

**ANÁLISIS FENOTÍPICO Y FUNCIONAL DE *Fast-DCs* CON PROPÓSITOS DE  
INMUNOTERAPIA**

**DIANA ROCÍO TOVAR MURILLO**

**UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA  
FACULTAD DE CIENCIAS  
MAESTRÍA DE MICROBIOLOGÍA  
BOGOTÁ  
2009**

**ANÁLISIS FENOTÍPICO Y FUNCIONAL DE *Fast-DCs* CON PROPÓSITOS DE  
INMUNOTERAPIA**

**DIANA ROCÍO TOVAR MURILLO**

**Tesis para optar al título de Magíster en Microbiología**

**Director de tesis, Profesor:**

**CARLOS A. PARRA LOPEZ  
Universidad Nacional de Colombia, Facultad de Medicina,  
Departamento de Microbiología**

**UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA  
FACULTAD DE CIENCIAS  
MAESTRÍA DE MICROBIOLOGÍA  
BOGOTÁ  
2009**

## Abreviaturas

APCs	Células Presentadoras de Antígenos
CF	Citometría de Flujo
CFSE	<u>C</u> arboxy <u>f</u> luorescein <u>S</u> uccinimidyl <u>E</u> ster
CTLs	Linfocitos T Citotóxicos
CTLp	Precusores de LT Citotóxicos
DC1	Células Dendríticas de origen mieloide
DC2	Células Dendríticas de origen linfoide/plasmacitoide
DCs	Células Dendríticas
DCIS	Ductal Carcinoma In Situ (Carcinoma Ductal In Situ)
DC-SIGN	Dendritic cell-specific ICAM-3 grabbing nonintegrin (CD209)
ELC	EBI1 ligand chemokine (Quimoquina Ligando EBI1)
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
ESAT-6	Early Secretory Antigenic Target-6
FACS	Fluorescence Activated Cell Sorter
<i>Fast-DCs</i>	Células Dendríticas rápidas de 48 horas
FSC	Forward Scatter
GM-CSF	Factor Estimulador de Colonias de Macófago y Granulocito
HLA	Antígeno Leucocitarios Humanos
iDCs	Células Dendríticas inmaduras
IFNs	Interferones
IL	Interleuquina
LAMPs	Lysosomal Associated Membrane glycoProteins (Glicoproteínas de membrana asociadas al lisosoma)
LAMP-1	CD107a
LAMP-2	CD107b
LT	Linfocito T
MACS	Magnetic Cell Sorting
MCM	Medio Condicionado de Monocitos
MDSCs	Myeloid-Derived Suppressor Cells
MHC	Complejo Mayor de Histocompatibilidad
MLR	Mixed Lymphocyte Reaction
NFκβ	Factor Nuclear Kappa beta
PAMPs	pathogen-associated molecular patterns
PBMCs	Células Mononucleares de Sangre Periférica
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa
pDCs	Células Dendríticas de origen plasmacitoide
PGE2	Prostaglandina E2
PHA-M	Fitohemaglutinina M
PPD	Protein Purified Derivative
PRRs	pattern-recognition receptors
SFC	Suero Fetal Bovino

SLC	Secondary Lymphoid Tissue Chemokine (Quimoquina de Tejido Linfoide Secundario)
SSC	Side Scatter
<i>Estándar-DCs</i>	Células Dendríticas de 7 días
STAT-3	Signal Transducer and Activator of Transcription-3 (Transductor de Señal y Activador de Transcripción-3)
TAAAs-A2	Antígenos Asociados a Tumor restringidos a HLA-A*0201
TAP	Transportador Asociado al Procesamiento en Clase I
TCR	Receptor de la Célula T
TCR $\alpha\beta$	Receptor de la Célula T $\alpha\beta$
TCM	Linfocitos T de memoria central
TCR	T Cell Receptor
TEBICA	Terapias Biológicas contra el Cáncer
TEM	Linfocitos T de memoria efectora
TGF- $\beta$	Tisular Growth Factor- $\beta$ (Factor de Crecimiento Tisular- $\beta$ )
Th-1 y Th-2	Respuesta de linfocitos T CD4+ ayudadores del tipo-1 y tipo-2
TLRs	Toll Like Receptors (Receptores similares a Toll)
TNF	Factor de Necrosis Tumoral
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor (Factor de Crecimiento Endotelial Vascular)

## **AGRADECIMIENTOS**

Esta es mi página favorita. Aquí puedo plasmar todos esos sentimientos de gratitud que tengo para con muchas personas y entidades que con sus grandes aportes lograron de este un gran proyecto de tesis de Maestría.

Definitivamente, Dios es y siempre será mi primer lugar. Desde que tengo conciencia, tengo muy claro que es Él quien me guía, me respalda y me protege hasta de mí misma. Luego de Él, mi madre hermosa, a quien también le debo mi vida en todo sentido, es mi ejemplo a seguir y la persona que más admiro y respeto. Mi padre, a quien le debo gran parte de mi personalidad (y hasta de mi físico) y me encanta. A mis hermanos, a Nata, a César y a Camilo, gracias por su confianza en mí y por su admiración.

Este proyecto fue posible gracias a su financiación por la Fundación Salud de los Andes – Clínica del Niño, la cual además me apoyó salarialmente durante su ejecución. Señalo un agradecimiento muy especial al Dr. Fabio Méndez Rivera, Gerente, quien desde hace varios años creó el Grupo de Inmuno-Oncología Clínica, con el propósito de establecer las bases para el desarrollo de futuros estudios clínicos en pacientes con cáncer en nuestro país. A pesar del esfuerzo económico que ello implica, la constancia y el apoyo del Dr. Méndez a esta noble causa son razones dignas de admiración. Asimismo, cabe subrayar el aporte académico por parte de la Fundación, al apoyar trabajos de pregrado y posgrado dirigidos al entendimiento de nuevas alternativas terapéuticas contra el cáncer.

A la Universidad Nacional de Colombia, en especial al Posgrado de Microbiología, Dra. Martha Fontanilla y Socorrito, les doy un INMENSO gracias, por su perseverancia en formar estudiantes de gran calidad, como las egresadas de este posgrado. A la Facultad de Medicina, a la Dra. Martha

Murcia y Yolanda Cárdenas, por permitirme la realización de los últimos experimentos en los laboratorios de equipos comunes. A los estudiantes de Estadística, William Guevara y Adrian Quintero, gracias por su valiosa asesoría en los análisis estadísticos realizados en este trabajo. Al Dr. Carlos Parra, mi director de tesis, científico, profesor, gracias por su paciencia y enseñanzas, además por la disciplina y la exigencia transmitidas para estudiar y trabajar de una forma honesta y entregada. A mis jurados de proyecto y de tesis, Dras. Alba Lucía Cómbita - Gabriela Delgado y Dr. Luis Fernando Cadavid, por el tiempo dedicado para darme sus opiniones y críticas constructivas en pro de un mejor trabajo final de tesis.

Al Instituto Nacional de Cancerología, en especial a la Jefe Sofía Quintero y al personal de Banco de Sangre, quienes siempre estuvieron muy atentos a colaborar con la donación de glóbulos blancos con propósitos de investigación.

A Rosalba Alfonso, por su amistad y por el trabajo realizado con la tipificación de pacientes HLA-A\*0201, lo cual fue de una valiosa ayuda en la realización de los ensayos funcionales aquí descritos.

A mis amigos y compañeros de trabajo, Vanessa Peñuela, David Bernal y Ricardo Cifuentes, por el tiempo dedicado en hacer de este un impecable trabajo y por muchos momentos de risas y apoyo en momentos no tan fáciles.

A la Fundación Instituto de Inmunología de Colombia – FIDIC, antes Instituto de Inmunología – Hospital San Juan de Dios, GRACIAS, porque, aparte de encontrar grandes amigos, allí fue donde aprendí a trabajar como lo hice en esta tesis, con dedicación, responsabilidad y con mucho gusto.

Y a todas aquellas personas que de una u otra forma contribuyeron e hicieron parte de este gran final de mi Maestría...

**GRACIAS!**

## TABLA DE CONTENIDO

	pág.
ABREVIATURAS.....	1
TABLA DE CONTENIDO.....	5
LISTA DE FIGURAS .....	7
LISTA DE TABLAS.....	9
1. RESUMEN .....	10
INTRODUCCIÓN .....	13
2. OBJETIVOS .....	17
2.1 OBJETIVO GENERAL.....	17
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	17
3. MARCO TEÓRICO.....	18
3.1 CÉLULAS DENDRÍTICAS .....	18
3.1.1 Origen.....	18
3.1.2 Clasificación.....	20
3.1.3 Generación <i>in vitro</i> .....	21
3.1.4 Marcadores de diferenciación y moléculas co-estimuladoras.....	24
3.1.4.1 CD80 y CD86 .....	24
3.1.4.2 CD83 .....	25
3.1.4.3 DC-SIGN (CD209).....	25
3.1.4.4 CCR7 .....	26
3.2 CÁNCER E INMUNOTERAPIA CON CELULAS DENDRÍTICAS.....	27
3.3 ESTUDIO DE POBLACIONES DE LINFOCITOS ESPECÍFICOS DE ANTÍGENO.....	29
3.3.1 Presentación de Antígenos al LT.....	29
3.3.2 Linfocitos T CD4+ y CD8+ .....	32
4. DISEÑO EXPERIMENTAL Y MÉTODOS.....	35
4.1 OBTENCIÓN DE CÉLULAS BLANCAS DE SANGRE PERIFÉRICA .....	35
4.2 AISLAMIENTO Y CULTIVO DE CÉLULAS .....	36
4.2.1 Obtención de monocitos por el método de rosetas.....	36
4.2.2 Obtención de monocitos por el método de adherencia.....	36
4.2.3 Generación de DCs de 2 días ( <i>Fast-DCs</i> ) maduras .....	37
4.2.4 Generación de DCs de 7 días ( <i>Estándar-DCs</i> ) maduras.....	37
4.2.5 Purificación de LT CD4 y CD8 por selección positiva.....	38
4.3 CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA DE DCs.....	38
4.4 GENERACIÓN DE LÍNEA DE LT CD8+ ESPECÍFICOS DE TAAs-A2 ...	39
4.5 DETERMINACIÓN DE LT CD8+ TETRÁMERO POSITIVAS POR CF ...	39

4.6 ENSAYO DE MOVILIZACIÓN DE CD107A Y CD107B .....	40
4.7 GENERACIÓN DE LÍNEA DE LT CD4+ Y LT CD8+ ESPECÍFICOS DE ESAT-6 RECOMBINANTE HUMANA .....	41
4.8 MARCAJE DE LT CD4+ CON CFSE.....	41
4.9 REACCIÓN MIXTA DE LINFOCITOS (MLR) .....	42
4.10 LT CD4+ ESPECÍFICOS DE PÉPTIDO TOXOIDE TETÁNICO (TT) ....	42
4.11 MEDICIÓN DE PRODUCCIÓN DE IL-12p70 E IFN- $\gamma$ POR ELISA .....	43
4.12 PÉPTIDOS SINTÉTICOS .....	43
5. ANÁLISIS ESTADÍSTICOS .....	44
5.1 HIPÓTESIS DE TRABAJO .....	44
5.2 DESCRIPCIÓN DE LAS VARIABLES.....	44
5.3 PRUEBA ESTADÍSTICA.....	45
5.3.1 Significancia estadística .....	45
6. RESULTADOS .....	46
6.1 COMPARACIÓN MORFOLÓGICA DE <i>FAST-DCs</i> CON <i>ESTÁNDAR-DCs</i> .....	46
6.2 CARACTERÍSTICAS FENOTÍPICAS DE <i>FAST-DCs</i> Y <i>ESTÁNDAR-DCs</i> ..	46
6.2.1 Análisis descriptivo. ....	49
6.2.1.1 Método de obtención.....	49
6.2.1.2 Tiempo de generación.....	50
6.2.1.3 Maduración.....	52
6.2.1.4 Congelación. ....	54
6.2.2 Análisis comparativo mediante prueba no paramétrica. ....	57
6.2.2.1 Análisis comparativo mediante prueba no paramétrica entre <i>DCs</i> inmaduras y maduras.....	57
6.3 ACTIVACIÓN DE LT CD4+ Y LT CD8+ POR <i>FAST-DCs</i> MADURAS ESTIMULADAS .....	62
6.3.1 <i>Fast-DCs</i> pulsadas con Toxoides Tetánico (TT) .....	62
6.3.2 <i>Fast-DCs</i> en Reacción Mixta de Linfocitos (MLR) .....	64
6.3.3 <i>Fast-DCs</i> pulsadas con ESAT-6 .....	64
6.4 GENERACIÓN DE LT CD8+ ESPECÍFICOS DE PÉPTIDO POR <i>FAST-DCs</i> PULSADAS CON TAAs-A2 .....	66
6.5 GENERACIÓN DE CTLs POR <i>FAST-DCs</i> PULSADAS CON TAAs-A2 ..	68
7. DISCUSIÓN .....	71
8. CONCLUSIONES.....	78
9. CONSIDERACIONES ÉTICAS .....	79
BIBLIOGRAFÍA .....	81
ANEXO 1. RESUMEN EJECUTIVO DEL PROYECTO TEBICA .....	89
ANEXO 2. POSTER: INTERNATIONAL SOCIETY FOR BIOLOGICAL THERAPY OF CANCER (ISBTC) .....	96
ANEXO 3. POSTER: UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA.....	97



## LISTA DE FIGURAS

	pág.
Figura 1. Vías de presentación de antígeno en DCs.....	28
Figura 2. Estructura del TCR .....	29
Figura 3. Diferentes vías de procesamiento de antígeno para las moléculas MHC Clase I y Clase II.....	32
Figura 3. Morfología celular bajo el microscopio de contraste de fases....	47
Figura 4. Morfología bajo el microscopio de contraste de fases de <i>Fast-DCs</i> y <i>Estándar-DCs</i> obtenidas a partir de monocitos purificados por el método de adherencia al plástico.....	48
Figura 5. Gráficas de dispersión de puntos (dot plot) de Side Scatter (SSC) vs. Forward Scatter (FSC) mostrando las diferencias morfológicas de <i>Fast-DCs</i> (izquierda) y <i>Estándar-DCs</i> (derecha) analizadas por CF.....	48
Figura 6. Diagramas de cajas para los porcentajes de los siete marcadores de superficie de acuerdo al método de obtención (adherencia – rosetas) de <i>Fast-DCs</i> y <i>Estándar-DCs</i> .....	51
Figura 7. Diagramas de cajas para los porcentajes de los siete marcadores de superficie de acuerdo al tiempo de generación de DCs...	53
Figura 8. Diagramas de cajas para los porcentajes de los siete marcadores de superficie de acuerdo al estado de maduración DCs.....	55
Figura 9. Diagramas de cajas para los siete marcadores de superficie de acuerdo a si fueron congelados o no los monocitos para la generación de DCs.....	56
Figura 10. Análisis fenotípico comparativo por CF de <i>Fast-DCs</i> y <i>Estándar-DCs</i> obtenidas a partir de monocitos frescos, purificados por el método de rosetas.....	59
Figura 11. Análisis fenotípico comparativo por CF de <i>Fast-DCs</i> y <i>Estándar-DCs</i> obtenidas a partir de monocitos frescos, purificados por adherencia al plástico.....	60

Figura 12. Análisis fenotípico comparativo por CF de <i>Fast-DCs</i> y <i>Estándar-DCs</i> obtenidas a partir de monocitos congelados, purificados por el método de rosetas.....	61
Figura 13. Análisis fenotípico comparativo por CF de <i>Fast-DCs</i> y <i>Estándar-DCs</i> obtenidas a partir de monocitos frescos y congelados, purificados por el método de rosetas.....	63
Figura 14. Actividad linfo-proliferativa de LT CD4+ en respuesta a <i>Fast-DCs</i> pulsadas con Toxide Tetánico (TT) y PHA-M.....	65
Figura 15. Generación de LT CD4+ productores de IFN- $\gamma$ luego de diferentes estímulos con <i>Fast-DCs</i> maduras.....	66
Figura 16. Inducción de respuestas proliferativas de LT CD4+ en una MLR por <i>Fast-DCs</i> .....	67
Figura 17. Producción de IFN- $\gamma$ intracelular en LT CD4+ y CD8+ en respuesta a estímulo de <i>Fast-DCs</i> pulsadas con péptido.....	68
Figura 18. Frecuencia de LT CD8+ específicos de péptido analizados por coloración con tetrámero.....	69
Figura 19. Determinación por CF de LT CD8+ citotóxicos (CD107a+ CD107b+) de individuos sanos HLA-A*0201 positivos en respuesta a estimulación con péptido específico.....	70

## LISTA DE TABLAS

	pág.
Tabla 1. Generación de DCs a partir de monocitos de sangre periférica humanos: condiciones de cultivo.....	21
Tabla 2. Estadísticas descriptivas para los siete marcadores de superficie de acuerdo al método de obtención (rosetas - adherencia) de <i>Fast-DCs</i> y <i>Estándar-DCs</i> .....	50
Tabla 3. Estadísticas descriptivas para los siete marcadores de superficie de acuerdo al tiempo de generación de DCs (2 días: <i>Fast-DCs</i> , 7 días: <i>Estándar-DCs</i> ).....	52
Tabla 4. Estadísticas descriptivas para los siete marcadores de superficie de acuerdo a la maduración de las DCs (Inmaduras-Maduras).	54
Tabla 5. Estadísticas descriptivas para los siete marcadores de superficie de acuerdo a si fueron congelados o no los monocitos para la posterior generación de DCs.....	55

## 1. RESUMEN

Por su eficiencia en el procesamiento y presentación del antígeno, las células dendríticas (DCs) han venido siendo utilizadas ampliamente en numerosos ensayos clínicos de inmunoterapia en pacientes con cáncer. En estos estudios se ha comprobado la eficacia de las DCs como células profesionales presentadoras del antígeno capaces de procesar y presentar diferentes formas de antígeno al sistema inmune con capacidad de inducir de manera efectiva Linfocitos T Citotóxicos (CTLs) antitumorales en diferentes tipos de tumores cuando son utilizadas como vehículo del antígeno en vacunas terapéuticas contra el cáncer.

Hasta el momento, las DCs han venido siendo derivadas a partir de monocitos de sangre periférica luego de su cultivo en Factor Estimulador de Colonias de Macrófago y Granulocito (GM-CSF) e Interleuquina 4 (IL-4) por 5 días y maduras por diferentes tipos de estímulo, por 48 horas adicionales (*Estándar-DCs*). No obstante la eficiente generación de DCs con fines de inmunoterapia lograda hasta ahora mediante este procedimiento, la producción de este tipo de DCs se considera altamente laboriosa y de alto costo, por lo cual modificaciones al proceso de producción que redunden en una obtención más rápida es altamente deseable.

Evidencias recientes por otros grupos sugieren que monocitos cultivados en GM-CSF e IL-4 por 24 horas y madurados con un coctel de citoquinas pro-inflamatorias por 24 horas adicionales conduce a la obtención de DCs rápidas (*Fast-DCs*). Aunque las *Fast-DCs* podrían ser deseables para ser usadas como vehículo del antígeno en inmunoterapia de cáncer, su uso en este campo está aún por ser demostrado.

En este trabajo se realizó la caracterización fenotípica de DCs derivadas de monocitos de sangre periférica (*Fast-DCs* y *Estándar-DCs*) mediante los métodos de purificación por adherencia y por rosetas en individuos sanos de la población colombiana. Se analizó la expresión de marcadores de diferenciación de DCs y moléculas co-estimuladoras (CD14, CD80, CD83, CD209, CD86, HLA-DR); expresión del receptor CCR7 para las quimoquinas CCL19/CCL21 en respuesta a un coctel de maduración: Interleuquina 6 (IL-6), Interleuquina 1 Beta (IL-1 $\beta$ ), Factor de Necrosis Tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) y Prostaglandina E2 (PGE-2).

Para evaluar la inmunogenicidad de las *Fast-DCs* a Antígenos Asociados a Tumor restringidos a HLA-A\*0201 (TAAs-A2) como Melan-A, NY-ESO1, Her-2/neu y Telomerasa, LT CD8+ de individuos normales HLA-A\*0201 positivos, purificados mediante perlas magnéticas, fueron co-cultivados durante 10 días en presencia de Interleuquina 2 (IL-2) e Interleuquina 7 (IL-7) y re-estimulados por 2 días con *Fast-DCs* pulsadas con péptido. La determinación de citotoxicidad (CD107a y CD107b) y de linfocitos T (LT) CD8+ específicos para los TAAs-A2 empleados, se realizó por citometría de flujo (CF). Además, fue evaluada la función de *Fast-DCs* como Células Presentadoras de Antígeno (APCs) en una Reacción Mixta de Linfocitos (MLR), y determinada la proliferación de LT CD4 alogénicos y la producción de IFN- $\gamma$  en sobrenadantes de cultivo por *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* (ELISA).

Mientras fue evidenciada una sobre-expresión de CD80, CD83 y CCR7 y una disminución en la expresión de CD209 en *Fast-DCs* y *Estándar-DCs* en respuesta al estímulo de maduración, no se encontraron diferencias importantes a nivel fisiológico en la expresión de CD86 y HLA-DR. La expresión de CD14 fue mayor en *Fast-DCs* comparado con la expresión en *Estándar-DCs*. Se observaron poblaciones de LT CD8+ específicos de péptido Melan-A y NY-ESO1 (tetrámero positivas) luego de haber sido estimulados por *Fast-DCs* pulsadas con el péptido correspondiente. Asimismo, células CD8+

estimuladas con *Fast-DCs* tuvieron capacidad citotóxica sobre células blanco, evidenciada por la expresión CD107a y CD107b determinada por CF.

*Fast-DCs* pulsadas con toxoide tetánico (TT) fueron eficientes en generar una respuesta linfoproliferativa de LT CD4+ productores de IFN- $\gamma$  en respuesta a un estímulo no específico (Fitohemaglutinina – PHA) y en respuesta a un antígeno definido (TT). Además, *Fast-DCs* indujeron la proliferación de LT CD4+ heterólogos, productores de IFN- $\gamma$  en una MLR.

A pesar de que la vacunación con DCs pulsadas con TAAs-A2 ha sido cuidadosamente evaluada en individuos Caucásicos como alternativa para la inmunoterapia en cáncer, la cobertura e inmunogenicidad de este tipo de vacunas en la población colombiana está aún por establecerse. En este contexto, la reducción de costos en la generación de *Fast-DCs* y la inmunogenicidad probada de *Fast-DCs* maduras, pulsadas con TAAs-A2, conduce a predecir que estas células pueden ser una importante alternativa para la inmunoterapia del cáncer en Colombia.

## INTRODUCCIÓN

El cáncer se caracteriza por la generación de células que se dividen anormalmente debido a que han perdido su respuesta a mecanismos homeostáticos que regulan normalmente el crecimiento de los tejidos. Por esta razón, las células tumorales invaden tejidos adyacentes y se diseminan a otros órganos causando siembras a distancia del tumor primario (metástasis).

Las células tumorales han desarrollado un proceso de “evasión inmune” o “escape del tumor”, debido a varios factores: 1) deficiencias de la célula tumoral como APCs evidenciado por: deficiencias en el procesamiento y presentación del antígeno; disminución de expresión de moléculas del Complejo Mayor de Histocompatibilidad (MHC) Clase I y falta de expresión de moléculas MHC Clase II en su superficie; deficiente expresión de moléculas co-estimuladoras; pérdida de variantes antigénicas del tumor como resultado de la presión del sistema inmune; deficiente inducción de apoptosis de la célula tumoral [1]; 2) deficiente activación de la respuesta de los LT contra el tumor evidenciado por ignorancia y tolerancia inmunológica a antígenos tumorales inducida a nivel central (los tumores expresan antígenos propios a los cuales las células T se han hecho tolerantes durante su educación en el timo) o en la periferia (mediada por LT CD4 reguladores); 3) disfunción inmune de células efectoras dada por la alteración de moléculas de transducción de señales o inducida por el micro-ambiente tumoral a expensas de un infiltrado inflamatorio (incluyendo células supresoras derivadas de la línea mieloide, Myeloid-Derived Suppressor Cells – MDSCs) que inhibe la proliferación y funciones efectoras de linfocitos y macrófagos [2, 3].

Gracias a un mejor entendimiento de los mecanismos de interacción entre el sistema inmune y las células tumorales, la inmunoterapia se perfila actualmente como una estrategia alternativa de tratamiento contra el cáncer.

Dentro de las posibilidades de terapia biológica en cáncer está el empleo de interferones, citoquinas, factores estimulantes de colonias, inhibidores de vías de señalización, anticuerpos monoclonales, los cuales pueden mejorar la función del sistema inmune, favoreciendo respuestas inmunes altamente específicas contra el tumor [4-6]. Otro método utilizado en inmunoterapia, conocido como inmunoterapia adoptiva, emplea la infusión de células efectoras que han sido estimuladas para actuar contra el tumor, como los CTLs anti-tumor [7-10]. Un tercer grupo de terapias persigue la activación del sistema inmune optimizando la presentación de antígenos tumorales. Tal es el caso de vacunas compuestas por APCs profesionales, como son DCs, que luego de ser pulsadas *in vitro* con una amplia variedad de antígenos, son reconstituidas al paciente con el fin de que estimulen eficientemente respuestas de LT contra el tumor [11-17].

Las vacunas basadas en DCs han venido siendo exploradas activamente debido a la deficiente capacidad de presentación de antígenos tumorales por las células tumorales y por DCs en pacientes con cáncer [1]. En el humano existen dos grupos de DCs, las de origen mieloide y las de origen linfoide o DCs plasmacitoides. Numerosas evidencias demuestran que en pacientes con cáncer distintas funciones de las DCs de origen mieloide se encuentran afectadas. Mientras que el número de DCs de origen mieloide en sangre periférica o infiltrando los tumores se encuentra disminuido, el número de las DCs de origen linfoide no se encuentra alterado. Por otra parte evidencias sugieren que las DCs de origen mieloide en estos pacientes son de fenotipo inmaduro [18]. El hecho de que las DCs aisladas de pacientes recuperan su respuesta a estímulos de maduración *in vitro* o que DCs de individuos normales expresan un fenotipo inmaduro cuando se exponen a medio condicionado de tumor, sugiere que en pacientes con cáncer una serie de sustancias producidas por los tumores (p. ej., el Factor de Crecimiento Endotelial y Vascular – VEGF) son responsables de las alteraciones de DCs de origen mieloide [1].



La habilidad de las DCs para activar células T capaces de reconocer y destruir las células tumorales de una manera específica de antígeno, ha sido evidenciada en numerosos protocolos clínicos que se llevan a cabo actualmente en humanos en los que las DCs pulsadas con antígenos tumorales son empleadas como vacuna. Se ha observado que este tipo de vacuna es segura y mucho más tolerable que otros tratamientos como la quimio o la radioterapia, con respuestas clínicas e inmunológicas significativas [12, 19-21]. Todas estas evidencias sugieren que la inmuno-estimulación de células del sistema inmune con DCs autólogas pulsadas *in vitro* con antígenos tumorales es posible y que el uso de esta clase de vacunas terapéuticas en distintos tumores invasivos abre la posibilidad de prolongar las expectativas de vida de los pacientes tratados, mejorando además su calidad de vida.

Debido a que las DCs se encuentran en muy baja cantidad en sangre periférica, durante la última década se han desarrollado distintos métodos para su generación *in vitro*. En la mayoría de ensayos clínicos realizados hasta la fecha se han empleado DCs cultivadas por siete días (*Estándar-DCs*) en presencia del GM-CSF e IL-4, adicionando diferentes estímulos de maduración al quinto día y por dos días más de cultivo. Recientemente se ha propuesto la generación de DCs en un tiempo más corto, cultivando durante 24 horas los monocitos purificados con GM-CSF e IL-4 y por otras 24 horas con el estímulo inflamatorio (*Fast-DCs*), logrando de esta forma DCs capaces de generar respuestas inmunes de tipo Th1 primarias, específicas de antígeno [22, 23]. Esta disminución en el tiempo de cultivo conlleva a una disminución en el costo de las citoquinas utilizadas en la diferenciación y maduración de DCs, además de una menor laboriosidad en su obtención, aspectos importantes a tener en cuenta cuando estas células son empleadas con propósitos de inmunoterapia.

