser CD8+ y expresar IFN- γ y TNF α +. Este clúster se vio incrementado con las Std-mDCs respecto a las LPS-mDCs (**figura 36**), resultados que coinciden con lo observado en el análisis estadístico manual (**figura 34**). La tasa de error del modelo utilizado se muestra en la **figura suplementaria 13**. Los análisis por CITRUS de las demás comparaciones entre cocteles y formatos del antígeno no evidenciaron clústeres diferenciales (datos no mostrados). El resultado obtenido por el análisis por CITRUS fortalece la idea de que el coctel Std podría representar una ventaja para este donante en comparación a los otros dos cocteles utilizados.

A



B

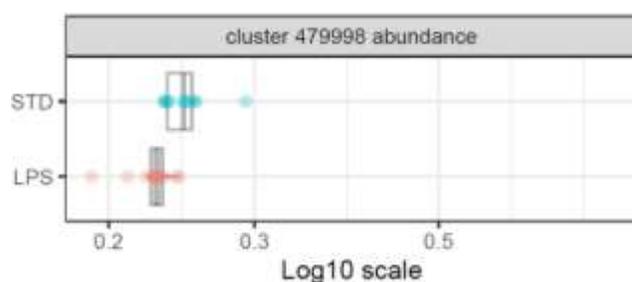


Figura 36. Clúster de células CD8+ IFN- γ + TNF α + en los cultivos Std VS LPS identificado mediante el análisis CITRUS. **A.** Características del clúster identificado (histograma rojo) en la expresión de CD8 y citoquinas respecto a la población general de células CD3+. **B.** Comparación de los cocteles Std y LPS respecto al clúster identificado. Los resultados reflejan el análisis sobre los conjuntos combinados de todos los formatos del antígeno utilizados. Las gráficas corresponden al clúster identificado por el modelo min. La tasa de error de validación cruzada de los modelos utilizados se encuentra en figura suplementaria 13.

13.6.3 Incremento de CD137 se asocia a la estimulación con péptidos cargados en α 1-mDCs y Std-mDCs

La evaluación de los marcadores CD25, CD69, CD137 y CD154 se realizó tanto en la población general de células CD3+CD8+ como en las subpoblaciones de memoria. CD25 no presentó diferencias en ninguno de los análisis realizados sobre la población general, ni sobre las subpoblaciones evaluadas (**figura suplementaria 3**), y se observó mucha heterogeneidad en los resultados obtenidos.

En el caso de CD137, se observa un incremento significativo con el péptido corto en las α 1-mDCs y tendencias al aumento en los cultivos α 1-mDCs + péptido largo, Std-mDCs + péptido corto y Std-mDCs + péptido largo (**figura 37A**). A nivel de subpoblaciones de memoria, hay diferencias significativas en los LT CD8+ T_{EM} cultivados con Std-mDCs + péptido corto y Std-mDCs + péptido largo (**figura 37B**); así como tendencias al incremento en los cultivos α 1-mDCs + péptido corto y LPS-mDCs + péptido largo (**figura 37B**). Por otro lado, la expresión general de CD137 parece depender de la subpoblación de LT CD8+ T_{EM}, en la cual se acentúan algunas de las diferencias observadas en el análisis de la población general, que no se vieron en el análisis de otras subpoblaciones: CM (**figura suplementaria 4**), N y EMRA (datos no mostrados).

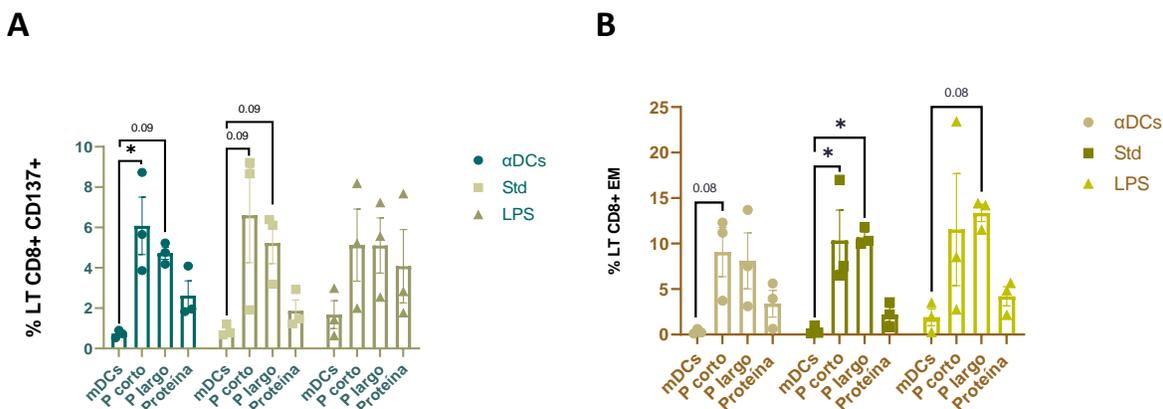


Figura 37. Expresión de CD137 en LT CD8+ de LAND42 cultivadas con MoDCs estimuladas con diferentes formatos del antígeno y maduras bajo distintas condiciones. Diagramas de dispersión con barras representativas de: **A.** Porcentaje de LT CD8+ CD137+, y **B.** Porcentaje de LT CD8+ CD45RO+ CD62L – (EM) CD137+. El análisis estadístico por grupos se llevó a cabo utilizando una prueba ANOVA de dos vías con comparación múltiple no pareada mediante la prueba de Turkey. ($p < 0.05$). $n = 3$, las barras representan el promedio de la expresión de los marcadores evaluados en 3 réplicas independientes del experimento + SEM.

A nivel general, CD154 no muestra diferencias entre las condiciones de cultivo (**figura 38A**). Sin embargo, en la subpoblación de CM se observó una diferencia significativa entre las α 1-mDCs y las LPS-mDCs estimuladas con péptido corto (**figura 38B**), y una tendencia entre las α 1-mDCs y las Std-mDCs. Esto sugiere que la expresión de este marcador podría estar influenciado por el coctel de maduración. No obstante, la mayor expresión de CD154 la presentó el cultivo estimulado con PBMCs pulsadas (**figuras 38C**). Las subpoblaciones de LT CD8+ EM (**figura suplementaria 5**), N y EMRA (datos no mostrados) no evidenciaron diferencias.

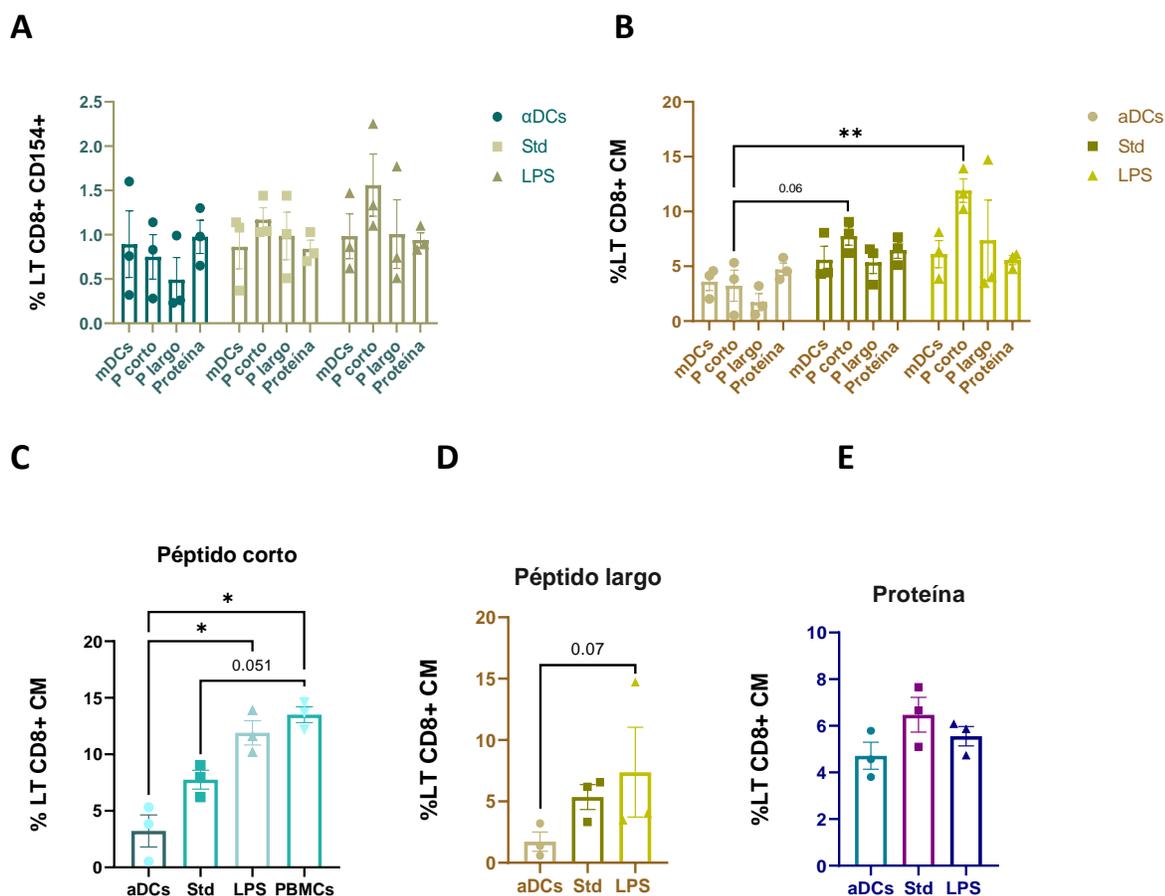


Figura 38. Expresión de CD154 en LT CD8+ de LAND42 cultivadas con MoDCs estimuladas con diferentes formatos del antígeno y maduras bajo distintas condiciones. Diagramas de dispersión con barras representativas de: **A.** Porcentaje de LT CD8+ CD154+ y **B.** Porcentaje de LT CD8+ CD45RO+CD62L+ (CM) CD137+. El análisis estadístico por grupos se llevó a cabo utilizando una prueba ANOVA de dos vías con comparación múltiple no pareada mediante la prueba de Turkey ($p < 0.05$) $n = 3$. Las barras representan el promedio de la expresión de los marcadores evaluados en 3 réplicas independientes del experimento + SEM. **C, D y E.** Diagramas

de dispersión con barras representativas del porcentaje de LT CD8+ CD45RO+ CD62L+ (CM) CD154+ estimuladas con péptido corto, péptido largo y proteína recombinante, respectivamente. El análisis estadístico para cada grupo se llevó a cabo utilizando la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis, ($p < 0.05$), $n=3$, las barras representan la media de 3 réplicas independientes del experimento + SEM.

En la población general, CD69 evidenció algunas diferencias entre los cultivos, relacionadas con observaciones previas de este proyecto. Por un lado, este marcador presentó un incremento en todos los cultivos que empearon mDCs como APCs, especialmente en aquellos estimulados con proteína recombinante (cocteles $\alpha 1$ y Std) y mDCs sin estímulo antigénico (cocteles Std y LPS) (**figura 39A-C**). Por otro lado, la comparación de los cocteles respecto al formato del antígeno utilizado mostró que el coctel $\alpha 1$ incrementa significativamente la expresión de CD69, respecto al coctel LPS y las PBMCs pulsadas (**figura 39F**).

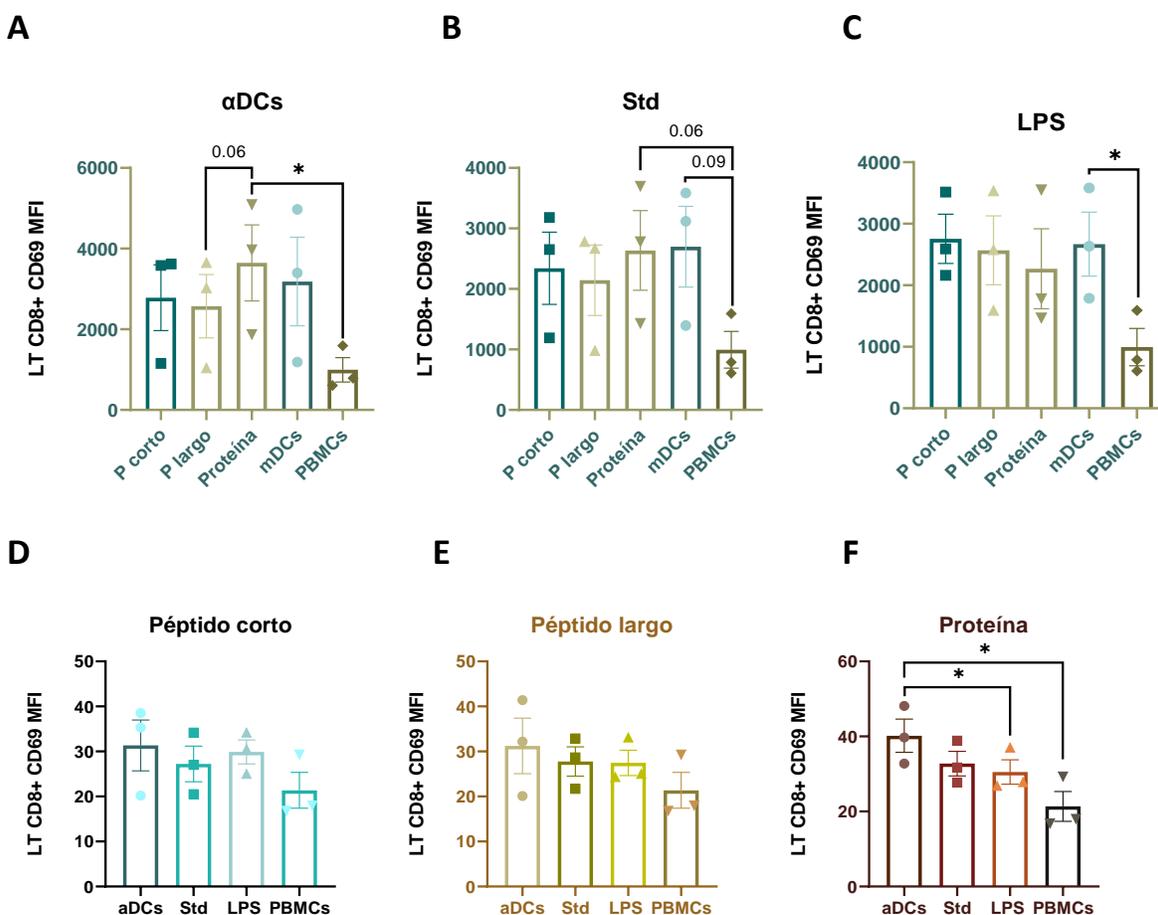


Figura 39. Expresión de CD69 en LT CD8+ del donante LAND42 cultivadas con MoDCs estimuladas con diferentes formatos del antígeno y maduras bajo distintas condiciones. Diagramas de dispersión con barras representativas de la MFI del marcador CD69 en cultivos estimulados con: **A.** coctel α 1, **B.** coctel Std, **C.** coctel LPS, **D.** péptido corto, **E.** péptido largo y **F.** proteína recombinante. El análisis estadístico para cada grupo se llevó a cabo utilizando la prueba no paramétrica de Friedman de datos pareados, $n=3$, ($p<0.05$). Los diagramas de dispersión con barras representan réplicas experimentales independientes + SEM.

El análisis de la subpoblación de CM parece reflejar el resultado obtenido en la población general (**figuras 40 A y B**), aunque en el coctel LPS se vio una tendencia al incremento con el péptido largo (**figura 40C**). También se observó que el coctel LPS podría favorecer la expresión de CD69 en el cultivo estimulado con péptido largo (**figura 40E**), mientras que en el caso de la proteína fue el coctel α 1 que mostró un aumento significativo (**figura 40F**). Resultados similares se observaron en la subpoblación de LT CD8+ CD45RO+ CD62L- (EM) (**figura suplementaria 6**).

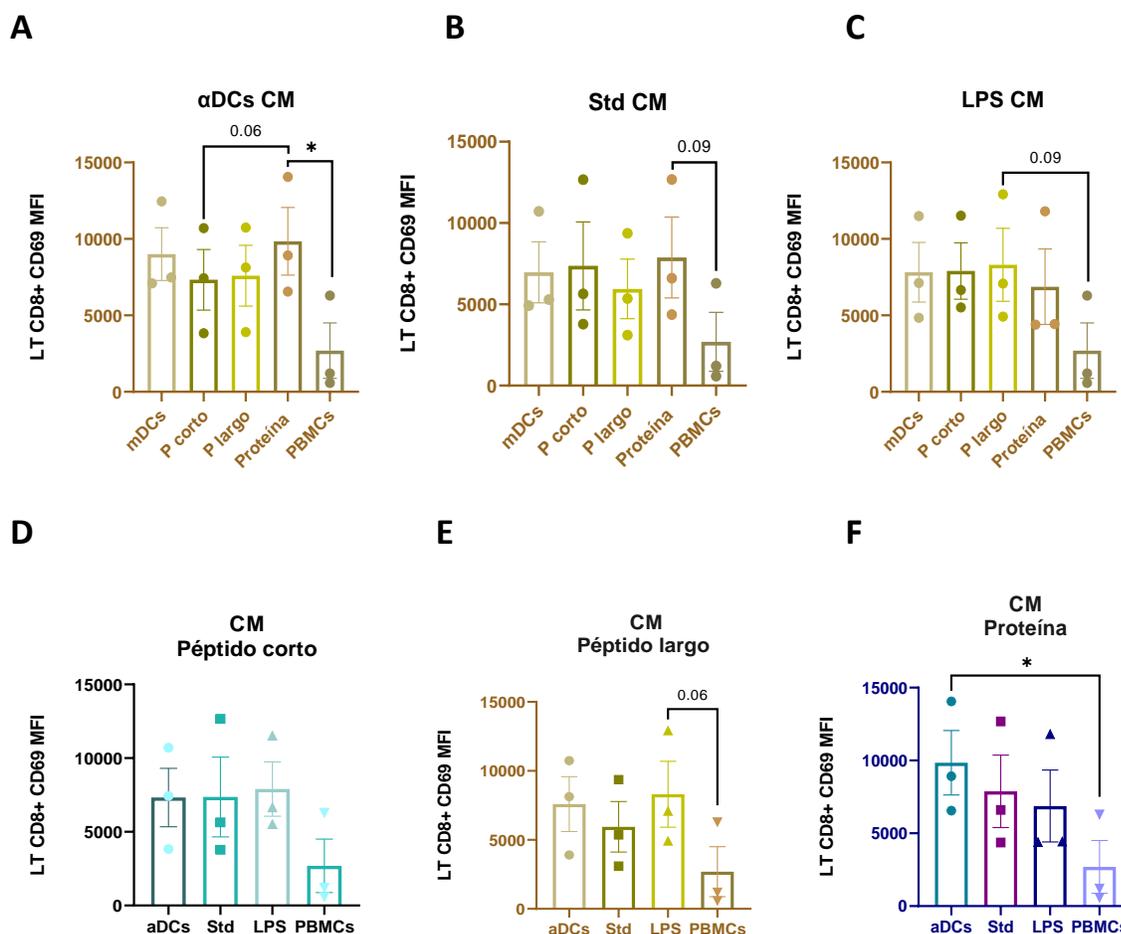


Figura 40. Expresión de CD69 en LT CD8+ CM de LAND42 cultivadas con MoDCs estimuladas con diferentes formatos del antígeno y maduras bajo distintas condiciones. Diagramas de dispersión con barras representativas de la MFI del marcador CD69 en cultivos estimulados con: **A.** coctel α 1, **B.** coctel Std, **C.** coctel LPS, **D.** péptido corto, **E.** péptido largo y **F.** proteína recombinante. El análisis estadístico para cada grupo se llevó a cabo utilizando la prueba no paramétrica de Friedman de datos pareados, $n=3$, ($p<0.05$). Los diagramas de dispersión con barras representan réplicas experimentales independientes + SEM.

13.6.4 Expresión de PD-1 y CTLA-4 se relaciona con el formato del antígeno empleado mientras que expresión de LAG-3 sea asocia al coctel de maduración de MoDCs

En la población de LT CD8+ se analizaron los marcadores de agotamiento PD-1, CTLA-4 y LAG-3 luego de 24 horas de cocultivo con MoDCs estimuladas con los distintos formatos del antígeno. La evaluación se llevó a cabo tanto en la población general de células CD3+CD8+ como en las subpoblaciones de memoria (En LT CD8+ N y EMRA datos no mostrados).

En el caso del marcador PD-1 se observaron tendencias y diferencias significativas entre los formatos para los cocteles Std y LPS. La estimulación con péptidos (incluyendo las PBMCs pulsadas) favoreció un incremento en la expresión de PD-1 respecto al control (**figuras 41B y C**). En contraste, el coctel α 1 no exhibió diferencias entre los formatos del antígeno (**figura 41A**). La comparación de los cocteles con relación al formato no mostró diferencias (**figura suplementaria 7**).

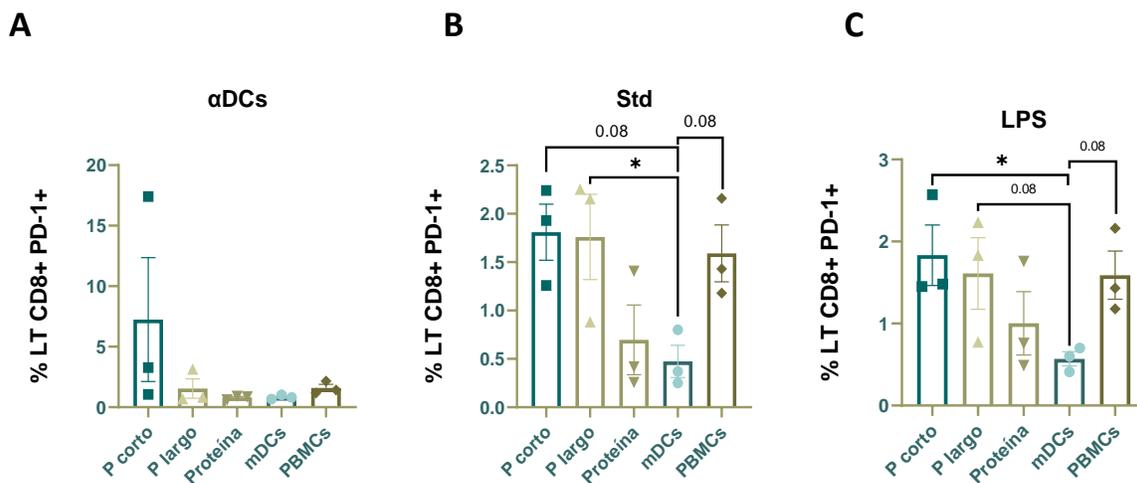


Figura 41. Expresión de PD-1 en LT CD8+ de LAND42 cultivadas con MoDCs estimuladas con diferentes formatos del antígeno y maduras bajo distintas condiciones. Diagramas de dispersión con barras representativos del porcentaje de LT CD8+ en cultivos estimulados con: **A.** coctel α 1, **B.** coctel Std, **C.** coctel LPS. El análisis estadístico para cada grupo se llevó a cabo utilizando la prueba no paramétrica de Friedman de datos pareados, $n=3$, ($p<0.05$). Los diagramas de dispersión con barras representan réplicas experimentales independientes + SEM.

El análisis de las subpoblaciones de memoria mostro que PD-1 presentó una tendencia al incremento en la población CM en las siguientes condiciones: Std-mDCs y LPS-mDCs + péptido largo (**figuras suplementarias 8B y E**), y α 1-mDCs + péptido corto (**figura suplementaria 8D**). Sin embargo, se vio que la población de EM reflejó el comportamiento de PD-1 en la población general (**figuras 42 A - C**). Esto indica que la expresión de PD-1 está influida por esta subpoblación de memoria. La comparación entre los cocteles según cada formato no muestra diferencias significativas (**figuras 42 D - F**).

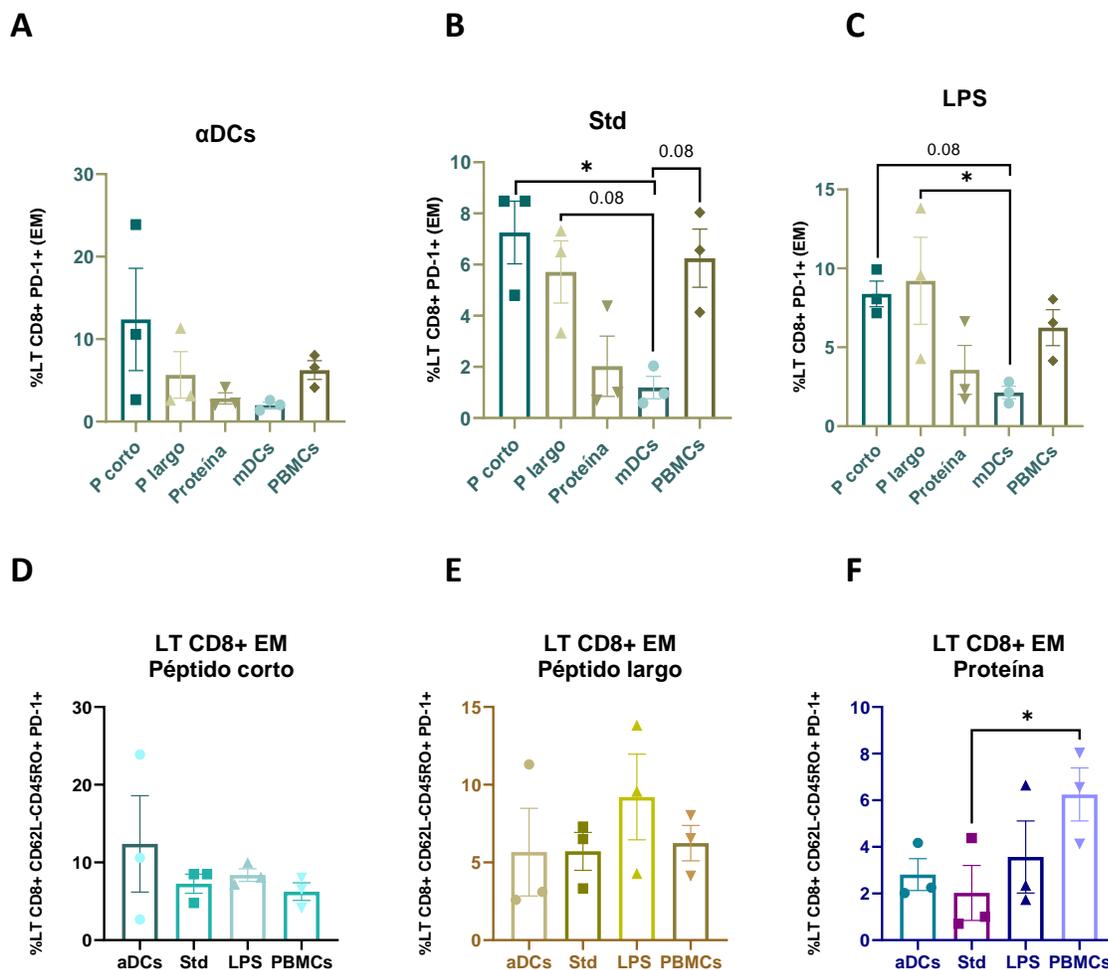


Figura 42. Expresión de PD-1 en LT CD8+CD45RO+CD62L- (EM) del donante LAND42 cultivadas con MoDCs estimuladas con diferentes formatos del antígeno y maduras bajo distintas condiciones. Diagramas de dispersión con barras representativos del porcentaje de LT CD8+ CD45RO+ CD62L- (EM) PD-1+ en cultivos estimulados con: **A.** coctel α 1, **B.** coctel Std, **C.** coctel LPS, **D.** péptido corto, **E.** péptido largo y **F.** proteína recombinante. El análisis estadístico para cada grupo se llevó a cabo utilizando la prueba no paramétrica de Friedman de datos pareados, $n=3$, ($p<0.05$). Los diagramas de dispersión con barras representan réplicas experimentales independientes + SEM.

Para CTLA-4 también se observó que la mayor expresión se dio luego del estímulo con péptidos, respecto al control negativo para los tres cocteles de maduración (**figura 43 A-C**). La comparación entre formatos del antígeno no mostró diferencias (**figura 43 D-E**).

