

PEDECIBA BIOLOGÍA

TESIS DE DOCTORADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

**Desarrollo y caracterización
de un modelo de
enfermedad mínima
residual de Linfoma no
Hodgkin para evaluar
nuevas inmunoterapias**

M.Sc. Thais Bascuas Castillo

Director

Dr. José A. Chabalgoity

Co-directoras

Dra. Sofía Grille Dra. María Moreno

Montevideo-Uruguay

Marzo 2017

AGRADECIMIENTOS

A mis orientadores de tesis José, Sofía y María por su apoyo incondicional. Por la paciencia y dedicación brindada a lo largo del camino transitado, siendo pilares fundamentales para el desarrollo de mi trabajo de tesis.

A la Agencia Nacional de Investigación e Innovación (ANII) por financiar mi trabajo de Doctorado, otorgándome una beca de posgrado, y el proyecto en el cual estuvo enmarcado dicho estudio.

A los Dres. Eduardo Osinaga, Gualberto González y Pablo Oppezzo por aceptar integrar el tribunal evaluador.

Al grupo del Área de Investigación y Desarrollo del Dpto. Biomédico del CUDIM, por su colaboración en la implementación de la técnica PET en los animales.

A la Dra. Gabriela Kramer por su colaboración en el clonado de la citoquina IL-15.

A los Lic. Carlos Chávez y Nancy Seiler por su colaboración en la preparación de la quimioterapia.

Al Dr. José Pedro Pacheco del Área de Patología Funcional y Morfológica del Dpto. de Patología de la Facultad de Veterinaria, por su aporte en los estudios relacionados con histología.

A los Dres. Pablo Cabral y Marcos Tassano por permitirme realizar la radiación de las células con la bomba de ⁶⁰Co disponible en el CIN.

A la Dra. Patricia Berasain, integrante de la UPB del Instituto de Higiene, por permitirme utilizar las instalaciones para preparar las muestras para el estudio histológico; y a la Lic. Natalia Mazza por facilitarme el protocolo para dicha preparación.

A Marcelo Fernández por ayudarme a utilizar la cámara In-Vivo MS FX PRO disponible en el CIN, con la que se tomaron las imágenes de RX.

A Amy, amiga y compañera de mesada, por su ayuda a nivel experimental siempre que lo necesité.

A la Dra. Daniela Lens por permitirme utilizar los equipos de citometría de flujo, disponible en el Dpto. Básico de Medicina del Hospital de Clínicas, en momentos donde el citómetro de flujo del Instituto de Higiene estuvo averiado.

A Guy Tejedor, técnico del bioterio de nuestro departamento, por el cuidado de los animales de experimentación.

A Martín Rossotti, por su ayuda con el equipo AKTA, utilizado para la purificación de los anticuerpos depletantes.

A Lucía Blixen por su participación en la edición de las imágenes.

A Geraldine Rimsky por su ayuda en la edición del manuscrito.

A mis compañeros del LVR, por su amistad a lo largo de todos estos años, generando un ambiente cálido de trabajo.

A mi gran amor Miguel, por apoyarme sin condiciones, a pesar de estar a la distancia.

A mi familia por estar siempre, en particular a mi abuela Violeta por cuidar de mí todos estos años y ser una gran compañera.

FINANCIACIÓN

El presente estudio estuvo enmarcado en un proyecto financiado por la Agencia Nacional de Investigación e Innovación (ANII), y además esta misma institución me otorgó una Beca de posgrado Nacional.

Como estudiante de Doctorado de PEDECIBA conté con apoyo económico por parte de dicho programa de posgrado.

PUBLICACIONES Y COMUNICACIONES DERIVADAS DE ESTA TESIS

Bascuas T, Moreno M, Mónaco A, Reyes L, Paolino A, Oliver P, Kramer MG, Engler H, Pacheco JP, Grille S, Chabalgoity JA. A novel non-Hodgkin lymphoma murine model closer to the standard clinical scenario. *J Transl Med.* 2016; 14(1):323.

Bascuas, T, Grille, S, Moreno, M, Reyes, L, Paolino A, and Chabalgoity, J.A. “*Salmonella enterica* serovar Typhimurium combined with CHOP chemotherapy for non-Hodgkin Lymphoma”. IMMUNOCOLOMBIA 2015 - 11th Congress of the Latin American Association of Immunology. Medellín, Colombia. 10/2015. Poster PO-085. Resumen publicado en *Front. Immunol.*

Bascuas, T, Grille, S, Moreno, M, Chávez, C, Seiler, N y Chabalgoity, J.A. “Desarrollo de un modelo murino de Enfermedad Mínima Residual de Linfoma no-Hodgkin B”. XIII Congreso Uruguayo de Hematología. Punta del Este, Uruguay. 11/2014. Book abstracts pag. 43, Poster N°18.

Bascuas, T, Grille S, Moreno M y Chabalgoity J.A. “Modelo murino de baja carga tumoral de Linfoma no-Hodgkin a células B”. XV Jornadas de la Sociedad Uruguaya de Biociencias (SUB). Piriápolis, Uruguay. 09/2014. Book abstracts pag. 108, Poster S2_046.

RESUMEN

Los linfomas no Hodgkin (LNH) constituyen un grupo heterogéneo de neoplasias linfoides, en los cuales a pesar de los recientes avances para su tratamiento, los resultados clínicos y las tasas de curación obtenidas continúan siendo insatisfactorias. La búsqueda de mejores abordajes terapéuticos en las enfermedades onco-hematológicas junto al mejor conocimiento del sistema inmunitario, hace que se considere a la inmunoterapia como una modalidad terapéutica complementaria a los tratamientos habitualmente utilizados. En este sentido, nuestro trabajo apuntó al desarrollo de inmunoterapias para LNH que fueron estudiadas a nivel pre-clínico en un modelo de EMR.

El éxito obtenido con terapias en estudios pre-clínicos pocas veces se traduce a ensayos clínicos, ya que los animales presentan alta carga tumoral, mientras que los pacientes se encuentran en condiciones muy distintas, por lo general con quimioterapia como primera línea de tratamiento. Por este motivo, planteamos que el desarrollo de un modelo de enfermedad mínima residual (EMR) que se acerque más al contexto clínico, sería una herramienta sumamente valiosa donde investigar nuevas inmunoterapias.

Para la puesta a punto del modelo se inocularon ratones BALB/c con la línea de linfoma A20 y luego que los animales desarrollaron tumor se estudiaron distintas dosis de quimioterapia. El establecimiento del modelo de EMR se logró utilizando dos ciclos de quimioterapia tipo CHOP, que induce remisión completa por aproximadamente 20 días. En particular se evaluó el crecimiento tumoral y supervivencia de los ratones, así como los efectos secundarios que tiene el tratamiento quimioterápico. La remisión completa se monitorizó *in vivo*, implementando la técnica de imagenología molecular tomografía por emisión de positrones (PET), utilizada para el diagnóstico clínico de la enfermedad. Los resultados se correlacionaron con los de la histología que es la técnica “gold standard” empleada en los pacientes. Además se evaluó el estado inmunológico de los animales, corroborando que son inmunocompetentes, característica esencial a la hora de evaluar inmunoterapias.

Las terapias desarrolladas en el presente trabajo incluyeron tanto inmunoterapias específicas (vacuna a células enteras) como inespecíficas (*Salmonella*). Debido a que las células B pueden actuar como células presentadoras de antígenos (APCs), la estrategia utilizada se basó en una vacuna formulada con células tumorales modificadas para que expresen de forma estable la citoquina IL-15, infectadas con *Salmonella* para aumentar la expresión de moléculas co-estimuladoras y MHC II y mejorar así su capacidad de células presentadoras, e irradiadas para eliminar la tumorigenicidad celular. Trabajos previos en nuestro laboratorio reportaron el beneficio terapéutico de administrar una vacuna formulada con células modificadas por la infección con *Salmonella* en combinación con IL-2, en el modelo de linfoma A20 de alta carga tumoral. Sin embargo, a pesar del efecto antitumoral observado todos los ratones murieron. Planteamos utilizar IL-15 en nuestra vacuna ya que por sus características es considerada mejor candidata para ser utilizada en terapias contra cancer que la IL-2. Evaluamos el uso de esta inmunoterapia específica en el modelo de EMR, demostrando que genera una potente respuesta antitumoral, que se traduce en una extensión significativa de la sobrevida de los animales.

Las bacterias son los agentes inmunoestimuladores más potentes jamás conocidos. *Salmonella* demostró ser muy eficaz como agente antitumoral en muchos modelos de cánceres, tanto sólidos como hematológicos. En particular nuestro grupo de trabajo previamente reportó la respuesta inmune antitumoral generada por la administración de *Salmonella* en un modelo de LNH ¹. Sin embargo, los animales presentaban alta carga tumoral, y como comentamos anteriormente, los pacientes suelen estar en condiciones muy distintas. En el presente trabajo demostramos que *Salmonella* puede utilizarse como terapia adyuvante efectiva en animales que han sido tratados con CHOP. Más aún, observamos que la administración de la bacteria mejora en gran medida la condición general de los animales bajo tratamiento quimioterápico.

En conclusión, hemos generado inmunoterapias efectivas para el tratamiento de LHN, evaluadas en un modelo pre-clínico que se asemeja al contexto en el que se encuentran los pacientes en la clínica. Estas inmunoterapias tendrían gran probabilidad de ser testeadas en ensayos clínicos fase I.

TABLA DE CONTENIDO

CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN.....	1
1 LINFOMAS NO HODGKIN.....	2
1.1 Definición.....	2
1.2 Epidemiología.....	3
1.3 Sistema de clasificación de LNH.....	5
1.4 Tratamiento de LNH.....	6
1.4.1 Nuevos tratamientos.....	8
2 INMUNIDAD ANTITUMORAL.....	9
2.1 Definición.....	9
2.2 Reseña histórica.....	10
2.3 Antígenos tumorales.....	13
2.4 Mecanismos efectores antitumorales.....	14
2.4.1 Células NK.....	14
2.4.2 Neutrófilos y macrófagos.....	15
2.4.3 Células dendríticas.....	17
2.4.4 Células T citotóxicas.....	19
2.4.5 Células T CD4 ⁺	20
2.4.6 Células B.....	24
2.4.7 Otras células que participan en la respuesta inmune antitumoral.....	26
2.5 Mecanismos de evasión de la respuesta inmune antitumoral.....	27
2.5.1 Alteraciones en el reconocimiento de las células tumorales.....	29
2.5.2 Inducción de la inmunosupresión del microambiente tumoral.....	30
2.5.2.1 Citoquinas y factores solubles.....	30
2.5.2.2 Células inmunosupresoras.....	32
2.5.3 Evasión de la lisis de células tumorales.....	35
3 INMUNOTERAPIAS.....	36
3.1 Tipos de inmunoterapias.....	36
3.2 Inmunoterapia pasiva inespecífica.....	37
3.2.1 Inmunoterapia celular adoptiva: células NK.....	37
3.3 Inmunoterapia pasiva específica.....	39
3.3.1 Anticuerpos monoclonales.....	39
3.3.2 Inmunoterapia celular adoptiva: células T.....	44

3.4	Immunoterapia activa inespecífica.....	46
3.4.1	Inhibidores de puntos de control.....	46
3.4.2	Bacterias.....	47
3.4.2.1	Bacterias anaerobias estrictas.....	49
3.4.2.2	Bacterias anaerobias facultativas.....	50
3.4.2.3	Respuesta inmune generada por las bacterias.....	53
3.4.3	Citoquinas.....	54
3.4.3.1	IL-2.....	55
3.4.3.2	IL-15.....	56
3.4.3.3	IFN.....	58
3.4.3.4	GM-CSF.....	59
3.4.3.5	Otras citoquinas con potencial terapéutico.....	60
3.5	Immunoterapia activa específica.....	61
3.5.1	Vacunas proteicas.....	62
3.5.2	Vacunas de ADN.....	63
3.5.3	Vacunas basadas en vectores virales o bacterianos.....	64
3.5.4	Vacunas a células dendríticas.....	67
3.5.5	Vacunas a células enteras.....	67
3.6	Enfermedad mínima residual.....	70
3.6.1	Definición.....	70
3.6.2	Detección de la EMR.....	70
3.6.3	Importancia del desarrollo de un modelo de EMR.....	71
3.6.4	Imagenología Molecular: PET.....	72
4	OBJETIVOS.....	74
4.1	Objetivo general.....	74
4.2	Objetivos específicos.....	74
CAPÍTULO II. MATERIALES Y MÉTODOS.....		75
1	LÍNEAS CELULARES.....	76
1.1	Células A20.....	76
1.1.1	Características y condiciones de cultivo.....	76
1.1.2	Lisado de A20.....	76
1.1.3	Células A20 modificadas para que expresen de forma estable la citoquina IL-15.....	76

1.1.3.1	Clonado del gen <i>Il-15</i> murino.....	76
1.1.3.2	Transfección de la línea celular A20.....	79
1.1.3.3	Determinación de los niveles de ARN mensajero de <i>Il15</i> en los clones transfectantes mediante PCR en tiempo real.....	79
1.1.3.4	Western blot para determinar expresión de IL-15.....	80
1.1.3.5	Ensayo para determinar la actividad biológica de IL-15.....	81
1.2	Estudio de la tumorigenicidad de las células transfectantes.....	81
1.3	Otras líneas celulares.....	82
2	ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN.....	83
3	BACTERIA UTILIZADA.....	84
4	PREPARADOS VACUNALES.....	84
4.1	Ensayo <i>in vitro</i> de invasión celular con la cepa LVR01.....	84
4.2	Determinación de la expresión de moléculas co-estimuladoras y MHC II en células infectadas con LVR01.....	85
4.3	Irradiación de las células A20.....	85
4.3.1	Estudio de la viabilidad celular con azul de Tripán.....	86
4.3.2	Estudio del ciclo celular por citometría de flujo.....	86
4.3.3	Estudio de la tumorigenicidad de células irradiadas.....	87
5	MODELO MURINO DE ENFERMEDAD MÍNIMA RESIDUAL DE LNH-B.....	87
5.1	Implantación del tumor.....	87
5.2	Tratamiento quimioterápico.....	87
5.3	Estudio de la citotoxicidad de la quimioterapia.....	88
5.3.1	Efecto de la quimioterapia sobre la línea celular A20.....	88
5.3.2	Estudio de la toxicidad de la quimioterapia sobre los animales.....	89
5.4	Necropsias e histología.....	89
5.5	Imagenología molecular: PET/CT.....	90
5.5.1	Adquisición de imágenes.....	90
5.5.2	Análisis de las imágenes.....	91
Estudio del LNH-B por rayos X.....	91	

6	ENSAYOS <i>IN VIVO</i> CON LA VACUNA FORMULADA CON LAS CÉLULAS A20 MODIFICADAS.....	91
7	ENSAYOS DE INMUNIZACIÓN CON <i>SALMONELLA</i> INTRATUMORAL.....	93
8	ESTUDIO DE LA RESPUESTA INMUNE.....	94
8.1	Análisis de células infiltrantes de tumor por citometría de flujo.....	94
8.2	Separación de poblaciones celulares inmunes en muestras de tumor.....	95
8.3	Detección de citoquinas y quimioquinas en el tumor por PCR en tiempo real.....	97
8.4	Ensayo de proliferación celular con esplenocitos.....	97
8.5	Detección de citoquinas por RT-PCR en esplenocitos estimulados.....	97
8.6	Detección de citoquinas en el sobrenadante de esplenocitos estimulados mediante ELISA.....	98
8.7	Ensayo de citotoxicidad mediada por células NK.....	98
8.8	Depleción de poblaciones de células inmunes.....	99
8.8.1	Puesta a punto de las dosis necesarias para depletar las distintas poblaciones celulares.....	99
8.8.2	Ensayo de depleción <i>in vivo</i> de células inmunes.....	99
8.9	Estudio de la respuesta humoral contra las células tumorales A20.....	100
8.10	Estudio de la condición física y comportamental de los animales.....	101
9	ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	102

CAPÍTULO III. PUESTA A PUNTO DE UN MODELO PRE-CLÍNICO DE ENFERMEDAD MÍNIMA RESIDUAL DE LINFOMA NO HODGKIN.....103

1	OBJETIVO.....	104
2	RESULTADOS.....	104
2.1	Eficiencia de la quimioterapia y toxicidad <i>in vivo</i>	104
2.2	Crecimiento tumoral y supervivencia.....	106
2.3	Evaluación de la remisión tumoral en los ratones tratados con CHOP.....	107
2.3.1	Histología.....	107
2.3.2	Evaluación de la remisión completa por PET/CT.....	109
2.3.3	Estudio del LNH-B por rayos X.....	111
2.4	Estado inmunológico de los animales sometidos al tratamiento quimioterápico.....	111
3	DISCUSIÓN.....	114

CAPÍTULO IV. IL-15 COMO INMUNOTERAPIA PARA LHN-B.....	119
1 OBJETIVO.....	120
2 RESULTADOS.....	120
2.1 Modificación de las células A20 para que expresen de forma estable la citoquina IL-15.....	120
2.1.1 Clonado del gen <i>Il15</i> murino.....	120
2.1.2 Transfección de la línea tumoral A20.....	122
2.1.3 Estudio de la expresión de la citoquina IL-15.....	122
2.1.4 Estudio de la tumorigenicidad de las células transfectantes.....	124
2.2 Generación de una vacuna celular.....	125
2.2.1 Infección de las células A20 productoras de IL-15 con <i>Salmonella</i>	126
2.2.2 Puesta a punto de la irradiación de las células A20 y transfectantes.....	127
2.3 Ensayos <i>in vivo</i> con la vacuna A20 (IL-15)-SL.....	129
2.4 Estudio de la respuesta inmune generada por la administración de la vacuna A20 (IL-15)-SL en ratones en estado de EMR.....	131
2.4.1 Análisis de los niveles de ARNm de citoquinas y quimoquinas en el microambiente tumoral.....	132
2.4.2 Proliferación de esplenocitos.....	134
2.4.3 Estudio de la citotoxicidad mediada por células NK en animales tratados con la vacuna A20 (IL-15)-SL.....	135
2.4.4 Estudio de la respuesta humoral en los animales tratados con la vacuna A20 (IL-15)-SL.....	136
3 DISCUSIÓN.....	137

CAPÍTULO V. EVALUACIÓN DE <i>SALMONELLA</i> COMO TERAPIA ADYUVANTE EN UN CONTEXTO DE TRATAMIENTO QUIMIOTERÁPICO PARA EL TRATAMIENTO DE LNH-B.....	142
1 OBJETIVO.....	143
2 RESULTADOS.....	143
2.1 Crecimiento tumoral y sobrevida.....	143
2.2 Estudio de la respuesta inmune.....	145
2.2.1 Estudio de poblaciones celulares infiltrantes de tumor por citometría de flujo.....	145
2.2.2 Estudio del perfil de citoquinas y quimioquinas en el microambiente tumoral.....	147
2.2.3 Estudio de la respuesta antígeno-específica en bazo.....	149

2.2.4	Estudio de la citotoxicidad mediada por NK en animales tratados con LVR01.....	151
2.2.5	Determinación de anticuerpos específicos contra antígenos tumorales.....	152
2.2.6	Ensayos de depleción de poblaciones celulares inmunes.....	153
2.3	Estudio de la condición física y comportamiento de los animales.....	154
3	DISCUSIÓN.....	156
 CAPÍTULO VI. CONCLUSIONES FINALES Y PERSPECTIVAS.....		163
 CAPÍTULO VII. REFERENCIAS.....		168
 ABREVIATURAS.....		199
 APÉNDICE.....		202

CAPÍTULO I

INTRODUCCIÓN

1 LINFOMAS NO HODGKIN

1.1 Definición

Los Linfomas no Hodgkin (LNH) constituyen un grupo de neoplasias linfoides heterogéneo, que difieren en su histología, evolución y respuesta a tratamientos, pudiendo ir desde los más indolentes (por ejemplo, linfoma folicular (LF)), hasta los altamente agresivos (por ejemplo, linfoma linfoblástico y linfoma de Burkitt) ^{1,2}. Usualmente se originan en la expansión clonal de las células del sistema inmunitario tanto en órganos linfoides primarios (médula ósea y timo), como en secundarios (ganglios linfáticos, bazo, amígdalas y tejido linfoide asociado), por lo que podría producirse casi en cualquier órgano (Fig. 1). La sintomatología para LNH en adultos incluye aumento del tamaño de los ganglios linfáticos, esplenomegalia, fiebre, sudoración nocturna, pérdida de peso, fatiga y anemia ¹.

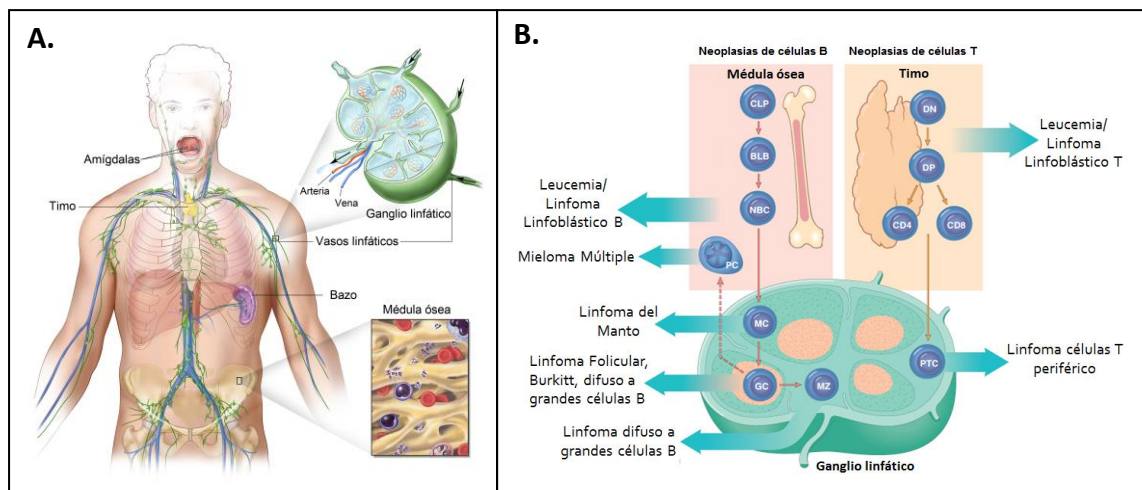


Figura 1. Origen del LNH. A. Anatomía del sistema linfático. Se muestran los vasos y órganos linfáticos, incluyendo los ganglios linfáticos, amígdalas, timo, bazo y médula ósea. Imagen modificada de SEER cancer statistics review, National Cancer Institute, <https://www.cancer.gov/types/lymphoma>, fecha de acceso: Diciembre 2016. **B.** El LNH se origina en la expansión clonal de células del sistema inmune, la figura muestra algunos tipos de neoplasias de células B y T.

1.2 Epidemiología

En los países desarrollados, los LNH son una de las enfermedades onco-hematológicas más frecuentes tanto en hombres como en mujeres ¹. Según Cancer Research UK, en 2012 se estimó un total de 386.000 casos de LNH a nivel mundial, incluyendo todos los subtipos ³. La incidencia del LNH ha cambiado sustancialmente en las últimas cuatro décadas. Entre los años 1970 y 1990, observamos que la incidencia se duplicó, probablemente debido al mejoramiento de las pruebas diagnósticas, la mayor incidencia de la infección por VIH y el incremento en el uso de terapias inmunosupresoras, mientras que entre 1995 y 2010 la incidencia del LNH se estabilizó (Fig. 2A) ⁴. Basándose en datos recaudados en el período 2009-2013, el programa Surveillance, Epidemiology, and End-Results (SEER) del Instituto Nacional de Cáncer de los Estados Unidos, calculó que el número de nuevos casos de LNH por año fue de 19,5/100.000 habitantes tomando en conjunto hombres y mujeres. En particular, la incidencia global es mayor en hombres (23,7/100.000) que en mujeres (16,1/100.000), este incremento en el riesgo de padecer la enfermedad en hombres también se ha visto en otros países ^{5,6}. Cancer Research UK proyecta que la tasa de incidencia de LNH caerá un 2% en UK en el período 2014-2035 (Fig. 2B). La incidencia del LNH aumenta exponencialmente con la edad, 9,3/100.000 personas por debajo de los 65 años, y 91,5/100.000 personas por encima de los 65 años de edad (Fig. 3). En UK el LNH está en el puesto n° 6 de los cánceres más comunes y en Estados Unidos en el n°7 ^{3,5}.

La distribución geográfica mundial es desigual, siendo la enfermedad poco frecuente en japoneses y afroamericanos. En la Fig. 4 se observa la prevalencia mundial para ambos sexos ⁷. Esta heterogeneidad sugiere que existen factores que influyen en la etiología de la enfermedad como son agentes infecciosos, medio ambiente, estilos de vida, y factores genéticos ^{4,6,8,9}. En particular, Uruguay se sitúa entre los países con mayor prevalencia junto con Europa y Estados Unidos. Según la Comisión Honoraria de Lucha contra el Cáncer, tomando en cuenta el período 2007-2011, la incidencia de LNH fue de aproximadamente 8/100.000 habitantes por año, con una mediana de edad de 65 años ¹⁰. Al igual que en los registros internacionales, los tipos de LNH más frecuentes son los LNH a células B y dentro de éstos, el linfoma difuso a grandes células B (LDGCB) y LF.

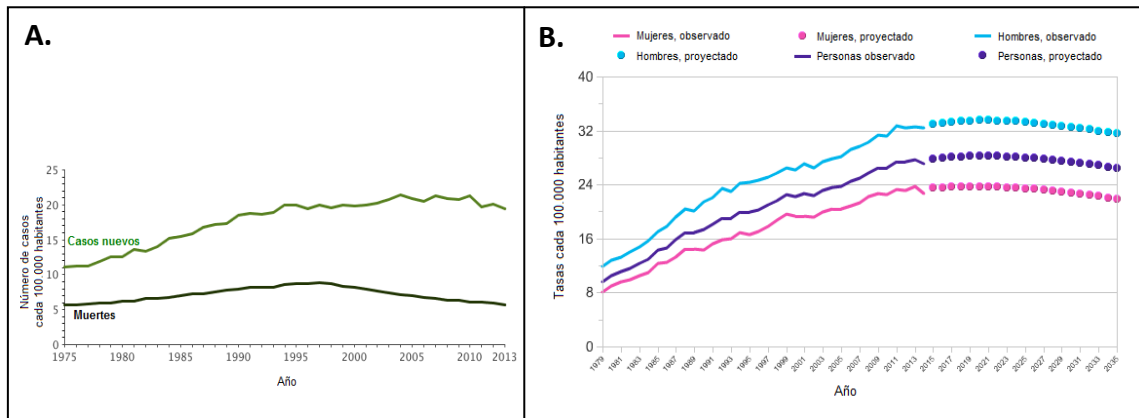


Figura 2. Cambios de la incidencia de LNH a través del tiempo. **A.** Cantidad de nuevos casos de LNH y muertes por la enfermedad cada 100.000 habitantes, registrados desde el año 1975. No se observan cambios significativos en las tasas de aparición de nuevos casos en los últimos 10 años. Por su parte, las tasas de mortalidad han caído un promedio 2,4% cada año durante el período 2004-2013. Imagen modificada de SEER cancer statistics review, National Cancer Institute, <https://seer.cancer.gov/statfacts/html/nhl.htm>, fecha de acceso: Diciembre 2016. **B.** Tasas de incidencia estandarizada por edad (ASR, del inglés) observadas (línea continua) y proyectadas (línea punteada), para mujeres, hombres y personas en general. Se proyecta una caída del 2% de las tasas de incidencia de LNH en el período 2014-2035. Imagen modificada de Cancer Research UK, <http://www.cancerresearchuk.org/health-professional/cancer-statistics/statistics-by-cancer-type/non-hodgkin-lymphoma/incidence#ref-4>, fecha de acceso: Diciembre 2016.

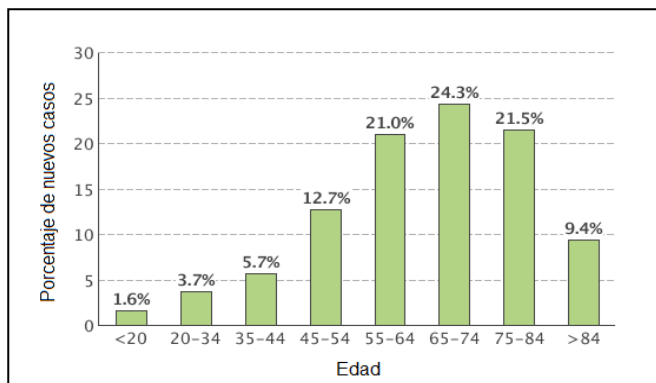


Figura 3. Incidencia del LNH según la edad. El gráfico de barras muestra el porcentaje de nuevos casos diagnosticados a distintas edades en el período 2009-2013. La edad promedio diagnóstico es de aproximadamente 66 años. Imágenes modificadas de SEER cancer statistics review, National Cancer Institute, <https://seer.cancer.gov/statfacts/html/nhl.html>, fecha de acceso: Diciembre 2016.

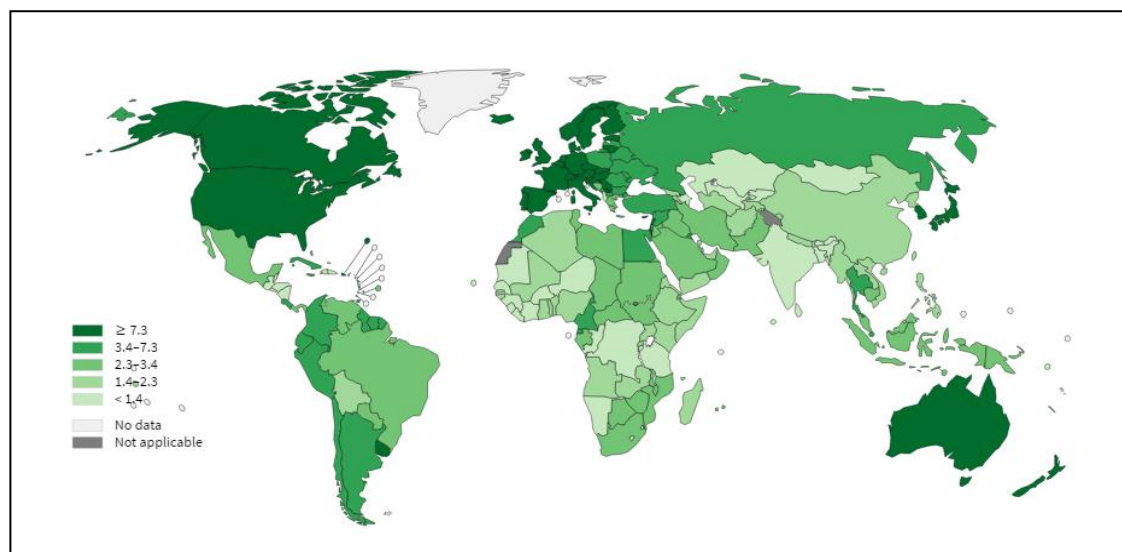


Figura 4. Prevalencia mundial anual de LNH, expresada cada 100.000 habitantes (Gobocan 2012).

De acuerdo al el programa SEER y Cancer Research UK, con los tratamientos modernos, la tasa de supervivencia global a 5 años para todas las edades, subtipos y estadios es de aproximadamente 70 % y para 10 años de 60 % (Fig. 5) ^{11,12}. En Uruguay en el período 2006-2009 la mortalidad global en todos los tipos de LNH fue de 6,5/100.000 habitantes por año (www.shu.com.uy). El estadio de la enfermedad así como el subtipo de LNH, la cantidad de enzima lactato deshidrogenasa (LDH) encontrada en sangre, mutaciones particulares en ciertos genes, estado de salud general del paciente, edad, y momento de diagnóstico de la enfermedad (diagnóstico primario o recaída), son factores pronóstico del LNH ^{5,13,14}.

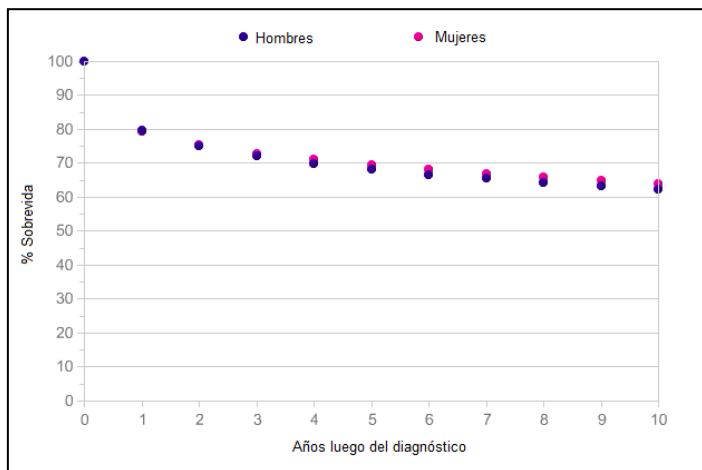


Figura 5. Supervivencia de los pacientes luego de diagnosticado el LNH. En la gráfica se observa la supervivencia de hombres y mujeres cuyo diagnóstico de LNH se realizó entre los años 2010-2011. La supervivencia a 5 años es de 70 %, luego de este tiempo se observa que la misma comienza a disminuir. Imagen modificada de Cancer Research UK, <http://www.cancerresearchuk.org/health-professional/cancer-statistics/statistics-by-cancer-type/non-hodgkin-lymphoma/survival#heading-Zero>, fecha de acceso: Diciembre 2016.

1.3 Sistema de clasificación de LNH

El diagnóstico preciso del tipo de LNH es fundamental para realizar un tratamiento adecuado de la enfermedad. Históricamente se utilizaron diversos sistemas de clasificación de LNH que han ido evolucionando basado en la incorporación de nuevas herramientas diagnósticas (inmunofenotipo, citogenética convencional y molecular, biología molecular, entre otros). Actualmente se utiliza el sistema de clasificación de la Organización Mundial de la Salud (OMS). Este sistema fue introducido por primera vez en el año 2001 y su última actualización se realizó en 2016 ¹⁵. La clasificación en este caso está basada en la morfología celular, inmunofenotipo, genética y características clínicas ¹⁶. Divide a los linfomas en grupos: neoplasmas de

células B, neoplasmas de células T y NK, neoplasias de histiocitos y células dendríticas, síndromes linfoproliferativos asociados a trasplante y Linfomas de Hodgkin (LH). Dentro de las neoplasias de células B y T el sistema de clasificación de la OMS distingue entre neoplasias precursoras y maduras, que corresponden a estadios de diferenciación tempranos y tardíos, respectivamente ¹⁵. A nivel mundial se estima que los linfomas de células B representan aproximadamente un 90 % del total de linfomas, siendo los más comunes el LDGCB y el LF, los mismos representan un 35 % y 20 % aproximadamente del total de linfomas ^{15,17}. En el Apéndice se muestra el sistema de clasificación de la OMS 2016.

1.4 Tratamiento de LNH

Paralelo al desarrollo de los conocimientos sobre la biología de los LNH, el tratamiento de los mismos, ha experimentado un cambio espectacular en las últimas décadas. Tradicionalmente, el tratamiento de los LNH consistía en quimioterapia citotóxica y radioterapia, con la cual se obtenía buenas tasas de remisión, aunque insatisfactorias, con sobrevida libre de enfermedad corta, dado que la mayoría de los pacientes recaían al poco tiempo. En las últimas décadas se han desarrollado nuevas terapias, dentro de las cuales destacamos el uso anticuerpos monoclonales. La estrategia terapéutica global de los LNH dependerá de varios factores como el subtipo histológico, la edad del paciente, la extensión de la enfermedad, y el lugar anatómico de presentación. Actualmente las terapias disponibles incluyen radioterapia, quimioterapia, inmunoterapia, terapias dirigidas con anticuerpos monoclonales, drogas inmunomoduladoras, radioinmunoterapia, y trasplante de progenitores hematopoyéticos ¹⁸⁻²⁸.