En Colombia, en el año 2007 se presentaron 5305 casos nuevos de cáncer (2219 hombres y 3086 mujeres), entre los cuales 419, 386 y 240 fueron por cáncer de piel, próstata y estómago en hombres, respectivamente y 657, 529 y 476 fueron por cáncer de mama, cuello del útero y piel en mujeres,

respectivamente. En ese mismo año, hubo un total de 1120 muertes por cáncer (490 hombres y 630 mujeres). En la población masculina la primera causa de muerte fue por cáncer de estómago ( $n=84$ ), en segundo lugar, por cáncer de colon, recto y ano ( $n=57$ ) y en tercer lugar, por cáncer de próstata y leucemias ( $n=43$  para cada uno). En la población femenina, las causas principales de muerte por cáncer fueron: cáncer de mama ( $n=137$ ), cuello del útero ( $n=70$ ) y por cáncer de colon, recto y ano ( $n=58$ ) [24].

Dada la importancia de implementar nuevas alternativas para el manejo del cáncer en nuestro país, en este trabajo se evalúa por primera vez la producción, caracterización fenotípica y funcional de *Fast-DCs* en nuestra población. Los resultados demuestran que las *Fast-DCs* poseen características fenotípicas y funcionales importantes a ser tenidas en cuenta para su uso en pacientes con cáncer como vacunas anti-tumor.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GENERAL

Caracterizar y comparar *Fast-DCs* (DCs de 2 días) vs. *Estándar-DCs* (DCs de 7 días) derivadas a partir de monocitos de sangre periférica de individuos sanos en la población colombiana, utilizando un estímulo pro-inflamatorio.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Estandarizar la obtención y crio-preservación de monocitos de sangre periférica.

Obtener *Fast-DCs* y *Estándar-DCs* maduras a partir de monocitos humanos de la población colombiana purificados y crio-preservados cultivados en presencia de IL-4, GM-CSF y un coctel de maduración (IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$  y PGE2).

Comparar el rendimiento de DCs obtenidas luego de 2 y 7 días de cultivo de monocitos *in vitro*.

Comparar los niveles de expresión de marcadores de maduración de superficie y moléculas co-estimuladoras en ambos tipos celulares.

Explorar a nivel poblacional la variabilidad en cuanto a los niveles de expresión de marcadores típicos de DCs durante su diferenciación *in vitro* (respuesta de monocitos al GM-CSF e IL-4 y citoquinas pro-inflamatorias).

Evaluar en individuos sanos la capacidad funcional de DCs como APCs profesionales para inducir LT CD8+ específicos de antígeno Melan-A.

### 3. MARCO TEÓRICO

#### 3.1 CÉLULAS DENDRÍTICAS

**3.1.1 Origen.** En 1973, Steinman y Cohn identificaron un nuevo tipo celular en poblaciones de células adherentes preparadas a partir de órganos linfoides periféricos del ratón, con distintas características morfológicas. Dichas células fueron denominadas “células dendríticas” (DCs) [25]. Las DCs son las más potentes células presentadoras de antígeno (APCs), caracterizadas por su capacidad de estimular células T vírgenes e iniciar respuestas inmunes primarias con la inducción de regulación de respuestas inmunes mediadas por células T, incluyendo respuestas de tipo Th1 y Th2 [26, 27]. DCs constituyen una población heterogénea de células inmunes derivadas de médula ósea, las cuales difieren en marcadores de superficie, patrones de migración, localización y producción de citoquinas. Las DCs actúan como centinelas, reconociendo la presencia de patógenos a través de varios receptores tipo PRRs (del inglés “pattern-recognition receptors”), activándose con productos microbianos o por muerte celular masiva, que originan la secreción de citoquinas involucradas en la defensa del huésped. Asimismo, las DCs pueden ser importantes para la inducción de la tolerancia inmunológica, dentro de lo que se incluyen la delección clonal de células T propias reactivas en timo (tolerancia central) y anergia y supresión por la producción de células T reguladoras (Treg) en periferia [28-31]

Progenitores hematopoyéticos de médula ósea dan lugar a precursores de DCs que migran a la sangre y a tejidos linfoides y no linfoides, donde residen como DCs inmaduras. Las DCs inmaduras poseen una alta capacidad endocítica y fagocítica, permitiendo así la captura del antígeno, pero expresan bajos niveles de IL-12, MHC Clase II y de moléculas co-estimuladoras en su superficie. Luego de una infección microbiana y daño tisular, las DCs

inmaduras migran a las regiones inflamatorias en respuesta a la producción de citoquinas inflamatorias a través de receptores específicos. Las DCs inmaduras reconocen PAMPs (del inglés “pathogen-associated molecular patterns”) de los productos microbianos a través de los PRRs, incluyendo la familia de los receptores semejantes a Toll (TLRs), receptores de manosa (MRs) y componentes inflamatorios liberados por los tejidos dañados. Bajo el reconocimiento de un patógeno, las DCs liberan grandes cantidades de citoquinas pro-inflamatorias o antivirales, resultando en la activación de células inmunes innatas, limitando así la diseminación de la infección [26].

Simultáneamente, las DCs adquieren un fenotipo maduro, morfológicamente distinguidas por la pérdida de estructuras de adhesión, organización del citoesqueleto, presencia de dendritos o velos que proveen una amplia área superficial para la interacción simultánea con LT. El proceso de maduración está asociado con varios eventos como: (i) pérdida de receptores fagocíticos y endocíticos; (ii) expresión de altos niveles de IL-12, MHC Clase II en la superficie celular y una producción incrementada de moléculas co-estimuladoras, incluyendo CD40, CD80 y CD86; (iii) cambios en la morfología celular; y (iv) activación de la maquinaria de procesamiento de antígeno, lo que involucra un cambio en compartimentos lisosomales e incremento en la proteína de membrana asociada al lisosoma (DC-LAMP). Además, las DCs maduras “reprograman” la expresión y respuesta de quimoquinas (p. ej. CCL3, CCL5 y CCL20) a través de “downregulation” del receptor o su no sensibilización (p. ej. CCR1, CCR5 y CCR6) y la adquisición de respuestas a quimoquinas homeostáticas, incluyendo CCL19 y CCL21 a través de la sobre-regulación de CCR7. Posteriormente, las DCs viajan a través de linfáticos aferentes dentro del área de LT en nódulos linfáticos locales, donde ellas seleccionan células T específicas de antígeno e inducen su activación y diferenciación en células efectoras, iniciando de esta manera una respuesta inmune primaria. A diferencia de los macrófagos, las DCs maduras muestran poca habilidad fagocítica, tienen escasos compartimentos lisosomales y expresan disminuidos receptores Fc o para el complemento [11].

El contacto en los tejidos de las iDCs con componentes altamente repetidos en distintos tipos de patógenos que estimulan los receptores TLR (LTA, Ácidos teicoicos de bacterias gram positivas, estimula TLR-2; RNA de doble cadena, TLR-3; LPS, Lipo-polisacárido de bacterias gram negativas, TLR-4; flagelina, TLR-5; Imiquimod, TLR-7 y CpG, TLR-9), inducen la activación y la maduración de las DCs, lo cual resulta en la expresión en superficie de moléculas MHC clase II, CD40, CD80 y CD86 y en la producción de IL-12, que contribuyen a la activación de los LT a los que las DCs presentan el antígeno [32].

**3.1.2 Clasificación.** En humanos, las DCs de sangre periférica están compuestas por dos subclases: DCs mieloides (CD11c+CD123<sup>low</sup>) (DC1) y DCs linfoides/plasmacitoides (CD11c-CD123<sup>hi</sup>) (DC2). La producción de DCs de origen mieloides está regulada por diferentes factores hematopoyéticos tales como: GM-CSF, IL-3, Stem Cell Factor (factor de células madres), Ligando para la fms-tirosina kinasa-3 (Flt-3). Aunque DC1 y DC2 expresan altos niveles de HLA-DR y tienen ausente marcadores de linaje (Lin-): CD3, CD14, CD16, CD19, CD20 and CD56, existen diferencias funcionales entre ellas [33]. Ambas poblaciones inducen una fuerte proliferación de células vírgenes CD4+.

Bajo interacción con LT, las DCs de origen mieloides (DC1) generan predominantemente una respuesta antimicrobiana celular T helper tipo 1 (Th1), mientras que las DCs derivadas de origen linfoides (DC2) apoyan la generación de una respuesta celular T helper tipo 2 (Th2) [34, 35]. Dzionek et al [36] describió nuevos marcadores para DCs de sangre periférica: BDCA-1 (CD1c) y BDCA-3 (CD141) para dos subpoblaciones de origen mieloides y BDCA-2 (CD303) y BDCA-4 (CD304), características de DCs linfoides/plasmacitoides. BDCA-1 (CD1c) es expresado en una subpoblación de DCs humanas con morfología monocitoide. Estas células son CD4+, Lin-, CD11c<sup>bright</sup>, CD123<sup>dim</sup>, CD45RO+, CD2+ y expresan marcadores mieloides (CD13, CD33), así como también receptores Fc (CD32, CD64, FcεRI). BDCA-2 es específicamente expresado en DCs linfoides humanas (plasmacitoides). Estas células son

CD4+, Lin-, CD11c-, CD123<sup>bright</sup>, CD45RA+, CD2- y no expresan marcadores de linaje mieloides como CD13 y CD33, ni receptores Fc. DCs BDCA-2 positivas circulan en sangre y viajan a tejidos linfoides y no linfoides. BDCA-4 es expresado en DCs CD11c-CD123<sup>hi</sup> linfoides/plasmacitoides y BDCA-3 es expresado en DCs mieloides CD11c+CD123- [36].

Las dos subpoblaciones mayoritarias de DCs, las de origen mieloides y las de origen plasmacitoide, se caracterizan por un patrón de expresión diferencial de receptores similares a Toll [37, 38]. Mientras que las DC11c<sup>hi</sup> (DC1) preferencialmente expresan TLR-1, TLR-2, TLR-3 y TLR-8, las DC2 expresan selectivamente TLR-7 y TLR-9 [39]. El hecho de que las distintas subpoblaciones de DCs expresen diferentes TLRs, origina la posibilidad de que reconozcan diferentes clases de antígenos propios y no propios, para inducir tolerancia o inmunidad activa [32].

**3.1.3 Generación *in vitro*.** Bajo condiciones fisiológicas, el número de DCs circulantes es muy bajo, siendo menos del 0.1% [40]. Aunque la cantidad de células puede incrementarse haciendo expansión *in vivo* de precursores en sangre periférica con la administración de factores de crecimiento hematopoyéticos Flt-3 ligando y GM-CSF [41], la mayoría de estudios clínicos y experimentales se basan en el desarrollo *in vitro* de DCs a partir de progenitores CD34+ de sangre de cordón o de monocitos de sangre periférica.

Los estudios *in vitro* para la diferenciación de DCs han sido realizados en gran parte para optimizar un sistema de cultivo que permita una eficiente producción de DCs para su uso en inmunoterapia de cáncer. Estudios adicionales se llevan a cabo para explorar los mecanismos que controlan las diferentes vías de generación de DCs humanas. Los métodos para la generación de DCs *in vitro* comprenden una primera fase de diferenciación, seguida por un paso de maduración.

Los monocitos necesarios para la generación de DCs se han logrado obtener de varias formas: (i) por adherencia a platos plásticos de cultivo durante 1 a 2 horas de incubación [42, 43]; (ii) por aislamiento mediante métodos de selección positiva o negativa de células CD14+ [15] y (iii) por aféresis única y las células obtenidas pueden ser crio-preservadas en alícuotas pequeñas, bien sea antes o después de su diferenciación en DCs [17]. Varias compañías con énfasis en la producción de DCs han logrado su producción utilizando sistemas cerrados con lo cual se alcanzan las exigencias de la producción de DCs bajo buenas prácticas de manufactura (GMP) [44]. Con este tipo de sistema se han logrado generar un promedio de 300 millones de DCs derivadas de monocitos partiendo de aféresis única en un sistema cerrado [15, 45].

Para diferenciar monocitos de sangre periférica en DCs, el primer método descrito fue empleando la combinación de GM-CSF e IL-4 [46], que hasta la fecha sigue siendo la combinación de citoquinas más empleada y caracterizada para la diferenciación de DCs *in vitro*. GM-CSF parece ser requerido para la supervivencia y diferenciación de monocitos *in vitro*, mientras que la IL-4 induce diferenciación a partir de monocitos humanos ejerciendo una función inhibitoria sobre la diferenciación a macrófagos [47]. El tratamiento de monocitos con estas dos citoquinas genera DCs con un fenotipo inmaduro y presentación de antígeno ineficiente. Otras citoquinas empleadas para la diferenciación de DCs se muestran en la Tabla 1.

Bajo el estímulo de factores inductores de maduración, las DCs adquieren características de células maduras y activadas, incluyendo cambios en la morfología, pérdida de toma del antígeno, sobre-regulación de moléculas co-estimuladoras y de moléculas Clase I y Clase II y, finalmente, una capacidad para activar de manera eficiente células T vírgenes [46].

Dentro de los estímulos de maduración de DCs para uso en pruebas clínicas se incluyen (i) Medio Condicionado de Monocitos autólogo (MCM), conformado por una combinación de citoquinas inflamatorias secretadas por monocitos



**Tabla 1.** Generación de DCs a partir de monocitos de sangre periférica humanos: condiciones de cultivo [48]

Condiciones de cultivo	Propiedades de DCs	Referencia
GM-CSF/IL-4	<ul style="list-style-type: none"> <li>Inmaduras, CD14-</li> <li>Inducibles para madurar</li> <li>Respuestas Th1</li> </ul>	[46]
GM-CSF/IL-13	<ul style="list-style-type: none"> <li>Inmaduras, CD14-</li> <li>Inducibles para madurar</li> <li>Respuestas Th1</li> </ul>	[49]
GM-CSF/IL-7	<ul style="list-style-type: none"> <li>Inmaduras, CD14-, CD21+</li> <li>Inducibles para madurar</li> <li>Inducción de una alta citotoxicidad y respuestas proliferativas de células T</li> </ul>	[50]
GM-CSF/IFN- $\alpha$	<ul style="list-style-type: none"> <li>Parcialmente maduras, CD14<sup>low</sup>, CD1a<sup>low</sup>, CD123+, TLR-7+</li> <li>Inducibles para maduración adicional</li> <li>Respuestas Th1</li> </ul>	[51] [52]
GM-CSF/TNF- $\alpha$	<ul style="list-style-type: none"> <li>Pre-DCs/macrófago, CD1a<sup>low</sup>, CD14+, CD70+</li> <li>Respuestas Th1, Th17</li> </ul>	[53]
GM-CSF/IL-15	<ul style="list-style-type: none"> <li>Langerhans-DCs (LCs) inmaduras, E-cadherina+, Lag+, CD14-, gránulos de Birbeck+, CCR6+</li> <li>Inducen proliferación de células T CD8+ en estado inmaduro</li> </ul>	[54]
GM-CSF/IL-4/TGF- $\beta$ 1	<ul style="list-style-type: none"> <li>LCs inmaduras, E-cadherina+, Lag+, CD14-, gránulos de Birbeck+, CLA+</li> </ul>	[55]
GM-CSF/IL-4/IL-2	<ul style="list-style-type: none"> <li>Inmaduras, CD14-</li> <li>Inducibles para madurar</li> <li>Respuestas Th1</li> </ul>	[56]
IL-3/IL-4	<ul style="list-style-type: none"> <li>Inmaduras, CD14-, CD1a-</li> <li>Inducibles para madurar</li> <li>Respuestas Th2</li> </ul>	[57]
IL-3/IFN $\beta$	<ul style="list-style-type: none"> <li>Inmaduras, CD11c<sup>high</sup>, CD123<sup>high</sup>,</li> <li>Inducción de una alta respuesta proliferativa de células T</li> </ul>	[58]
IL-15	<ul style="list-style-type: none"> <li>Maduras, CD14-, CD83+</li> <li>Inducen proliferación de células T</li> </ul>	[59]

adherentes en cultivo (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 e IFN- $\alpha$ ) [60, 61]; (ii) CD40L, un componente principal de células Th CD4+, el cual capacita a las DCs para activar células T CD8+ en CTLs efectores [62]; (iii) Poly I:C, un RNA sintético

de doble cadena, que sirve como modelo de la infección viral [63, 64]; y, (iv) coctel de citoquinas pro-inflamatorias (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 y PGE2), descrito por Jonuleit y colaboradores [65].

Usualmente, los monocitos son cultivados por 5 a 7 días con GM-CSF e IL-4 para generar DCs inmaduras, las cuales son activadas por otros 2-3 días con citoquinas de maduración para generar una completa capacidad estimuladora de células T [65]. En el año 2003, investigadores describieron una nueva estrategia para el desarrollo de DCs maduras a partir de monocitos dentro de sólo 48 horas en cultivo *in vitro* [22]. Las células son mantenidas durante las primeras 24 horas con GM-CSF e IL-4 y luego maduras por 24 horas más con el coctel de citoquinas pro-inflamatorias arriba mencionado. Las DCs obtenidas de esta forma se compararon con DCs de 7 días en cuanto a la expresión de marcadores de activación, sensibilidad a quimoquinas proinflamatorias y en cuanto a su habilidad para inducir proliferación y producción de IFN- $\gamma$  específica de antígeno en células T autólogas, además de la activación de LT vírgenes autólogos [22].

**3.1.4 Marcadores de diferenciación y moléculas co-estimuladoras.** Las células T vírgenes requieren señales co-estimuladoras y primarias de las APCs para ser activadas de manera funcional. Las señales específicas de antígeno primarias inician la activación a través de señales co-estimuladoras, induciendo expansión clonal y diferenciación en células efectoras. Las señales co-estimuladoras son provistas por la interacción de moléculas de membrana expresadas por los LT y las APCs.

**3.1.4.1 CD80 y CD86.** La actividad biológica de la molécula co-estimuladora CD28 ha sido ampliamente estudiada. CD28 es constitutivamente expresado por células T e interactúa con las moléculas B7: CD80 (B7.1) y CD86 (B7.2). Esta interacción resulta en una proliferación de células T incrementada, producción de IL-2 y resistencia a apoptosis. Aquellos LT que unen el antígeno y no reciben una señal co-estimuladora, se cree que mueren o se muestran

anérgicas. CD80 y CD86 son glicoproteínas de membrana tipo I, pertenecientes a la superfamilia de las inmunoglobulinas. La expresión de CD86 es constitutiva en monocitos y DCs y es sobre-regulada por la activación. Por el contrario, CD80 es expresado en bajos niveles en APCs y sobre-regulado después de un estímulo. Estas moléculas son también inducidas en células T luego de activación. A pesar de que tienen los mismos ligandos, CD80 y CD86 parecen estar involucrados en diferentes mecanismos [66-68].

CD80 puede ser más potente que CD86 en inducir respuesta antitumoral, mientras que el CD86 preferencialmente induce la producción de una respuesta Th2. Debido a su expresión constitutiva sobre APCs, el CD86 se cree está involucrado en la iniciación de la respuesta inmune [69].

**3.1.4.2 CD83.** Esta molécula trans-membranal es un marcador principalmente expresado en DCs maduras (DCs circulantes y en tejidos). DCs derivadas de monocitos también expresan CD83 luego de cultivo con GM-CSF e IL-4, pero requieren activación con TNF- $\alpha$  para sobre-regular su expresión en la superficie celular, lo que se correlaciona con una sobre-regulación en la expresión de MHC Clase II. Se ha demostrado que CD83 unido a membrana libera una importante señal, específicamente apoyando la expansión de células T CD8+ activadas. Específicamente, la estimulación de células T alogénicas por DCs humana es reducida cuando la expresión de CD83 en superficie celular se bajo-regula por RNA de interferencia. Por el contrario, la sobre-expresión transitoria de CD83 en DCs maduras aumenta su capacidad estimuladora de células T [70].

**3.1.4.3 DC-SIGN (CD209).** Recientemente ha sido identificada una gran diversidad de receptores lectina tipo-C sobre DCs, involucrados en el reconocimiento de un amplio rango de estructuras como carbohidratos sobre diferentes antígenos. Especialmente, las células inmaduras expresan una amplia variedad de lectinas tipo-C que parecen estar involucradas en el

reconocimiento específico de antígenos propios y de patógenos. *In vivo*, DC-SIGN (Dendritic cell-specific ICAM-3 grabbing nonintegrin) es expresada por DCs inmaduras en tejidos periféricos como piel, mucosa intestinal, cérvix, recto, placenta y pulmón, así como también en DCs de tejidos linfoides, nódulos linfáticos, amígdalas y bazo [32]. CD209 o DC-SIGN juega papeles importantes en el reconocimiento por parte de DCs y macrófagos de patógenos, pero parece no ser requerida para activación de células T. DC-SIGN así probablemente ejerce su principal papel en la toma y procesamiento del antígeno, más que en la fase donde este es presentado a la célula T [71].

**3.1.4.4 CCR7.** El receptor de quimoquina CCR7 es una molécula clave para la entrada de linfocitos y DCs a órganos linfoides secundarios y su recorrido a zonas de células B y T. Los precursores de DCs inmaduras salen de médula ósea y circulan a través de la corriente sanguínea para alcanzar sus tejidos blanco. Luego de tomar y procesar el antígeno, los péptidos son presentados en la superficie celular, asociados a MHC Clase I o II. Después de recibir señales inductoras de maduración, ya sea directamente de patógenos o por estímulo inflamatorio, las DCs cambian el patrón de expresión de receptores de quimoquinas, lo que permite a las células dejar el tejido periférico y migrar a órganos linfoides. La sobre-expresión de CCR7 ocurre 3 a 4 horas después del estímulo de maduración y hace a las DCs sensibles a dos quimioatrayentes, ELC/CCL19 y SLC/CCL21, los cuales dirigen su migración a las regiones de células T en órganos linfoides. Dentro de estas regiones, las DCs pueden inducir activación y proliferación de CTLs y células Th a través de la presentación de péptidos inmunogénicos, en asociación con moléculas MHC Clase I y II, respectivamente [72, 73]. En ratones que no expresan CCR7 o sus ligandos, las DCs fallan para migrar desde la piel hasta las áreas de células T en los nódulos linfáticos, lo que evidencia el papel esencial de CCR7 en este proceso [73].

### 3.2 CÁNCER E INMUNOTERAPIA CON CELULAS DENDRÍTICAS

Muchos componentes del tumor no generan respuestas de LT específicos de antígeno, lo cual puede deberse a la presencia de DCs deficientes en los tumores. Se ha observado que DCs que infiltran cánceres de piel y colon están ausentes de CD80 y CD86 y, por lo tanto, tienen una reducida actividad estimuladora de células T [74].

Las DCs de tejidos y nódulos linfáticos que drenan el tumor son con frecuencia DCs inmaduras, no activadas y en reposo. La progresión del tumor se correlaciona con la presencia de DCs inmaduras que inducen la expansión de células T reguladoras en los nódulos linfáticos drenando el tumor, asociado con progresión del mismo de una manera dependiente de TGF- $\beta$ . En modelos animales, la disminución de DCs de origen mieloide en sangre periférica se restaura luego de la remoción del tumor. Estudios han sugerido que pacientes con altos números de DCs presentes en los tumores sobrevivieron más que pacientes con pocas o ninguna DCs en los tejidos cancerosos [14].

Una característica sobresaliente de muchas células cancerígenas es la sobre-expresión de la proteína STAT-3 (Signal Transducer and Activator of Transcription-3), la cual sobre-regula la expresión de varias citoquinas inmunosupresoras, incluyendo IL-10 y TGF- $\beta$  y suprime respuestas de tipo Th1. La activación de STAT-3 impide la translocación del factor de transcripción Factor Nuclear Kappa beta (NF $\kappa$  $\beta$ ) el cual es necesario para la transcripción de ciertos genes involucrados en el proceso de maduración de las DCs. En particular, la expresión de STAT-3 en DCs asociadas al tumor, causa la expresión reducida de moléculas co-estimuladoras y MHC Clase II, así como también la producción de TGF- $\beta$  [75].

Por otra parte, distintos factores tumorales han sido reportados como responsables de impedir la normal maduración de las DCs en pacientes con cáncer. Dentro de los factores secretados por los tumores que promueven la

hematopoyesis de células inmaduras e impiden la normal maduración de las DCs se encuentran [76]:

- VEGF: Factor de crecimiento endotelial y vascular
- M-CSF: Factor estimulador de colonia de monocitos
- IL-6: Interleuquina-6
- GM-CSF: Factor estimulador de colonias de macrófago y granulocito
- IL-10: Interleuquina-10
- Gangliósidos

Dado su papel central en controlar la inmunidad, las DCs constituyen un blanco importante en muchas situaciones clínicas que involucran células T: trasplante, alergia, enfermedades autoinmunes, resistencia a infecciones y tumores, inmunodeficiencia y vacunas. Es por esto que las DCs están siendo utilizadas en ensayos clínicos para la inmunoterapia de diferentes tipos de cáncer, dentro de los cuales se incluyen, mama, colon, próstata, melanoma, pulmón, linfomas, entre otros.

Desde la publicación en 1996 del primer ensayo clínico empleando DCs como vacuna en el manejo de cáncer [13], más de 60 estudios han sido publicados y más de 100 ensayos clínicos que utilizan esta metodología se encuentran en curso. El melanoma es el blanco más frecuente de este tipo de inmuno-terapia seguido de cáncer de próstata.

Vacunaciones en pacientes de DCs pulsadas con antígenos asociados a tumor (TAAs) ha demostrado la capacidad de romper la tolerancia e inducir la expansión de CTLs contra el tumor *in vivo* [12, 77]. La información generada con el uso de DCs en ensayos clínicos en distintas partes del mundo en un número amplio de pacientes ha señalado que esta forma de inmunoterapia es factible y segura [12, 77]. Más aun, en algunos ensayos clínicos se ha logrado alcanzar, en algunos individuos, la regresión del tumor (curación) o detenimiento de las metástasis con este tipo de inmuno-estimulación.

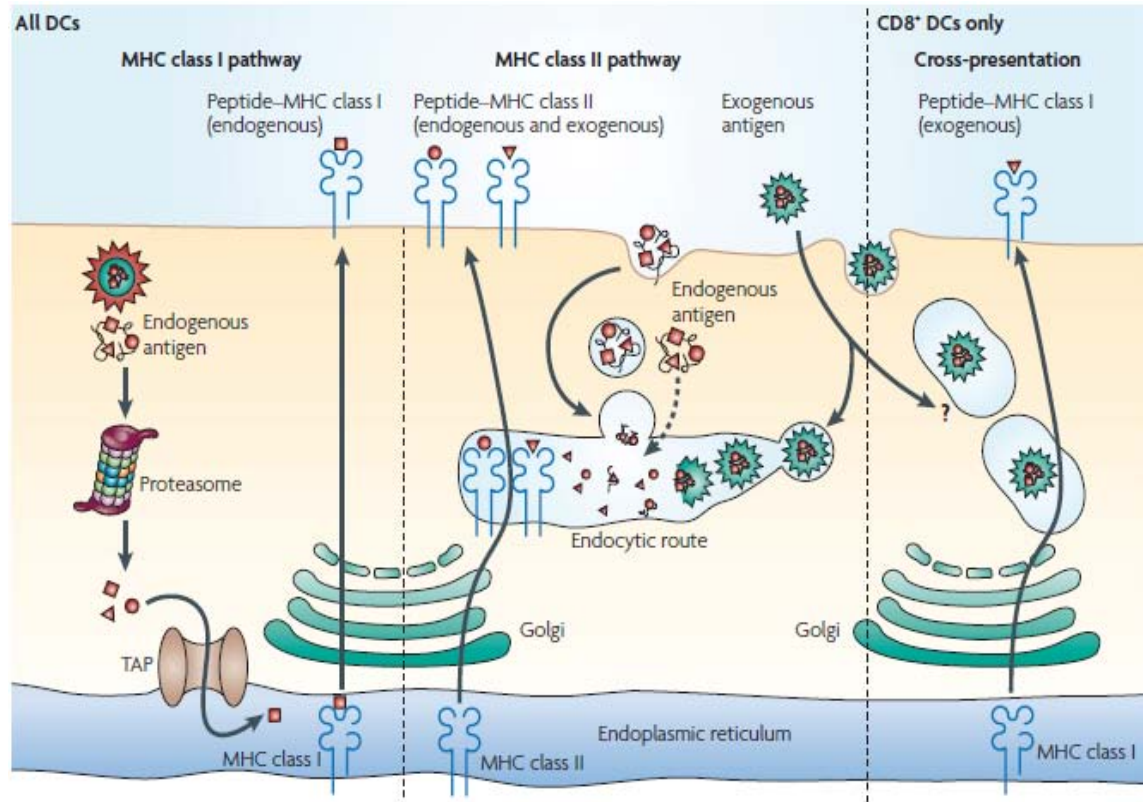
Diferentes fuentes de antígeno han también sido explorados en ensayos en que se utilizan DCs como vacuna: vectores virales (retrovirus, lentivirus, adenovirus, alfavirus, Fowlpox), DNA plasmídico, mRNA, liposomas con ácidos nucleicos o proteínas, tumor o lisados tumorales, células apoptóticas y péptidos [16].