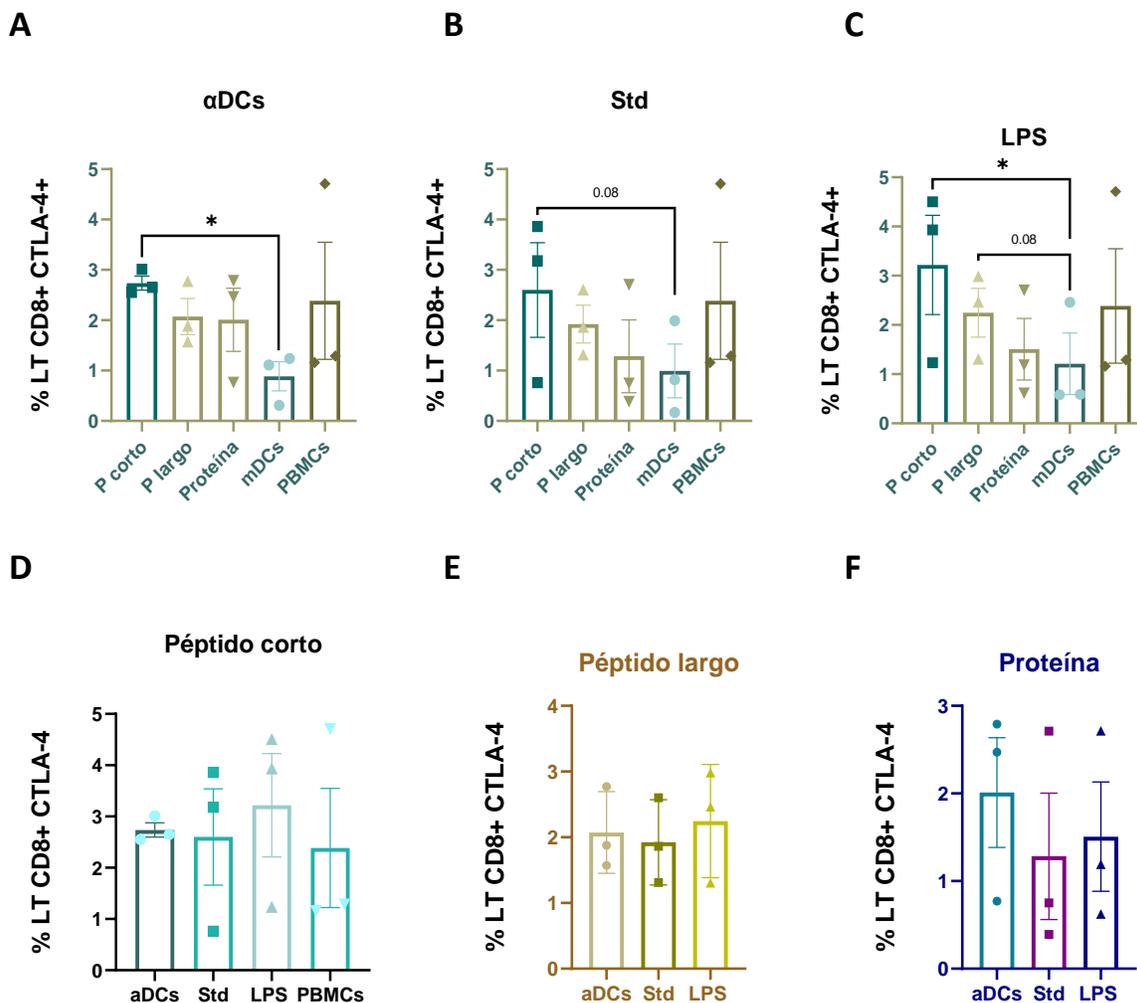
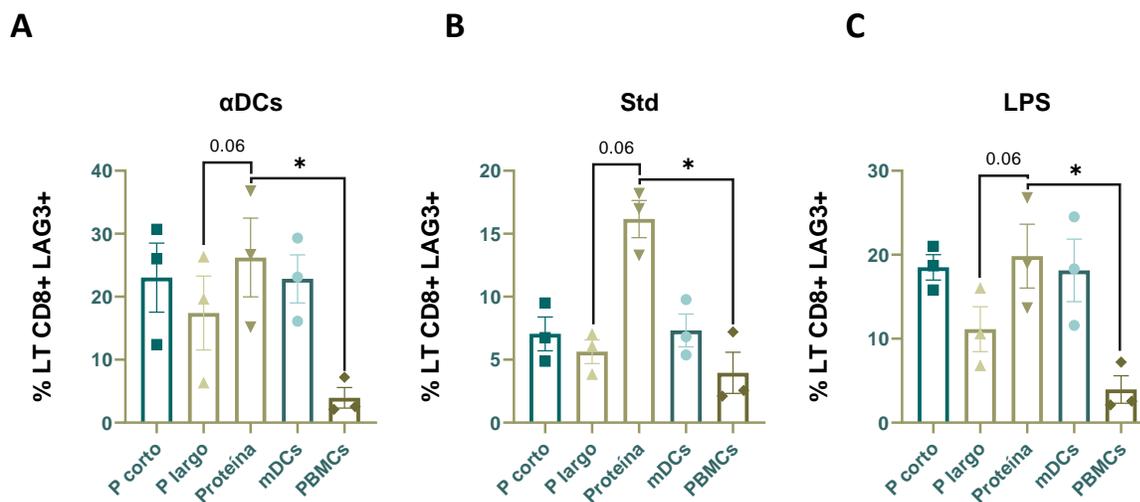


Figura 43. Expresión de CTLA-4 en LT CD8+ de LAND42 cultivadas con MoDCs estimuladas con diferentes formatos del antígeno y maduras bajo distintas condiciones. Diagramas de dispersión con barras representativos del porcentaje de LT CD8+ en cultivos estimulados con: **A.** coctel α 1, **B.** coctel Std, **C.** coctel LPS. El análisis estadístico para cada grupo se llevó a cabo utilizando la prueba no paramétrica de Friedman de datos pareados, $n=3$, ($p<0.05$). Los diagramas de dispersión con barras representan réplicas experimentales independientes + SEM.

Por último, el marcador LAG-3 exhibió diferencias significativas a nivel de la población general de LT CD8+ tanto a nivel del formato del antígeno como de los cocteles de maduración. Para los tres cocteles, se observó un incremento significativo de LAG-3 luego del estímulo con proteína respecto a las PBMCs; así como una tendencia respecto al péptido largo (**figura 44 A-C**). Por otra parte, al comparar los cultivos de mDCs sin estímulo antigénico, se observó que las α 1mDCs expresaron LAG-3 de forma significativamente mayor que las PBMCs pulsadas y que las StdmDCs (**figura 44D**). Por su parte las Std-mDCs también parecen expresar menos LAG-3 que las LPSmDCs (**figura 44D**). Resultados similares se observaron en la comparación de los cocteles respecto al péptido corto (**figura 44E**).

En conjunto, estos hallazgos sugieren que los cocteles α 1 y LPS podrían favorecer *per se* la expresión de LAG-3 independientemente del antígeno. Esta diferencia también se observa en la comparación de cocteles respecto a la proteína (**figura 44G**). El análisis de las subpoblaciones de memoria CM y EM mostró un comportamiento similar del marcador para ambas subpoblaciones (**figura 45 y figura suplementaria 9**).



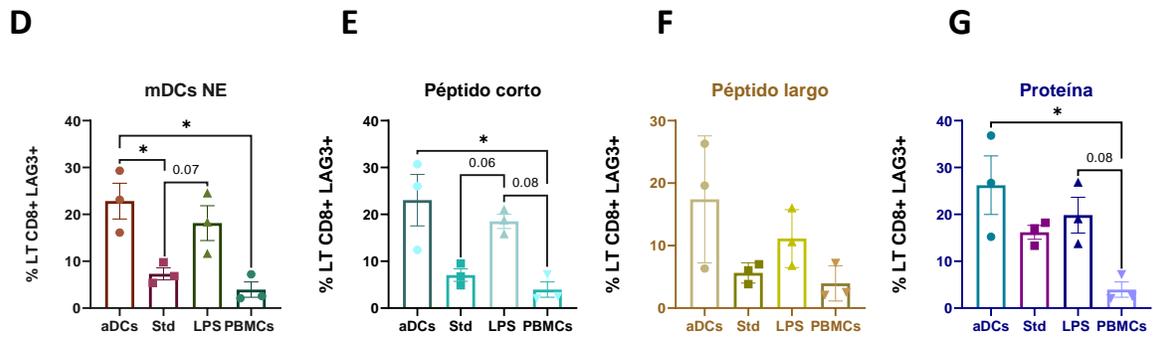


Figura 44. Expresión de LAG-3 en LT CD8+ de LAND42 cultivadas con MoDCs estimuladas con diferentes formatos del antígeno y maduras bajo distintas condiciones. Diagramas de dispersión con barras representativos del porcentaje de LT CD8+ en cultivos estimulados con: **A.** coctel α 1, **B.** coctel Std, **C.** coctel LPS, **D.** mDCs no pulsadas, **E.** péptido corto, **F.** péptido largo y **G.** proteína recombinante. El análisis estadístico para cada grupo se llevó a cabo utilizando la prueba no paramétrica de Friedman de datos pareados, $n=3$, ($p<0.05$). Los diagramas de dispersión con barras representan réplicas experimentales independientes + SEM.

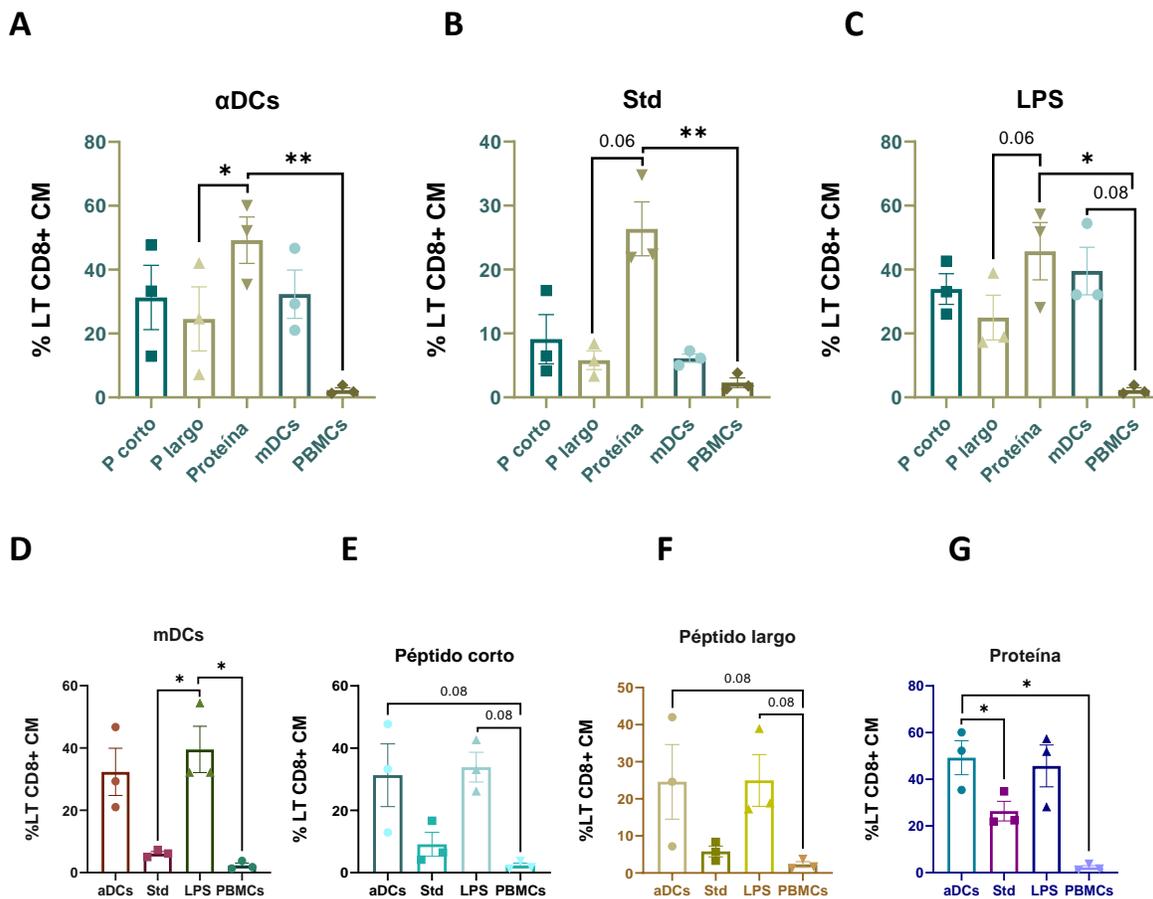


Figura 45. Expresión de LAG-3 en LT CD8+ CM del donante LAND42 cultivadas con MoDCs estimuladas con diferentes formatos del antígeno y maduras bajo distintas condiciones. Diagramas de dispersión con barras representativos del porcentaje de LT CD8+ CD45RO+CD62L+ (CM) LAG-3+ en cultivos estimulados con: **A.** coctel α 1, **B.** coctel Std, **C.** coctel LPS, **D.** mDCs no estimuladas, **E.** péptido corto, **F.** péptido largo y **G.** proteína recombinante. El análisis estadístico para cada grupo se llevó a cabo utilizando la prueba no paramétrica de Friedman de datos pareados, $n=3$, ($p<0.05$). Los diagramas de dispersión con barras representan réplicas experimentales independientes + SEM.

Estos resultados sugieren que el incremento en la expresión de los marcadores PD-1 y CTLA-4 parecen estar asociados a los formatos más eficientes en la generación de una respuesta efectora. Por otro lado, el marcador LAG-3 parece tener un comportamiento asociado al tipo de mDCs utilizadas.

13.6.5 CD154 se incrementa en poblaciones CD3+CD8- luego del estímulo con proteína recombinante en células del donante LAND42

Con base en los resultados obtenidos en la **sección 13.3.4**, se evaluó la expresión del marcador CD154 en las poblaciones CD3+CD8- (LT CD4+ colaboradores). El análisis mostró que el coctel LPS parecer favorecer la expresión de CD154, ya que se observa una tendencia en comparación al coctel α 1, cuando se evalúa el péptido corto (**figura 46**). En contraste, el péptido largo presentó la menor expresión de este marcador, disminución significativa respecto a la proteína en el coctel LPS, a manera de tendencia en el coctel α 1. No se observaron diferencias estadísticas significativas para el coctel Std. Para el marcador CD137 no se observaron diferencias y se detectaron porcentajes muy bajos de células CD137+ (datos no mostrados).

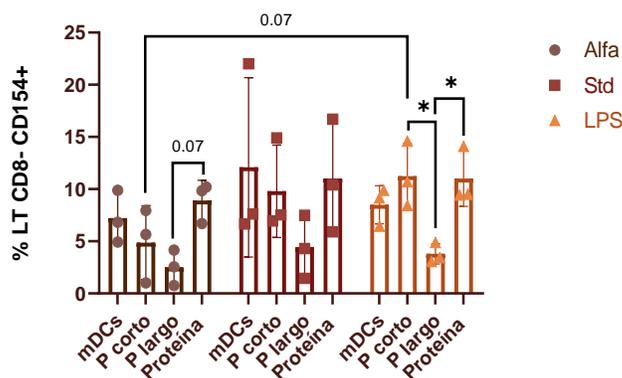
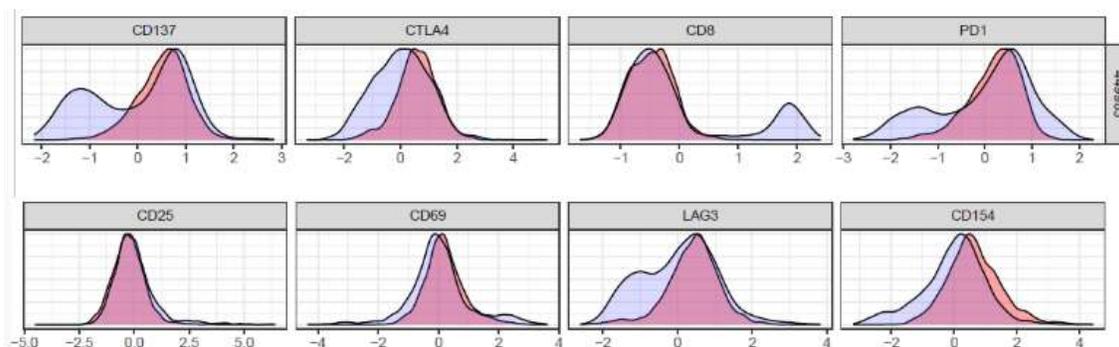


Figura 46. Expresión de CD154 en LT CD8- del donante LAND42 cultivadas con MoDCs estimuladas con diferentes formatos del antígeno y maduras bajo distintas condiciones. Diagramas de dispersión con barras representativos del porcentaje de LT CD8- cultivos estimulados con los tres cocteles mencionados y los 3 formatos del antígeno. El análisis estadístico se llevó a cabo utilizando la prueba no paramétrica de Friedman de datos pareados, $n=3$, ($p<0.05$). Los diagramas de dispersión con barras representan réplicas experimentales independientes + SEM.

Comparando los formatos péptido largo y proteína, tomando en conjunto los tres cocteles de maduración por medio de CITRUS, se identificó el clúster 449983. Este correspondió a una población CD8 – CD154+, incrementada para la proteína recombinante (**figura 47**). Estos resultados sugieren que hay algo de presentación de la proteína recombinante a poblaciones CD8-.

A



B

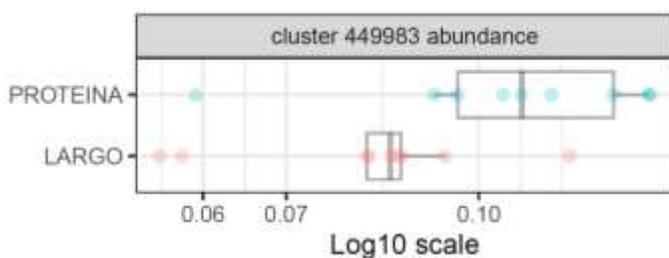


Figura 47. Clúster de células CD3+CD8- en los cultivos de péptido largo VS proteína. A. Características del clúster identificado (histograma rojo) en la expresión de CD8 y marcadores de activación y agotamiento respecto a la población general de células CD3+. **B.** Comparación de los formatos péptido largo y proteína respecto al clúster identificado. Los resultados reflejan el análisis sobre los conjuntos combinados de todos los cocteles utilizados. Las gráficas corresponden al clúster identificado por el modelo min. La tasa de error de validación cruzada de los modelos utilizados se encuentra en figura suplementaria 14.

13.7 Respuesta efectora de clones de LT CD8+ específicos de MART-1 no se influido por el coctel de maduración utilizado

13.7.1 Coctel Std favorece la expresión de CD80, CD83 y CD54 en MoDCs del donante LAND43

Los ensayos realizados con clones antígeno-específicos emplearon como presentadoras mDCs o PBMCs del donante LAND43. La **figura 48** representa la expresión de marcadores de los marcadores de maduración CD80, CD83 y CD54 en MoDCs de este donante.

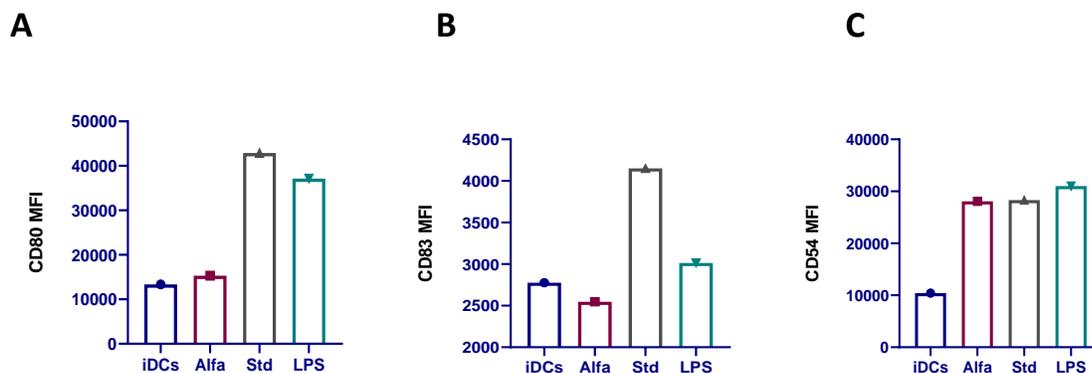


Figura 48. Evaluación de marcadores de maduración en MoDCs del donante LAND43 estimuladas con diferentes cocteles. Diagramas de barras representan la expresión de los marcadores **A. CD80**, **B. CD83** y **C. CD54** en MoDCs estimuladas con diferentes cocteles de maduración.

En términos generales, se observó que el coctel Std favoreció la mayor expresión de los marcadores CD80 y CD83 (**figura 48A y B**), en contraposición a lo observado en el donante LAND42 (**figura 32**). Sin embargo, el marcador CD83 continúa teniendo un ruido de fondo incrementado respecto a las α 1-mDCs, como se observó para el donante LAND42. El coctel LPS tuvo un comportamiento similar para la expresión de CD80 (**figura 48A**) y el marcador CD54 no mostró diferencias entre los cocteles respecto a las iDCs (**figura 48C**). El coctel α 1 solo evidenció incremento del marcador CD54 para este donante (**figura 48C**). Teniendo en cuenta que estos resultados contrastan con lo observado en las MoDCs del donante LAND42, se refuerzan la idea de la heterogeneidad interindividual respecto a la elección de marcadores de maduración.

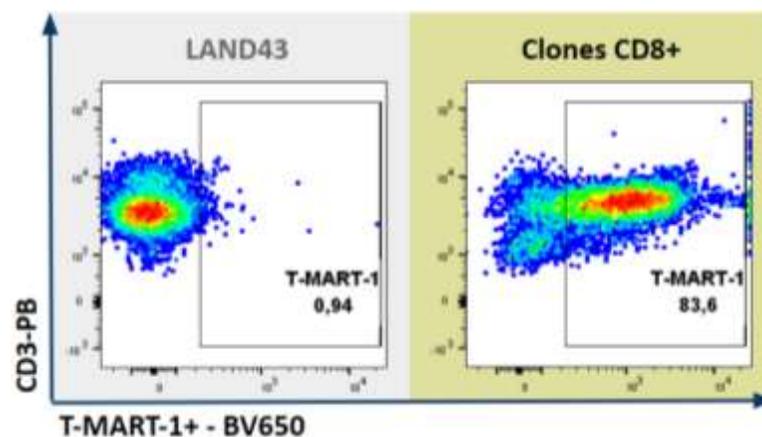
13.7.2 Cocteles de maduración no influyen en la respuesta efectora de clones de LT CD8+ específicos de MART-1 a péptido largo

Clones LT CD8+ MART-1+ fueron cultivados con mDCs alogénicas no pulsadas, alfa-mDCs, Std-mDCs y LPS-mDCs, cada tipo estimulada con los distintos formatos de la proteína MART-1. En la **figura 49** se observa el análisis por tetrámero del clon y los diagramas de puntos correspondientes al experimento completo.

En este ensayo, llamó la atención que la estimulación con el péptido corto en mDCs no generó una respuesta de producción de citoquinas por los clones MART-1-específicos. Aunque las PBMCs pulsadas favorecieron un 23% de células productoras de TNF α +, no se observaron LT CD8+ productores de IFN γ +. Esto contrasta grandemente con los resultados del ensayo de tetrámero, que exhiben un porcentaje del 83,6% de células positivas, habiendo utilizado el mismo péptido para el ensamblaje (**figura 49A**). Como se ha observado previamente, la proteína recombinante tampoco evidenció una respuesta efectora de LT CD8+ (**figura 49B**).

Únicamente los cultivos estimulados con péptido largo, independientemente del coctel empleado para la maduración de las mDCs, favorecieron una amplia respuesta de clones CD8+ doble-positivos. Esta respuesta fue comparable a la observada en el cultivo que recibió estímulo con PMA/Ionomomicina (**figura 49B**). Teniendo en cuenta que la epítipo blanco está inmersa en este péptido largo sintético de 25 aminoácidos, este resultado podría sugerir un fenómeno de presentación cruzada.

A



B

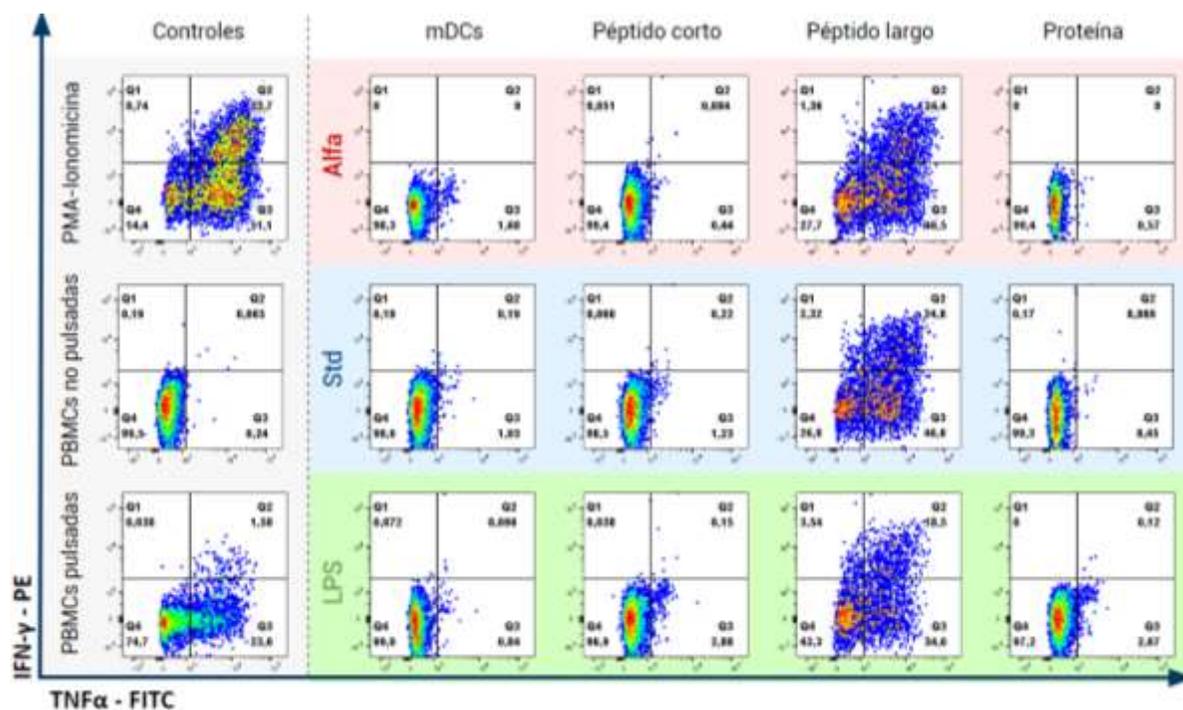


Figura 49. Clones CD8+ MART-1-específicos productores de citoquinas cultivados con MoDCs estimuladas con diferentes formatos del antígeno y maduras bajo distintas condiciones. Diagramas de puntos correspondientes al análisis de **A.** Clonos CD8+ T-MART-1+; **B.** la producción de IFN- γ y TNF α por clones CD8+ MART-1- específicos cultivados con MoDCs estimuladas con distintos formatos del antígeno de MART-1 bajo distintas condiciones de maduración.

13.7.3 Expresión de PD-1 en clones de LT CD8+ no se asocia con estímulo antigénico reciente

Después de 24h de cultivo, se evaluaron los clones CD8+ MART-1+ para los marcadores de activación CD25, CD69, CD137 y CD154 (**figura 50**). Para CD25, CD69 y CD137 se observó un incremento marcado luego del estímulo con péptido largo, independientemente del estímulo de maduración (**figuras 50A - C**). Este resultado es coherente con los hallazgos del protocolo de ICS, donde este estímulo generó una respuesta efectora a su vez reflejada en el fenotipo del clon CD8+.

Por otro lado, el incremento de CD154 podría estar relacionado con el coctel utilizado, ya que se vio un aumento en las α 1-mDCs sin estímulo antigénico y pulsadas con péptido largo (**figura 50D**). Este incremento se dio en menor medida para los cultivos Std y LPS estimulados con péptido largo.

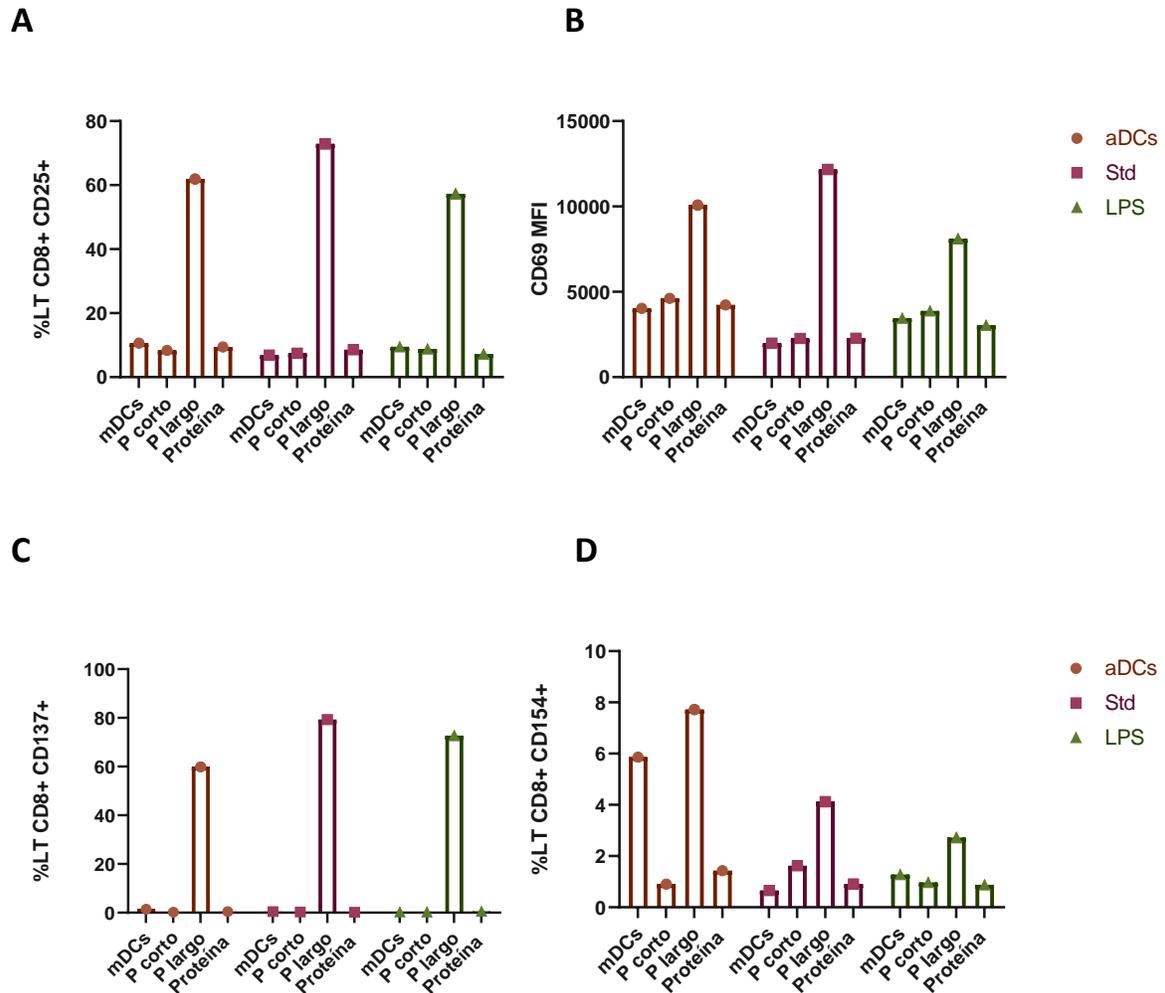


Figura 50. Evaluación de marcadores de activación de clones CD8+ MART-1-específicos cultivados con MoDCs estimuladas con diferentes formatos del antígeno y maduras bajo distintas condiciones. Diagramas de barras que representan los porcentajes de clones T CD8+ **A.** CD25+, **C.** CD137+ y **D.** CD154+. **B.** Representa la MFI del marcador CD69 en los diferentes cultivos.

En el caso de los marcadores de agotamiento, se observó una expresión generalizada de PD-1 en los clones para casi todos los cultivos, incluyendo los controles de mDCs (**figura 51A**). CTLA-4 tuvo un aumento marcado en los cultivos $\alpha 1$ y Std estimulados con péptido largo, sin incremento en las demás condiciones (**figura 51B**).

Finalmente, el marcador LAG-3 mostró una expresión predominante en los cultivos estimulados con el coctel $\alpha 1$ y LPS, no siendo así para el coctel Std (**figura 51C**). Sin embargo, se mostró consistentemente elevado en los cultivos estimulados con péptido largo, independientemente del coctel de maduración empleado, hecho posiblemente relacionado con el fenotipo de clon activado y la producción de citoquinas (**figura 49C**).