La quimioterapia utiliza drogas que actúan sobre las células en activa proliferación, produciendo daños a nivel del ciclo celular de modo que las células no pueden completar su división y mueren. Debido a la rápida multiplicación de las células tumorales, éstas tienen mayor probabilidad de ser dañadas por las drogas, siendo este el efecto antitumoral. Dado que el LNH es considerado una enfermedad sistémica desde su inicio, se elige la administración de las drogas por vía sistémica. Actualmente, para el tratamiento de los LNH se utilizan numerosas drogas citostáticas como son

agentes alquilantes, antimetabolitos, alcaloides de la vinca, antraciclinas, entre otros ¹. En general, los tratamientos quimioterápicos se utilizan en forma de poliquimioterapia, adicionándose también fármacos de tipo esteroides ya que son altamente linfocíticos. Los regímenes de poliquimioterapia son diseñados en función de la actividad antitumoral de los fármacos, procurando un efecto sinérgico, sin sumar toxicidades. El problema con este tipo de tratamientos es que las drogas además de ejercer su actividad citotóxica sobre las células tumorales, afectan tejidos normales, especialmente aquellos con una alta tasa de proliferación como son el epitelio digestivo y médula ósea. Por tal motivo, existe un gran interés en el desarrollo de fármacos dirigidos a diferentes blancos terapéuticos como forma de evitar los efectos adversos de la quimioterapia y lograr una mayor efectividad terapéutica.

En los últimos años, con la introducción del anticuerpo monoclonal anti-CD20 (rituximab), se logró una mejoría franca en las tasas de respuesta a tratamientos. Los mejores resultados alcanzados hasta la fecha se han logrado utilizando la combinación de regímenes de quimioterapia junto con rituximab ^{29,30}. El tratamiento de primera línea para los subtipos más frecuentes de LNH es el plan de poliquimioterapia tipo CHOP (ciclofosfamida, doxorubicina, vincristina y prednisona) que incluye la combinación de agentes citostáticos con diferentes mecanismos de acción sobre la célula tumoral junto con corticoides ³¹. La ciclofosfamida es un agente alquilante y como tal, tiene afinidad por el ADN y las proteínas, a los que adiciona radicales altamente reactivos. Así produce enlaces entre cadenas de ADN, entre otras transformaciones, impidiendo su replicación y transcripción. La doxorubicina pertenece al grupo de antibióticos citostáticos, en particular a las antraciclinas, las cuales se intercalan en el ADN, inhiben topoisomerasas y alteran la membrana celular. La vincristina es un alcaloide de la vinca que inhibe la mitosis porque se une a la tubulina impidiendo la formación de microtúbulos ¹. En los LNH a células B (LNH-B) se le incorpora a esta combinación de fármacos rituximab (R-CHOP), que mejora notoriamente la tasa de respuestas ^{29,32-34}. Sin embargo, a pesar de las diversas terapias disponibles para el tratamiento, los resultados clínicos y las tasas de curación obtenidas para todos los tipos de LNH continúan siendo insatisfactorios, por lo que es necesario desarrollar nuevas estrategias terapéuticas.

1.4.1 Nuevos tratamientos

En los últimos años, el avance en el conocimiento de la biología y patogenia de los LNH, y cómo el sistema inmune interactúa con las células linfomatosas ha dado lugar al desarrollo de nuevas drogas que utilizan como blanco terapéutico moléculas involucradas en las vías de señalización intracelular, las cuales en muchos casos están alteradas en linfoma. En Mondello et al., 2015 y Smith et al., 2015 se revisan la mayoría de las drogas actualmente en uso y en desarrollo para LNH ^{21,35}. En la Tabla 1 se resumen estos fármacos, a excepción de los anticuerpos monoclonales de los cuales se hablará en la Sección: *Inmunoterapias*.

En la actualidad las aproximaciones terapéuticas con mayor potencial son aquellas que combinan terapias convencionales como son quimioterapia y radioterapia con aquellas cuyo blanco incluyen elementos que forman parte del sistema inmune ³⁶.

Tabla 1. Nuevas drogas desarrolladas para el tratamiento LNH.

Grupo de Drogas	Agentes	Comentario
Inhibidores de BCR	-Inhibidor BTK: ibrutinib -Inhibidores PI3K: idelalisib, duvelisib, copanlisib -Inhibidores de SYK: fostamatinib, entospletinib -Inhibidores de mTOR: sirolimus, temsirolimus, everolimus, deforolimus -Inhibidores de AKT: perifosin	Se ha demostrado que las señales del receptor de células B (BCR) son necesarias para la proliferación y supervivencia de las células B linfomatosas ³⁷ . La desregulación de alguna de estas proteínas está implicada en la proliferación celular y progresión tumoral ²⁷ . El desarrollo de inhibidores de proteínas de la vía de señalización de BCR ha mostrado potencial terapéutico en los LNH ^{21,23,27,38} .
Inhibidores del proteosoma	Bortezomib ³⁹⁻⁴² Carfilzomib ⁴³	El proteosoma es un complejo proteico multicatalítico responsable de la degradación de la mayoría de las proteínas intracelulares de forma específica, incluyendo proteínas cruciales para la regulación del ciclo celular y la apoptosis ⁴⁴ . Asimismo, es fundamental para la homeostasis celular por su función en la degradación de proteínas mutadas, o mal plegadas que no son funcionales ^{42,45} . Además, existen estudios que indican que en varios tumores humanos hay mayor expresión de proteínas relacionadas con el proteosoma, por lo que estas células

Continuación Tabla 1.

		tumorales serían más sensibles a drogas inhibidoras del proteosoma ^{45,46} .
Drogas inmunomoduladoras	Talidomida ³⁵ Lenalidomida ⁴⁷ Pomalidomida ⁴⁸	Su mecanismo de acción no se conoce con exactitud. Se ha descrito que estas drogas tienen efectos pleiotrópicos sobre las células tumorales, incluyendo la disminución de IL-6, VEGF y TNF α ^{21,35} .
Drogas modificadoras del epigenoma	-Inhibidores de DNA metiltransferasas (DNMTi): azacitidina y la decitabina, tazemetostat ⁴⁹⁻⁵¹ -Inhibidores de histona desacetilasas (HDACi): vorinostat, romidepsin, belinostat y panobinostat ⁵²⁻⁵⁴	Dentro de los mecanismos epigenéticos que remodelan la cromatina, se incluye la metilación y acetilación del ADN, modificaciones postraduccionales de las histonas y ARN no codificantes. Estos mecanismos son de gran importancia en la regulación de la expresión génica y el mantenimiento de fenotipos normales ⁵⁰ . Los cambios epigenéticos son reversibles, por lo que el desarrollo de fármacos que promuevan el equilibrio epigenético son potenciales drogas terapéuticas ⁵⁵ .
Agentes pro-apoptóticos	Obatoclax: se une a proteínas antiapoptóticas de la familia BCL-2 induciendo la apoptosis ⁵⁶ Navitoclax: se une a las proteínas BCL-2, BCL-XL y BCL-W ³⁸ Venetoclax (ABT-199): inhibidor selectivo de BCL-2 ^{38,57} Oligonucleótidos anti-sentido (ASO): oblimersen ⁵⁸	En numerosas neoplasias linfoides miembros de la familia BCL-2 están sobreexpresados ^{59,60} . Dentro de la familia de proteínas BCL-2 se incluyen factores pro-apoptóticos (Bax, Bak y proteínas con dominio solo BH3) y antiapoptóticos (BCL-2, BCL-XL, BCL-W, MCL-1 and A1). La interacción entre estas proteínas son esenciales para prevenir o iniciar la apoptosis ⁵⁸ . Utilizar estas proteínas como blanco podría ser una estrategia atractiva para el tratamiento del cáncer ^{56,60} .

2 INMUNIDAD ANTITUMORAL

2.1 Definición

La inmunidad antitumoral se define como el conjunto de mecanismos del sistema inmune, cuya activación es desencadenada por la presencia de tumor. Se basa en la premisa de que existen antígenos tumorales que pueden ser reconocidos por el sistema inmune y pueden generar una respuesta contra las células neoplásicas ⁶¹.

2.2 Reseña histórica

La noción de que el sistema inmune puede proteger al huésped de enfermedades neoplásicas fue inicialmente propuesta por Paul Ehrlich a comienzos del siglo XX, y formalmente planteada como la teoría de inmunovigilancia por Burnet y Thomas en los años 70⁶²⁻⁶⁵. La inmunovigilancia se define como el proceso de monitoreo por parte del sistema inmune que detecta y destruye células neoplásicas. El sistema inmune actuaría como centinela reconociendo y eliminando dichas células sin dejar una secuela patológica⁶⁶. Esta hipótesis se ha visto apoyada por múltiples evidencias tanto en modelos animales como en humanos⁶⁶⁻⁶⁸. Se observó que existe una estrecha relación entre la aparición y desarrollo de cánceres y el estado funcional del sistema inmune⁶¹.

Desde hace más de una década la investigación intensa en el área de la inmunidad tumoral reveló que la inmunovigilancia es sólo una parte de la historia y llevó a perfeccionar y ampliar el concepto en lo que se conoce como “inmunoedición del cáncer”^{66,69-71}. Este proceso dinámico, donde el sistema inmune no sólo protege contra el desarrollo del cáncer, sino que también puede moldear el tumor a través de la selección de variantes tumorales con inmunogenicidad reducida, está compuesto por tres fases: Eliminación, Equilibrio y Escape (Fig. 6)⁷¹.

La etapa de *Eliminación*, hace referencia al concepto original de inmunovigilancia tumoral, donde se logra la erradicación de las células tumorales. En esta etapa tanto la inmunidad innata como adaptativa trabajan conjuntamente para detectar y destruir las células tumorales. Las células normales se transforman en células tumorales por carcinógenos, radiación, y fallos en mecanismos supresores de tumor (por ejemplo, p53, ATM). El inicio de la respuesta inmune antitumoral se produce como consecuencia de la presencia de patrones moleculares asociados a daño (DAMPs) debido al daño en tejidos circundantes al tumor y por la detección de moléculas inducidas por estrés en las células tumorales (calreticulina, antígenos tumorales presentados en moléculas de MHC I y/o ligandos NKG2D) por parte de células CD8⁺ y NK. Estas señales reclutan células del sistema inmune innato (NK, NKT, células T $\gamma\delta$, neutrófilos, macrófagos y células dendríticas (DCs)) y adaptativo (linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺). Las células NK y macrófagos infiltrantes de tumor producen IFN- γ e IL-

12, que terminan por desencadenar la muerte de las células tumorales por apoptosis vía TRAIL, perforinas y especies reactivas del oxígeno. Por su parte, las DCs inmaduras pueden captar los antígenos tumorales liberados por el efecto de las células del sistema inmune innato, posteriormente activarse y migrar a ganglios adyacentes del tumor donde pueden inducir la activación de células T CD4⁺ y CD8⁺. Luego estas células son reclutadas al sitio del tumor donde ejercen sus funciones efectoras antitumorales⁷². Las DCs también pueden captar y presentar de forma cruzada antígenos tumorales a células NKT (antígenos lipídicos y glucolípidicos presentadas a través de CD1d). Estas células efectoras activadas liberan IFN- γ que puede mediar los efectos antitumorales inhibiendo la proliferación de células tumorales y la angiogénesis. Las células T CD8⁺ pueden inducir la apoptosis de las células tumorales por interacción con los receptores Fas y TRAIL en las células tumorales, o por secreción de perforina y granzimas (Fig. 6)⁶⁹⁻⁷¹.

En la etapa de *Equilibrio*, la permanente inmunovigilancia determina que las células tumorales se vuelvan “resistentes” a los mecanismos efectoras antitumorales puestos en marcha por el sistema inmunitario^{70,71}. Existe una presión inmunitaria selectiva, que determina la aparición de células tumorales con inmunogenicidad reducida. Las células tumorales ponen en marcha mecanismos de evasión de la respuesta inmune antitumoral (Fig. 6)^{69,73}. Estas variantes celulares, menos inmunogénicas, proliferan promoviendo el crecimiento tumoral. Los mecanismos moleculares que subyacen esta etapa son poco conocidos debido a la dificultad de desarrollar modelos en los cuales estudiar dicho proceso. Un escenario clínico que puede ilustrar la fase de equilibrio en los seres humanos es la aparición de tumores en individuos trasplantados. Mackie y col. reportaron la aparición de melanoma metastásico 1-2 años después del trasplante en dos receptores de aloinjerto que habían recibido cada uno un riñón del mismo donante. Después de un análisis posterior, se encontró que el donante había sido tratado para melanoma primario 16 años antes de que sus riñones fueran donados, pero se consideró libre de tumor al momento de su muerte⁷⁴. La etapa de equilibrio es probablemente la más larga de las tres fases, abarcando en humanos períodos de varios años⁷⁰.

Finalmente, en la etapa de *Escape*, las variantes tumorales evaden los mecanismos efectoras antitumorales del sistema inmunitario, proliferan y el tumor se

hace clínicamente evidente ^{69,70}. Dicho escape ocurre por distintos mecanismos, incluyendo: disminución del reconocimiento de las células tumorales por parte del sistema inmune, aumento de la resistencia o supervivencia, o desarrollo de un microambiente tumoral inmunosupresor (Fig. 6) ⁷¹. Los mecanismos que subyacen esta fase se detallarán más adelante.

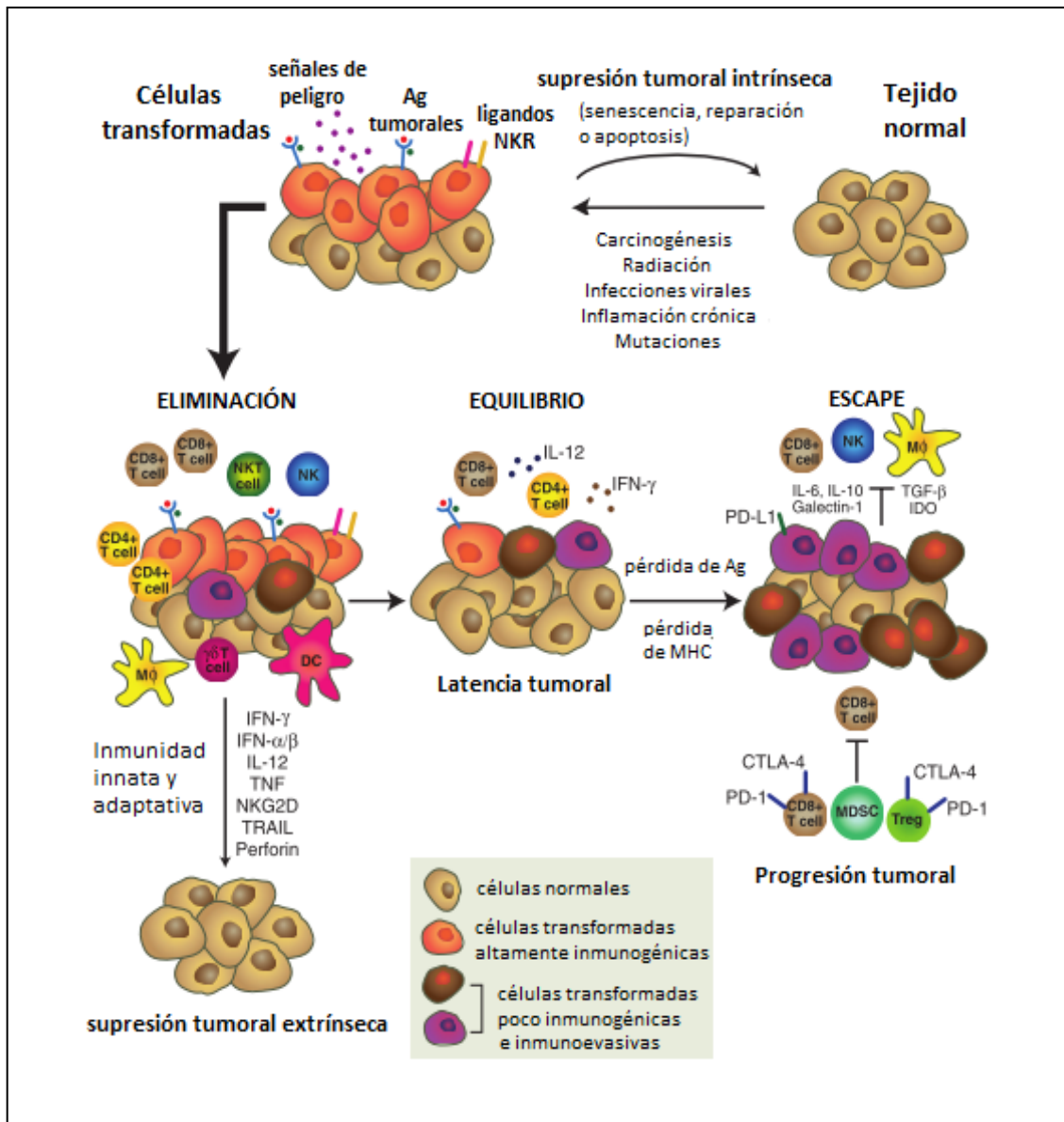


Figura 6. Inmunomodulación del cáncer. En la etapa de ELIMINACIÓN tanto el sistema inmune innato como adaptativo destruyen el tumor tempranamente antes de que sean clínicamente visibles. Aquí la balanza está volcada a inmunidad antitumoral debido a un aumento en la expresión de antígenos tumorales, MHC I, Fas y receptor TRAIL en células tumorales y perforinas, granzimas, IFN- $\alpha/\beta/\gamma$, IL-1, IL-12, TNF- α en el microambiente tumoral. En la etapa de EQUILIBRIO el sistema inmune mantiene al tumor en estado de latencia. En esta fase se mantiene un equilibrio entre las citoquinas antitumorales (IL-12, IFN- γ) y promotoras de tumor (IL-10, IL-23). Durante la fase de ESCAPE el sistema inmune no logra limitar el crecimiento tumoral y el cáncer se hace clínicamente evidente. Aquí la balanza está volcada hacia la progresión tumoral debido a la presencia de factores inmunosupresores como IL-10, TGF- β , VEGF, IDO y PD-L1. Imagen modificada de ⁷¹.

2.3 Antígenos tumorales

El concepto de inmunoterapia antitumoral específica se basa en que el sistema inmune puede detectar diferencias entre células normales y neoplásicas. Los antígenos tumorales pueden ser proteínas, péptidos o carbohidratos que el sistema inmune reconoce como “extraños”, desencadenando una respuesta inmunológica en el huésped ⁶¹. La alta frecuencia de mutaciones de la célula tumoral y la desregulación en la expresión génica da lugar a la producción de proteínas que no se expresan normalmente. Adicionalmente, los tumores causados por virus pueden expresar proteínas virales y estos productos pueden ser reconocidos como extraños por las células B y T ⁷⁵.

Clásicamente, los antígenos tumorales se clasificaban en antígenos específicos de tumor y antígenos asociados a tumor ⁶¹. Los primeros se expresan sólo en células tumorales y no en las células normales. Los segundos se expresan en ambos tipos de células, aunque en las células tumorales su expresión es aberrante o existe una alteración en la regulación de su expresión. Actualmente se han propuesto numerosas formas de clasificar a los antígenos tumorales, siendo una de las más utilizadas la que tiene en cuenta las características y funciones del antígeno (Tabla 2) ⁷⁵⁻⁷⁷.

Tabla 2. Antígenos tumorales. Datos extraídos de ⁶¹.

Tipos de antígenos	Ejemplos
Productos de oncogenes y de genes supresores de tumor mutados	Bcr/abl, ras, p53
Productos de oncogenes sobreexpresados (no mutados)	HER2/Neu
Genes mutados no implicados en la tumorigénesis	Proteínas mutadas reconocidas por CTLs en melanoma
Productos de genes que se encuentran silenciados en la mayoría de los tejidos normales	Antígenos encontrados en cáncer de testículo, en muchos carcinomas y melanoma
Proteínas normales no oncogénicas sobreexpresadas en células tumorales	Tirosinasa, gp100, MART en melanomas (normalmente expresada en melanocitos)
Virales	VEB, VPH, HTLV-1
Proteínas celulares sobreexpresadas o expresadas aberrantemente	Tirosinasa, MAGE, GAGE, RAGE
Glicolípidos y glicoproteínas	GM ₂ , GD ₂ en melanomas
Antígenos oncofetales	CEA y AFP
Antígenos de diferenciación específicos de tejido	CD10, CD20, Idiotipo de célula B, PSA

2.4 Mecanismos efectores antitumorales

La respuesta inmune antitumoral es llevada a cabo por mecanismos efectores tanto del sistema inmune innato como del adaptativo. Tradicionalmente se consideraba que la respuesta inmune innata era la primera barrera contra las células tumorales, las cuales eran reconocidas por un proceso no específico, mientras que la respuesta inmune adaptativa requería del reconocimiento específico de antígenos tumorales para poder eliminar las células malignas. Clásicamente se consideraba a las células B y T como efectoras de la inmunidad adaptativa, pero en los últimos años, este concepto se ha modificado ya que se han descrito nuevas poblaciones, como las células B1, células $T\gamma\delta$ y células NKT, entre otras, como parte de la inmunidad innata. Asimismo, se ha descrito que algunas de estas células presentan funciones características de la inmunidad adaptativa, como por ejemplo se ha sugerido la existencia de células NK de memoria ⁷⁸. Estas poblaciones celulares y las citoquinas producidas a partir de ellas, desempeñan un rol dual en el desarrollo tumoral, ya sea teniendo un efecto antitumoral, o promoviendo su crecimiento ⁷⁹.

2.4.1 Células NK

Las células NK se han descrito como efectores críticos en la respuesta antitumoral, teniendo atributos tanto del sistema inmune innato como del adaptativo. Además de eliminar de forma directa a las células tumorales, desempeñan un papel regulador en la formación de respuestas de células T y B específicas de antígenos ^{61,80,81}. Las NK son capaces de destruir las células tumorales, en especial, las que tienen una expresión reducida de MHC I. La activación de la célula NK está regulada por un equilibrio entre señales generadas por los receptores activadores (ejemplo: NKG2D, NKp44, NKp46) e inhibidores (KIR) ^{77,82,83}. Los receptores inhibidores de las células NK se unen a moléculas del MHC I que se expresan en la célula diana. Cuando ambos receptores activadores e inhibidores están ocupados por su ligando, domina la influencia de los inhibidores y la célula NK no se activa ^{61,82}. Muchas veces, las células tumorales no expresan o disminuyen la expresión de MHC I como mecanismo de evasión del sistema inmune, provocando que las células NK pasen de su estado normal de inhibición al estado activado ⁸³. Además, algunos tumores expresan MICA, MICB y

ULB que son ligandos del receptor activador KNG2D de las células NK. La activación de las células NK induce la apoptosis de la célula tumoral a través de la liberación de perforinas/granzimas, vía Fas/Fas-L y TRAIL. Adicionalmente, las células NK pueden actuar sobre células recubiertas por anticuerpos IgG, dado que expresan receptores de Fc (FcγRIII o CD16) mediando la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC, del inglés) ⁶¹. La capacidad tumoricida de las células NK se incrementa por citoquinas, incluyendo IFN-γ, IL-12, IL-15 e IL-18 que estimulan la actividad de las células NK ^{84,85}.

Desde hace años, existe evidencia de cómo las células NK contribuyen al control del desarrollo tumoral tanto en modelos experimentales como en pacientes ^{85,86}. En particular, se ha demostrado la participación de las células NK en la respuesta antitumoral en las neoplasias hematológicas, lo cual podría tener un impacto en el desarrollo de estrategias terapéuticas ^{87,88}. Recientemente, se describieron células NK de memoria, observándose una respuesta mejorada y prolongada al estimular células NK con antígenos específicos, las cuales podrían ser utilizadas para el desarrollo de inmunoterapias contra cáncer ⁸⁹.

2.4.2 Neutrófilos y macrófagos

Los neutrófilos son la primera línea de defensa del sistema inmune del huésped contra infecciones de distinta naturaleza ⁹⁰. Mientras que el papel de los neutrófilos en la defensa del sistema inmune contra patógenos se conoce con bastante exactitud, aún falta más información para determinar el rol que cumplen estas células en el desarrollo tumoral; lo que sí se sabe es que es complejo y varía entre los diferentes tipos y estadios del cáncer ⁹¹⁻⁹⁴. Se ha sugerido que existen dos subpoblaciones funcionales diferentes de neutrófilos asociados a tumor (TANs). Los N1 con función antitumoral, y los N2 que favorecen el desarrollo del tumor.

Los tipo N1 pueden ejercer su actividad antitumoral de forma directa ya sea por daño oxidativo generado por las especies reactivas del oxígeno secretadas por los neutrófilos ^{95,96}, a través de la apoptosis asociada a FasL ⁹⁷, o por ADCC ^{98,99}. Este tipo de neutrófilos pro-inflamatorios pueden promover el reclutamiento de células T CD8⁺ y su activación mediante la secreción de quimioquinas CCL3, CXCL9 y CXCL10, y

citoquinas pro-inflamatorias IL-12, TNF- α y GM-CSF^{100,101}. Además, se ha observado la presentación cruzada *in vitro* por parte de los neutrófilos, y que neutrófilos pulsados con antígenos promueven la activación de las células T CD8⁺¹⁰². También existe evidencia que estos TANs pueden activar DCs vía contacto célula-célula, y a través de la secreción de TNF- α , promueve la activación de células T CD4⁺¹⁰³, la memoria antitumoral¹⁰⁴, e induce la regresión tumoral vía IL-12¹⁰⁵. La depleción de los neutrófilos N1 promueve el crecimiento tumoral y contrarresta los efectos antitumorales de las inmunoterapias^{100,106-108}. Se ha descrito que la presencia de TGF- β en el microambiente tumoral inhibe los neutrófilos N1. Por lo que una forma de eliminar este efecto sería utilizar anticuerpos monoclonales anti-TGF- β , lo cual inhibiría además el crecimiento tumoral¹⁰⁰. Los neutrófilos tipo N2 se comentarán junto con la evasión de la respuesta inmune por parte del tumor.

Los macrófagos son otra de las poblaciones celulares del sistema inmune que juegan un rol importante como primera línea de la defensa del huésped, y además participan en el mantenimiento de la homeostasis de los tejidos¹⁰⁹. Los macrófagos residentes de tejido se originan de monocitos precursores circulantes, derivados de la médula ósea¹¹⁰. Estos precursores extravasan a los tejidos, donde se diferencian a macrófagos y se polarizan en distintas subpoblaciones con diferentes fenotipos dependiendo del microambiente¹¹¹. Análogo a lo que ocurre con los TANs, los macrófagos infiltrantes de tumor (TAMs) pueden ser de tipo M1, implicados en respuestas inflamatorias y antitumorales, o M2, con función anti-inflamatoria y pro-tumoral^{112,113}. Para polarizarse a M1 son necesarias dos señales, citoquinas Th1 y TNF exógeno o inductores de TNF endógeno^{114,115}. Los macrófagos M1 expresan IL-12, IL-13, MHC y miembros de la familia B7 en altas cantidades. La función principal de estos macrófagos es el promover la presentación antigénica y la activación Th1¹¹⁶. Los macrófagos M1 producen quimioquinas incluyendo CXCL9 y CXCL10 que atrae linfocitos Th1¹¹⁷. Además, se puede inducir la secreción de óxido nítrico, factores inflamatorios y quimioquinas por parte de los macrófagos por la presencia de IFN- γ ¹¹⁸.

Las quimioquinas con mayor participación en el reclutamiento de TAMs son CCL2, CCL3, CCL4, CCL5, CCL22 y CXCL8¹¹⁹⁻¹²¹. También citoquinas como el factor de estimulación de colonias 1 (CSF-1) y factores de crecimiento como VEGF y PDGF, están implicadas en dicho reclutamiento¹²²⁻¹²⁵. Se ha observado que en tumores ya

establecidos, los TAM poseen un fenotipo M2, favoreciendo el escape tumoral mediante supresión de la respuesta inmune específica ¹²⁶. Este tipo de macrófagos inmunosupresores se comentarán con mayor detalle en el Apartado: *Mecanismos de evasión de la respuesta inmune antitumoral*.

2.4.3 Células dendríticas

Las DCs son un grupo heterogéneo de células presentadoras de antígenos (APC) derivadas de células madre CD34⁺ de la médula ósea, y se encuentran en todos los tejidos ^{127,128}. Pueden pertenecer al linaje mieloide (DC convencionales), o al linaje linfoide, conocidas como plasmocitoides (pDC) ¹²⁹.

Cuando las DCs abandonan la médula ósea se definen como inmaduras. Estas células no expresan niveles significativos de moléculas co-estimuladoras como CD80, CD86 o CD40 en su superficie y producen cantidades muy reducidas de IL-12, citoquina imprescindible para montar una respuesta mediada por células Th1 y crítica en la inmunidad antitumoral. En el estado inmaduro su función principal es interactuar con el ambiente, incluyendo el tumor, cumpliendo las funciones de fagocitosis, macropinocitosis y endocitosis mediada por receptor ^{61,130,131}. Una de las señales a través de las cuales se produce la activación de las DCs es por el reconocimiento de patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs) y DAMPs, por los receptores de reconocimiento de patrones (PPR) ¹²⁷. Cuando las DCs se activan, migran a los ganglios linfáticos de drenaje, mediado por las quimioquinas CCL19 y CCL21 que se unen a CCR7 expresado en las DCs ^{128,132}. En los ganglios se encuentran con las células T naïve, y provocan la diferenciación de estas células a T efectoras con funciones y perfiles de citoquinas únicos. Los péptidos presentados en moléculas de MHC I son reconocidos por células T CD8⁺, mientras que los presentados en MHC II son reconocidos por células T CD4⁺. La activación de las células T dependerá de la intensidad y duración de la interacción DC-células T a través de la sinapsis inmunológica ¹²⁸. Las DCs residentes de ganglios linfáticos que adquieren el antígeno directamente de la linfa, son las primeras en presentar péptidos a células T CD4⁺ naïve, lo que resulta en la producción de IL-2 que facilita la proliferación de las células T y expansión clonal. Las DCs residentes de tejido capturan antígenos en tejidos periféricos, migran a los ganglios

linfáticos, y presentan los péptidos a las células T CD4⁺ ya activadas, lo que facilita la generación de células T efectoras. Luego de la interacción con las DCs, las células T CD4⁺ naïve se diferencian a efectoras con distintas funciones, Th1, Th2, Th17, Thf (foliculares) ¹²⁷. Estas últimas pueden interactuar con células B y promover la diferenciación a plasmocitos (células B secretoras de anticuerpos). Por su parte, las células T CD8⁺ naïve pueden convertirse a linfocitos T citotóxicos (CTLs). Las DCs también pueden interaccionar con otras células del sistema inmune innato como las células NK, (vía IL-12, IL-15 e IFN tipo I), lo cual a su vez puede también provocar la maduración de las DC, NKT (vía CD1), plasmocitos, y mastocitos ^{133,134}.

Además de provocar una respuesta inmune pro-inflamatoria, las DCs median la tolerancia periférica y previenen respuestas autoinmunes ¹²⁸. Las DCs inmaduras no activan células T debido a la baja expresión de moléculas co-estimuladoras y MHC que presentan. Además las DCs también pueden expresar indoleamina 2,3 dioxigenasa (IDO) en respuesta a ciertos estímulos, provocando el arresto celular y apoptosis de las células T. Mediante la producción de IDO las DCs pueden promover la diferenciación de células Tregs ^{135,136}, las cuales ejercen sus efectos inmunosupresores mediante la expresión de TGF- β , IL-10, y CTLA-4, inhibiendo la proliferación de células T ^{137,138}. Como parte de la inmunovigilancia, las DCs inmaduras adquieren antígenos propios en ausencia de estímulos de maduración, induciendo la tolerancia a antígenos propios ¹²⁸.

Se ha observado que las DCs son una de las primeras células en infiltrar tumores, y la presencia de un número elevado de estas células a nivel tumoral se ha asociado con un buen pronóstico en pacientes con distintos tipos de cáncer ¹³⁹. En otros tumores existe evidencia de la falla en la función de las DCs, hecho que podría contribuir a la falta de respuesta inmune antitumoral efectiva ¹²⁸. Parece ser que el grado de activación de las DCs es uno de los principales factores que determinan si estas células contribuirán o no a una respuesta antitumoral efectiva ^{129,130}. Las células tumorales que mueren encienden al menos tres tipos de señales cuando interactúan con DCs y otros fagocitos, incluyendo las señales de "encuéntrame", "cómeme" y "no me comas", donde en cada una participan distintas moléculas ¹⁴⁰.

2.4.4 Células T citotóxicas

Las CTLs reconocen y eliminan la célula tumoral de forma específica a través del reconocimiento de péptidos derivados de antígenos tumorales presentados en moléculas de MHC I por las DCs. Estas células ejercen la citotoxicidad al menos por tres vías distintas, dos involucran contacto directo célula-células entre la efectora y la blanco. El tercer mecanismo está mediado por citoquinas como IFN- γ y TNF- α , las cuales son producidas y secretadas por el tiempo en que se produzca la estimulación vía el receptor de las células T (TCR) ^{61,141}. La actividad citolítica que requiere el contacto directo célula-célula, puede estar mediado por dos mecanismos diferentes. En un caso, el ligando Fas, que se expresa en la superficie de CTLs, se une al receptor de Fas sobre la célula diana. Esta unión desencadena la apoptosis a través de la vía clásica de la caspasas. En el otro caso, las CTLs liberan perforinas y granzimas en el espacio intercelular, estas proteínas son tóxicas para la célula diana, pero las CTLs tiene un mecanismo para protegerse ellas mismas y a células vecinas ¹⁴². Por su parte, TNF- α acopla su receptor en la célula diana y desencadena la cascada de caspasas, dando lugar a la apoptosis de células diana. IFN- γ induce la activación transcripcional de la vía de presentación del antígeno en MHC I y Fas en las células diana, lo que conduce a una presentación mejorada de péptidos endógenos por MHC I y aumenta la lisis de células diana mediada por Fas ¹⁴³. En tumores sólidos, las CTLs constituyen gran parte del infiltrado de linfocitos T (TIL, del inglés) ^{139,141}. Más aún, en melanoma, cáncer de mama, pulmón, colono rectal y cerebro, se ha observado que cuanto mayor es la cantidad de TIL en el infiltrado, mejor será la prognosis del paciente ¹⁴⁴. En este sentido, la detección de ARNm de granzima B, granulocina, IFN- γ y perforinas se correlaciona con menor enfermedad metastásica y mayor supervivencia en pacientes con carcinoma de colon ¹³⁹. Las células T CD8⁺ suelen clasificarse en subgrupos incluyendo efectoras, de memoria, anérgicas, reguladoras, senescentes, y “agotadas”, siendo las dos primeras las más importantes en el desarrollo de una respuesta antitumoral efectiva ¹⁴⁴.

La activación completa de células T CD8⁺ naïve y su diferenciación a CTLs efectoras y de memoria requieren la participación de las células T CD4⁺ colaboradoras ¹⁴¹. En el contexto de una fuerte respuesta inmune contra un microorganismo, la

ayuda de células T CD4⁺ no es un punto crítico. Sin embargo, esta ayuda sí es necesaria para que las células T CD8⁺ puedan montar respuestas efectivas contra tumores y diferenciarse a CTLs de memoria.