### **3.3 ESTUDIO DE POBLACIONES DE LINFOCITOS ESPECÍFICOS DE ANTÍGENO**

Las APCs son las responsables del procesamiento del antígeno y asociación de péptidos con moléculas del Complejo Mayor de Histocompatibilidad (Figura 1). Estos complejos péptido-MHC son presentados en la superficie de la célula, para que sean reconocidos por el receptor de la célula T (TCR), gracias a una señal co-estimuladora dada por la interacción de CD80/CD86 presentes en APCs y CD28 presente en el LT.

**3.3.1 Presentación de Antígenos al LT.** Las moléculas del sistema inmune HLA clase I y II son esenciales para la inmunidad adaptativa mediada por LT que se desarrollan en el timo y que expresan un  $TCR_{\alpha\beta}$  (Figura 2). Mientras que los LT que expresan  $TCR_{\alpha\beta}$  reconocen péptidos antigénicos unidos a HLA clase I o II y son importantes mediadores de mecanismos de respuesta inmune celular característicos de la inmunidad adaptativa, los LT que expresan  $TCR_{\gamma\delta}$  reconocen otros tipos de antígenos (no peptídicos) y son importantes mediadores de la inmunidad innata especialmente en las mucosas. El desarrollo del LT en el timo involucra primero el re-arreglo del gen de la cadena  $\beta$ ; si el re-arreglo de una primera copia es funcional se aborta el de la segunda copia y se inicia el de la cadena  $\alpha$ , en cuya expresión no opera la exclusión alélica, lo que trae como consecuencia que un LT exprese solo una cadena  $\beta$  pero puede expresar una o ambas cadenas  $\alpha$ . Cuando los LT maduran y expresan  $TCR_{\alpha\beta}$  en la superficie, las células sufren en el timo procesos de selección positiva y negativa por interacción de los TCRs con antígenos propios presentados por moléculas HLA Clase I o II expresados por

células del epitelio tímico (en corteza y médula) y células de origen mieloide (DC1).

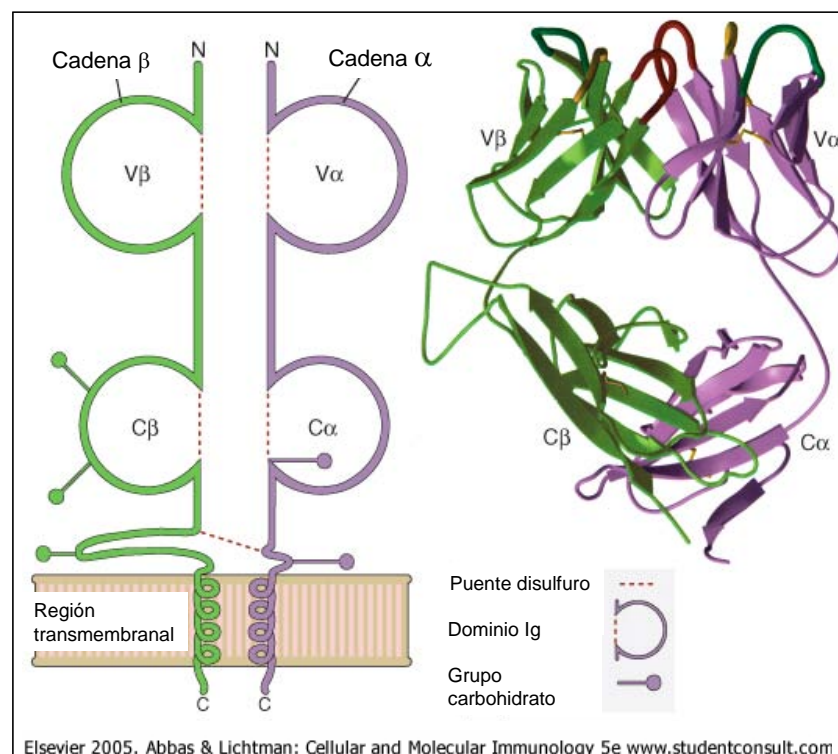


**Figura 1.** Vías de presentación de antígeno en DCs. Todas las DCs tienen vías funcionales de presentación restringida a MHC Clase I y II. Las moléculas de Clase I presentan péptidos derivados de proteínas degradadas principalmente en el citosol, que en la mayoría de DCs compromete casi exclusivamente a proteínas endógenas (sintetizadas por la misma célula). Las moléculas de Clase II toman péptidos generados por degradación proteolítica en compartimentos endosomales. Las proteínas precursoras de estos péptidos incluyen material exógeno que es endocitado desde el medio extracelular, además de componentes endógenos, tales como proteínas de membrana plasmática, componentes de la vía endocítica y proteínas citosólicas que alcanzan los endosomas por autofagia. Las DCs CD8+ tienen una única habilidad de liberar antígenos exógenos a la vía MHC Clase I (del inglés, “*cross-presentation*”), aunque los mecanismos utilizados en esta vía están pobremente entendidos. La flecha bifurcada indica que las vías de presentación cruzada de MHC Clase I y II pueden “competir” por antígenos exógenos en DCs CD8+, o que el mecanismo endocítico involucrado en internalización de un antígeno dado puede determinar si este es preferencialmente liberado a la vía MHC Clase II o a la vía de “*cross-presentation*” MHC Clase I [78].

Se estima que durante la ontogenia de los LT más del 90% de los LT que llegan al timo desde la médula ósea son seleccionados negativamente



(mueren por apoptosis) a nivel de la corteza, por un proceso de ignorancia inmunológica (falta de estímulo) debido a que interactúan pobremente con alotipos del HLA Clase I o II o porque reconocen fuertemente complejos MHC-péptido derivados de antígenos propios. Los LT son seleccionados positivamente en el timo debido a la estimulación de su receptor por alotipos de Clase I o II autólogos con un umbral de activación intermedio. Menos del 1% de LT logran convertirse en LT maduros circulantes [79].



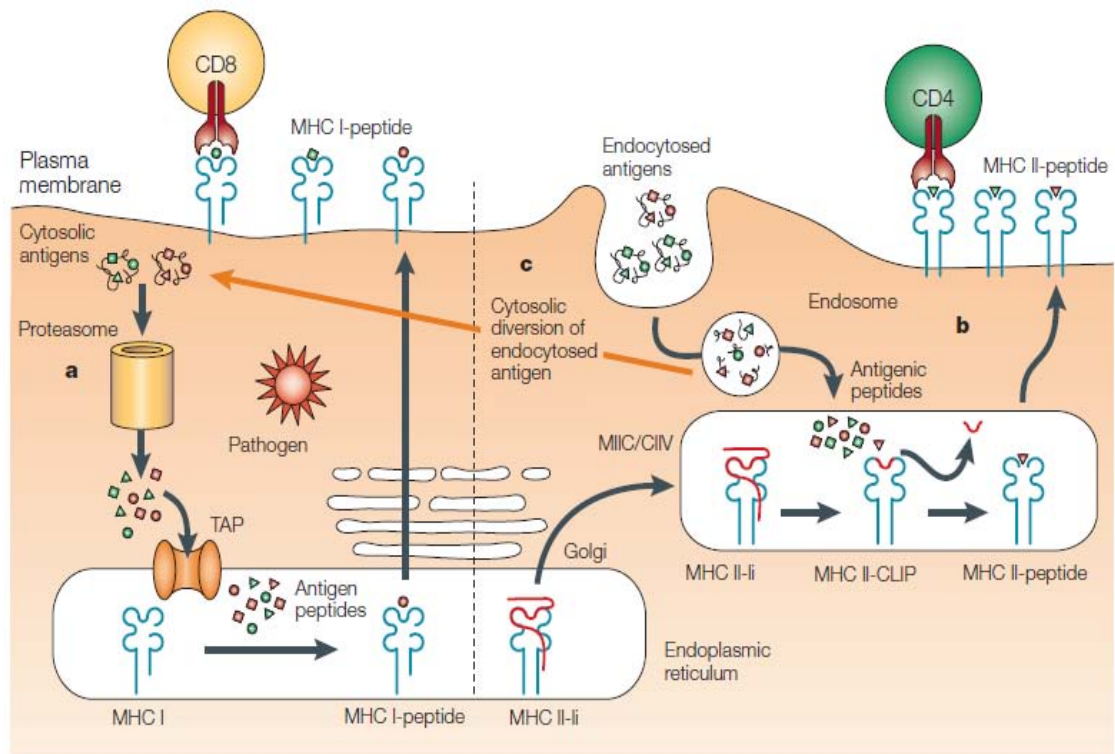
**Figura 2.** Estructura del TCR. El receptor para los complejos péptido-MHC en la mayoría de los LT es un heterodímero formado por dos cadenas polipeptídicas transmembranales llamadas  $\alpha$  y  $\beta$ , unidas covalentemente entre sí mediante puentes disulfuro.

Los antígenos extraños reconocidos por el  $\text{TCR}_{\alpha\beta}$  son péptidos producidos intracelularmente por APCs, los cuales se unen a moléculas HLA clase I y II dentro de la célula y luego viajan a la superficie de esta en donde son presentados a los LT. En el desarrollo tímico se generan dos tipos de  $\text{LT}_{\alpha\beta}$  ( $\text{LT CD4}^+$  y  $\text{LT CD8}^+$ ) que se diferencian porque sus receptores reconocen antígenos presentados en moléculas de HLA Clase I o II. Los LT que

reconocen antígenos presentados por una de estas dos moléculas de HLA se dice que son restringidos por esa clase de molécula HLA. Se asume que un LT es restringido en la periferia por un alotipo HLA clase I o II dependiendo del tipo de alotipo con el cual fue seleccionado positivamente en el timo. Las glicoproteínas de superficie CD4 y CD8 que diferencian los tipos de LT, específicamente se unen a clase I y II y se denominan co-receptores porque interactúan con las moléculas HLA que son necesarias para la activación de LT [80].

Las moléculas MHC Clase I presentan péptidos que son principalmente derivados de proteínas sintetizadas endógenamente de origen propio o patógeno. Estas proteínas son degradadas en péptidos por el proteosoma y luego transportadas a través de transportadores de moléculas procesadoras de antígeno (TAP) al retículo endoplásmico para ser cargadas por moléculas MHC Clase I. Por el contrario, moléculas MHC Clase II presentan proteínas que entran a la célula a través de una ruta endocítica. Durante su maduración, las moléculas MHC Clase II evitan la unión a antígenos endógenos en el retículo endoplásmico, asociándose con la cadena invariante (Ii). Los complejos MHC – cadena invariante (MHC II – Ii) se mueven a través del Golgi para los compartimentos MIIC/CIIV, donde la cadena invariante es degradada a CLIP (del inglés “*Class II - associated invariant-chain peptide*”). CLIP es luego removido de los complejos CLIP – MHC Clase II (MHC – CLIP) e intercambiado por el péptido antigénico (MIIC, compartimento cargando MHC II; CIIV, vesículas MHC II) (Figura 3) [81].

**3.3.2 Linfocitos T CD4+ y CD8+.** Los LT CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> difieren en funciones, los CD8 tienen funciones citotóxicas contra virus y patógenos intracelulares y se denominan LT citotóxicos (CTLs) y los CD4 liberan citoquinas que activan otras células del sistema inmune y por esta razón son llamados LT CD4<sup>+</sup> ayudadores o cooperadores (LT “helper” o Th). Debido al tipo de citoquinas que estos producen los LT CD4<sup>+</sup> se diferencian en dos subtipos Th1 y Th2.



**Figura 3.** Diferentes vías de procesamiento de antígeno para las moléculas MHC Clase I y Clase II [81].

Los Th1 producen citoquinas pro-inflamatorias como el TNF- $\alpha$  y linfotoxina, que contribuyen a la activación del macrófago. Por su parte, los linfocitos Th2 producen por lo general citoquinas como la IL-4, IL-5, IL-13 e IL-10 que desaceleran la actividad microbicida de macrófagos pero que estimulan respuestas de tipo humoral (producción de ciertas sub-clases de anticuerpos, especialmente de tipo Ig-E), por células B [79].

Los linfocitos Th CD4+ son esenciales para la eficiente ejecución de la mayoría de respuestas inmunes, incluyendo producción de anticuerpos por linfocitos B activados y función efectora de CTLs específicos de antígeno [82]. No todos los linfocitos Th reconocen el mismo péptido, sólo distintos clones de células Th reconocen secuencias peptídicas particulares. Esta especificidad es debida al procesamiento de antígeno en la APC, lo que resulta en varios péptidos capaces de estimular linfocitos Th para los cuales ellos son específicos [83] (epítopes de LT).

La mayoría de estos epítopes muestran restricción de haplotipo. Una vez estimulados, los LT proveen su “ayuda” a través de la liberación de mediadores solubles, los cuales son responsables de conducir células B productoras de anticuerpo y CTLs efectores.

Los linfocitos vírgenes (del inglés “*naive*”) necesitan por lo menos 6 horas para activarse una vez hayan recibido el estímulo *ex vivo*. Luego, las células podrían proliferar y diferenciarse en LT efectores y posteriormente, LT de memoria, que en el caso de una re-infección, pueden iniciar una respuesta inmune más rápida y específica [84]. La memoria protectora es mediada por células efectoras que migran a los tejidos periféricos inflamados y muestran una función efectora inmediata, mientras que la reactiva es mediada por LT de memoria central (TCM) que migran a las áreas de células T de órganos linfoides secundarios, tienen poca o ninguna función efectora, pero fácilmente proliferan y se diferencian a células efectoras en respuesta al estímulo antigénico.

La cuantificación y frecuencia de LT en respuesta a un antígeno específico, puede determinarse por CF, evaluando, entre otros: (i) población de células T CD8+-tetrámero específicas. Los tetrámeros resultan de la asociación de una avidina fluorescente y cuatro moléculas MHC Clase I biotinadas, pre-cargadas con un péptido antigénico (monómero) [85, 86]; (ii) población de LT productores de IFN- $\gamma$  por coloración intracelular; (iii) moléculas efectoras en población de CTLs, tales como perforina, granzima y granulicina, localizadas en gránulos citoplasmáticos y analizadas por coloración intracelular; (iv) determinación de moléculas de citotoxicidad CD107a (LAMP-1) y CD107b (LAMP-2), cuya exposición en la superficie celular es un resultado del proceso de degranulación. Una exposición significativa de CD107a/b puede observarse por coloración intracelular 30 minutos después de la estimulación del LT, y alcanza su pico máximo a las 4 horas [84]. Además, la determinación de precursores LT CD8+, puede realizarse por métodos tradicionales como son, ELISA, ELISPOT, liberación de timidina tritiada, entre otros.

## 4. DISEÑO EXPERIMENTAL Y MÉTODOS

La obtención de *Fast-DCs* y *Estándar-DCs* se realizó a partir de monocitos de individuos sanos, los cuales fueron crio-preservados y luego cultivados en presencia de citoquinas específicas para tal fin. En algunos individuos, este proceso se realizó con células frescas con el fin de evaluar el efecto de la crio-preservación en la generación de DCs *in vitro*. Una vez generadas, las células fueron monitorizadas bajo el microscopio invertido para evaluar su morfología. La caracterización fenotípica de DCs se determinó por medio de CF, analizando la expresión de marcadores de diferenciación de células maduras e inmaduras. La capacidad funcional como APCs se evaluó mediante ensayos *in vitro* en los que se exploró por CF la proliferación de LT CD4+ y la producción de IFN- $\gamma$  por estas células mediante tinción intracelular y en sobrenadantes de cultivo por ELISA. Finalmente, como parte de la caracterización funcional de la respuesta inducida en LT, se generaron líneas de LT CD8+ a partir de individuos sanos HLA-A\*0201 positivos [87, 88], los cuales fueron re-estimulados con *Fast-DCs* pulsadas con péptidos de antígenos modelo en los que se analizó la especificidad de la respuesta.

### 4.1 OBTENCIÓN DE CÉLULAS BLANCAS DE SANGRE PERIFÉRICA

Células blancas de sangre periférica fueron obtenidas de unidades de sangre total de individuos sanos ( $n=29$ ), donadas por el Banco de Sangre del Instituto Nacional de Cancerología (INC), E.S.E. Una vez adquirida la unidad, el laboratorio de Banco de Sangre obtiene para su uso cada uno de los productos sanguíneos (glóbulos rojos, plasma, plaquetas), dejando como producto de desecho la capa de los glóbulos blancos o "*buffy coat*", la cual ha sido donada con fines de investigación. Para los ensayos de generación de líneas de LT CD8+ específicas de péptido, fueron requeridas células que expresan el alelo HLA-A\*0201, por lo que se emplearon PBMCs de individuos HLA\*0201

positivos previamente tipificados por Biología Molecular en el laboratorio de la Fundación Salud de los Andes, según técnica descrita por Argüello JR [89] y estandarizada previamente en el laboratorio por Alfonso R (manuscrito en preparación). Los individuos HLA\*0201 positivos donaron su sangre de manera voluntaria en el Banco de Sangre del INC.

## **4.2 AISLAMIENTO Y CULTIVO DE CÉLULAS**

Monocitos de sangre periférica de individuos sanos fueron purificados por el método selección negativa, usando RosetteSep (StemCell Technologies) o por el método de adherencia al plástico y congelados en medio de congelación compuesto por RPMI 1640 estéril (Gibco) 50% + SFB (Gibco) 40% + DMSO (ICN Biomedicals) 10%. En algunos casos se generaron DCs a partir de monocitos frescos de sangre periférica purificados.

**4.2.1 Obtención de monocitos por el método de rosetas.** Con el objeto de retirar el exceso de anticoagulante de las unidades de sangre total del Banco de Sangre del INC, se realizaron varios lavados con medio RPMI 1640 + SFB 1% a la capa de glóbulos blancos, para luego agregar 50µl del reactivo RosetteSep por cada ml de muestra, según indicaciones del proveedor (StemCell Technologies). Se incubó durante 20 minutos a temperatura ambiente (TA) y luego se realizó centrifugación por gradiente de densidad con Ficoll-Paque (GE Healthcare), a razón 1:2 Ficoll : Muestra. El anillo superior obtenido luego de centrifugación (monocitos purificados) fue lavado dos veces con medio RPMI. La viabilidad y el número de células se determinaron con colorante de exclusión azul de tripán (Gibco). Para la generación de DCs inmaduras, monocitos purificados por rosetas se cultivaron en cajas de 24 pozos estériles (Becton Dickinson – BD) en presencia de medio AIM V estéril (Gibco) + 750UI de IL-4 y 1000UI de GM-CSF (CellGenix).

**4.2.2 Obtención de monocitos por el método de adherencia.** Una vez lavada la capa de glóbulos blancos de las unidades de sangre empleadas, se

realizó centrifugación con Ficoll-Paque. Obtenidos los PBMCs, se cultivaron en cajas de 6 pozos estériles (BD), en medio RPMI incompleto. Luego se incubó durante 2 horas a 37°C, 5% de CO<sub>2</sub> y 90% de humedad [90]. La capa de células mononucleares no adherentes (linfocitos) se retiró mediante 3 lavados con PBS estéril (Dulbecco) + SFB 1% a cada pozo. Para la generación de DCs inmaduras, las células adherentes se cultivaron en medio AIM V + IL-4 y GM-CSF en las concentraciones señaladas anteriormente.

**4.2.3 Generación de DCs de 2 días (*Fast-DCs*) maduras.** Obtenidos los monocitos por el método de rosetas o por el método de adherencia antes explicados, luego de agregar las citoquinas IL-4 y GM-CSF, se incubó a 37°C, 5% de CO<sub>2</sub> y 90% de humedad durante 24 horas. Al cabo de este tiempo, las DCs inmaduras se maduraron con el coctel de citoquinas compuesto por: 10ng/ml de TNF- $\alpha$ , 10ng/ml de IL-1 $\beta$ , 1000UI/ml de IL-6 (CellGenix) y 1 $\mu$ g/ml de PGE2 (SIGMA). Se incubó a 37°C, 5% de CO<sub>2</sub> y 90% de humedad durante 24 horas adicionales [22].

**4.2.4 Generación de DCs de 7 días (*Estándar-DCs*) maduras.** Obtenidos los monocitos por el método de rosetas o por el método de adherencia, luego de agregar las citoquinas IL-4 y GM-CSF, se incubó a 37°C, 5% de CO<sub>2</sub> y 90% de humedad durante 72 horas. Al cabo de este tiempo, se retiró la mitad del medio del pozo y se agregó nuevamente IL-4 y GM-CSF en la misma cantidad de medio AIM V retirado, teniendo en cuenta de agregar el total requerido de citoquinas para la cantidad total de medio por pozo, según concentraciones antes mencionadas. Luego se incubó a 37°C, 5% de CO<sub>2</sub> y 90% de humedad durante 48 horas. Finalmente, las DCs inmaduras se cultivaron durante 48 horas adicionales con el coctel de citoquinas pro-inflamatorias + IL-4 y GM-CSF, en las concentraciones indicadas en numerales 4.2.1 y 4.2.3 [71].

Para la generación de DCs inmaduras, los cultivos se siguieron como se indicó, tanto para *Estándar-DCs* como para *Fast-DCs*, pero sin adicionar el coctel de citoquinas pro-inflamatorias. Las células no adherentes en su

mayoría correspondían a DCs maduras y las adherentes (células inmaduras) se desprendieron con PBS-EDTA (Merck) 3mM [91] (precalentado a 37°C) a 37°C. Finalmente, se realizó recuento en cámara de Neubauer con colorante de exclusión azul de tripán y se determinó la viabilidad celular para ambos tipos de DCs. Para la caracterización fenotípica de ambos tipos celulares no fue necesario que las células provinieran de individuos HLA-A\*0201 positivos, por lo que se emplearon células de individuos sin tipificar.

**4.2.5 Purificación de LT CD4 y CD8 por selección positiva.** PBMCs de individuos sanos fueron obtenidos por centrifugación con Ficoll-Paque y criopreservados en medio de congelación. Cuando correspondió, los PBMCs fueron descongelados y lavados con medio RPMI 1640 + SFB 1%. Por cada  $10^7$  PBMCs resuspendidos en 80µl de medio RPMI 1640 + SFB 1% + EDTA 0.5mM, se agregaron 20µl de perlas anti CD4 ó anti CD8, según indicaciones del fabricante (Miltenyi Biotec) [92, 93]. Luego de incubar a 4°C durante 15 minutos, la separación de las poblaciones CD4+ y/o CD8+ se efectuó por medio de un separador MiniMACS (Miltenyi Biotec), el cual retiene la población de linfocitos de interés contenidos en la columna, mientras son lavadas las células inespecíficas (monocitos). La purificación de las células se evidenció por CF por medio de marcadores específicos. A diferencia de los LT CD4+, las células CD8+ fueron obtenidas de individuos sanos HLA-A\*0201 positivos para la generación de líneas específicas de TAAs-A2.

#### **4.3 CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA DE DCs**

*Fast-DCs* y *Estándar-DCs* se recolectaron en PBS + SFB 1%, y se realizó tinción con los siguientes anticuerpos monoclonales: CD209 (DC-SIGN) FITC, HLA-DR APC, CD14 PE, CD80 PE, CD86 PE o APC, CD83 FITC o PE-Cy5 (BD) y CCR7 FITC (R&D Systems) a 4°C durante 20 minutos en condiciones de oscuridad y se resuspendieron en Paraformaldehído (SIGMA) al 1% en PBS. Se adquirieron  $10^4$  eventos en el gate de DCs (tomado en gráfico de puntos, dot plot, de Side Scatter - SSC vs. Forward Scatter - FSC) en citómetro



de flujo FACS Scan y FACS CANTO II (Becton Dickinson). Los datos se analizaron usando software Summit 4.3 (Beckman Coulter) y FlowJo 7.2.5 (Tristar).

#### **4.4 GENERACIÓN DE LÍNEA DE LT CD8+ ESPECÍFICOS DE TAAs-A2**

Una vez maduras, las *Fast-DCs* de un individuo sano HLA-A\*0201 positivo fueron pulsadas con cada uno de los TAAs-A2 mencionados en el numeral 4.12, a una concentración 10 $\mu$ M durante 2 a 4 horas a 37°C/5% CO<sub>2</sub>. En cajas de 96 pozos fondo plano (BD) se colocaron las *Fast-DCs* estimuladas en co-cultivo con LT CD8+ purificados del mismo individuo en medio AIM V + Suero AB Humano 10% (Gibco). Al cabo de dos días, se adicionó al cultivo IL-2 (300UI/ml) e IL-7 (10ng/ml) recombinantes para uso humano (R&D Systems) [23]. Las células se recolectaron en el día 10, habiendo hecho recambio de citoquinas y de la mitad del medio cada 72 horas. Luego de hacer recuento y viabilidad celular por medio de azul de tripán, los LT CD8+ fueron re-estimulados con *Fast-DCs* del mismo individuo, maduras, pulsadas con el péptido correspondiente, como se mencionó antes. Después de 72 horas, los LT CD8+ se analizaron por CF, para lo cual fueron marcados con anti-CD8 Alexa 750 APC (Caltag Lab), tetrámero Melan-A PE o tetrámero NY-ESO1 PE (Dako Cytomation) para determinar poblaciones de LT CD8+ tetrámero positivos. Los probandos a emplear fueron los siguientes:

- *Fast-DCs* + LT CD8+ sin péptido
- *Fast-DCs* + LT CD8+ con péptido (TAAs-A2)
- *Fast-DCs* + LT CD8+ con péptido Leishmania (no relacionado), pulsadas de la misma forma que para TAAs-A2.

#### **4.5 DETERMINACIÓN DE LT CD8+ TETRÁMERO POSITIVAS POR CF**

Luego de 72 horas de re-estimulación con *Fast-DCs* pulsadas con péptido, LT CD8+ específicos de péptido fueron lavados con PBS + SFB 1% (buffer de

lavado) y teñidos durante 10 minutos en condiciones de oscuridad a temperatura ambiente con 10µl de tetrámeros HLA-A\*0201 marcados con PE, específicos para péptido Melan-A p26-35 (DakoCytomation) o NY-ESO1 p157-165 (Proimmune), en un volumen final de 100µl. Después de un lavado, las células fueron teñidas con anticuerpo anti-CD8 PerCP (BD) durante 20 minutos a 4°C en condiciones de oscuridad, en un volumen de 100µl y luego de otro lavado, se resuspendieron en PBS + Paraformaldehído al 1%. Se adquirieron 10<sup>5</sup> eventos en la población de LT CD8+.