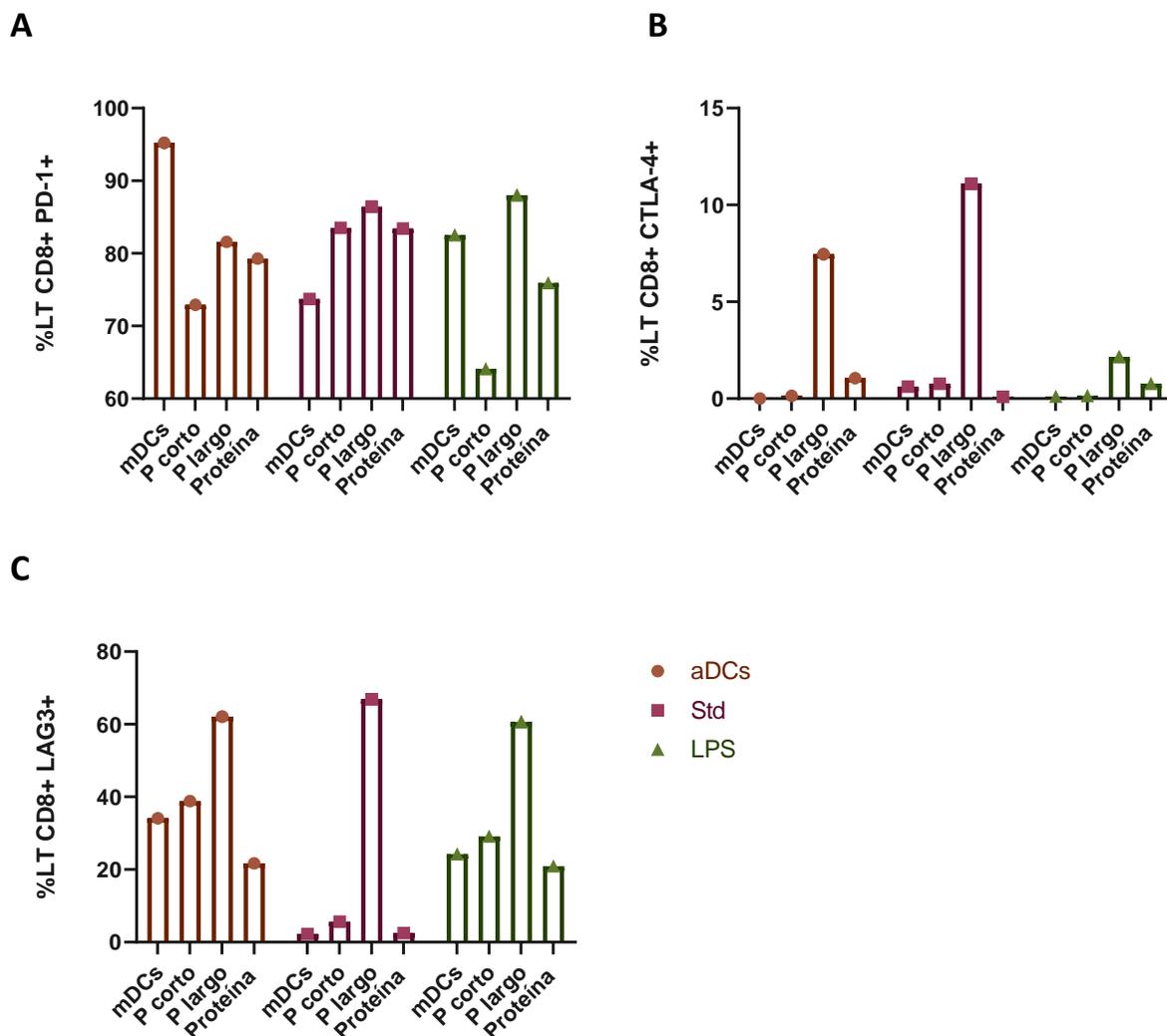
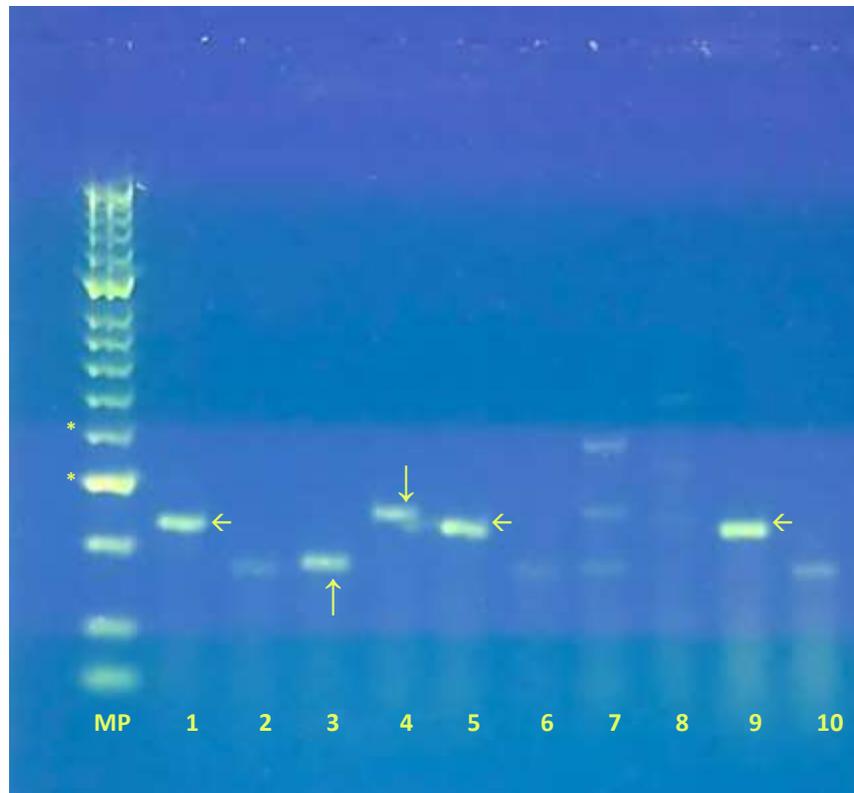


Figura 51. Evaluación de marcadores de agotamiento de clones CD8+ MART-1-específicos cultivados con MoDCs estimuladas con diferentes formatos del antígeno y maduras bajo distintas condiciones. Diagramas de barras que representan los porcentajes de clones T CD8+ **A.** PD-1+, **B.** CTLA-4+ y **C.** LAG-3+.

13.8 mRNA de las proteínas MART-1 y NY-ESO-1 es expresado en las líneas tumorales MALME-3M y SKMEL-37 respectivamente

Se realizó una RT-PCR de punto final para evaluar la expresión del mRNA de MART-1 y NY-ESO-1 en las líneas tumorales MALME-3M, CRL2338 y SKMEL-37 (**figura 52**). Como control de amplificación se utilizó el gen de la proteína constitutiva β -actina (230bp), positivo para todas las líneas evaluadas. En la línea MALME-3M se evidenció mRNA de MART-1, pero no de NY-ESO-1, resultados que concuerdan con los reportes de la literatura (132-134). La **tabla suplementaria 3** muestra la concentración y pureza de los mRNAs utilizados. CRL2338 se utilizó como control negativo, representado en la ausencia de mRNA para los genes de interés (**figura 52**). Por último, la línea SKMEL-37 expresó mRNA de ambas proteínas. Si bien esta línea se ha descrito como MART-1(-)(136-138) y NY-ESO-1+ (135, 138), se ha reportado expresión del mRNA de MART-1 a bajos niveles (155). Esto posiblemente obedece a que MART-1 es un marcador de diferenciación melanocítica (156), presente en una gran variedad de melanomas (35).

A



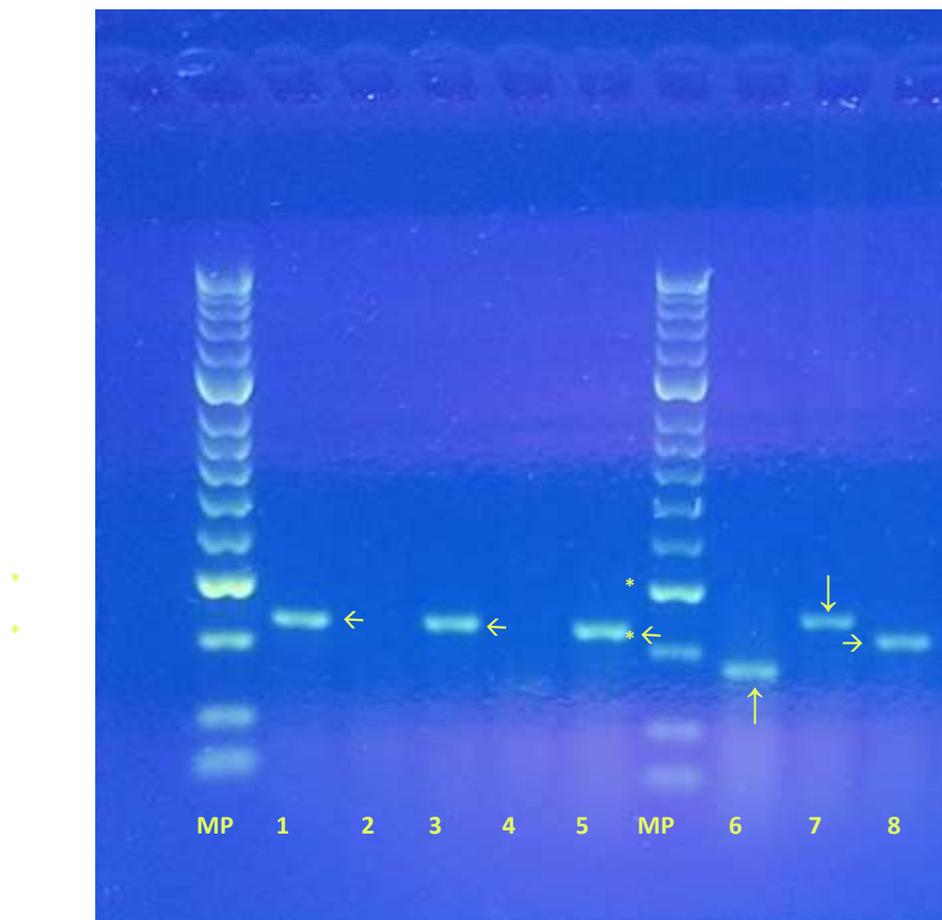
B

Figura 52. RT-PCR de punto final revelada en gel de agarosa al 2%. Las imágenes muestran el resultado de la RT-PCR de punto final para evaluar la expresión del mRNA de las proteínas MART-1 y NY-ESO-1 en las líneas tumorales MALME-3M, SKMEL-37 y CRL2338. Como control positivo de amplificación se utilizó el gen de β -actina (230bp) (marcado con la flecha \leftarrow); y adicionalmente se utilizó un segundo control de amplificación por medio del gen constitutivo RPS18, cuya amplificación no resultó tan evidente (carriles 2, 6 y 10 en **A**). En el marcador de peso molecular (MP) se indican con asterisco (*) las bandas 300bp (arriba) y 200bp (Abajo). En **A**: (1) MALME-3M β actina (\leftarrow); (2) MALME-3M RPS18(-); (3) MALME-3M MART-1 (178bp) (\uparrow); (4) MALME-3M MART-1 (253bp) (\downarrow); (5) CRL2338 β actina (\leftarrow); (6) CRL2338 RPS18 (-); (7) CRL2338 MART-1 (178bp); (8) CRL2338 MART-1 (253bp); (9) SKMEL-37 β actina (\leftarrow); (10) SKMEL-37 RPS18 (-). En **B**: (1) MALME-3M β actina (\leftarrow); (2) MALME-3M NY-ESO-1 (217bp); (3) CRL2338 β actina (\leftarrow); (4) CRL2338 NY-ESO-1 (217bp); (5) SKMEL-37 β actina (\leftarrow); (6) SKMEL-37 MART-1 (178bp) (\uparrow); (7) SKMEL-37 MART-1 (253bp) (\downarrow); (8) SKMEL-37 NY-ESO-1 (217bp) (\rightarrow). Imágenes representativas de tres ensayos independientes.

13.9 Agentes quimioterapéuticos ejercen efecto citotóxico sobre líneas tumorales tratadas

La determinación de la IC_{50} y el efecto citotóxico de cada fármaco sobre cada una de las líneas tumorales trabajadas se realizó conforme a la metodología descrita en la **sección 12.2.13**. Se estableció el porcentaje de viabilidad y mortalidad en función de la concentración del fármaco utilizado en cada experimento y con base en esto se calculó la IC_{50} , que corresponde a la concentración del agente quimioterapéutico que reduce al 50% la viabilidad celular en un tiempo determinado. En la **figura 53** se muestran resultados representativos de los ensayos realizados, y se indica la IC_{50} obtenida una vez aplicado el modelo de análisis. Para cada línea con cada fármaco se realizaron al menos 3 experimentos independientes. En la **tabla 4** se muestran las IC_{50} calculadas para cada línea tratada con los agentes mencionados. En la **figura suplementaria 11** se muestran curvas representativas de los ensayos realizados.

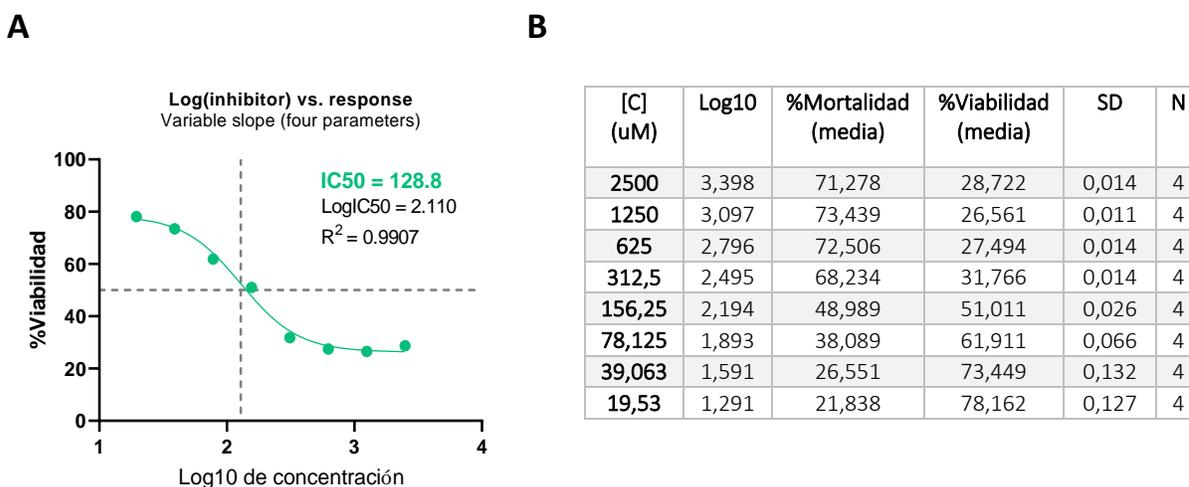


Figura 53. Efecto citotóxico de agentes quimioterapéuticos sobre líneas tumorales y determinación de IC_{50} . **A.** Análisis de regresión no lineal empleando la curva log(inhibidor) vs respuesta (pendiente variable) y cálculo de IC_{50} para carboplatino. El valor de R^2 refleja el ajuste de los datos experimentales en el modelo empleado. **B.** Concentraciones utilizadas de carboplatino y porcentajes de mortalidad y viabilidad obtenidos. La desviación estándar (SD) registrada se calculó respecto a la viabilidad. Este set de gráficas es representativo de 3 experimentos independientes para cada fármaco en cada línea.

Tabla 4. IC₅₀ calculada para cada línea tumoral tratada con distintos agentes quimioterapéuticos

Línea tumoral	Fármaco	IC ₅₀ (μM) ¹	CI 95% ²
MALME-3M	Doxorrubicina	4,022	2,974 - 5,377
	Carboplatino	97,88	62,16 - 146,4
	Paclitaxel	7,189	6,144 - 8,528
CRL2338	Doxorrubicina	5,533	4,396 - 6,703
	Carboplatino	477,5	422,5 - 542,3
	Paclitaxel	7,037	4,431 - 9,480
SKMEL-37	Doxorrubicina	6,745	3,469 - 12,65
	Carboplatino	132,6	73,81 - 185,3
	Paclitaxel	10,13	8,097 - 12,71

¹La IC₅₀ se calculó con base en 3 experimentos independientes

²intervalos de confianza del 95%

Una vez establecidas las IC₅₀ para cada línea tratada con los tres fármacos distintos, se procedió con los experimentos de sinergia empleando combinaciones de fármacos, inducción de muerte celular y evaluación de traslocación de CRL a la membrana celular.

13.10 Combinación de fármacos no evidencia efecto sinérgico

Se evaluó el efecto de la combinación de los fármacos doxorubicina, carboplatino y paclitaxel mediante ensayos de sinergia, como se describió en la **sección 12.2.14**. El objetivo de este ensayo es determinar si las combinaciones de estos fármacos (doxorubicina + carboplatino; carboplatino + paclitaxel; doxorubicina + paclitaxel) podría tener un efecto sinérgico en la citotoxicidad sobre las líneas tumorales tratadas. En la **figura 54** se observa un ejemplo representativo del informe y las curvas dosis-respuesta obtenidas de una de las combinaciones de fármacos usadas, tras analizarse en la plataforma synergyfinder.fimm.fimm.fi.

Mediante las curvas obtenidas para cada fármaco independiente, el algoritmo calcula el ZIP score que establece si la combinación de medicamentos es antagónica, aditiva o sinérgica. Este análisis se llevó a cabo al menos una vez para cada combinación en cada línea tumoral. En la **tabla 5** se muestran los ZIP score obtenidos para cada combinación de fármacos en cada línea tumoral tratada.

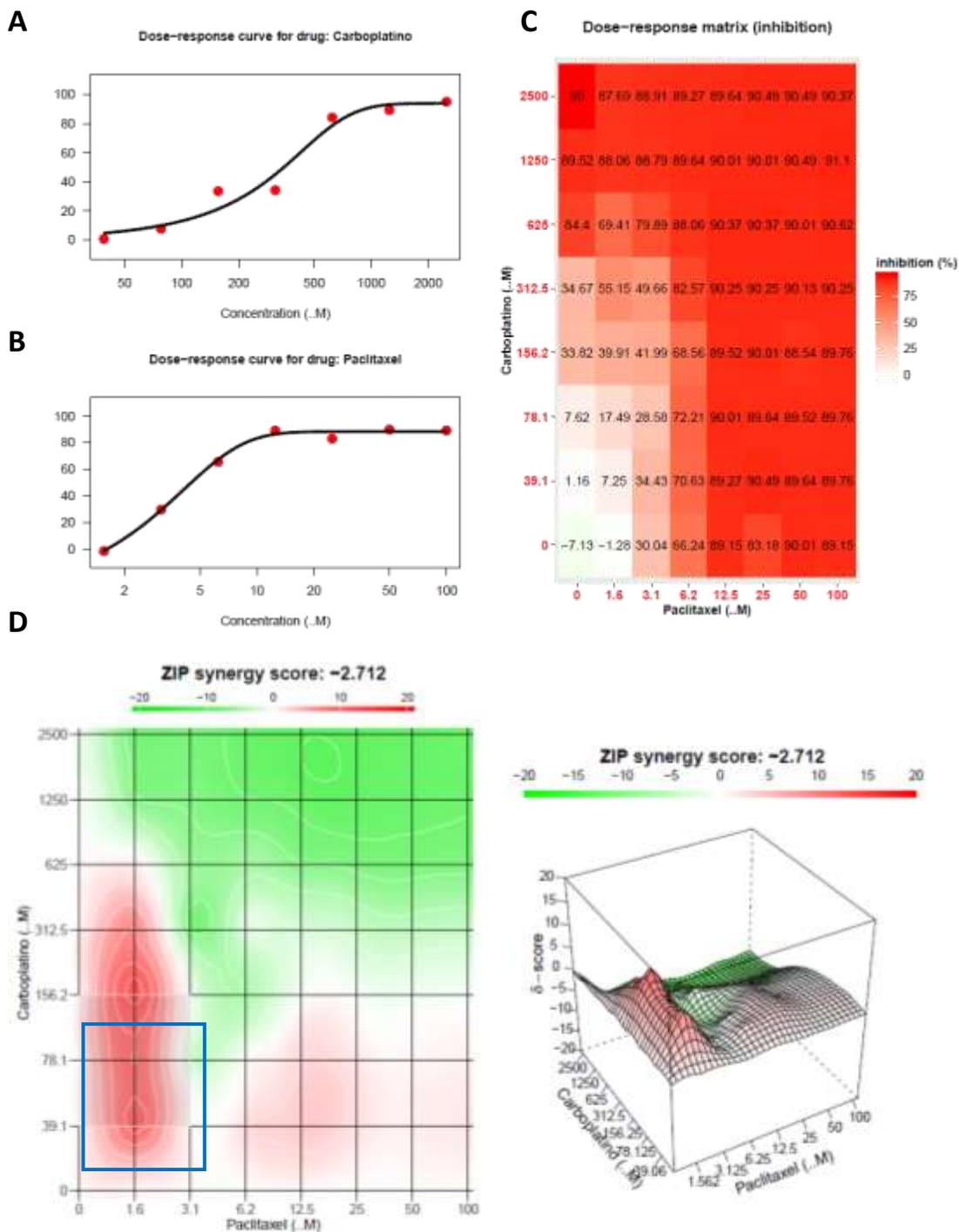


Figura 54. Análisis dosis-respuesta de la combinación carboplatino + paclitaxel como tratamiento sobre la línea tumoral SKMEL-37. La figura muestra la curva dosis respuesta para el agente carboplatino (A) y paclitaxel (B). C. Matriz dosis-respuesta para la combinación de fármacos. D. mapa de sinergia obtenido en el análisis realizado. El recuadro sobre el mapa señala el área con mayor puntaje ZIP score para esa ventana de dosis en la combinación de fármacos.

Tabla 5. Evaluación del efecto sinérgico de la combinación de agentes quimioterapéuticos sobre líneas tumorales

Línea tumoral	Combinación de fármacos	ZIP score ¹	Efecto ²	Área más sinérgica ³	Dosis área más sinérgica ⁴	Efecto ²
MALME-3M	Carboplatino + Paclitaxel	-5,85	Aditivo	5,82	312,5 uM (C) + 3,1uM (P)	Aditivo
CRL2338	Carboplatino + Paclitaxel	2,33	Aditivo	13,31	1250 uM (C) + 3,1uM (P)	Sinérgico
SKMEL-37	Carboplatino + Paclitaxel	-2.71	Aditivo	2,76	156,2 uM (C) + 1,6 uM (P)	Aditivo
MALME-3M	Doxorrubicina + Carboplatino	5,57	Aditivo	30,26	625 uM (C) + 1,9 uM (D)	Sinérgico
CRL2338	Doxorrubicina + Carboplatino	-4,1	Aditivo	10,93	78,1 uM (C) + 5,6 uM (D)	Aditivo
SKMEL-37	Doxorrubicina + Carboplatino	-6,27	Aditivo	6,03	78,1 uM (C) + 3,6 uM (D)	Aditivo
MALME-3M	Doxorrubicina + Paclitaxel	-9,07	Aditivo	0,26	30 uM (P) + 1,9 uM (D)	Aditivo
CRL2338	Doxorrubicina + Paclitaxel	-5,07	Aditivo	5,28	1,9 uM (P) + 60 uM (D)	Aditivo
SKMEL-37	Doxorrubicina + Paclitaxel	-7,31	Aditivo	0,46	15 uM (P) + 3,8 uM (D)	Aditivo

¹ ZIP score general obtenido para la combinación de fármacos mencionada

² puntaje menor a -10 indica que la interacción es probablemente antagónica, entre -10 y 10 la interacción es probablemente aditiva y >10 la interacción es probablemente sinérgica.

³ el área más sinérgica representa la ventana de dosis en la matriz dosis-respuesta que cuenta con mayor puntaje ZIP score calculado, como se señaló en la figura 54

⁴ combinación de dosis de los fármacos empleados en la que se observó el área más sinérgica

13.11 Líneas tumorales tratadas expresan CRL y Anexina V en superficie

Con base en las IC₅₀ obtenidas para cada fármaco, se examinó la expresión de CRL y Anexina V en células tumorales tratadas. Aunque los tres fármacos favorecieron el aumento en la CRL de superficie, la línea MALME-3M exhibió un incremento significativo tanto en la expresión de CRL como de Anexina V con carboplatino, respecto al control de células vivas (**figuras 55A - E**). También se vio un aumento de CRL en las células tratadas con doxorrubicina (**figura 55D**), sin embargo, solo el carboplatino indujo una fuerte expresión de Anexina V (**figuras 55 A, C y E**). Los porcentajes de células CLR+ y Anexina V+ muestran resultados similares (**figuras suplementarias 12A y B**).

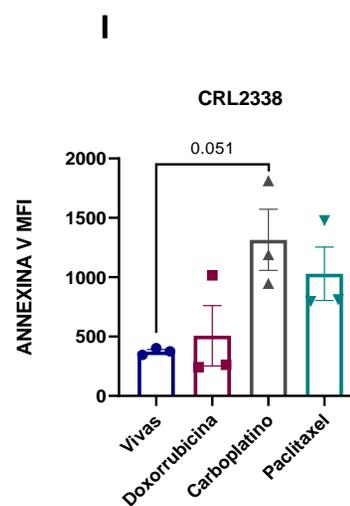
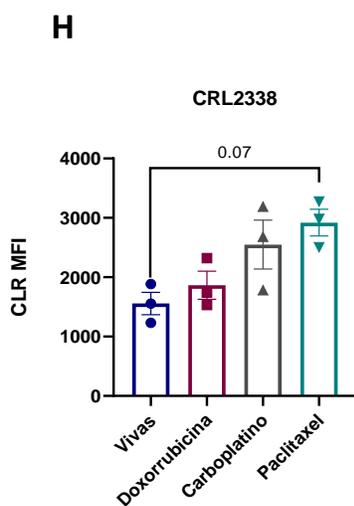
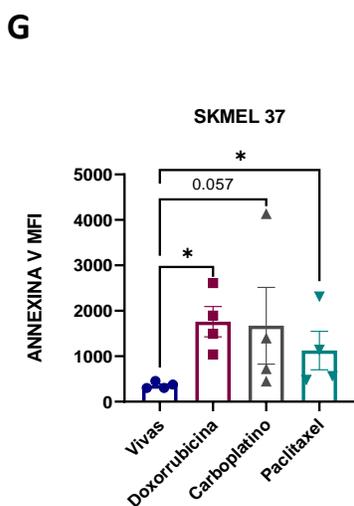
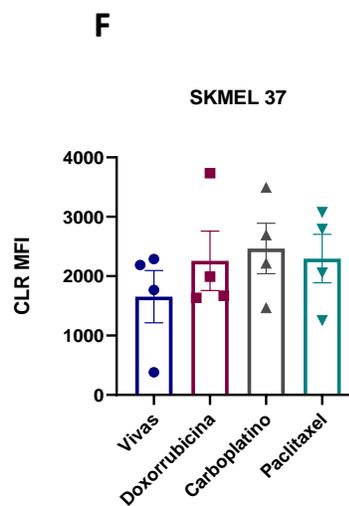
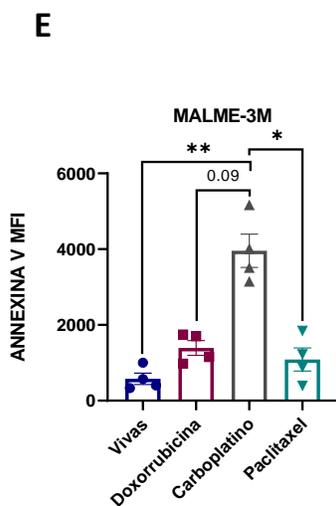
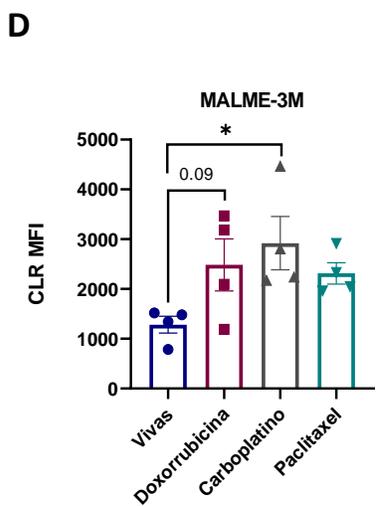
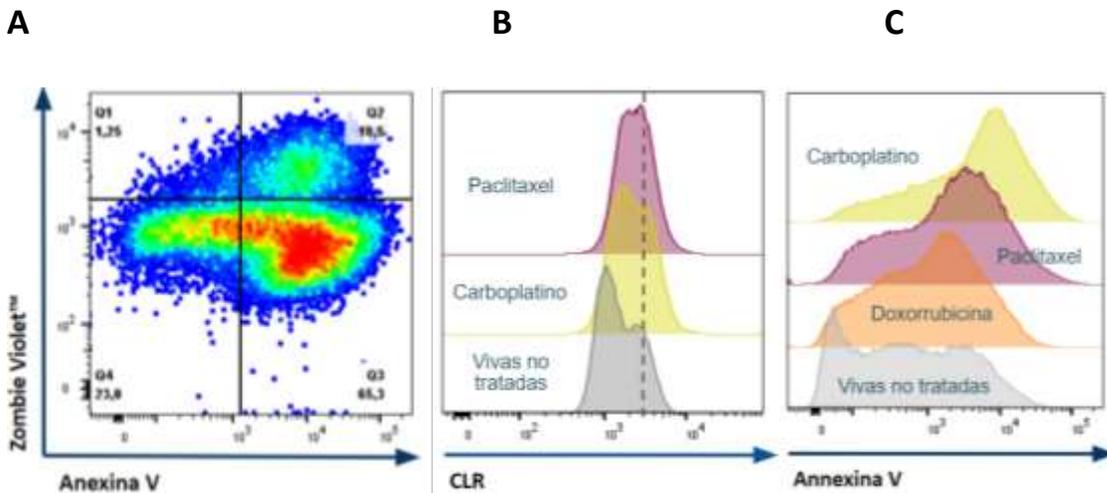


Figura 55. Expresión de CRL y Anexina V en líneas tumorales tratadas con agentes quimioterapéuticos. A. Diagrama de puntos representativo de la distribución de poblaciones luego del tratamiento con agentes quimioterapéuticos, en este caso carboplatino, sobre la línea MALME-3M. Q1: necrosis; Q2 apoptosis tardía, Q3 apoptosis temprana; Q4 células viables. **B.** Histogramas representativos de la expresión de CRL en la línea MALME-3M evaluado en células no tratadas, tratadas con carboplatino y paclitaxel. **C.** Histogramas representativos de la expresión de Anexina V en células de la línea MALME-3M no tratadas y tratadas con los tres agentes quimioterapéuticos. **D – I.** Diagramas de dispersión con barras representativos de la MFI obtenida para CLR y Anexina V en **D y E.** línea MALME-3M, **F y G.** línea SKMEL-37; **H e I.** línea CRL2338. El análisis estadístico para cada grupo se llevó a cabo utilizando la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis, ($p < 0.05$), $n=3$, las barras representan la media de 3 réplicas independientes del experimento + SEM.