2.4.5 Células T CD4⁺

Existen varias subpoblaciones de células T CD4⁺, las cuales se diferencian en cuanto al perfil de citoquinas que secretan y a las funciones que llevan a cabo^{145,146}. La diferenciación de las células T vírgenes hacia cada subpoblación está determinada por la naturaleza del antígeno presentado, las células presentadoras de antígeno, y las citoquinas presentes en el medio¹⁴⁷⁻¹⁴⁹. Además, el proceso de diferenciación del linaje se rige por un patrón de expresión génica único, donde participan factores transcripcionales específicos¹⁵⁰. Las subpoblaciones más conocidas son Th1, productoras de IFN- γ , IL-2, IL-12 y TNF- β , Th2, productoras de IL-4, IL-5, IL-9, IL-10, IL-13 e IL-15, y Th17, caracterizadas por secretar IL-17 e IL-22¹⁵¹. Cada subgrupo expresa distintos receptores para quimioquinas y moléculas de adhesión, que las dirigen a migrar a diferentes sitios. Las Th1, expresan altos niveles para los receptores CXCR3 y CCR5, los cuales se unen a quimioquinas producidas en tejidos durante la respuesta inmune innata. Estas células también secretan altos niveles de ligandos para E y P-selectina, que participan en la migración de estas células al sitio de inflamación. Las células Th2 expresan los receptores de quimioquinas CCR3, CCR4 y CCR8, que reconocen quimioquinas expresadas en alta cantidad en respuesta a infecciones producidas por helmintos o reacciones alérgicas. Las Th17 por su parte expresan CCR6 que se une a CCL20, producida por varios tejidos y por macrófagos en ciertas infecciones bacterianas o por hongos¹⁴⁶.

Dentro de los estímulos que propician la diferenciación de las células T CD4⁺ naïve al fenotipo Th1 están IFN- γ e IL-12, y el principal regulador transcripcional es T-bet (Fig. 7). La IL-18 es sinérgica con la IL-12, y los IFN tipo I pueden también favorecer las respuestas Th1¹⁵². Las DCs que favorecen este tipo de respuestas son las plasmocitoides, dado que secretan IL-12 e IFN tipo I. Las células NK secretan IFN- γ , que a su vez actúa sobre los macrófagos que secretan IL-12. El IFN- γ es esencial para la activación de macrófagos, aumentando su capacidad fagocítica. La IL-2 secretada por

las células Th1 promueve la proliferación de células T CD8⁺, la adquisición de su fenotipo citolítico y la generación de memoria de las CTLs¹⁵³. Se ha demostrado que las células Th1 participan en la respuestas antitumoral y esa respuesta depende en gran medida de la producción local de INF- γ , la cual induce la infiltración en el tumor de macrófagos y células T CD8⁺¹⁴⁷. La infiltración de células Th1 al tumor se correlaciona con una extensión de supervivencia global y libre de enfermedad en pacientes con distintos tipos de cáncer¹⁵⁴. INF- γ derivado de las células Th1 desencadenan la cascada de eventos que implican la maduración de las células T CD8⁺ citotóxicas a través de la activación de DCs en el sitio del tumor, y además induce la eliminación del tumor a través de la activación de células NK y macrófagos M1¹⁴⁶.

En el caso de las células Th2, la diferenciación a este fenotipo es promovido por las citoquinas IL4 e IL2, siendo GATA3 el principal factor transcripcional involucrado (Fig. 7)¹⁵². Dentro de sus funciones encontramos el generar una respuesta inmune frente a parásitos extracelulares, y colaborar con las células B en la respuesta humoral. Además, estas células tienen una participación en enfermedades relacionadas con alergia y asma. Se cree que las DCs mieloides favorecen la diferenciación hacia la subpoblación Th2¹⁴⁷. El rol de las células Th2 en la respuesta antitumoral es un hecho controvertido. Tradicionalmente ha sido visto como un tipo de respuesta que favorece el crecimiento tumoral a través de la promoción de la angiogénesis, secreción de IL-10, promoción de la inmunidad humoral e inhibición de la respuesta celular antitumoral. Sin embargo, actualmente se postula que las células de tipo Th2 tienen función antitumoral, promoviendo la activación de granulocitos infiltrantes de tumor y macrófagos. IL-4, una de las citoquinas clave en este tipo de respuesta, ha mostrado un rol dual en la inmunidad tumoral, ya sea induciendo una respuesta antitumoral eficaz en modelos pre-clínicos, por ejemplo, se ha demostrado la función anti-angiogénica de IL-4 y la capacidad de inducir necrosis en tumores sólidos¹⁵⁵, o promoviendo el escape tumoral¹⁵⁶.

La diferenciación de la subpoblación Th17 se produce a partir de células T vírgenes por estimulación con el antígeno, en presencia de las citoquinas IL-6, IL-21, IL-23, y TGF- β , siendo esta última la más importante (Fig. 7). El regulador transcripcional principal es el receptor gamma relacionado al receptor huérfano del ácido retinoico (ROR γ t, del inglés)¹⁵². Una vez diferenciadas a Th17, la citoquina que induce la

proliferación y supervivencia de estas células es IL-23. Estas células tienen un efecto pro-inflamatorio que les permite hacer de puente entre la inmunidad innata y la adaptativa ¹⁵⁷. Su función está involucrada con respuestas inflamatorias, más particularmente a las que involucran un alto reclutamiento de neutrófilos, ya que IL-17 induce la producción de citoquinas y quimioquinas que reclutan neutrófilos ¹⁴⁷. Actúa sobre un amplio panel de células, y las estimula a secretar potentes mediadores de la inflamación (IL-1, TNF- α , IL-6, IL-8, etc.) ^{147,148}. Existe evidencia de la participación dual de la IL-17 en la inmunovigilancia tumoral ¹⁵⁸⁻¹⁶¹. En modelos murinos se ha reportado la asociación de las células Th17 al crecimiento tumoral en un contexto de inflamación crónica ¹⁶²⁻¹⁶⁴. También en distintos tipos de cáncer humano, incluyendo colon, melanoma, pancreático, hepato-celular y ovárico, se observó la polarización de las T CD4⁺ naïve a Th17 ¹⁶⁵. Por otro lado, estudios pre-clínicos de tumores murinos han correlacionado la presencia de células Th17 intratumorales con un crecimiento tumoral reducido y una inmunidad antitumoral eficaz. La capacidad antitumoral de las células Th17 se ha asociado a la secreción de citoquinas IL-17A, IL-17F, IL-22, y IL-21 ¹⁶⁶⁻¹⁶⁸. También se ha observado que las células Th17 producen la quimioquina CCL20 que promueve el reclutamiento de las DCs al sitio del tumor a través de CCR6. El reclutamiento de estas DCs resulta en la activación de células T CD8⁺ y aumento de su respuesta citotóxica ¹⁴⁶.

Las células Tregs regulan de forma negativa la respuesta inmune, protegiendo al organismo de inmunopatologías. Las citoquinas que propician la diferenciación a este fenotipo son IL-2 y TGF- β , siendo en este caso FoxP3 el factor transcripcional más involucrado (Fig. 7). Las principales citoquinas efectoras producidas por las Tregs son IL-10, TGF- β , e IL-35 ^{146,152}. IL-10 es una potente citoquina inhibidora que suprime la respuesta pro-inflamatoria limitando el daño tisular. Varios estudios sugieren que la IL-10 puede disminuir la respuesta inmune antitumoral de forma directa, inhibiendo la activación de células T con actividad antitumoral ¹⁶⁹. Además, esta citoquina restringe la presentación antigénica por parte de las APCs, inhibiendo la expresión de moléculas co-estimuladoras de la familia B7 y MHC ^{170,171}, estimulando la sobreexpresión de los inhibidores de los miembros de la familia B7 ¹⁷²⁻¹⁷⁴, promoviendo la regulación negativa de la expresión de IL-12, e inhibiendo la maduración y diferenciación de las DCs. Aunque esta citoquina generalmente se considera promotora del escape tumoral,

existe evidencia creciente de que también puede promover una inmunidad antitumoral. Por ejemplo, la transfección de una línea tumoral con IL-10 o la administración sistémica de esta citoquina, suprime el crecimiento tumoral y provoca el rechazo tumoral en varios modelos murinos de cáncer ¹⁴⁶. Más aún, este efecto tumoral se observó que es dependiente de células T CD8⁺. Las células Tregs pueden clasificarse en dos grandes subgrupos dependiendo de la actividad inmunosupresora que lleven a cabo. Las Tregs “naturales” (nTregs) expresan de forma constitutiva FoxP3 y el marcador de activación CD25, y se originan en el timo por la interacción de alta afinidad entre el TCR y el antígeno expresado en el estroma adyacente ¹⁴⁶. La supresión de la proliferación de células T efectoras por estas células es dependiente del contacto célula-célula pero independiente de citoquinas. Por otro lado, las células Tregs “inducidas” (iTregs) se desarrollan en órganos linfoides periféricos, y llevan a cabo la inmunosupresión a través de factores solubles, y su función no está estrictamente asociada a los niveles de FoxP3 que expresan ¹⁴⁶.

Durante la respuesta antitumoral, una pequeña población de células T CD4⁺ efectoras específicas de tumores puede diferenciarse a células T de memoria que retienen sus funciones efectoras, pero con la ventaja que al exponerse nuevamente al antígeno experimentan una rápida expansión y producción de citoquinas efectoras ¹⁷⁵⁻¹⁷⁸. Las células T de memoria se dividen en dos grupos dependiendo de los patrones de migración que presenten. Por un lado, las células T de memoria central expresan el receptor de quimioquinas CCR7 y la L-selectina CD62L luego de su activación. La expresión de este receptor le permite a estas células recircular por órganos linfoides secundarios como son los ganglios linfáticos. Este tipo de circulación es beneficioso ya que las DCs están continuamente captando antígenos en tejidos y los llevan a los ganglios drenantes, de modo que aumenta el área de monitoreo para prevenir la progresión tumoral y desarrollo de metástasis. El otro tipo de células T de memoria son las efectoras que no expresan CCR7 ni CD62L, y por lo tanto tiene tendencia a migrar a tejidos periféricos en respuesta a un estímulo inflamatorio. En pacientes con cáncer se ha observado que un aumento en el número de células T de memoria infiltrantes de tumor provoca un aumento en la supervivencia ¹⁴⁶.

Otras subpoblaciones que han sido caracterizadas en años recientes son las Th9, Th22, TFh (foliculares) (revisado en ¹⁴⁶).

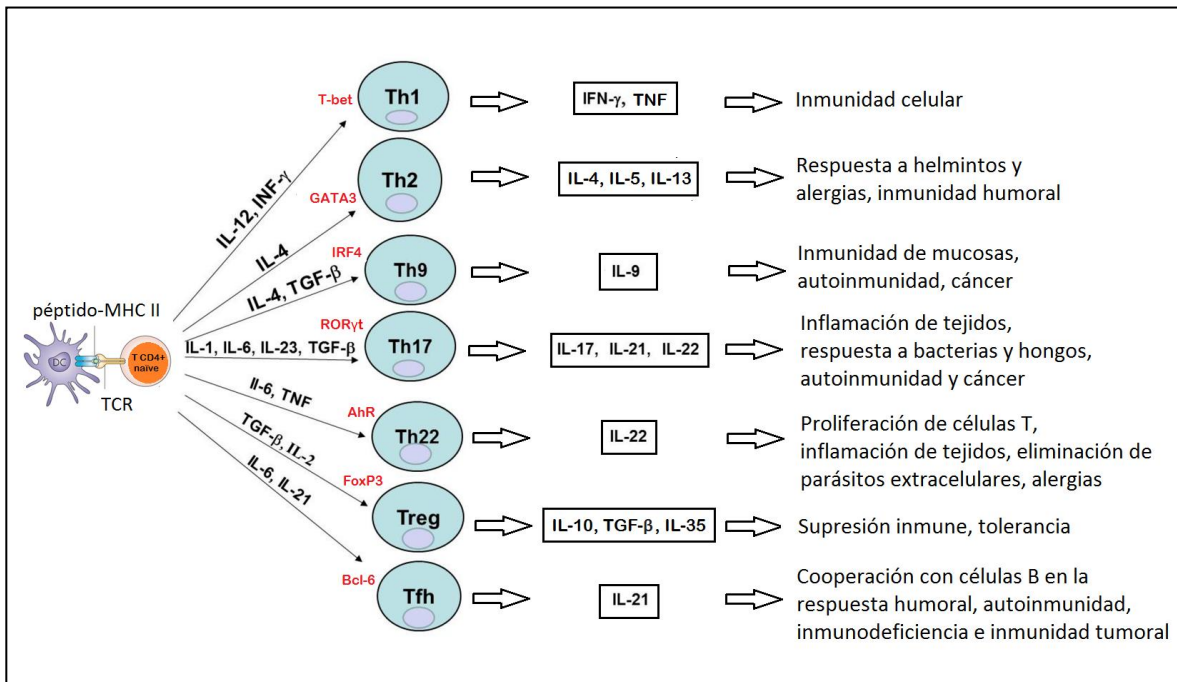


Figura 7. Diferenciación de subpoblaciones T CD4⁺. Luego de la interacción entre la APC y la célula T CD4⁺ naíve en la presentación antigénica, se produce la diferenciación de la célula naíve a distintas subpoblaciones T CD4⁺. Esta diferenciación es dependiente, entre otras cosas, de las citoquinas presentes en el medio, y cada población secretan un perfil característico de citoquinas. Imagen modificada de ¹⁷⁸.

2.4.6 Células B

Las células B maduras, desarrolladas a partir de precursores de la médula ósea, entran a los órganos linfoides donde tiene lugar la presentación antigénica. La respuesta humoral se inicia cuando los antígenos se unen a las inmunoglobulinas presentes en la membrana de la célula B ¹⁷⁹, activando estas células, lo que conduce a la proliferación y supervivencia, aumento de la expresión de moléculas coestimuladoras y citoquinas que promueven la interacción con células T CD4⁺ colaboradoras, y aumento de la expresión de CCR7 que le permite la migración desde los folículos a la zona extrafolicular donde se encuentran con las células T. En esta zona, la re-estimulación de las células B (como APC) con las células T provoca el cambio de isotipo de inmunoglobulina, y a su vez las células B promueven la diferenciación de células T al fenotipo de células TFh, esta interacción también promueve la diferenciación a células plasmáticas de corta vida (Fig. 8). Posteriormente en los centros germinales se produce la mutación somática y la maduración de la afinidad, con cambio adicional de isotipo de inmunoglobulina, generación de memoria y diferenciación a células plasmáticas de larga vida ¹⁷⁹. Las células B de memoria

expresan altos niveles de BCL-2, proteína antiapoptótica que contribuye a la larga vida de estas células. Algunas de estas células permanecen en los órganos linfoides, mientras que otras salen de los centros germinales y recirculan en sangre y órganos linfoides.

En los últimos años se ha acumulado evidencia del rol dual que tienen las células B en la respuesta antitumoral ¹⁸⁰⁻¹⁸². En muchos tumores humanos, la presencia de células B infiltrantes de tumor y anticuerpos reactivos de tumor se correlaciona con una mejoría en la supervivencia de los pacientes, lo cual también se demostró en modelos animales ¹⁸³. Por su parte, el efecto de los anticuerpos en la respuesta antitumoral, tanto en el humano como en ratón, depende del isotipo. En pacientes con cáncer de páncreas, el incremento de IgE en suero se asoció con ADCC. En pacientes con glioma, un aumento en los niveles séricos de IgE se asoció con una supervivencia extendida ¹⁸³. También se ha observado que los niveles de IgG varían significativamente en pacientes con cáncer respecto a controles sanos, observándose que niveles más altos de IgG se asocian a una supervivencia extendida ¹⁸². Incluso se ha sugerido que el nivel de IgG en plasma podría servir como marcador pronóstico en cáncer de vejiga y páncreas. El efecto negativo en la respuesta inmune de las células B se mencionará junto con la evasión de la respuesta inmune por parte del tumor.

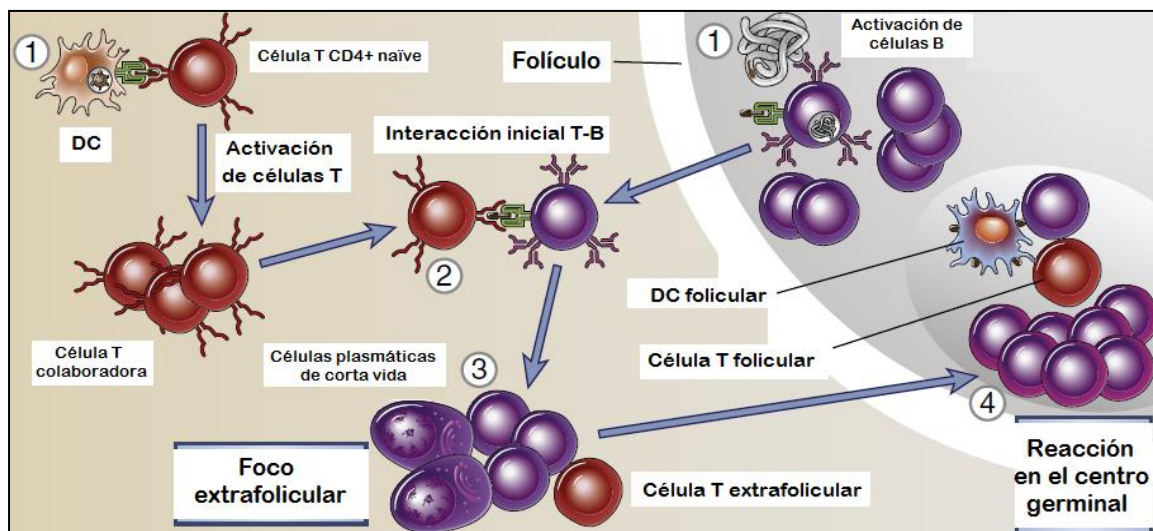


Figura 8. Secuencia de eventos de la respuesta humoral T-dependiente. (1) Inicio de la respuesta inmune por el reconocimiento de antígenos por las células B y T CD4⁺. (2) Las células activadas migran a la zona extrafolicular donde interactúan, promoviendo la proliferación y diferenciación de las células B. (3) La reestimulación de las células B por células T colaboradoras extrafoliculares produce el cambio de isotipo y la generación de células plasmáticas de vida corta, y la inducción de células TFh. (4) Los eventos tardíos producidos en el centro germinal incluyen mutación somática y maduración de la afinidad, cambio adicional del isotipo de inmunoglobulina, generación de células B de memoria y de plasmocitos de larga vida. Imagen modificada de ¹⁷⁹.

2.4.7 Otras células que participan en la respuesta inmune antitumoral

Otras células con participación en la respuesta inmune antitumoral son las NKT y $\gamma\delta$. Las primeras fueron inicialmente caracterizadas en ratones como células que expresaban tanto TCR como receptores de células NK¹⁸⁴. Reconocen antígenos de naturaleza glicolipídica, cuya presentación está restringida a la molécula CD1d. Las células NKT pueden clasificarse en dos grandes grupos, las NKT invariantes (iNKT), y las NKT tipo II, que poseen una cadena de TCR con mayor variación y reconocen antígenos diferentes a los reconocidos por las iNKT, y tiene principalmente función inmunorreguladora¹⁸⁵⁻¹⁸⁷. La importancia de las células iNKT radica en su potente acción inmunorreguladora debida a la liberación rápida y masiva de citoquinas tipo Th1 y Th2, especialmente IFN- γ e IL-4, luego de la activación de su TCR invariante. Se ha demostrado que la activación de las células iNKT conduce a la estimulación de las células NK, monocitos, DC, células B y células T CD4⁺ y T CD8⁺, estableciendo un puente entre el desarrollo de las respuestas inmunes innata y adaptativa^{188,189}. El efecto citotóxico tumoral de estas células se postula que es mediado por sus productos: TNF, ligando de Fas, TRAIL y por el sistema perforinas/granzimas. Adicionalmente, el IFN- γ secretado, además de amplificar la respuesta inmune, participa inhibiendo la angiogénesis¹⁹⁰.

El rol de las iNKT en la inmunidad antitumoral se ha demostrado en diferentes modelos¹⁹¹. En pacientes con cáncer se ha reportado la deficiencia de NKT en sangre periférica, tanto en números como en función^{192,193}. Contrariamente al efecto antitumoral observado en varios modelos, existen publicaciones en modelos murinos que plantean que las NKT pueden favorecer el crecimiento tumoral^{194,195}. Por lo tanto, estos datos sugieren que las células NKT tienen la capacidad de regular la respuesta inmune en ambas direcciones, activando o suprimiendo la respuesta inmune antitumoral. La modulación de su actividad hacia la activación inmunológica podría ser una herramienta útil para mejorar las vacunas en cáncer^{187,196-200}.

Por su parte, las células $\gamma\delta$ son células relativamente abundantes en los epitelios, pero en sangre periférica, bazo y ganglios son una población menor (inferior a 2% de las células CD3⁺). Estas células reconocen distintos tipos de antígenos, incluyendo proteínas y lípidos, así como pequeñas moléculas fosforiladas y

alquilaminas, muchas veces encontradas en microorganismos. Dicho reconocimiento no está restringido por el MHC ⁷⁷. Las células T $\gamma\delta$ activadas pueden expresar gránulos citotóxicos que contienen perforina y granzimas que desencadenan la citólisis. También pueden producir citoquinas efectoras, como IFN- γ y TNF- α , y expresar FasL y TRAIL ²⁰¹. Además, la expresión de CD16 en células T $\gamma\delta$ puede facilitar la ADCC ²⁰². Por lo tanto, las células T $\gamma\delta$ pueden utilizar varios mecanismos efectores para eliminar células tumorales directamente ²⁰³.

Se ha observado que la estimulación de las células T $\gamma\delta$ *in vivo* puede inducir respuesta inmune en síndromes linfoproliferativos ²⁰⁴. Contrariamente al efecto antitumoral descrito, recientemente se reportó que las células T $\gamma\delta$ poseen algunas funciones pro-tumorales, tanto en ratones como en humanos. En particular, este subgrupo de células T $\gamma\delta$ inmunosupresor es capaz de reclutar poblaciones mieloides inmunosupresoras, inhibiendo la respuesta inmune antitumoral, y promover la angiogénesis, fomentando la progresión tumoral ²⁰⁵.

2.5 Mecanismos de evasión de la respuesta inmune antitumoral

Los tumores desarrollan múltiples mecanismos para evadir el reconocimiento por parte del sistema inmune. Dentro de éstos encontramos alteraciones en la presentación antigénica, defectos en señales intracelulares de células T, incremento de la secreción de factores inmunosupresores y/o pro-apoptóticos, activación de vías de señalización inhibitorias en células del sistema inmune, reclutamiento selectivo de poblaciones celulares inmunosupresoras e inducción de sitios privilegiados para el desarrollo tumoral (Fig. 9) ^{77,206}. En conjunto, estos mecanismos limitan la capacidad del sistema inmune de combatir al tumor y provoca muchas veces el fracaso de las inmunoterapias.

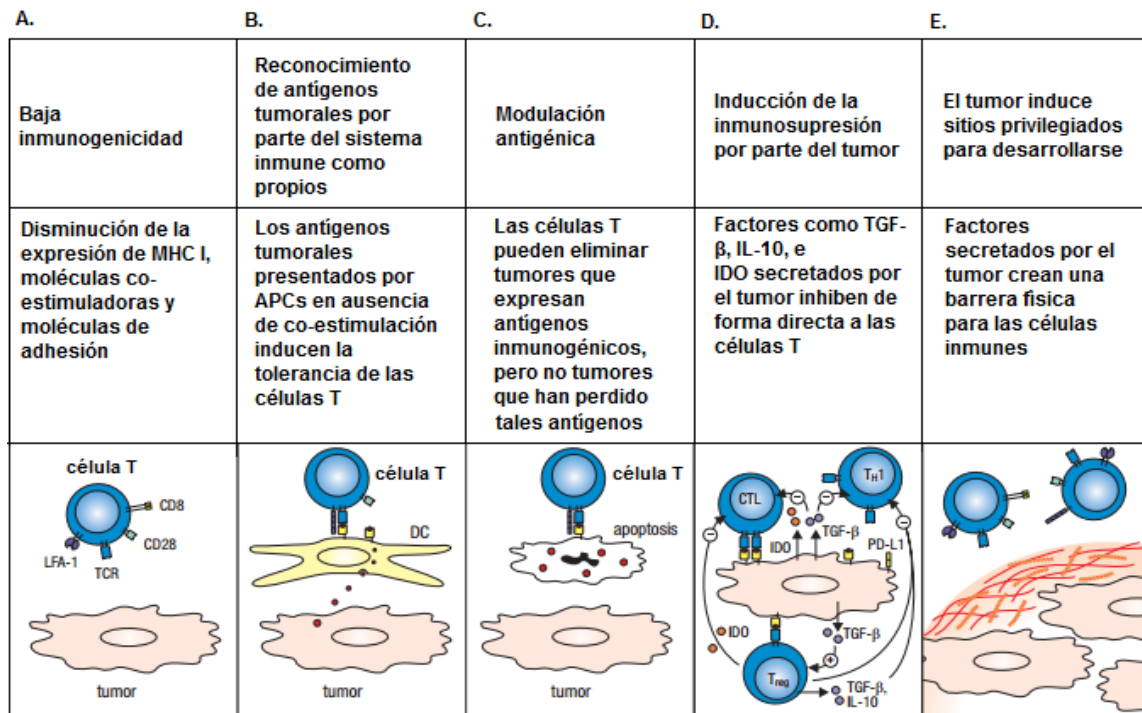


Figura 9. Mecanismos de evasión del reconocimiento de células tumorales por parte del sistema inmune. A. Los tumores pueden tener baja inmunogenicidad por falta de antígenos reconocidos por las células T, disminución de la expresión de moléculas de MHC I, o aumento de la expresión de moléculas inhibitoras tales como PD-L1. B. Antígenos específicos del tumor pueden ser presentados en forma cruzada por DCs sin co-estimulación, induciendo la tolerancia de las células T. C. Los tumores pueden inicialmente expresar antígenos reconocidos por el sistema inmune, de forma que se eliminan estas células. La inestabilidad genética de los tumores permite el cambio antigénico (en la etapa de equilibrio), de modo que las células tumorales que carecen de antígenos inmunogénicos pueden proliferar. D. En el microambiente tumoral a menudo se producen moléculas, tales como TGF- β , IL-10, IDO, o PD-L1, que suprimen las respuestas inmunes reclutando células Tregs que secretan citoquinas inmunosupresoras. E. Las células tumorales pueden secretar moléculas como el colágeno que forman una barrera física alrededor del tumor, impidiendo el acceso de células del sistema inmune. Imagen modificada de ⁷⁷.

Una forma de agrupar los mecanismos que regulan de forma negativa la respuesta antitumoral por parte del tumor es en factores intrínsecos y extrínsecos (Fig. 10). Los primeros incluyen la secreción de citoquinas inmunosupresoras (IL-10, TGF- β) y factores solubles (VEGF, IDO), alteración de la inmunogenicidad de las células tumorales ya sea por pérdida o cambio en la expresión de antígenos específicos de tumor o cambio en la expresión de moléculas de superficie (MHC I, moléculas co-estimuladoras, PD-L1, Fas-L) ²⁰⁷. Por su parte, los mecanismos extrínsecos incluyen el reclutamiento de células T inmunosupresoras (Tregs y Tr1) y poblaciones como células mieloides supresoras (MDSC), TAMs y TANs, APCs inmaduras y pDCs, entre otras ²⁰⁷. En Upadhyay et al., 2015 y Nicholas et al., 2016 se revisan los principales mecanismos involucrados en la evasión de la respuesta inmune en linfomas ^{208,209}.

El conocimiento de los mecanismos por los cuales las células tumorales escapan de la destrucción por parte del sistema inmune es fundamental para el desarrollo de inmunoterapias efectivas, de modo de aumentar la inmunogenicidad tumoral y las respuestas inmunitarias en el huésped^{206,210}.

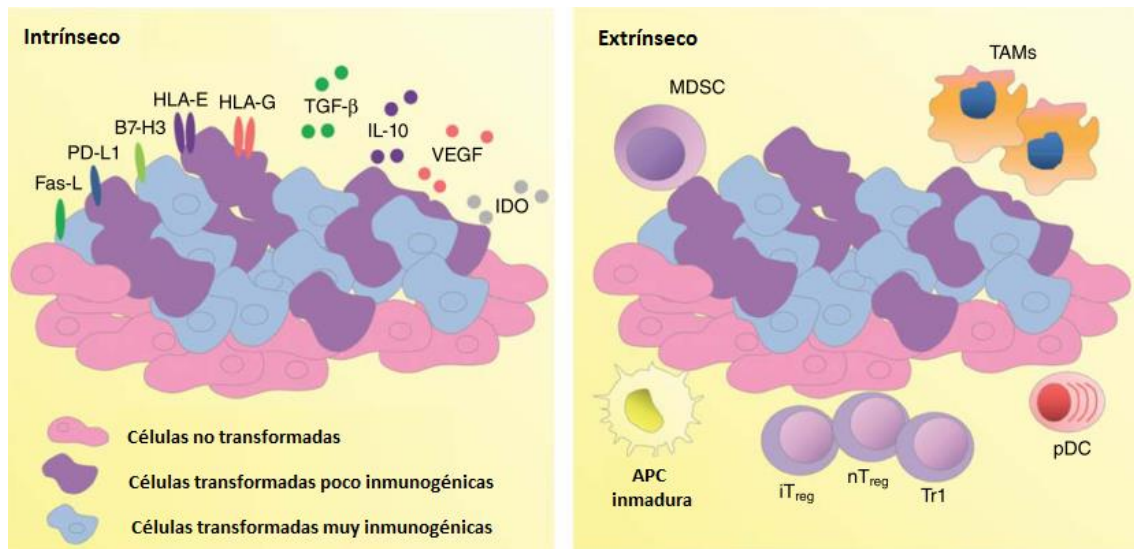


Figura 10. Regulación negativa de la respuesta inmune antitumoral. En la figura se muestran factores tumorales intrínsecos (izquierda) y extrínsecos (derecha) que promueven la evasión del tumor. Imagen modificada de²⁰⁷.

2.5.1 Alteraciones en el reconocimiento de las células tumorales

La mayoría de los tumores muestran disminución o pérdida de la expresión de moléculas de MHC I, de $\beta 2$ microglobulina o de componentes de la maquinaria del procesamiento del antígeno, ausencia o disminución de la expresión de moléculas co-estimuladoras (por ej.: CD80 y CD86), y algunas subunidades del proteosoma, lo que les permite escapar de la lisis mediada por las células T $CD8^+$ citotóxicas^{72,210}. Otros mecanismos que contribuyen a la tolerancia y por ende a la evasión de la respuesta inmune son la expresión de moléculas inhibitoras como PD-L1 en las células tumorales, y la regulación negativa de los receptores de muerte que previenen la apoptosis de las células tumorales tanto por las CTLs como por las células NK²¹¹⁻²¹⁴.

Los LNH-B presentan un comportamiento diferente que el resto de los tumores ya que son células B que muchas veces conservan la expresión de MHC II y moléculas co-estimuladoras, siendo capaces de desencadenar respuestas celulares T $CD4^+$. Se ha

visto que los LNH folicular, anaplásico y LDGCB expresan CD80/CD86 y estas células *in vitro* pueden funcionar como APC ^{215,216}. En los LNH es frecuente observar que la expresión de moléculas co-estimuladoras disminuye, lo que conduce a la anergia de las células T, siendo uno de los mecanismos principales de evasión de la respuesta inmune antitumoral descrito en los LNH-B. Además, se ha observado que la pérdida de expresión de estas moléculas se asocia con una disminución de linfocitos infiltrantes de tumor ²¹⁷. En particular, para el modelo murino de LNH de células A20 se observó que las células tumorales A20 expresan altos niveles de moléculas de MHC I y II y niveles moderados-bajos de la moléculas co-estimuladoras CD86/CD80 ²¹⁸. En concordancia con esta observación, la inmunización de ratones con células A20 irradiadas no produce respuesta inmune antitumoral como puede observarse en otros modelos de tumores trasplantables ²¹⁸⁻²²⁰.

Otra forma de evadir el reconocimiento por parte del sistema inmune es lo que se conoce como enmascaramiento antigénico, por ejemplo por mucopolisacáridos que contienen ácido siálico ⁶¹.

2.5.2 Inducción de la inmunosupresión del microambiente tumoral

2.5.2.1 Citoquinas y factores solubles

Una de las principales citoquinas encontradas en microambientes tumorales inmunosupresores es TGF- β , que inhibe la respuesta celular necesaria para el control del crecimiento tumoral e induce el desarrollo de células Tregs. TGF- β promueve la sobreexpresión de IL-10 y a su vez IL-10 promueve la expresión de TGF- β ^{208,221}. IL-10 inhibe la presentación de antígenos, la expresión de MHC II y de moléculas co-estimuladoras. Previene la producción de citoquinas asociadas a la respuesta Th1 (IL-2, IFN- γ) a partir de las APCs y suprime la acción de citoquinas pro-inflamatorias como IL-1, IL-6, IL-12 y TNF- α . La fuente de IL-10 son células Th2, Tregs, Th17, algunas subpoblaciones de DCs, células B, granulocitos, eosinófilos, entre otras ²²¹. Otras citoquinas que contribuyen al desarrollo tumoral son IL-4, IL-6, IL-13, e IFN tipo I ^{221,222}.

Se observó un incremento de IL-6 a nivel sérico para varios tipos de cáncer, incluyendo LNH, donde podría servir como factor pronóstico y para determinar el estadio ²²³.

Por su parte VEGF, producido por el tumor, inhibe la diferenciación de progenitores de DCs, afectando la presentación antigénica²⁰⁸. Además, VEGF, IL-10 y TGF- β inhiben la maduración de las APCs, causando la anergia de las células T ya que no presentan el antígeno en el contexto adecuado (con co-estimulación apropiada). Otros factores como los gangliósidos tumorales y el antígeno de superficie asociado al receptor (RCAS1) también contribuyen a la progresión tumoral²¹⁰. La expresión de RCAS1 también se asocia con la apoptosis de TILs. Además, la presencia de la enzima arginasa y el inhibidor del factor nuclear kappa-B quinasa (IKK2) contribuyen significativamente a la progresión tumoral, ya sea por acción directa sobre la proliferación de las células tumorales o mediante la inducción de la tolerancia de las células T o su supresión²²⁴⁻²²⁷. Particularmente, en linfomas se ha encontrado un aumento en los niveles deIDO, galectinas, y prostaglandinas extracelular^{208,228}.

Las galectinas son una familia de proteínas de unión a carbohidratos con afinidad por β -galactósidos implicados en distintos procesos incluyendo adhesión célula-célula, interacciones célula-matriz, homeostasis del sistema inmune y crecimiento celular²²⁹. Se ha descrito que galectina-1 está sobreexpresada en diferentes tumores, contribuyendo a la evasión de la respuesta inmune, promoviendo la apoptosis de células T, angiogénesis y transformación²³⁰⁻²³³. En particular, se describió el papel de las galectinas en las neoplasias hematológicas, observándose una asociación entre el aumento de la expresión de galectin-1 con la progresión tumoral en LH y la leucemia linfocítica crónica, mientras que la galectina-3 desempeña un papel secundario en la leucemia mielógena crónica y el mieloma múltiple, y se sobreexpresa en LDGCB, siendo uno de los mejores genes para discriminar entre LF indolente y LDGCB²³⁴. Más aún, en un modelo pre-clínico se observó que galectina-1 participa en la resistencia de la inmunoterapia con CD20²³⁵.

El receptor de quimioquina CXCR4 está sobreexpresado en la mayoría de los tumores, mientras que su ligando se expresa en varios órganos, incluyendo pulmón, bazo, cerebro, riñón, piel y médula ósea, participando probablemente en mecanismos fisiológicos de reparación. Se ha observado que varios tumores positivos para CXCR4 metastatizan en órganos específicos en una manera dependiente de CXCL12. El eje CXCR4/CXCL12 parece estar involucrado en el desarrollo tumoral y metástasis^{221,236}.

Estudios en un modelo experimental sugieren que la sobreexpresión de CXCR4 sería inducida por TGF- β .