#### **4.6 ENSAYO DE MOVILIZACIÓN DE CD107a Y CD107b**

LT CD8+ generados al cabo de 10 días (específicos de TAAs-A2) se incubaron con *Fast-DCs* maduras pulsadas con péptido en tubos de citometría estériles de 12x75mm (BD), en un volumen final de 200µl de medio AIM V: 100ul de células efectoras (LT CD8+) + 100ul de células blanco (*Fast-DCs*). Con el propósito de inhibir el transporte de las glicoproteínas de membrana y de las proteínas de secreción a partir del aparato de Golgi, se adicionó 1µl de Monensina (GolgiStop – BD) a cada pozo. Además, se adicionaron 5µl de anti-CD107a PE + 5ul de anti-CD107b FITC (BD) por pozo. Se incubó durante 5 horas a 37°C/5% CO<sub>2</sub>. Después de centrifugación, los conjugados célula – célula fueron disgregados lavando el sedimento celular con PBS + EDTA 0.5mM [94]. El pellet fue teñido con anti-CD8 PerCP durante 20 minutos a 4°C y, luego de lavado, el pellet fue resuspendido en Paraformaldehído al 1% en PBS para finalmente analizar por CF. La lectura se realizó con base en la población de LT CD8+ seleccionada a partir de la población de linfocitos observada en SSC vs. FSC. Los probandos empleados fueron los descritos en el numeral 4.4.

#### **4.7 GENERACIÓN DE LÍNEA DE LT CD4+ Y LT CD8+ ESPECÍFICOS DE ESAT-6 RECOMBINANTE HUMANA**

Con base en los ensayos realizados para la generación de LT CD8+ específicos de péptido, PBMCs de un individuo sano PPD (Protein Purified Derivative) positivo, fueron obtenidos por centrifugación con Ficoll-Paque. Las células fueron estimuladas con 10µg/ml de proteína recombinante ESAT-6. Luego de 2 días, se agregó IL-2 recombinante humana, haciendo recambio de la mitad del medio cada 72 horas durante 10 días. Al cabo de este tiempo, las células fueron re-estimuladas por 18 horas con *Fast-DCs* autólogas pulsadas con ESAT-6 recombinante humana por 2 horas antes de madurar con el coctel de citoquinas pro-inflamatorias. Como control negativo, PBMCs específicos de ESAT-6 fueron re-estimulados con *Fast-DCs* maduras, sin pulsar con la proteína recombinante. Brefeldina A (10µg/ml, SIGMA) fue adicionada por las últimas 6 horas de cultivo para inhibir el tránsito de proteínas desde el Retículo Endoplasmático al Complejo de Golgi. Las células fueron recolectadas, lavadas con buffer de lavado y teñidas con anti-CD8 PerCP. Luego de un lavado, las células fueron resuspendidas en buffer de fijación (Cytotfix/Cytoperm™ Fixation/Permeabilization Solution Kit, BD), incubadas durante 20 minutos a 4°C y lavadas con solución PermWash 1X (solución de permeabilización), como lo indica el fabricante. Luego de descartar el sobrenadante, el pellet celular fue resuspendido en solución de permeabilización + anti-IFN-γ PE (BD). Las células se incubaron durante 30 minutos a 4°C en condiciones de oscuridad. Luego de centrifugar con buffer de lavado, las células se resuspendieron en Paraformaldehído al 1% en PBS. Para determinar poblaciones IFN-γ positivas, se adquirieron  $1,3 \times 10^5$  eventos en la población de linfocitos por CF.

#### **4.8 MARCAJE DE LT CD4+ CON CFSE**

Luego de purificar los LT CD4+, se realizó un lavado con PBS + SFB 5%, con el fin de proteger las células de la toxicidad causada por el Carboxyfluorescein

Succinimidyl Ester (CFSE - Molecular Probes Invitrogen). Las células purificadas se resuspendieron a una concentración de  $0.5$  a  $10 \times 10^6$  por ml de PBS + SFB 5%. A la suspensión celular se agregó CFSE  $4 \mu\text{M}$  y luego se incubó en baño serológico a  $37^\circ\text{C}$  durante 10 minutos. La coloración se detuvo adicionando PBS + SFB 5% frío a las células e incubando en hielo durante 5 minutos. Posteriormente se hicieron 3 lavados con PBS + SFB 5% frío [95].

#### **4.9 REACCIÓN MIXTA DE LINFOCITOS (MLR)**

*Fast-DCs* maduras con el coctel de citoquinas pro-inflamatorias fueron co-cultivadas con LT CD4+ autólogos o heterólogos purificados por selección positiva, marcados con CFSE, en cajas de 96 pozos fondo redondo (BD) en  $200 \mu\text{l}$  de medio AIM V + Suero AB Humano 10% [96]. Como control positivo, se colocaron *Fast-DCs* + LT CD4+ autólogos + Fitohemaglutinina M (PHA-M - SIGMA) 2% v/v. Al cabo de 5 días, las células fueron recolectadas y marcadas con anti-CD4 PE y anti-CD69 APC-Cy7 (BD) y analizadas por CF, con base en la población de linfocitos en SSC vs. FSC. Un resultado positivo se determinó como el porcentaje de LT CD4+ que proliferaron (pérdida en la fluorescencia del CFSE) en respuesta a la estimulación de LT CD4+ de diferentes individuos con *Fast-DCs* maduras heterólogas, comparado con el porcentaje de células proliferando en el control negativo (*Fast-DCs* maduras autólogas + LT CD4+ autólogos).

#### **4.10 LT CD4+ ESPECÍFICOS DE PÉPTIDO TOXOIDE TETÁNICO (TT)**

Ocho horas antes de adicionar el coctel de citoquinas pro-inflamatorias, *Fast-DCs* fueron pulsadas con TT  $10 \mu\text{g/ml}$  y luego de 24 horas de maduración con el coctel, las células fueron co-cultivadas con LT CD4+ marcados con CFSE de un individuo sano previamente vacunado contra TT en  $200 \mu\text{l}$  de medio AIM V + Suero AB Humano 10% por pozo de cajas de 96 pozos fondo redondo [97]. Las células se recolectaron en el día 5, se marcaron con anti-CD4 PE-Texas Red (Rochem Biocare) y anti-CD69 APC-Cy7 para ser analizadas por

CF. Un resultado positivo se determinó como el porcentaje de LT CD4+ que proliferaron (pérdida en la fluorescencia del CFSE) en respuesta a la estimulación con *Fast-DCs* estimuladas con TT, comparado con el porcentaje de células proliferando en el control negativo (*Fast-DCs* maduras sin estimular + LT CD4+). Como control positivo, se colocaron *Fast-DCs* + LT CD4+ + PHA-M (SIGMA) 2% v/v.

#### 4.11 MEDICIÓN DE PRODUCCIÓN DE IL-12p70 E IFN- $\gamma$ POR ELISA

La producción de IL-12p70 en sobrenadantes de cultivo de DCs maduras y de IFN- $\gamma$  en sobrenadantes de 40 horas de cultivo de MLR y LT CD4+ estimulados con *Fast-DCs* pulsadas con TT fue determinada por *Enzyme – Linked Immunosorbent Assay* – ELISA, de acuerdo a las indicaciones dadas por el fabricante (OptEIA™ – Becton Dickinson). La reacción fue leída en lector de ELISA con filtro de 630nm y los resultados se expresaron como pg/ml de citoquina, con base en los datos obtenidos de la curva de un estándar de citoquina recombinante de concentración conocida (IL-12p70 y Human IFN- $\gamma$  ELISA Set BD OptEIA™).

#### 4.12 PÉPTIDOS SINTÉTICOS

Los péptidos empleados (**TAA**s-A2: **Melan-A p26-35** ELAGIGILTV, **NY-ESO1 p157-165** SLLMWITQV, **Her-2/neu p369-377** KIFGSLAFL, **Telomerasa p540-548** ILAKFLHWL y péptido no relacionado: **Leishmania** DSLTLNRAL) fueron sintetizados por el método de síntesis de péptidos en fase sólida [98]. El reconocimiento de estas epítopes por LT CD8+ citotóxicos es restringido en el contexto del alelo HLA-A\*02 (alelos HLA-A\*02011 y HLA-A\*02013). El péptido de *Leishmania* se empleó como péptido control (un péptido no relacionado, sin capacidad de unión a alelos HLA-A\*02).

## 5. ANÁLISIS ESTADÍSTICOS

### 5.1 HIPÓTESIS DE TRABAJO

El fenotipo de las DCs inmaduras es diferente al fenotipo de las DCs maduras; adicionalmente, el fenotipo de las células *Fast-DCs* es igual al fenotipo de las *Estándar-DCs* abriendo así la posibilidad de emplear *Fast-DCs* maduras en ensayos clínicos.

**Hipótesis nula 1:** La mediana de los marcadores de las *Fast-DCs* es igual a la mediana de los marcadores de las *Estándar-DCs*

**Hipótesis nula 2:** La mediana de los marcadores de las DCs inmaduras es igual a la mediana de los marcadores de las DCs maduras.

**Hipótesis alterna 1:** La mediana de los marcadores de las *Fast-DCs* es diferente a la mediana de los marcadores de las *Estándar-DCs*

**Hipótesis alterna 2:** La mediana de los marcadores de las DCs inmaduras es diferente a la mediana de los marcadores de las DCs maduras.

### 5.2 DESCRIPCIÓN DE LAS VARIABLES

Para la selección de la prueba estadística que se aplicó a los resultados obtenidos, inicialmente se realiza una descripción estadística de las variables a comparar; en este caso se agruparon en 4 categorías: (i) método de obtención (ii) tiempo de cultivo, (iii) estado de maduración y (iv) congelación. se realizaron figuras de caja y bigotes (percentiles 5-95%) de los cuatro grupos observando así el tipo de distribución (normal o asimétrico) de los datos en cada una de las categorías por cada una de las variables (marcadores de

fenotipificación en porcentajes), adicionalmente se muestran los datos correspondientes a la media, mediana y desviación estándar.

### 5.3 PRUEBA ESTADÍSTICA

Según la hipótesis planteada, donde se desea comparar el fenotipo de las DCs de dos días (*Fast-DCs*) con respecto a las DCs de 7 días (*Estándar-DCs*), se analiza cada una de las muestras como independientes (a pesar de que algunas muestras provenían de los mismos individuos, la generación de las DCs se realizó a partir de tratamientos diferentes), tanto en un estado inmaduro como maduro, haciendo así un análisis de muestras no pareadas (*Fast-DCs vs Estándar-DCs* e *Inmaduras vs Maduras*). Con este análisis y con las descripciones de los datos analizados anteriormente se decide realizar la prueba de Mann-Whitney.

**5.3.1 Significancia estadística.** Para la definición de la significancia estadística, en este trabajo se decidió tomar un valor de 5% ( $p=0.05$ ) con un estudio a dos colas (los valores obtenidos en las diferentes muestras pueden ser mayores o menores entre los grupos de comparación seleccionados). Se considerará un valor significativo menor de 0.05 ( $*p<0.05$ ) y altamente significativo  $<0.01$  ( $**p<0.01$ ). Los análisis y las gráficas se realizarán en GraphPad Prism 5.0.

## 6. RESULTADOS

### 6.1 COMPARACIÓN MORFOLÓGICA DE *Fast-DCs* CON *Estándar-DCs*

La morfología de *Fast-DCs* fue comparada con la de *Estándar-DCs* bajo el microscopio de contraste de fases. En estado maduro, las *Fast-DCs* fueron muy similares en tamaño a los monocitos purificados por el método de rosetas. Por el contrario, las *Estándar-DCs* se mostraron más grandes, presentando los “vellos” típicos de DCs diferenciadas terminalmente. Asimismo, no se encontraron diferencias morfológicas al comparar *Fast-DCs* y *Estándar-DCs* obtenidas por el método de adherencia de monocitos al plástico o por purificación de monocitos por rosetas (Véase Figuras 3 y 4).

La diferencia en tamaño y granularidad de *Fast-DCs* y *Estándar-DCs* puede también evidenciarse en el análisis por CF, en gráfico de dispersión de puntos (dot plot) de SSC vs. FSC, como puede observarse en la Figura 5.

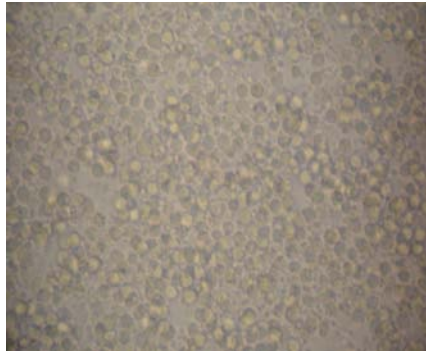
Mientras se obtuvo aproximadamente un 50% de *Fast-DCs* maduras, con base en la población inicial, la cantidad de células recuperadas en los cultivos de *Estándar-DCs* fue de aproximadamente un 30%. La viabilidad de las células obtenidas osciló entre un 80 y 90% para ambos tipos celulares.

### 6.2 CARACTERÍSTICAS FENOTÍPICAS DE *Fast-DCs* Y *Estándar-DCs*

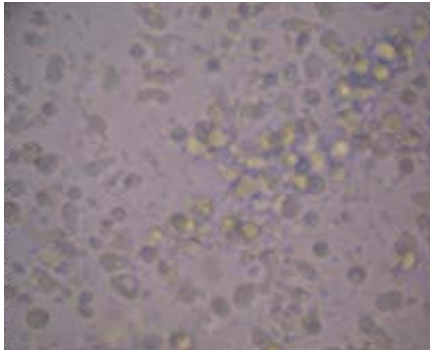
Monocitos de sangre periférica de 29 individuos sanos fueron purificados por el método de rosetas (selección negativa, RosetteSep – StemCell Technologies) o por adherencia al plástico y cultivados en presencia de IL-4 y GM-CSF durante uno y cinco días para *Fast-DCs* y *Estándar-DCs*, respectivamente. Las DCs inmaduras fueron luego maduras con el coctel de citoquinas pro-inflamatorias (IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$  y PGE2) por 24 y 48 horas adicionales para cada tipo celular, respectivamente.



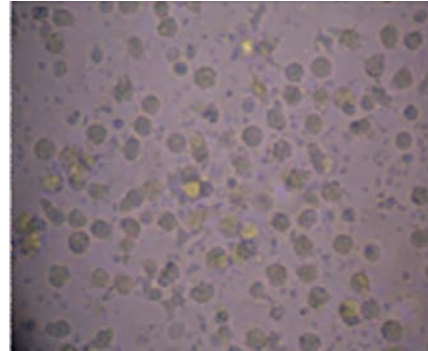
**A. Monocitos**



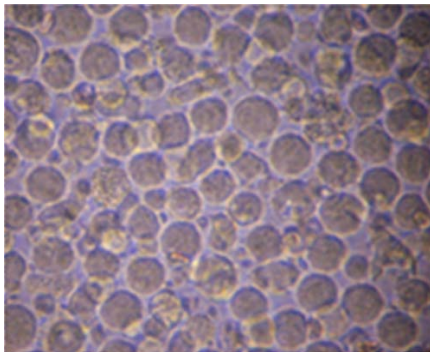
**B. *Fast-DCs* Inmaduras**



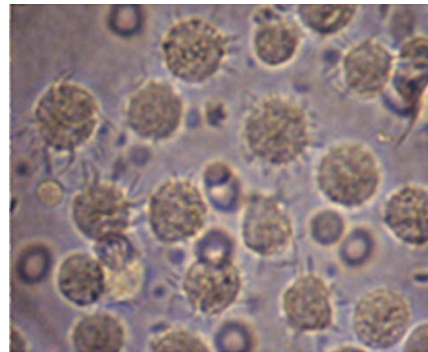
**C. *Fast-DCs* Maduras**



**D. *Estándar-DCs* Inmaduras**

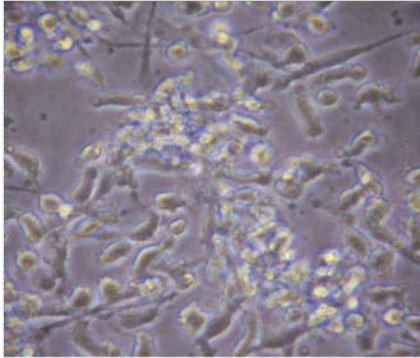


**E. *Estándar-DCs* Maduras**

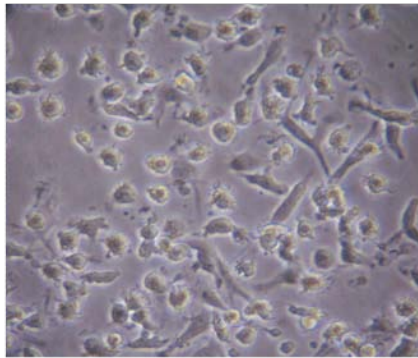


**Figura 3.** Morfología celular bajo el microscopio de contraste de fases. A) Monocitos purificados por rosetas. B - E) *Fast-DCs* y *Estándar-DCs* inmaduras y maduras derivadas a partir de monocitos obtenidos por rosetas.

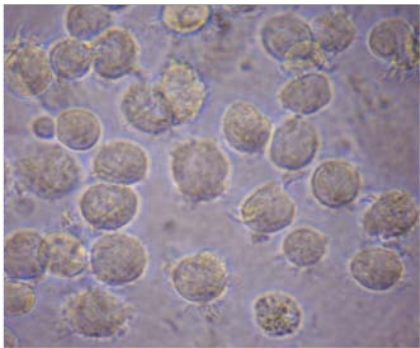
**A. *Fast-DCs* Inmaduras**



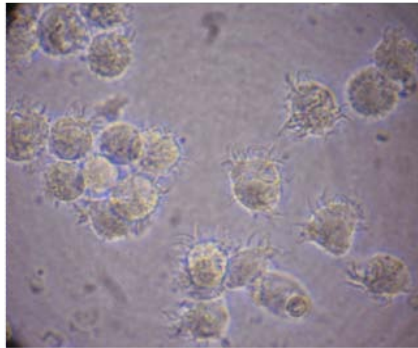
**B. *Fast-DCs* Maduras**



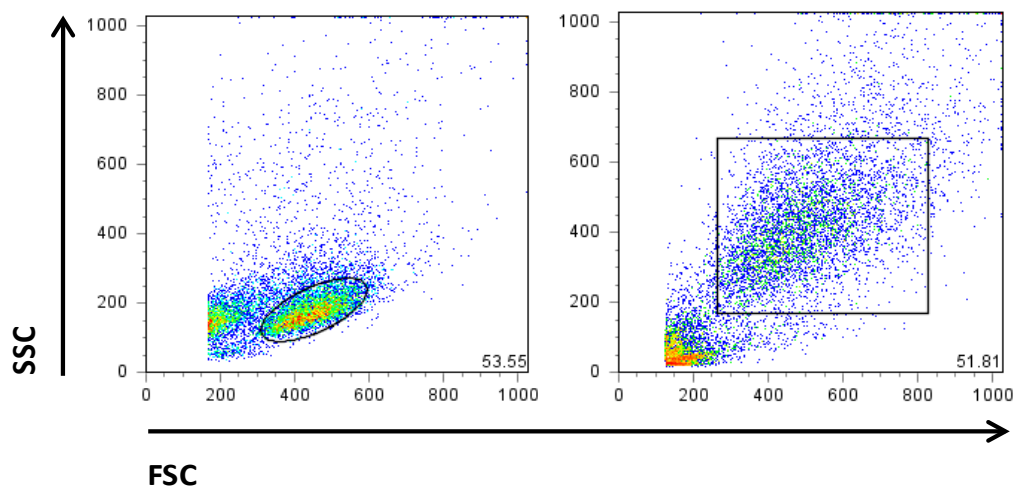
**C. *Estándar-DCs* Inmaduras**



**D. *Estándar-DCs* Maduras**



**Figura 4.** Morfología bajo el microscopio de contraste de fases de *Fast-DCs* y *Estándar-DCs* obtenidas a partir de monocitos purificados por el método de adherencia al plástico.



**Figura 5.** Gráficas de dispersión de puntos (dot plot) de Side Scatter (SSC) vs. Forward Scatter (FSC) mostrando las diferencias morfológicas de *Fast-DCs* (izquierda) y *Estándar-DCs* (derecha) analizadas por CF.

Para cada individuo, los monocitos se cultivaron en dos pozos de cajas de 24 pozos con el fin de realizar la fenotipificación de DCs tanto inmaduras como maduras. Las DCs fueron generadas a partir de monocitos frescos o congelados con el propósito de observar posibles cambios en las características fenotípicas de las células. De esta forma, se obtuvieron datos para *Fast-DCs* y *Estándar-DCs* inmaduras y maduras, obtenidas por rosetas y/o por adherencia, a partir de monocitos frescos y/o congelados. Finalmente, a las DCs generadas se les determinó el porcentaje de expresión de los marcadores de superficie CCR7, CD86, CD83, CD209, CD14, HLA-DR y CD80 por CF.

**6.2.1 Análisis descriptivo.** En primer lugar se realizó un análisis descriptivo de los datos recolectados con el fin de tener una idea preliminar de la existencia de una diferencia entre las muestras obtenidas por rosetas en comparación a las muestras obtenidas por adherencia, entre las *Fast-DCs* y *Estándar-DCs*, entre las células inmaduras y las maduras y finalmente entre las células congeladas y las frescas, conclusiones válidas para las 29 unidades muestrales utilizadas en el estudio.

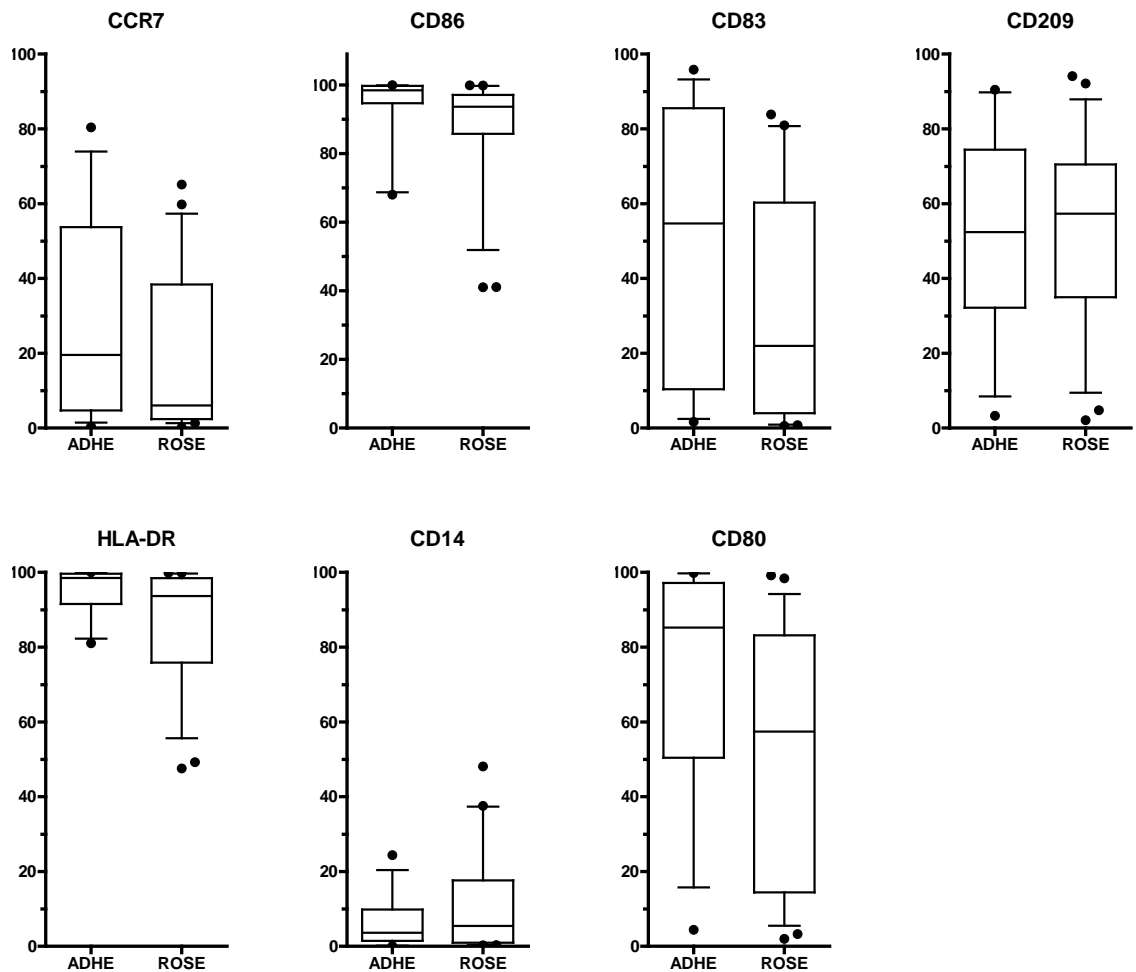
**6.2.1.1 Método de obtención.** Del total de datos obtenidos (90), para 58 los monocitos se obtuvieron por el método de rosetas y para 32 por el método de adherencia al plástico. Para cada uno de los siete marcadores por cada uno de los métodos de obtención (rosetas o adherencia), se presentan en la Tabla 2 la media, la mediana y la desviación estándar y en la Figura 6 los diagramas de cajas. La distribución del marcador CD209 no muestra grandes diferencias entre los dos métodos de obtención, presentando en ambos casos gran variabilidad y valores de concentración prácticamente entre cero y cien. Los marcadores CD86 y HLA-DR tienen concentraciones altas para los dos niveles de la variable, sin embargo, las células obtenidas por rosetas presentan mayor variabilidad teniendo concentraciones hasta del 40% mientras que para adherencia los valores mínimos son alrededor del 70%.

**Tabla 2.** Estadísticas descriptivas para los siete marcadores de superficie de acuerdo al método de obtención (rosetas - adherencia) de *Fast-DCs* y *Estándar-DCs*.

	Método de obtención	CCR7	CD86	CD209	CD83	HLA-DR	CD14	CD80
<b>Media</b>	Rosetas	19.72	88.66	53.65	32.16	86.86	10.24	50.89
	Adherencia	27.98	94.67	52.86	50.73	95.18	6.11	71.88
<b>Mediana</b>	Rosetas	6.05	93.65	57.35	21.96	93.65	5.43	57.45
	Adherencia	19.58	98.42	52.41	54.73	98.52	3.65	85.22
<b>Desviación Estándar</b>	Rosetas	19.91	14.03	24.11	29.08	15.03	11.85	33.67
	Adherencia	25.01	8.97	25.99	34.85	6.05	6.43	29.55

Para el marcador CD14 se tiene una situación similar a la anterior, pero en este caso las concentraciones son bajas. De esta manera, para estos tres marcadores el promedio de concentración es de valores extremos para las células obtenidas por adherencia. Para los marcadores CCR7, CD83 y CD80 se encuentra que las distribuciones toman valores en un rango amplio siendo más dispersas en las células obtenidas por adherencia, además la concentración media y mediana es mucho mayor en estas células que en las obtenidas por rosetas. Para CD86 se encuentra que, a excepción de un dato, las concentraciones para adherencia son mayores al 97%, mientras que en rosetas la mitad de las observaciones son menores al 93,65%. Para CD14 se encuentran varios datos atípicos para las células purificadas por rosetas que hacen que su media sea mucho mayor que su mediana. Las distribuciones de los marcadores CCR7, CD86, HLA-DR y CD14 presentan diferencias. Para CCR7 se encuentra que las concentraciones para adherencia son mayores en promedio y de mayor dispersión. Para HLA-DR se observa un comportamiento similar al de CD86, existiendo valores de mayor concentración para adherencia (véase Figura 6).

**6.2.1.2 Tiempo de generación.** De los 90 datos que se tienen, 54 fueron obtenidos con el procedimiento que dura 2 días (*Fast-DCs*) y 36 con el de 7 días (*Estándar-DCs*). Para cada uno de los siete marcadores por cada uno de los tiempos de generación, se presentan en la Tabla 3 la media, la mediana y la desviación estándar y en la Figura 7 los diagramas de cajas.



**Figura 6.** Diagramas de cajas para los porcentajes de los siete marcadores de superficie de acuerdo al método de obtención (adherencia – rosetas) de *Fast-DCs* y *Estándar-DCs*. Del total de datos obtenidos (90), para 58 los monocitos se obtuvieron por el método de rosetas y para 32 por el método de adherencia al plástico.