En el caso de la línea SKMEL-37 se observó una expresión significativamente alta de Anexina V en las células tratadas con doxorrubicina y paclitaxel, y una tendencia al incremento luego del tratamiento con carboplatino (**figura 55G**). No se observan diferencias significativas en la expresión de CRL con los medicamentos empleados (**figura 55F**), aunque hay una tendencia de un ligero incremento en los tres tratamientos empleados. Los porcentajes de células CLR+ mostraron una tendencia mayor con carboplatino (**figura suplementaria 12C**), y el porcentaje de células Anexina V+ mostraron incrementos similares a los observados con la MFI (**figura suplementaria 12D**).

Para la línea CRL2338, aunque se percibe una elevación en la expresión de CRL con los tres tratamientos, a nivel estadístico solo se observa una tendencia cuando son tratadas con paclitaxel (**figura 55H**). Los porcentajes de células CLR+ exhiben una tendencia al aumento con paclitaxel, que es estadísticamente significativo respecto a la doxorrubicina (**figura suplementaria 12E**). Anexina V muestra una tendencia cuando la línea es tratada con carboplatino, aunque impresiona un incremento similar en la línea tratada con paclitaxel (**figura 55I**).

13.12 Carboplatino y paclitaxel favorecen la fagocitosis de células MALME-3M por iDCs y el incremento en la expresión de marcadores de maduración

Con base en los resultados obtenidos respecto a la expresión de CRL, se seleccionaron células de la línea MALME-3M tratadas con carboplatino y paclitaxel, y se llevó a cabo un ensayo de fagocitosis. Este perseguía determinar las diferencias en la captura de células tratadas y no tratadas por parte de

iDCs (**figura 56**) y el efecto de este fenómeno en la expresión de marcadores de maduración (**figura 57**). En el análisis se pudo evidenciar que dentro de la población CD11c+ se detectaron células HLA-DR+ CFSE+ en los cultivos de iDCs + MALME-3M vivas (2,12%), porcentaje incrementado en los cultivos que emplearon células tumorales tratadas con agentes quimioterapéuticos: carboplatino (4,98%) y paclitaxel (4,22%) (**figura 56**).

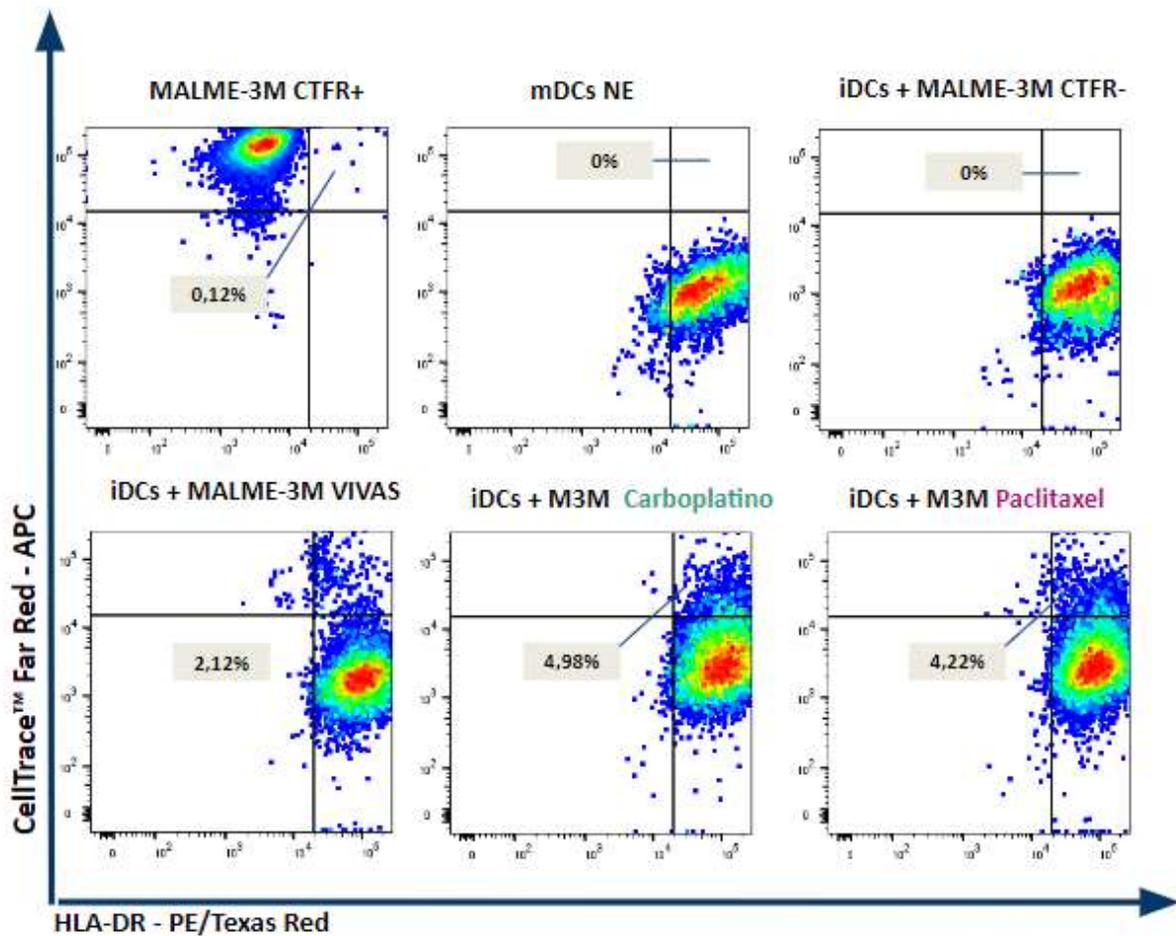


Figura 56. Ensayo de fagocitosis de células MALME-3M por iDCs. Diagrama de puntos representativo del ensayo de fagocitosis realizado con MoDCs CD11c+HLA-DR+ y células MALME-3M CTFR+ vivas o tratadas con carboplatino o paclitaxel.

Sobre las poblaciones CD11c+HLA-DR+CTFR+ se realizó el análisis de los marcadores de maduración CD80 y HLA-DR, que reflejan el grado de maduración de las MoDCs luego del proceso de fagocitosis. Este análisis mostró un incremento de CD80 (**figuras 57A y B**) y HLA-DR (**figuras 57C y D**) en los cultivos

que emplearon tumores tratados con carboplatino y paclitaxel. Dicha expresión alcanzó niveles iguales o superiores a los observados en mDCs maduras con el coctel LPS. Por el contrario, las iDCs estimuladas con células tumorales vivas, expresaron estos marcadores en niveles similares a las iDCs (figuras 57 A – D).

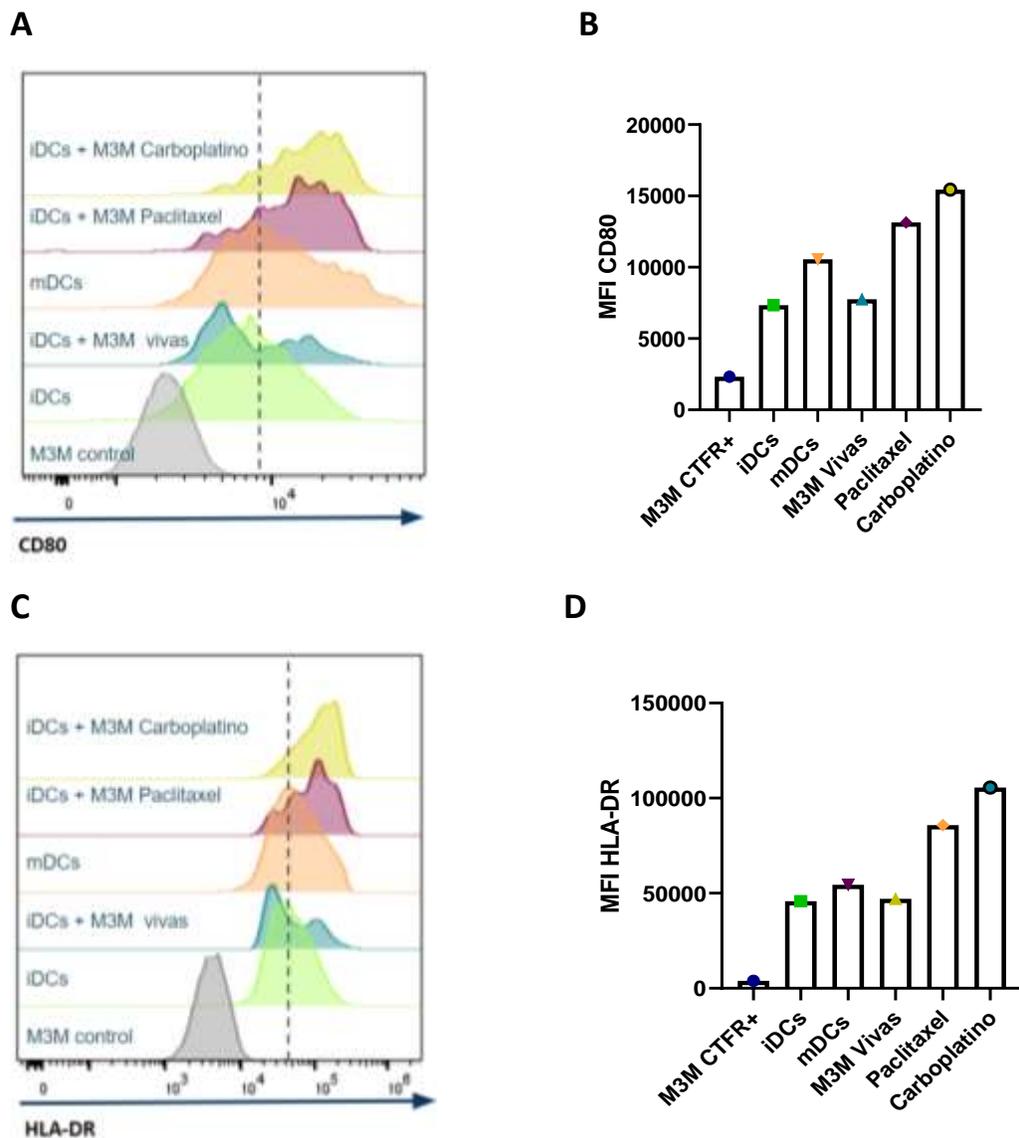


Figura 57. Expresión de marcadores de maduración en la población CD11c+HLA-DR+CTFR+. **A.** Histogramas correspondientes a la expresión de CD80 en las distintas condiciones de cultivo. **B.** Diagramas de barras de la expresión de CD80 en las diferentes condiciones de cultivo. **C.** Histogramas correspondientes a la expresión de HLA-DR en las distintas condiciones de cultivo. **D.** Diagramas de barras de la expresión de HLA-DR en las diferentes condiciones de cultivo. Esquemas correspondientes a un único ensayo.

13.13 Clones de LT CD8+ MART-1-específicos estimulados con mDCs cargadas con células tumorales no evidencian presentación cruzada el antígeno

Finalmente, se llevó a cabo un ensayo de presentación cruzada del antígeno, que perseguía determinar la capacidad de clones CD8+ específicos para la epítipo inmunogénica de MART-1, de generar una respuesta efectora citotóxica al enfrentarse con MoDCs estimuladas con células tumorales MALME-3M que expresan la proteína MART-1. Como control positivo de presentación cruzada se utilizaron LPS-mDCs pulsadas con el péptido largo de MART-1, y como control negativo se utilizaron MoDCs estimuladas con células tumorales de la línea CRL2338, cáncer de mama que no expresa MART-1. Este ensayo se realizó en el mismo experimento de la **sección 13.7.2**. No se observó una respuesta efectora de los clones en ninguno de los cultivos estimulados con células tumorales, respecto los controles establecidos (**figura 58**).

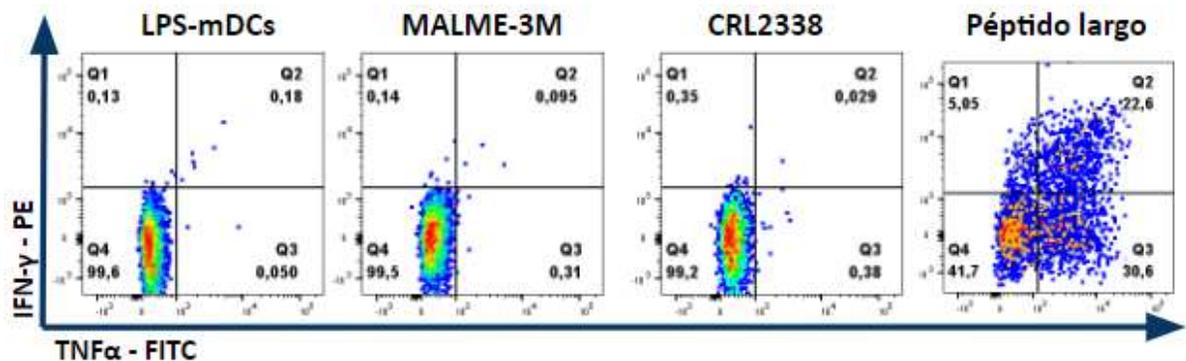


Figura 58. Evaluación de la producción de citoquinas en el ensayo de presentación cruzada del antígeno. Diagrama de puntos de las poblaciones productoras de IFN γ y TNF α en el ensayo de presentación cruzada del antígeno, que muestra clones CD8+ estimulados con (de izquierda a derecha): LPS-mDCs no pulsadas, iDCs estimuladas con células de la línea MALME-3M, iDCs estimuladas con células de la línea CRL2338 (en ambos casos posteriormente maduradas con el coctel LPS) y LPS-mDCs estimuladas con péptido largo.

También se evaluaron los marcadores de activación, agotamiento y memoria. Las poblaciones CD137+ solo se incrementaron en el cultivo estimulado con péptido largo y en CD154 no se observaron diferencias (**figuras 59 A y B**). Como en observaciones previas, CD69 se incrementó ligeramente en los cultivos que emplearon MoDCs como presentadoras (**figura 59 C y D**).

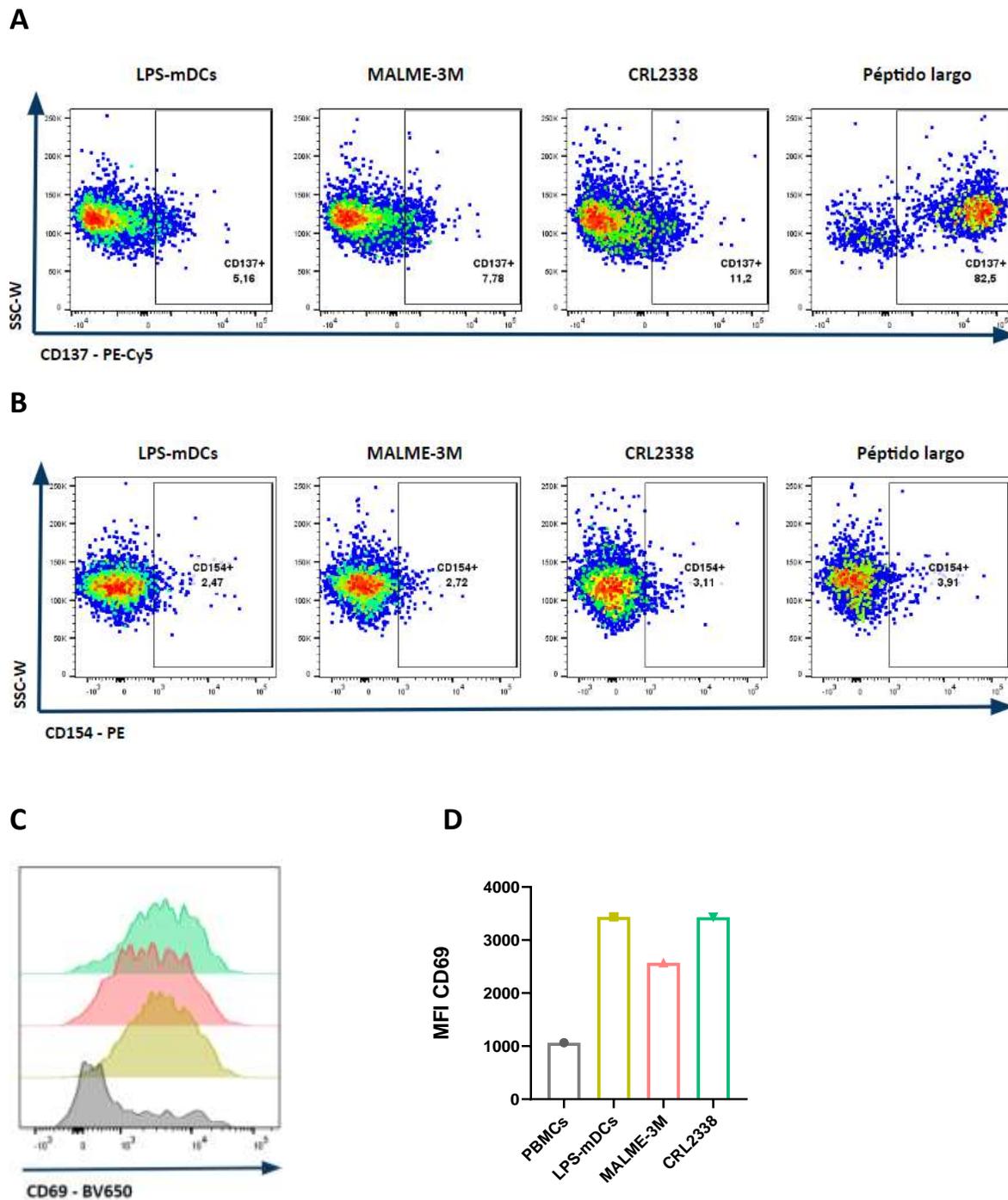


Figura 59. Evaluación de marcadores de activación en el ensayo de presentación cruzada del antígeno. La figura muestra los diagramas de puntos correspondientes a los marcadores CD137 (**A**) y CD154 (**B**). **C.** Histogramas obtenidos para el marcador CD69. **D.** Representación gráfica de la MFI de CD69.

En el análisis de los marcadores de agotamiento, se observó un incremento generalizado de PD-1 y LAG-3, sin diferencias notables entre las diferentes condiciones de cultivo (**figura 60A y C**). Para el marcador CTLA-4 se observó un ligero incremento en el control tumoral negativo y el péptido largo (**figura 60B**).

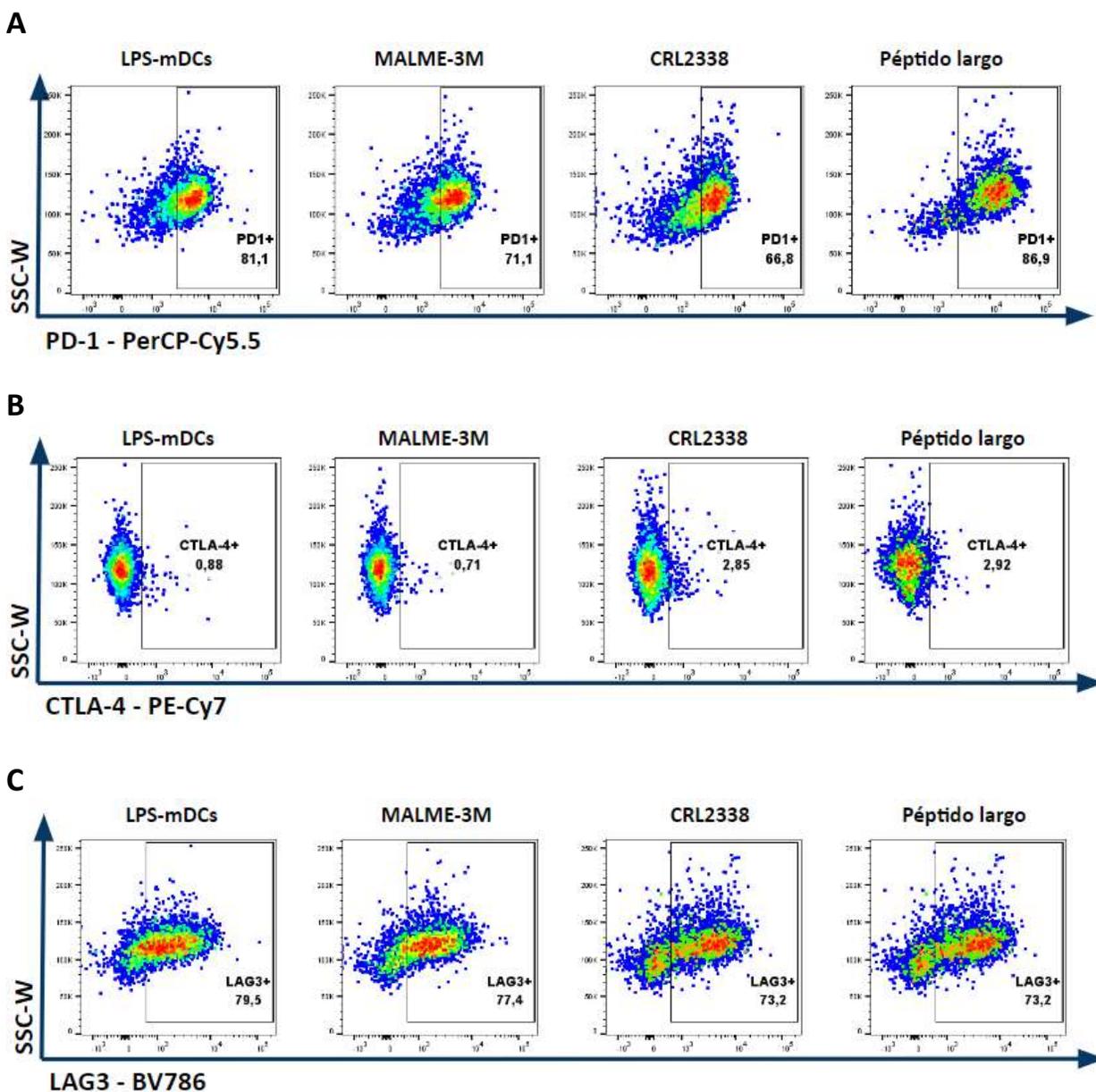


Figura 60. Evaluación de marcadores de agotamiento en el ensayo de presentación cruzada del antígeno. La figura muestra los diagramas de puntos correspondientes a los marcadores PD-1 (**A**), CTLA-4 (**B**) y LAG-3 (**C**) expresados en los 4 cultivos evaluados.

Finalmente, y como se observó en ensayos previos, la distribución de las poblaciones de memoria no sufrió cambios (**figura 61**).

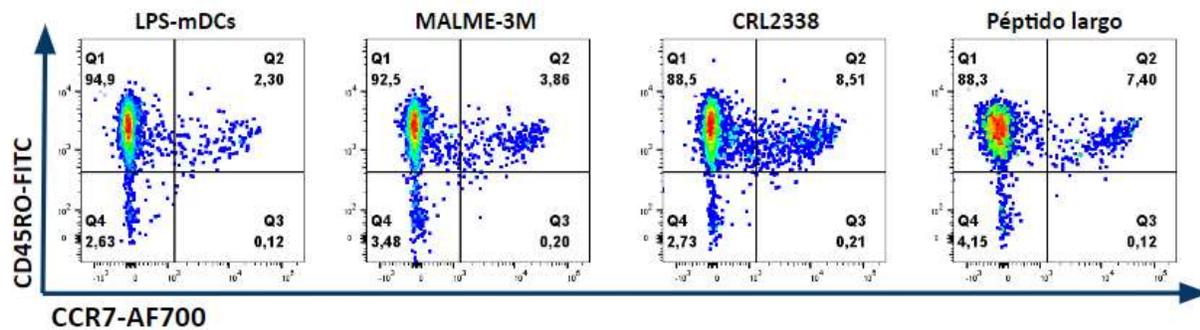


Figura 61. Evaluación de subpoblaciones de memoria en el ensayo de presentación cruzada del antígeno.

Diagrama de puntos de las subpoblaciones de memoria, representadas así: Q1. T_{EM}, Q2 T_{CM}, Q3 T_N y Q4 T_{EMRA}.

14 DISCUSIÓN

La inmunoterapia ha surgido como una estrategia prometedora en la lucha contra el cáncer, y las células dendríticas (DCs) se han destacado como una de las estrategias de coadyuvancia más estudiadas, gracias a su papel en la activación de respuestas efectoras antitumorales. No obstante, el extenso análisis de las DCs como herramienta de inmunoterapia ha enfrentado desafíos relacionados con la complejidad inherente al diseño y la preparación de vacunas basadas en estas APC. La complejidad que reviste este proceso no solo se asocia a los métodos utilizados para la obtención de DCs a partir de otras poblaciones celulares, sino que implica considerar las condiciones del cultivo en las que estas células se derivan y maduran. Todas las variables involucradas en la manipulación *ex vivo* de estas APC, incluyendo el estímulo antigénico en términos de tipo y formulación, pueden tener un impacto específico para cada donante.

Con motivo del uso de los neoantígenos como terapia personalizada contra el cáncer, se ha reconocido que las tendencias en inmunoterapia versan sobre intervenciones específicas según el perfil genético y molecular del tumor de un paciente particular (157). A esto se suma la variabilidad en la respuesta inmunitaria entre los individuos y la falta de predictibilidad de su eficacia con un tratamiento o adyuvante determinado (158). Mientras algunos pacientes pueden responder de manera robusta, otros, dependiendo de diversas circunstancias, pueden mostrar una respuesta limitada. En este sentido, se requiere de amplios estudios de caracterización individual para comprender qué tipo de pacientes pueden beneficiarse de ciertas estrategias y en qué condiciones deben ser tratadas o estimuladas sus células. Estas respuestas diversas explicarían el por qué este tipo de abordajes terapéuticos carecen de criterios estandarizados y universalmente aceptados.

En este proyecto, comparamos los efectos de diferentes formatos de antígenos y combinaciones de cocteles de maduración con los cuales se estimularon MoDCs, con el fin de establecer su efecto sobre la respuesta efectora de LT CD8+. Dada la naturaleza de la presentación antigénica, este primer abordaje implicó la elección del haplotipo HLA-A*02:01, uno de los más comunes en la población general, con cerca de un 20% de frecuencia en centro y Suramérica (159). Esto mejora las posibilidades de obtener muestras de individuos comparables, además de contar con la amplia disponibilidad de herramientas estandarizadas para ensayos inmunológicos en este haplotipo, como el tetrámero.

Por otro lado, fueron seleccionados antígenos modelo ampliamente caracterizados y con suficiente evidencia de su inmunogenicidad, proporcionando una base sobre las respuestas inmunológicas

esperables. La elección de antígenos modelo como CMV, MART-1 y NY-ESO-1 simplifica la adquisición de los elementos necesarios para el enfoque experimental, como lo son los péptidos sintéticos o la proteína recombinante completa asociada a estos antígenos.

El conocimiento sobre la inmunidad 'clásica' de CMV permite apalancarse en el hecho de que los huéspedes con infección aguda o persistente suelen inducir respuestas de LT a epítopes específicas (31), que se mantienen a largo plazo en frecuencias elevadas, especialmente en poblaciones CD8+ (30, 160). En este proyecto se utilizó como primer antígeno modelo la epítote inmunodominante de la proteína estructural pp65, con la cual fue posible evidenciar expansiones considerables de hasta 10 veces el porcentaje inicial de LT CD8+ específicos contra este antígeno. Esto permitió obtener un número suficiente de LT CD8+, que posibilitaron un análisis robusto por citometría de flujo y facilitó la interpretación de los resultados.

Utilizando el mismo enfoque, se implementó la expansión de LT CD8+ específicos para MART-1 en el donante LAND33, logrando un incremento de los precursores de aproximadamente siete veces en comparación con la línea no estimulada. Este aumento en el número de células demuestra la inmunogenicidad del péptido utilizado y la multiplicación selectiva de LT CD8+ específicos. Estos resultados corroboran los datos documentados en la literatura científica (38). Como era esperable, la identificación de donantes sanos portadores de LT CD8+ específicos para antígenos tumorales constituye una tarea laboriosa que implica la evaluación de un amplio grupo de personas, dado el bajo porcentaje de LT específicos contra dichos antígenos.

El donante MER, en quien se evaluó la presencia de LT CD8+ NY-ESO-1-específicos por tetrámero, se trata de un paciente con diagnóstico de cáncer de mama (152), por lo cual se presume que su condición de base afectó la funcionalidad y capacidad de expansión de los LT circulantes (161, 162). A diferencia de MART-1, NY-ESO-1 es una proteína que en condiciones normales se expresa únicamente en sitios inmunológicamente privilegiados como testículo y placenta, y no se encuentra presente en otros tejidos sanos (9). Esto dificulta obtener LT CD8+ NY-ESO-1-específicos en donantes sanos.

Una vez lograda la expansión de LT CD8+ específicos, se caracterizó la maduración de MoDCs en dos escenarios: luego de la estimulación con el coctel LPS en 4 donantes y utilizando tres cocteles distintos en un solo donante (LAND42). Esta última evaluación también se realizó para el donante LAND43 en un solo experimento, considerando que estas MoDCs se utilizarían como presentadoras para el experimento con clones de LT CD8+. El análisis conjunto de los seis donantes demostró que el coctel

LPS induce un aumento notable de los tres marcadores de maduración, aunque estos incrementos difieren en magnitud según el donante. La heterogeneidad individual se hizo especialmente evidente cuando se compararon los tres cocteles en MoDCs del donante LAND42, ya que el marcador CD83 no mostró los niveles observados en otros donantes para los cocteles α 1 y Std.

CD83 es un miembro de la superfamilia de las inmunoglobulinas (163), y ha sido considerado como uno de los marcadores de maduración más importantes (164-166). En la literatura se ha descrito una expresión incrementada de este marcador en las Std-mDCs respecto a las α 1-mDCs (167). Lo anterior pudo evidenciarse en los resultados obtenidos para el donante LAND43 (**sección 13.7.1**). Sin embargo, es escasa la bibliografía que relaciona la expresión de CD83 con el coctel de maduración utilizado.

Contrariamente, CD80 tuvo un comportamiento reproducible para todos los donantes y fue el marcador que mostró los mayores incrementos con los tres cocteles de maduración empleados, especialmente para el coctel LPS. Para LAND43, el coctel Std favoreció notablemente la expresión de CD80, a niveles comparables a los inducidos por el coctel LPS. Junto con CD86, CD80 es una de las principales moléculas coestimuladoras de las mDCs, quienes expresan niveles elevados de estos marcadores encargados de proporcionar la señal necesaria para la activación, expansión (señal 2) y diferenciación de LT, gracias a su unión con CD28 (168).