2.5.2.2 Células inmunosupresoras

Dentro de las principales poblaciones celulares que contribuyen a la inmunosupresión del microambiente tumoral, en particular en linfomas, encontramos MDSC, TAMs, TANs, células Tregs y Th17 (Fig. 11) ^{208,237-242}. Las MDSCs son células mieloides inmaduras, que se definen como células con un fenotipo Gr1⁺ CD11b⁺ ²⁴³, que se acumulan en el bazo y en ganglios linfáticos de animales portadores de tumor ^{244,245}. Estas células expresan niveles normales de MHC I, pero significativamente reducidos de MHC II y de moléculas co-estimuladoras. La actividad funcional de las MDSC se manifiesta a través de su capacidad de inhibir la producción de IFN- γ producida por linfocitos T CD8⁺ en respuesta a antígenos tumorales presentados en la superficie de las MDSC ²⁴⁴. Las MDSC inhiben la respuesta inmune antitumoral por varios mecanismos, incluyendo la alteración de la función de células T, NK y DCs, la inducción de la diferenciación de células Tregs, producción de citoquinas inmunosupresoras como TGF- β , y el agotamiento o secuestro de los aminoácidos arginina, triptófano o cisteína, necesarios para la función de las células T, y la nitración del TCR o receptores de quimioquinas en células T específicas de tumor (Fig. 11) ²⁰⁶. Las MDSCs pueden secretar IL-6, IL-23, y TGF- β provocando el reclutamiento de células Th17, las cuales producen IL-17 que provoca el reclutamiento de más MDSCs y secreción del factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF, del inglés) por los fibroblastos, que a su vez promueven la función inmunosupresora de los MDSC en el nicho pre-metastásico ²⁰⁶. Además, los linfocitos Th17 y Th2 programan los TAMs para promover un nicho pre-metastásico a través de la secreción de varias citoquinas incluyendo IL-6 e IL-17. En estadios avanzados de cáncer se observó la acumulación de estas células en sangre periférica, mientras que la remoción quirúrgica del tumor reduce marcadamente el número de las mismas ²⁴⁶. Se ha visto que estas células tienen gran participación en suprimir la respuesta antitumoral en neoplasias hematológicas ²⁰⁹.

Los TAMs tienen un rol dual en la inmunidad tumoral, los tipo M2 ejercen su actividad inmunosupresora a través de la expresión de factores solubles como TGF- β ,

IL-10, VEGF, EGF, quimioquinas tales como CCL17, CCL22 y CCL24, implicadas en el reclutamiento de células Tregs, Th2, eosinófilos y basófilos, moléculas tales como iNOS, arginasa-1, e IDO, y moléculas proteolíticas, como son la plasmina, catepsina B y metaloproteinasas (MMP, del inglés)^{112,113,247,248}. Los TAMs también pueden suprimir la actividad citotóxica de los T CD8⁺, ya sea a través de la expresión de ligandos inhibidores como PD-L1, o a través del reclutamiento de Tregs mediado por CCL22²⁴⁹. Los macrófagos se polarizan a M2 por la presencia de citoquinas como IL-1, IL-4, IL-6, IL-10, CSF, y TNF- α que activan la vía de señalización de STAT (Fig. 11)²⁰⁶. En particular para LF, la infiltración de TAMs se ha reportado como un factor de mal pronóstico^{208,250,251}.

Otras células inmunosupresoras que también están implicadas en el escape tumoral son neutrófilos tipo N2²⁴⁸. Los neutrófilos pro-tumorales afectan tanto la matriz extracelular como el microambiente de las células neoplásicas⁹⁸. Otros factores secretados por los neutrófilos que promueven el desarrollo tumoral son CXCL1 (a través del eje CXCR2), CXCL8 y CCL3²⁵². La supresión más importante se produce a nivel de los linfocitos T CD8⁺, por la secreción de arginasa-1 que está almacenada y degradación de la arginasa extracelular (Fig. 11)²⁴¹. Además, en se ha descrito, tanto en modelos experimentales como en humanos, que las trampas extracelulares de ADN liberado por neutrófilos (NETs, del inglés) se asocian con un peor pronóstico²⁵³. Los neutrófilos también se han visto implicados en el proceso de angiogénesis y neovascularización, mediado en parte por la secreción de quimioquinas y MMPs^{254,255}. Además, los TANs pro-tumorales secretan la enzima colagenasa-IV y heparanasa, implicados en la extravasación de las células tumorales durante el proceso de metástasis²⁵².

Aunque previamente mencionamos algunas características de las células Tregs, dado que son una de las principales poblaciones celulares inmunosupresoras, no podemos dejar de nombrarlas en este Subapartado. Expresan IL-10 y TGF- β , e inhiben la presentación de antígenos asociados a tumor, ya sea en la interacción física entre las DCs y la células T, o por privación de co-estimulación^{207,256}. Las células Tregs también pueden promover el aumento de la expresión de IDO por parte de las DCs que median la supresión de células T por agotamiento del triptófano y la apoptosis a través de catabolitos del triptófano. Las perforinas y granzima B, producida por las células Tregs,

inducen la apoptosis y citólisis tanto de células T como DCs. La privación de IL-2 (vía el receptor de alta afinidad de IL-2) y de ATP (vía CD39 y CD73) provoca la inhibición de la activación de las células T y su apoptosis. En muchos tipos de cáncer, incluyendo carcinoma gástrico, pancreático, de mama, cáncer colono rectal y de pulmón, la presencia de Tregs en el infiltrado celular se asocia a un peor pronóstico ¹⁶⁹.

También se ha descrito que las células dendríticas reguladoras (DCregs) y B reguladoras (Bregs) tienen un efecto inmunosupresor en el microambiente tumoral ²⁰⁶. Las células dendríticas pueden sufrir un cambio a un estado regulador (Fig. 11) ²⁵⁷. Dentro de los factores derivados de células tumorales que inducen una disminución en la expresión de moléculas co-estimuladoras (CD40, CD80, CD86) y una disminución de TNF- α , IFN- α , IL-12 y CCL5, se incluyen IL-10, TGF- β , VEGF, and PGE2 ¹³⁰. Se ha observado que en tumores establecidos, las DCs son ineficientes para diferenciarse y activarse y no estimulan el sistema inmune de forma correcta. Estudios recientes sugieren que la hipoxia, la acumulación de adenosina, niveles elevados de lactato y una disminución en el pH perjudican la función normal de las DCs ¹²⁹. Este cambio en las DCs en última instancia conduce a la anergia de las células T y diferenciación de las células Tregs ^{140,258}. La expresión de moléculas inhibitorias como PD-L1, contribuye a alteración de la funcionalidad de las DCs tanto en tumores como en ganglios linfáticos drenantes. Recientemente se ha sugerido que la presencia de DCs en el microambiente tumoral se correlaciona con una pobre presentación cruzada de antígenos ²⁵⁹⁻²⁶¹. Más aún, se ha descrito que el tumor puede propiciar la conversión de las DCs infiltrantes de tumor en reguladoras con función inmunosupresora ¹²⁹. En Conejo-García et al., 2016, se revisa la utilización de DCregs como blanco de acción terapéutico ²⁶⁰. En el microambiente tumoral, las pDCs tienden a ser tolerogénicas, favoreciendo la progresión tumoral. En este sentido, se ha observado que el reclutamiento de estas DCs se asocia con un peor pronóstico en cáncer de ovario, cabeza y cuello, mama y melanoma ^{262,263}.

Las Bregs se han observado como células inmunosupresoras de la respuesta antitumoral ^{182,264}. Uno de los mecanismos más implicados es la producción de IL-10 por parte de las Bregs, que inhibe el efecto antitumoral de células T efectoras ^{180,265}. También la expresión de Fas-L y PD-L1 tiene un efecto negativo en la respuesta antitumoral montada por las células T. Además, las células Bregs secretan TGF- β que

afecta de forma directa el epitelio de transición en los tejidos tumorales, o en cooperación con las vías de señalización de Ras o Wnt¹⁸⁰. TGF-β junto conIDO, también producido por las Bregs, induce la anergia de las células T CD4⁺. Además, las Bregs son una fuente de TNF-α que limita actividad de las células T CD8⁺, y promueven la expresión de Foxp3 y CTLA-4 en células Tregs a través del contacto célula-célula, fomentando la supervivencia de estas células inmunosupresoras²⁶⁴.

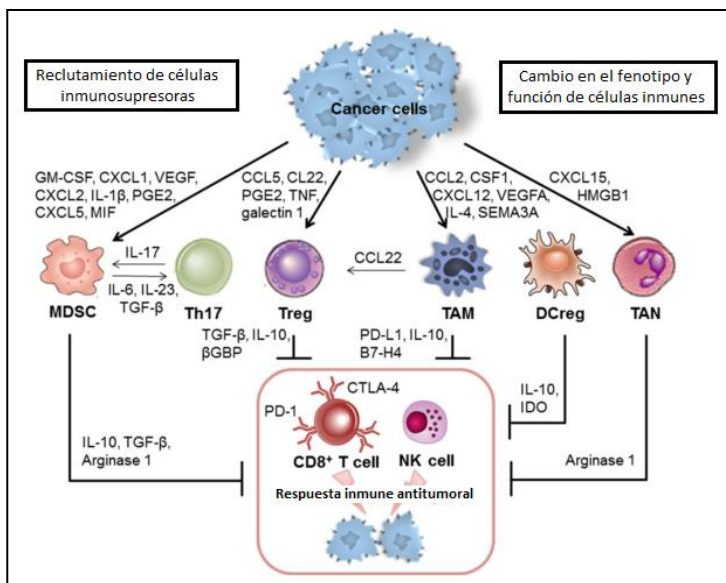


Fig. 11. Células inmunosupresoras que participan en el escape tumoral. Las células tumorales secretan quimioquinas y citoquinas que reclutan MDSC, Treg, TAMs, células T Th17, DCreg, TAN y Breg, y en muchos casos cambian el fenotipo y la función de las células inmunes normales del estado potencialmente antitumoral a potencialmente pro-tumoral. Estas células suprimen directamente las funciones citotóxicas de las células NK y T CD8⁺ citotóxicas, principalmente a través de la expresión de PD-L1, B7-H4, inhibiendo la respuesta inmune antitumoral y por lo tanto promueven el escape del tumor. Imagen modificada de²⁰⁶.

2.5.3 Evasión de la lisis de células tumorales

Las células tumorales pueden presentar mutaciones en los genes que codifican para las caspasas o proteínas implicadas en la vía de las caspasas. Asimismo, en algunos tumores se ha observado una sobreexpresión de FLIP (proteína inhibidora de caspasa 8)^{72,266}. Adicionalmente, se ha observado que las células tumorales pueden expresar receptores falsos para TRAIL y de ésta forma evadir la apoptosis. La sobreexpresión del inhibidor serin-proteasa PI9, es otro mecanismo puesto en marcha por las células tumorales, que bloquea eficientemente la acción del sistema perforina/granzima utilizado por las células NK y CTL para lisar a las células tumorales⁷². Otros factores que afectan la lisis mediada por las CTL son la desorganización en el

citoesqueleto, donde está implicada la vía de señalización de FAK, y la hipoxia, donde se ven involucradas la inducción de HIF-1 α y activación de STAT3 ²⁶⁶.

3 INMUNOTERAPIAS

En los últimos años, el creciente entendimiento de los mecanismos que gobiernan la inmunidad tumoral ha marcado el comienzo de una nueva era para el tratamiento del cáncer. El principal interés en tratar a los pacientes con terapias enfocadas en la inmunología, es que la mayoría de los fármacos convencionales actúan a nivel de la división celular, teniendo efectos dañinos también en células sanas, aumentando la morbilidad y mortalidad en los pacientes. El objetivo de la inmunoterapia es establecer, reparar o aumentar la respuesta inmune frente a una enfermedad, en este caso las enfermedades oncológicas. De esta forma, se pretende conseguir una destrucción selectiva de las células tumorales, eliminando así los efectos secundarios de los tratamientos estándar, y además desarrollar respuestas más duraderas.

3.1 Tipos de inmunoterapias

Las inmunoterapias clásicamente se clasifican en inmunoterapia pasiva y activa, y dentro de cada una tenemos las que son específicas, si se dirige contra antígenos tumorales, y las inespecíficas si pretende la activación del sistema inmune de forma global ²⁶⁷. La pasiva incluye la transferencia de anticuerpos específicos de tumor, y células pre-activadas dirigidos contra el tumor (transferencia adoptiva). La inmunoterapia activa, cuyo objetivo es inducir una respuesta inmune *in vivo*, incluye vacunas de distintos tipos, administración de anticuerpos que interfieren con puntos de control, utilización de bacterias, y administración de citoquinas (Tabla 3) ²⁶⁷. Por razones de importancia en esta tesis nos centraremos en las inmunoterapias activas, haciendo una breve mención de los otros tipos de inmunoterapias. En Bachireddy et al., 2015 se muestra de forma cronológica los principales avances en inmunoterapias para el tratamiento de neoplasias hematológicas, indicando las que tienen acción directa

sobre antígenos de la superficie de las células tumorales (anticuerpos anti-CD20 y anti-idiotipo), las que promueven inmunidad específica contra antígenos tumorales (vacunas anti-idiotipo), las que incrementan funciones efectoras inmunes (terapia adoptiva de células NK, CAR-T), y las que inhiben la supresión inmune (inhibidores de los puntos de control como anticuerpos anti-CTLA-4, anti-PD-1/PD-L1) ²⁶⁸.

Tabla 3. Tipos de Inmunoterapia

Tipos de inmunoterapia		Ejemplos
Pasiva	Inespecífica	-Terapias adoptivas: células LAK, NK
	Específica	-Anticuerpos monoclonales -Terapia adoptiva: células TIL
Activa	Inespecífica	-Anticuerpos inhibidores de los puntos de control -Bacterias -Citoquinas
	Específica	-Vacunas

3.2 Inmunoterapia pasiva inespecífica

3.2.1 Inmunoterapia celular adoptiva: células NK

La transferencia adoptiva de células (ACT, del inglés) es un tipo de inmunoterapia que consiste en extraer células con actividad antitumoral de la sangre del paciente o de tumores sólidos, expandirlas en número y potenciar su actividad antitumoral, y posteriormente reinfundirlas al paciente ⁶¹. Los tipos celulares efectoras más evaluados en ACT son los linfocitos T y las células NK, otros son NKT, iNKT y células asesinas inducidas por citoquinas ²⁶⁹.

En los años 80', el primer uso clínico de células NK para el tratamiento del cáncer implicaba la infusión a pacientes con las células activadas *ex vivo* con IL-2 (células asesinas activadas por linfoquinas (LAK, del inglés)). Aunque se observó respuesta contra tumor, la eficacia clínica de este tratamiento fue limitada por la toxicidad de IL-2 y posiblemente por la expansión de Tregs por parte de IL-2 ⁸⁶. En la actualidad, dentro de las estrategias utilizadas en la transferencia adoptiva de células NK encontramos la utilización de NK alogénicas expandidas *ex vivo*, las cuales no son

inhibidas por antígenos de histocompatibilidad propios como sucede con las células NK autólogas. Otra estrategia utiliza la transferencia adoptiva de líneas estable de NK alogénicas, lo cual es más práctico para el control de calidad y producción a mayor escala (Fig. 12A-B). El tercer enfoque implica la modificación genética *ex vivo* de células NK o líneas celulares de NK para sobreexpresar citoquinas, receptores Fc y/o receptores quiméricos de antígeno (CAR) (Fig. 12C) ^{81,85,270}.

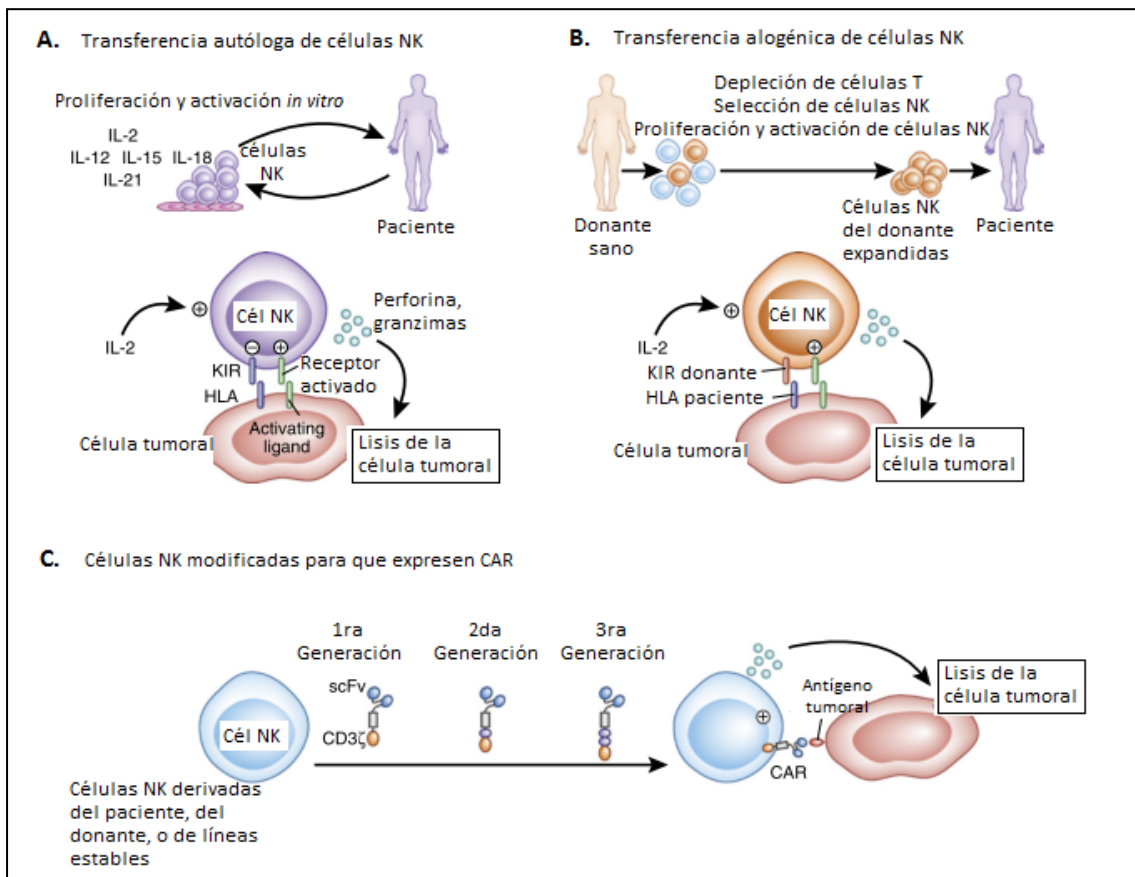


Figura 12. Estrategias utilizadas para transferencia adoptiva de células NK. **A.** En la transferencia autóloga, las células NK del paciente son activadas y expandidas *in vitro*, en presencia de citoquinas. Históricamente se utilizó IL-2, pero en la actualidad la utilización de IL-12, IL-15 e IL-18 aumentan la funcionalidad de las células NK y la memoria. Para dicha expansión también se pueden utilizar células "alimentadoras" en el cultivo. Luego las células NK son reinfundidas al paciente que en general recibe dosis bajas de IL-2 para promover la expansión de las células infundidas *in vivo*. Una limitante de la transferencia de células NK autólogas en la actividad antitumoral son las señales inhibitorias desencadenadas por el reconocimiento de HLA propio. **B.** En el transplante alogénico, las células NK se obtienen de donantes haploidénticos (parcialmente compatibles). Las células NK se expanden de forma similar a las utilizadas para la transferencia autóloga, pero las células T deben eliminarse para evitar la enfermedad de injerto contra huésped. En este contexto, las mejores respuestas se obtienen cuando los donantes haploidénticos no expresan KIRs que reconocen las moléculas HLA del paciente, porque las células NK donadoras no reciben una señal inhibitoria de las células cancerosas del paciente. **C.** Las células NK autólogas o alogénicas pueden ser manipuladas genéticamente para que expresen CAR de 1ra, 2da o 3ra generación. La unión de un CAR al antígeno tumoral proporciona una potente señal de activación que desencadena la citotoxicidad de las células NK, lo que resulta en la eliminación de la célula cancerosa. Imagen modificada de ⁸¹.

3.3 Inmunoterapia pasiva específica

3.3.1 Anticuerpos monoclonales

La posibilidad de utilizar anticuerpos como “balas mágicas” ha atraído a los investigadores durante muchos años y sigue siendo un área de activa investigación ⁶¹. La tecnología de hibridomas permitió la producción de anticuerpos monoclonales (mAb) con especificidad definida y en grandes cantidades. A pesar del éxito obtenido con los anticuerpos anti-idiotipo en 1980, la mayoría de los anticuerpos dirigidos contra antígenos de célula B o T fallaron en lograr una respuesta clínica ²⁷¹. La actividad de los monoclonales como agentes terapéuticos depende de las características del antígeno blanco y del anticuerpo. Los resultados de los ensayos clínicos de los últimos 25 años han demostrado que las características del antígeno es un factor muy importante en el resultado clínico de los monoclonales. La molécula diana ideal debería expresarse en niveles altos y estables en todas las células del tumor y no expresarse en los tejidos sanos ²⁷¹. En cuanto a las características del anticuerpo, los primeros ensayos clínicos con monoclonales murinos generaron buenas tasas de respuesta inmune pero por cortos períodos de tiempo dado la escasa vida media en suero del monoclonal debido a la generación de anticuerpos anti-inmunoglobulina murina ⁷⁶. Con la utilización de técnicas de ingeniería genética, la producción de monoclonales primero quiméricos y posteriormente humanizados ha mejorado la vida media en suero de los mismos y su actividad clínica ⁷⁶.

El efecto antitumoral de los mAb ocurre por los mismos mecanismos efectores que se dan en la eliminación de patógenos, incluyendo opsonización y fagocitosis, activación del sistema del complemento y ADCC. Además, en caso que el anticuerpo esté dirigido a moléculas con actividad biológica, por ejemplo un receptor, este puede detener el crecimiento tumoral y conducir a la apoptosis celular ^{61,268}.

La lista creciente de mAb indica el potencial clínico que tiene el utilizar esta estrategia como inmunoterapia. En la revisión de Grover & Park ³⁸ se describen la mayoría de los mAb para el tratamiento de LNH-B, incluyendo los aprobados por la FDA, así como los que se encuentran en ensayos clínicos. En la Tabla 4 se esquematizan los mAb más importantes desarrollados para el tratamiento de los LNH.

Tabla 3. Anticuerpos monoclonales

Tipo	Anticuerpo	Comentario	Blanco	
Sin modificar	Rituximab	mAb quimérico (humano/murino) IgG1 tipo I. Fue el primer mAb aprobado por la FDA para el tratamiento del cáncer. Su incorporación a los tratamientos estándar (quimioterapia) hace más de una década, cambió drásticamente las tasas de respuesta ^{29,33,272} , convirtiéndose en un componente central para el tratamiento del LNH. En la actualidad se está evaluando su efecto como terapia de mantenimiento y en otros tipos de LNH como en linfoma de tejido linfoide asociado a mucosa y linfoma de Burkitt ^{33,273} .	Anti-CD20	CD20 se expresa en más del 85% de los LNH de células B, pero no en células progenitoras, y se pierde cuando las células B normales se diferencian a células plasmáticas secretoras de anticuerpos ^{274,275} . Además, no se internaliza tras la unión al anticuerpo, su expresión es estable, y no se desprende de la superficie ³³ , convirtiéndolo en una diana atractiva para el tratamiento de LNH. Los mAb anti-CD20 pueden ejercer su efecto antitumoral induciendo la muerte celular vía apoptosis o por otras vías de muerte celular, por citotoxicidad dependiente del complemento (CDC), o por ADCC, mediada por receptores Fc (FcR) ²⁷⁶ .
	Ofatumumab	mAb totalmente humanizado tipo I, su blanco es un epítipo en CD20 distinto al de rituximab, desencadenando similar ADCC que rituximab, pero mejor CDC ²⁷⁷ . Fue aprobado por la FDA para el tratamiento de leucemia linfocítica crónica refractario luego del tratamiento con fludarabina y alemtuzumab (anti-CD52). En la actualidad está siendo estudiado en ensayos clínicos tanto para LNH indolente como agresivo, ya sea como tratamiento de primera línea o en pacientes en recaída o refractarios, tanto monoterapia como combinados con quimioterapia ²⁶ .	Anti-CD20	Dependiendo de cuál sea el mecanismo por el cual el anticuerpo anti-CD20 ejerce su acción, se pueden clasificar en tipo I o tipo II ²² . Los tipo I promueven la
	Veltuzumab	mAb humanizado que tiene una región de unión a CD20 similar a la de rituximab. En modelos pre-clínicos, demostró tener mayor actividad antitumoral que rituximab, exhibiendo mayor retención a la superficie celular luego de la unión a CD20 ²⁷⁸ . En ensayos fase I/II con pacientes portadores de LNH refractario fue en general bien tolerado ^{22,26} .	Anti-CD20	
	Ocaratuzumab	mAb humanizado tipo I, mostró ser de 5-7 veces más potente que rituximab para ADCC. Sin embargo, a pesar de la efectividad observada <i>in vitro</i> y pre-clínicamente, se desconoce la verdadera contribución que tiene este mecanismo a nivel clínico ²² .	Anti-CD20	
	Obinutuzumab (GA-101)	mAb totalmente humanizado tipo II, que ha sido modificado de modo de aumentar la afinidad de FcγRIIIa en células efectoras, resultando en un potenciamiento de ADCC, fagocitosis celular dependiente de anticuerpos (ADCP, del inglés) y muerte directa de células B ²⁷⁹⁻²⁸¹ . Se ha estudiado tanto como monoterapia como en combinación con quimioterapia. Aunque aún no se conoce el impacto que tiene para el tratamiento de LNH indolentes, ya que	Anti-CD20	

Continuación Tabla 3.

		aún se carece de resultados de estudios en fase III, el incremento en la actividad de este mAb anti-CD20 es atractivo para el diseño de tratamientos sin quimioterapia. También se está evaluando para el tratamiento de LNH agresivos con resultados promisorios ²⁶ . Además de evaluar la combinación con quimioterapia, un estudio fase I (GALEN) está evaluando el tratamiento combinado de obinutuzumab con lenalidomida ²⁶ .		actividad ADCC y CDC. Los tipo II exhiben menores niveles de CDC, pero inducen la muerte celular directa. Ambos tipos de mAbs son capaces de activar efectores del sistema inmune por la ligación a los FcR.
Conjugados a radionucleidos	<p>Ibritumomab tiuxetan (Zevalin)</p> <p>tositumomab (Bexxar)</p>	Además de conjugar mAb a toxinas y drogas, pueden unirse a radionucleidos, con resultados promisorios en pacientes con LNH en recaída o refractario ¹⁹ . Zevalin y Bexxar son dos mAb anti-CD20 comerciales que han demostrado respuestas terapéuticas superiores a las obtenidas con rituximab. Actualmente se encuentra en estudios fase I/II el uso de rituximab conjugado a lutecio-177 (¹⁷⁷ Lu) con resultados promisorios.	<p>Anti-CD20 conjugado a itrio-90 (⁹⁰Y)</p> <p>Anti-CD20 conjugado a iodina-131 (¹³¹I)</p>	
Sin modificar	Epratuzumab	Este mAb se está estudiando en ensayos fase I/II en pacientes en recaída o con enfermedad refractaria, tanto en linfoma folicular como LDGCB, también en combinación con rituximab y R-CHOP ^{26,282}	Anti-CD22	
Conjugados a drogas (ADC)	Inotuzumab ozogamicin (CMC544)	Es un anticuerpo IgG4 humanizado conjugado con caliqueamicina (citotoxina que daña al ADN de forma directa). Este ADC mostró una fuerte actividad antitumoral en linfoma de células B ²⁸ . Se ha investigado como monoterapia o en combinación con rituximab y/o quimioterapia, con resultados favorables en estudios fase I/II ^{283,284} . También se ha estudiado sobre líneas celulares de leucemia en estudios pre-clínicos.	Anti-CD22 conjugado a caliqueamicina	CD22 es un antígeno expresado tanto por células B normales como neoplásicas que participa en la vía de señalización de BCR, adhesión celular y regulación del "homing" en las células B.
	Pinatuzumab vedotin (PiV)	Este ADC está conjugado al agente antimicrotúbulos monometil auristatin E (MMAE). En estudios pre-clínicos, PiV exhibió una actividad anti-linfoma notoria tanto contra el centro germinal como con las líneas celulares activadas de células B de líneas de LDGCB. En la clínica se ha utilizado como monoterapia mostrando buenos perfiles de seguridad, y se ha investigado en combinación con rituximab en ensayos fase II en pacientes en recaída o refractarios con LF y LDGCB (ROMULUS) ^{26,28} .	Anti-CD22 conjugado a MMAE	
Sin modificar	MEDI-551	mAb IgG humanizado mejorado, que aumenta la ADCC. Se está evaluando en ensayos fase I/II en pacientes en recaída tanto con LF como en LDGCB ²⁶ .	Anti-CD19	CD19 es una proteína reguladora de la vía de señalización del
ADC	SAR3419	Este mAb está conjugado al inhibidor de	anti-CD19	señalización del

Continuación Tabla 3.

		tubulina (DM4). Se encuentra en estudios fase I en pacientes con LNH-B indolentes y agresivos observándose buen perfil de seguridad ^{285,286} .	conjugado a DM4	BCR que se expresa en todos los tipos de linfocitos B, excepto en las células plasmáticas.
	SGN-CD19A	Este mAb está conjugado al agente antimicrotubulina monometil auristatin F (MMAF). Se está ensayando en estudios fase I en pacientes con LDGCB ²⁸ . Se observó que este anticuerpo conjugado disminuye el crecimiento y síntesis de proteínas en líneas celulares de leucemia linfocítica crónica y linfoma de Burkitt ²⁸ .	anti-CD19 conjugado a MMAF	
	Brentuximab vedotin (SGN-35)	Es mAb quimérico está conjugado químicamente a MMAE. Se aprobó por la FDA para el tratamiento para pacientes con linfoma anaplásico de células grandes en recaída o refractario luego de al menos un tratamiento previo ²⁸ .	anti-CD30 a MMAE	CD30 es un miembro de la superfamilia del receptor de TNF comúnmente expresado en linfocitos T y B activados. La naturaleza pleiotrópica de la señalización CD30 puede resultar en proliferación celular y supervivencia o apoptosis y muerte celular. CD30 está altamente expresado en linfoma anaplásico de células grandes y en LH y en grado variable en los linfomas de células T y B, convirtiéndolo en un blanco atractivo para la terapia basada en anticuerpos ²⁸ .
Sin modificar	Lucatumumab	mAb anti-CD40 totalmente humanizado que en un modelo pre-clínico de leucemia linfocítica crónica mostró mayor lisis de células B que las obtenidas con rituximab. A nivel clínico se encuentra en ensayos fase I en pacientes con leucemia linfocítica crónica ²⁸⁷ , y los ensayos fase I/II en pacientes con LNH en recaída o refractario mostraron que la droga es bien tolerada ²⁸⁸ .	Anti-CD40	CD40 es una proteína transmembrana de la superfamilia de TNF, expresada en más del 90 % de las células B malignas ²⁸⁹ . La

Continuación Tabla 3.

	Dacetuzumab (SGN-40)	mAb que actúa como un agonista parcial. En líneas celulares de linfoma se observó que induce apoptosis directa, ADCC y fagocitosis. Se encuentra en curso un ensayo fase I con pacientes con LNH-B en recaída o refractario donde se ha observado toxicidad aceptable y actividad antitumoral. Otro ensayo fase I está estudiando la combinación de este mAb con rituximab y gencitabina en pacientes con LDGCB en recaída o refractario ²⁹⁰ .	Anti-CD40	ventaja de utilizar CD40 como blanco respecto a CD20, es que se expresa además de en células B progenitoras en los plasmocitos. La activación CD40 por unión al ligando (CD40L) resulta en un aumento de la proliferación y supervivencia de las células B neoplásicas, por lo que el uso de mAb anti-CD40 bloquearía dicha proliferación y promovería ADCC y CDC.
	Alemtuzumab	mAb humanizado con actividad CDC, ADCC e inductor de apoptosis ²⁹¹ . Su uso se ha aprobado en leucemia linfocítica crónica refractaria al tratamiento con fludrabina ²⁹² . Ha mostrado su eficacia tanto como monoterapia como en combinación con quimioterapia en linfomas de células T periféricos, así como en linfomas de células T cutáneo ²⁹³⁻²⁹⁵ . Sin embargo, su uso se ha asociado a infecciones relacionadas a inmunosupresión. Ensayos fase II recientes han mostrado su eficiencia en linfomas de células T periféricos tanto como terapia de consolidación luego del tratamiento quimioterápico como tratamiento de primera línea ²⁹⁶ .	Anti-CD52	CD52 es una glicoproteína de superficie con función desconocida que se expresa tanto en linfocitos B como en T ²⁶ .
ADC	Polatuzumab vedotin (PoV)	Es un mAb humanizado anti-CD79 unido mediante cisteínas a MMAE. Mostró actividad al utilizarse como monoterapia y se han investigado en ensayos fase II en pacientes en recaída o refractarios con LF y LDGCB (ROMULUS) ²⁶ . Basándose en estos resultados está en curso la utilización de la terapia combinada de PoV con rituximab y quimioterapia.	Anti-CD79 conjugado a MMAE	CD79 se expresa en células B normales, leucemia linfocítica crónica y LNH-B. CD79 α /CD79 β son parte integral de la estructura del BCR y de la vía de señalización que regula la proliferación celular, la

Continuación Tabla 3.

				supervivencia y la apoptosis, siendo entonces atractivo como blanco terapéutico para el tratamiento de neoplasias de células B ²⁸ .
Biespecíficos (BiTEs)	Blinatumomab	Es un BiTE que une CTLs con células B malignas, con el fin de mejorar la lisis de células tumorales mediada por células T. Se observó que esta droga fue bien tolerada en ensayos fase I con pacientes portadores de LNH-B en recaída ^{22,26} . En la actualidad se encuentra en curso un ensayo fase II en pacientes con LDGCB en recaída o refractario y leucemia linfoblástica aguda ^{18,22} .	anti-CD3/ anti-CD19	Son moléculas diseñadas que unen la cadena única variable de dos anticuerpos dirigidos a dos antígenos diferentes ²² .