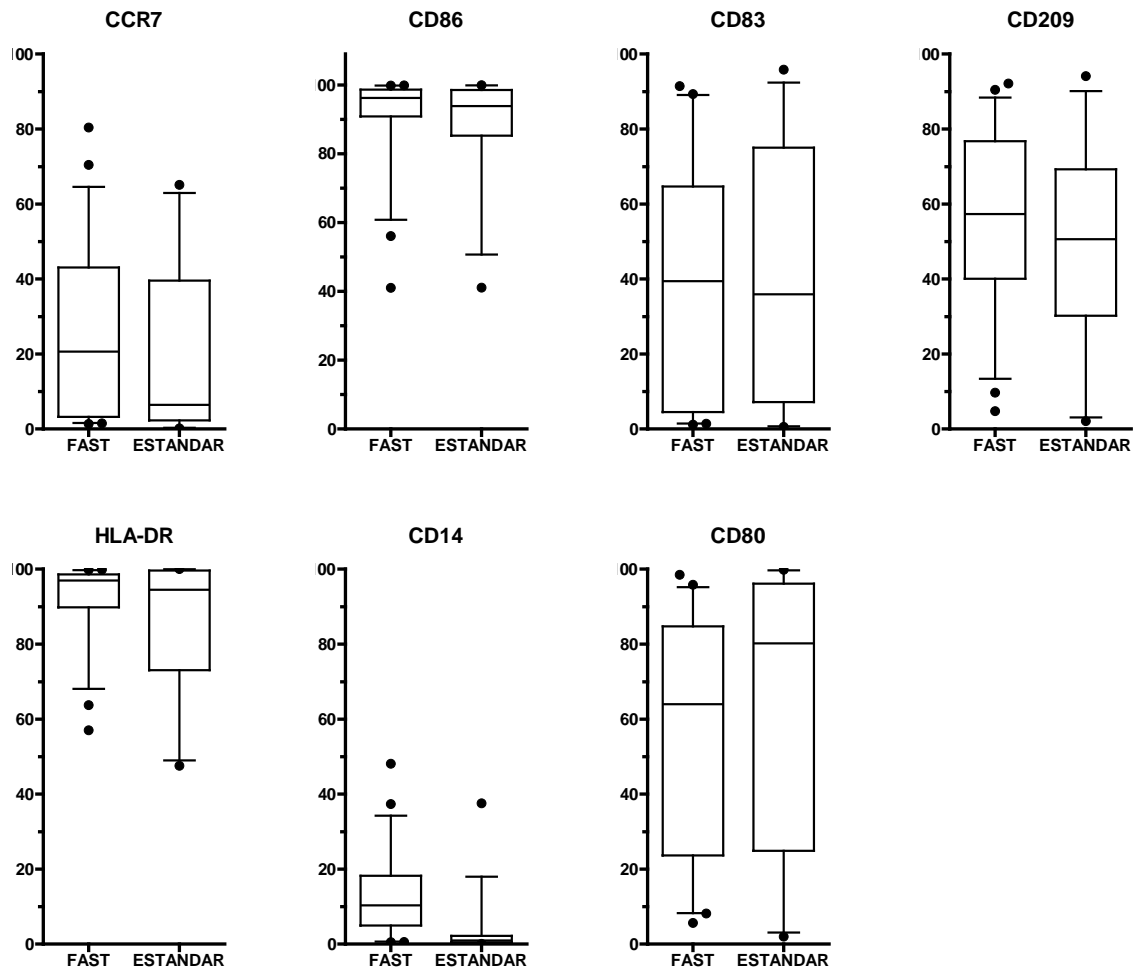
Las distribuciones de los marcadores CCR7, CD86, CD83 y CD209 no muestran grandes diferencias. Para CCR7 se observan en general porcentajes pequeños de concentración aunque se presentan algunos valores altos. Para CD86 se observa una alta concentración de valores mayores al 80%. Para CD83 se ve una pequeña diferencia entre las células *Fast-DCs* y *Estándar-DCs*, teniendo gran variabilidad este marcador en ambos casos. En el marcador CD209 se tienen muestras de gran variabilidad presentando valores

de concentración prácticamente entre cero y cien. Las distribuciones de los marcadores HLA-DR, CD14 y CD80 presentan diferencias. Para HLA-DR se observan porcentajes altos, teniendo mayor variabilidad en el caso de las células de 7 días. Para CD14 se observa que los porcentajes de *Estándar-DCs* son menores con muy poca variabilidad y se evidencia un dato atípico con el 37.55% de expresión (véase Figura 7).

**Tabla 3.** Estadísticas descriptivas para los siete marcadores de superficie de acuerdo al tiempo de generación de DCs (2 días: *Fast-DCs*, 7 días: *Estándar-DCs*).

	Tiempo de generación	CCR7	CD86	CD209	CD83	HLA-DR	CD14	CD80
<b>Media</b>	2 días	24.93	91.88	56.52	36.83	92.40	12.79	55.83
	7 días	19.84	89.18	48.65	41.66	85.94	2.74	62.40
<b>Mediana</b>	2 días	20.64	96.26	57.35	39.42	96.95	10.35	63.96
	7 días	6.42	93.85	50.63	35.91	94.50	0.97	80.19
<b>Desviación Estándar</b>	2 días	22.69	11.66	23.02	31.65	9.39	10.63	31.88
	7 días	21.55	14.23	26.54	33.54	16.79	6.49	36.25

**6.2.1.3 Maduración.** Del total de datos obtenidos (90), en 45 casos se aplicó un coctel de citoquinas pro-inflamatorias para madurar las DCs, en los demás no se aplicó dicho coctel (DCs inmaduras). En la Tabla 4 se muestran la media, la mediana y la desviación estándar para cada uno de los siete marcadores, diferenciando por DCs inmaduras y maduras y en la Figura 8 se presentan los diagramas de cajas. Las distribuciones de los marcadores HLA-DR y CD14 no muestran grandes diferencias. Para HLA-DR se observa que en ambos casos el 75% de las observaciones son mayores al 80% de concentración, alcanzando valores mínimos de alrededor del 50%. Para CD14 se observan concentraciones pequeñas por debajo del 30% exceptuando algunos valores atípicos. Las distribuciones de los marcadores CCR7, CD86, CD83, CD209 y CD80 presentan diferencias. Para las células inmaduras se encuentra que las concentraciones de CCR7 y CD83 son muy pequeñas (menor al 15%) y tienen muy poca variación, mientras que para las células



**Figura 7.** Diagramas de cajas para los porcentajes de los siete marcadores de superficie de acuerdo al tiempo de generación de DCs. De los 90 datos que se tienen, 54 fueron obtenidos con el procedimiento que dura 2 días (*Fast-DCs*) y 36 con el de 7 días (*Estándar-DCs*).

maduras se observa gran variación en los valores, entre 0 y 70% en el primer caso y entre 30% y 90% en el segundo, además la concentración promedio es mucho mayor que en las células inmaduras. Para CD86, en las células maduras, se observan valores altos (mayores al 90%) y muy concentrados, mientras que para las células inmaduras se encuentra una gran dispersión de valores que alcanzan a estar en el 40%.

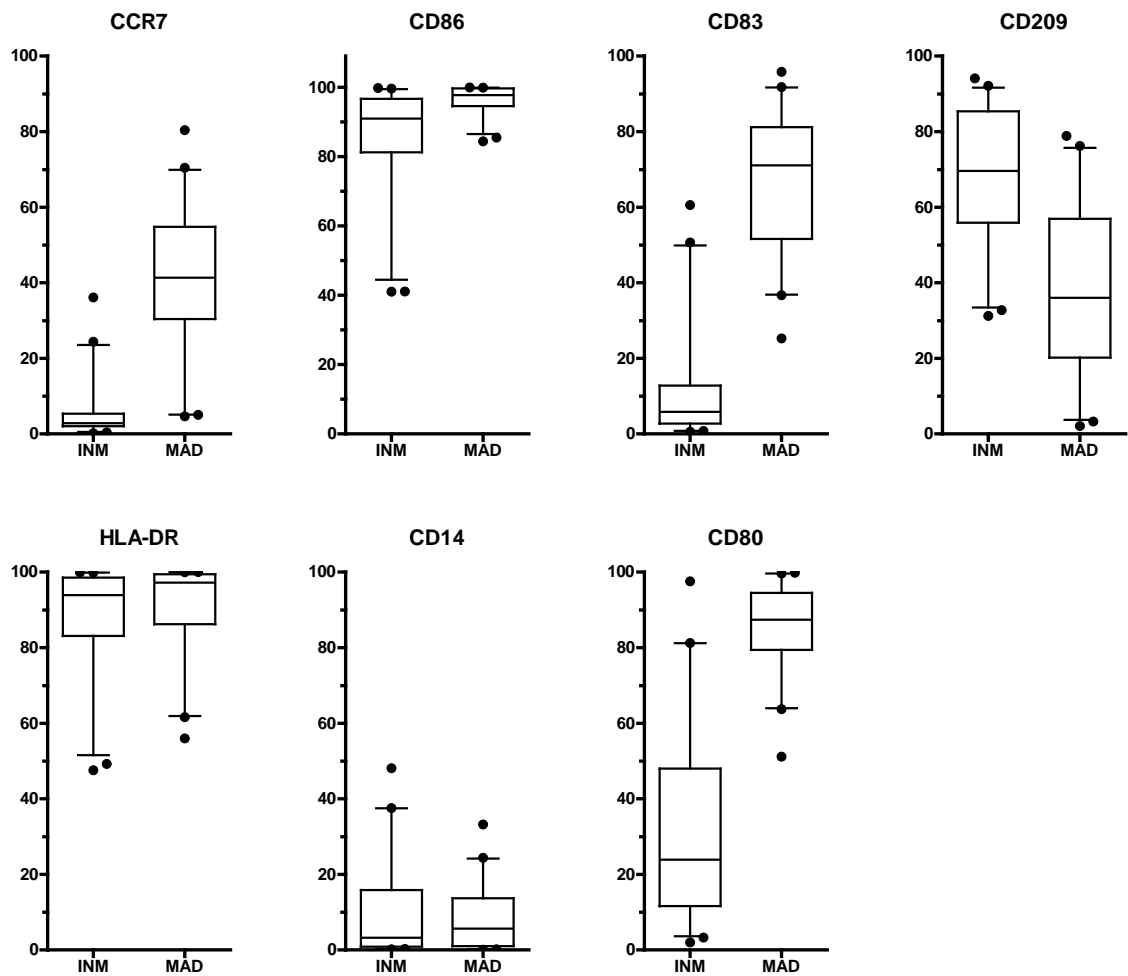
**Tabla 4.** Estadísticas descriptivas para los siete marcadores de superficie de acuerdo a la maduración de las DCs (Inmaduras - Maduras).

	Maduración	CCR7	CD86	CD209	CD83	HLA-DR	CD14	CD80
<b>Media</b>	Inmaduras	5.31	84.91	67.90	10.85	88.27	9.31	30.56
	Maduras	40.58	96.69	38.84	66.68	91.37	8.22	86.15
<b>Mediana</b>	Inmaduras	2.83	90.96	69.62	5.86	93.93	3.25	23.88
	Maduras	41.36	97.74	36.00	71.08	97.21	5.66	87.40
<b>Desviación Estándar</b>	Inmaduras	6.83	15.60	17.63	13.75	14.50	12.29	24.30
	Maduras	17.86	3.76	22.05	18.17	11.64	8.21	10.91

Para CD209 se encuentra que las dos distribuciones tienen una variación similar, pero en el caso de células maduras toma valores alrededor del 36%, cerca de la mitad de lo que toma en las inmaduras, alrededor del 70%. Para CD80 las concentraciones en las células maduras son altas, variando alrededor del 85%, contrario a las células inmaduras donde las concentraciones son bajas y se encuentran alrededor del 20% (véase Figura 8).

**6.2.1.4 Congelación.** De los 90 datos obtenidos, en 36 casos se congelaron los monocitos purificados por rosetas para la posterior generación de DCs. En 54 casos se midieron las características de las DCs obtenidas a partir de monocitos frescos. En la Tabla 5 y Figura 9 se presentan los diagramas de caja y la media, la mediana y la desviación estándar para cada uno de los siete marcadores, discriminando por células frescas y congeladas. Las distribuciones de todos los marcadores, a excepción de CCR7 y CD209, presentan diferencias. Para CCR7 y CD209 se tiene una concentración promedio similar en las células frescas y en las congeladas siendo del 23% y 21% respectivamente para el primero y del 55% y 50% para el segundo. Además se observa gran variabilidad entre los valores de CD209, ya que toma valores casi entre 0% y 100 %.

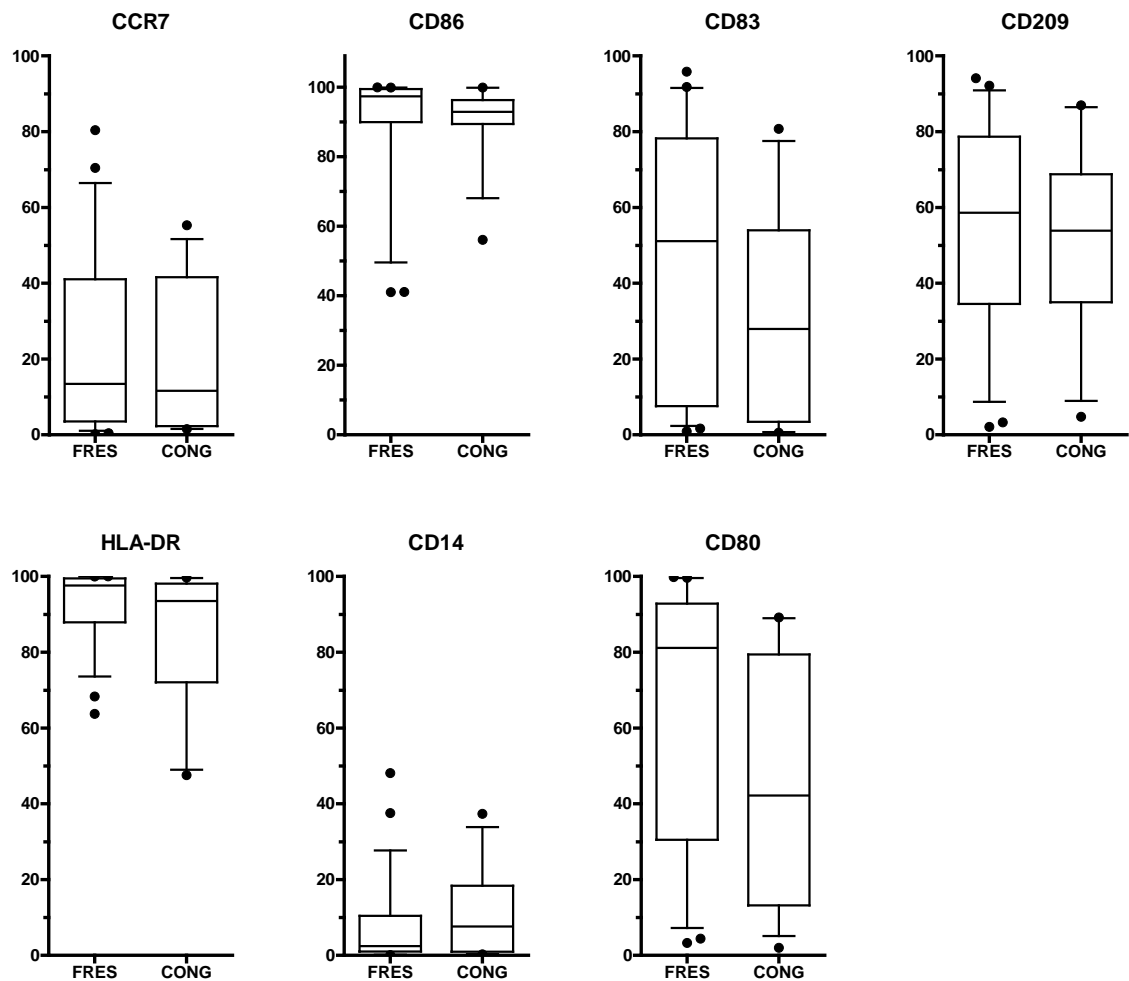




**Figura 8.** Diagramas de cajas para los porcentajes de los siete marcadores de superficie de acuerdo al estado de maduración de DCs. Del total de datos (90), en 45 casos se aplicó un coctel de citoquinas pro-inflamatorias para madurar las DCs, en los demás no se aplicó dicho coctel (DCs inmaduras).

**Tabla 5.** Estadísticas descriptivas para los siete marcadores de superficie de acuerdo a si fueron congelados o no los monocitos para la posterior generación de DCs.

	Congelación	CCR7	CD86	CD209	CD83	HLA-DR	CD14	CD80
<b>Media</b>	Frescas	23.78	90.51	55.49	44.83	93.09	7.08	66.10
	Congeladas	21.34	91.23	50.19	29.74	84.91	11.31	46.74
<b>Mediana</b>	Frescas	13.44	97.39	58.58	51.11	97.61	2.47	81.14
	Congeladas	11.59	92.91	53.86	27.92	93.52	7.62	42.17
<b>Desviación Estándar</b>	Frescas	23.47	15.05	26.23	34.33	8.74	9.66	31.95
	Congeladas	20.03	8.35	22.04	27.00	16.85	11.09	33.20



**Figura 9.** Diagramas de cajas para los siete marcadores de superficie de acuerdo a si fueron congelados o no los monocitos para la generación de DCs. De los 90 datos obtenidos, en 36 casos se congelaron los monocitos purificados por rosetas para la posterior generación de DCs. En los casos restantes se midieron las características de las DCs obtenidas a partir de monocitos frescos.

Se obtuvieron valores del marcador CD86 menores al 80%, pero la mayoría de los valores están por encima de este valor, teniéndose una concentración media mayor para las células frescas. Se observa gran diferencia entre la concentración promedio del marcador CD83, siendo aproximadamente dos veces más grande (a partir de la mediana) en el caso de las células frescas, las cuales tienen una mayor variabilidad. Para HLA-DR se encuentra una mayor variabilidad entre las células congeladas, tomando valores entre 45% y 100%, mientras que para las células frescas toma valores entre el 60% y el

100% aproximadamente, el nivel promedio para estas DCs es más alto. La concentración promedio de CD14 es menor en las células frescas, al igual que su variabilidad, teniendo la mayoría de sus valores por debajo del 20%. Para el caso del marcador CD80 se encuentra gran variabilidad en los dos tipos de células, pero se observa una diferencia entre los niveles de concentración media de las células frescas y congeladas, siendo mayor para las primeras (véase Figura 9).

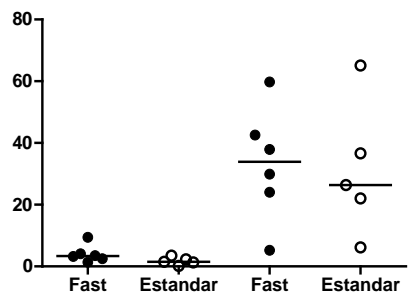
**6.2.2 Análisis comparativo mediante prueba no paramétrica.** Una vez realizado el análisis descriptivo de las muestras estudiadas, se determinaron diferencias significativas entre grupos de *Fast-DCs* y *Estándar-DCs* inmaduras y maduras, obtenidas por los métodos de rosetas o adherencia a partir de monocitos frescos o congelados, empleando la prueba estadística no paramétrica de Mann-Whitney, con un nivel de significancia del 5%.

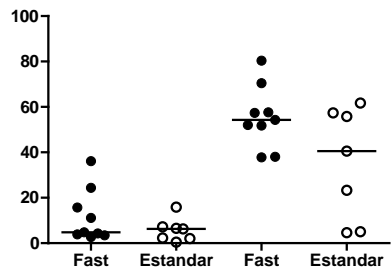
**6.2.2.1 Análisis comparativo mediante prueba no paramétrica entre DCs inmaduras y maduras.** Como puede observarse en la Figura 10, en las DCs obtenidas a partir de monocitos frescos purificados por rosetas, no se encontraron diferencias importantes entre DCs de 2 y 7 días, pero sí se encontraron diferencias significativas entre *Fast-DCs* y *Estándar-DCs* inmaduras y maduras para los marcadores CCR7 ( $p=0.0043$  y  $0.0079$ , respectivamente), CD83 ( $p=0.0022$  y  $0.0079$ , resp.) y CD80 ( $p=0.0022$  y  $0.0159$ , resp.), demostrándose así el efecto del coctel de maduración en las DCs. Para el marcador CD86 hubo diferencias significativas ( $p=0.0079$ ) entre *Estándar-DCs* antes y después del coctel de maduración, no evidenciado en *Fast-DCs*, en las cuales se mostró una concentración promedio del marcador por encima del 88% en células inmaduras y maduras. En el caso de CD209 se observó una disminución significativa ( $p=0.0152$ ) en *Fast-DCs* tratadas con el coctel de citoquinas pro-inflamatorias. No se observaron diferencias importantes en la expresión de HLA-DR y CD14 en las DCs analizadas.

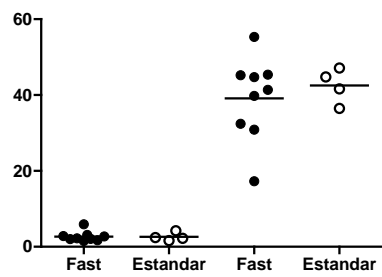
Para las DCs obtenidas a partir de monocitos frescos purificados por adherencia se encontraron diferencias significativas entre *Fast-DCs* y *Estándar-DCs* para los marcadores CD209, HLA-DR y CD80 entre células maduras y para CD14 entre células inmaduras y maduras (véase Figura 11). Hubo un efecto claro del coctel de citoquinas pro-inflamatorias en ambos tipos celulares para los marcadores CCR7, CD83, CD209 y CD80. DCs maduras de 2 días mostraron significativamente una mayor expresión de CD209 comparada con DCs maduras de 7 días ( $p=0.0262$ ), pero mucho menor que DCs de 2 días inmaduras ( $p=0.0040$ ). La expresión de HLA-DR y CD80 fue menor en *Fast-DCs* maduras que en *Estándar-DCs* maduras, con unos promedios de 92 y 99%, respectivamente para HLA-DR ( $p=0.0021$ ) y de 91 y 98% respectivamente para CD80 ( $p=0.0079$ ).

DCs de 2 y 7 días obtenidas a partir de monocitos congelados purificados por rosetas presentaron diferencias en la expresión de HLA-DR, CD86 y CD14 (véase Figura 12). *Fast-DCs* maduras expresaron significativamente mayor cantidad de HLA-DR y CD86 en su superficie comparado con *Estándar-DCs* maduras ( $p= 0.0182$  y  $0.0307$ , resp.). Asimismo, *Fast-DCs* presentaron mayor porcentaje de CD14 que *Estándar-DCs*, con concentraciones medias de 19 y 15% para *Fast-DCs* inmaduras y maduras, y de 0.6 y 0.7% para *Estándar-DCs* inmaduras y maduras, respectivamente. Como en las DCs generadas a partir de monocitos frescos, DCs obtenidas a partir de monocitos congelados purificados por rosetas respondieron eficientemente al estímulo de maduración, evidenciado por un aumento significativo en la expresión de CCR7, CD83, y CD80 y disminución importante en la expresión de CD209, para el caso de *Fast-DCs* ( $p=0.0002$ ). La expresión de CD86 aumentó en DCs de 2 días en respuesta al coctel de maduración, mientras que en *Estándar-DCs* se mantuvo estable.

Comparando DCs provenientes de monocitos frescos y congelados, aislados por selección negativa (rosetas), se encontró significativamente mayor expresión de CD83 y CD209 en *Fast-DCs* maduras (e inmaduras en el caso de







CD209), obtenidas de monocitos frescos, comparado con células provenientes de monocitos congelados ( $p=0.0138$  para CD83 y  $p=0.0104$  y  $0.0138$  para CD209 en células inmaduras y maduras respectivamente), como puede observarse en la Figura 13. *Estándar-DCs* inmaduras generadas a partir de monocitos frescos presentaron menor porcentaje de CD86 comparado con células obtenidas de monocitos congelados, pero hubo una mayor expresión de este marcador luego del estímulo de maduración ( $p=0.0173$ ).

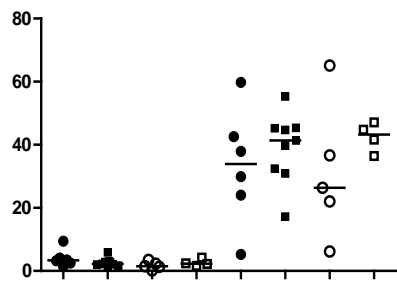
### **6.3 ACTIVACIÓN DE LT CD4+ y LT CD8+ POR *Fast-DCs* MADURAS ESTIMULADAS**

**6.3.1 *Fast-DCs* pulsadas con Toxoide Tetánico (TT).** *Fast-DCs* inmaduras de un individuo sano previamente vacunado contra el tétanos, pulsadas con TT y luego maduras con el coctel de citoquinas pro-inflamatorias, fueron co-cultivadas con LT CD4+ purificados por selección positiva y marcados con CFSE para luego evaluar la proliferación de las células por CF y la producción de IFN- $\gamma$  por el método de ELISA en sobrenadantes de cultivo.

Luego de 5 días de co-cultivo, *Fast-DCs* mostraron ser eficientes en la inducción de proliferación de LT CD4+, como se muestra en la Figura 14, en donde se observa un 52% de células proliferando en respuesta al estímulo, comparado con el control de LT CD4+ co-cultivados con APCs sin estimular (23%). Además, *Fast-DCs* fueron capaces de activar células CD4+ en respuesta a un estímulo inespecífico, como la PHA-M (93% de células en proliferación). No hubo diferencias en la expresión del marcador de activación temprana, CD69, entre LT CD4+ estimulados con *Fast-DCs* pulsadas o no con péptido TT, contrario a linfocitos co-cultivados con APCs estimuladas con PHA-M, los cuales mostraron un 67% de expresión de este marcador.

Comparado con el control de APCs sin estimular, LT CD4+ específicos de TT produjeron casi diez veces más citoquina comparado con el control (93 y 10





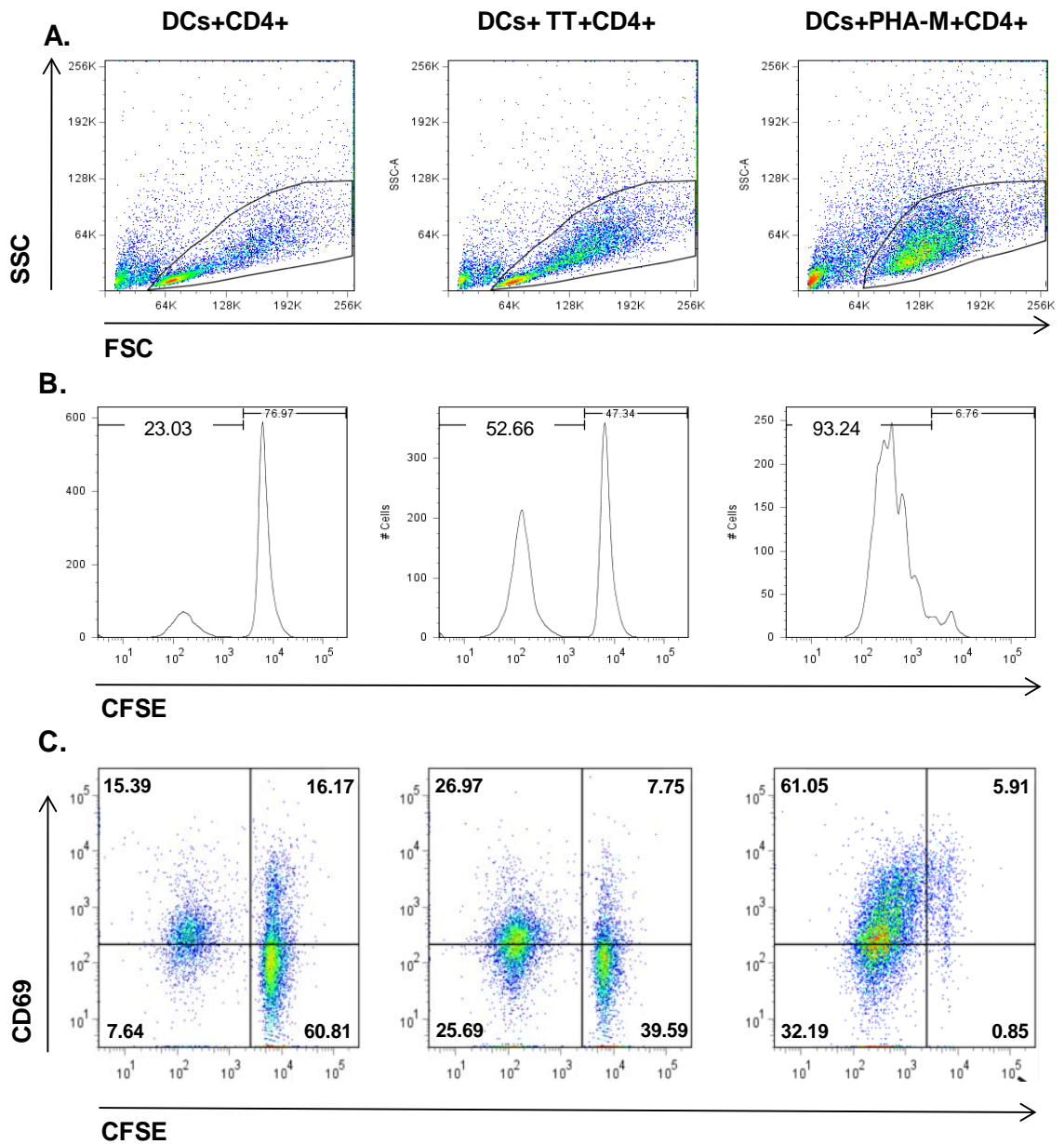
pg/ml, respectivamente) al cabo de 40 horas de co-cultivo; LT CD4+ activados por *Fast-DCs* estimuladas con PHA-M, mostraron una producción de IFN- $\gamma$  quinientas veces mayor que el control (5400 y 4800 pg/ml) (véase Figura 15).