Por último, CD54 corresponde a un ligando para el complejo LFA-1, fundamental para el contacto célula a célula y la sinapsis inmunológica (169, 170). Se ha definido como un marcador de activación y maduración de APCs (171). De forma similar a CD80, este marcador reflejó incrementos notables luego con los estímulos de maduración, por lo cual constituye un indicador fiable del efecto de los cocteles sobre la maduración de MoDCs. Sin embargo, CD54 no puede utilizarse para evaluar maduración en un ensayo de fagocitosis, ya que algunas líneas tumorales pueden expresar esta molécula de adhesión (151, 169, 170), lo que interfiere con su análisis en MoDCs (datos no mostrados de ensayo de fagocitosis).

Con base en los resultados obtenidos, los marcadores CD80, CD83 y CD54 reflejan adecuadamente el estado de maduración de las MoDCs para la mayoría de los donantes. Cabe resaltar que existe una heterogeneidad individual y se dan algunas excepciones, como en el caso de CD83 para el donante LAND42. Desde este punto de vista, surge la pregunta sobre la importancia de una caracterización ‘personalizada’ de la maduración, ya que esta puede verse afectada de manera donante-dependiente según el estímulo de maduración utilizado. Esto podría tener impactos positivos en el diseño de

estrategias de maduración, proporcionando información valiosa para el refinamiento de los enfoques terapéuticos basados en MoDCs.

Una vez caracterizada la maduración de MoDCs, se continuó con la evaluación de su efecto sobre poblaciones de LT CD8+ antígeno-específicas estimuladas con distintos formatos del antígeno. La evaluación de tres donantes con LPS-MoDCs para el antígeno de CMV mostró que, para todos los casos y como era esperable, el péptido corto de la epítipo inmunogénica favoreció una respuesta efectora notable. Se observaron resultados similares con el péptido largo, en ambos formatos con predominio en la producción de IFN- γ . Dado que la producción de esta citoquina se dio en un periodo corto de tiempo luego del estímulo antigénico (6 h), es probable que la respuesta sea de LT CD8+ de memoria (57, 59-61). Es importante señalar que la subpoblación predominante fue la de LT CD8+ IFN- γ + TNF α +, y aunque no se evaluó la producción de IL-2 en este proyecto, este hecho refuerza la idea de la presencia de LT CD8+ polifuncionales (64-66). Por otra parte, de forma generalizada se observaron porcentajes muy bajos de LT CD8+ IFN- γ - TNF α +, lo que indica que la respuesta efectora probablemente no está dada por poblaciones LT_N (57, 59-61).

A diferencia de los péptidos, la proteína recombinante pp65 no favoreció respuestas potentes de citoquinas a las concentraciones utilizadas. Esto guarda relación con que los antígenos complejos pueden sufrir procesos de degradación dentro de la iDC durante el procesamiento, disminuyendo las probabilidades de presentar la epítipo inmunogénica blanco. En ese sentido, el incremento en la concentración de la proteína utilizada podría mejorar las probabilidades de una respuesta en este modelo *in vitro*. De otro lado, la duración del estímulo de las iDCs con la proteína, antes de la maduración, podría jugar un papel clave en el proceso de degradación, ya que una disminución de este tiempo (entre 8 y 16 horas, y no 24h como se hizo en este proyecto), podría promover la presentación cruzada, como reportó Alloatti et. al (2016) (128).

A pesar de estos resultados, la producción de citoquinas en el cultivo de la proteína recombinante fue ligeramente mayor que en los controles negativos utilizados (PBMCs y mDCs sin estímulo antigénico). Esto fue especialmente evidente para el donante LAND42, en cuyo caso se encontró significancia estadística entre las mDCs sin estímulo antigénico y con la proteína recombinante. Este hecho sugiere que, aunque en porcentajes bajos, se está produciendo una presentación cruzada del antígeno. Sin embargo, en dos de tres donantes esta respuesta estuvo dada predominantemente por LT CD8+ monofuncionales productores de IFN- γ . La literatura ha sugerido que estos se asocian a una baja capacidad de proliferación y un pobre control viral (64), por lo cual se hace necesario explorar los

mecanismos que explican las razones por las que este formato del antígeno orienta a una respuesta menos efectiva.

A nivel de subpoblaciones de memoria, no se observó una franca diferenciación hacia fenotipos efectores en ninguno de los donantes luego de los estímulos empleados. Es posible que esto se relacione con los porcentajes de células antígeno-específicas presentes en cada donante, que comprenden menos del 10% del total de LT CD8+. Dado que el análisis no se realizó sobre los LT CD8+ T-CMV+, que son la población directamente afectada por el estímulo antigénico, la diferenciación a células efectoras no se da para el general de la población de LT CD8+, lo que dificulta evidenciar dicha diferenciación en las poblaciones antígeno-específicas. Esto también se vio para el donante LAND42.

El análisis manual de estos ensayos sugiere que los cocteles de maduración tienen un efecto limitado sobre la respuesta inducida por los formatos del antígeno. Sin embargo, el coctel Std se sitúa como una buena alternativa para el donante LAND42, por cuanto provocó la respuesta más robusta y reproducible con porcentajes adecuados de LT CD8+ IFN- γ + TNF α + e IFN- γ + TNF α -. Esto cobra particular importancia al correlacionarlo con los resultados de la caracterización de Std-mDCs, ya que estas mostraron la menor expresión de marcadores de maduración en comparación con los otros dos cocteles. Lo anterior implica que expresión más elevada de moléculas coestimuladoras, como ocurre en las LPS-mDCs, podría no representar una ventaja para la inducción de respuestas efectoras de citoquinas en LT CD8+. Esto también se refuerza con los hallazgos del algoritmo CITRUS, que, aunque se hizo sobre el conjunto de todos los formatos del antígeno para cada coctel, insistió en que el coctel Std podría conferir un beneficio en la expansión de poblaciones de LT CD8+ productores de citoquinas para este donante. Las demás comparaciones se vieron afectadas por la amplia variabilidad en los resultados del coctel α 1.

A nivel de antígenos tumorales como MART-1, desafortunadamente no se observó producción de citoquinas luego de la estimulación con los formatos del antígeno en células del donante LAND33. Esto se explicaría en que se trata de un donante sano, y la subpoblación de LT CD8+ específica para este antígeno probablemente tenga un fenotipo LT_N. Por lo tanto, la respuesta efectora podría requerir un tiempo más prolongado de cultivo para alcanzar una diferenciación funcional.

Como era esperable, los clones de LT CD8+ específicos de CMV mostraron una respuesta marcada a la estimulación con péptidos. Estas células fueron obtenidas por la técnica de dilución límite (153). Así,

estas poblaciones suelen ser células terminalmente diferenciadas, con un fenotipo EM y EMRA. Aunque la respuesta de estos clones fue altamente específica para el péptido corto, el grado de respuesta fue similar para el péptido largo. Siendo este un péptido de 15aa existen dos explicaciones para esta respuesta: i) el péptido fue presentado directamente a LT CD8+ sin sufrir un procesamiento dentro de las APC; ii) se hizo una presentación cruzada del antígeno.

Para el primer caso, aunque se sabe que el bolsillo del MHC-I es cerrado y limita la longitud de los péptidos de unión a no más de 11aa, algunos estudios han sugerido que péptidos ligeramente más largos podrían adaptarse al MHC I cambiando su conformación (172). Sin embargo, también existe la posibilidad de que este péptido de 15 aa haya sido sometido a un procesamiento en la APC, por lo cual estaríamos ante un fenómeno de presentación cruzada. Este hecho también se apoya en los resultados de la proteína recombinante pp65, que indujo una respuesta de citoquinas en porcentajes bajos, pero superiores a los observados con el control negativo.

Se observaron resultados similares para los clones de LT CD8+ MART-1-específicos, aunque en este caso, la proteína recombinante no fue capaz de generar ningún tipo de respuesta efectora. Esto pudo obedecer a la concentración utilizada o el tiempo de estimulación (128) como se mencionó anteriormente.

En el caso del clon de NY-ESO-1 se observó una respuesta interesante por cuanto los clones no respondieron al péptido corto, pero sí al péptido largo. Sumado a este resultado, el clon tampoco mostró células tetrámero-positivas, por lo cual podría deducirse que su especificidad correspondía a una epítope distinta a la indicada. Es probable que la secuencia blanco del clon estuviese inmersa dentro del péptido largo de 15aa. De este modo, una vez procesado el péptido, pudo generarse y presentarse dicha epítope, desencadenando la respuesta efectora de los clones.

La comparación entre cocteles no mostró diferencias en la producción de citoquinas de los clones. Lamentablemente los resultados del péptido corto en el clon de MART-1 no permitieron realizar un análisis adecuado de la respuesta. Lo anterior podría ser atribuido al vial de péptido utilizado, a algún tipo de inhibición en la respuesta o a un estímulo intenso que condujo a muerte celular (76, 77) (ver expresión de PD-1 en clones más adelante).

Pasando al análisis de los marcadores de activación, es necesario mencionar que estos han constituido clásicamente un sustrato importante para la caracterización del fenotipo efector de LT CD8+. Uno de los más importantes ha sido el marcador CD69, como indicador temprano de activación (70-72, 173).

Sin embargo, para todos los ensayos realizados se observó un incremento generalizado de CD69 en los cultivos que utilizaron mDCs como presentadoras. Esto se vio tanto en las réplicas biológicas como en las réplicas experimentales de LAND42. En este último caso, se evidenciaron algunas sutiles diferencias relacionadas con el formato del antígeno y el coctel de maduración. Particularmente, los cultivos estimulados con proteína, especialmente el cultivo $\alpha 1$, evidenciaron la mayor expresión de este marcador. Por el contrario, los cultivos estimulados con péptidos tuvieron una expresión ligeramente menor que el control de mDCs sin estímulo antigénico, lo cual no guarda relación con lo observado en los ensayos de ICS. El marcador CD25, aunque solo se evaluó en el donante LAND42, mostró una gran variabilidad entre las réplicas del mismo donante, por lo cual tampoco mostró correlación con los resultados obtenidos en la producción de citoquinas.

En la literatura se ha sugerido que, además de Galectin-1 – presente en las DCS –, existe una amplia variedad de estímulos que desencadenan la expresión de CD69. Estos comprenden pequeñas moléculas de activación, la interacción anti-CD3, citoquinas, LPS y proteínas de choque térmico, entre otros (173). Esto explicaría porqué de forma generalizada se observó un ruido de fondo elevado para CD69 en los cultivos que utilizaron MoDCs como presentadoras y no PBMCs. Es posible que tanto la interacción mDCs-LT como los cocteles de maduración utilizados, pudieran inducir de forma temprana la expresión de CD69 en superficie, sin que esto se relacione con un fenotipo efector productor de citoquinas. Estos resultados no se ajustan a lo que ha sido descrito en la literatura para otros modelos experimentales, principalmente de enfermedad autoinmune (71, 73). La comparación solo mostró diferencias a nivel de la proteína, con una expresión ligeramente mayor en el caso de las $\alpha 1$ -mDCs. Sin embargo, no se encontró literatura que relacionara la expresión de este marcador con los cocteles de maduración.

CD25 también podría verse influenciado por citoquinas u otras moléculas pequeñas (78, 174), generando heterogeneidad en los resultados. Dado que CD25 se expresa luego de 24 horas del estímulo aplicado (67), que fue el punto de tiempo en el que se evaluaron los marcadores de activación en este proyecto, sería pertinente examinar su nivel de expresión en un punto de tiempo posterior.

En contraste, CD137 sí tuvo un comportamiento relacionado con la producción de citoquinas en los ensayos de los cuatro donantes. Esto confirma lo documentado en la literatura (80, 83, 84), siendo este marcador un reflejo adecuado de la respuesta efectora de LT activados. Resultados similares se obtuvieron para el donante LAND42 en los cocteles $\alpha 1$ y Std, pero no para el coctel LPS, en el que se

vio una amplia variabilidad. Lo anterior sugiere que este coctel de maduración podría tener algún impacto en la expresión de este marcador para este donante.

CD154 se mostró heterogéneo entre los donantes a nivel de la población general de LT CD8+. Las diferencias significativas observadas en la subpoblación de LT_{CM} para los distintos cocteles, sugiere que estos podrían incidir en el grado de expresión de CD154. Por otra parte, tanto en el análisis manual de marcadores como en CITRUS, la proteína recombinante favoreció una regulación al alta de CD154 en poblaciones CD8-, hecho que no ocurrió con otros formatos. Esto se ajusta a lo reportado en la literatura las poblaciones CD4+ (88, 92, 95-97), que además corresponde a lo esperable para un formato del antígeno complejo.

Otro hallazgo relevante fue el incremento de CD137 en poblaciones de LT CD8- luego de la estimulación con péptido corto para los cuatro donantes. Si bien los péptidos cortos históricamente han sido asociados a la presentación en clase I, favoreciendo la inducción de respuestas citotóxicas (175), algunos estudios han reportado respuestas de LT CD4+ a péptidos cortos para modelos infecciosos (176, 177). El primer informe para antígenos tumorales se dio para un péptido de 10aa de MART-1, que se consideró una epítipo mínima de LT CD4+ (178), además de que se encontraron LT CD4+ específicos para el péptido corto de MART-1 en pacientes vacunados con este péptido (179). Aunque no se ha dilucidado por completo como ocurre la presentación de estos péptidos en clase II, es posible que se relacione con el reconocimiento de epítipes mínimas poseedoras de los aminoácidos correctos de anclaje en el MHC de clase II (180). Otros estudios han evaluado péptidos cortos derivados de segmentos de secuencias óptimas que han sido reconocidos por LT CD4+, hecho que acentúa la idea de la flexibilidad del TCR en el reconocimiento de antígenos y el potencial de reactividad cruzada en el sistema inmune (181, 182).

En cuanto a los marcadores de agotamiento evaluados, en el caso del donante LAND42 hubo un incremento de PD-1 y CTLA-4 asociados al estímulo con péptidos, especialmente con el péptido corto. Esto fue cierto para todos los cocteles, aunque las α 1-mDCs presentaron una amplia variabilidad en los resultados. Para PD-1, estos resultados se remarcaron en la población de LT_{EM}. Considerando que no se vio un incremento de PD-1 en los cultivos de mDCs sin estímulo antigénico, es probable que la expresión de marcadores de agotamiento sean producto de un fenotipo efector activado (102). Esta expresión podría ser transitoria y su evaluación en un punto de tiempo posterior podría mostrar una disminución, según lo reportado en la literatura (116, 118).

Es importante resaltar que también se evidenció una correlación entre la expresión de PD-1 y la expresión de CD69, hecho que corrobora la idea de PD-1 como mecanismo regulador que aparece como consecuencia de una intensa activación. Estudios recientes han confirmado la inducción de PD-1 mediada por CD69 a través de NFAT (183) y también se ha planteado que CD69 puede ser un predictor de la respuesta PD-1/PD-L1 (184).

En el caso de los clones, CTLA-4 también se asoció a este fenotipo efector; Sin embargo, PD-1 mostró una expresión generalizada incluso para los controles negativos de estimulación. En ese sentido, este marcador podría ser un indicador de un fenotipo agotado de clones, que encontraría su explicación en el mecanismo de generación de esta población y su diferenciación efectora previa (153). Es posible que el bloqueo de este receptor pudiera mejorar los resultados de la respuesta efectora de estos clones.

Por otro lado, el marcador LAG-3 mostró un comportamiento más dependiente del tipo de coctel de maduración utilizado, ya que se mostró aumentado con los cocteles α 1 y LPS, incluso en los cultivos que emplearon mDCs sin estímulo antigénico. Por el contrario, el coctel Std mostró la menor expresión de este marcador independientemente del formato del antígeno empleado. Estos resultados se correlacionan con la producción ligeramente mejorada de citoquinas para este coctel observada en los ensayos del donante LAND42. Su incremento favorecido por las otras condiciones de cultivo podría explicar algunos de los resultados negativos obtenidos con las α 1-mDCs, y parte de la disminución observada para el coctel LPS.

La literatura ha reportado que para el caso de los LT CD4+, la unión de LAG-3 al MHC II depende de la expresión de moléculas accesorias y de otras propiedades de las APC, así como de los péptidos presentados y los haplotipos de MHC (185, 186). Por otra parte, también se han reportado otros ligandos de LAG-3 dentro de los que se encuentran lectinas como Gal-3 y LSEctin, expresadas en DCs (187, 188). Los resultados obtenidos hacen necesario explorar posibles moléculas o ligandos expresados en distintos tipos de mDCs sobre la expresión de LAG-3 en LT CD8+. El efecto de cocteles de intensa estimulación con citoquinas como el α 1 y el LPS, y el marcado incremento de marcadores de maduración podría participar en la inducción de LAG-3 como mecanismo regulador que a su vez afecta la respuesta efectora de LT. Esto podría dar luces sobre el rol de los cocteles de maduración en la inducción de LAG-3, y por ende en la interferencia sobre ciertas respuestas efectoras de LT CD8+, evento del cual hay escasa literatura (189, 190).

En conjunto, los resultados obtenidos en estos ensayos reflejan las particularidades inherentes a la respuesta de cada donante. Esto señala que la inmunología constituye una disciplina compleja que reviste dificultades a la hora de estudiar los grupos de individuos. Por esta razón cobra relevancia el estudio individual de los donantes en virtud de los nuevos abordajes de medicina personalizada.

Pasando al análisis de células tumorales como formulación del antígeno, se pudo establecer la expresión de los antígenos de interés por las líneas tumorales utilizadas, lo que permitió su uso como sustrato de los ensayos realizados. La línea SKMEL-37 expresó mRNA tanto de MART-1 como de NY-ESO-1, y aunque se ha corroborado la expresión de la segunda en diversas publicaciones (135, 138), la expresión de MART-1 no ha sido tan ampliamente documentada. Sin embargo, se ha reportado expresión del mRNA de MART-1 a bajos niveles (155), lo cual se explica en que esta proteína corresponde a un marcador de diferenciación melanocítica (156) expresada en una gran variedad de melanomas (35).

Las líneas tumorales fueron tratadas utilizando distintos agentes quimioterapéuticos, y por medio del ensayo MTT fue posible determinar las IC_{50} para cada fármaco y para cada línea con los medicamentos disponibles en el laboratorio. Como era esperable, las dosis establecidas para los tres fármacos fueron diferentes a las reportadas en la literatura para otros modelos (191-195) y distintas a las establecidas para otras líneas tumorales en el GI&MT (149). Pese a que en los ensayos realizados no se observaron efectos sinérgicos empleando las combinaciones de fármacos, fue posible detectar la expresión de CRL como indicador de ICD (196-199). Estos resultados fueron significativos, especialmente para la línea MALME-3M. Tanto doxorubicina (196, 197, 199, 200) como carboplatino (201, 202) y paclitaxel (203) han sido reportados como inductores de ICD. Los resultados obtenidos son una contribución al conocimiento sobre ICD favorecida por estos fármacos en estas líneas tumorales, información de la cual hay escasos reportes en la literatura.

Adicionalmente, la expresión de CLR en la superficie de células MALME-3M promovió la fagocitosis de estas células apoptóticas por iDCs en una tasa superior a lo observado con células tumorales vivas. También se vio un notable aumento en la expresión de marcadores de maduración por DCs que fagocitaron estas células tratadas. Esto se ajusta a lo reportado en literatura, ya que CRL ha sido descrita como una señal canónica de captura por células fagocíticas (204, 205), por lo cual su aumento potenciado por estos fármacos se traduce en una fagocitosis incrementada. Así mismo, la CLR también se ha asociado a la mejora en la maduración de MoDCs (206, 207), tal y como se observó en el ensayo realizado en este trabajo.

No obstante, el uso de células tumorales como formulación del antígeno, no mostró indicios de una respuesta efectora asociada a la presentación cruzada del antígeno. Este resultado podría ser explicado por múltiples variables ligadas a la calidad de la respuesta, dentro de las cuales se señalan: el 'exceso' de co-estimulación proporcionado por iDCs estimuladas con células tumorales y con expresión incrementada de marcadores de maduración; la persistencia de moléculas inhibitoras liberadas por la línea tumoral en el medio de las iDCs; la dificultad en la degradación de una formulación compleja del antígeno, que diluye la epítope blanco de los clones; o el aumento de marcadores de agotamiento como PD-1 y LAG-3 observado en los clones MART-1+. En conjunto, estos resultados reiteran en la necesidad de explorar con mayor detalle las condiciones de cultivo utilizadas para evaluar el fenómeno de presentación cruzada.

En conclusión, la inmunología se configura como una disciplina compleja, amoldada a un extenso entramado de variables de orden individual o externo. Los resultados de este proyecto sugieren que el avance hacia una medicina personalizada es cada vez más evidente, requiriendo un examen meticuloso del impacto de cada intervención, incluso desde modelos de estudio *in vitro*. Como se observó, la expansión de LT CD8+ estimulados no necesariamente se traduce en respuestas efectoras mejoradas de producción de citoquinas o fenotipo de activación ante un estímulo dado. Así mismo, una mayor expresión de marcadores de maduración de MoDCs no necesariamente conducen a una presentación del antígeno efectiva. Por lo contrario, la elección de un coctel de maduración o un formato del antígeno para un individuo pone de manifiesto sutiles diferencias que podrían determinar si una respuesta inmune es efectiva o no. Esto es aplicable tanto para modelos de antígeno tradicionales como para la elección de antígenos personalizados. Por lo tanto, es crucial evaluar con detenimiento las diversas interacciones y efectos que pueden variar según cada individuo, haciendo un análisis cuidadoso de cada marcador y del efecto de las intervenciones en cada fase del diseño de vacunas personalizadas.

15 PERSPECTIVAS

Los resultados obtenidos con este trabajo plantearon un panorama general sobre la respuesta inmune generada con los distintos estímulos y condiciones de cultivo. Sin embargo, para lograr resultados más robustos y aplicables, se recomienda considerar los siguientes aspectos para fases futuras del proyecto:

1. **Evaluación de una muestra más grande de individuos:** una limitación importante de este proyecto fue el número de individuos en el que se analizaron todas las variables, principalmente para el caso de los antígenos tumorales. Aunque se hizo un análisis relativamente completo de las respuestas generadas por el antígeno de CMV en combinación con diferentes cocteles de maduración en un solo donante, este mismo abordaje no se completó para los antígenos tumorales. Esto obedece a la dificultad en la obtención de muestras de individuos que pudieran aportar células específicas para estos antígenos. Adicionalmente, en el modelo viral no se cuenta con el formato de lisado celular. Esto limita la interpretación de los resultados, y es probable que un análisis más robusto de antígenos tumorales evidencie diferencias en la respuesta respecto al modelo viral empleado.
2. **Evaluación de antígenos tumorales en células de pacientes:** con motivo de los resultados obtenidos con el paciente MER, se plantea llevar a cabo este abordaje con células de pacientes, ya que la respuesta observada alberga grandes diferencias con la de los individuos sanos. En ese sentido, el estudio de estas variables en células de pacientes portadores de tumores de interés podría contribuir de mejor forma a la aplicabilidad de esta caracterización de la respuesta en el contexto de la inmunoterapia del cáncer. No obstante, es importante resaltar que la información obtenida en donantes sanos es esencial en un intento por construir una base de datos de la respuesta basal esperada *in vitro*.
3. **Condiciones de cultivo y estímulos utilizados:** se hace necesario estandarizar las dosis utilizadas en algunos de los formatos del antígeno, como fue el caso de la proteína recombinante y las células tumorales. Es factible que un ajuste de este estímulo pueda mejorar la respuesta observada e incrementar las posibilidades de observar un fenómeno de presentación cruzada del antígeno.
4. **Evaluación de tetrámero intracelular:** una de las limitaciones más importantes de este trabajo fue la imposibilidad de medir la producción de citoquinas y marcadores de activación en

células tetrámero-positivas. Esto se debe a que el tetrámero es internalizado por el LT luego del estímulo con MoDCs durante el cocultivo, y en el laboratorio aun no se cuenta con un método estandarizado para evaluar tetrámero intracelular. Por lo tanto, se propone ahondar en los métodos disponibles para la evaluación del tetrámero en estas condiciones, de forma que sea posible caracterizar de manera más específica la respuesta efectora de estos LT antígeno-específicos.

5. **Realización de ensayos de citotoxicidad:** se propone sumar a marcadores de citotoxicidad al panel de evaluación del fenotipo efector de LT, ya que esto contribuye a perfilar de manera mas completa la aplicabilidad de estos abordajes en este y otros modelos *in vitro*.
6. **Uso de otros sistemas de entrega antigénica:** aunque en este proyecto se evaluaron los formatos del antígeno tradicionales, existen otros sistemas de entrega antigénica en APCs como es el caso de los métodos de transfección con minigenes o transducción con lentivirus. Para estas formulaciones también se hace necesaria una adecuada caracterización de las respuestas generadas, además de observar el efecto que podrían tener los estímulos de maduración sobre esta forma de presentación por parte de MoDCs.

16 CONSIDERACIONES ÉTICAS

De acuerdo con la **Resolución No. 008430 de 1993** (4 de octubre de 1993), '*por la cual se establecen las Normas Científicas, Técnicas y Administrativas para la Investigación en Salud en Colombia*'; TÍTULO II, Capítulo I: *de los aspectos éticos de la investigación en seres humanos*, artículo 11 numeral b, este proyecto entra en la categoría de **Investigación con riesgo mínimo** para los donantes. Las células de los donantes sanos destinadas a los experimentos del proyecto se obtuvieron del Instituto Distrital de Ciencia, Biotecnología e innovación en Salud (IDCBIS) de la ciudad de Bogotá y esta institución fue la encargada de la toma de la muestra de sangre, como se estipula en el proyecto *Optimización de las células dendríticas autólogas como estrategia de inmunoterapia en pacientes con cáncer* aprobado en la convocatoria 807 de 2018 de Minciencias a cargo de la Fundación Salud de los Andes y la Universidad Nacional de Colombia; y en el marco del Convenio de cooperación interinstitucional entre la facultad de Medicina y el IDCBIS. Las muestras fueron procesadas en el laboratorio del GI&MT en las instalaciones de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional de Colombia, manteniendo la confidencialidad de los datos, realizando una disposición adecuada de los desechos químicos y biológicos resultantes; y utilizando los equipos e instalaciones adecuadas del laboratorio. Este proyecto fue avalado por el comité de ética de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional de Colombia mediante el **acta 006 del 13 de abril de 2023** (ver Anexo 1).

17 POSTER Y PONENCIAS

Durante el desarrollo de este trabajo se participó en dos eventos científicos donde se socializaron los resultados de este trabajo:

1. **VI Encuentro de Investigaciones - Asociación Colombiana de Inmunología (ACOI)**. Ponencia de modalidad presencial realizada en Instalaciones de la Universidad El Bosque el 10 de marzo de 2023 (Anexo 2).
2. **21° Día de la Investigación: Sistemas de salud e investigación – Fundación Cardioinfantil y Fundación Neumológica Colombiana**. Poster impreso modalidad presencial, evento realizado en las instalaciones de la Fundación Cardioinfantil el 17 de noviembre de 2023 (Anexos 3 y 4).

18 REFERENCIAS

1. Gierlich P, Lex V, Technau A, Keupp A, Morper L, Glunz A, et al. Prostaglandin E(2) in a TLR3- and 7/8-agonist-based DC maturation cocktail generates mature, cytokine-producing, migratory DCs but impairs antigen cross-presentation to CD8(+) T cells. *Cancer Immunol Immunother.* 2020;69(6):1029-42.
2. Chamucero-Millares JA, Bernal-Estevez DA, Parra-Lopez CA. 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;360:104257.
3. Patente TA, Pinho MP, Oliveira AA, Evangelista GCM, Bergami-Santos PC, Barbuto JAM. Human Dendritic Cells: Their Heterogeneity and Clinical Application Potential in Cancer Immunotherapy. *Front Immunol.* 2018;9:3176.
4. Granot T, Senda T, Carpenter DJ, Matsuoka N, Weiner J, Gordon CL, et al. Dendritic Cells Display Subset and Tissue-Specific Maturation Dynamics over Human Life. *Immunity.* 2017;46(3):504-15.
5. Lamberti MJ, Nigro A, Mentucci FM, Rumie Vittar NB, Casolaro V, Dal Col J. Dendritic Cells and Immunogenic Cancer Cell Death: A Combination for Improving Antitumor Immunity. *Pharmaceutics.* 2020;12(3).
6. Bol KF, Schreibelt G, Gerritsen WR, de Vries IJ, Figdor CG. Dendritic Cell-Based Immunotherapy: State of the Art and Beyond. *Clin Cancer Res.* 2016;22(8):1897-906.
7. Sabado RL, Balan S, Bhardwaj N. Dendritic cell-based immunotherapy. *Cell Res.* 2017;27(1):74-95.
8. Hu Z, Ott PA, Wu CJ. Towards personalized, tumour-specific, therapeutic vaccines for cancer. *Nat Rev Immunol.* 2018;18(3):168-82.
9. Thomas R, Al-Khadairi G, Roelands J, Hendrickx W, Dermime S, Bedognetti D, et al. NY-ESO-1 Based Immunotherapy of Cancer: Current Perspectives. *Front Immunol.* 2018;9:947.
10. Mastelic-Gavillet B, Balint K, Boudousquie C, Gannon PO, Kandalaf LE. Personalized Dendritic Cell Vaccines-Recent Breakthroughs and Encouraging Clinical Results. *Front Immunol.* 2019;10:766.
11. Sarivalasis A, Boudousquie C, Balint K, Stevenson BJ, Gannon PO, Iancu EM, et al. A Phase I/II trial comparing autologous dendritic cell vaccine pulsed either with personalized peptides (PEP-DC) or with tumor lysate (OC-DC) in patients with advanced high-grade ovarian serous carcinoma. *J Transl Med.* 2019;17(1):391.
12. Prins RM, Wang X, Soto H, Young E, Lisiero DN, Fong B, et al. Comparison of glioma-associated antigen peptide-loaded versus autologous tumor lysate-loaded dendritic cell vaccination in malignant glioma patients. *J Immunother.* 2013;36(2):152-7.
13. Castiello L, Sabatino M, Jin P, Clayberger C, Marincola FM, Krensky AM, et al. Monocyte-derived DC maturation strategies and related pathways: a transcriptional view. *Cancer Immunol Immunother.* 2011;60(4):457-66.
14. C DEW, M VDB, Hoefnagel M. Regulatory perspective on in vitro potency assays for human dendritic cells used in anti-tumor immunotherapy. *Cytotherapy.* 2018;20(11):1289-308.
15. Lee J, Breton G, Oliveira TY, Zhou YJ, Aljoufi A, Puhr S, et al. Restricted dendritic cell and monocyte progenitors in human cord blood and bone marrow. *J Exp Med.* 2015;212(3):385-99.
16. Gerlini G, Urso C, Mariotti G, Di Gennaro P, Palli D, Brandani P, et al. Plasmacytoid dendritic cells represent a major dendritic cell subset in sentinel lymph nodes of melanoma patients and accumulate in metastatic nodes. *Clin Immunol.* 2007;125(2):184-93.