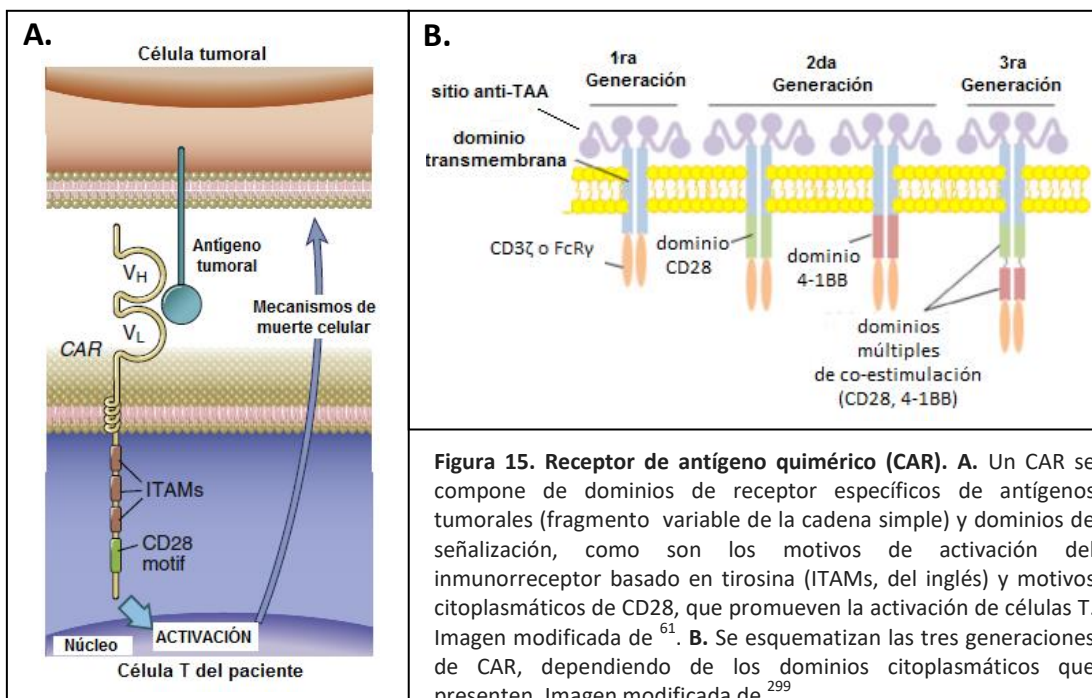
3.3.2 Inmunoterapia celular adoptiva: células T

La primera experiencia clínica en humanos de transferencia adoptiva de células T fue reportada en 1991 para la profilaxis contra citomegalovirus (CMV) en pacientes trasplantados. La técnica consistía en expandir células T específicas contra CMV *ex vivo* y luego se infundían a pacientes con riesgo de infección por CMV, lo que resultaba en una respuesta inmune protectora contra CMV ²⁹⁷. Se ha reportado que uso de TILs en melanoma metastásico es uno de los tratamientos más efectivos para pacientes con melanoma metastásico ⁸⁸. Sin embargo el uso de TIL en otros cánceres es limitada por ciertos factores incluyendo que no siempre es fácil obtener tumores (por ejemplo en las metástasis donde las biopsias no se obtienen fácilmente), los TILs son detectables de manera reproducible en pocos tipos de cáncer, los protocolos para la expansión de células son complicados (largos y difíciles de estandarizar), y se ha observado que una vez reinfundidos los TIL pueden revertir a estados inmunosupresores en el microambiente tumoral ²⁶⁹. Se trató de mejorar los resultados obtenidos con TIL infundiéndolos junto con IL-2 pero no se observó un efecto antitumoral significativo

²⁶⁹

En la actualidad, las principales terapias basadas en la transferencia de células T para el tratamiento de LNH son: células T específicas del virus Epstein-Barr, para tratar linfomas inducidos por el virus, y células T modificadas para el receptor quimérico de antígeno (CAR-T). Otras son células T específicas de antígenos asociadas a tumor (TAA), y células T modificadas para el TCR ²⁹⁸.

En el último tiempo ha existido un crecimiento vertiginoso en el número de ensayos clínicos utilizando células CAR-T en las neoplasias hematológicas. Son linfocitos T autólogos modificados genéticamente para expresar construcciones CAR ²⁹⁹. Dicho receptor quimérico tiene un sitio de unión específico del antígeno tumoral codificado por los genes variables de inmunoglobulinas, y la parte citoplasmática contiene dominios de señalización tanto de receptores de antígenos como de moléculas co-estimuladoras (Fig. 13) ³⁰⁰.



La mayoría de los estudios publicados para el tratamiento de neoplasias de células B con CAR-T utilizan células dirigidas a CD19 ^{18,301}. La mayor experiencia clínica ha sido para el tratamiento de leucemia linfocítica aguda en recaída o refractaria,

donde se ha obtenido respuesta completa en un porcentaje cercano a 90%^{299,302}. En el último tiempo se ha acumulado evidencia de su utilidad para el tratamiento de neoplasias linfoides, como leucemia linfocítica crónica y LNH¹⁸. Respecto a los LNH-B están en curso estudios con pacientes en recaída o refractarios que utilizan CAR-T con resultados alentadores²⁹⁸. Además se está estudiando la combinación del uso de CAR-T con inhibidores de moléculas pequeñas (ibrutinib, lenalidomida) o inhibidores de punto de control inmunológico para mejorar la eficacia del tratamiento¹⁸.

3.4 Inmunoterapia activa inespecífica

3.4.1 Inhibidores de puntos de control

Hasta el momento, la inhibición de ciertos puntos de control, como son de las vías de señalización de CTLA-4 y de PD-1 ha sido el enfoque terapéutico más prometedor para distintos tipos de cáncer incluyendo melanoma, cáncer de pulmón y carcinoma renal, con ensayos clínicos en curso para otros tipos de cáncer, y neoplasias hematológicas (incluyendo LNH)^{18,38,209,303}. Ipilimumab es un anticuerpo IgG1 completamente humanizado anti-CTLA-4, aprobado por la FDA para melanoma, y en actual ensayo para otros tipos de cáncer (Tabla 4). Aunque aún no se conoce con exactitud la eficiencia de este mAb en neoplasias hematológicas, los resultados son promisorios²⁰⁹. Más aún, se están ensayando terapias combinadas con este mAb, administrándolo antes y después de trasplante de progenitores hematopoyéticos (NCT01896999, NCT01729806, NCT01592370, NCT01919619, NCT01822509)¹⁸. Además se encuentra en ensayo clínico fase I/III el mAb Tremelimumab, para melanoma, cáncer de hígado, mesotelioma, colono rectal y pulmón⁹⁴.

Existen distintos mAb anti-PD-1 en desarrollo, la FDA aprobó Nivolumab, anticuerpo IgG4 totalmente humanizado, para el tratamiento de melanoma, pulmón y carcinoma renal, y Pembrolizumab (lambrolizumab), anticuerpo humanizado IgG4, para el tratamiento de melanoma y cáncer de cabeza y cuello (Tabla 4)^{18,304}. Otros mAb anti-PD-1 en desarrollo son Pidilizumab (IgG1 humanizado), siendo estudiado para el tratamiento de melanoma, cáncer renal, de páncreas, próstata y linfoma, AMP-224 y AMP-514. Todos estos mAb anti-PD-1 están siendo probados en ensayos clínicos para el tratamiento de distintas neoplasias hematológicas^{18,304}. Además, se

encuentran en desarrollo anticuerpos contra el ligando de PD-1 (PD-L1) ³⁰⁵. Atezolizumab (MPDL3280A), un mAb IgG1 humanizado ha sido aprobado por la FDA para el cáncer de vejiga y pulmón y está siendo estudiado para varias neoplasias hematológicas como monoterapia, o en combinación con otros agentes como obinutuzumab en pacientes con LF o LDGCB en recaída o refractario, y también a esta combinación se le agrega lenalidomida, bendamustina, o quimioterapia (CHOP) en estudios fase I/II ¹⁸.

Tabla 4. Inhibidores de los puntos de control

Anticuerpo	Banco
Ipilimumab	Anti-CTLA-4
Nivolumab	Anti-PD-1
Pembrolizumab	Anti-PD-1
Pidilizumab	Anti-PD-1
Atezolizumab	Anti-PD-L1

3.4.2 Bacterias

El uso de bacterias como agentes antitumorales data del siglo XIX, siendo William B. Coley el primero en emplearlas ^{306,307}. Coley observó un efecto antitumoral potente en un grupo extenso de pacientes con cáncer, pero su uso fue discontinuado debido a la alta toxicidad del procedimiento ³⁰⁸⁻³¹⁰.

En la actualidad el desarrollo de terapias antitumorales basadas en microorganismos vivos está nuevamente en foco de investigación ³⁰⁶. Las características del microambiente tumoral, incluyendo vasos sanguíneos anormales y regiones hipóxicas y necróticas hace que sea propicio para la colonización por bacterias anaerobias obligadas, como *Clostridium* y *Bifidobacterium*, y facultativas como *Streptococcus*, *Escherichia*, *Listeria* y *Salmonella* ³¹¹⁻³²². Se han evaluado terapias basadas en la administración de bacterias solas y también usando la bacteria como vector de antígenos tumorales o genes terapéuticos ^{323,324}. En Felgner et al., 2016 se revisan las bacterias recientemente utilizadas como terapia antitumoral, tanto en estudios pre-clínicos como clínicos (Tabla 5 y 6).

Tabla 5. Estudios pre-clínicos con bacterias. Ejemplos de estudios pre-clínicos recientes (desde 2012) donde se utilizan bacterias como terapia antitumoral. Datos extraídos de ³⁰⁶.

ESPECIE	AÑO	MODELO	RESULTADO
<i>C. novyi</i>	2014	Spontaneous, dog	Colonization and prolonged survival
<i>C. novyi</i>	2015	Glioblastoma, rat	Colonization and prolonged survival
<i>B. infantis</i>	2013	Bladder, rat	High tumor specificity by engineered strain
<i>L. monocytogenes</i>	2014	Ovary, mouse	Reprogramming of M2-M ϕ , iNOS-mediated tumor cell lysis
<i>L. monocytogenes</i> (ANZ-100)	2014	Pancreas, mouse	Prolonged survival
<i>S. Typhimurium</i> (A1-R)	2012	Breast, nude mouse	Intravenous administration most effective for tumor targeting
<i>S. Typhimurium</i> (A1-R)	2012	Brain, nude mouse	Tumor growth inhibition and prolonged survival
<i>S. Typhimurium</i> (A1-R)	2014	Bone metastasis, nude mouse	Inhibition of breast cancer bone metastasis
<i>S. Typhimurium</i> (A1-R)	2014	Pancreas, nude mouse	Tumor growth retardation, A-VEGF supports therapy
<i>S. Typhimurium</i> (A1-R)	2015	Ovary, nude mouse	Prolonged survival, less metastasis formation
<i>S. Typhimurium</i>	2015	Carcinoma (CT26), mouse	Complete tumor rejection in all cases by recombinant strain
<i>E. coli</i>	2015	Breast (4T1), mouse	Secretion of toxic compound, reduced tumor volume
<i>La. acidophilus</i>	2014	Carcinoma (CT26), mouse	Increased apoptosis and tumor growth suppression

Tabla 6. Estudios clínicos con bacterias. Ejemplos de estudios clínicos recientes (desde 2002) donde se utilizan bacterias como terapia antitumoral. Datos extraídos de ³⁰⁶.

ESPECIE	AÑO	COHORTE	RESULTADO
<i>S. Typhimurium</i> (VNP20009)	2002	24 patients with metastatic melanoma; 1 patient with metastatic renal cell carcinoma	Induction of immune response, tumor colonization in 3 cases, no antitumor response
<i>S. Typhimurium</i> (TAPET-CD)	2003	3 patients with advanced and metastatic solid tumors	66% tumor colonization, measurable activity of cytosine deaminase in tumor
<i>C. novyi-NT</i>	2014	1 patient with advanced leiomyosarcoma	Tumor reduction within and surrounding the bone
<i>C. novyi-NT</i>	Active	Patients with solid tumors that do not respond to standard therapy	Recruitment (NCT01924689)
<i>L. monocytogenes</i> (ANZ-100 and CRS-207)	2011	26 patients with solid tumors (liver, pancreas, lung, or ovary)	Safe vaccines that resulted in immune activation
<i>L. monocytogenes</i> (CRS-207)	Active	90 patients with pancreatic cancer	Extended survival with minimal toxicity

Una de las formas más antiguas y eficaces de inmunoterapia activa inespecífica ha sido la utilización del bacilo de Calmette-Guerin (BCG), una forma atenuada del bacilo *Mycobacterium bovis*, que ha mostrado ser un potente estimulador del sistema mononuclear fagocítico. Actualmente, es el tratamiento de primera línea para el carcinoma superficial de vejiga junto con la resección transuretral de los pólipos. Ha mostrado incluso ser más efectivo que la quimioterapia ³²⁵. Mediante administración intravesical, se logra obtener altas concentraciones de la

bacteria, lo que conduce a la generación de una respuesta inmune local, caracterizada por la expresión de diversas citoquinas y por el reclutamiento de linfocitos y células mononucleares, que culmina con la generación del efecto antitumoral deseado, donde los mecanismos efectores principales son la actividad antitumoral directa del IFN y la actividad citotóxica de las células NK ³²⁶. Adicionalmente, BCG ha sido utilizado en ensayos clínicos como adyuvante en vacunas antitumorales en diferentes tipos de tumores (tumores de sistema nervioso central, carcinoma de colon, melanoma, entre otros) ³²⁵. También se han utilizado cepas de BCG genéticamente modificadas para producir citoquinas. Por ejemplo, se utilizó como adyuvante de una vacuna para melanoma una cepa de BCG modificada para expresar IL-2, , que mostró suprimir el crecimiento tumoral ³²⁵.

3.4.2.1 Bacterias anaerobias estrictas

Dentro de este grupo las más utilizadas son las bacterias gram-positivas del género *Clostridium* y *Bifidobacterium* ³²⁴. Estas bacterias pueden sólo replicarse en condiciones de anoxia y por ello se acumulan preferentemente en las regiones necróticas de los tumores ³²⁷.

El primer reporte del efecto antitumoral de *Clostridium* fue en el año 1813, luego de observar que pacientes que habían adquirido una gangrena gaseosa, presentaban regresión tumoral ³²⁸. Posteriormente, Connell utilizó filtrados estériles de *C. histolyticum* y observó regresión tumoral, que fue atribuida a la producción de enzimas proteolíticas ³²⁸. Se observó que las condiciones del microambiente tumoral, a diferencia de los tejidos normales, propician la supervivencia de *Clostridium*. Se postuló que esto era debido a la hipoxia y necrosis en el tumor, condiciones que no están presentes en los tejidos normales bien oxigenados ³²⁹. Además se demostró que el efecto antitumoral de *Clostridium* ocurría en tumores de mediano y gran tamaño, con extensas áreas de necrosis, mientras que dicho efecto no se observaba en las lesiones metastásicas con pequeño volumen tumoral y por lo tanto carente de áreas hipóxicas. En 1970 se realizó un ensayo clínico con *C. butyricum* en pacientes con tumores encefálicos. Se demostró que los tumores se convertían en abscesos que podían ser tratados quirúrgicamente ³²⁹.

Las especies de *Clostridium* presentan numerosos obstáculos como terapia antitumoral, sólo se replican en tumores voluminosos, inducen respuestas inflamatorias importantes lo que determina numerosos efectos adversos y generan abscesos intratumorales. Sin embargo con el desarrollo de nuevas herramientas de biología molecular para la manipulación genética, esta bacteria ha ganado interés para utilizarla en el tratamiento del cáncer ^{330,331}. En particular dichas técnicas permiten reducir su toxicidad e introducir en ellas por ejemplo, enzimas convertidoras de pro-drogas, citoquinas, entre otras para ser utilizadas como vectores tumor-específico ³²⁴.

Bifidobacterium es una alternativa atractiva para ser utilizada en lugar de *Clostridium*. Es una bacteria gram-positiva, anaerobia, que a diferencia de *Clostridium* no es patogénica, no forma esporas y se encuentra naturalmente en el tracto digestivo de mamíferos, siendo segura administrarla como terapia antitumoral en humanos. Se ha visto que luego de su administración intravenosa coloniza grandes masas tumorales de varios tipos tumorales murinos ³³². Sin embargo, al igual que *Clostridium*, se ha visto que *Bifidobacterium* sólo coloniza tumores mayores de 1,5 cm y es pobremente distribuida en la masa tumoral, por lo que las masas tumorales pequeñas y metástasis no son colonizadas. Al igual que *Clostridium*, en la actualidad el uso de esta bacteria como inmunoterapia se centra en la utilización de la misma como vehículo de expresión de enzimas convertidoras de pro-drogas, citosina deaminasa y ha sido combinada con factores anti-angiogénicos ^{320,324}.

3.4.2.2 Bacterias anaerobias facultativas

La utilidad de las bacterias anaerobias estrictas como terapia antitumoral se encuentra limitada porque sólo colonizan y replican en condiciones de anoxia y por ello no colonizan metástasis y tumores pequeños. Una alternativa es la utilización de bacterias anaerobias facultativas, como *Salmonella*, que tienen la propiedad de colonizar y replicarse tanto en condiciones de anoxia como en zonas oxigenadas de los tumores pudiendo entonces, colonizar tumores pequeños ³³³.

En 1997 Pawelek demostró que la inoculación de cepas de *Salmonella* auxotróficas con mutaciones en las vías de las purinas, a animales portadores de tumores (melanoma, pulmón, colon, mama, hígado) genera replicación bacteriana preferencial en el tumor, con una relación de bacterias en el tumor en comparación

con el tejido normal mayor a 1000/1, con un efecto terapéutico antitumoral notorio³³⁴. Estas observaciones y el hecho de la fácil manipulación de *Salmonella*, hace que esta última sea interesante de utilizar como terapia antitumoral.

Salmonella se acumula y replica preferentemente en el microambiente tumoral, lo que ofrece el potencial de amplificar el efecto terapéutico en el sitio del tumor, evitando el efecto tóxico en los tejidos adyacentes^{319,333}. Puede multiplicarse tanto en condiciones aeróbicas como anaeróbicas, de modo que puede replicarse tanto en tumores pequeños como grandes; además posee flagelo que permite la dispersión de la bacteria en todo el tumor. Se ha encontrado una gran cantidad de bacteria en zonas necróticas e isquémicas, siendo un beneficio ya que estas áreas son más resistentes a la radiación y a la quimioterapia³³⁵⁻³³⁷. Una característica útil que posee esta bacteria es que puede ser atenuada por mutaciones genéticas, permitiendo la generación de cepas atenuadas, y además puede ser utilizada como vector de entrega de moléculas terapéuticas^{320,338}.

Uno de los principales problemas que tenía el uso de *Salmonella* para el tratamiento del cáncer es que es altamente inmunogénica e induce shock séptico mediado por TNF- α . Por este motivo se han desarrollado cepas de *Salmonella* auxotróficas menos virulentas de modo de reducir su capacidad de producir shock séptico^{333,338,339}. En particular para nuestro trabajo utilizamos la cepa de *Salmonella enterica* serovar Typhimurium (*S. Typhimurium*), LVR01, construida en nuestro laboratorio. Esta cepa está atenuada por delección del gen *aroC* (vía de los compuestos aromáticos). Es sensible a la ampicilina y requiere de compuestos aromáticos para su crecimiento³⁴⁰.

Salmonella ha sido usada como una terapia antitumoral efectiva en distintos modelos de cáncer, incluyendo melanoma, pulmón, colon, mama, renal, hepático, próstata y hematológicos^{307,321,323,325,341-345}. En la revisión de Zheng et al., 2016 se analizan las distintas aproximaciones terapéuticas utilizando cepas atenuadas de *Salmonella*, ya sea por la citotoxicidad natural de la bacteria o en combinación con otras terapias, como vectores en vacunas, o modificadas para que expresen citoquinas, reguladores, antígenos tumorales, ARN interferente o enzimas³³³. En Wang et al., 2016 y Zheng et al., 2016 se revisan las cepas de *Salmonella* con mayor potencial terapéutico antitumoral para ser utilizadas a nivel clínico (Tabla 7)³²¹.

En lo que respecta al uso de *Salmonella* como inmunoterapia para linfoma, previamente nuestro grupo de trabajo reportó que la administración de una cepa atenuada de *Salmonella* desencadena una potente respuesta inmune antitumoral en animales portadores de linfoma A20, que se traduce en un retardo en el crecimiento tumoral y extensión de la supervivencia³⁴⁶. Más aún, Vendrell & col., reportaron que el uso de *Salmonella* tiene un efecto terapéutico en un modelo de linfoma T metastásico³⁴⁷.

Se han llevado a cabo ensayos clínicos con cepas atenuadas de *Salmonella* en tumores sólidos metastásicos refractarios a la terapia convencional, siendo *S. Typhimurium* VNP20009 la más utilizada. En particular, se probó esta cepa como tratamiento de melanoma metastásico y carcinoma renal metastásico. Los resultados obtenidos de estos estudios no tuvieron demasiado éxito, por lo que se intentó mejorar la eficacia terapéutica donde la cepa VNP20009 se modificó para expresar una enzima que convierte 5-Fluorocitocina (pro-droga que se administraba con la bacteria) en 5-Fluorouracil (droga con efecto tóxico), en un modelo pre-clínico. Los resultados obtenidos con este ensayo mostraron que *S. Typhimurium* puede entregar genes terapéuticos a tejidos malignos a dosis seguras³³³.

Tabla 7. Cepas atenuadas de *S. Typhimurium* con potencial terapéutico antitumoral para ser utilizadas en la clínica. Datos extraídos de³³³.

CEPA	GENOTIPO	DESCRIPCIÓN
VNP20009	Δmsb , $\Delta purI$	Lipid A-modified to reduce septic shock induction; purine-dependent
A1-R	leucine and arginine auxotrophs	Leucine/arginine-dependent
$\Delta ppGpp$	$\Delta relA$, $\Delta spoT$	Defective in ppGpp synthesis; non-invasive to mammalian cells
SL7207	$\Delta aroA$	Aromatic amino acids synthesis depends on <i>p</i> -aminobenzoate and 2,3-dihydroxybenzoate
LH340	$\Delta phoP$, $\Delta phoQ$	Cytoplasmic transcriptional regulator (PhoP) and membrane-associated sensor kinase (PhoQ)
SL3261	$\Delta aroA$	Blocked in aromatic synthesis
BRD509	$\Delta aroA$, $\Delta aroD$	Aromatic compound-dependent
SA186	$\Delta znuABC$	Deletion of the whole <i>znuABC</i> operon, which encodes the high-affinity zinc transporter
LVR01	$\Delta aroC$	Auxotrophic for certain aromatic compounds
YB1	$\Delta aroA$	Engineered to express the essential <i>asd</i> gene under the control of a hypoxia-inducible promoter
RE88	$\Delta aroA$, Δdam	Defective in DNA adenine methylase; fails to secrete the protein; non-invasive to mammalian cells
SB824	$\Delta aroA$, $\Delta sptP$	Reduction of virulence gene expression
MvP728	$\Delta purD$, $\Delta htrA$	Adenine-dependent; unable to survive in macrophages

3.4.2.3 Respuesta inmune generada por las bacterias

Los componentes microbianos activan al sistema inmune innato y adaptativo a través del reconocimiento de PAMPs. En mamíferos se han identificado varias familias de receptores PRRs que reconocen PAMPs, entre los que se destacan los receptores tipo toll (TLRs) (Fig. 14), receptores de unión a nucleótidos (NLRs), receptores tipo lectina C y receptores de inducción del gen de ácido retinoico (RLRs)^{348,349}.

Salmonella, posee numerosos agonistas de TLR, que al unirse con su ligandos puede inducir la apoptosis de las células tumorales³⁵⁰, y aumento de la permeabilidad vascular y reclutamiento leucocitario en el tumor favoreciendo la lisis de células tumorales por células NK o T citotóxicas. Las células NK pueden activarse y aumentar su actividad citolítica en el sitio de la inflamación a través de los receptores TLR. Se ha demostrado que estas células expresan TLR-3 y TLR-9 y son capaces de responder frente a antígenos virales y bacterianos. La exposición de las células NK y de las DCs al ARN (ligando de la molécula TLR-3) determina la secreción de IL-12 por las DCs y la activación de las células NK. Además las células NK activadas a través de la vía TLR, en presencia de IL-12, liberan citoquinas incluyendo IFN- γ y TNF- α adquiriendo una elevada actividad citolítica. También estimulan la inmunidad adaptativa y tienen un rol adyuvante. Además inhiben la diferenciación y proliferación de células Tregs. La respuesta inmune que promueve *Salmonella* hace que sea una buena opción para ser utilizada como terapia antitumoral. Dados los efectos que tienen los agonistas de TLR en la respuesta inmune antitumoral, se vienen ensayando diferentes agonistas TLR como inmunoterapias antitumorales o como adyuvantes en la construcción de vacunas contra el cáncer²⁷⁰.

Previamente nuestro grupo de trabajo reportó que la administración de *Salmonella* a ratones portadores de linfoma A20 genera una potente respuesta antitumoral. A nivel local, se observó reclutamiento de neutrófilos, células T CD8⁺ y NK activadas al sitio tumoral, y a nivel sistémico la administración de la bacteria generó una respuesta específica con un perfil Th1³⁴⁶.

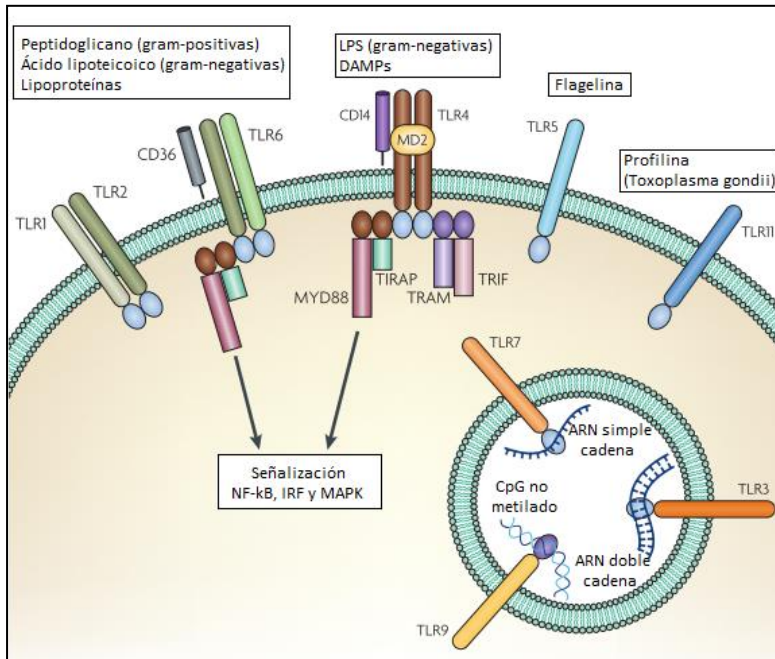


Figura 14. Función fisiológica de los TLRs. Los TLRs están implicados en el reconocimiento de PAMPs y DAMPs. Esto ocurre tanto en la membrana plasmática como en compartimentos intracelulares. Después de la interacción de TLR con su ligando, ya sea directamente o a través de moléculas (CD14, MD2 y CD36), los TLR se dimerizan y transmiten señales por medio de moléculas adaptadoras tales como MYD88, TIRAP, TRAM y TRIF. Esto conduce a una cascada de señalización intracelular que finaliza en la activación de NFκB, MAPKs e IRF. Estas vías resultan en la activación de la respuesta inmune innata y adaptativa, la inflamación y la reparación de tejidos. Imagen modificada de ⁵⁵⁸.

3.4.3 Citoquinas

El hecho que las citoquinas puedan incrementar la inmunogenicidad y promover la regresión tumoral ha hecho que aumente el interés en el estudio de las mismas y su aplicación clínica en pacientes con cáncer. El perfil y la cantidad de citoquinas producidas en respuesta a la invasión por microorganismo, a las células tumorales o a otras señales como DAMPs, define si las respuestas inmunes posteriores tendrán efectos beneficiosos o perjudiciales para el huésped ³⁵¹.

La utilización de citoquinas como monoterapia o junto con planes de quimioterapia forma parte de los tratamientos actuales de pacientes con cáncer. Un ejemplo es la utilización de IL-2 para el tratamiento del carcinoma renal y melanoma en estadios avanzados, que ha sido aprobada por la FDA hace ya varios años ³⁵², y el IFN-α, utilizado en el tratamiento de tricoleucemia, linfomas de bajo grado, mieloma, melanomas, tumores carcinoides e hipernefoma ³⁵².

La utilización de citoquinas formando parte de formulaciones en vacunas, se encuentran en fase de ensayo pre-clínico y clínico ²⁷⁰. Un abordaje consiste en incorporar a la vacuna, citoquinas de tipo Th1 o Th2 de forma de modular la respuesta inmune hacia el fenotipo deseado. Existen numerosos reportes en modelos experimentales y en ensayos clínicos que utilizan este abordaje en la construcción de

vacunas tanto antivirales como antitumorales y muestran que el mismo es efectivo ³⁵¹. También se han incluido citoquinas en diferentes preparados vacunales, con el propósito de incrementar el reclutamiento de células presentadoras de antígeno en el sitio de la vacuna. Este abordaje ha sido particularmente utilizado para estimular e incrementar la respuesta inmune en las vacunas de ADN. Resultados alentadores se han obtenido con la utilización de citoquinas como GM-CSF, IL-2, IL-12, IL-18, IFN- γ , TNF- α , entre otras ³⁵¹. También se han utilizado otras citoquinas como IL-8, RANTES, CCL19 y CCL21, entre otras. Además la combinación de más de una citoquina ha mostrado efectos sinérgicos ⁷⁶.

3.4.3.1 IL-2

La IL-2 es una glicoproteína inmunomoduladora producida principalmente por células T CD4⁺ activadas y, en menor medida, por células T CD8⁺, NK, NKT y DCs activadas ³⁵³. Tiene una gran variedad de efectos inmunológicos incluyendo activación de células T citotóxicas, y activación de células NK en las que induce la producción de IFN- γ , así como su proliferación y actividad citolítica. Asimismo, promueve la proliferación y activación de células B ³⁵². Esta citoquina es considerada crucial en la regulación de una respuesta inmunitaria efectiva contra el cáncer. La administración de IL-2 conduce a la liberación de citoquinas pro-inflamatorias, incluyendo TNF- α , IL-1 β , IL-6, IFN- γ . Sin embargo, también es un potente regulador inmune mediante la expansión de las células Treg, así como la promoción de la muerte celular inducida por la activación (AICD, del inglés) de células T, características que van en detrimento de una respuesta antitumoral efectiva ³⁵². Esto concuerda con los resultados previamente obtenidos por nuestro grupo de trabajo, donde al utilizar una vacuna a células enteras, cuya formulación incluía IL-2, se observó un aumento en el número de Tregs ³⁵⁴. También a nivel clínico se ha observado que pacientes tratados con IL-2 presentan un aumento de Tregs ^{355,356}.

La IL-2 se ha utilizado en distintas aproximaciones para el tratamiento del cáncer, incluyendo monoterapia, combinada con otras citoquinas, quimioterápicos, otros fármacos dirigidos, inhibidores de los puntos de control, para realizar la expansión *ex vivo* en ACT (TIL), y con vacunas peptídicas. Como monoterapia, la FDA aprobó el uso de IL-2 para el tratamiento de melanoma y de carcinoma renal

metastásico³⁵⁷. En estos ensayos se observó que la administración en forma sistémica de IL-2 se asociaba a numerosos efectos adversos, obligando a suspender el tratamiento en ciertos casos³⁵⁸. Posteriormente, una serie de ensayos clínicos en pacientes con melanoma se centraron en estudiar la respuesta terapéutica de IL-2 a altas dosis junto a otras citoquinas (IFN- α) o regímenes de quimioterapia como forma de mejorar las tasas obtenidas³⁵². Algunos de estos estudios lograron escasas mejorías en términos de respuesta completa o parcial, pero con mayor toxicidad. En modelos pre-clínicos se observó un efecto sinérgico del tratamiento de Rituximab e IL-2 comparado con ambos tratamientos por separado³⁵². Posteriormente se realizaron ensayos en fase I y II en pacientes con LF en recaída o refractarios, con resultados contradictorios^{272,359-361}. Khan y col. llevaron a cabo un ensayo en fase II con mayor número de pacientes, mostrando que la utilización de IL-2 genera *in vivo* una expansión de células NK e *in vitro* aumento de ADCC del Rituximab, pero estos efectos no son reflejados en una mejoría de la respuesta clínica al Rituximab³⁶¹.

También se llevó a cabo un ensayo fase III para estudiar la eficacia y seguridad de la inmunoterapia adyuvante con células asesinas inducidas por citoquinas (CIK, del inglés) estimuladas con IL-2 en el tratamiento posquirúrgico en pacientes con hepatocarcinoma, observándose un aumento en la supervivencia global en comparación con el grupo control³⁵⁷. Las CIK activadas son una población heterogénea de células T que comparten las propiedades fenotípicas y funcionales de las células NK, tales como la expresión del receptor NKG2D, exocitosis de gránulos, secreción de citoquinas y citotoxicidad. Las CIK son capaces de erradicar tumores malignos hematológicos y sólidos. Por lo tanto, IL-2 puede actuar como un adyuvante viable para otros agentes terapéuticos en el tratamiento de tumores sólidos³⁵⁷.

3.4.3.2 IL-15

La IL-15 fue inicialmente caracterizada como un factor de crecimiento para las células T con similares propiedades *in vitro* que la IL-2. Los receptores de IL-2 e IL-15 contienen la misma subunidad β y γ , y la vía de señalización de ambos receptores son similares, por lo que se asumió que tenían funciones similares. Tanto la IL-2 como la IL-15 activan a las células NK y promueven la proliferación de células T e inducen la generación de células T citotóxicas, facilitan la proliferación de células B y la síntesis de

inmunoglobulinas. Sin embargo, *in vivo* se ha demostrado que estas dos citoquinas tienen algunas funciones diferentes^{362–364}. Cuando las células T CD4⁺ son estimuladas en forma repetitiva por la IL-2, estas van a la apoptosis por AICD, mientras que la IL-15 tiene el efecto opuesto y a su vez inhibe la muerte por apoptosis inducida por la IL-2³⁵⁷. Adicionalmente, la IL-2 participa en el mantenimiento de las células Tregs, mientras que la IL-15 no tiene efecto sobre éstos. La IL-15 estimula además la proliferación de células T CD8⁺ y permite la supervivencia de células T CD8⁺ de memoria. Además, la IL-15 promueve el desarrollo de DCs, activa a macrófagos e induce la producción de citoquinas pro-inflamatorias por parte de los macrófagos^{365–367}. Debido a estas diferencias inmunológicas, sumado a que previamente nuestro grupo de trabajo observó un incremento en la población de células Tregs al utilizar una vacuna celular cuya formulación incluía IL-2³⁵⁴, para mejorar el efecto terapéutico en el presente estudio planteamos el uso de IL-15 como parte de la vacuna.

La IL-15 ha mostrado efectos antitumorales en modelos murinos incluyendo carcinoma de colon MC38, CT26, NXS2 neuroblastoma, melanoma B16, rhabdomiosarcoma, adenocarcinoma de pulmón (LA795). En Van den Bergh et al., 2014 se revisa gran parte de los ensayos pre-clínicos realizados hasta la fecha, la mayoría en combinación con otras terapias, ya sea administrada con otras citoquinas, con terapia adoptiva de células, con inhibidores de los puntos de control, y quimioterapia³⁶⁸. Respecto a los ensayos clínicos, se han probado distintas terapias combinadas^{368,369}. Una utiliza quimioterapia (fludarabina/ciclofosfamida) con terapia adoptiva de células e IL-15 humana recombinante en pacientes con leucemia mieloide aguda (NCT01385423), melanoma (NCT01369888) y otros tumores sólidos en etapa avanzada (NCT01875601). La segunda estrategia combina el uso de una vacuna a células dendríticas con IL-15 luego de la cirugía en pacientes con melanoma en estadio III o en estadio IV (NCT01189383). Aunque existe evidencia que la administración de IL-15 es eficiente como tratamiento antitumoral los resultados aún no son óptimos. Se ha observado que IL-15 unida al receptor 15R α tiene mayor afinidad por IL-15R β / γ C que la IL-15 libre. La unión del complejo IL-15/IL-15R α a IL-15R β / γ C en la superficie de la célula efectora se conoce como transpresentación^{362,370–374}. Esto llevó a probar la tercera combinación (ALT-803), la cual utiliza IL-15 con el dominio sushi de IL-15R α y ha sido previamente probado en un modelo de mieloma múltiple murino y un modelo

de cáncer de vejiga^{375,376}. La terapia con ALT-803 se utilizará en estos ensayos clínicos para tratar el mieloma múltiple (NCT02099539), el cáncer de vejiga (NCT02138734) y el melanoma avanzado (NCT01946789). Se ha observado que el uso del complejo IL-15/IL-15R α mejora la proliferación y aumenta la actividad antitumoral de las células NK y T CD8⁺, lo que conduce a una respuesta antitumoral mejorada respecto a la utilización de IL-15 sola^{371,377,378}.