**6.3.2 *Fast-DCs* en Reacción Mixta de Linfocitos (MLR).** La MLR es empleada como un modelo para estudiar la capacidad de DCs para iniciar respuestas inmunes primarias. *Fast-DCs* maduras fueron co-cultivadas con LT CD4+ autólogos (control) y con LT CD4+ de 3 diferentes individuos (heterólogos) marcados con CFSE, durante 5 días. Como pudo demostrarse por CF (véase Figura 16), LT CD4+ heterólogos proliferaron alrededor de un 34% en respuesta al estímulo alogénico, comparado con el control, donde se presentó sólo un 3% de proliferación. El porcentaje de células heterólogas CD69 positivas fue mayor (8-10%), comparado con un 4% en el cultivo control (*Fast-DCs* + LT CD4+ autólogos).

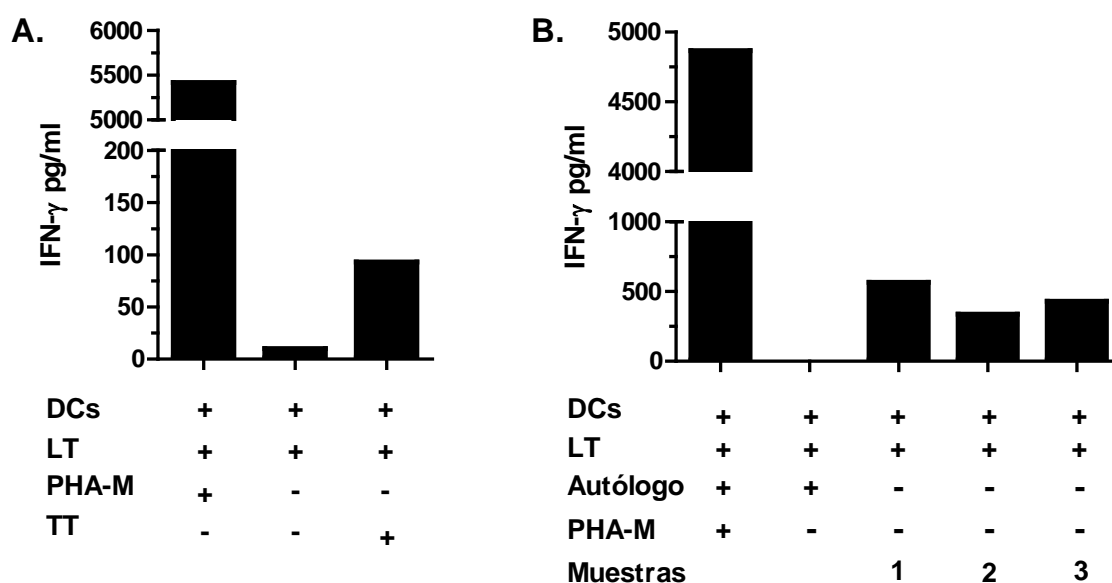
En cultivos de *Fast-DCs* con LT CD4+ autólogos no hubo producción de IFN- $\gamma$ , contrario a cultivos que contenían linfocitos heterólogos, con una producción de 566, 338 y 430 pg/ml de citoquina para cada uno de los individuos probados (véase Figura 15).

Nuevamente, y como se muestra en la Figura 15, *Fast-DCs* fueron eficientes en la presentación de un estímulo inespecífico como la PHA-M (4867 pg/ml de IFN- $\gamma$ ).

**6.3.3 *Fast-DCs* pulsadas con ESAT-6.** Entre los antígenos secretados por *M. tuberculosis* y que ha sido descrito como inductor de la secreción de mediadores asociados a protección contra la infección por el bacilo está la proteína de secreción temprana ESAT-6 [99]. Con el propósito de determinar la funcionalidad de *Fast-DCs* como APCs profesionales, PBMCs de un individuo sano PPD+ fueron cultivados durante 10 días en presencia de proteína recombinante ESAT-6 e IL-2. Al cabo de este tiempo, *Fast-DCs* pulsadas con ESAT-6 y maduras con el coctel de citoquinas pro-inflamatorias fueron co-



**Figura 14.** Actividad linfo-proliferativa de LT CD4+ en respuesta a *Fast-DCs* pulsadas con Toxide Tetánico (TT) y PHA-M. A. Dot plot SSC vs. FSC donde se evidencia la proliferación de LT CD4+, específica del estímulo. B. Histogramas correspondientes a la pérdida de la fluorescencia del CFSE de linfocitos T CD4+ debido a la proliferación celular en co-cultivos con *Fast-DCs* estimuladas. Los números de la región de la izquierda corresponden a los porcentajes de las células con uno o más ciclos de división. C. Diagramas de dot plot para poblaciones doble positivas para CFSE y CD69. Los números en cada cuadrante corresponden a los porcentajes de expresión de cada población.

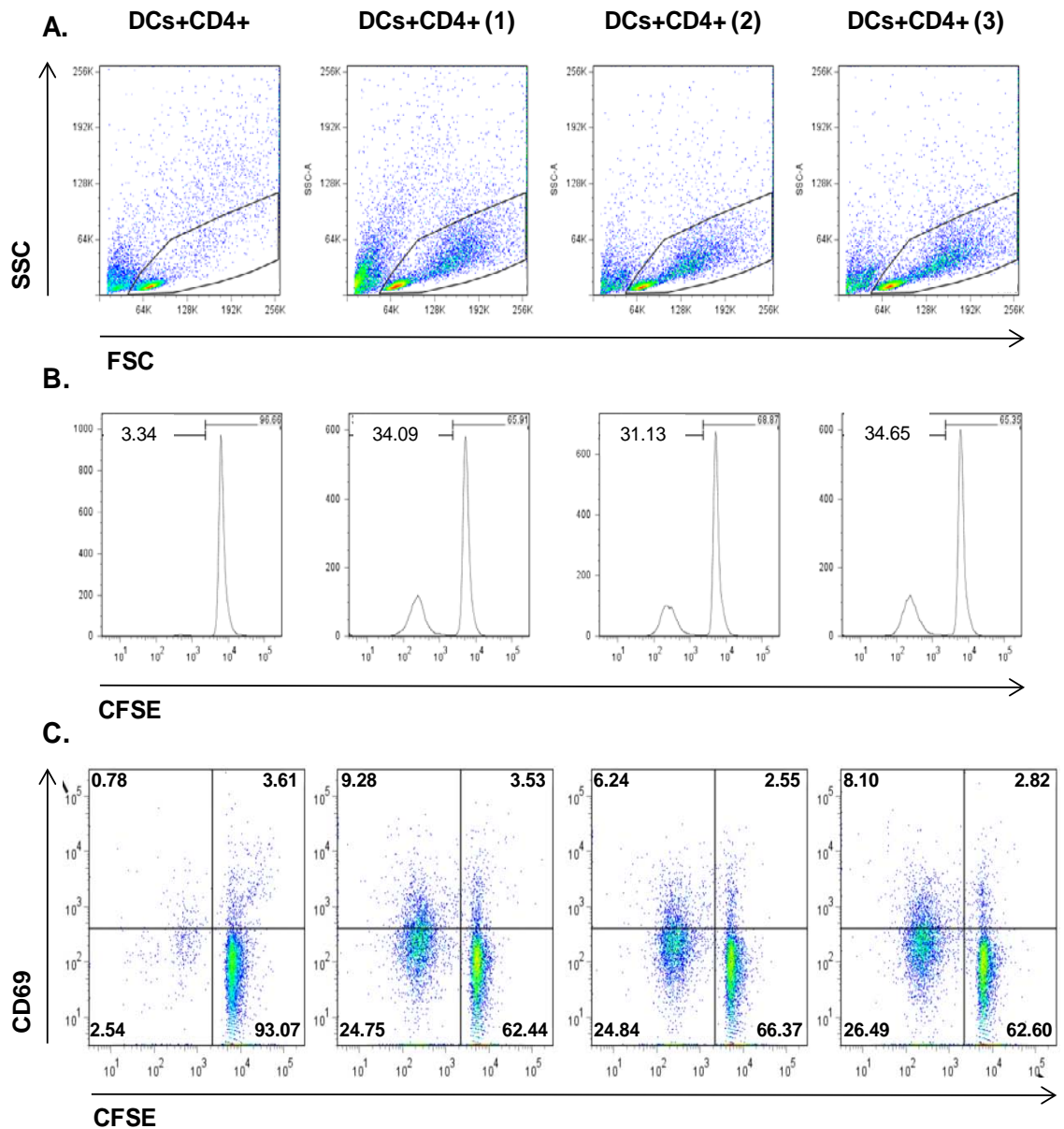


**Figura 15.** Generación de LT CD4+ productores de IFN- $\gamma$  luego de diferentes estímulos con *Fast-DCs* maduras. La producción de IFN- $\gamma$  fue determinada por ELISA en sobrenadantes de cultivo luego de 40 horas. A) Cultivo de LT CD4+ estimulados con *Fast-DCs* pulsadas con 10 $\mu$ g/ml de TT o con PHA-M 2% v/v. B) Reacción Mixta de Linfocitos (MLR) con *Fast-DCs* autólogas en co-cultivo con LT CD4+ de 3 individuos sanos diferentes.

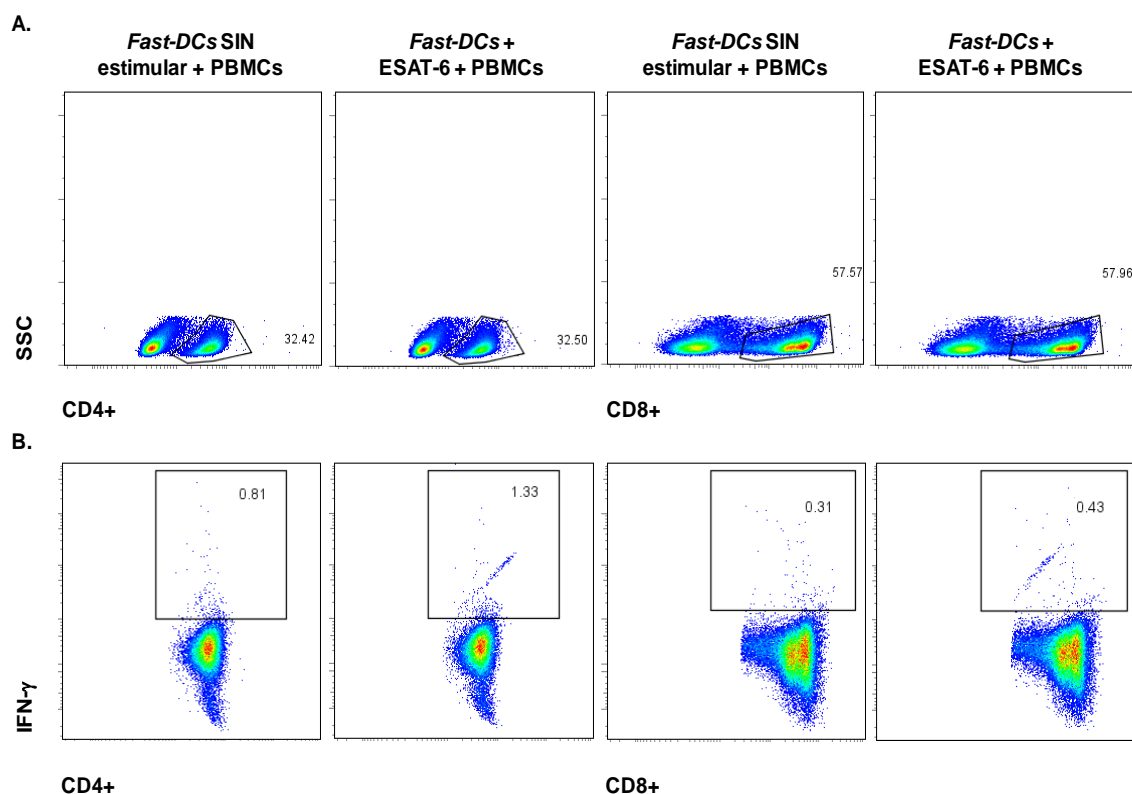
cultivadas con PBMCs específicos de ESAT-6. Cuarenta y ocho horas después, y en presencia de Brefeldina A por las últimas 6 horas, se realizó coloración con anticuerpos anti-CD4 y anti-CD8 y posterior tinción intracelular con anti-IFN- $\gamma$ . Comparado con el control de *Fast-DCs* maduras sin estimular, LT CD4+ re-estimulados con *Fast-DCs* pulsadas con ESAT-6 mostraron mayor producción de IFN- $\gamma$  intracelular, la cual fue a su vez mayor que la expresión de citoquina mostrada por LT CD8+, cuando se analizaron por CF (véase Figura 17).

#### 6.4 GENERACIÓN DE LT CD8+ ESPECÍFICOS DE PÉPTIDO POR *Fast-DCs* PULSADAS CON TAAs-A2

*Fast-DCs* de individuos sanos HLA-A\*0201 positivos pulsadas con TAAs-A2 (Melan-A y NY-ESO1 10 $\mu$ M), fueron co-cultivadas con LT CD8+ autólogos durante 10 días en presencia de IL-2 e IL-7. Al cabo de este tiempo, las células



**Figura 16.** Inducción de respuestas proliferativas de LT CD4+ en una MLR por *Fast-DCs*. A. Dot plot (SSC vs FSC) donde se evidencia la proliferación de LT CD4+ alogénicos (individuos 1, 2 y 3), comparado con el control (*Fast-DCs* + LT CD4+ autólogos). B. Histogramas correspondientes a la pérdida de la fluorescencia del CFSE de LT CD4+ debido a la proliferación celular en co-cultivos con *Fast-DCs* heterólogas. Los números de la región de la izquierda corresponden a los porcentajes de las células con uno o más ciclos de división. C. Dot plot de CFSE vs CD69. Los números representan los porcentajes de las células en el respectivo cuadrante.



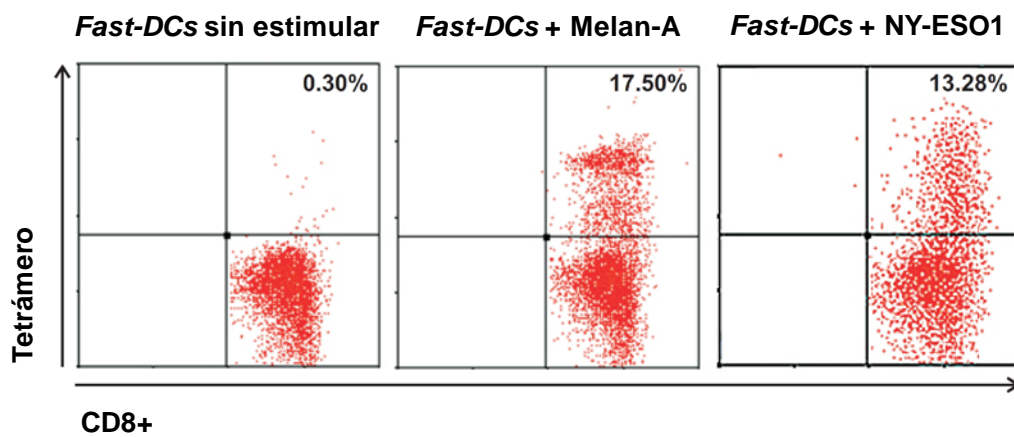
**Figura 17.** Producción de IFN- $\gamma$  intracelular en LT CD4+ y CD8+ en respuesta a estímulo de *Fast-DCs* pulsadas con péptido. Células CD4 y CD8 positivas (A) fueron seleccionadas con base en la población de linfocitos en dot plot de SSC vs. FSC. Los números en los cuadros (B) representan el porcentaje de células dobles positivas para CD4 y CD8 productoras de IFN- $\gamma$ .

T fueron re-estimuladas con *Fast-DCs* pulsadas con péptido durante 72 horas y teñidas con tetrámero para determinar poblaciones de LT CD8+ específicas de TAAs-A2 por CF. Como puede observarse en la Figura 18, *Fast-DCs* pulsadas con péptidos Melan-A y NY-ESO1 fueron eficientes en inducir proliferación de LT CD8+ específicos de péptido comparado con el control (*Fast-DCs* sin estimular).

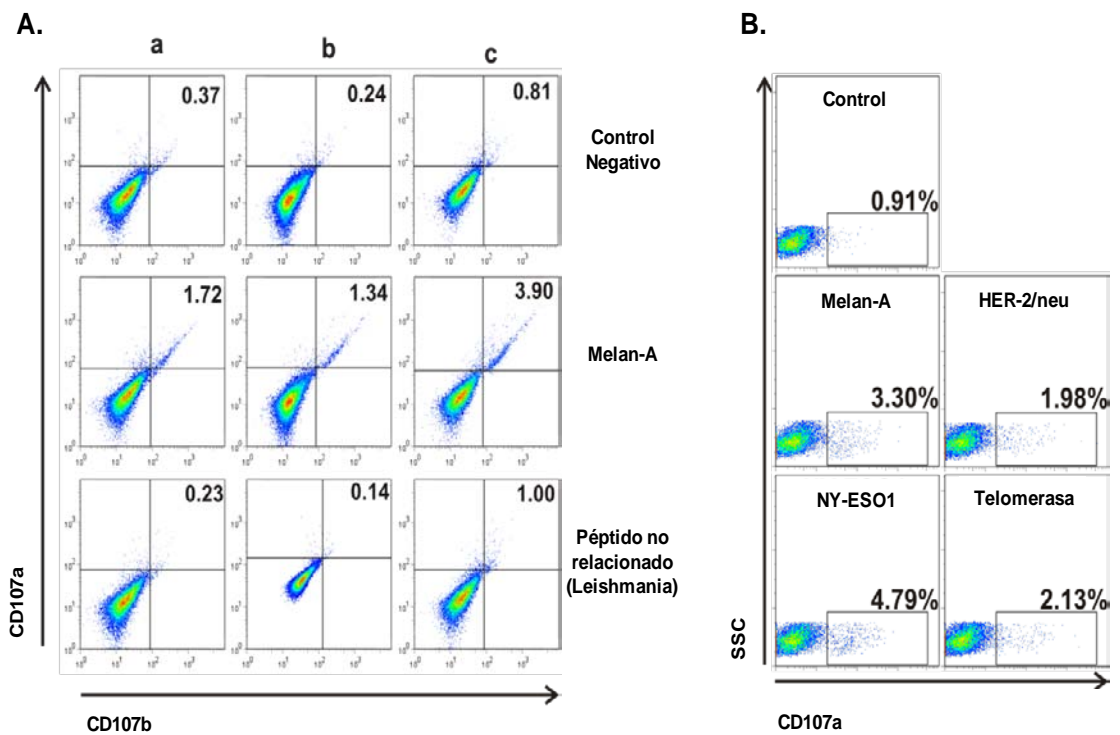
## 6.5 GENERACIÓN DE CTLs POR *Fast-DCs* PULSADAS CON TAAs-A2

LT CD8+ (células efectoras) provenientes de cultivo de 10 días con *Fast-DCs* pulsadas con TAAs-A2 fueron co-cultivados con las mismas APCs pulsadas con péptido (células blanco) e incubados durante 5 horas en presencia de anti-

CD107a, anti-CD107b y monensina y luego marcados con anti-CD8 y analizados por CF. Para LT CD8+ estimulados con *Fast-DCs* + Her-2/neu, NY-ESO1 y Telomerasa se realizó tinción únicamente con anti-CD107a y para LT CD8+ estimulados con *Fast-DCs* + Melan-A se realizó tinción con anti-CD107a y anti-CD107b. Como se muestra en la Figura 19, *Fast-DCs* pulsadas con TAAs-A2 estimularon eficientemente la producción de CTLs que expresan moléculas de citotoxicidad como CD107a y CD107b.



**Figura 18.** Frecuencia de LT CD8+ específicos de péptido analizados por coloración con tetrámero. LT CD8+ provenientes de co-cultivo con *Fast-DCs* maduras pulsadas con péptido por 10 días fueron re-estimulados con las mismas APCs por 72 horas y luego teñidos con el tetrámero correspondiente y anti-CD8 y analizados por CF. Los porcentajes de LT CD8+ tetrámero positivos son mostrados. Datos representativos de 3 y 2 individuos que mostraron células tetrámero positivas para los péptidos Melan-A y NY-ESO-1, respectivamente.



**Figura 19.** Determinación por CF de LT CD8+ citotóxicos (CD107a+ CD107b+) de individuos sanos HLA-A\*0201 positivos en respuesta a estimulación con péptido específico. A) Poblaciones de LT CD8+ de tres diferentes individuos (a, b y c) que expresan CD107a y CD107b en respuesta a estimulación con péptido Melan-A (controles: *Fast-DCs* sin péptido y péptido HLA-A\*0201 negativo - Leishmania). B) Poblaciones CD107a positivas para los TAA-A2 Melan-A, Her-2/neu, NY-ESO1 y Telomerasa de un individuo HLA-A\*0201 positivo. Los números corresponden a los porcentajes de células doble positivas para CD107a y CD107b en A y para células CD107a positivas en B.



## 7. DISCUSIÓN

Desde 1973 cuando Steinman y Cohn [25] dieron nombre a las células antes descritas por Paul Langerhans, las “células dendríticas” han venido siendo utilizadas en diferentes estudios clínicos como adyuvantes o inductoras de respuesta inmune específica frente a distintos antígenos tumorales. A partir del primer estudio publicado en 1996 [13], en donde pacientes con Linfoma de células B fueron vacunados con DCs autólogas, las DCs de 7 días (*Estándar-DCs*) han sido las células tradicionalmente empleadas como APCs en numerosos protocolos clínicos de vacunación [19, 21, 100-104].

En el 2003, Dauer y colaboradores obtuvieron en tan sólo 48 horas de cultivo *in vitro*, DCs maduras a partir de monocitos de sangre periférica de donantes sanos, a las cuales denominaron *Fast-DCs*. Tales células, bajo activación con mediadores pro-inflamatorios, expresaron marcadores de superficie de DCs maduras y secretaron IL-12p70 cuando fueron estimuladas con CD40L en presencia de IFN- $\gamma$ . Además, las *Fast-DCs*, cuando se compararon con las *Estándar-DCs*, fueron capaces de estimular respuestas inmunes primarias de tipo Th1, específicas de antígeno [22]. Desde entonces, el papel de DCs de 2 días como APCs se ha venido analizando en diversos ensayos *in vitro* [71, 105-108].

La eficiencia de *Fast-DCs* fue demostrada en una reciente prueba clínica, en donde pacientes con Carcinoma Ductal In Situ (DCIS), un cáncer pre-invasivo de la mama, recibieron 4 vacunaciones semanales de DCs de 2 días pulsadas con péptidos restringidos a HLA Clase I y Clase II, derivados de la proteína Her-2/neu [109]. Siete de once pacientes mostraron una marcada disminución de la expresión de Her-2/neu en especímenes quirúrgicos de tumor, con disminución medible en DCIS residual, lo que sugirió un proceso activo de “inmuno-edición” para células tumorales expresando la proteína, luego de la

vacunación. En este estudio se demostró el potencial de *Fast-DCs* en la prevención y tratamiento del cáncer temprano de mama.

El uso de DCs autólogas utilizadas como vehículo de antígenos peptídicos tumorales que hacen parte de un amplio número de tumores, es parte fundamental del proyecto TEBICA (Terapias Biológicas contra el Cáncer, ver Anexo 1), que tiene como objetivo principal el uso de vacunas terapéuticas individualizadas en la población colombiana para el manejo de determinados tipos de cáncer. Con el propósito de evaluar aspectos de costo-efectividad del proceso de generación de DCs para uso humano en TEBICA, en este trabajo se realizó la caracterización fenotípica y funcional de DCs obtenidas en 2 días (*Fast-DCs*).

Existen distintas formas de diferenciar monocitos a DCs *in vitro*, de las cuales la combinación más empleada es el GM-CSF y la IL-4 [46]. Las DCs inmaduras pueden ser diferenciadas a DCs maduras por la exposición a varios estímulos como ligandos de TLR (LPS, Poly I:C, los cuales hacen señalización a través de TLR-4 y TLR-3, respectivamente), Medio Condicionado de Monocitos (MCM) o coctel de citoquinas pro-inflamatorias (IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$  y PGE2) [17]. La maduración de DCs es importante para inducir de manera efectiva una inmunidad celular a través de la vacunación con estas células. Evidencias indican que debe evitarse el uso de DCs inmaduras en ensayos de vacunación, debido a que son pobres inmunógenos y pueden generar células T reguladoras [110]. En 1997, Jonuliet y colaboradores reportaron el uso del coctel de citoquinas pro-inflamatorias (IL-1 $\beta$ , IL-6, y TNF- $\alpha$ ) para la generación de DCs maduras. La adición de PGE2 al coctel aumentó la producción, maduración y capacidad inmuno-estimuladora y de migración de las DCs generadas, características importantes para la generación de LT CD4+ y CD8+ productores de IFN- $\gamma$  [65].

Con el objetivo de determinar posibles cambios en el fenotipo de las células, en este trabajo se obtuvieron DCs de 2 y 7 días inmaduras (GM-CSF + IL-4) y

maduradas con el coctel de citoquinas pro-inflamatorias, a partir de monocitos de sangre periférica frescos o congelados, purificados por adherencia al plástico o por selección negativa (formación de rosetas con glóbulos rojos y células CD14 negativas). En cualquiera de los métodos empleados para su diferenciación, las DCs (rápidas y estándar) estimuladas con el coctel de citoquinas pro-inflamatorias, mostraron de manera significativa mayor expresión de los marcadores de superficie CCR7, CD83, y CD80, moléculas importantes para el desempeño de DCs como APCs profesionales comparado con las células no estimuladas con el coctel.

La escogencia de la medición de la expresión de estos marcadores como indicadores de DCs inmuno-competentes se hizo con base en distintos tipos de evidencia que los sugiere como tales. LT y DCs (llevando el antígeno) entran a los órganos linfoides desde la periferia a través de los linfáticos aferentes; una vez allí, por la interacción del CCR7 con sus ligandos (CCL19 y CCL21 expresados por LT vírgenes y DCs), estas células se extravasan al intersticio de estos órganos en donde las DCs presentan los antígenos a los LT, lo que se considera un importante paso en la activación de la respuesta inmune celular por las DCs maduras [111]. CD83 es un miembro de la super familia de las inmunoglobulinas y es calificado como un marcador característico de DCs maduras ya que se ha observado que la expresión de CD83 en estas células se correlaciona con una óptima activación de LT mediada por DCs [112]. Además, estudios en ratones han demostrado que deficiencias en la expresión de CD83 reduce la expresión de MHC Clase II en superficie en un 25 a 50% de células B esplénicas, DCs, células epiteliales tímicas y macrófagos peritoneales [113].