17. Wylie B, Macri C, Mintern JD, Waithman J. Dendritic Cells and Cancer: From Biology to Therapeutic Intervention. *Cancers (Basel)*. 2019;11(4).
18. Huysamen C, Willment JA, Dennehy KM, Brown GD. CLEC9A is a novel activation C-type lectin-like receptor expressed on BDCA3+ dendritic cells and a subset of monocytes. *J Biol Chem*. 2008;283(24):16693-701.
19. Sancho D, Joffre OP, Keller AM, Rogers NC, Martinez D, Hernanz-Falcon P, et al. Identification of a dendritic cell receptor that couples sensing of necrosis to immunity. *Nature*. 2009;458(7240):899-903.
20. Constantino J, Gomes C, Falcao A, Neves BM, Cruz MT. Dendritic cell-based immunotherapy: a basic review and recent advances. *Immunol Res*. 2017;65(4):798-810.
21. Calmeiro J, Mendes L, Duarte IF, Leitao C, Tavares AR, Ferreira DA, et al. In-Depth Analysis of the Impact of Different Serum-Free Media on the Production of Clinical Grade Dendritic Cells for Cancer Immunotherapy. *Front Immunol*. 2020;11:593363.
22. Munz C, Dao T, Ferlazzo G, de Cos MA, Goodman K, Young JW. Mature myeloid dendritic cell subsets have distinct roles for activation and viability of circulating human natural killer cells. *Blood*. 2005;105(1):266-73.
23. Luo XL, Dalod M. The quest for faithful in vitro models of human dendritic cells types. *Mol Immunol*. 2020;123:40-59.
24. Chiang CL, Kandalaf LE, Tanyi J, Hagemann AR, Motz GT, Svoronos N, et al. A dendritic cell vaccine pulsed with autologous hypochlorous acid-oxidized ovarian cancer lysate primes effective broad antitumor immunity: from bench to bedside. *Clin Cancer Res*. 2013;19(17):4801-15.
25. Mailliard RB, Wankowicz-Kalinska A, Cai Q, Wesa A, Hilkens CM, Kapsenberg ML, et al. alpha-type-1 polarized dendritic cells: a novel immunization tool with optimized CTL-inducing activity. *Cancer Res*. 2004;64(17):5934-7.
26. Lee JJ, Foon KA, Mailliard RB, Muthuswamy R, Kalinski P. Type 1-polarized dendritic cells loaded with autologous tumor are a potent immunogen against chronic lymphocytic leukemia. *J Leukoc Biol*. 2008;84(1):319-25.
27. Garris CS, Arlauckas SP, Kohler RH, Trefny MP, Garren S, Piot C, et al. Successful Anti-PD-1 Cancer Immunotherapy Requires T Cell-Dendritic Cell Crosstalk Involving the Cytokines IFN-gamma and IL-12. *Immunity*. 2018;49(6):1148-61 e7.
28. Del Prete A, Sozio F, Barbazza I, Salvi V, Tiberio L, Laffranchi M, et al. Functional Role of Dendritic Cell Subsets in Cancer Progression and Clinical Implications. *Int J Mol Sci*. 2020;21(11).
29. Cannon MJ, Schmid DS, Hyde TB. Review of cytomegalovirus seroprevalence and demographic characteristics associated with infection. *Rev Med Virol*. 2010;20(4):202-13.
30. Terrazzini N, Kern F. Cell-mediated immunity to human CMV infection: a brief overview. *F1000Prime Rep*. 2014;6:28.
31. Schober K, Buchholz VR, Busch DH. TCR repertoire evolution during maintenance of CMV-specific T-cell populations. *Immunol Rev*. 2018;283(1):113-28.
32. O'Hara GA, Welten SP, Klenerman P, Arens R. Memory T cell inflation: understanding cause and effect. *Trends Immunol*. 2012;33(2):84-90.
33. Khan N, Best D, Bruton R, Nayak L, Rickinson AB, Moss PA. T cell recognition patterns of immunodominant cytomegalovirus antigens in primary and persistent infection. *J Immunol*. 2007;178(7):4455-65.
34. Wills MR, Carmichael AJ, Mynard K, Jin X, Weekes MP, Plachter B, et al. The human cytotoxic T-lymphocyte (CTL) response to cytomegalovirus is dominated by structural protein pp65: frequency, specificity, and T-cell receptor usage of pp65-specific CTL. *J Virol*. 1996;70(11):7569-79.
35. Pittet MJ, Zippelius A, Valmori D, Speiser DE, Cerottini JC, Romero P. Melan-A/MART-1-specific CD8 T cells: from thymus to tumor. *Trends Immunol*. 2002;23(7):325-8.

36. Coulie PG, Brichard V, Van Pel A, Wolfel T, Schneider J, Traversari C, et al. A new gene coding for a differentiation antigen recognized by autologous cytolytic T lymphocytes on HLA-A2 melanomas. *J Exp Med*. 1994;180(1):35-42.
37. Pittet MJ, Valmori D, Dunbar PR, Speiser DE, Lienard D, Lejeune F, et al. High frequencies of naive Melan-A/MART-1-specific CD8(+) T cells in a large proportion of human histocompatibility leukocyte antigen (HLA)-A2 individuals. *J Exp Med*. 1999;190(5):705-15.
38. Alanio C, Lemaitre F, Law HK, Hasan M, Albert ML. Enumeration of human antigen-specific naive CD8+ T cells reveals conserved precursor frequencies. *Blood*. 2010;115(18):3718-25.
39. Valmori D, Fonteneau JF, Lizana CM, Gervois N, Lienard D, Rimoldi D, et al. Enhanced generation of specific tumor-reactive CTL in vitro by selected Melan-A/MART-1 immunodominant peptide analogues. *J Immunol*. 1998;160(4):1750-8.
40. van Elsas A, van der Burg SH, van der Minne CE, Borghi M, Mourer JS, Melief CJ, et al. Peptide-pulsed dendritic cells induce tumoricidal cytotoxic T lymphocytes from healthy donors against stably HLA-A*0201-binding peptides from the Melan-A/MART-1 self antigen. *Eur J Immunol*. 1996;26(8):1683-9.
41. Bakker AB, Marland G, de Boer AJ, Huijbens RJ, Danen EH, Adema GJ, et al. Generation of antimelanoma cytotoxic T lymphocytes from healthy donors after presentation of melanoma-associated antigen-derived epitopes by dendritic cells in vitro. *Cancer Res*. 1995;55(22):5330-4.
42. Cebon J, Knights A, Ebert L, Jackson H, Chen W. Evaluation of cellular immune responses in cancer vaccine recipients: lessons from NY-ESO-1. *Expert Rev Vaccines*. 2010;9(6):617-29.
43. Chen YT, Scanlan MJ, Sahin U, Tureci O, Gure AO, Tsang S, et al. A testicular antigen aberrantly expressed in human cancers detected by autologous antibody screening. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1997;94(5):1914-8.
44. Sabbatini P, Tsuji T, Ferran L, Ritter E, Sedrak C, Tuballes K, et al. Phase I trial of overlapping long peptides from a tumor self-antigen and poly-ICLC shows rapid induction of integrated immune response in ovarian cancer patients. *Clin Cancer Res*. 2012;18(23):6497-508.
45. Raza A, Merhi M, Inchakalody VP, Krishnankutty R, Relecom A, Uddin S, et al. Unleashing the immune response to NY-ESO-1 cancer testis antigen as a potential target for cancer immunotherapy. *J Transl Med*. 2020;18(1):140.
46. Slingluff CL, Jr. The present and future of peptide vaccines for cancer: single or multiple, long or short, alone or in combination? *Cancer J*. 2011;17(5):343-50.
47. Yamshchikov GV, Barnd DL, Eastham S, Galavotti H, Patterson JW, Deacon DH, et al. Evaluation of peptide vaccine immunogenicity in draining lymph nodes and peripheral blood of melanoma patients. *Int J Cancer*. 2001;92(5):703-11.
48. Rosenberg SA, Sherry RM, Morton KE, Scharfman WJ, Yang JC, Topalian SL, et al. Tumor progression can occur despite the induction of very high levels of self/tumor antigen-specific CD8+ T cells in patients with melanoma. *J Immunol*. 2005;175(9):6169-76.
49. Toes RE, Blom RJ, Offringa R, Kast WM, Melief CJ. Enhanced tumor outgrowth after peptide vaccination. Functional deletion of tumor-specific CTL induced by peptide vaccination can lead to the inability to reject tumors. *J Immunol*. 1996;156(10):3911-8.
50. Toes RE, Offringa R, Blom RJ, Melief CJ, Kast WM. Peptide vaccination can lead to enhanced tumor growth through specific T-cell tolerance induction. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996;93(15):7855-60.
51. Janssen EM, Droin NM, Lemmens EE, Pinkoski MJ, Bensinger SJ, Ehst BD, et al. CD4+ T-cell help controls CD8+ T-cell memory via TRAIL-mediated activation-induced cell death. *Nature*. 2005;434(7029):88-93.

52. Srinivasan M, Domanico SZ, Kaumaya PT, Pierce SK. Peptides of 23 residues or greater are required to stimulate a high affinity class II-restricted T cell response. *Eur J Immunol.* 1993;23(5):1011-6.
53. Zwaveling S, Ferreira Mota SC, Nouta J, Johnson M, Lipford GB, Offringa R, et al. Established human papillomavirus type 16-expressing tumors are effectively eradicated following vaccination with long peptides. *J Immunol.* 2002;169(1):350-8.
54. Ma Y, Adjemian S, Mattarollo SR, Yamazaki T, Aymeric L, Yang H, et al. Anticancer chemotherapy-induced intratumoral recruitment and differentiation of antigen-presenting cells. *Immunity.* 2013;38(4):729-41.
55. Pathak SK, Skold AE, Mohanram V, Persson C, Johansson U, Spetz AL. Activated apoptotic cells induce dendritic cell maturation via engagement of Toll-like receptor 4 (TLR4), dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule 3 (ICAM-3)-grabbing nonintegrin (DC-SIGN), and beta2 integrins. *J Biol Chem.* 2012;287(17):13731-42.
56. Han Q, Bagheri N, Bradshaw EM, Hafler DA, Lauffenburger DA, Love JC. Polyfunctional responses by human T cells result from sequential release of cytokines. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2012;109(5):1607-12.
57. de Araujo-Souza PS, Hanschke SCH, Nardy A, Secca C, Oliveira-Vieira B, Silva KL, et al. Differential interferon-gamma production by naive and memory-like CD8 T cells. *J Leukoc Biol.* 2020;108(4):1329-37.
58. Bhat P, Leggatt G, Waterhouse N, Frazer IH. Interferon-gamma derived from cytotoxic lymphocytes directly enhances their motility and cytotoxicity. *Cell Death Dis.* 2017;8(6):e2836.
59. Lachmann R, Bajwa M, Vita S, Smith H, Cheek E, Akbar A, et al. Polyfunctional T cells accumulate in large human cytomegalovirus-specific T cell responses. *J Virol.* 2012;86(2):1001-9.
60. Gubser PM, Bantug GR, Razik L, Fischer M, Dimeloe S, Hoenger G, et al. Rapid effector function of memory CD8+ T cells requires an immediate-early glycolytic switch. *Nat Immunol.* 2013;14(10):1064-72.
61. Sathaliyawala T, Kubota M, Yudanin N, Turner D, Camp P, Thome JJ, et al. Distribution and compartmentalization of human circulating and tissue-resident memory T cell subsets. *Immunity.* 2013;38(1):187-97.
62. Mehta AK, Gracias DT, Croft M. TNF activity and T cells. *Cytokine.* 2018;101:14-8.
63. Brehm MA, Daniels KA, Welsh RM. Rapid production of TNF-alpha following TCR engagement of naive CD8 T cells. *J Immunol.* 2005;175(8):5043-9.
64. Harari A, Dutoit V, Cellerai C, Bart PA, Du Pasquier RA, Pantaleo G. Functional signatures of protective antiviral T-cell immunity in human virus infections. *Immunol Rev.* 2006;211:236-54.
65. Healy ZR, Weinhold KJ, Murdoch DM. Transcriptional Profiling of CD8+ CMV-Specific T Cell Functional Subsets Obtained Using a Modified Method for Isolating High-Quality RNA From Fixed and Permeabilized Cells. *Front Immunol.* 2020;11:1859.
66. Imai N, Tawara I, Yamane M, Muraoka D, Shiku H, Ikeda H. CD4(+) T cells support polyfunctionality of cytotoxic CD8(+) T cells with memory potential in immunological control of tumor. *Cancer Sci.* 2020;111(6):1958-68.
67. Reddy M, Eirikis E, Davis C, Davis HM, Prabhakar U. 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):127-42.
68. Adamczyk M, Bartosinska J, Raczkiewicz D, Kowal M, Surdacka A, Krasowska D, et al. The Expression of Activation Markers CD25 and CD69 Increases during Biologic Treatment of Psoriasis. *J Clin Med.* 2023;12(20).

-
69. Cebrian M, Yague E, Rincon M, Lopez-Botet M, de Landazuri MO, Sanchez-Madrid F. Triggering of T cell proliferation through AIM, an activation inducer molecule expressed on activated human lymphocytes. *J Exp Med*. 1988;168(5):1621-37.
 70. Risso A, Smilovich D, Capra MC, Baldissarro I, Yan G, Bargellesi A, et al. CD69 in resting and activated T lymphocytes. Its association with a GTP binding protein and biochemical requirements for its expression. *J Immunol*. 1991;146(12):4105-14.
 71. Cibrian D, Sanchez-Madrid F. CD69: from activation marker to metabolic gatekeeper. *Eur J Immunol*. 2017;47(6):946-53.
 72. Ziegler SF, Ramsdell F, Alderson MR. The activation antigen CD69. *Stem Cells*. 1994;12(5):456-65.
 73. Gonzalez-Amaro R, Cortes JR, Sanchez-Madrid F, Martin P. Is CD69 an effective brake to control inflammatory diseases? *Trends Mol Med*. 2013;19(10):625-32.
 74. de la Fuente H, Cruz-Adalia A, Martinez Del Hoyo G, Cibrian-Vera D, Bonay P, Perez-Hernandez D, et al. The leukocyte activation receptor CD69 controls T cell differentiation through its interaction with galectin-1. *Mol Cell Biol*. 2014;34(13):2479-87.
 75. Sakaguchi S, Sakaguchi N, Asano M, Itoh M, Toda M. Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. *J Immunol*. 1995;155(3):1151-64.
 76. Brusko TM, Wasserfall CH, Hulme MA, Cabrera R, Schatz D, Atkinson MA. Influence of membrane CD25 stability on T lymphocyte activity: implications for immunoregulation. *PLoS One*. 2009;4(11):e7980.
 77. Green DR, Droin N, Pinkoski M. Activation-induced cell death in T cells. *Immunol Rev*. 2003;193:70-81.
 78. Poulton TA, Gallagher A, Potts RC, Beck JS. Changes in activation markers and cell membrane receptors on human peripheral blood T lymphocytes during cell cycle progression after PHA stimulation. *Immunology*. 1988;64(3):419-25.
 79. Watts TH. TNF/TNFR family members in costimulation of T cell responses. *Annu Rev Immunol*. 2005;23:23-68.
 80. Wolfi M, Kuball J, Eyrich M, Schlegel PG, Greenberg PD. Use of CD137 to study the full repertoire of CD8+ T cells without the need to know epitope specificities. *Cytometry A*. 2008;73(11):1043-9.
 81. Wen T, Bukczynski J, Watts TH. 4-1BB ligand-mediated costimulation of human T cells induces CD4 and CD8 T cell expansion, cytokine production, and the development of cytolytic effector function. *J Immunol*. 2002;168(10):4897-906.
 82. Halstead ES, Mueller YM, Altman JD, Katsikis PD. In vivo stimulation of CD137 broadens primary antiviral CD8+ T cell responses. *Nat Immunol*. 2002;3(6):536-41.
 83. Vinay DS, Kwon BS. Role of 4-1BB in immune responses. *Semin Immunol*. 1998;10(6):481-9.
 84. Etxeberria I, Glez-Vaz J, Teijeira A, Melero I. New emerging targets in cancer immunotherapy: CD137/4-1BB costimulatory axis. *ESMO Open*. 2020;4(Suppl 3):e000733.
 85. Alosaimi MF, Hoenig M, Jaber F, Platt CD, Jones J, Wallace J, et al. Immunodeficiency and EBV-induced lymphoproliferation caused by 4-1BB deficiency. *J Allergy Clin Immunol*. 2019;144(2):574-83 e5.
 86. Zhu Y, Zhu G, Luo L, Flies AS, Chen L. CD137 stimulation delivers an antigen-independent growth signal for T lymphocytes with memory phenotype. *Blood*. 2007;109(11):4882-9.
 87. Melero I, Shuford WW, Newby SA, Aruffo A, Ledbetter JA, Hellstrom KE, et al. Monoclonal antibodies against the 4-1BB T-cell activation molecule eradicate established tumors. *Nat Med*. 1997;3(6):682-5.

88. Grewal IS, Flavell RA. CD40 and CD154 in cell-mediated immunity. *Annu Rev Immunol.* 1998;16:111-35.
89. Caux C, Massacrier C, Vanbervliet B, Dubois B, Van Kooten C, Durand I, et al. Activation of human dendritic cells through CD40 cross-linking. *J Exp Med.* 1994;180(4):1263-72.
90. Bennett SR, Carbone FR, Karamalis F, Flavell RA, Miller JF, Heath WR. Help for cytotoxic-T-cell responses is mediated by CD40 signalling. *Nature.* 1998;393(6684):478-80.
91. Schoenberger SP, Toes RE, van der Voort EI, Offringa R, Melief CJ. T-cell help for cytotoxic T lymphocytes is mediated by CD40-CD40L interactions. *Nature.* 1998;393(6684):480-3.
92. Tay NQ, Lee DCP, Chua YL, Prabhu N, Gascoigne NRJ, Kemeny DM. CD40L Expression Allows CD8(+) T Cells to Promote Their Own Expansion and Differentiation through Dendritic Cells. *Front Immunol.* 2017;8:1484.
93. Wong KL, Lew FC, MacAry PA, Kemeny DM. CD40L-expressing CD8 T cells prime CD8alpha(+) DC for IL-12p70 production. *Eur J Immunol.* 2008;38(8):2251-62.
94. Wong KL, Tang LF, Lew FC, Wong HS, Chua YL, MacAry PA, et al. CD44high memory CD8 T cells synergize with CpG DNA to activate dendritic cell IL-12p70 production. *J Immunol.* 2009;183(1):41-50.
95. Bourgeois C, Rocha B, Tanchot C. A role for CD40 expression on CD8+ T cells in the generation of CD8+ T cell memory. *Science.* 2002;297(5589):2060-3.
96. Hernandez MG, Shen L, Rock KL. CD40-CD40 ligand interaction between dendritic cells and CD8+ T cells is needed to stimulate maximal T cell responses in the absence of CD4+ T cell help. *J Immunol.* 2007;178(5):2844-52.
97. Shugart JA, Bambina S, Alice AF, Montler R, Bahjat KS. A self-help program for memory CD8+ T cells: positive feedback via CD40-CD40L signaling as a critical determinant of secondary expansion. *PLoS One.* 2013;8(5):e64878.
98. Olson MR, Seah SG, Edenborough K, Doherty PC, Lew AM, Turner SJ. CD154+ CD4+ T-cell dependence for effective memory influenza virus-specific CD8+ T-cell responses. *Immunol Cell Biol.* 2014;92(7):605-11.
99. Stinchcombe JC, Majorovits E, Bossi G, Fuller S, Griffiths GM. Centrosome polarization delivers secretory granules to the immunological synapse. *Nature.* 2006;443(7110):462-5.
100. Ballesteros-Tato A, Leon B, Lee BO, Lund FE, Randall TD. Epitope-specific regulation of memory programming by differential duration of antigen presentation to influenza-specific CD8(+) T cells. *Immunity.* 2014;41(1):127-40.
101. Blank CU, Haining WN, Held W, Hogan PG, Kallies A, Lugli E, et al. Defining 'T cell exhaustion'. *Nat Rev Immunol.* 2019;19(11):665-74.
102. Ahn E, Araki K, Hashimoto M, Li W, Riley JL, Cheung J, et al. Role of PD-1 during effector CD8 T cell differentiation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2018;115(18):4749-54.
103. Wherry EJ. T cell exhaustion. *Nat Immunol.* 2011;12(6):492-9.
104. Sharpe AH, Wherry EJ, Ahmed R, Freeman GJ. The function of programmed cell death 1 and its ligands in regulating autoimmunity and infection. *Nat Immunol.* 2007;8(3):239-45.
105. Hui E, Cheung J, Zhu J, Su X, Taylor MJ, Wallweber HA, et al. T cell costimulatory receptor CD28 is a primary target for PD-1-mediated inhibition. *Science.* 2017;355(6332):1428-33.
106. Parry RV, Chemnitz JM, Frauwirth KA, Lanfranco AR, Braunstein I, Kobayashi SV, et al. CTLA-4 and PD-1 receptors inhibit T-cell activation by distinct mechanisms. *Mol Cell Biol.* 2005;25(21):9543-53.
107. Dong H, Zhu G, Tamada K, Chen L. B7-H1, a third member of the B7 family, co-stimulates T-cell proliferation and interleukin-10 secretion. *Nat Med.* 1999;5(12):1365-9.
108. Tseng SY, Otsuji M, Gorski K, Huang X, Slansky JE, Pai SI, et al. B7-DC, a new dendritic cell molecule with potent costimulatory properties for T cells. *J Exp Med.* 2001;193(7):839-46.

-
109. Keir ME, Freeman GJ, Sharpe AH. PD-1 regulates self-reactive CD8+ T cell responses to antigen in lymph nodes and tissues. *J Immunol.* 2007;179(8):5064-70.
 110. Brahmer JR, Tykodi SS, Chow LQ, Hwu WJ, Topalian SL, Hwu P, et al. Safety and activity of anti-PD-L1 antibody in patients with advanced cancer. *N Engl J Med.* 2012;366(26):2455-65.
 111. Meng X, Liu X, Guo X, Jiang S, Chen T, Hu Z, et al. FBXO38 mediates PD-1 ubiquitination and regulates anti-tumour immunity of T cells. *Nature.* 2018;564(7734):130-5.
 112. Chan DV, Gibson HM, Aufiero BM, Wilson AJ, Hafner MS, Mi QS, et al. Differential CTLA-4 expression in human CD4+ versus CD8+ T cells is associated with increased NFAT1 and inhibition of CD4+ proliferation. *Genes Immun.* 2014;15(1):25-32.
 113. Dariavach P, Mattei MG, Golstein P, Lefranc MP. Human Ig superfamily CTLA-4 gene: chromosomal localization and identity of protein sequence between murine and human CTLA-4 cytoplasmic domains. *Eur J Immunol.* 1988;18(12):1901-5.
 114. Harper K, Balzano C, Rouvier E, Mattei MG, Luciani MF, Golstein P. CTLA-4 and CD28 activated lymphocyte molecules are closely related in both mouse and human as to sequence, message expression, gene structure, and chromosomal location. *J Immunol.* 1991;147(3):1037-44.
 115. Auchincloss H, Turka LA. CTLA-4: not all costimulation is stimulatory. *J Immunol.* 2011;187(7):3457-8.
 116. Lindsten T, Lee KP, Harris ES, Petryniak B, Craighead N, Reynolds PJ, et al. Characterization of CTLA-4 structure and expression on human T cells. *J Immunol.* 1993;151(7):3489-99.
 117. Gajewski TF, Fallarino F, Fields PE, Rivas F, Alegre ML. Absence of CTLA-4 lowers the activation threshold of primed CD8+ TCR-transgenic T cells: lack of correlation with Src homology domain 2-containing protein tyrosine phosphatase. *J Immunol.* 2001;166(6):3900-7.
 118. Walunas TL, Lenschow DJ, Bakker CY, Linsley PS, Freeman GJ, Green JM, et al. CTLA-4 can function as a negative regulator of T cell activation. *Immunity.* 1994;1(5):405-13.
 119. Triebel F, Jitsukawa S, Baixeras E, Roman-Roman S, Genevee C, Viegas-Pequignot E, et al. LAG-3, a novel lymphocyte activation gene closely related to CD4. *J Exp Med.* 1990;171(5):1393-405.
 120. Workman CJ, Cauley LS, Kim IJ, Blackman MA, Woodland DL, Vignali DA. Lymphocyte activation gene-3 (CD223) regulates the size of the expanding T cell population following antigen activation in vivo. *J Immunol.* 2004;172(9):5450-5.
 121. Hannier S, Tournier M, Bismuth G, Triebel F. CD3/TCR complex-associated lymphocyte activation gene-3 molecules inhibit CD3/TCR signaling. *J Immunol.* 1998;161(8):4058-65.
 122. Workman CJ, Dugger KJ, Vignali DA. Cutting edge: molecular analysis of the negative regulatory function of lymphocyte activation gene-3. *J Immunol.* 2002;169(10):5392-5.
 123. Huard B, Tournier M, Hercend T, Triebel F, Faure F. Lymphocyte-activation gene 3/major histocompatibility complex class II interaction modulates the antigenic response of CD4+ T lymphocytes. *Eur J Immunol.* 1994;24(12):3216-21.
 124. Goldberg MV, Drake CG. LAG-3 in Cancer Immunotherapy. *Curr Top Microbiol Immunol.* 2011;344:269-78.
 125. Blackburn SD, Shin H, Haining WN, Zou T, Workman CJ, Polley A, et al. Coregulation of CD8+ T cell exhaustion by multiple inhibitory receptors during chronic viral infection. *Nat Immunol.* 2009;10(1):29-37.
 126. Bijker MS, van den Eeden SJ, Franken KL, Melief CJ, van der Burg SH, Offringa R. Superior induction of anti-tumor CTL immunity by extended peptide vaccines involves prolonged, DC-focused antigen presentation. *Eur J Immunol.* 2008;38(4):1033-42.
 127. Gutierrez-Martinez E, Planes R, Anselmi G, Reynolds M, Menezes S, Adiko AC, et al. Cross-Presentation of Cell-Associated Antigens by MHC Class I in Dendritic Cell Subsets. *Front Immunol.* 2015;6:363.

128. Alloatti A, Kotsias F, Magalhaes JG, Amigorena S. Dendritic cell maturation and cross-presentation: timing matters! *Immunol Rev.* 2016;272(1):97-108.
129. Menager J, Ebstein F, Oger R, Hulin P, Nedellec S, Duverger E, 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):e89897.
130. Tang-Huau TL, Gueguen P, Goudot C, Durand M, Bohec M, Baulande S, et al. Human in vivo-generated monocyte-derived dendritic cells and macrophages cross-present antigens through a vacuolar pathway. *Nat Commun.* 2018;9(1):2570.
131. Fonteneau JF, Kavanagh DG, Lirvall M, Sanders C, Cover TL, Bhardwaj N, et al. Characterization of the MHC class I cross-presentation pathway for cell-associated antigens by human dendritic cells. *Blood.* 2003;102(13):4448-55.
132. Du J MA, Widlund HR, Horstmann MA, Ramaswamy S, Fisher DE. MLANA/MART1 and SILV/PMEL17/GP100 are transcriptionally regulated by MITF in melanocytes and melanoma. *Am J Pathol.* 2003(Jul;163(1):333-43.).
133. Li J, Song JS, Bell RJ, Tran TN, Haq R, Liu H, et al. YY1 regulates melanocyte development and function by cooperating with MITF. *PLoS Genet.* 2012;8(5):e1002688.
134. Vidard L. 4-1BB and cytokines trigger human NK, gammadelta T, and CD8(+) T cell proliferation and activation, but are not required for their effector functions. *Immun Inflamm Dis.* 2023;11(1):e749.
135. Almunia C, Bretaudeau M, Held G, Babon A, Marchetti C, Castelli FA, et al. Bee Venom Phospholipase A2, a Good "Chauffeur" for Delivering Tumor Antigen to the MHC I and MHC II Peptide-Loading Compartments of the Dendritic Cells: The Case of NY-ESO-1. *PLoS One.* 2013;8(6):e67645.
136. Levy F, Muehlethaler K, Salvi S, Peitrequin AL, Lindholm CK, Cerottini JC, et al. Ubiquitylation of a melanosomal protein by HECT-E3 ligases serves as sorting signal for lysosomal degradation. *Mol Biol Cell.* 2005;16(4):1777-87.
137. Sabbatino F, Wang Y, Scognamiglio G, Favoino E, Feldman SA, Villani V, et al. Antitumor Activity of BRAF Inhibitor and IFNalpha Combination in BRAF-Mutant Melanoma. *J Natl Cancer Inst.* 2016;108(7).
138. Suriano R, Rajoria S, A LG, Geliebter J, Wallack M, Tiwari RK. Ex vivo derived primary melanoma cells: implications for immunotherapeutic vaccines. *J Cancer.* 2013;4(5):371-82.
139. Sallusto F, Lanzavecchia A. Efficient presentation of soluble antigen by cultured human dendritic cells is maintained by granulocyte/macrophage colony-stimulating factor plus interleukin 4 and downregulated by tumor necrosis factor alpha. *J Exp Med.* 1994;179(4):1109-18.
140. Jonuleit H, Kuhn U, Muller G, Steinbrink K, Paragnik L, Schmitt E, et al. Pro-inflammatory cytokines and prostaglandins induce maturation of potent immunostimulatory dendritic cells under fetal calf serum-free conditions. *Eur J Immunol.* 1997;27(12):3135-42.
141. Martinuzzi E, Afonso G, Gagnerault MC, Naselli G, Mittag D, Combadiere B, et al. acDCs enhance human antigen-specific T-cell responses. *Blood.* 2011;118(8):2128-37.
142. Aspod C, Leloup C, Reche S, Plumas J. pDCs efficiently process synthetic long peptides to induce functional virus- and tumour-specific T-cell responses. *Eur J Immunol.* 2014;44(10):2880-92.
143. Wada H, Isobe M, Kakimi K, Mizote Y, Eikawa S, Sato E, et al. Vaccination with NY-ESO-1 overlapping peptides mixed with Picibanil OK-432 and montanide ISA-51 in patients with cancers expressing the NY-ESO-1 antigen. *J Immunother.* 2014;37(2):84-92.
144. Martínez-Enríquez L. Identificación y caracterización de linfocitos T neoantígeno específicos de donantes sanos con fines de inmunoterapia en cáncer: Universidad Nacional de Colombia; 2022.