Como mencionamos anteriormente para la transferencia adoptiva de células NK, en la actualidad la expansión y activación *ex vivo* se realiza con IL-15 (sumado a IL-12 e IL-18) en lugar de hacerlo con IL-2³⁶⁹. Esto es debido a que el uso de IL-15 promueve la memoria de las células NK y estas células en comparación con otro tipo de células NK utilizadas en la transferencia adoptiva tiene un reconocimiento del blanco potenciado, aumento en la capacidad citotóxica, aumento en la producción de IFN- γ y TNF en respuesta al blanco tumoral, ligación del Fc γ RIIIa, y estimulación del receptor de citoquinas. Estas funciones son mantenidas en las células hijas. Además esta respuesta está potenciada aunque haya receptores de inhibición unidos a sus ligandos. También se ve aumentada la expresión de receptores de activación, citoquinas, y “homing” de las células NK (NKG2D, NKp30, NKp44, NKp46, TRAIL, CD25 (IL-2R α), CD62L)⁸⁹.

3.4.3.3 IFN

Desde hace años se conoce la importancia de los IFNs en la inmunovigilancia e inmunomodulación del cáncer³⁷⁹. Por este motivo la utilización de los mismos podría ser una buena estrategia para el tratamiento antitumoral.

Los IFN tipo I han sido considerados desde hace mucho tiempo como “factores de crecimiento negativos” que contribuyen a la erradicación de patógenos o células tumorales mediante la inducción de la apoptosis, modulando la expresión génica de proteínas claves en el control del ciclo celular y la apoptosis. Inhiben la proliferación celular, estimulan la actividad citotóxica linfocítica, estimulan la actividad fagocítica y tumoricida de macrófagos, estimulan la expresión de antígenos de superficie, y tienen efectos anti-angiogénicos⁷⁶. Administrando a ratones anticuerpos neutralizantes para IFN y desafiándolos posteriormente con diferentes tumores trasplantables, se

demuestra que los IFN tipo I restringen el desarrollo de tumores y constituye un componente esencial de los mecanismos de defensa antitumorales ³⁸⁰.

Los primeros neoplasmas tratados con éxito con IFN, fueron los hematológicos ³⁸¹. Inicialmente se obtuvieron buenos resultados en pacientes portadores de tricoleucemia ³⁸²⁻³⁸⁴. Posteriormente fue utilizado para el tratamiento de la leucemia mieloide crónica, donde se obtuvieron buenas respuestas y fue el tratamiento de primera línea de esta enfermedad hasta la introducción de los inhibidores tirosinquinasa ^{385,386}. IFN- α también ha sido utilizado con éxito en el tratamiento de tumores sólidos. Se han reportado resultados alentadores en melanoma, carcinoma de células renales, tumores neuroendocrinos, carcinoma hepato-celular, sarcoma de Kaposi, entre otros ³⁸¹.

El IFN- γ regula el crecimiento tumoral en forma directa e indirecta: ejerce efectos citostáticos y citotóxicos en las células tumorales, induce la expresión de quimioquinas que inhiben la angiogénesis, aumenta la expresión de moléculas de MHC I y II, y es un potente activador de macrófagos ⁶¹. En cuanto al uso de esta citoquina en ensayos clínicos se ha realizado un ensayo en fase III en pacientes con cáncer de ovario, donde se demostró que la administración de IFN- γ junto con quimioterapia genera un incremento significativo en la supervivencia libre de enfermedad con una toxicidad aceptable ³⁸⁷. Sin embargo, el IFN- γ no mostró beneficios en términos de progresión de la enfermedad y supervivencia en el tratamiento de pacientes con carcinoma renal metastásico ³⁸⁸.

Los IFN tipo III, (IFN- λ) juegan un rol crucial controlando las infecciones virales y estableciendo una respuesta inmune innata antitumoral. IFN- λ se ha probado en modelos animales de cáncer, enfermedades autoinmunes e infecciones virales, y los resultados obtenidos de ensayos clínicos de pacientes con hepatitis C se fueron exitosos ³⁸⁹. Aunque aún no se han realizado ensayos clínicos con pacientes portadores de neoplasias hematológicas, por los resultados obtenidos a nivel pre-clínico, se cree que la utilización de IFN- λ podría ser una estrategia terapéutica promisorio ³⁸⁹.

3.4.3.4 GM-CSF

GM-CSF es una citoquina que estimula la proliferación y diferenciación de las colonias de granulocitos y macrófagos y otras células relacionadas como monocitos y

DCs³⁹⁰. Además, prolonga la supervivencia de los TILs y de esta forma mejora la actividad antitumoral³⁹¹. Se ha evaluado su aplicación como un “booster” inmunológico en ensayos clínicos en melanoma, cáncer colono rectal y carcinoma mamario³⁹⁰. En un modelo pre-clínico de LNH A20 se demostró que la vacunación con células tumorales transfectadas con el gen codificante para GM-CSF genera respuesta inmune específica antitumoral y es capaz de erradicar el linfoma³⁹². Cartron y col. publicaron los resultados de la terapia combinada de rituximab y GM-CSF en pacientes con LF en recaída³⁹³. Se observó una mayor tasa de respuesta si se compara con la monoterapia con rituximab³⁹³. Se postula que GM-CSF favorece una presentación antigénica efectiva por las APCs y de esta forma se mejora la activación de las células T CD8⁺ citotóxicas. Asimismo, favorece la activación y maduración de las DCs.

3.4.3.5 Otras citoquinas con potencial terapéutico

IL-21 es una citoquina miembro de la familia IL-2/IL15. Es producida por células T CD4⁺ TH1, TH2 y TH17 y NKT³⁹⁴. IL-21 por sí solo tiene poco efecto sobre células T CD8⁺ en reposo, pero luego de su activación, IL-21 promueve la expansión y la actividad antitumoral de estas células, promoviendo la diferenciación a CTL y fenotipo de memoria³⁹⁵, y la proliferación y maduración de células NK³⁹⁶. Las células B expresan altos niveles de IL-21R e IL-21, siendo una citoquina clave para la diferenciación de células B en células plasmáticas, estableciendo un fenotipo de memoria y respuesta humoral a largo plazo³⁹⁷. Asimismo, se piensa que inhibe el desarrollo y las funciones de Tregs³⁹⁸. Sin embargo, al igual que la IL-2 promueve la función AICD, y también puede promover la apoptosis, eliminando células B activadas y plasmáticas³⁹⁹.

Se observó que IL-21 tiene receptores en algunas neoplasias de células B, incluyendo LNH indolentes y agresivos, y leucemia linfocítica crónica. Contrariamente a la estimulación que genera esta citoquina en las células B normales, en las células neoplásicas estimula la apoptosis. Esto se ha demostrado en algunas líneas celulares tumorales linfoides y en tumores primarios, particularmente en LDGCB⁴⁰⁰. Un ensayo clínico fase I en pacientes con LNH en recaída mostró que con la administración de rituximab junto a IL-21, se logra una respuesta en pacientes que previamente eran resistentes a rituximab, con efectos secundarios menores. Recientemente se ha

iniciado un ensayo en fase II ⁴⁰⁰. Los ensayos pre-clínicos y clínicos se resumen en ^{353,357}.

La IL-12 es una citoquina heterodimérica pro-inflamatoria, y el primer miembro de la familia de las citoquinas IL-12, incluyendo también IL-23, IL-27 e IL-35. La IL-12 se secreta principalmente por APCs en respuesta a patógenos, promoviendo la diferenciación de células CD4⁺ en células Th1 ³⁵³. Tiene un efecto proliferativo sobre las células NK y T pre-activadas, mejora la capacidad citolítica de las células NK y T CD8⁺ de forma independiente y/o sinérgica mediante la regulación positiva de genes que codifican proteínas asociadas a gránulos de células citotóxicas ³⁵³. También estimula la ADCC en células tumorales que tienen anticuerpos unidos a la superficie, en una concentración considerablemente menor que la IL-2. Las células efectoras estimuladas por IL-12 producen varias citoquinas pro-inflamatorias como IFN- γ , GM-CSF y TNF- α . El receptor IL-12R es expresado principalmente por células NK y T activadas. Inhibe las células Treg presentes en el microambiente tumoral, ya sea mediante la supresión de la producción de IL-2 por parte de las células T, por inducción de la apoptosis, o por el arresto celular mediada por IFN- γ ³⁵³.

En estudios pre-clínicos se determinó la actividad antitumoral de la administración sistémica o local de IL-12 contra diversas líneas celulares tumorales. La respuesta fue dependiente de la dosis y del modelo, además, se observó un efecto antitumoral de memoria. Los ensayos clínicos iniciales se interrumpieron temporalmente después de que se observaron muertes relacionadas con la toxicidad inesperada en el ensayo de fase II en pacientes con carcinoma renal metastásico y melanoma ^{401,402}. Estas estrategias comprendían la entrega de IL-12 exógena en sitios específicos, la modificación genética de las células para que secreten IL-12 o la coadministración de vacunas con antígenos tumorales ⁴⁰³.

3.5 Inmunoterapia activa específica

La inmunoterapia activa incluye a las vacunas antitumorales que tienen como finalidad generar en el huésped portador del tumor, una respuesta inmune sistémica capaz de rechazar las células neoplásicas y a su vez promover el desarrollo de memoria inmunológica a largo plazo para prevenir futuras recaídas ⁴⁰⁴. Para generar este ideal

de vacuna el principal obstáculo es lograr identificar un antígeno blanco apropiado capaz de generar una respuesta inmunológica que supere la tolerancia generada por las células tumorales ^{404,405}.

El concepto de vacunas en enfermedades neoplásicas es diferente al concepto de vacunas en enfermedades infecciosas. Mientras en estas últimas, la vacuna se dirige contra un antígeno bien conocido, muy inmunogénico y con un fin claramente preventivo, en el caso de los tumores, el antígeno no siempre es conocido, es débilmente inmunogénico y la primera intención es terapéutica. Un paso básico en el desarrollo de prácticamente todas las vacunas es aumentar la inmunogenicidad del antígeno contra el que se dirige la respuesta, por ejemplo, mediante la utilización de adyuvantes, la transfección de genes (*gm-csf*, *il2*, *ifng* u otra citoquina o molécula co-estimuladora) en la célula tumoral u otro vector ⁴⁰⁶.

3.5.1 Vacunas proteicas

Los avances en la identificación de los antígenos expresados en las células tumorales han hecho posible el desarrollo de vacunas dirigidas específicamente contra antígenos tumorales. La estrategia de vacuna contra cáncer más común es administrar antígenos proteicos recombinantes a pacientes con cáncer, junto con uno o más adyuvantes inmunoestimuladores para promover la maduración de DC ⁴⁰⁵. Esta aproximación ha cobrado especial importancia en los LNH a células B, dado que representan el tumor ideal para el desarrollo de vacunas proteicas, debido a que la inmunoglobulina sintetizada y expresada en células B tumorales es uno de los pocos antígenos específicos de tumor conocido ⁴⁰⁷. Mediante vacunas que incluyan dicho idiotipo (Id) en su formulación (vacunas idiotípicas), se puede inducir una respuesta inmune que destruya las células B tumorales que expresan la Ig que contiene el Id, sin perjudicar las células B normales.

En el año 1992, Kwak y col. reportaron por primera vez un ensayo clínico fase I/II con vacunas idiotípicas en LF, donde utilizaron una vacuna en la que el Id se conjugó con hemocianina de lapa californiana (KLH, del inglés) y el adyuvante SAF-1 como transportador inmunológico para el Id ⁴⁰⁸. Demostraron que la vacuna idiotípica fue capaz de inducir una respuesta inmune específica en términos de respuesta

humoral frente al mismo Id. Este trabajo proporcionó la primera prueba formal de que se puede inmunizar contra un antígeno derivado de un tumor autólogo, y de sus exitosos resultados se desprendieron ensayos clínicos con buenas tasas de respuesta al tratamiento. Sin embargo, luego de los resultados alentadores de los ensayos clínicos en fase I / II utilizando vacunas idiopáticas en LNH, el resultado de los tres ensayos en fase III (Genitope, Favrilite y Biovest) ha sido decepcionantes (revisado en ⁴⁰⁹). Es probable que la diferencia de resultados entre los ensayos en fase I/II y los en fase III pueda ser resultado de diferencias en los diseños de los estudios, preparación de la vacuna y los regímenes de quimioterapia utilizados en el tratamiento de inducción. Los resultados del estudio aleatorizado de fase III de la vacuna BiovaxID no mostraron diferencias en la supervivencia. Sin embargo, sorprendentemente, los pacientes que recibieron la vacuna tuvieron una mediana de 44 meses de supervivencia libre de progresión en comparación con 30 meses para los pacientes que recibieron placebo ⁴¹⁰. Se ha estudiado la asociación de otros adyuvantes inmunológicos a la formulación de la vacuna. Entre el panel de citoquinas probados en modelos murinos para potenciar el efecto del Id-KLH, el GM-CSF ha demostrado ser el más eficaz ^{411,412}. Este concepto fue trasladado a la clínica y el grupo de Kwak condujo un estudio en fase II en pacientes con LF, los cuales se trataban con quimioterapia seguida de administraciones mensuales de la vacuna Id-KLH junto GM-CSF ⁴¹³. En la actualidad se encuentran en curso ensayos con pacientes portadores de LNH, combinando el uso de estas vacunas con otras terapias (rituximab, quimioterapia) ⁴¹³.

3.5.2 Vacunas de ADN

Una alternativa a las vacunas Id es el uso de las llamadas vacunas de ADN desnudo. Estas vacunas pueden ser producidas rápidamente (2 a 4 semanas) con técnicas de biología molecular, lo que representa una ventaja sustancial sobre las vacunas proteicas ⁴¹⁴.

Las vacunas de ADN desnudo consisten en un plásmido en el que se clonan determinados genes que codifican la proteína tumoral, citoquinas u otras proteínas. El ADN plasmídico está compuesto por una unidad transcripcional dirigida por un potente promotor, capaz de inducir la síntesis de la proteína y una secuencia

inmunoestimuladora, que estimula la respuesta inmune promoviendo la liberación de IFN- γ , IFN- α , IL-12 e IL-18, y dirigiendo la respuesta inmune hacia un patrón de tipo Th1⁴¹⁵. Cuando este tipo de vacunas es inyectado de forma intramuscular o subcutánea, las células del huésped se transfectan creando una zona de expresión ectópica de la proteína. La proteína liberada por la célula diana es captada por las células presentadoras locales y después de ser adecuadamente procesada se presenta al sistema inmune en los órganos linfoides secundarios⁴¹⁴. Las vacunas así producidas tienen un bajo potencial inmunogénico y por ello también se introduce en el plásmido información genética que codifique para inmunomoduladores o citoquinas que aumenten la inmunidad natural frente al tumor al ser liberadas continuamente por las células transfectadas.

Se han ensayado estas vacunas para numerosos antígenos de melanoma (tirosinasa, gp75/TRP-1, DCT/TRP-2, gp100, melanA/MART-1, etc), cánceres epiteliales (CEA), cáncer de próstata (PSA), de ovario (MUC-1), LMC (Bcr-Abl), entre otros⁷⁶. En el caso de los tumores de células B, como ya hemos dicho el Id de la inmunoglobulina es claramente un antígeno específico de tumor que puede ser utilizado en vacunas de ADN. Estudios realizados en modelos murinos han mostrado que la vacunación con plásmidos de ADN que codifican para el Id induce protección contra posteriores desafíos con células linfomatosas⁴¹⁶. Estudios posteriores mostraron que la fusión de los genes de citoquinas (GM-CSF) o genes de quimioquinas (MIP-1 α) al gen del Id puede mejorar la respuesta inmune anti-Id y generar protección contra LNH en forma comparable o incluso mejor que la vacuna proteica⁴¹⁴. También se ha ensayado fusionar el gen de Id con el gen de la toxina tetánica⁴¹⁴.

3.5.3 Vacunas basadas en vectores virales o bacterianos

Los vectores virales y bacterianos pueden utilizarse para transportar un gen de interés, presentando cada uno de ellos ventajas e inconvenientes inherentes a sus propias características. Los vectores bacterianos son menos inmunogénicos, no presentan límite en el tamaño de la información que pueden transportar y son fáciles de producir. Los vectores virales por su parte, son eficaces a la hora de transducirse en las células diana pero suelen tener un límite en el tamaño del transgén a insertar en su

genoma, a la vez que pueden presentar ciertas complicaciones técnicas en su producción a gran escala ^{417,418}.

Estas vacunas tienen la ventaja sobre las vacunas de ADN desnudo que son altamente inmunogénicas. Los productos microbianos (bacterias y virus) son potentes activadores del sistema inmune. Mientras otras subunidades vacunales necesitan ser administradas junto con adyuvantes para generar respuestas inmunes efectivas, los vectores virales y bacterianos presentan sus propios factores inmunomoduladores por lo que pueden ser administrados solos y generar buenas respuestas, hecho que los convierte en una alternativa interesante para la generación de vacunas antitumorales ^{419,420}. El uso de esta aproximación es atractiva porque: a) los virus infectan numerosos tipos celulares incluyendo DCs lo cual conduce a una presentación antigénica directa e indirecta al sistema inmune; b) las infecciones virales aportan “señales de peligro” lo cual resulta en la activación del sistema inmune innato, creando un ambiente inflamatorio que es crucial para el reclutamiento y activación de células del sistema inmune adaptativo; c) muchas proteínas virales son altamente inmunogénicas y pueden actuar como señales de “ayuda” en la generación de una respuesta inmune antitumoral potente ⁷⁶. Adicionalmente, los virus pueden ser también manipulados para que porten moléculas inmunoestimuladoras como citoquinas, moléculas co-estimuladoras y quimioquinas ⁷⁶.

Se han construido diversos sistemas de vectores virales. En LNH se han utilizado adenovirus que codifican para los genes Id, y se demostró en modelos animales que fueron capaces de generar respuesta inmune específica contra el linfoma ⁴²¹. Además, se observó que la inmunidad antitumoral conseguida fue mayor con este tipo de vacuna que con las clásicas vacunas proteicas o de ADN desnudo que utilizan el Id ⁴¹⁴.

Los vectores bacterianos diseñados para inducir una respuesta inmune pueden ser vehículos de liberación de proteínas o de ADN ⁴¹⁷. La bacteria es transformada con plásmidos o presenta modificaciones genómicas para expresar genes bajo el control transcripcional de la bacteria ⁷⁶. También se utiliza la expresión de las proteínas bajo promotores eucariotas, de modo que la bacteria portando el gen de interés es fagocitada por diferentes fagocitos y a nivel intracelular ocurre el pasaje del plásmido al citosol de la célula huésped. Posteriormente los genes son expresados bajo un

promotor eucariota y la proteína resultante es presentada en moléculas de MHC I y II a las células T CD4⁺ y CD8⁺ ⁷⁶. Las bacterias más utilizadas para este abordaje incluyen: *Clostridium*, *BCG*, *Shigella flexneri*, *Salmonella typhi*, *Salmonella typhimurium*, *Listeria monocytogenes*, entre otras ⁴¹⁷. Las bacterias genéticamente modificadas pueden expresar y liberar proteínas citotóxicas, tales como toxinas bacterianas, proteínas inmunorreguladoras y factores inductores de la apoptosis ^{321,324}. También pueden ser diseñadas para llevar enzimas que conviertan pro-fármacos no tóxicos en fármacos citotóxicos (Fig. 15) ^{321,324}.

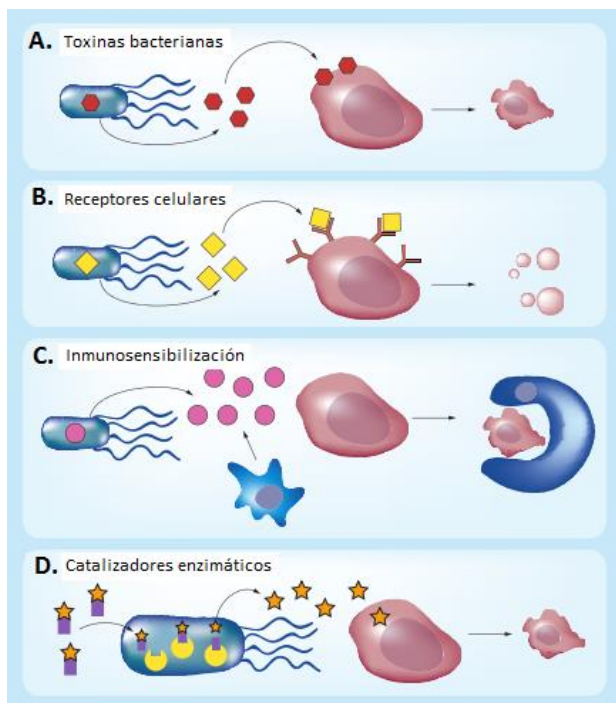


Figura 15. Entrega de proteínas por parte de las bacterias. A. La bacteria puede expresar toxinas que directamente matan a la célula tumoral. B. La bacteria puede producir proteínas de origen eucariota que interacciona con receptores de la superficie de las células tumorales. Estas proteínas a menudo tienen como blanco de acción vías de señalización para la apoptosis. C. La bacteria puede ser modificada para expresar por ej. Citoquinas que atraen granulocitos y DC, que promueven la eliminación de las células tumorales. D. Las bacterias pueden expresar enzimas que catalizan la conversión de pro-drogas (no tóxicas) a drogas con acción terapéutica. Imagen modificada de ³²⁴.

Uno de los vectores bacterianos más ampliamente utilizado en inmunoterapia para el cáncer es *Salmonella* ^{318,320,338}. Inicialmente en 1997 Darji y col. reportaron la utilización de *S. Typhimurium* como vehículo para el transporte de dos factores de virulencia de *L. Monocytogenes*, listeriolisina O y Act A mediante inmunización oral a ratones BALB/C, generando inmunidad de mucosas e inmunidad sistémica, mostrando la factibilidad de utilizar a esta bacteria como vector para vacunas ADN ⁴²². Posteriormente, muchos trabajos mostraron la generación de respuestas inmunes específicas utilizando *Salmonella* como vector para vacunas de ADN. Actualmente, el

desarrollo en la utilización de *Salmonella* se centra en la utilización de la misma como vector de diversos genes, tales como, citoquinas, moléculas co-estimuladoras, pro-drogas y agentes tóxicos para el tumor ^{318,423}.

3.5.4 Vacunas a células dendríticas

El papel crítico de las DCs en el inicio de la respuesta inmune las hace atractivas para su uso en estrategias terapéuticas contra el cáncer. Estudios realizados en modelos murinos de LNH muestran que la vacunación con DCs pulsadas con Id estimulan una respuesta inmune antígeno específica que mostró ser superior a la obtenida con la clásica vacuna proteica de Id-KLH-GM-CSF ⁴²⁴. Por su parte, el número de ensayos clínicos con DCs ha crecido sustancialmente en los últimos años en pacientes con diferentes tipos de cáncer. En particular para neoplasias hematológicas, el primer ensayo publicado con el uso de estas células, empleó DCs autólogas pulsadas con el Id en cuatro pacientes con LNH folicular y se demostró la inducción de linfocitos T específicos ⁴²⁵. Estos resultados preliminares se actualizaron en el 2002, incluyendo un total de 35 pacientes y se confirmó la eficacia antitumoral de esta vacuna ⁴²⁶. Pyzer y col. revisan los ensayos clínicos posteriores que incluyen el uso de vacunas a DCs basadas en Id en LF y mieloma múltiple, y cargadas con proteínas autólogas en pacientes con leucemia ⁴²⁷. Hasta el momento, la única vacuna aprobada por la FDA que utiliza DCs es Sipuleucel-T (Provenge), en pacientes con cáncer de próstata avanzado ⁴²⁸.

Con el objetivo de mejorar los blancos de acción, potenciar la inmunogenicidad, optimizando la presentación antigénica, y la susceptibilidad al microambiente tumoral de las DCs, se está utilizando ingeniería genética, incluyendo la introducción de ARN mensajero y el pequeño ARN interferente, transducción génica viral, e incluso fusión con células tumorales enteras ⁴²⁹.

3.5.5 Vacunas a células enteras

Las vacunas a células enteras se basan en que las células tumorales son capaces de presentar sus propios antígenos a las DCs o células T. Las principales ventajas de este tipo de vacunas son que no se requiere caracterizar los antígenos

tumorales para la construcción de vacunas y que se logra generar una respuesta inmune antitumoral polivalente contra muchos antígenos tumorales. Las vacunas a células enteras pueden ser especialmente útiles cuando no se conocen los antígenos contra los que debe ir dirigida la respuesta, hecho muy frecuente en cáncer. Para este tipo de vacunas suelen usarse células tumorales obtenidas del paciente, cultivadas y dañadas de forma irreversible (irradiadas), para evitar su propagación cuando se re-infunden.

Los LNH-B son un grupo especial de neoplasias, ya que las propias células tumorales son APC. Datos experimentales han mostrado que las células B tumorales en comparación con las células B normales son ineficientes en la presentación de antígenos (probablemente porque disminuyen la expresión de MHC y moléculas co-estimuladoras) y por lo tanto la construcción de una vacuna celular en este tipo de neoplasias puede conducir a la anergia de las células T más que a su activación^{218,430}. En este sentido se han desarrollado numerosas estrategias tendientes a aumentar la inmunogenicidad de las propias células tumorales para poder utilizarlas en la construcción de vacunas celulares. Las células tumorales pueden ser genéticamente modificadas para secretar citoquinas y quimioquinas que contribuyan a la activación de las APC y células T. Entonces, la combinación de antígenos tumorales específicos presentados en las células tumorales vivas dañadas irreversiblemente con niveles localmente elevados de inmunomoduladores, puede potenciar notablemente la respuesta inmune de las células. Estudios en modelos animales de diferentes tumores han demostrado que la vacunación con células tumorales modificadas genéticamente para expresar citoquinas (IL-2, IL-12, IL-4, IL-17, IL-6, IL-18, IFN- γ y GM-CSF) estimula a las células T y posteriormente éstas son capaces de destruir a las células tumorales^{76,414}. Previamente, nuestro grupo de trabajo desarrolló una vacuna donde la célula tumoral B es modificada mediante la infección *in vitro* con *Salmonella*, demostrando que dicha infección mejora la expresión de moléculas co-estimuladoras y MHC II, convirtiéndolas probablemente en mejores APC⁴³¹.

Cuando no se dispone de tumor autólogo, se utilizan vacunas producidas con células multivalentes de cultivos que se producen tras el procesamiento de varias líneas de células tumorales cultivadas *in vitro*, siendo por tanto vacunas de células no procedentes del paciente²⁶⁷. Con la mezcla de varias cepas se intenta que alguno de

los antígenos incluidos en la mezcla sea expresado por las células tumorales del paciente. La ventaja de estas vacunas es que no es necesario obtener células tumorales del propio paciente para cultivar. Sin embargo, su principal desventaja es que son vacunas poco eficaces, probablemente porque gran parte de la respuesta inmune se organice contra antígenos irrelevante, no presente en el tumor del paciente. Para aumentar la inmunogenicidad de estas vacunas, las células enteras se transfectan para producir citoquinas o expresar moléculas co-estimuladoras, posteriormente se irradian para eliminar la tumorigenicidad ²⁶⁷. En este sentido, se llevaron a cabo ensayos clínicos con una línea celular humana transducida con GM-CSF. Esta línea celular fue elegida porque mostraba una muy baja expresión de MHC de clase I y II, lo cual permitía reducir al mínimo las posibilidades de rechazo. Los ensayos clínicos con este abordaje fueron realizados en pacientes con mieloma múltiple a los cuales se les administraron células tumorales autólogas irradiadas junto a la línea celular transducida con GM-CSF. Esta vacuna no presentó eficacia clínica y el ensayo fue discontinuado ⁴³². Utilizando otra estrategia diferente, se intenta aumentar la capacidad presentadora de antígeno de las células tumorales. Se utiliza virus recombinante para transferir moléculas co-estimuladoras a las células tumorales (B7-1, B7-2, 4-1BBL, ICAM, LFA-3, CD40L, MHC II) y lograr mejorar su inmunogenicidad ^{76,414}. Se han reportado dos ensayos clínicos en pacientes con leucemia linfocítica crónica a células B utilizando este tipo de estrategias. En el primero, las células tumorales autólogas son transducidas *ex vivo* utilizando un adenovirus recombinante con CD40L y luego reinfundidas en el paciente. No se observó toxicidad con este tratamiento y existió respuesta clínica ⁴³³. En otro estudio, los pacientes recibieron inyecciones subcutáneas de células tumorales autólogas transducidas con un adenovirus codificando IL-2 y CD40L ⁴³⁴. Se observó activación de células T y el 30% de los pacientes obtuvieron respuesta parcial lo cual sugiere que la inmunoterapia basada en CD40 puede ser útil en pacientes con LNH-B.

Una estrategia que favorece el microambiente en el cual interaccionan el antígeno y el sistema inmune es utilizar diferentes tipos de adyuvantes ⁴³⁵. Por ejemplo los compuestos de aluminio, emulsiones de aceite o agua, bacterias, compuestos derivados de las plantas, citoquinas, y agonistas TLRs, son algunos de los adyuvantes que pueden ser utilizados junto a las vacunas celulares ⁷⁶. El uso de adyuvantes

potencia la respuesta inmunitaria antitumoral en las terapias que se basan en células irradiadas como fuente de antígenos ⁴³⁶. La búsqueda de adyuvantes efectivos para utilizar en nuevas inmunoterapias es un área de desarrollo de gran interés. La elección del adyuvante a utilizar depende de varios criterios, como la especie blanco a la que va dirigida la inmunoterapia, el tipo de antígeno a utilizar, la ruta de administración, el tipo de respuesta inmunitaria esperada y la duración de la misma ⁴³⁷.

En el presente trabajo una de las inmunoterapias planteadas es utilizar una vacuna a células enteras formulada con células B de linfoma A20 modificadas para que expresen de forma estable la citoquina IL-15, infectadas con *Salmonella* para que aumenten la expresión de moléculas co-estimuladoras y MHC II, e irradiadas para eliminar su capacidad tumorigénica.

3.6 Enfermedad mínima residual

3.6.1 Definición

La enfermedad mínima residual (EMR) hace referencia a la persistencia de una cantidad pequeña de células malignas luego del tratamiento con intención curativa del cáncer. Es la enfermedad que persiste por debajo del nivel de sensibilidad de las técnicas convencionales utilizadas para identificar la remisión de la enfermedad (en LNH tomografía por emisión de positrones/tomografía computarizada (PET/CT), e inmunofenotipo e histología en médula ósea). Se cree que estas células residuales constituyen la fuente de recidiva de la enfermedad ¹.

3.6.2 Detección de la EMR

Dependiendo del tipo de linfoma, existen diferentes métodos para detectar EMR, incluyendo PCR a tiempo final, PCR cuantitativa (qPCR), secuenciación de nueva generación, inmunofenotipo por citometría de flujo, citogenética, entre otros. Para LNH las más utilizadas son la citometría de flujo, PCR a tiempo final y qPCR. En particular, para LF se ha observado que la detección de la EMR tiene relevancia clínica, y determina un peor pronóstico para el paciente, por lo que es de utilidad para planificar tratamientos futuros ⁴³⁸⁻⁴⁴³. Estos métodos de PCR están basados en la

detección de secuencias de ADN específicas de tumor, dentro de las cuales encontramos translocaciones (por ejemplo en linfoma folicular la translocación cromosomal t(14;18) y en linfoma de células del manto la t(11;14)), y regiones de unión específicas que resultan del rearreglo de los genes VDJ para la expresión de la cadena pesada de la inmunoglobulina ^{444,445}. En la actualidad se están utilizando técnicas como secuenciación de nueva generación para detectar y cuantificar ADN de tumor que circula en sangre debido a la apoptosis y necrosis de las células neoplásicas ⁴⁴⁶⁻⁴⁴⁸. Respecto a la citometría de flujo (CF), en los últimos años se ha investigado la CF de nueva generación (NGF, del inglés), basado en la CF que utiliza el consorcio EuroFlow ⁴⁴⁹.

3.6.3 Importancia del desarrollo de un modelo de EMR

Dado que actualmente disponemos de tratamientos efectivos para lograr respuesta completa o al menos parcial de la mayoría de los LNH y algunas neoplasias hematológicas, una de las principales líneas de investigación es el desarrollo de agentes capaces de eliminar la presencia de EMR para acercarnos a lograr la curación de los pacientes. Existen numerosos ejemplos clínicos, tanto en LNH como en otras neoplasias donde se evidencia que los pacientes en los cuales no se logra demostrar EMR tienen sobrevividas más prolongadas que en los que sí se logra demostrar ^{440,450-452}. Es por ello que actualmente se están buscando estrategias terapéuticas complementarias, con el objetivo de eliminar esa enfermedad residual que se cree es la que determina la recaída de la enfermedad. En este sentido, se ha propuesto realizar trasplante de progenitores hematopoyéticos (TPH) autólogo luego de obtenida la respuesta completa, lo que ha mostrado resultados clínicos dispares en algunos tipos de linfomas, mientras que en otros es el estándar actual de tratamiento ⁴⁵³. También se han realizado ensayos con TPH alogénico como terapia de consolidación, pero la elevada mortalidad relacionada al procedimiento hace que no sea una opción terapéutica válida en el tratamiento de primera línea de este grupo de pacientes. Otro de los abordajes utilizados para intentar erradicar la EMR es la utilización de radioinmunoterapia (con anticuerpos anti-CD20) luego de lograda la respuesta con la inmunoterapia ⁴⁵⁴. Una estrategia terapéutica exitosa utilizada

actualmente en los linfomas indolentes es el tratamiento de mantenimiento con rituximab por 2 años luego de alcanzada la remisión de la enfermedad con inmunoterapia. Este plan de tratamiento se basa en el concepto que el rituximab puede eliminar la enfermedad residual que queda luego del tratamiento de inducción ²⁷³. Actualmente, se está ensayando la utilización de nuevas drogas (inhibidores del proteosoma, inmunomoduladores, anticuerpos monoclonales, inhibidores tirosin-quinasa, entre otros) como terapia de consolidación o mantenimiento luego de lograda la remisión completa de la enfermedad con la quimioterapia ^{21,22,414,455,456}.

Es en esta situación clínica donde la inmunoterapia juega un rol fundamental. Para la mayoría de los autores es claro que la inmunoterapia activa debe ser aplicada en pacientes con baja carga tumoral, en situación de EMR negativa o con muy baja carga tumoral. Algunos de los ensayos clínicos que aplican vacunas en LNH y que mostraron respuesta inmune antitumoral específica fueron realizados luego de obtenida la respuesta completa/parcial con quimioterapia citorreductora ^{457,458}.

En la actualidad, los estudios pre-clínicos de inmunoterapias activas contra LNH se llevan a cabo principalmente en animales con alta carga tumoral, que no han recibido tratamiento previo, mientras que los ensayos clínicos se realizan en pacientes que fueron sometidos a quimioterapia y están en remisión completa o parcial ^{407,459}. Por lo tanto, los modelos murinos por lo general no se asemejan al escenario clínico y esto puede ser una razón para explicar la inconsistencia en los resultados al pasar de los ensayos pre-clínicos a los ensayos clínicos (fase I o II) ⁴⁶⁰. El desarrollo de nuevos modelos pre-clínicos que imiten el entorno clínico, o sea un modelo en el cual los animales alcancen la remisión completa con quimioterapia, desarrollando posteriormente el estado de EMR, podría ser una herramienta valiosa para explorar nuevas estrategias terapéuticas ⁴⁶¹.