La interacción de las moléculas co-estimuladoras CD80 y CD86 (B7.1 y B7.2) con su receptor en LT, CD28, provee una sustancial activación y supervivencia de células T, en conjunto con la unión MHC/péptido – TCR. Diferentes estudios han demostrado que CD80 es más eficiente que CD86 en la activación y proliferación de LT CD8+ y en la producción de IL-12 por DCs [66-68] aunque

las bases de esta asociación se desconocen. Basado en los resultados obtenidos en este trabajo es interesante resaltar que CD80 se comportó como un franco marcador de diferenciación de DCs maduras en comparación con CD86 el cual, al igual que HLA-DR, mostró un alto porcentaje de expresión tanto en *Fast-DCs* como en *Estándar-DCs* inmaduras y maduras.

La expresión de CD14 fue significativamente mayor en células inmaduras y maduras de 2 días comparada con células de 7 días, cuando se aislaron por el método de adherencia al plástico y a partir de monocitos crio-preservados purificados por rosetas. Este resultado contrasta con lo observado por Dauer y colaboradores [22] y podría ser explicado por una internalización del CD14 inducida por los anticuerpos de las perlas anti-CD14 utilizadas en ese estudio para el aislamiento de los monocitos (selección positiva). Respecto a la expresión de CD14 en *Fast-DCs* evidenciada en los resultados, es importante mencionar que más que una inadecuada diferenciación de monocitos a DCs, la expresión de este marcador en *Fast-DCs* bien podría estar señalando hacia un tipo de DC con cierta capacidad de estimulación que no es lograda por DCs que no expresan CD14, como lo sugieren los trabajos de Klechevsky y colaboradores, quienes han identificado propiedades especiales de DCs que expresan este marcador (DCs de la dermis – intersticiales), las cuales preferencialmente inician inmunidad humoral [114, 115].

Se observó una disminución significativa en el marcador CD209 (DC-SIGN) en *Fast-DCs* en respuesta al coctel de maduración, obtenidas a partir de monocitos frescos purificados por adherencia al plástico y en *Fast-DCs* obtenidas a partir de monocitos frescos y congelados, purificados por rosetas. DC-SIGN es una proteína trans-membranal de unión a carbohidratos, dependiente de calcio, clasificada como una lectina tipo-C del Grupo II. Esta molécula es con frecuencia descrita como un receptor fagocítico, con un importante papel en la toma y procesamiento del antígeno en DCs inmaduras, caracterizadas con una amplia capacidad de endo-fagocitosis [116, 117]. Desde lo descrito inicialmente con el Virus de la Inmuno-deficiencia Humana

(VIH), un importante papel inmuno-modulador de la respuesta de los LT por esta lectina ha sido evidenciado en múltiples modelos de interacción hospedero-patógeno [118, 119], lo que sugiere que algunos patógenos tienen propiedades inmuno-evasivas o inmunosupresoras a través de DC-SIGN. Por ello, la falta de la pérdida de DC-SIGN en *Fast-DCs* maduras podría ser más una preocupación que un efecto benéfico.

En general, no se observaron cambios importantes en la caracterización fenotípica de DCs cuando se comparó su obtención a partir de monocitos frescos o congelados. Estos resultados son de particular importancia si se considera que la posibilidad de congelación de las células es un aspecto importante a tener en cuenta para su aplicación en estudios clínicos, debido a que, en la mayoría de los casos, las células son obtenidas en gran cantidad por procesos de leucoféresis y necesitan ser crio-preservadas para su posterior generación a DCs.

No obstante la clara estimulación de linfocitos anti-tumorales lograda con vacunas terapéuticas contra el cáncer basadas en epítopes CD8 ha podido ser evidenciada en diferentes estudios clínicos [12, 19-21, 109], es claro que una repetida estimulación con el antígeno es necesaria para lograr la expansión de estos precursores. La necesidad de dosis repetidas del antígeno para lograr inmunidad anti-tumoral bien podría ser atribuida a la falta de inclusión en estas vacunas de epítopes que estimulen LT CD4+. La importancia de LT CD4+, en el desarrollo de vacunas terapéuticas contra el cáncer está en parte apoyada por el hecho de que estas células son fundamentales para la generación de LT CD8+ de memoria [120]. Con base en lo anterior, es importante resaltar que los resultados aquí presentados sugieren que *Fast-DCs* son un adecuado vehículo del antígeno para evocar una potente linfo-proliferación y producción de IFN- $\gamma$  por LT-CD4+ estimulados con *Fast-DCs* pulsadas con diferentes formas de antígeno: antígenos definidos (toxoides tetánico – ESAT-6), un mitógeno (PHA) y antígenos alogénicos en una Reacción Mixta de Linfocitos (MLR).

Previos estudios han evidenciado la participación de LT en inmunidad antitumoral, incluyendo el clonaje de genes que codifican antígenos tumorales y la posterior identificación de epítopes asociados a tumor. La caracterización de antígenos tumorales definidos por LT ha abierto nuevas posibilidades en el campo de la inmunología tumoral humana. Tetrámeros fluorescentes de complejos MHC-péptido que unen con suficiente avidéz células T con el TCR apropiado, han mejorado la habilidad de determinar LT específicos de antígeno [85]. En este trabajo se determinaron poblaciones de LT CD8+ específicas de TAAs-A2 en individuos sanos HLA-A\*0201 positivos. Los antígenos tumorales seleccionados han sido previamente reportados como buenos candidatos a vacuna y empleados en diferentes protocolos de vacunación [121-124]. *Fast-DCs* maduras con el coctel de citoquinas pro-inflamatorias, pulsadas con TAAs-A2 Melan-A y NY-ESO-1 generaron precursores de LT CD8+ específicos de péptido en tres diferentes individuos sanos, como se observó por medio de coloración con tetrámeros específicos.

Además de lograr precursores de LT CD8+ específicos de TAAs-A2, es importante establecer la funcionalidad de éstas células, para lo cual LT CD8+ generados en una línea específica de péptido fueron re-estimulados con *Fast-DCs* maduras, pulsadas con péptido (células blanco) y determinada la expresión de moléculas específicas de citotoxicidad por CF. Dentro de los métodos para determinar actividad citotóxica, uno de los más empleados es el ensayo de liberación de  $^{51}\text{Cr}$ , que no permite la identificación de células efectoras específicas responsables de la muerte celular, sino que determina la muerte de células blanco. Por lo tanto, no se puede atribuir la actividad citolítica directamente a LT CD8+ específicos de antígeno. Recientemente, Betts et al describió el ensayo de citotoxicidad CD107, que permite la caracterización fenotípica y funcional de LT CD8+ por medio de CF, con el empleo de un marcador que sólo se expresa durante la degranulación, el evento inicial que toma lugar durante la lisis de la célula blanco [125]. La fusión de los gránulos con la membrana plasmática de los LT CD8+ resulta en la liberación de perforina y granzima y en la expresión en superficie de las

glicoproteínas de membrana asociadas al lisosoma (LAMPs) CD107a (LAMP-1) y CD107b (LAMP-2). La expresión de CD107a y CD107b fue determinada por CF en LT CD8+ de cuatro y tres diferentes individuos sanos HLA-A\*0201 positivos, respectivamente, en respuesta al estímulo dado de *Fast-DCs* pulsadas con péptido Melan-A. Asimismo, LT CD8+ generados en líneas específicas de péptidos NY-ESO1, Her-2/neu y Telomerasa mostraron expresión en su superficie de CD107a por CF, lo que demuestra la capacidad funcional de *Fast-DCs* como células presentadoras de antígeno.

La producción de IL-12p70 en sobrenadantes de cultivo de *Fast-DCs* y *Estándar-DCs* maduras fue determinada por ELISA. Como era de esperarse, y de acuerdo a estudios anteriores en donde el empleo de la PGE2 en combinación con el coctel de citoquinas pro-inflamatorias inhibe la producción de IL-12 [22, 126], aún después de activación adicional con IFN- $\alpha$  [127], DCs de 2 y 7 días maduras con el coctel de citoquinas pro-inflamatorias no produjeron cantidades sustanciales de IL-12p70 (dato no mostrado). Sin embargo, *Fast-DCs* maduras pulsadas con péptido estimularon LT CD8+ específicos de péptido y CTLs. Además, la importante producción de IFN- $\gamma$  por parte de LT CD4+ específicos de TT y LT CD4+ heterólogos (MLR), sugiere que la presentación del antígeno por *Fast-DCs* a las células T induce la secreción de IL-12p70 por parte de las DCs necesaria para facilitar la estimulación de respuestas inmunes Th1. Teniendo en cuenta que la producción de IL-12p70 por DCs ha venido siendo considerada últimamente como un importante marcador de immuno-competencia de las DCs a utilizar con fines de inmunoterapia [128], una detección de esta citoquina por ELISPOT que permitiría estimar cualitativamente la cantidad de IL12p70 producida por cada DC, sería deseable y hace parte de las evaluaciones en curso actualmente en nuestro trabajo con *Fast-DCs*.

## 8. CONCLUSIONES

Se logró optimizar el cultivo *in vitro* para la generación de DCs y la reducción del tiempo de cultivo a 2 días, además de la disminución en costos, lo cual representa un aporte favorable en la generación de DCs a partir de monocitos de sangre periférica de individuos sanos de la población de Bogotá.

Como fue evidenciado por el análisis de CF, las *Fast-DCs* tienen un fenotipo similar a las *Estándar-DCs*, que no se ve afectado por el procedimiento de congelación de monocitos. La mayoría de marcadores muestran un comportamiento disperso entre las muestras a excepción de HLA-DR y CD86.

Se demostró una eficiente immuno-competencia de *Fast-DCs* cuando se utilizaron como APCs en los diferentes ensayos funcionales realizados.

*Fast-DCs* fueron capaces de inducir respuestas proliferativas y producción de IFN- $\gamma$  por LT CD4+, además de la generación de LT CD8+ citotóxicos y específicos de Antígenos Asociados a Tumor restringidos a HLA-A\*0201, utilizados en diferentes ensayos de inmunoterapia contra el cáncer.

La implementación de un sistema *in vitro* que permite evidenciar en sangre periférica de individuos sanos la presencia de precursores de LT CD8+ específicos para antígenos tumorales, es necesario en TEBICA para monitorizar la respuesta en pacientes que serán tratados con este tipo de vacuna.

Este trabajo permite explorar el impacto que pudiese tener en un momento dado el uso de DCs en inmunoterapia de pacientes con cáncer en Colombia.



## 9. CONSIDERACIONES ÉTICAS

De acuerdo a la resolución N° 8430 de 1993 que establece las normas científicas, técnicas y administrativas para la investigación en humanos [129], Artículo 11, este estudio se clasifica como “investigación sin riesgo”: *“Son estudios que emplean técnicas y métodos de investigación documental retrospectivos y aquellos en los que no se realiza ninguna intervención o modificación intencionada de las variables biológicas, fisiológicas, psicológicas o sociales de los individuos que participan en el estudio, entre los que se consideran: revisión de historias clínicas, entrevistas, cuestionarios y otros en los que no se le identifique ni se traten aspectos sensitivos de su conducta”*.

En este trabajo se utilizaron “buffy-coats”, preparación enriquecida de glóbulos blancos provenientes de unidades de sangre total las cuales son desechadas de bancos de sangre luego de haber utilizado diferentes componentes empleados habitualmente en medicina transfusional como glóbulos rojos, plaquetas, plasma, etc. La identidad del donador es desconocida.

El presente trabajo comprende la ejecución de ensayos *in vitro* (en el laboratorio) tales como aislamiento y cultivo *in vitro* de leucocitos humanos; los insumos utilizados para los experimentos propuestos no revisten ningún tipo de riesgo para la salud humana. Debido a que el trabajo experimental se desarrolló en un laboratorio en donde se adelantan usualmente otros proyectos de investigación del mismo tipo y en donde se observan las buenas prácticas de laboratorio, el manejo de los desechos se realizó atendiendo normas vigentes en la Institución y en el país en materia de bio-seguridad. En atención a lo anterior, el trabajo controló la exposición de los investigadores y demás personas del laboratorio a sustancias generadas en este estudio que requirieron especial cuidado (desecho de material corto-punzante, agujas, tubos con reductos de sangre humana, desechos químicos, etc.), con el fin de

prevenir daños a otras personas y al medio ambiente, como lo dicta la resolución 8430 de 1993, Art. 63.

## BIBLIOGRAFÍA

1. Gabrilovich, D., *Mechanisms and functional significance of tumour-induced dendritic-cell defects*. Nat Rev Immunol, 2004. **4**(12): p. 941-52.
2. Nagaraj, S. and D.I. Gabrilovich, *Tumor escape mechanism governed by myeloid-derived suppressor cells*. Cancer Res, 2008. **68**(8): p. 2561-3.
3. Gabrilovich, D.I. and S. Nagaraj, *Myeloid-derived suppressor cells as regulators of the immune system*. Nat Rev Immunol, 2009. **9**(3): p. 162-74.
4. Weiss, J.M., et al., *Immunotherapy of cancer by IL-12-based cytokine combinations*. Expert Opin Biol Ther, 2007. **7**(11): p. 1705-21.
5. Smith, I., et al., *2-year follow-up of trastuzumab after adjuvant chemotherapy in HER2-positive breast cancer: a randomised controlled trial*. Lancet, 2007. **369**(9555): p. 29-36.
6. Hunter, T., *Treatment for chronic myelogenous leukemia: the long road to imatinib*. J Clin Invest, 2007. **117**(8): p. 2036-43.
7. Mackensen, A., et al., *Phase I study of adoptive T-cell therapy using antigen-specific CD8+ T cells for the treatment of patients with metastatic melanoma*. J Clin Oncol, 2006. **24**(31): p. 5060-9.
8. Vignard, V., et al., *Adoptive transfer of tumor-reactive Melan-A-specific CTL clones in melanoma patients is followed by increased frequencies of additional Melan-A-specific T cells*. J Immunol, 2005. **175**(7): p. 4797-805.
9. Bernhard, H., et al., *Adoptive transfer of autologous, HER2-specific, cytotoxic T lymphocytes for the treatment of HER2-overexpressing breast cancer*. Cancer Immunol Immunother, 2008. **57**(2): p. 271-80.
10. Morgan, R.A., et al., *Cancer regression in patients after transfer of genetically engineered lymphocytes*. Science, 2006. **314**(5796): p. 126-9.
11. Avigan, D., *Dendritic cells: development, function and potential use for cancer immunotherapy*. Blood Rev, 1999. **13**(1): p. 51-64.
12. Banchereau, J., et al., *Immune and clinical responses in patients with metastatic melanoma to CD34(+) progenitor-derived dendritic cell vaccine*. Cancer Res, 2001. **61**(17): p. 6451-8.
13. Hsu, F.J., et al., *Vaccination of patients with B-cell lymphoma using autologous antigen-pulsed dendritic cells*. Nat Med, 1996. **2**(1): p. 52-8.
14. Melief, C.J., *Cancer immunotherapy by dendritic cells*. Immunity, 2008. **29**(3): p. 372-83.
15. Motta, M.R., et al., *Generation of dendritic cells from CD14+ monocytes positively selected by immunomagnetic adsorption for multiple myeloma patients enrolled in a clinical trial of anti-idiotype vaccination*. Br J Haematol, 2003. **121**(2): p. 240-50.
16. Osada, T., et al., *Dendritic cell-based immunotherapy*. Int Rev Immunol, 2006. **25**(5-6): p. 377-413.

17. Schuler, G., B. Schuler-Thurner, and R.M. Steinman, *The use of dendritic cells in cancer immunotherapy*. *Curr Opin Immunol*, 2003. **15**(2): p. 138-47.
18. Lenahan, C. and D. Avigan, *Dendritic cell defects in patients with cancer: mechanisms and significance*. *Breast Cancer Res*, 2006. **8**(1): p. 101.
19. Berntsen, A., et al., *Therapeutic dendritic cell vaccination of patients with metastatic renal cell carcinoma: a clinical phase 1/2 trial*. *J Immunother*, 2008. **31**(8): p. 771-80.
20. Kavanagh, B., et al., *Vaccination of metastatic colorectal cancer patients with matured dendritic cells loaded with multiple major histocompatibility complex class I peptides*. *J Immunother*, 2007. **30**(7): p. 762-72.
21. Wieriecky, J., et al., *Immunologic and clinical responses after vaccinations with peptide-pulsed dendritic cells in metastatic renal cancer patients*. *Cancer Res*, 2006. **66**(11): p. 5910-8.
22. Dauer, M., et al., *Mature dendritic cells derived from human monocytes within 48 hours: a novel strategy for dendritic cell differentiation from blood precursors*. *J Immunol*, 2003. **170**(8): p. 4069-76.
23. Dauer, M., et al., *FastDC derived from human monocytes within 48 h effectively prime tumor antigen-specific cytotoxic T cells*. *J Immunol Methods*, 2005. **302**(1-2): p. 145-55.
24. República de Colombia, Ministerio de la Protección Social, Instituto Nacional de Cancerología, E.S.E. *Anuario Estadístico 2007, "Por el control del cáncer"*. 2008. **5**: p. 100.
25. Steinman, R.M. and Z.A. Cohn, *Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. I. Morphology, quantitation, tissue distribution*. *J Exp Med*, 1973. **137**(5): p. 1142-62.
26. Liu, Y.J., *Dendritic cell subsets and lineages, and their functions in innate and adaptive immunity*. *Cell*, 2001. **106**(3): p. 259-62.
27. Banchereau, J., et al., *Immunobiology of dendritic cells*. *Annu Rev Immunol*, 2000. **18**: p. 767-811.
28. Steinman, R.M. and M.C. Nussenzweig, *Avoiding horror autotoxicus: the importance of dendritic cells in peripheral T cell tolerance*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2002. **99**(1): p. 351-8.
29. Roncarolo, M.G., M.K. Levings, and C. Traversari, *Differentiation of T regulatory cells by immature dendritic cells*. *J Exp Med*, 2001. **193**(2): p. F5-9.
30. Weaver, C.T., et al., *Th17: an effector CD4 T cell lineage with regulatory T cell ties*. *Immunity*, 2006. **24**(6): p. 677-88.
31. Kretschmer, K., et al., *Inducing and expanding regulatory T cell populations by foreign antigen*. *Nat Immunol*, 2005. **6**(12): p. 1219-27.
32. Geijtenbeek, T.B., et al., *Self- and nonself-recognition by C-type lectins on dendritic cells*. *Annu Rev Immunol*, 2004. **22**: p. 33-54.
33. Ardavin, C., et al., *Origin and differentiation of dendritic cells*. *Trends Immunol*, 2001. **22**(12): p. 691-700.
34. Rissoan, M.C., et al., *Reciprocal control of T helper cell and dendritic cell differentiation*. *Science*, 1999. **283**(5405): p. 1183-6.

35. Grouard, G., et al., *The enigmatic plasmacytoid T cells develop into dendritic cells with interleukin (IL)-3 and CD40-ligand*. J Exp Med, 1997. **185**(6): p. 1101-11.
36. Dzionek, A., et al., *BDCA-2, BDCA-3, and BDCA-4: three markers for distinct subsets of dendritic cells in human peripheral blood*. J Immunol, 2000. **165**(11): p. 6037-46.
37. Rossi, M. and J.W. Young, *Human dendritic cells: potent antigen-presenting cells at the crossroads of innate and adaptive immunity*. J Immunol, 2005. **175**(3): p. 1373-81.
38. Guermonprez, P., et al., *Antigen presentation and T cell stimulation by dendritic cells*. Annu Rev Immunol, 2002. **20**: p. 621-67.
39. Gilliet, M., W. Cao, and Y.J. Liu, *Plasmacytoid dendritic cells: sensing nucleic acids in viral infection and autoimmune diseases*. Nat Rev Immunol, 2008. **8**(8): p. 594-606.
40. Steinman, R.M., *The dendritic cell system and its role in immunogenicity*. Annu Rev Immunol, 1991. **9**: p. 271-96.
41. Pulendran, B., et al., *Flt3-ligand and granulocyte colony-stimulating factor mobilize distinct human dendritic cell subsets in vivo*. J Immunol, 2000. **165**(1): p. 566-72.
42. Thurner, B., et al., *Generation of large numbers of fully mature and stable dendritic cells from leukapheresis products for clinical application*. J Immunol Methods, 1999. **223**(1): p. 1-15.
43. Tuyraerts, S., et al., *Generation of large numbers of dendritic cells in a closed system using Cell Factories*. J Immunol Methods, 2002. **264**(1-2): p. 135-51.
44. Elias, M., et al., *Closed system generation of dendritic cells from a single blood volume for clinical application in immunotherapy*. J Clin Apher, 2005. **20**(4): p. 197-207.
45. Berger, T.G., et al., *Large-scale generation of mature monocyte-derived dendritic cells for clinical application in cell factories*. J Immunol Methods, 2002. **268**(2): p. 131-40.
46. Sallusto, F. and A. Lanzavecchia, *Efficient presentation of soluble antigen by cultured human dendritic cells is maintained by granulocyte/macrophage colony-stimulating factor plus interleukin 4 and downregulated by tumor necrosis factor alpha*. J Exp Med, 1994. **179**(4): p. 1109-18.
47. Romani, N., et al., *Proliferating dendritic cell progenitors in human blood*. J Exp Med, 1994. **180**(1): p. 83-93.
48. Conti, L. and S. Gessani, *GM-CSF in the generation of dendritic cells from human blood monocyte precursors: Recent advances*. Immunobiology, 2008. **213**(9-10): p. 859-70.
49. Piemonti, L., et al., *IL-13 supports differentiation of dendritic cells from circulating precursors in concert with GM-CSF*. Eur Cytokine Netw, 1995. **6**(4): p. 245-52.
50. Takahashi, K., M.C. Honeyman, and L.C. Harrison, *Dendritic cells generated from human blood in granulocyte macrophage-colony stimulating factor and interleukin-7*. Hum Immunol, 1997. **55**(2): p. 103-16.

51. Santini, S.M., et al., *Type I interferon as a powerful adjuvant for monocyte-derived dendritic cell development and activity in vitro and in Hu-PBL-SCID mice*. J Exp Med, 2000. **191**(10): p. 1777-88.
52. Mohty, M., et al., *IFN-alpha skews monocyte differentiation into Toll-like receptor 7-expressing dendritic cells with potent functional activities*. J Immunol, 2003. **171**(7): p. 3385-93.
53. Iwamoto, S., et al., *TNF-alpha drives human CD14+ monocytes to differentiate into CD70+ dendritic cells evoking Th1 and Th17 responses*. J Immunol, 2007. **179**(3): p. 1449-57.
54. Mohamadzadeh, M., et al., *Interleukin 15 skews monocyte differentiation into dendritic cells with features of Langerhans cells*. J Exp Med, 2001. **194**(7): p. 1013-20.
55. Geissmann, F., et al., *Transforming growth factor beta1, in the presence of granulocyte/macrophage colony-stimulating factor and interleukin 4, induces differentiation of human peripheral blood monocytes into dendritic Langerhans cells*. J Exp Med, 1998. **187**(6): p. 961-6.
56. Sanarico, N., et al., *Human monocyte-derived dendritic cells differentiated in the presence of IL-2 produce proinflammatory cytokines and prime Th1 immune response*. J Leukoc Biol, 2006. **80**(3): p. 555-62.
57. Ebner, S., et al., *A novel role for IL-3: human monocytes cultured in the presence of IL-3 and IL-4 differentiate into dendritic cells that produce less IL-12 and shift Th cell responses toward a Th2 cytokine pattern*. J Immunol, 2002. **168**(12): p. 6199-207.
58. Buelens, C., et al., *Interleukin-3 and interferon beta cooperate to induce differentiation of monocytes into dendritic cells with potent helper T-cell stimulatory properties*. Blood, 2002. **99**(3): p. 993-8.
59. Saikh, K.U., et al., *IL-15-induced conversion of monocytes to mature dendritic cells*. Clin Exp Immunol, 2001. **126**(3): p. 447-55.
60. Reddy, A., et al., *A monocyte conditioned medium is more effective than defined cytokines in mediating the terminal maturation of human dendritic cells*. Blood, 1997. **90**(9): p. 3640-6.
61. Sato, M., et al., *Generation of mature dendritic cells fully capable of T helper type 1 polarization using OK-432 combined with prostaglandin E(2)*. Cancer Sci, 2003. **94**(12): p. 1091-8.
62. Ridge, J.P., F. Di Rosa, and P. Matzinger, *A conditioned dendritic cell can be a temporal bridge between a CD4+ T-helper and a T-killer cell*. Nature, 1998. **393**(6684): p. 474-8.
63. Cella, M., et al., *Maturation, activation, and protection of dendritic cells induced by double-stranded RNA*. J Exp Med, 1999. **189**(5): p. 821-9.
64. Strayer, D.R., et al., *A controlled clinical trial with a specifically configured RNA drug, poly(I).poly(C12U), in chronic fatigue syndrome*. Clin Infect Dis, 1994. **18 Suppl 1**: p. S88-95.
65. Jonuleit, H., et al., *Pro-inflammatory cytokines and prostaglandins induce maturation of potent immunostimulatory dendritic cells under fetal calf serum-free conditions*. Eur J Immunol, 1997. **27**(12): p. 3135-42.
66. Fields, P.E., et al., *B7.1 is a quantitatively stronger costimulus than B7.2 in the activation of naive CD8+ TCR-transgenic T cells*. J Immunol, 1998. **161**(10): p. 5268-75.

67. Gajewski, T.F., *B7-1 but not B7-2 efficiently costimulates CD8+ T lymphocytes in the P815 tumor system in vitro*. J Immunol, 1996. **156**(2): p. 465-72.
68. Pejawar-Gaddy, S. and M.A. Alexander-Miller, *Ligation of CD80 is critical for high-level CD25 expression on CD8+ T lymphocytes*. J Immunol, 2006. **177**(7): p. 4495-502.
69. Jeannin, P., et al., *Soluble CD86 is a costimulatory molecule for human T lymphocytes*. Immunity, 2000. **13**(3): p. 303-12.
70. Prazma, C.M. and T.F. Tedder, *Dendritic cell CD83: a therapeutic target or innocent bystander?* Immunol Lett, 2008. **115**(1): p. 1-8.
71. Jarnjak-Jankovic, S., et al., *A full scale comparative study of methods for generation of functional Dendritic cells for use as cancer vaccines*. BMC Cancer, 2007. **7**: p. 119.
72. Marsland, B.J., et al., *CCL19 and CCL21 induce a potent proinflammatory differentiation program in licensed dendritic cells*. Immunity, 2005. **22**(4): p. 493-505.
73. Sallusto, F. and A. Lanzavecchia, *Understanding dendritic cell and T-lymphocyte traffic through the analysis of chemokine receptor expression*. Immunol Rev, 2000. **177**: p. 134-40.
74. Chauv, P., et al., *Inflammatory cells infiltrating human colorectal carcinomas express HLA class II but not B7-1 and B7-2 costimulatory molecules of the T-cell activation*. Lab Invest, 1996. **74**(5): p. 975-83.
75. Kortylewski, M. and H. Yu, *Role of Stat3 in suppressing anti-tumor immunity*. Curr Opin Immunol, 2008. **20**(2): p. 228-33.
76. Yang, L. and D.P. Carbone, *Tumor-host immune interactions and dendritic cell dysfunction*. Adv Cancer Res, 2004. **92**: p. 13-27.
77. Ribas, A., et al., *Current developments in cancer vaccines and cellular immunotherapy*. J Clin Oncol, 2003. **21**(12): p. 2415-32.
78. Villadangos, J.A. and P. Schnorrer, *Intrinsic and cooperative antigen-presenting functions of dendritic-cell subsets in vivo*. Nat Rev Immunol, 2007. **7**(7): p. 543-55.
79. Marsh SGE, P.P.a.B.L., *The HLA*. Facts Book Series. 2000, San Diego. 107.
80. Ellmeier, W., S. Sawada, and D.R. Littman, *The regulation of CD4 and CD8 coreceptor gene expression during T cell development*. Annu Rev Immunol, 1999. **17**: p. 523-54.
81. Heath, W.R. and F.R. Carbone, *Cross-presentation in viral immunity and self-tolerance*. Nat Rev Immunol, 2001. **1**(2): p. 126-34.
82. Mescher, M.F., *Molecular interactions in the activation of effector and precursor cytotoxic T lymphocytes*. Immunol Rev, 1995. **146**: p. 177-210.
83. Van den Eynde, B.J. and S. Morel, *Differential processing of class-I-restricted epitopes by the standard proteasome and the immunoproteasome*. Curr Opin Immunol, 2001. **13**(2): p. 147-53.
84. Breinig, T., et al., *Antigen-specific T cell responses: determination of their frequencies, homing properties, and effector functions in human whole blood*. Methods, 2006. **38**(2): p. 77-83.
85. Altman, J.D., et al., *Phenotypic analysis of antigen-specific T lymphocytes*. Science, 1996. **274**(5284): p. 94-6.