145. Weekes MP, Wills MR, Mynard K, Carmichael AJ, Sissons JG. The memory cytotoxic T-lymphocyte (CTL) response to human cytomegalovirus infection contains individual peptide-specific CTL clones that have undergone extensive expansion in vivo. *J Virol.* 1999;73(3):2099-108.
146. Solache A, Morgan CL, Dodi AI, Morte C, Scott I, Baboonian C, 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):5512-8.
147. Bruggner RV, Bodenmiller B, Dill DL, Tibshirani RJ, Nolan GP. Automated identification of stratifying signatures in cellular subpopulations. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2014;111(26):E2770-7.
148. Carmichael J, DeGraff WG, Gazdar AF, Minna JD, Mitchell JB. Evaluation of a tetrazolium-based semiautomated colorimetric assay: assessment of chemosensitivity testing. *Cancer Res.* 1987;47(4):936-42.
149. Infante-Crúz A. Activación de respuesta inmune innata a partir de la inducción de muerte tumoral inmunogénica.: Universidad Nacional de Colombia; 2016.
150. Yadav B, Wennerberg K, Aittokallio T, Tang J. Searching for Drug Synergy in Complex Dose-Response Landscapes Using an Interaction Potency Model. *Comput Struct Biotechnol J.* 2015;13:504-13.
151. Altomonte M, Gloghini A, Bertola G, Gasparollo A, Carbone A, Ferrone S, et al. Differential expression of cell adhesion molecules CD54/CD11a and CD58/CD2 by human melanoma cells and functional role in their interaction with cytotoxic cells. *Cancer Res.* 1993;53(14):3343-8.
152. Bernal Estévez D. Evaluación de la capacidad inmuno-estimulante de la terapia neo-adyuvante con Doxorubicina y Ciclofosfamida en pacientes con cáncer de mama: Universidad Nacional de Colombia Sede Bogotá 2017.
153. Mariotti S, Nisini R. Generation of human T cell clones. *Methods Mol Biol.* 2009;514:65-93.
154. Klapper JA, Thomasian AA, Smith DM, Gorgas GC, Wunderlich JR, Smith FO, et al. Single-pass, closed-system rapid expansion of lymphocyte cultures for adoptive cell therapy. *J Immunol Methods.* 2009;345(1-2):90-9.
155. Rimoldi D, Muehlethaler K, Salvi S, Valmori D, Romero P, Cerottini JC, et al. Subcellular localization of the melanoma-associated protein Melan-AMART-1 influences the processing of its HLA-A2-restricted epitope. *J Biol Chem.* 2001;276(46):43189-96.
156. Busam KJ JA. Melan-A, a new melanocytic differentiation marker. *Adv Anat Pathol.* 1999(Jan;6(1):12-8.).
157. Blass E, Ott PA. Advances in the development of personalized neoantigen-based therapeutic cancer vaccines. *Nat Rev Clin Oncol.* 2021;18(4):215-29.
158. Wahida A, Buschhorn L, Frohling S, Jost PJ, Schneeweiss A, Lichter P, et al. The coming decade in precision oncology: six riddles. *Nat Rev Cancer.* 2023;23(1):43-54.
159. Olivier T, Haslam A, Tuia J, Prasad V. Eligibility for Human Leukocyte Antigen-Based Therapeutics by Race and Ethnicity. *JAMA Netw Open.* 2023;6(10):e2338612.
160. Welten SPM, Baumann NS, Oxenius A. Fuel and brake of memory T cell inflation. *Med Microbiol Immunol.* 2019;208(3-4):329-38.
161. van der Leun AM, Thommen DS, Schumacher TN. CD8(+) T cell states in human cancer: insights from single-cell analysis. *Nat Rev Cancer.* 2020;20(4):218-32.
162. Rodriguez IJ, Bernal-Estevez DA, Llano-Leon M, Bonilla CE, Parra-Lopez CA. Neoadjuvant chemotherapy modulates exhaustion of T cells in breast cancer patients. *PLoS One.* 2023;18(2):e0280851.
163. Zhou LJ, Schwarting R, Smith HM, Tedder TF. A novel cell-surface molecule expressed by human interdigitating reticulum cells, Langerhans cells, and activated lymphocytes is a new member of the Ig superfamily. *J Immunol.* 1992;149(2):735-42.

164. Zhou LJ, Tedder TF. Human blood dendritic cells selectively express CD83, a member of the immunoglobulin superfamily. *J Immunol.* 1995;154(8):3821-35.
165. Lechmann M, Berchtold S, Hauber J, Steinkasserer A. CD83 on dendritic cells: more than just a marker for maturation. *Trends Immunol.* 2002;23(6):273-5.
166. Li Z, Ju X, Silveira PA, Abadir E, Hsu WH, Hart DNJ, et al. CD83: Activation Marker for Antigen Presenting Cells and Its Therapeutic Potential. *Front Immunol.* 2019;10:1312.
167. Trepiaikas R, Pedersen AE, Met O, Hansen MH, Berntsen A, Svane IM. Comparison of alpha-Type-1 polarizing and standard dendritic cell cytokine cocktail for maturation of therapeutic monocyte-derived dendritic cell preparations from cancer patients. *Vaccine.* 2008;26(23):2824-32.
168. Li JG, Du YM, Yan ZD, Yan J, Zhuansun YX, Chen R, et al. CD80 and CD86 knockdown in dendritic cells regulates Th1/Th2 cytokine production in asthmatic mice. *Exp Ther Med.* 2016;11(3):878-84.
169. Dustin ML, Rothlein R, Bhan AK, Dinarello CA, Springer TA. Induction by IL 1 and interferon-gamma: tissue distribution, biochemistry, and function of a natural adherence molecule (ICAM-1). *J Immunol.* 1986;137(1):245-54.
170. Carrasco YR, Fleire SJ, Cameron T, Dustin ML, Batista FD. LFA-1/ICAM-1 interaction lowers the threshold of B cell activation by facilitating B cell adhesion and synapse formation. *Immunity.* 2004;20(5):589-99.
171. Sheikh NA, Jones LA. CD54 is a surrogate marker of antigen presenting cell activation. *Cancer Immunol Immunother.* 2008;57(9):1381-90.
172. Josephs TM, Grant EJ, Gras S. Molecular challenges imposed by MHC-I restricted long epitopes on T cell immunity. *Biol Chem.* 2017;398(9):1027-36.
173. Jimenez-Fernandez M, de la Fuente H, Martin P, Cibrian D, Sanchez-Madrid F. Unraveling CD69 signaling pathways, ligands and laterally associated molecules. *EXCLI J.* 2023;22:334-51.
174. Hosono M, de Boer OJ, van der Wal AC, van der Loos CM, Teeling P, Piek JJ, et al. Increased expression of T cell activation markers (CD25, CD26, CD40L and CD69) in atherectomy specimens of patients with unstable angina and acute myocardial infarction. *Atherosclerosis.* 2003;168(1):73-80.
175. Engelhard VH. Structure of peptides associated with class I and class II MHC molecules. *Annu Rev Immunol.* 1994;12:181-207.
176. Wang M, Larsen MV, Nielsen M, Harndahl M, Justesen S, Dziegiel MH, et al. HLA class I binding 9mer peptides from influenza A virus induce CD4 T cell responses. *PLoS One.* 2010;5(5):e10533.
177. Wang M, Tang ST, Stryhn A, Justesen S, Larsen MV, Dziegiel MH, et al. Identification of MHC class II restricted T-cell-mediated reactivity against MHC class I binding Mycobacterium tuberculosis peptides. *Immunology.* 2011;132(4):482-91.
178. Bioley G, Jandus C, Tuyaearts S, Rimoldi D, Kwok WW, Speiser DE, et al. Melan-A/MART-1-specific CD4 T cells in melanoma patients: identification of new epitopes and ex vivo visualization of specific T cells by MHC class II tetramers. *J Immunol.* 2006;177(10):6769-79.
179. Jandus C, Bioley G, Dojcinovic D, Derre L, Baitsch L, Wieckowski S, et al. Tumor antigen-specific FOXP3+ CD4 T cells identified in human metastatic melanoma: peptide vaccination results in selective expansion of Th1-like counterparts. *Cancer Res.* 2009;69(20):8085-93.
180. Gross S, Lennerz V, Gallerani E, Mach N, Bohm S, Hess D, et al. Short Peptide Vaccine Induces CD4+ T Helper Cells in Patients with Different Solid Cancers. *Cancer Immunol Res.* 2016;4(1):18-25.
181. Hemmer B, Kondo T, Gran B, Pinilla C, Cortese I, Pascal J, et al. Minimal peptide length requirements for CD4(+) T cell clones--implications for molecular mimicry and T cell survival. *Int Immunol.* 2000;12(3):375-83.

182. Meeuwse MH, Wouters AK, Hagedoorn RS, Kester MGD, Remst DFG, van der Steen DM, et al. Cutting Edge: Unconventional CD8(+) T Cell Recognition of a Naturally Occurring HLA-A*02:01-Restricted 20mer Epitope. *J Immunol.* 2022;208(8):1851-6.
183. Jimenez-Fernandez M, Rodriguez-Sinovas C, Canes L, Ballester-Servera C, Vara A, Requena S, et al. CD69-oxLDL ligand engagement induces Programmed Cell Death 1 (PD-1) expression in human CD4 + T lymphocytes. *Cell Mol Life Sci.* 2022;79(8):468.
184. Hu ZW, Sun W, Wen YH, Ma RQ, Chen L, Chen WQ, et al. CD69 and SBK1 as potential predictors of responses to PD-1/PD-L1 blockade cancer immunotherapy in lung cancer and melanoma. *Front Immunol.* 2022;13:952059.
185. Maruhashi T, Okazaki IM, Sugiura D, Takahashi S, Maeda TK, Shimizu K, et al. LAG-3 inhibits the activation of CD4(+) T cells that recognize stable pMHCII through its conformation-dependent recognition of pMHCII. *Nat Immunol.* 2018;19(12):1415-26.
186. MacLachlan BJ, Mason GH, Greenshields-Watson A, Triebel F, Gallimore A, Cole DK, et al. Molecular characterization of HLA class II binding to the LAG-3 T cell co-inhibitory receptor. *Eur J Immunol.* 2021;51(2):331-41.
187. Liu W, Tang L, Zhang G, Wei H, Cui Y, Guo L, et al. Characterization of a novel C-type lectin-like gene, LSEctin: demonstration of carbohydrate binding and expression in sinusoidal endothelial cells of liver and lymph node. *J Biol Chem.* 2004;279(18):18748-58.
188. Kouo T, Huang L, Pucsek AB, Cao M, Solt S, Armstrong T, et al. Galectin-3 Shapes Antitumor Immune Responses by Suppressing CD8+ T Cells via LAG-3 and Inhibiting Expansion of Plasmacytoid Dendritic Cells. *Cancer Immunol Res.* 2015;3(4):412-23.
189. Lichtenegger FS, Rothe M, Schnorfeil FM, Deiser K, Krupka C, Augsberger C, et al. Targeting LAG-3 and PD-1 to Enhance T Cell Activation by Antigen-Presenting Cells. *Front Immunol.* 2018;9:385.
190. Andrae S, Piras F, Burdin N, Triebel F. Maturation and activation of dendritic cells induced by lymphocyte activation gene-3 (CD223). *J Immunol.* 2002;168(8):3874-80.
191. Tiago M, de Oliveira EM, Brohem CA, Pennacchi PC, Paes RD, Haga RB, et al. Fibroblasts protect melanoma cells from the cytotoxic effects of doxorubicin. *Tissue Eng Part A.* 2014;20(17-18):2412-21.
192. Mehraj U, Mir IA, Hussain MU, Alkhanani M, Wani NA, Mir MA. Adapalene and Doxorubicin Synergistically Promote Apoptosis of TNBC Cells by Hyperactivation of the ERK1/2 Pathway Through ROS Induction. *Front Oncol.* 2022;12:938052.
193. Licarete E, Rauca VF, Luput L, Drotar D, Stejerean I, Patras L, et al. Overcoming Intrinsic Doxorubicin Resistance in Melanoma by Anti-Angiogenic and Anti-Metastatic Effects of Liposomal Prednisolone Phosphate on Tumor Microenvironment. *Int J Mol Sci.* 2020;21(8).
194. Bernard S, Poon AC, Tam PM, Mutsaers AJ. Investigation of the effects of mTOR inhibitors rapamycin and everolimus in combination with carboplatin on canine malignant melanoma cells. *BMC Vet Res.* 2021;17(1):382.
195. Liebmann JE, Cook JA, Lipschultz C, Teague D, Fisher J, Mitchell JB. Cytotoxic studies of paclitaxel (Taxol) in human tumour cell lines. *Br J Cancer.* 1993;68(6):1104-9.
196. Fucikova J, Kepp O, Kasikova L, Petroni G, Yamazaki T, Liu P, et al. Detection of immunogenic cell death and its relevance for cancer therapy. *Cell Death Dis.* 2020;11(11):1013.
197. Kim DY, Pyo A, Yun M, Thangam R, You SH, Zhang Y, et al. Imaging Calreticulin for Early Detection of Immunogenic Cell Death During Anticancer Treatment. *J Nucl Med.* 2021;62(7):956-60.
198. Obeid M, Tesniere A, Ghiringhelli F, Fimia GM, Apetoh L, Perfettini JL, et al. Calreticulin exposure dictates the immunogenicity of cancer cell death. *Nat Med.* 2007;13(1):54-61.
199. Liu P, Zhao L, Kepp O, Kroemer G. Quantitation of calreticulin exposure associated with immunogenic cell death. *Methods Enzymol.* 2020;632:1-13.

-
200. Mistarz A, Graczyk M, Winkler M, Singh PK, Cortes E, Miliotto A, et al. Induction of cell death in ovarian cancer cells by doxorubicin and oncolytic vaccinia virus is associated with CREB3L1 activation. *Mol Ther Oncolytics*. 2021;23:38-50.
201. Golden EB, Frances D, Pellicciotta I, Demaria S, Helen Barcellos-Hoff M, Formenti SC. Radiation fosters dose-dependent and chemotherapy-induced immunogenic cell death. *Oncoimmunology*. 2014;3:e28518.
202. Schaer DA, Geeganage S, Amaladas N, Lu ZH, Rasmussen ER, Sonyi A, et al. The Folate Pathway Inhibitor Pemetrexed Pleiotropically Enhances Effects of Cancer Immunotherapy. *Clin Cancer Res*. 2019;25(23):7175-88.
203. Lau TS, Chan LKY, Man GCW, Wong CH, Lee JHS, Yim SF, et al. Paclitaxel Induces Immunogenic Cell Death in Ovarian Cancer via TLR4/IKK2/SNARE-Dependent Exocytosis. *Cancer Immunol Res*. 2020;8(8):1099-111.
204. Arandjelovic S, Ravichandran KS. Phagocytosis of apoptotic cells in homeostasis. *Nat Immunol*. 2015;16(9):907-17.
205. Gardai SJ, McPhillips KA, Frasch SC, Janssen WJ, Starefeldt A, Murphy-Ullrich JE, et al. Cell-surface calreticulin initiates clearance of viable or apoptotic cells through trans-activation of LRP on the phagocyte. *Cell*. 2005;123(2):321-34.
206. Liu X, Li J, Liu Y, Ding J, Tong Z, Liu Y, et al. Calreticulin acts as an adjuvant to promote dendritic cell maturation and enhances antigen-specific cytotoxic T lymphocyte responses against non-small cell lung cancer cells. *Cell Immunol*. 2016;300:46-53.
207. Kepp O, Senovilla L, Vitale I, Vacchelli E, Adjemian S, Agostinis P, et al. Consensus guidelines for the detection of immunogenic cell death. *Oncoimmunology*. 2014;3(9):e955691.

19 DATOS SUPLEMENTARIOS

19.1 Tipificación de HLA-A de alta resolución de muestras de donantes sanos

Tabla suplementaria 1. Donantes sanos tipificados para el haplotipo HLA-A

Donante	Edad	Sexo	HLA-A	
LAND-001	30 años	Femenino	02:01:01G	02:01:01G
LAND-002	25 años	Femenino	02:01:01G	02:01:01G
LAND-003	23 años	Masculino	22:01:01G	02:01:01G
LAND-004	21 años	Femenino	02:01:01G	23:01:01G
LAND-005	30 años	Femenino	02:01:01G	32:01:01G
LAND-006	21 años	Femenino	02:01:01G	24:02:01G
LAND-010	20 años	Masculino	02:01:01G	24:02:01G
LAND-012	30 años	Masculino	02:01:01G	23:01:01G
LAND-013	24 años	Masculino	01:01:01G	02:01:01G
LAND-015	22 años	Femenino	02:01:01G	26:01:01G
LAND-017	27 años	Femenino	02:01:01G	33:01:01G
LAND-018	22 años	Femenino	01:01:01G	02:01:01G
LAND-019	20 años	Masculino	02:01:01G	02:01:01G
LAND-21	28 años	Masculino	02:01:01G	24:14:01G
LAND-22	36 años	Masculino	02:01:01G	32:01:01G
LAND-024	33 años	Femenino	02:01:01G	26:01:01G
LAND-025	25 años	Masculino	02:01:01G	31:01:02G
LAND-026	23 años	Masculino	02:22:01G	02:22:01G
LAND-027	29 años	Femenino	02:01:01G	23:01:01G
LAND-028	26 años	Femenino	02:01:01G	29:02:01G
LAND-030	23 años	Femenino	02:01:01G	24:03:02
LAND-031	19 años	Masculino	02:02:01G	02:01:01G
LAND-032	25 años	Masculino	02:01:01G	02:01:01G
LAND-033	27 años	Femenino	02:01:01G	02:01:01G
LAND-034	26 años	Masculino	02:22:01G	03:01:01G
LAND-037	27 años	Masculino	02:01:01G	24:03:02
LAND-038	24 años	Masculino	02:01:01G	24:02:01G
LAND-039	25 años	Masculino	02:11:01G	31:01:02G
LAND-040	23 años	Masculino	02:22:01G	03:02:01G
LAND-042	31 años	Masculino	02:01:01G	02:01:01G
LAND-043	39 años	Masculino	02:01:01G	24:02:01G
LAND-044	28 años	Masculino	02:22:01G	02:01:01G

19.2 Análisis de LT CD8+ productores de IFN- γ mediante el protocolo ICS en el donante LAND13

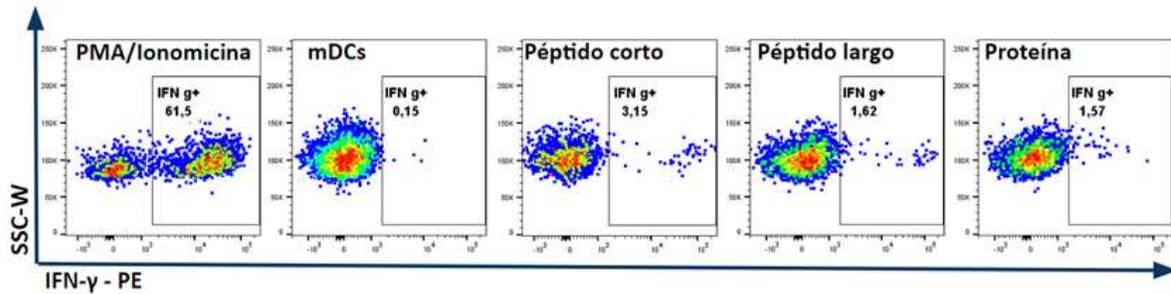


Figura suplementaria 1. Evaluación de poblaciones de LT CD8+ productores de IFN- γ del donante LAND13. Análisis de las poblaciones de LT CD8+ productores de IFN- γ , cultivados con MoDCs estimuladas con diferentes formulaciones del antígeno de CMV. No fue posible evaluar la producción de TNF α por un defecto en el anticuerpo utilizado.

19.3 Evaluación de marcadores de agotamiento en LT CD8+ del donante LAND33

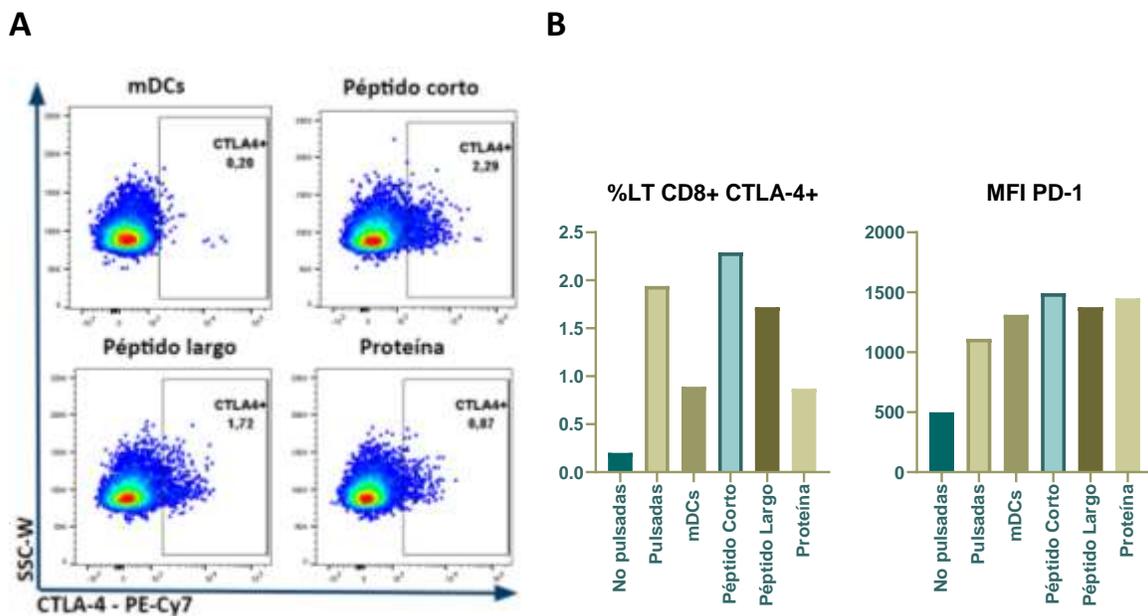
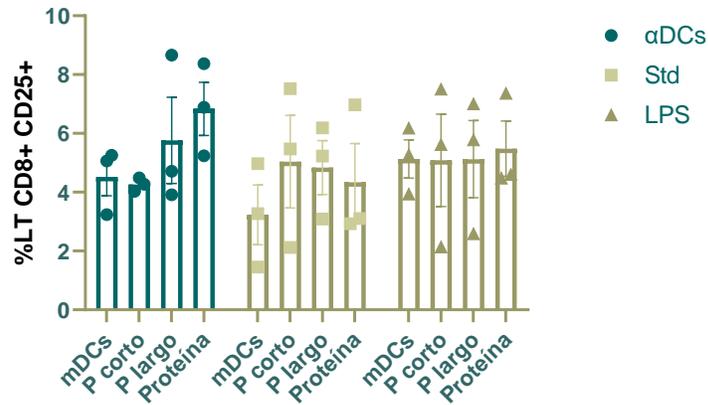


Figura suplementaria 2. Evaluación de marcadores de agotamiento en LT CD8+ del donante LAND33. A. Diagrama de puntos representativo del marcador CTLA-4. **B.** Las barras representan la población de LT CD8+ CTLA-4+ y la MFI para el marcador PD-1 en la población de LT CD8+.

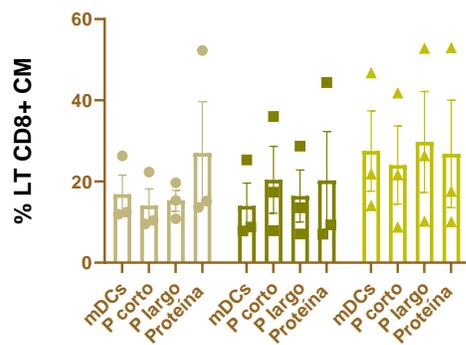
19.4 Evaluación de marcadores de activación en las subpoblaciones de memoria en LT CD8+ del donante LAND42

19.4.1 CD25

A



B



C

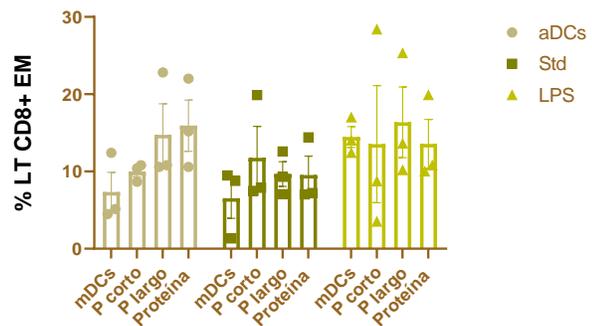


Figura suplementaria 3. Evaluación del marcador CD25 en la población general y sobre las subpoblaciones de memoria CM y EM

19.4.2 CD137

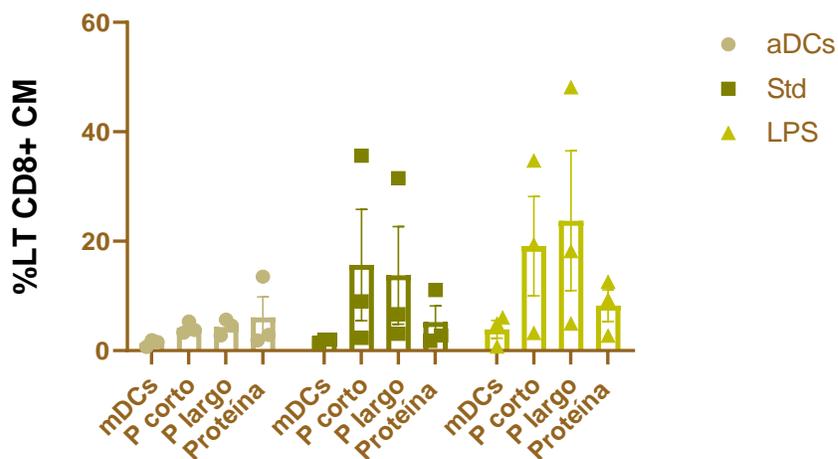


Figura suplementaria 4. Evaluación del marcador CD137 en la subpoblación de LT CD8+ CM

19.4.3 CD154

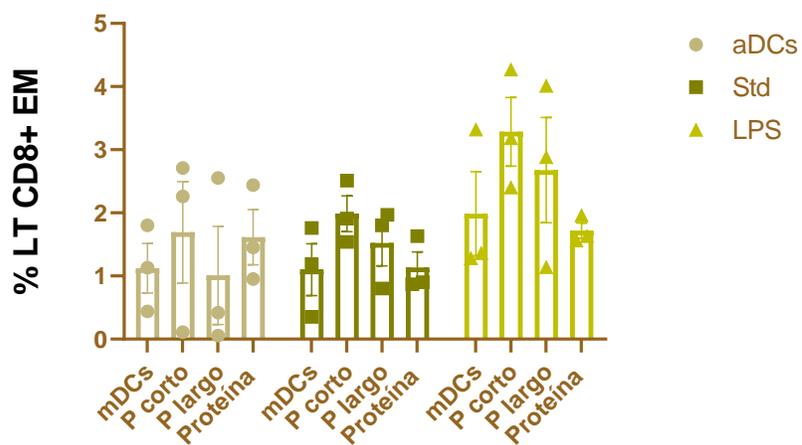


Figura suplementaria 5. Evaluación del marcador CD154 en la subpoblación de LT CD8+ EM

19.4.4 CD69

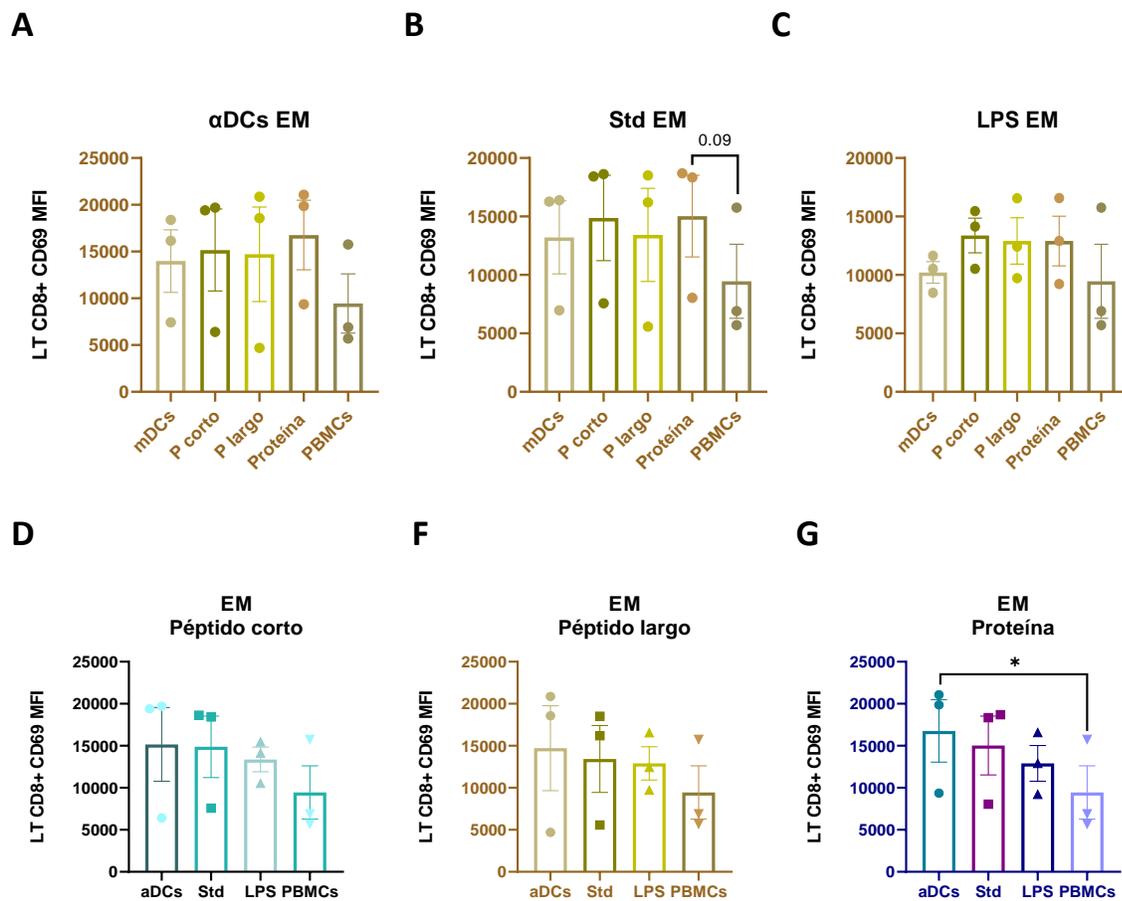


Figura suplementaria 6. Evaluación del marcador CD69 en la subpoblación de LT CD8+ EM