3.6.4 Imagenología Molecular: PET

El PET es una técnica de medicina nuclear que se basa en el uso de ligandos radioactivos que pueden marcar estructuras moleculares específicas en organismos vivos. Esta técnica ofrece la posibilidad de visualizar y cuantificar la actividad de las

células en órganos específicos, aportando información directa acerca de la bioquímica y la función del área. La morfología es aportada por la tomografía computarizada incluida en las cámaras PET (PET/CT). Es así que la imagenología funcional con PET ha alcanzado un rol fundamental en el estudio de enfermedades oncológicas a nivel mundial debido a su capacidad de detectar el cáncer por medio de mecanismos basados en las alteraciones moleculares de los procesos neoplásicos ⁴⁶²⁻⁴⁶⁴. El trazador más utilizado en oncología, y específicamente en LNH, es un análogo de la glucosa marcado con flúor: ¹⁸F-2-flúor-2-desoxi-D-glucosa (¹⁸F-FDG). De esta forma, el PET detecta la retención tumoral de FDG, debido al mayor índice glucolítico de las células cancerosas. Mediante PET/CT es posible diagnosticar, estadificar, re-estadificar y evaluar la respuesta a tratamientos en numerosos tipos de cánceres, con exactitudes diagnósticas francamente superior a las técnicas imagenológicas convencionales ^{465,466}.

En lo que respecta a los LNH, diversos estudios han demostrado aumento de captación de FDG en la mayoría de los linfomas, sobre todo linfomas de Hodgkin y LNH agresivos, con una correlación entre la intensidad de captación, el grado de malignidad y la actividad proliferativa ^{467,468}. Los resultados en linfomas indolentes han sido variables, con captación positiva entre el 40% y el 98% de los casos ^{469,470}. Los linfomas más frecuentes (LDGCB, LF, linfoma del manto y LH) muestran un aumento de captación de FDG, con sensibilidad mayor del 80% y especificidad del 90%, por lo que la PET-FDG puede proporcionar información complementaria en tres momentos clave del proceso diagnóstico y terapéutico de los pacientes con linfoma: en el estudio inicial de extensión, en la valoración de la respuesta al final del tratamiento y en el seguimiento tras completar el tratamiento previsto ^{17,471-473}. En cuanto a nuestro modelo tumoral, existe un trabajo que demuestra que las células linfomatosas A20 captan FDG ⁴⁷⁴. La utilización de esta herramienta para evaluar la inmunoterapia en el modelo de EMR puede ser muy ventajosa ya que permite evaluar la respuesta al tratamiento sin necesidad de sacrificar los animales. El PET-FDG presenta una excelente correlación entre las imágenes y la autopsia en las lesiones tumorales no palpables ⁴⁷⁴. Además, es útil en la detección precoz y seguimiento de lesiones tumorales internas que no pueden ser valoradas con la palpación.

4 OBJETIVOS

4.1 Objetivo general

Desarrollar un nuevo modelo de Linfoma no Hodgkin, y evaluar su utilidad para estudiar la efectividad de nuevas inmunoterapias en un contexto mas cercano a la clínica.

4.2 Objetivos específicos

- 1) Desarrollar y caracterizar un modelo de EMR de LNH utilizando la línea tumoral A20 en ratones BALB/c y quimioterapia estándar tipo CHOP.
- 2) Incorporar técnicas imagenológicas de frontera para el seguimiento *in vivo* de la enfermedad, y compararla con la técnica “gold standard”.
- 3) Evaluar el efecto terapéutico de una vacuna a células enteras cuya formulación contenga IL-15 en el modelo de EMR .
- 4) Evaluar el uso de *Salmonella* como terapia adyuvante para el tratamiento de LNH en un contexto que incluya quimioterapia.

Con estos estudios esperamos contribuir al desarrollo de nuevas y mas eficaces inmunoterapias para el tratamiento de LNH que puedan replicar su efectividad pre-clínica en estudios clinicos futuros.

CAPÍTULO II

MATERIALES Y MÉTODOS

1 LÍNEAS CELULARES

1.1 Células A20

1.1.1 Características y condiciones de cultivo

La línea celular A20 fue obtenida de American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA). Es una línea murina de Linfoma no Hodgkin, transplantable y singénica con ratones BALB/c. Las células derivan de un neoplasma espontáneo de células reticulares y son células B con morfología de linfoblastos que expresan IgG en su superficie^{218,475}. La línea celular se cultivó en suspensión en medio de cultivo RPMI-1640 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB) (Capricorn, Ebsdorfergrund, Alemania), 2mM L-glutamina (Sigma) y 0,05 mM 2-mercaptoetanol (Sigma), en estufa húmeda a 37°C y 5% CO₂.

1.1.2 Lisado de A20

El lisado de A20, se hizo a partir de 1×10^7 células/ml, utilizando cinco pulsos de 15 minutos en el sonicador Omni Sonic Ruptor 4000 (Omni International, Kennesaw, GA). Posteriormente la suspensión fue centrifugada a velocidad máxima y el sobrenadante se conservó a -80°C hasta el momento de ser utilizado. La concentración de proteína total se estimó utilizando Bradford Reagent (Sigma). Este lisado se utilizó como antígeno específico en los ensayos que involucraron la estimulación de esplenocitos, y para sensibilizar las placas de ELISA de detección de anticuerpos anti-A20.

1.1.3 Células A20 modificadas para que expresen de forma estable la citoquina IL-15

1.1.3.1 Clonado del gen *Il-15* murino

La secuencia codificante para la citoquina IL-15 se obtuvo mediante amplificación por PCR utilizando como molde el plásmico pORF9mIL-15 (InvivoGen, San Diego, CA), cedido gentilmente por la Dra. Ma. Gabriela Kramer. Además del gen *Il15*, el fragmento amplificado también porta el promotor hEF1-HTLV (amplificación de

1.088 pb). Dicho promotor está compuesto por el promotor del Factor de Elongación-1 α (EF-1 α , del inglés) y la región 5' no traducida del virus de la leucemia humana de células T (HTLV, del inglés), y tiene la particularidad de ser un promotor más fuerte que otros, incluyendo CMV, expresándose en altos niveles en todos los ciclos celulares y todos los tipos de células, sin tener especificidad de tejido. Los cebadores para dicha PCR (pBglIII y pEcoRI) se diseñaron de modo que tuvieran sitios de corte para las enzimas de restricción BglIII y EcoRI, que están presentes en el plásmido pcDNA3.1(-) (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA), utilizado como vector de clonaje (Fig. 16A). En paralelo se digirió el fragmento amplificado a partir de pORF9mIL-15 y el plásmido pcDNA3.1(-) con las enzimas BglIII y EcoRII (FastDigest, Thermo Fisher Scientific). Las digestiones se corrieron en un gel de agarosa 0,8% (Thermo Fisher Scientific) y se realizó la extracción de banda utilizando QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN, Hilden, Alemania) (Fig. 16B). Posteriormente se ligaron ambos segmentos utilizando la enzima T4 ADN ligasa (NEB, Ipswich, MA), y se procedió a transformar la cepa DH5 α ; contexto genético que permite la instalación de plásmidos recombinantes que tienen clonados productos de PCR, ya que es una cepa deficiente para la restricción (HsdR $^-$) pero capaz de modificar el DNA por metilación (HsdM $^+$). En todos los casos, la extracción de ADN plasmídico se realizó con QIAprep Spin Miniprep Kit (QIAGEN). Para la selección de los clones transformantes se utilizó el antibiótico ampicilina (Ap) (Sigma), resistencia que porta el vector pcDNA3.1(-). Se realizó la búsqueda de los clones de interés mediante amplificación del fragmento que contiene el gen *IL15* y por análisis de restricción con las enzimas BglIII-EcoRI (libera el fragmento clonado), y KpnI-SalI-PstI (FastDigest, Thermo Fisher Scientific). Una vez obtenido el clon de interés se corroboró la secuencia del inserto mediante secuenciación. Los cebadores utilizados para amplificar el fragmento a clonar y los utilizados para la secuenciación (R1IL-15, R2IL-15 y LIL-15) se muestran en la Tabla 8. La construcción se denominó pcDNA3.1IL-15.

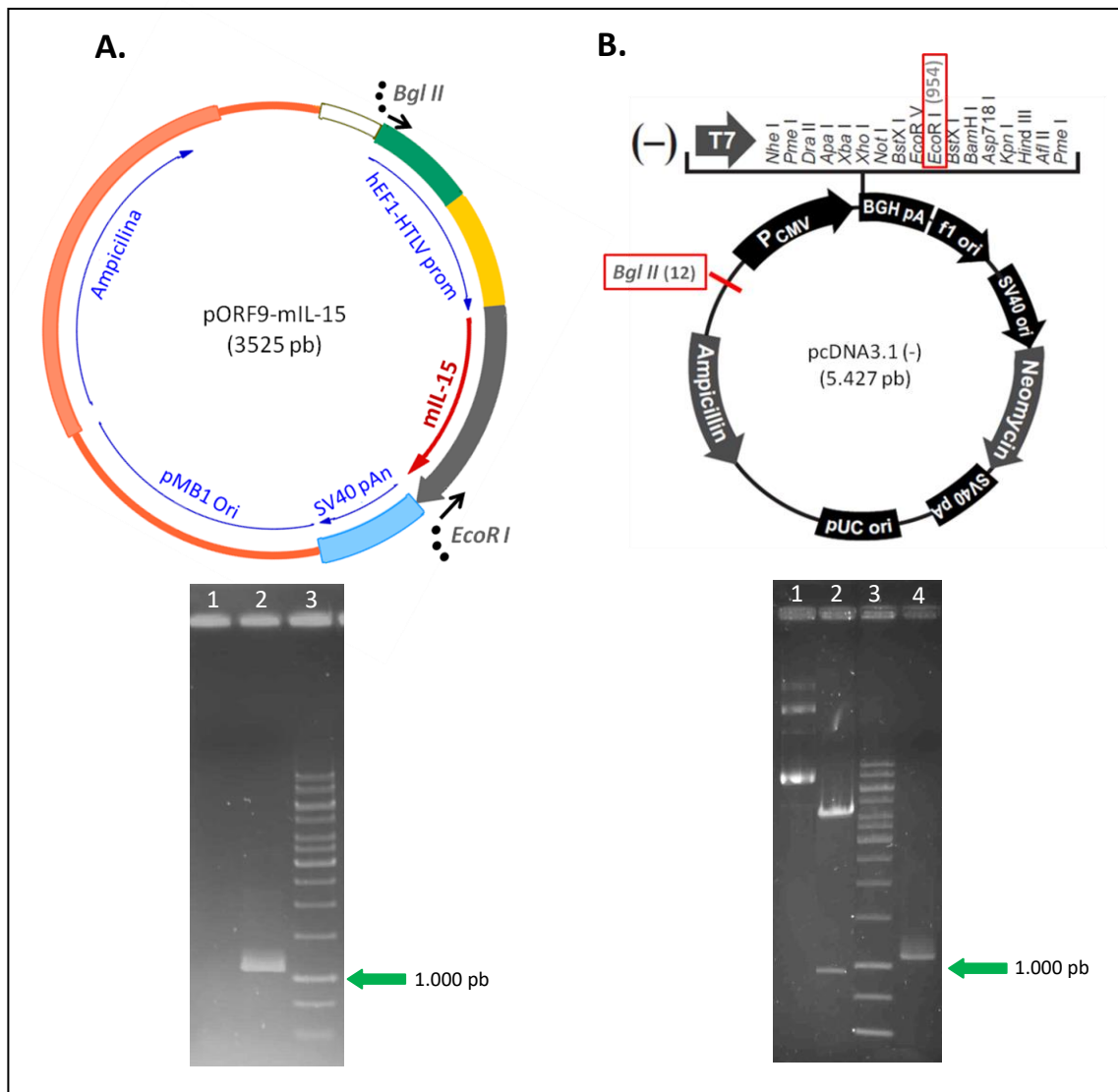


Figura 16. Clonado del gen codificante para la citoquina IL-15 murina. **A.** Amplificación del fragmento que porta el gen *Il-15* con los cebadores pEcoRI y pBgIII utilizando como molde el plásmido pORF9-mIL-15. En el gel de agarosa 0,8% se muestra: 1) control negativo, 2) amplificación del fragmento a clonar a partir de pORF9-mIL-15 (banda de 1.088 pb), 3) Ladder 1Kb (Thermo Fisher Scientific) (bandas de menor a mayor (kb): 0,5, 0,75, 1, 1,5, 2, 2,5, 3, 3,5, 4, 5, 6, 8 y 10). **B.** El vector pcDNA3.1(-) y el fragmento a clonar se digirieron con las enzimas EcoRI y BgIII. Se corrieron las digestiones en gel de agarosa 0,8% para realizar la extracción de banda, 1) vector entero, 2) vector digerido con EcoRI y BgIII (bandas de 942 pb y de 4.485 pb), 3) Ladder 1Kb, 4) fragmento a clonar digerido con EcoRI y BgIII (banda de 1.076 pb).

Tabla 8. Cebadores utilizados para amplificar el fragmento a clonar y los utilizados en la secuenciación.

NOMBRE	SECUENCIA 5'-3'
pBgIII	TGCAGATCTATCTGCGATCGCTCCGGTG
pEcoRI	TGCGAATTCGGCTCGCGTGCAATCAGG
R1IL-15	ACCAGCGTTTCTGGGTGAG
R2IL-15	TGCAGTAGTCGCCGTGAAC
LIL-15	GAAAGGACAGTGGGAGTGG

1.1.3.2 Transfección de la línea celular A20

Una vez obtenida la construcción pcDNA3.1IL-15 se procedió a realizar la transfección de la línea celular A20 con dicho plásmido. En primer lugar se realizó la prueba de sensibilidad de las células A20 al antibiótico neomicina (G418 Sulfate, Thermo Fisher Scientific), resistencia que porta el vector pcDNA3.1(-), utilizada para la selección de los clones de interés. Para ello se probaron distintas dosis del antibiótico de modo de determinar cuál es la concentración mínima necesaria para impedir el crecimiento de la línea celular A20. Las dosis probadas fueron 100, 300, 500, 700, 1000, 1600 y 2000 µg/ml, y control sin antibiótico.

La transfección de las células A20 se realizó con Amaxa cell line nucleofector kit V (Lonza, Basel, Switzerland), utilizando el programa L-013. Se estudió la eficiencia de transfección con el plásmido reportero pmaxGFP según instrucciones del fabricante (Lonza, Basel, Switzerland). El porcentaje de células transfectadas, calculado como: (número de células que expresan GFP/total de células estudiadas) x 100), se estudió CF, adquiriendo los datos en el citómetro de flujo FACS Canto II, equipado con dos láseres (BD Biosciences). Para la adquisición y análisis de datos, se utilizó el software FACSDiva (BD Biosciences).

Posteriormente se realizó la transfección de la línea tumoral A20 con pcDNA3.1IL-15 y el vector vacío pcDNA3.1(-) como control. La línea transfectada con el plásmido portador del gen para IL-15 se denominó A20 (IL-15) y con el control A20 (pcDNA3.1). Como se mencionó anteriormente la presión selectiva se realizó con neomicina. Aproximadamente 10 días post-transfección se realizó separación celular por FCS-SSC, en el que se dispuso una célula por pocillo en placa de 96 pocillos para aislar los clones transfectados. La placa se cultivó por aproximadamente 30 días, manteniendo siempre la presión selectiva, de modo de propiciar la integración del plásmido en el genoma y de esta forma obtener clones que expresen de forma estable la citoquina de interés.

1.1.3.3 Determinación de los niveles de ARN mensajero de *IL15* en los clones transfectantes mediante PCR en tiempo real

Se determinaron los niveles de ARNm para *IL15* en clones transfectantes, utilizando PCR en tiempo real (RT-PCR). En primer lugar, se realizó la extracción de ARN

a partir de 1×10^6 células de clones A20 (IL-15) y A20 (pcDNA3.1) en cultivo utilizando Trizol (Thermo Fisher Scientific), según lo indicado por el fabricante. La cantidad y calidad de ARN se determinó mediante la relación de absorbancia 260/280 en el equipo NanoDrop 2000 (Thermo Fisher Scientific). Previo a la síntesis del ADN copia (ADNc), 1 μ g de ARN se trató con DNasa I (Thermo Fisher Scientific) por 15 min. La retrotranscripción se realizó con la enzima Moloney Murine Leukemia Virus Reverse Transcriptase (M-MLV RT) (Thermo Fisher Scientific) y “random primers” (Thermo Fisher Scientific), utilizando el siguiente ciclado: 10 min a 25°C, 50min a 37°C y 15 min a 70°C. El ADNc se diluyó 1/4 en agua bidestilada (Thermo Fisher Scientific) y se almacenó a -20°C. Finalmente, se realizaron las RT-PCR en el termociclador 7900HT RT-PCR System (Applied Bio-systems, Foster City), utilizando el kit comercial QuantiTect SYBR Green PCR (QIAGEN) y los cebadores mostrados en la Tabla 9 a una concentración final 0,9 μ M, el gen β -actina (*Actb*) se utilizó como gen constitutivo. El ciclado utilizado fue: 15 min a 95°C, 40 ciclos de 15 seg a 95°C y 1 min a 60°C, con curva de desnaturalización al final del mismo. Una vez finalizada la PCR, se determinó el valor de Ct para cada muestra, y los niveles de ARNm se calcularon utilizando el método $2^{-\Delta\Delta Ct}$ ⁴⁷⁶, donde $\Delta Ct = Ct_{\text{gen de interés}} - Ct_{Actb}$, y se expresaron relativos a los niveles de ARNm de clones transfectados con el plásmido vacío (incremento relativo). Los clones con mayores niveles de ARNm para IL-15 se criopreservaron a -80°C. También se criopreservaron células transfectantes control, A20 (pcDNA3.1), pero en este caso la elección de los clones fue arbitraria.

Tabla 9. Cebadores utilizados en las RT-PCR para determinar los niveles de ARNm de *IL15* en clones transfectantes.

Nombre	Cebador sentido (5' - 3')	Cebador anti-sentido (5' - 3')	Amplificación (pb)
<i>Actb</i>	GCTTCTTTGCAGCTCCTTCGT	CGTCATCCATGGCGAACTG	68
<i>IL15</i>	CATCCATCTCGTGCTACTTGTGTT	AGGGAGACCTACACTGACACAGCCCAAAA	101

1.1.3.4 Western blot para detectar la citoquina IL-15

Luego de determinar cuáles eran los clones que expresaban los mayores niveles de ARNm para IL-15, los mismos se analizaron por Western blot (WB) siguiendo el protocolo descrito en⁴⁷⁷. Debido a que la citoquina IL-15 es una proteína pequeña,

para el SDS-PAGE se utilizaron geles de Tricina, según se describe en ⁴⁷⁸, ya que tienen mejor resolución para visualizar proteínas con peso molecular menor a 15 kDa. Se analizó la presencia de la proteína IL-15 en muestras de sobrenadantes de cultivo de los clones transfectantes y sonificado del pellet de dichas células. Como control se utilizó 50 ng de la IL-15 murina recombinante (Thermo Fisher Scientific).

1.1.3.5 Ensayo para determinar la actividad biológica de IL-15

Para el estudio de la actividad biológica de la citoquina IL-15, producida por las células transfectantes, se utilizó la línea celular CTLL-2 (ATCC). Dicha línea es un clon de células T citotóxicas derivadas de la cepa de ratón C57BL/6 y tiene la particularidad de proliferar en presencia tanto de IL-2 como de IL-15. La línea se creció en medio de cultivo RPMI-1640 suplementado con 10% SFB, 10% factor de crecimiento de rata, preparado según se describe por ATCC para esta línea celular, 2 mM L-glutamina, 0,05 mM 2-mercaptoetanol y 1mM piruvato de sodio (Sigma), en estufa húmeda a 37°C y 5% CO₂.

Se realizaron ensayos con MTT utilizando la línea celular CTLL-2 basándonos en el trabajo de Soman & col. ⁴⁷⁹. Las células fueron dispensadas en placas de 48 pocillos en una densidad de 5x10⁵ células/pocillo. Se realizaron triplicados de cada condición: dilución 1/2 de sobrenadante (sn) de cultivo de 48 hs de células A20 (IL-15) y A20 (pcDNA3.1), 1,5 µg/ml de Concanavalina A (ConA) (Sigma), y medio de cultivo fresco. Para la curva estándar se hicieron seis puntos (diluciones al medio), utilizando 6 ng/ml como concentración inicial de la proteína IL-15 recombinante (Thermo Fisher Scientific). La placa se incubó en estufa húmeda a 37°C y 5% CO₂ por 48 hs. Posteriormente se realizó el ensayo de MTT se describe en ⁴⁷⁹.

1.2 Estudio de la tumorigenicidad de las células transfectantes

Se estudió la tumorigenicidad de las células A20 (IL-15) y A20 (pcDNA3.1) en animales naïve. Las células transfectantes y la línea A20 se crecieron en cultivo hasta fase log, luego se lavaron y resuspendieron en PBS a una concentración de 5x10⁶ céls/ml. Los ratones fueron inoculados de forma subcutánea (s.c.) en el flanco derecho con 1x10⁶ células en 0,2 ml de PBS. Los animales se observaron día por medio para

monitorizar el volumen tumoral y la supervivencia. Para calcular el volumen tumoral se utilizó un calíper y se aplicó la fórmula: ancho × largo × profundidad × $\pi/6$ ³³⁶. Por convención asumimos como criterio de punto final, la presencia de elementos de distrés en los animales o cuando los volúmenes tumorales alcanzaban 4.000 mm³.

1.3 Otras líneas celulares

Para los ensayos de citotoxicidad mediada por células NK se utilizó la línea celular YAC-1 (ATCC), la cual deriva de células transformadas con virus de la leucemia murina de Moloney de ratones de la cepa A/Sn. Esta línea celular tiene la particularidad de ser sensible a la citotoxicidad mediada por células NK. Las células se crecieron en medio de cultivo RPMI-1640 suplementado con 10% SFB, en estufa húmeda a 37°C y 5% CO₂.

La línea celular B16F1 de melanoma, singénica con ratones C57BL/6J, se cultivó en DMEM (Capricorn, Ebsdorfergrund, Alemania) suplementado con 10% de SFB en estufa a 37°C y 5 % CO₂. Esta línea se usó para preparar un lisado celular, el cual se utilizó como antígeno no relacionado en los ensayos que involucraban estimulación de esplenocitos. Dicho lisado se realizó de igual forma que el de A20, descrito en el Subapartado 1.1.2.

Los hibridomas GK1.5 (anti-CD4), 2.43 (anti-CD8), RB68C5 (anti-GR1) y HB152 (isotipo control) (ATCC) se cultivaron en medio DMEM (ATCC), suplementado con 10% de SFB (ATCC), 1 % penicilina-estreptomicina (Sigma) y 2mM L-glutamina, en estufa húmeda a 37°C y 5 % CO₂. Luego de crecer las células por 4 días, se realizó ultracentrifugación a 12.000g por 30 min a 4°C, obteniendo el sobrenadante, el cual se concentró por ultrafiltración en el equipo QuixStand (GE Healthcare Life Sciences, Chicago, IL). Los anticuerpos se purificaron por afinidad en una columna de proteína G en el equipo ÄKTA (GE Healthcare life Sciences). Se realizó un SDS-PAGE para corroborar la purificación de dichos anticuerpos, y se cuantificó por la técnica de Bradford (Fig. 17).

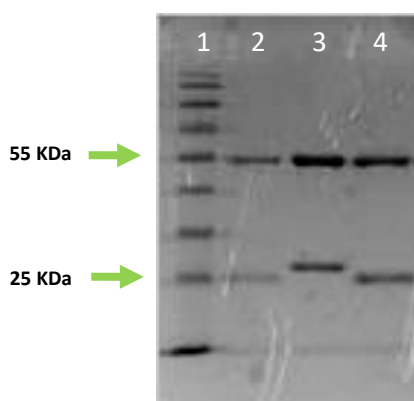


Figura 17. SDS-PAGE de anticuerpos depletantes purificados. 1) marcador de PM PageRuler Prestained (Thermo Fisher Scientific) (bandas de menor a mayor (kDa): 17, 26, 34, 43, 55, 72, 95, 130, 180), 2) isotipo control, 3) anticuerpo anti-CD4, 4) anticuerpo anti-CD8.

2 ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN

Se utilizaron ratones hembras BALB/c de 8-10 semanas de edad. Los mismos fueron producidos en el bioterio de DILAVE (División de Laboratorios Veterinarios, Montevideo, Uruguay) y alojados en hotelería del bioterio del Dpto. de Desarrollo Biotecnológico del Instituto de Higiene. Dicho bioterio cuenta con salas definidas para trabajar con animales infectados y no infectados, y está equipado con todo el material necesario. Los ratones fueron mantenidos en un ambiente controlado, con temperatura entre 20-22°C, y humedad entre 40-70%, con sistema de iluminación automática con ciclos de 12 hs luz/12 hs oscuridad y jaulas con filtro y sistema de aire libre de microorganismos. Para la cama se utilizó viruta atóxica autoclavada. Los animales recibieron agua y ración balanceada y complementada con nutrientes esenciales y no esenciales estéril *ad libitum*. Para el manejo de los animales se utilizó vestimenta completa (guantes, tapabocas, túnicas, gorros y zapatos) exclusiva para el área y la manipulación de los mismos se realizó bajo cámara de flujo laminar.

Cabe mencionar que los protocolos de experimentación animal utilizados en este trabajo siguieron la Ordenanza para el Uso y Manejo de Animales de Laboratorio de la Comisión Honoraria de Experimentación Animal (CHEA) de la Universidad de la República y fueron aprobados por dicha institución.

3 BACTERIA UTILIZADA

La cepa de *Salmonella enterica* serovar Typhimurium (*S. Typhimurium*), LVR01, atenuada por una delección en el gen *aroC* (vía de los compuestos aromáticos)³⁴⁰ se utilizó para distintos ensayos. Dicha cepa se creció con agitación a 37°C en medio Luria-Bertani (LB) líquido (Difco Laboratories, Deteroit, MI), hasta alcanzar la fase exponencial de crecimiento. Una vez crecida se almacenó un stock en glicerol 17% a -80°C. Para determinar la concentración del stock se descongeló una alícuota y se realizó recuento en placa de LB agar (Difco Laboratories) de diluciones seriadas al décimo. Los stocks se utilizaron tanto en los ensayos de invasión de células como para los ensayos *in vivo*.

Para los ensayos de inmunización con LVR01 se descongeló una alícuota del stock de LVR y se diluyó en buffer fosfato salino (PBS) a una concentración de 1×10^7 ufc/mL. Se controló que la concentración bacteriana fuera la adecuada mediante recuento en placa.

4 PREPARADOS VACUNALES

La vacuna utilizada se formuló con células A20 transfectadas para que expresen de forma estable la citoquina IL-15, infectadas con *Salmonella* LVR01, de modo de aumentar los niveles de expresión de moléculas co-estimuladoras y MHC II, y posteriormente irradiadas para eliminar la tumorigenicidad de la línea A20.

4.1 Ensayo *in vitro* de invasión celular con la cepa LVR01

Para el ensayo de invasión de las células A20 (pcDNA3.1)/A20 (IL-15) con la cepa LVR01 se utilizó una multiplicidad de infección (MOI) 100:1, previamente descrito por Grille & col.⁴³¹, y control sin bacteria. La densidad celular utilizada fue de 1×10^6 células/ml. La mezcla se incubó por 1 h en estufa húmeda a 37°C y 5% CO₂. Posteriormente, se centrifugó a 800 rpm por 10 min y las células se resuspendieron en RPMI completo conteniendo 100 µg/mL de gentamicina (Sigma) por 24 hs en estufa

húmeda a 37°C y 5% CO₂, de modo de inhibir el crecimiento de las bacterias que permanecen en el medio extracelular.

4.2 Determinación de la expresión de moléculas co-estimuladoras y MHC II en células infectadas con LVR01

La capacidad que posee la cepa LVR01 de modificar la expresión de moléculas co-estimuladoras y MHC de clase II en la línea celular A20 (pcDNA3.1) y A20 (IL-15), se determinó por CF. Luego de 24 hs post-infección las células fueron lavadas con PBS e incubadas con anticuerpos monoclonales anti-CD80 conjugado con PE, anti-CD86 conjugado con FITC, anti-CD40 conjugado con FITC, anti-MHC II conjugado con PE y controles isotípicos conjugados con FITC y PE (BD Biosciences, Oxford, UK), en oscuridad a 4°C por 30 min. Posteriormente, las células se lavaron con PBS y los datos se adquirieron en el citómetro de flujo FACS Canto II utilizando el software FACSDiva e Infinicyt (Cytognos, Spain). También para el análisis de datos se utilizó el mismo software. Dado que el estudio de la expresión de dichas moléculas por CF se realizó en el mismo momento para las distintas células, los valores para cada marcador se calcularon como la resta de los promedios de triplicados de intensidad media de fluorescencia (MFI, del inglés) menos el promedio de triplicados de MFI de los controles isotipos.

4.3 Irradiación de las células A20

Se realizó la puesta a punto de la irradiación de las células A20 (pcDNA3.1)/A20 (IL-15) con una bomba de ⁶⁰Co en el Centro de Investigaciones Nucleares (CIN). Las células se irradiaron en una concentración de 1x10⁷ células/ml. Se probaron los siguientes tiempos (min) de irradiación: 10, 15, 20, 30, 45 y 60. El efecto ejercido por la irradiación se controló por tres métodos: 1) determinación de viabilidad celular 2) estudio del ciclo celular; 3) inoculación de células irradiadas a ratones sanos para comprobar que no desarrollan la enfermedad.

Inmediatamente después de irradiadas, las células fueron criopreservadas en RPMI completo con 10% DMSO a -80°C . En el momento de ser utilizadas como vacuna se descongelaron y se lavaron dos veces con PBS.

4.3.1 Estudio de la viabilidad celular con azul de Tripán

Luego de la irradiación, una alícuota de células se cultivó en RPMI completo en estufa húmeda a 37°C y 5% CO_2 . A las 0, 24 y 72 hs, y 5 días post-irradiación de las células en cultivo se determinó el porcentaje de células viables por exclusión con azul de Tripán (Thermo Fisher Scientific), cuantificando las células al microscopio.

4.3.2 Estudio del ciclo celular por citometría de flujo

Al mismo tiempo que se realizó la determinación de la viabilidad celular, se analizó el ciclo celular por la técnica de cuantificación de ADN en núcleos por CF utilizando yoduro de propidio ⁴⁸⁰. Los datos se adquirieron en el citómetro de flujo FACSCalibur (BD Biosciences), y para el procesamiento de datos se utilizó el software ModFit (Verity Software House, Inc). En la Fig. 18 se representa el típico histograma que resulta de estudiar el ciclo celular normal por CF. Se elegirá una dosis de irradiación que provoque la disminución de la fase S y arreste el ciclo celular en la fase G2/M.

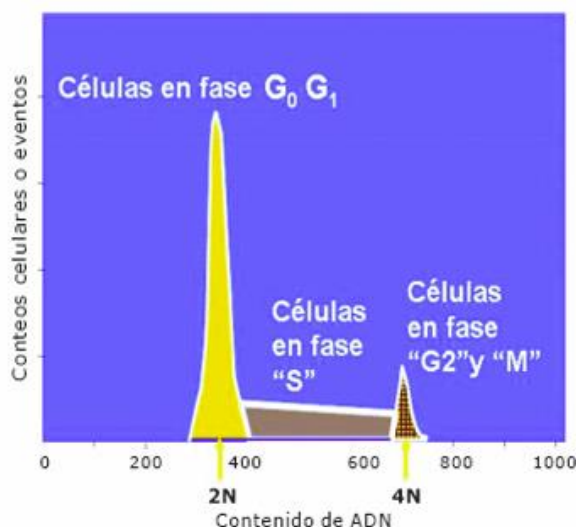


Figura 18. Estudio del ciclo celular por CF. Visualización representativa de un histograma monoparamétrico del ciclo celular normal y análisis del contenido de material genético (ADN) por citometría de flujo. Imagen extraída de ⁵⁵⁹.

4.3.3 Estudio de la tumorigenicidad de células irradiadas

Se corroboró que las células transfectantes utilizadas en las preparaciones vacunales efectivamente no fueron tumorigénicas. Para ello se inocularon 1×10^6 células irradiadas A20 (IL-15) o A20 (pcDNA3.1) a cinco ratones sanos y se monitoreó que no desarrollaran tumor.

Una vez corroborada la expresión de moléculas co-estimuladoras y MHC II por la infección con *Salmonella*, y puesta a punto las dosis de irradiación necesarias para eliminar la tumorigenicidad celular, generamos nuestro stock de vacunas utilizando el clon N° 5 de A20 (IL-15) y el N° 1 de A20 (pcDNA3.1). Todos los ensayos *in vivo* se realizaron con este stock.

5 MODELO MURINO DE ENFERMEDAD MÍNIMA RESIDUAL DE LNH-B

5.1 Implantación del tumor

Para la implantación del tumor, las células A20 se crecieron en cultivo hasta fase log, luego se lavaron y resuspendieron en PBS a una concentración de 5×10^6 céls/ml. Los ratones fueron inoculados de forma s.c. en el flanco derecho con 1×10^6 células A20 en 0,2 ml de PBS. Los animales se observaron día por medio para detectar el momento de aparición del tumor, monitorizar el volumen tumoral y la supervivencia. El cálculo del volumen tumoral se realizó según se describe en el Apartado 1.2, y también se asumió como criterio de punto final la presencia de elementos de distrés en los animales o cuando los volúmenes tumorales alcanzaban 4.000 mm^3 .

5.2 Tratamiento quimioterápico

El tratamiento quimioterápico estándar utilizado tanto en pacientes con LNH agresivos así como para la mayoría de LNH indolentes es la combinación de ciclofosfamida, doxorubicina, vincristina y prednisona/esteroides (CHOP) administrado cada 21 días por 6-8 ciclos^{31,481}. Para desarrollar el modelo de EMR en

los animales, se utilizó el régimen CHOP administrado de forma intraperitoneal (i.p.), en donde se sustituyó la prednisona oral por dexametasona i.p, de modo de lograr niveles más uniformes de esteroides y reducir posible peritonitis química. Luego de evaluar dosis crecientes de fármacos y diferentes esquemas de administración se optó por utilizar en cada ciclo las siguientes dosis: ciclofosfamida 100 mg/kg, doxorubicina 6 mg/kg, vincristina 0.1 mg/kg y dexametasona 0.2 mg/kg. Los ratones portadores de tumor A20 se trataron con un ciclo de CHOP al día 25 post-implantación del tumor (p.i.t.) (CHOPx1), dos ciclos de CHOP, uno al día 25 y otro al día 35 p.i.t. (CHOPx2), o PBS como control (n=9), y se monitorizó el crecimiento tumoral y la supervivencia. Para determinar los posibles efectos secundarios de la quimioterapia se midió el cambio en el peso corporal y la toxicidad a nivel hematológico. Se estudió la recuperación de linfocitos, monocitos y neutrófilos luego cada ciclo de CHOP, utilizando un contador automático de células sanguíneas para determinar el valor absoluto de leucocitos/mL y posteriormente realizando recuento manual de neutrófilos, monocitos y linfocitos en extendidos de sangre periférica teñidos con May-Grünwald Giemsa. La sangre se obtuvo puncionando la vena caudal con una aguja 27G. Este estudio permitió determinar el período óptimo entre los ciclos de CHOP.

Para evitar posibles infecciones por el efecto inmunosupresor que tienen las drogas que componen la quimioterapia, se administró tratamiento profiláctico con 15 mg/kg de fluconazol y 20 mg/kg de aciclovir vía oral vía oral.

La preparación de las drogas citostáticas se realizó en el Hospital de Clínicas por personal técnico capacitado, en una cabina de flujo laminar destinada para tal fin. Una vez preparado el CHOP, la inoculación de los animales se llevó a cabo en el bioterio del Instituto de Higiene, Facultad de Medicina. Todo el material en contacto con citostáticos fue descartado en los sitios habilitados disponibles en el Hospital de Clínicas.