86. Batard, P., et al., *Dextramers: new generation of fluorescent MHC class I/peptide multimers for visualization of antigen-specific CD8+ T cells*. J Immunol Methods, 2006. **310**(1-2): p. 136-48.
87. Fleischhauer, K., et al., *Molecular characterization of HLA class I in Colombians carrying HLA-A2: high allelic diversity and frequency of heterozygotes at the HLA-B locus*. Tissue Antigens, 1999. **53**(6): p. 519-26.
88. Arevalo-Herrera, M., et al., *Identification of HLA-A2 restricted CD8(+) T-lymphocyte responses to Plasmodium vivax circumsporozoite protein in individuals naturally exposed to malaria*. Parasite Immunol, 2002. **24**(3): p. 161-9.
89. Gatz, S.A., H. Pohla, and D.J. Schendel, *A PCR-SSP method to specifically select HLA-A\*0201 individuals for immunotherapeutic studies*. Tissue Antigens, 2000. **55**(6): p. 532-47.
90. Pullarkat, V., et al., *Large-scale monocyte enrichment coupled with a closed culture system for the generation of human dendritic cells*. J Immunol Methods, 2002. **267**(2): p. 173-83.
91. Zehn, D., et al., *Efficiency of peptide presentation by dendritic cells compared with other cell types: implications for cross-priming*. Int Immunol, 2006. **18**(12): p. 1647-54.
92. Baxevanis, C.N., et al., *Tumor-specific CD4+ T lymphocytes from cancer patients are required for optimal induction of cytotoxic T cells against the autologous tumor*. J Immunol, 2000. **164**(7): p. 3902-12.
93. Partington, K.M., E.J. Jenkinson, and G. Anderson, *A novel method of cell separation based on dual parameter immunomagnetic cell selection*. J Immunol Methods, 1999. **223**(2): p. 195-205.
94. Rubio, V., et al., *Ex vivo identification, isolation and analysis of tumor-cytolytic T cells*. Nat Med, 2003. **9**(11): p. 1377-82.
95. Quah, B.J., H.S. Warren, and C.R. Parish, *Monitoring lymphocyte proliferation in vitro and in vivo with the intracellular fluorescent dye carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester*. Nat Protoc, 2007. **2**(9): p. 2049-56.
96. Nguyen, X.D., et al., *Flow cytometric analysis of T cell proliferation in a mixed lymphocyte reaction with dendritic cells*. J Immunol Methods, 2003. **275**(1-2): p. 57-68.
97. Bajana, S., et al., *Differential CD4(+) T-cell memory responses induced by two subsets of human monocyte-derived dendritic cells*. Immunology, 2007. **122**(3): p. 381-93.
98. Merrifield, R.B., *Solid-Phase Peptide Synthesis. 3. An Improved Synthesis of Bradykinin*. Biochemistry, 1964. **3**: p. 1385-90.
99. Sorensen, A.L., et al., *Purification and characterization of a low-molecular-mass T-cell antigen secreted by Mycobacterium tuberculosis*. Infect Immun, 1995. **63**(5): p. 1710-7.
100. Heiser, A., et al., *Autologous dendritic cells transfected with prostate-specific antigen RNA stimulate CTL responses against metastatic prostate tumors*. J Clin Invest, 2002. **109**(3): p. 409-17.



101. Salcedo, M., et al., *Vaccination of melanoma patients using dendritic cells loaded with an allogeneic tumor cell lysate*. *Cancer Immunol Immunother*, 2006. **55**(7): p. 819-29.
102. Palucka, A.K., et al., *Dendritic cells loaded with killed allogeneic melanoma cells can induce objective clinical responses and MART-1 specific CD8+ T-cell immunity*. *J Immunother*, 2006. **29**(5): p. 545-57.
103. Vonderheide, R.H., et al., *Vaccination of cancer patients against telomerase induces functional antitumor CD8+ T lymphocytes*. *Clin Cancer Res*, 2004. **10**(3): p. 828-39.
104. De Vleeschouwer, S., et al., *Postoperative adjuvant dendritic cell-based immunotherapy in patients with relapsed glioblastoma multiforme*. *Clin Cancer Res*, 2008. **14**(10): p. 3098-104.
105. Ramadan, G., et al., *Generation of cytotoxic T cell responses directed to human leucocyte antigen Class I restricted epitopes from the Aspergillus f16 allergen*. *Clin Exp Immunol*, 2005. **140**(1): p. 81-91.
106. Zhu, F., et al., *Stimulation by means of dendritic cells followed by Epstein-Barr virus-transformed B cells as antigen-presenting cells is more efficient than dendritic cells alone in inducing Aspergillus f16-specific cytotoxic T cell responses*. *Clin Exp Immunol*, 2008. **151**(2): p. 284-96.
107. Guan, X., et al., *A novel, rapid strategy to form dendritomas from human dendritic cells and hepatocellular carcinoma cell line HCCLM3 cells using mature dendritic cells derived from human peripheral blood CD14+ monocytes within 48 hours of in vitro culture*. *World J Gastroenterol*, 2004. **10**(24): p. 3564-8.
108. Dauer, M., et al., *Combined use of toll-like receptor agonists and prostaglandin E(2) in the FastDC model: rapid generation of human monocyte-derived dendritic cells capable of migration and IL-12p70 production*. *J Immunol Methods*, 2008. **337**(2): p. 97-105.
109. Czerniecki, B.J., et al., *Targeting HER-2/neu in early breast cancer development using dendritic cells with staged interleukin-12 burst secretion*. *Cancer Res*, 2007. **67**(4): p. 1842-52.
110. Dhodapkar, M.V. and R.M. Steinman, *Antigen-bearing immature dendritic cells induce peptide-specific CD8(+) regulatory T cells in vivo in humans*. *Blood*, 2002. **100**(1): p. 174-7.
111. Ohl, L., et al., *CCR7 governs skin dendritic cell migration under inflammatory and steady-state conditions*. *Immunity*, 2004. **21**(2): p. 279-88.
112. Kruse, M., et al., *Inhibition of CD83 cell surface expression during dendritic cell maturation by interference with nuclear export of CD83 mRNA*. *J Exp Med*, 2000. **191**(9): p. 1581-90.
113. Kuwano, Y., et al., *CD83 influences cell-surface MHC class II expression on B cells and other antigen-presenting cells*. *Int Immunol*, 2007. **19**(8): p. 977-92.
114. Klechevsky, E., et al., *Understanding human myeloid dendritic cell subsets for the rational design of novel vaccines*. *Hum Immunol*, 2009. **70**(5): p. 281-8.

115. Klechevsky, E., et al., *Functional specializations of human epidermal Langerhans cells and CD14+ dermal dendritic cells*. *Immunity*, 2008. **29**(3): p. 497-510.
116. Geijtenbeek, T.B., et al., *Identification of DC-SIGN, a novel dendritic cell-specific ICAM-3 receptor that supports primary immune responses*. *Cell*, 2000. **100**(5): p. 575-85.
117. Kerrigan, A.M. and G.D. Brown, *C-type lectins and phagocytosis*. *Immunobiology*, 2009.
118. den Dunnen, J., S.I. Gringhuis, and T.B. Geijtenbeek, *Innate signaling by the C-type lectin DC-SIGN dictates immune responses*. *Cancer Immunol Immunother*, 2009. **58**(7): p. 1149-57.
119. Wu, L. and V.N. KewalRamani, *Dendritic-cell interactions with HIV: infection and viral dissemination*. *Nat Rev Immunol*, 2006. **6**(11): p. 859-68.
120. Shedlock, D.J. and H. Shen, *Requirement for CD4 T cell help in generating functional CD8 T cell memory*. *Science*, 2003. **300**(5617): p. 337-9.
121. Di Pucchio, T., et al., *Immunization of stage IV melanoma patients with Melan-A/MART-1 and gp100 peptides plus IFN-alpha results in the activation of specific CD8(+) T cells and monocyte/dendritic cell precursors*. *Cancer Res*, 2006. **66**(9): p. 4943-51.
122. Diefenbach, C.S., et al., *Safety and immunogenicity study of NY-ESO-1b peptide and montanide ISA-51 vaccination of patients with epithelial ovarian cancer in high-risk first remission*. *Clin Cancer Res*, 2008. **14**(9): p. 2740-8.
123. Peoples, G.E., et al., *Combined clinical trial results of a HER2/neu (E75) vaccine for the prevention of recurrence in high-risk breast cancer patients: U.S. Military Cancer Institute Clinical Trials Group Study I-01 and I-02*. *Clin Cancer Res*, 2008. **14**(3): p. 797-803.
124. Wenandy, L., et al., *The immunogenicity of the hTERT540-548 peptide in cancer*. *Clin Cancer Res*, 2008. **14**(1): p. 4-7.
125. Betts, M.R., et al., *Sensitive and viable identification of antigen-specific CD8+ T cells by a flow cytometric assay for degranulation*. *J Immunol Methods*, 2003. **281**(1-2): p. 65-78.
126. van der Pouw Kraan, T.C., et al., *Prostaglandin-E2 is a potent inhibitor of human interleukin 12 production*. *J Exp Med*, 1995. **181**(2): p. 775-9.
127. Dauer, M., et al., *IFN-alpha promotes definitive maturation of dendritic cells generated by short-term culture of monocytes with GM-CSF and IL-4*. *J Leukoc Biol*, 2006. **80**(2): p. 278-86.
128. DeBenedette, M.A., et al., *Priming of a novel subset of CD28+ rapidly expanding high-avidity effector memory CTL by post maturation electroporation-CD40L dendritic cells is IL-12 dependent*. *J Immunol*, 2008. **181**(8): p. 5296-305.
129. MinSalud, *RESOLUCION NUMERO 8430 DE 1993. Por la cual se establecen las normas científicas, técnicas y administrativas para la investigación en salud.*, M. Salud, Editor. 1993: Colombia. p. p. 1-19.

## ANEXO 1. RESUMEN EJECUTIVO DEL PROYECTO TEBICA

“EVALUACIÓN DE LA INMUNOGENICIDAD Y SEGURIDAD DE LA VACUNACIÓN CON CÉLULAS DENDRÍTICAS PULSADAS EX VIVO CON ANTÍGENOS TUMORALES EN PACIENTES CON CÁNCER PROGRESIVO Y REFRACTARIO A OTROS TRATAMIENTOS”.

### TEBICA

TEBICA (TERapias BIológicas contra el CÁncer) es un macroproyecto que explora nuevas alternativas terapéuticas contra el cáncer. TEBICA está concebido a cinco años, es un proyecto modelo de MEDICINA TRASLACIONAL (\*), financiado por la empresa privada y se desarrollará en el marco de una alianza estratégica entre la Universidad Nacional de Colombia y la Empresa PREVIMEDIC S. A. (ahora Fundación Salud de los Andes, quien en la actualidad patrocina el proyecto TEBICA). El proyecto TEBICA fue presentado y aprobado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología COLCIENCIAS. Son objetivos generales del proyecto TEBICA: (i) Promover la realización de estudios clínicos en los que se evalúe la eficacia de nuevas alternativas terapéuticas y de diagnóstico del cáncer. (ii) Explorar la utilidad de algunos marcadores biológicos tumorales y de la respuesta inmune antitumoral en el diagnóstico, pronóstico y evolución de la enfermedad en pacientes con cáncer.

(\*) La investigación en **ciencias básicas**, la **investigación clínica** y la **investigación orientada a mejorar las expectativas de salud del paciente** son disciplinas hasta ahora con una pronunciada demarcación de sus límites. El papel protagónico de estas disciplinas en el manejo exitoso del paciente del siglo XXI hace prever su fusión definitiva en un futuro inmediato alrededor del concepto de **Medicina Traslacional** la cual buscará traducir en beneficio al paciente los logros de la medicina experimental (de los hallazgos en el laboratorio al paciente). Para lograrlo se deberán conformar equipos multidisciplinarios y la información deberá fluir bidireccionalmente entre todos sus miembros.

## TEBICA en perspectiva

- **Un proyecto Universidad Nacional-Empresa sin antecedentes.**
- Un proyecto en la **frontera del conocimiento** que implica abrir nuevos caminos.
- Los aspectos logísticos del programa van a estar en **permanente evolución**.
- Debe contar con la **voluntad política** de las instituciones participantes.
- Requiere atención y **participación permanente de clínicos e investigadores**.
- **Debe velar por atender con rigor la reglamentación ético-legal.**
- **Es importante su desarrollo en alianza con la academia.**

## **Objetivos de Investigación en Inmuno-Oncología Clínica**

- Generar infraestructuras que permitan desarrollar estudios clínicos en pacientes con cáncer.
- Adaptar un programa de investigación en Inmuno-Oncología Clínica que permita monitorizar y evaluar la eficacia de nuevos tipos de terapias biológicas en el manejo de la enfermedad.

**FUNDACIÓN SALUD DE LOS ANDES – UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA**

## RESUMEN EJECUTIVO DEL PROTOCOLO DE INVESTIGACION TEBICA

---

### Título

Evaluación de la inmunogenicidad y seguridad de la vacunación con células dendríticas pulsadas *ex vivo* con antígenos tumorales en pacientes con cáncer progresivo y refractario a otros tratamientos.

---

### Tipo de Estudio

Estudio Clínico Fase I

---

### Objetivos Generales

Explorar la capacidad de células dendríticas pulsadas con antígenos tumorales para generar respuestas anti-tumorales de los linfocitos T en individuos con cáncer progresivo refractario a otros tipos de tratamiento (inmunogenicidad).

Explorar la seguridad del uso de DCs pulsadas con fragmentos de proteínas tumorales (péptidos sintéticos) utilizados como vacuna en individuos con cáncer (seguridad).

Evaluar la capacidad de la inmunización con la epítotope T-CD4<sup>+</sup> PADRE en la estimulación de una respuesta anti-tumoral mediada por linfocitos T- CD8<sup>+</sup> citotóxicos.

Establecer la prevalencia de alelos HLA-A\*02 en la población.

### Objetivos Específicos:

Determinar la respuesta de linfocitos T CD8<sup>+</sup> (producción de citoquinas, expansión clonal y citotoxicidad) inducidos en pacientes con cáncer luego de la vacunación con células dendríticas pulsadas *in vitro* con péptidos sintéticos derivados de antígenos tumorales.

Determinar la respuesta de linfocitos T CD4<sup>+</sup> (producción de citoquinas y proliferación) inducidos en pacientes con cáncer luego de la vacunación con células dendríticas pulsadas *in vitro* con el péptido PADRE.

Caracterizar por medio de inmunohistoquímica y biología molecular la expresión en tumores de antígenos seleccionados como inmunógenos.

Cuantificar y caracterizar el nivel de expresión y fenotipo de subpoblaciones de células dendríticas en sangre periférica de los voluntarios del estudio.

Cuantificar la población de células T reguladoras (Linfocitos T CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> FoxP3<sup>+</sup>) en sangre periférica de los voluntarios que participan en el estudio.

Registrar la clase y frecuencia de efectos adversos que se generan como consecuencia de la inoculación de células dendríticas pulsadas con péptidos en los pacientes vacunados.

Determinar la prevalencia de alelos HLA-A\*02011 y HLA-A\*02013 en la individuos sanos residentes en la ciudad de Bogotá.

---

#### Diseño del Estudio

El esquema de inmunización comprenderá un primer ciclo de 6 vacunaciones bi-semanales con DCs pulsadas con los péptidos seleccionados, seguido por un segundo ciclo de 6 vacunaciones mensuales sólo con la mezcla de péptidos en IFA. Previo a la vacunación se establecerá una línea base para medir diferentes parámetros del tumor y de la respuesta inmune. Se realizará la monitorización de estos parámetros inmunológicos 2 semanas luego del final de cada esquema de vacunación, (un primer ciclo de DCs + péptido y un segundo ciclo de péptido solo en IFA). Asimismo, se realizarán mediciones de química sanguínea y laboratorios antes y luego de comenzar el esquema de vacunación, con una periodicidad mensual. Al comienzo y al final del ciclo, los pacientes serán probados para determinar si la administración intradérmica de los péptidos seleccionados para pulsar las DCs induce reacciones de hipersensibilidad tipo tardía (DTH) en piel.

---

#### Pacientes

2 grupos de pacientes:

Pacientes HLA-A\*0201 positivos con cáncer de mama y próstata en progresión vacunados con DCs pulsadas con péptidos seleccionados.

Pacientes HLA-A\*0201 positivos con cáncer de mama y próstata en progresión vacunados con DCs pulsadas péptidos seleccionados + epítotope T-helper PADRE.

Carcinoma de mama en progresión cuyos esquemas de tratamiento se han agotado (pacientes en cuidado paliativo).

Adenocarcinoma de próstata, hormono- y/o quimio-refractarios (pacientes en cuidado paliativo).

Expresión en el tumor por inmunohistoquímica o RT-PCR de antígenos como NY-ESO-1, Telomerasa, HER-2/neu, Survivina, CEA, MUCINA, p53, PSA-1 y PSCA.

Que cumplan criterios de inclusión y exclusión dados en el protocolo.

---

## Agentes Investigacionales

### Péptido NY-ESO-1

Péptido restringido a HLA-A\*0201, codificado por el gen NY-ESO-1, secuencia SLLMWITQV, posición 157-165

### Péptido Telomerasa

Péptido restringido a HLA-A\*0201, codificado por el gen Telomerasa (hTERT), secuencia ILAKFLHWL, posición 540-548

### Péptido HER-2/neu

Péptido restringido a HLA-A\*0201, codificado por el oncogen HER-2/neu, secuencia KIFGSLAFL (E75), posición 348-356

### Péptido HER-2/neu

Péptido restringido a HLA-A\*0201, codificado por el oncogen HER-2/neu, secuencia RLLQETELV, posición 689-697

### Péptido HER-2/neu

Péptido restringido a HLA-A\*0201, codificado por el oncogen HER-2/neu, secuencia ILHNGAYSL, posición 435-443

### Péptido Survivina

Péptido restringido a HLA-A\*0201, codificado por el gen Survivin, secuencia LMLGEFLKL, posición 96-104

### Péptido MUCINA-1

Péptido restringido a HLA-A\*0201, codificado por el gen MUC-1, secuencia LLLLTVLTV (M1.2), posición 12-20

### Péptido MUCINA-1

Péptido restringido a HLA-A\*0201, codificado por el gen MUC-1, secuencia STAPPVHNV, posición 950-958

### Péptido p53

Péptido restringido a HLA-A\*0201, codificado por el gen p53, secuencia LLGRNSFEV, posición 261-269

### Péptido de Antígeno Carcinoembrionario (CEA)

Péptido restringido a HLA-A\*0201, codificado por el gen CEA, secuencia GVLVGVALI, posición 694-702

### Péptido de Antígeno Carcinoembrionario (CEA)

Péptido restringido a HLA-A\*0201, codificado por el gen CEA, secuencia YLSGANLNL, posición 571-579

Péptido Antígeno Específico Prostático-1 (PSA-1)  
Péptido restringido a HLA-A\*0201, codificado por el gen PSA-1, secuencia VISNDVCAQV, posición 154-163

Péptido Antígeno Específico Prostático-1 (PSA-1)  
Péptido restringido a HLA-A\*0201, codificado por el gen PSA-1, secuencia FLTPKKLQCV, posición 141-150

Péptido "Prostate Stem Cell Antigen" (PSCA)  
Péptido restringido a HLA-A\*0201, codificado por el gen PSCA, secuencia ALQPGTALL, posición 14-22

Péptido PADRE  
Epítotope T-helper pan-DR (PADRE) de unión a HLA-DR. Secuencia: aKXVAAWTLKAAa (a es D-alanina y X es ciclohexilalanina).

Los péptidos serán formulados en 30% de DMSO y 70% de PBS.

Adyuvante Incompleto de Freund (Montanide® ISA-51)  
Composición: Octadecionato manitol anhidro (Montanide 80) en aceite mineral (Drakeol 6 VR).

Dosis: 300µl

Tamaño del vial: 3 ml

Ruta de administración: Subcutánea

Fuente: Seppic, Francia

Células Dendríticas autólogas pulsadas con péptidos seleccionados

Formulación: En solución salina estéril

Dosis: Entre 1 a  $10 \times 10^6$  DCs autólogas maduras

Tamaño del Vial: 500 µl

Ruta de administración: Intradérmica

Fuente: Monocitos de sangre periférica

---

### Procedimientos de Laboratorio

Tipificación HLA de pacientes seleccionados.

Estudio del tumor por inmunohistoquímica y/o RT-PCR; actividad telomerasa; B7-H1.

Ensayos de respuesta inmune:

Inducción de linfocitos T citotóxicos (CTLs) y ensayos de citotoxicidad.

Detección en sangre periférica de células CD8<sup>+</sup> específicas para los péptidos, por medio de coloración con tetrámeros y análisis por citometría de flujo.

ELISPOT para determinación de células CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> específicas de antígeno, productoras de IFN-γ y medición de citoquinas específicas (IL-6, TNF-α, IL-4, IL-10).

Determinación de población CD4<sup>+</sup> y ensayos de linfoproliferación por marcación con timidina tritiada o métodos colorimétricos.



Determinación de células T reguladoras en sangre periférica por citometría de flujo.

Estudio de las poblaciones de células dendríticas en sangre periférica por medio de citometría de flujo.

Expresión de PD-L1

Pruebas de laboratorio clínico: hematológicas, química sanguínea y orina.

Índice de respuesta objetiva al tumor sólido, medido por criterios RECIST.

Realización de reacción DTH a péptidos utilizados para pulsar células dendríticas.

---

### Consideraciones Estadísticas

Este es un Ensayo Clínico Fase I que se realiza con el único propósito de evaluar la inmunogenicidad y seguridad de células dendríticas autólogas pulsadas *ex vivo* con una mezcla de péptidos y que serán inyectadas en pacientes con cáncer de mama y próstata en progresión, con el fin de promover respuestas inmunes antitumorales en los pacientes vacunados. El tamaño de muestra (cinco pacientes por grupo) se calculó de tal manera que de no observarse respuesta antitumoral evidenciable en ninguno de los 5 pacientes relacionados en cada grupo al final de los 9 meses del esquema de inoculaciones, se estima en aproximadamente el 90% el grado de confianza de que la probabilidad de obtener una respuesta inmune antitumoral en respuesta a la vacunación en la población general sería menor de 0.25, lo cual es impedimento para que se continúe el estudio. Si por el contrario, uno o más pacientes evidencian una respuesta inmune, sugiere la necesidad de un estudio con un mayor número de participantes con el fin de determinar la tasa de respuesta.

En cada paciente, las mediciones del ELISPOT, tinción con tetrámeros, medición de la actividad de Linfocitos T CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup>, etc., serán registradas usando células mononucleares de sangre periférica (PBMCs). Los valores basales serán definidos incluyendo variaciones normales entre resultados usando los mismos PBMCs en pruebas repetidas. Los resultados antes de la vacunación serán comparados con aquellos después de la misma, por lo tanto cada resultado es evaluado para medir si este difiere estadística y significativamente del valor basal. Esto excluye la posibilidad de falsos positivos debido a la variabilidad inherente en la realización de los ensayos.


---

### Patrocinador

FUNDACIÓN SALUD DE LOS ANDES



# ANEXO 3. Poster: Universidad Nacional de Colombia



**UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA**  
FACULTAD DE MEDICINA

## PRIMERAS JORNADAS DE INVESTIGACION FACULTAD DE MEDICINA

La investigación en la formación profesional y posgraduada

---

### Introducción

The allele HLA-A\*02:01 is one of the most frequent in individuals of Caucasian and Hispanic origin, having an extensive diversity of peptide sequences in its binding groove. The presence of CD8+ T lymphocytes is more restricted to specific antigens and peptides. The aim of this study was to evaluate the immunogenicity of DCs pulsed with HLA-A\*02:01 restricted peptides. The population of HLA-A\*02:01 carriers in Bogotá, Colombia, was determined by PCR-RFLP analysis. The results show that the frequency of HLA-A\*02:01 carriers is 31% in Bogotá, Colombia, which is similar to the frequency reported in other populations. The results also show that the frequency of HLA-A\*02:01 carriers is higher in Bogotá, Colombia, compared to other populations. The results also show that the frequency of HLA-A\*02:01 carriers is higher in Bogotá, Colombia, compared to other populations.

## EXPLORING THE IMMUNOGENICITY OF DCs PULSED WITH HLA-A\*02 RESTRICTED TUMOR ANTIGENS IN COLOMBIAN INDIVIDUALS

Tojar Muñoz, Diana R. <sup>1,2</sup>, Alfaro, Rosalva <sup>1</sup>, Parra-López, Carlos A. <sup>1</sup>

<sup>1</sup> Oncology, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, Colombia. <sup>2</sup> Group of research on Cancer Immunology, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, Colombia.

---

### Objetivos

To evaluate the immunogenicity of DCs pulsed with HLA-A\*02:01 restricted peptides in Bogotá, Colombia. To evaluate the immunogenicity of DCs pulsed with HLA-A\*02:01 restricted peptides in Bogotá, Colombia. To evaluate the immunogenicity of DCs pulsed with HLA-A\*02:01 restricted peptides in Bogotá, Colombia.

### Metodología

The presence of HLA-A\*02:01 carriers in Bogotá, Colombia, was determined by PCR-RFLP analysis. The results show that the frequency of HLA-A\*02:01 carriers is 31% in Bogotá, Colombia, which is similar to the frequency reported in other populations. The results also show that the frequency of HLA-A\*02:01 carriers is higher in Bogotá, Colombia, compared to other populations. The results also show that the frequency of HLA-A\*02:01 carriers is higher in Bogotá, Colombia, compared to other populations.

---

### Resultados

The results show that the frequency of HLA-A\*02:01 carriers is 31% in Bogotá, Colombia, which is similar to the frequency reported in other populations. The results also show that the frequency of HLA-A\*02:01 carriers is higher in Bogotá, Colombia, compared to other populations. The results also show that the frequency of HLA-A\*02:01 carriers is higher in Bogotá, Colombia, compared to other populations.

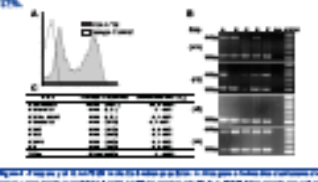


Figure 1. Flow cytometry analysis of DCs pulsed with HLA-A\*02:01 restricted peptides. The figure shows histograms and bar graphs of DCs expression of HLA-A\*02:01, CD80, CD86, and CD83. The bar graphs show the percentage of DCs expressing each marker, with HLA-A\*02:01 showing the highest expression.

---

### Conclusiones

The results show that the frequency of HLA-A\*02:01 carriers is 31% in Bogotá, Colombia, which is similar to the frequency reported in other populations. The results also show that the frequency of HLA-A\*02:01 carriers is higher in Bogotá, Colombia, compared to other populations. The results also show that the frequency of HLA-A\*02:01 carriers is higher in Bogotá, Colombia, compared to other populations.

### Referencias Bibliográficas

1. Muñoz T, Alfaro R, Parra-López CA. (2018) Exploring the immunogenicity of DCs pulsed with HLA-A\*02:01 restricted tumor antigens in Colombian individuals. *Journal of Immunology*, 181(12), 7450-7458.

2. Parra-López CA, Alfaro R, Muñoz T. (2019) Immunogenicity of DCs pulsed with HLA-A\*02:01 restricted tumor antigens in Colombian individuals. *Journal of Immunology*, 182(1), 100-108.