19.4.5 PD-1

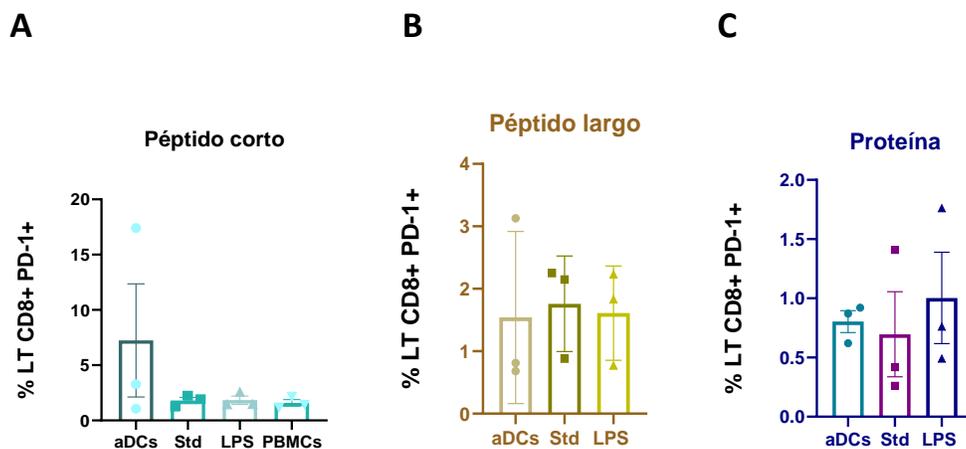


Figura suplementaria 7. Expresión de PD-1 en LT CD8+ del donante LAND42 y comparación entre los cocteles de maduración respecto al formato del antígeno

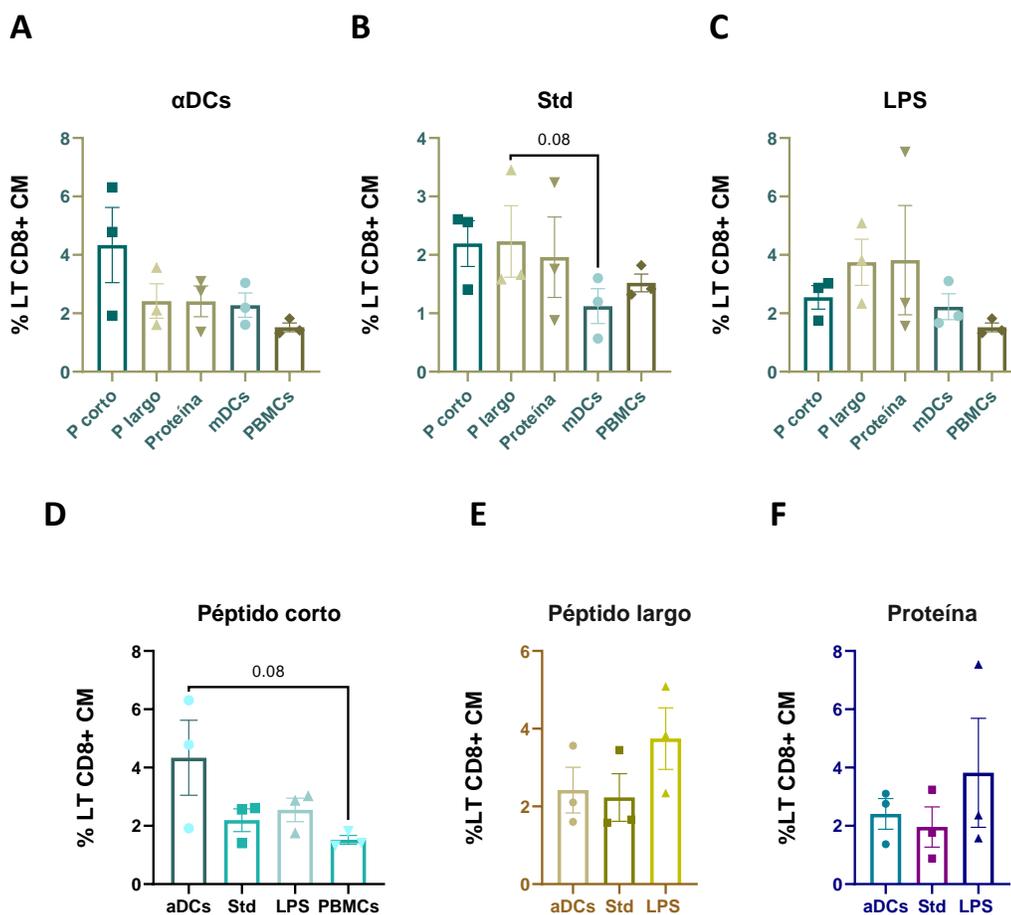


Figura suplementaria 8. Expresión de PD-1 en LT CD8+CD45RO+CD62L+ (CM) del donante LAND42 cultivadas con MoDCs estimuladas con diferentes formatos del antígeno y maduras bajo distintas condiciones. Diagramas de dispersión con barras representativos del porcentaje de LT CD8+ CD45RO+CD62L+ (CM) PD-1+ en cultivos estimulados con: **A.** coctel α 1, **B.** coctel Std, **C.** coctel LPS, **D.** péptido corto, **E.** péptido largo y **F.** proteína recombinante. El análisis estadístico para cada grupo se llevó a cabo utilizando la prueba no paramétrica de Friedman de datos pareados, $n=3$, ($p<0.05$). Los diagramas de dispersión con barras representan réplicas experimentales independientes + SEM.

19.4.6 LAG-3

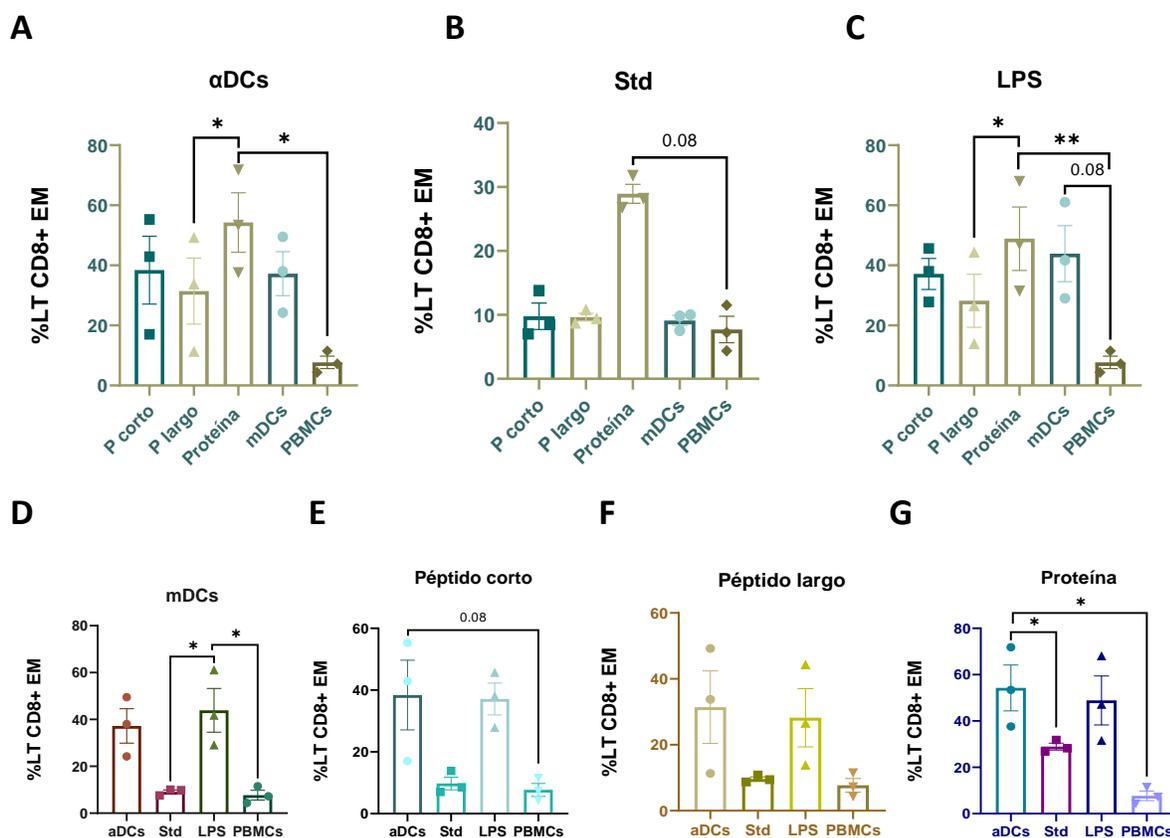


Figura suplementaria 9. Expresión de LAG-3 en LT CD8+ EM de LAND42 y comparación entre los cocteles de maduración respecto al formato del antígeno. Diagramas de dispersión con barras representativos del porcentaje de LT CD8+ CD45RO+CD62L+ (EM) LAG-3+ en cultivos estimulados con: **A.** coctel α 1, **B.** coctel Std, **C.** coctel LPS, **D.** péptido corto, **E.** péptido largo y **F.** proteína recombinante. El análisis estadístico para cada grupo se llevó a cabo utilizando la prueba no paramétrica de Friedman de datos pareados, $n=3$, ($p<0.05$). Los diagramas de dispersión con barras representan réplicas experimentales independientes + SEM.

19.5 Diseño de cebadores para RT-PCR

El diseño de los cebadores se realizó con base en las secuencias de referencia de DNA, mRNA y codificantes (CCDS) en formato FASTA para cada gen de interés, almacenadas en la base de datos del NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov>), a saber: MLANA (Gene ID: 2315); CTAG1B cancer/testis antigen 1B (Gene ID: 1485) y del gen de la proteína constitutiva ACTB actin beta (Gene ID: 60). El alineamiento de las secuencias para la identificación de exones se llevó a cabo en la plataforma MUSCLE - Multiple Sequence Alignment (European Bioinformatics Institute (EMBL-EBI) <https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/muscle/>). Se empleó el programa Gene Runner para evaluar la compatibilidad con las secuencias de referencia (mRNA y/o CDS), la longitud del cebador, la temperatura de fusión (Tm), el contenido de GC, secuencias repetidas o complementarias, producto de amplificación, formación de horquillas o dímeros de cebadores, entre otros parámetros.

Tabla suplementaria 2. Cebadores utilizados para RT-PCR

Gen	Primer Forward (FWD)	Primer Reverse (RV)	Producto de amplificación
β- ACTINA*	5'-CGGGAAATCGTGCGTGACATT-3'	5'-GATGGAGTTGAAGGTAGTTTCG-3'	230 bp
MART-1 (MELANA) (178)	5'-CACTCTTACACCACGGCTGA-3'	5'-CCTTCTGTGGGCATCTTCT-3'	178 bp
MART-1 (MELANA) (253)	5'-CACGGCCACTTTACACCAC-3'	5'-GGAGCATTGGGAACCACAGG-3'	253bp
NY-ESO-1 (CTAG1B)	5'-CGCCTGCTTGAGTTCTACCTC-3'	5'-AGGGAAAGCTGCTGGAGACAG-3'	217 bp

* Proteína Constitutiva (*Housekeeping*)

19.6 Gel de Integridad del mRNA de las líneas tumorales MALME-3M, CRL2338 y SKMEL-37

Se realizó una electroforesis en gel de integridad del RNA con el objetivo de detectar las bandas correspondientes al RNAr 28S (5 Kb), 18S (2 Kb) y 5S (~120Kb) que reflejan la calidad del material genético extraído.

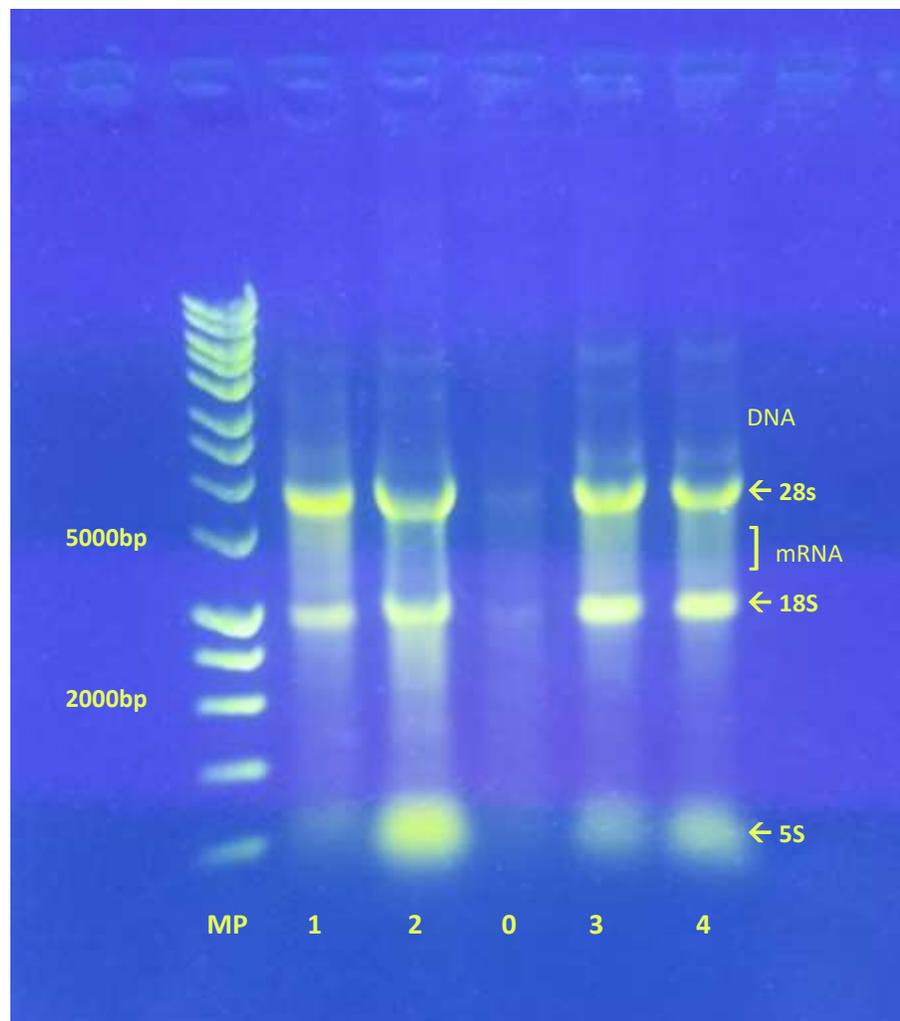


Figura suplementaria 10. Gel de integridad de RNA líneas tumorales humanas. En mamíferos una relación de 2:1 entre el RNAr 28S y 18S (←) suele indicar la presencia de RNA de alta calidad. La zona difusa entre las bandas 28S y 18S (]) corresponde al mRNA, mientras que en la parte superior se puede observar escaso DNA genómico. Marcador de peso Molecular (MP); PBMCs humanas (0); Líneas tumorales MALME-3M (1); CRL2338 (2); SKMEL-37 (3); y SKMEL-23(4).

19.7 Concentración y pureza del mRNA de las líneas tumorales MALME-3M, CRL2338 y SKMEL-37

Se llevó a cabo una cuantificación de la concentración y pureza del RNA extraído de las líneas tumorales humanas, cuyos resultados se muestran a continuación:

Tabla suplementaria 3. Concentración y pureza de RNA obtenido de líneas tumorales

Ensayo ¹	Línea celular	Concentración	Relación A260/280	Relación A260/230
1	MALME-3M	560,9 ng/uL	1,81	1,66
	CRL2338	2489,4 ng/uL	1,94	1,93
	SKMEL-37	874,1 ng/uL	1,93	1,67
2	MALME-3M	1015,5 ng/uL	1,94	1,99
	CRL2338	1580,0 ng/uL	1,96	1,87
	SKMEL-37	1254,7 ng/uL	1,88	1,51
3	MALME-3M	1214,8 ng/uL	1,95	1,98
	CRL2338	2404,9 ng/uL	1,90	1,71
	SKMEL-37	1969,2 ng/uL	1,96	1,90

¹Se realizaron 3 ensayos independientes

19.8 Análisis de regresión no lineal para cálculo de IC₅₀ en líneas tumorales tratadas con agentes quimioterapéuticos

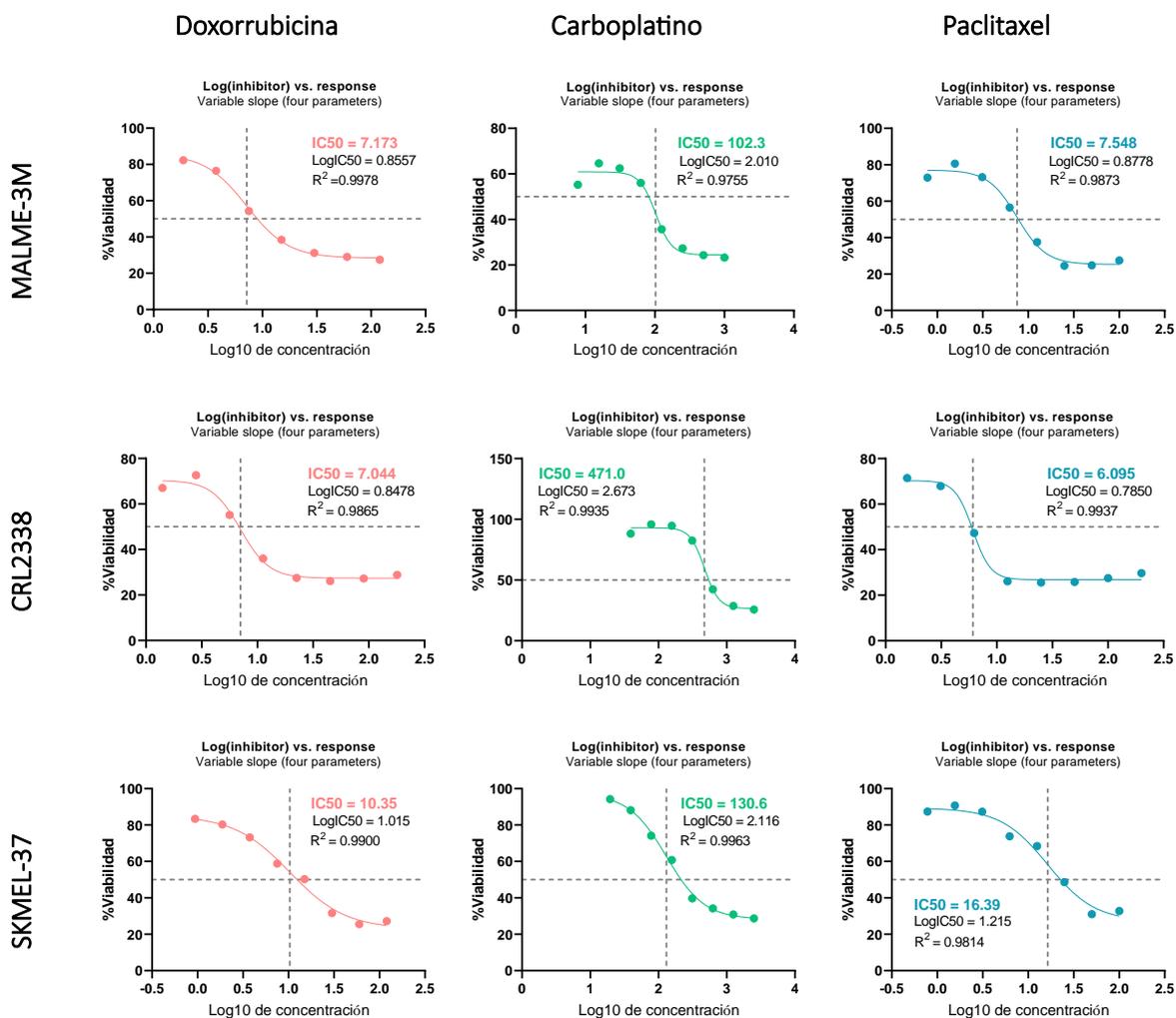


Figura suplementaria 11. Curvas dosis-respuesta: inhibición para cálculo de IC₅₀ en líneas tumorales tratadas con agentes quimioterapéuticos. En cada gráfica se indica la IC₅₀ calculada con base en el Log10 de la concentración que coincide con una reducción del 50% en la viabilidad celular para cada línea tratada con los fármacos doxorubicina, carboplatino y paclitaxel. El valor de R² refleja el ajuste del modelo a los valores de los datos experimentales. Cada curva es representativa de 3 experimentos independientes.

Tabla Suplementaria 4. Resultados de ensayo MTT para determinación de IC₅₀

MALME-3M - Paclitaxel					
Concentración (uM)	Log10¹	%Mortalidad²	%Viabilidad²	SD³	N⁴
100	2	68,622	31,378	0,035	4
50	1,699	71,697	28,303	0,036	4
25	1,398	71,973	28,027	0,022	4
12,5	1,097	57,190	42,810	0,039	4
6,25	0,796	35,430	64,570	0,144	4
3,125	0,495	16,430	83,570	0,027	4
1,563	0,194	7,994	92,006	0,079	4
0,781	-0,107	16,706	83,294	0,056	4

¹Logaritmo en base 10 de las concentraciones del fármaco evaluado

²Mortalidad y viabilidad promedio de las réplicas para cada dilución del fármaco calculadas con base en las absorbancias obtenidas.

³Desviación estándar con respecto al porcentaje de la viabilidad en este experimento

⁴Número de réplicas dentro del mismo experimento

19.9 Expresión de CRL y Anexina V en líneas tumorales tratadas

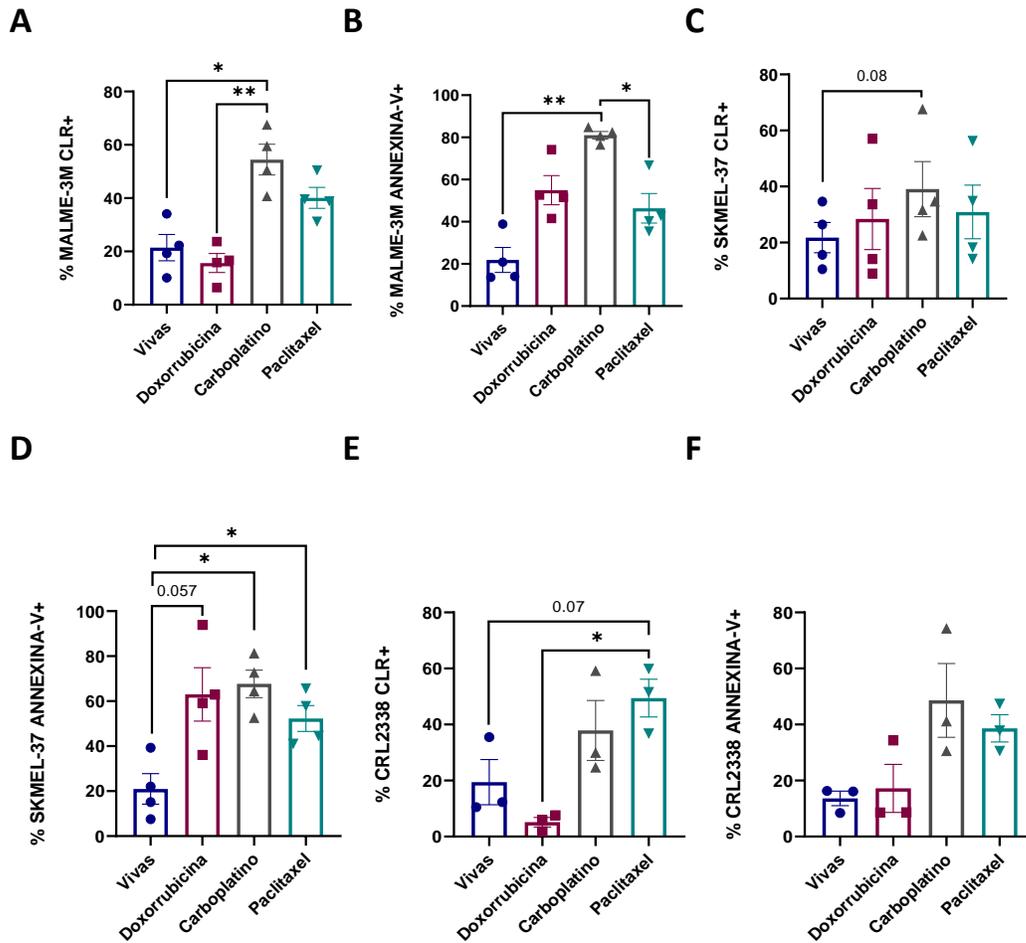


Figura suplementaria 12. Porcentajes de células CRL+ y Anexina V+ en líneas tumorales tratadas

19.10 Tasa de Error de Validación Cruzada de los modelos en CITRUS

19.10.1 Coctel LPS VS STD en análisis de producción de citoquinas

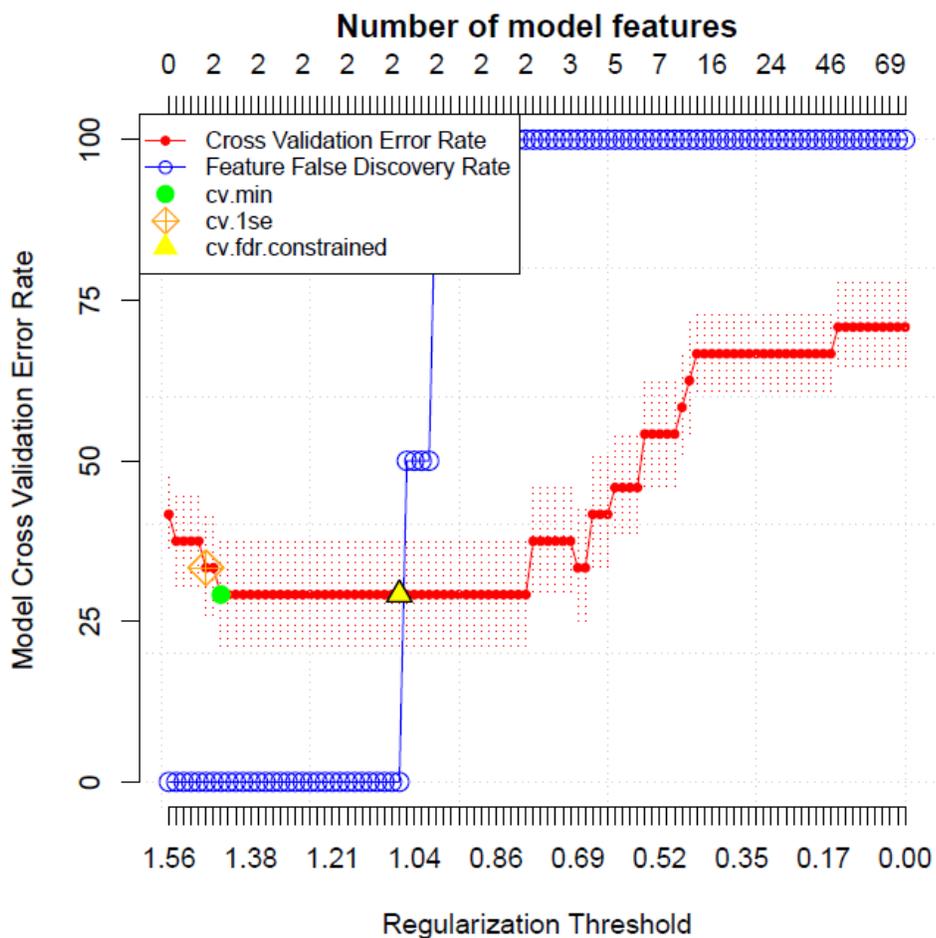


Figura suplementaria 13. Tasa de error de validación cruzada de los modelos utilizados para el análisis de comparación entre los cocteles LPS y Std en la producción de citoquinas intracelulares. La menor tasa de error la tuvieron los modelos 1se y min.

19.10.2 Péptido largo VS proteína para marcadores de activación y agotamiento

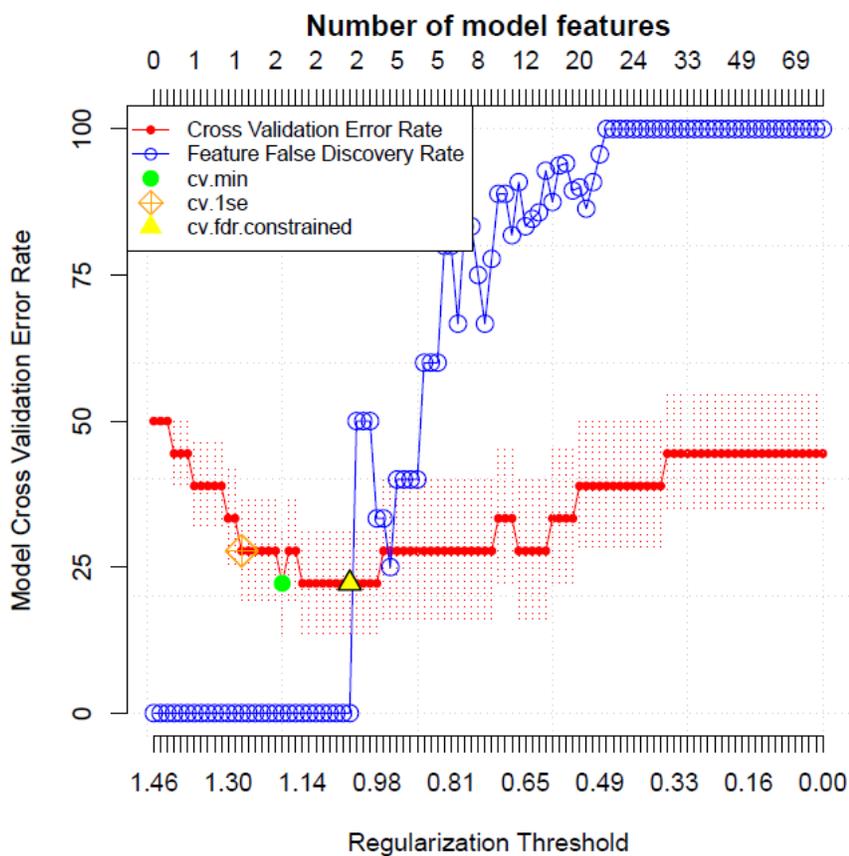


Figura suplementaria 14. Tasa de error de validación cruzada de los modelos utilizados para el análisis de comparación entre péptido largo VS proteína en la expresión de marcadores de activación y agotamiento. Los modelos con la menor tasa de error corresponden a 1se y min.