5.3 Estudio de la citotoxicidad de la quimioterapia

5.3.1 Efecto de la quimioterapia sobre la línea celular A20

Se estudió el efecto citotóxico *in vitro* de las drogas que componen el CHOP sobre la línea celular A20, mediante ensayos de inhibición de crecimiento. Las células

fueron dispensadas en placa de 24 pocillos en una densidad de 1×10^6 células/pocillo. Se realizaron triplicados de distintas concentraciones de cada droga, como control se utilizó PBS y Dimetil sulfóxido (DMSO) (Sigma). Para la ciclofosfamida, doxorubicina y dexametasona se probaron las dosis de 0,1, 1, 10, 100 nM y 1 μ M, y para la vincristina 10, 20, 30, 40, 50 y 70 nM. Las placas se incubaron por 96 hrs en estufa húmeda a 37°C y 5% CO₂. Posteriormente se determinó la viabilidad celular por microscopia con el colorante vital azul de Tripán (Life Technologies, Carlsbad, CA), y por CF utilizando Anexina V (BD Pharmingen, San Diego, CA) e ioduro de propidio (IP) (Sigma). La concentración inhibitoria mínima (IC₅₀, del inglés) se definió como la concentración de la droga (nM) a la cual el crecimiento celular se inhibe en un 50%.

5.3.2 Estudio de la toxicidad de la quimioterapia sobre los animales

Para evaluar el efecto tóxico *in vivo*, se midió el peso corporal de los ratones antes y después de la administración del CHOP. Se calculó el cambio en el peso corporal (BWC, del inglés) utilizando la fórmula: % BWC=[(peso corporal del ultimo día)-(peso corporal al día 0)/(peso corporal al día 0)] $\times 100$ ⁴⁸². En particular para nuestro cálculo, el peso corporal al día 0 corresponde al valor medido inmediatamente antes de administrar el primer ciclo de CHOP.

5.4 Necropsias e histología

Al día 45 p.i.t. se sacrificaron ratones de cada grupo para llevar a cabo necropsias. Por un lado, los animales fueron examinados para determinar la presencia macroscópica de linfoma a nivel del sitio primario, nódulos linfáticos y otros órganos. Por otro lado, se removió tejido del sitio primario, ganglios linfáticos inguinales y de retroperitoneo, hígado y bazo para evaluar si había compromiso por linfoma a nivel microscópico. Las muestras se sumergieron en formalina tamponada al 10% por 24 hs a temperatura ambiente. Posteriormente las muestras fueron lavadas con PBS por 24 hs a 4°C y luego sumergidas dos veces sucesivas por 2 hs en: EtOH 95%, alcohol absoluto, xilol, parafina y finalmente se procesaron en bloques de parafina. Se cortaron láminas de 4 μ m y se desparafinaron por inmersiones sucesivas de 5 min en:

xilol, alcohol absoluto, EtOH 95% y EtOH 90%. Luego los cortes fueron lavados tres veces con agua destilada y teñidos con hematoxilina-eosina. Finalmente se sumergieron de forma sucesiva por 3 seg en: EtOH 70%, EtOH 80%, EtOH 95%, alcohol absoluto, xilol y se montaron con Bálsamo de Canadá.

5.5 Imagenología molecular: PET/CT

La remisión completa de la enfermedad se evaluó *in vivo* mediante la técnica de imagenología molecular Tomografía por Emisión de Positrones/Tomografía Computarizada (PET/CT), utilizando el radiotrazador ^{18}F -2-fluor-2-desoxi-D-glucosa (^{18}F -FDG). Este estudio fue llevado a cabo en el Centro Uruguayo de Imagenología Molecular (CUDIM).

5.5.1 Adquisición de imágenes

El PET/CT se llevó a cabo utilizando la cámara trimodal (Triumph, Trifoil, Inc., US) con el centellador LYSO/LGSO (resolución espacial: 1,0 mm, campo axial de visión: 3,75 cm). Los datos se adquirieron en una matriz de 184 x 184 x 31, tamaño de píxel de 0,25 x 0,25 x 1,175 mm; ancho de ventana de coincidencia: 22,22 seg.

Los ratones evaluados por histología fueron estudiados por PET/CT (n=17), de los cuales dos fueron excluidos del análisis ya que murieron como resultado de la citotoxicidad de la quimioterapia. Las imágenes fueron obtenidas antes (día 25 p.i.t.) y después del tratamiento con CHOP, cuando los ratones tenían remisión completa determinada por palpación (clínica) (día 44 p.i.t.). Los animales se anestesiaron con 2% isoflurano con flujo de oxígeno de 2 L/min. Se colocaron en decúbito en la cama del scanner y se inyectaron con 100 μL de ^{18}F -FDG ($20,0 \pm 5,4$ MBq) por la vena caudal. La adquisición de las imágenes comenzó 30 min luego de la administración del radiotrazador y duró un total de 60 min. La reconstrucción de imágenes se realizó utilizando el procedimiento iterativo 3D-MLEM (Maximum Likelihood Expectation Maximization).

5.5.2 Análisis de las imágenes

Se realizó el análisis de las imágenes semi-cuantitativo utilizando PMOD, versión 3.4 (PMOD Technologies, Ltd., Zurich, Switzerland). Los estudios de PET fueron co-registrados con su correspondiente estudio de CT, de modo de determinar la localización anatómica. Las imágenes se presentaron en cortes coronal, sagital y axial. Para cuantificar la captación específica, se trazaron volúmenes de interés (VOIs) en el tumor como sitio blanco (B), y en el músculo esquelético como tejido no blanco (NB)⁴⁸³. La captación se expresó en KBq/cc; los resultados se expresaron como el cociente B/NB.

Se calculó la sensibilidad, especificidad, valor predictivo negativo y valor predictivo positivo, estableciendo un punto de corte para considerar que el ratón presentaba linfoma residual. Dicho valor fue 2,45 y se calculó utilizando las curvas ROC (del inglés Receiver Operating Characteristic curve) según se describe en la Sección 9.

5.5.3 Estudio del LNH-B por rayos X

Otra técnica de imagenología que intentamos implementar para realizar el seguimiento *in vivo* de la enfermedad fue el estudio por rayos X (RX). Los ratones portadores de linfoma A20 se anestesiaron por inyección i.p. con 2,2 mg de y 0,11 mg de xilacina, se tomaron imágenes en la cámara In-Vivo MS FX PRO (Bruker BioSpin, Billerica, MA), disponible en el CIN, a los días 15, 22 y 29 p.i.t.

6 ENSAYOS *IN VIVO* CON LA VACUNA FORMULADA CON LAS CÉLULAS A20 MODIFICADAS

Se estudió la eficacia terapéutica generada por la administración de la vacuna formulada con células A20 productoras de IL-15 infectadas con LVR01 y posteriormente irradiadas (vacuna A20 (IL-15)-SL), en ratones en estado de EMR. En primer lugar se realizó un ensayo preliminar en el modelo de alta carga tumoral de LNH-B, previamente reportado por Grille & col.³⁵⁴, en donde se administraron dos dosis de la vacuna a los días 3 y 7 p.i.t. Además, como control se incluyó un grupo al

que se le administró la vacuna formulada con células A20 transfectadas con el plásmido vacío (pcDNA3.1) infectadas con LVR01 previo a ser irradiadas (vacuna A20 (pcDNA3.1)-SL) y el grupo PBS. Posteriormente se realizó un ensayo utilizando el modelo de EMR de LNH-B. Para ello se realizaron los grupo PBS, CHOPx2, CHOPx2 + A20 (IL-15)-SL y CHOPx2 + A20 (pcDNA3.1)-SL. Inicialmente y en base a estudios previos de nuestro grupo con otras vacunas desarrolladas para LNH-B^{354,431}, se diseñó un ensayo basado en dos inmunizaciones (día +11 y +15 días luego del 2do ciclo de CHOP, que correspondía a días 46 y 50 p.i.t.). Posteriormente, con el objetivo de mejorar la respuesta obtenida se diseñó un segundo ensayo basado en 5 inmunizaciones (días 46, 50, 54, 57, 61 p.i.t.) (Fig. 19).

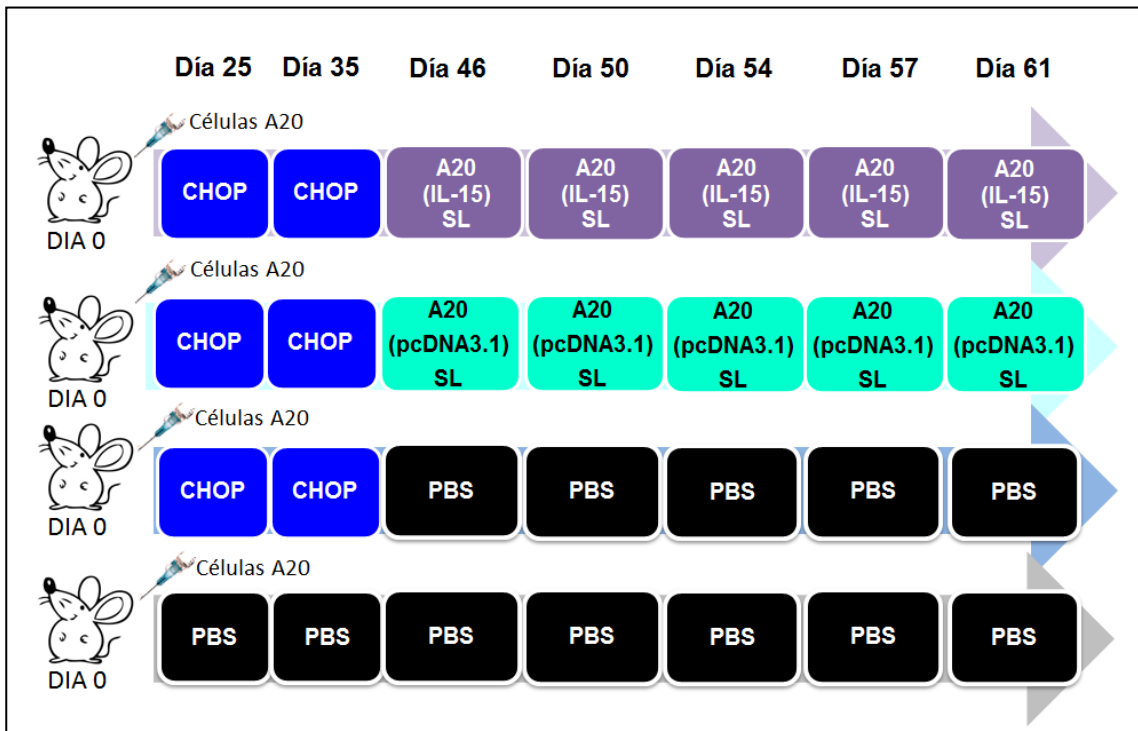


Figura 19. Esquema de inoculación con cinco dosis de vacuna A20 (IL-15)-SL. La implantación del tumor se realizó inoculando 1×10^6 células A20 de forma s.c. (día 0) (n=9). Los ciclos de CHOP se inocularon los días 25 y 35 p.i.t. y las cinco dosis de la vacuna A20 (IL-15)-SL, así como su control A20 (pcDNA3.1)-SL, se administraron a los días 46, 50, 54, 57 y 61 p.i.t.

7 ENSAYOS DE INMUNIZACIÓN CON *SALMONELLA* INTRATUMORAL

Se estudió el efecto de la administración i.t. de la cepa LVR01, en combinación con la quimioterapia. Se inoculó 1×10^6 ufc en 0,1 ml de PBS de forma intratumoral (i.t.) en ratones portadores de LNH-B. El esquema de inoculación para los grupos PBS, tres dosis de LVR01 (LVR01x3), CHOPx2 y CHOPx2+LVR01x3 se muestra en la Fig. 20. Cabe aclarar que en este último grupo, la inoculación de LVR01 al día 39 p.i.t. se realizó de forma s.c. en la zona tumoral, ya que a ese día el tumor no era palpable en la mayoría de los animales. Nótese que para el grupo LVR01x3 la administración de *Salmonella* se realizó según lo descrito por Grille & col., i.e. dosis cada siete días ³⁴⁶, por lo que este grupo no se utilizó como control experimental, sino para reproducir el efecto previamente reportado y compararlo con la terapia combinada.

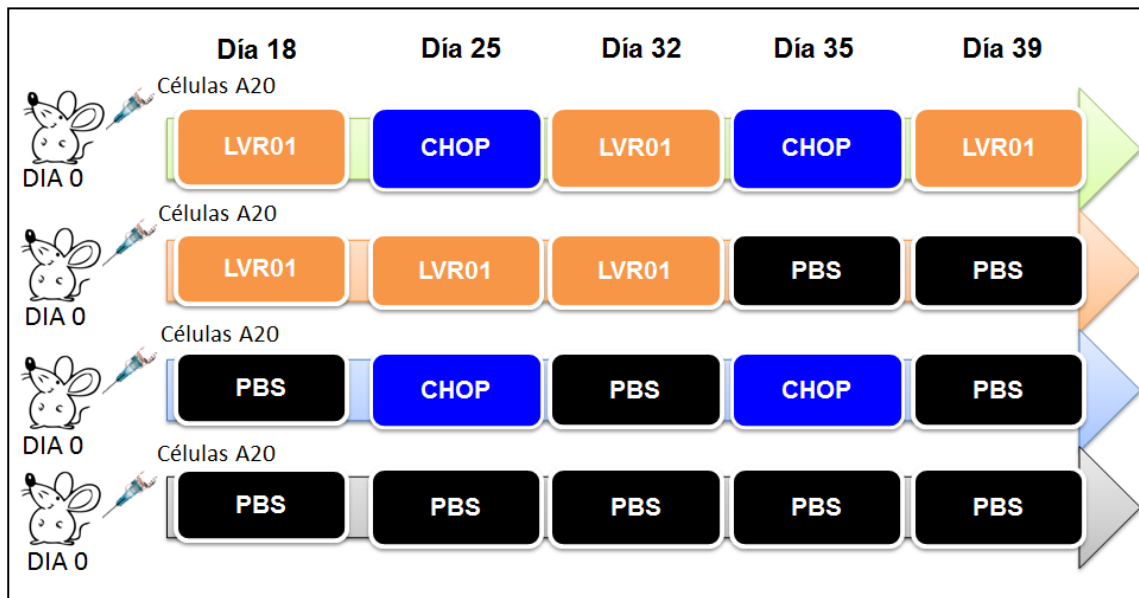


Figura 20. Esquema de inoculación. La implantación del tumor se realizó inoculando 1×10^6 células A20 de forma s.c. (día 0) (n=10). En los grupos CHOPx2 y CHOPx2+LVR01x3 los ciclos de quimioterapia se administraron de forma i.p. los días 25 y 35 p.i.t. En los grupos LVR01x3 y CHOPx2+LVR01x3, se administraron 1×10^6 CFU de forma i.t. los días 18, 25 y 32, y 18, 32 y 39 p.i.t, respectivamente.

8 ESTUDIO DE LA RESPUESTA INMUNE

Se estudió la respuesta inmune generada por los distintos tipos de inmunoterapia a nivel local (tumor) y sistémico. Se sacrificaron cinco ratones por grupo a los que se les extrajo tumor, bazo y sangre.

8.1 Análisis de células infiltrantes de tumor por citometría de flujo

Al día 45 p.i.t. se sacrificaron ratones con linfoma primario residual de los grupos PBS, LVR01x3, CHOPx2 y CHOPx2 + LVR01x3, para extraer muestras de tumor. Las mismas se disgregaron y prepararon como una suspensión celular. Las muestras se estudiaron por CF para determinar poblaciones infiltrantes de tumor (linfocitos T CD4+ (CD3+, CD4+), T CD8+ (CD3+, CD8+), linfocitos Tregs (CD4+, CD25+, FoxP3+), células NK (CD49b+), y neutrófilos (Ly6C/Ly6G+)). Las células se marcaron por 30 min en oscuridad a 4°C con distintos paneles: 1) anti-CD49b conjugado a FITC, anti-CD69 conjugado a PE, anti-CD3 conjugado a APC, anti-CD19 conjugado a PerCPCy5.5, anti-CD8 conjugado a PECy7, anti-CD4 conjugado a APCCy7; 2) anti-CD4 conjugado a FITC, anti-FoxP3 conjugado a PE, anti-CD25 conjugado a APC, anti-CD3 conjugado a PECy7, 3) anti-Ly6C conjugado a FITC, anti-F4/80 conjugado a PE, anti-CD62L conjugado a APC, anti-CD11b conjugado a PerCPCy5.5, anti-CD11c conjugado a PECy7, anti-Ly6G conjugado a APCCy7 (BD Biosciences). La concentración óptima de anticuerpos se definió previamente por titulación. Para la tinción intracelular de FoxP3, en primer lugar las células se marcaron con anticuerpos anti-CD4 conjugado a FITC, anti-CD25 conjugado a APC y anti-CD3 conjugado a PECy7, luego se fijaron y permeabilizadas con el buffer set para FoxP3 (BD Biosciences), de acuerdo a las recomendaciones del fabricante. Las células se lavaron dos veces con el buffer de permeabilización y se incubaron con el anticuerpo anti-FoxP3 conjugado a PE en oscuridad por 30 min a 4°C. Los datos se adquirieron en el citómetro de flujo FACS Canto II. Para el procesamiento de datos se utilizó el software FACSDiva e Infinicyt.

8.2 Separación de poblaciones celulares inmunes en muestras de tumor

Al día 70 p.i.t. se sacrificaron cinco ratones en recaída de los grupos CHOPx2, CHOPx2 + A20 (IL-15)-SL y CHOPx2 + A20 (pcDNA3.1)-SL para extraer muestras de tumor con las que se realizó la separación de poblaciones celulares mediante CF, utilizando el clasificador celular de alta velocidad FACSAria Fusion (BD Biosciences) del Instituto Pasteur de Montevideo. En particular se separaron las poblaciones de linfocitos T CD4+ (CD3+, CD4+), T CD8+ (CD3+, CD8+) y células NK (CD49b+). Para ello las muestras de tumor se disgregaron y las células se marcaron por 30 min a 4°C en oscuridad con el siguiente panel de anticuerpos: anti-CD45 conjugado a FITC, anti-CD49b conjugado a APC, anti-CD3 conjugado a PerCPCy5.5, anti-CD4 conjugado a APCCy7 y anti-CD8 conjugado a PECy7 (BD Biosciences). Una vez separadas, las distintas poblaciones celulares se guardaron en Trizol a -80°C.

8.3 Detección de citoquinas y quimioquinas en el tumor por PCR en tiempo real

Se determinaron los niveles de ARNm para distintas citoquinas y quimioquinas en el microambiente tumoral utilizando RT-PCR. Al día 45 p.i.t. se sacrificaron cinco ratones de los grupos PBS y LVR01x3, y aquellos de los grupos CHOPx2 y CHOPx2+LVR01x3 con tumor primario residual (remisión parcial) para extraer muestras de tumor. El mismo procedimiento se realizó para tumores de los grupos CHOPx2, CHOPx2 + A20 (IL-15)-SL y CHOPx2 + A20 (pcDNA3.1)-SL al día 70 p.i.t. (animales en recaída). Los tumores se sumergieron en Trizol (Invitrogen, Carlsbad, CA) y se conservaron a -80°C. Al momento del procesamiento, los tumores se disgregaron utilizando el homogeneizador Ultra Turrax T8 ANTRIEB (IKA WERKE) y el ARN se extrajo de acuerdo a las instrucciones de fabricante (Invitrogen). La cuantificación de ARN, tratamiento con ADNasa, retrotranscripción, PCRs y análisis de resultados, se describieron previamente en el Subapartado 1.1.3. En particular se estudió la expresión de los genes *Ccl3*, *Ccl4*, *Ccl5*, *Ccl20*, *Cxcl1*, *Cxcl9*, *Cxcl10*, *Cxcl11*, *Cxcl12*, *Cxcr4*, *Cxcr7*, *Il2*, *Il4*, *Il6*, *Il10*, *Il12*, *Il17a*, *Foxp3*, *Ifng*, *Lgals1*, *Tgfb* y *Tnfa*. En este caso se

utilizó como gen constitutivo β -2 *microglobulina* (*B2m*), y los resultados se expresaron relativos al grupo CHOPx2. El listado de cebadores utilizados se detalla en la Tabla 10.

Además con las poblaciones celulares separadas por CF, se realizó el estudio de la expresión de genes para varias citoquinas. En particular se estudió la expresión de *Il2*, *Il4*, *Il5*, *Il6*, *Il10*, *Il13*, *Il17a*, *Ifng*, *Tgfb* y *Tnfa*, para la población de linfocitos T CD4+, *Ifng* y *Tnfa* en la población de linfocitos T CD8+, e *Ifng* en la población de células NK. La extracción de ARN y pasos sucesivos se realizaron igual que para las muestras de tumor entero, con la diferencia que las células no necesitan ser disgregadas. Los cebadores utilizados se detallan en la Tabla 10.

Tabla 10. Cebadores utilizados en las PCR cuantitativas.

Gen	Cebador sentido (5'-3')	Cebador anti-sentido (5'-3')	Tamaño del amplicón (pb)
<i>B2m</i>	CCTGCAGAGTTAAGCATGCCAG	TGCTTGATCACATGTCTCGATCC	72
<i>Ccl2</i>	CCCTCAACGGGAAGAACAAA	CACATCAGGTACGATCCAGGC	72
<i>Ccl3</i>	AACATCATGAAGGTCTCCAC	CCAAGACTCTCAGGCATTCA	294
<i>Ccl4</i>	GCCCTCTCTCTCTTGCT	GTCTGCCTCTTTGGTCAGG	196
<i>Ccl5</i>	GGTACCATGAAGATCTCTGCA	AAACCCTCTATCCTAGCTCAT	294
<i>Ccl20</i>	TTTTGGGATGGAATTGGACAC	TGCAGGTGAAGCCTTCAACC	69
<i>Cxcr4</i>	TTCTCATCCTGGCCTTCATC	CTTTTCAGCCAGCAGTTTCC	92
<i>Cxcr7</i>	GCCGTACCATTTTGTGGTTC	TGCAACGCTGTAAGAGCAC	96
<i>Cxcl1</i>	CTTGGTTCAGAAAATTGTCCAAAA	ACGGTGCCATCAGAGCAGTCT	84
<i>Cxcl9</i>	TGGAGCAGTGTGGAGTTCGA	CCTCGGCTGGTGCTGATG	73
<i>Cxcl10</i>	GCCGTCAATTTCTGCCTCAT	GCTTCCCTATGGCCCTCATT	127
<i>Cxcl11</i>	CAAAATGGCAGAGATCGAGAAA	TGAGCCTTCATAGTAACAATCACTTCA	87
<i>Cxcl12</i>	GAAGTGGAGCCATAGTAATGCC	TCCAAGTGGAAAAATACACCG	133
<i>Cxcl13</i>	CAACTGTTGTCGGTCTAAACATCAT	GGTCCAGATCACAACCTCAGTTTTG	89
<i>Lgals1</i>	TGAACCTGGGAAAAGACAGC	TCAGCCTGGTCAAAGGTGAT	190
<i>Il2</i>	CCTGAGCAGGATGGAGAATTACA	CTTTC AATTCTGTGGCCTGCTGGG	92
<i>Il4</i>	ACAGGAGAAGGGACGCCAT	GAAGCCCTACAGACGAGCTCA	95
<i>Il5</i>	AGCACAGTGGTGAAAGAGACCTT	TCCAATGCATAGCTGGTGATT	117
<i>Il6</i>	GTTCTCTGGGAAATCGTGAAA	AAGTGCATCATCGTTGTTTCATACA	78
<i>Il10</i>	CATTTGAATCCCTGGGTGAGA	TGCTCCACTGCCTTGCTCTT	101
<i>Il12</i>	ATCACACGGGACCAAACCA	CAGGCAACTCTCGTTCTTGTTAGT	74

Continuación Tabla 10.

<i>Il13</i>	GGAGCTGAGCAACATCACACA	GGTCCTGTAGATGGCATTGCA	142
<i>Il17a</i>	CTCCAGAAGGCCCTCAGACTAC	GGGTCTTCATTGCGGTGG	69
<i>Ifng</i>	TCAGCAACAGCAAGGCGAAA	CCGCTTCTGAGGCTGGAT	143
<i>Tgfb</i>	GCTGAACCAAGGAGACGGAAT	GAGTTTGTATCTTTGCTGTACAAGA	76
<i>Foxp3</i>	CCCAGGAAAGACAGCAACCTT	TTCTCACAACCAGGCCACTTG	89
<i>Tnfα</i>	CATCTTCTCAAATTCGAGTGACAA	CCTCCACTTGGTGGTTTGCT	63

8.4 Ensayo de proliferación celular con esplenocitos

Se sacrificaron ratones de los de distintos grupos para extraer bazo, los cuales se disgregaron y prepararon como una suspensión celular. Los esplenocitos se marcaron con 1 μ M de 5(6)-Carboxy-fluorescein diacetate, succinimidyl ester (CFSE) (Sigma-Aldrich), y se dispensaron 2×10^6 céls/ml en placa de 24 pocillos con las siguientes condiciones: 1 μ g/ml de Concanavalina A (ConA) (Sigma-Aldrich) como control de estimulación, 10 μ g/ml de lisado de A20 (lisA20) como antígeno específico, 10 μ g/ml de lisado de B16F1 (lisB16F1) como antígeno no específico y medio de cultivo como control sin estimular (SE). La placa se incubó por 4 días en estufa húmeda a 37°C y 5% CO₂. Luego de la incubación las células fueron lavadas con PBS y marcadas con IP en oscuridad a temperatura ambiente por 10 min. Además las células se marcaron para linfocitos T CD4⁺ (CD3⁺ CD4⁺) y T CD8⁺ (CD3⁺ CD8⁺), con los anticuerpos anti-CD3 conjugado a APC, anti-CD8 conjugado a PEcy7 y anti-CD4 conjugado a APCCy7. La adquisición de datos se realizó en el citómetro FACS Canto II y para el procesamiento de datos se utilizaron los software FACSDiva, y ModFit según se describe en ⁴⁸⁴. Para el análisis se realizó un “gate” en la población de esplenocitos viables utilizando el dot plot FSC-IP.

8.5 Detección de citoquinas por RT-PCR en esplenocitos estimulados

Se sacrificaron ratones de distintos grupos y se removieron los bazos, los cuales se prepararon como una suspensión celular. Se dispensaron 2×10^6 céls/ml en placa de 24 pocillos con las siguientes condiciones: 1 μ g/ml de ConA, 10 μ g/ml de lisA20, 10

µg/ml de IISB16F1, y medio de cultivo como control SE. Las células se incubaron en estufa a 37°C 5% CO₂ por 24 hs. Posteriormente, fueron centrifugadas y los pellets se colocaron en Trizol y almacenaron a -80°C hasta su procesamiento. La extracción de ARN se realizó de acuerdo a las instrucciones del fabricante (Invitrogen, Carlsbad, CA). La cuantificación de ARN, tratamiento con ADNasa, retrotranscripción, PCRs y análisis de resultados, se describieron previamente en el Subapartado 1.1.3. En particular se estudiaron los niveles de ARNm de *Il-2*, *Il-4*, *Il-10*, *Il-12*, *Il-17a* e *Ifng*. Se utilizó *β2m* como gen constitutivo, y los resultados se expresaron relativos a la condición SE del grupo CHOPx2. Las secuencias de los cebadores se indican en la Tabla 10.

8.6 Detección de citoquinas en el sobrenadante de esplenocitos estimulados mediante ELISA

Para los grupos CHOPx2 y CHOPx2 + LVR01x3 se evaluó la producción *in vitro* de citoquinas en los sobrenadantes del ensayo de proliferación con esplenocitos. Al día 4, se centrifugó la placa a 1.200 rpm y se obtuvo los sobrenadantes que fueron guardados a -80°C hasta ser analizados. En particular se utilizaron kit de ELISA para detectar IL-2, IL-10, IL-12 e IFN-γ (BD Biosciences), según lo indicado por el fabricante.

8.7 Ensayo de citotoxicidad mediada por células NK

Se sacrificaron ratones de distintos grupos para extraer bazo, los cuales se prepararon como una suspensión celular. Los esplenocitos se utilizaron como células efectoras (E) y la línea celular YAC-1, sensible a citotoxicidad mediada por células NK teñidas con 1 µM de CFSE, como células blanco (B). En base a un trabajo de Duan & col.⁴⁸⁵, las células se dispensaron en las relaciones (E:B) 6,25:1, 12,5:1, 25:1, 50:1, 100:1, 200:1, colocando 6x10⁴ células YAC-1/ml en placas de 24 pocillos. Las mismas se incubaron por 24 hs en estufa húmeda a 37°C y 5% CO₂. Luego de la incubación, las células se lavaron con PBS y se marcaron con IP por 10 min en oscuridad a temperatura ambiente. La adquisición de datos se realizó por CF, utilizando el equipo FACS Canto II y el procesamiento de los resultados se realizó con el software FACSDiva e Infinicyt. El porcentaje de citotoxicidad se calculó con la fórmula: [(% células muertas

en la muestra - % muerte celular espontánea) / (100 - % muerte celular espontánea)]

485

8.8 Depleción de poblaciones de células inmunes

Se implementaron técnicas para evaluar actividades efectoras del sistema inmune e investigar la relevancia de poblaciones celulares en la actividad antitumoral. En particular se produjeron anticuerpos depletantes para linfocitos T CD4⁺, CD8⁺ y neutrófilos según se describe en el Apartado 1.3.

8.8.1 Puesta a punto de las dosis necesarias para depletar las distintas poblaciones celulares

Basándonos en trabajos previos ⁴⁸⁶⁻⁴⁸⁸, se pusieron a punto las dosis de anticuerpos que debemos administrar para mantener depletadas las poblaciones de linfocitos T CD4⁺, T CD8⁺, y neutrófilos en ratones naïve. El protocolo de administración fue el mismo para todos los casos: días 1, 2, 3, 5, 7 y luego refuerzos cada una semana. La cantidad de anticuerpo utilizado por dosis fue 100 µg/ratón. La depleción de cada población se corroboró estudiando sangre periférica de los animales por CF. En particular se utilizaron los anticuerpos anti-CD4 conjugado a FITC, anti-CD8 conjugado a PE, anti-CD3 conjugado a APC, anti-Ly6C conjugado a FITC y anti-Ly6G conjugado a PE. Para el caso de los neutrófilos, aunque logramos la depleción, no pudimos mantenerla en el tiempo ya que a la semana de administrar el anticuerpo los animales presentaban esplenomegalia y posteriormente morían.

8.8.2 Ensayo de depleción *in vivo* de células inmunes

Una vez puesto a punto los regímenes de inoculación, se realizaron ensayos *in vivo*, administrando los anticuerpos anti-CD4 y anti-CD8 en ratones del grupo CHOPx2 + LVR01x3. En particular se inocularon los días -1, 0, 1, 3, 5, 12, 19, tomando el día 0 como el inicio de la inmunoterapia, i.e. la primera inoculación de LVR01. En la Fig. 21 se muestra el esquema de inoculación utilizado.

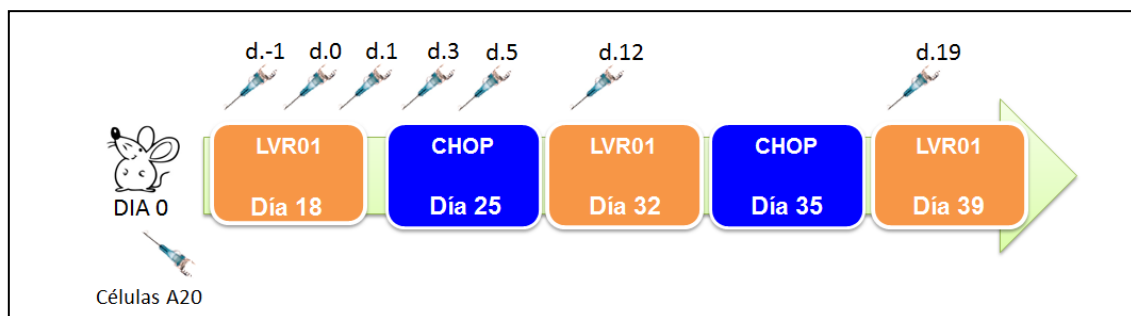


Fig. 21. Esquema de inoculación de los anticuerpos depletantes. Se muestra el esquema de administración de los anticuerpos anti-CD4, anti-CD8 e isotipo control en el grupo CHOPx2 + LVR01x3 (n=5). En todos los casos se utilizó el mismo protocolo de inoculación de anticuerpos depletantes y la cantidad de anticuerpo utilizada por dosis fue 100 μ g/ratón.

8.9 Estudio de la respuesta humoral contra las células tumorales A20

Se extrajeron muestras de sangre a distintos tiempos, se incubaron 30 min en estufa a 37°C, y luego se centrifugaron a 7.000 rpm por 10 min a 10°C. Las muestras de suero se colocaron en tubos limpios y se almacenaron a -20°C hasta el momento de ser utilizados.

La respuesta humoral contra las células A20 se determinó mediante ELISA. Como sustrato se utilizaron placas de poliestireno Nunc (Sigma), las cuales fueron sensibilizadas con 15 μ g/pocillo de lisado de células A20 durante toda la noche en cámara húmeda a 4°C. Las placas se lavaron tres veces por tres minutos con PBS – 0,05% Tween-20 (Sigma-Aldrich) (PBS-T) y luego se bloquearon con PBS – 1% BSA (Sigma-Aldrich) por 1 h en cámara húmeda a 37°C. Las muestras de suero se diluyeron 1/50 en PBS – 0,05% Tween – 1% BSA (PBS-T-BSA) y se agregaron a las placas por duplicado. Luego de 2 hs de incubación en cámara húmeda a 37°C, se realizaron tres lavados de tres minutos con PBS-T y se agregó el anticuerpo secundario IgG producido en cabra conjugado a biotina (SouthernBiotech, Birmingham, AL) diluido 1/2000 en PBS-T-BSA, se incubó por 1 h en cámara húmeda a 37°C. Para aumentar la señal se agregó estreptavidina conjugada a peroxidasa (Sigma-Aldrich) en una dilución 1/2500 en PBS-T-BSA y se incubó por 45 min en cámara húmeda a 37°C. Finalmente, el color se desarrolló utilizando SIGMAFAST OPD (Sigma-Aldrich), siguiendo las indicaciones del fabricante.

8.10 Estudio de la condición física y comportamental de los animales

Se determinó si la administración de *Salmonella* tiene un impacto en la condición general de los animales. Para ello, se midieron distintos parámetros, tanto clínicos como paraclínicos, en animales con CHOP tratados con LVR01 o sin tratar, los días 26, 44 y 62 p.i.t. Dentro de los parámetros clínicos se estudió la condición corporal (BC, del inglés), “grooming”, dolor, letargia, respuesta al estímulo/fuerza, mucositis (evidenciada por diarrea). Para designar un puntaje a cada parámetro nos basamos en trabajos previos, los valores se muestran en la Tabla 11^{489–491}. A su vez, asignamos puntajes para poder realizar la sumatoria de los parámetros clínicos y determinar la condición general de los ratones, donde 0 corresponde al estado óptimo del animal, 1 revela presencia y 2 es exacerbación de la sintomatología/patología (Tabla 11). En paralelo realizamos estudios paraclínicos, como son BWC, hemograma y funcional hepático, y correlacionamos los resultados con los obtenidos a nivel clínico.

Tabla 11. Condición general de los animales. Se muestra el puntaje para cada parámetro clínico utilizados para determinar la sanidad de los animales. Para realizar la sumatoria de dichos parámetros se designó un puntaje general.

PARÁMETRO CLÍNICO	PUNTAJE	PUNTAJE GENERAL
Condición corporal (BC)	0: esquelético 1: desnutrido 2: en condición	0: estado óptimo 1: mínimamente por debajo del peso normal 2: demacrado/esquelético
Grooming	0: grooming adecuado 1: falta de grooming 2: ausencia de grooming	0: estado óptimo 1: aseo descuidado 2: sin aseo
Dolor	0: ausencia de dolor 1: dolor al manipularlo 2: dolor constante	0: estado óptimo 1: algunos signos de dolor 2: dolor constante
Letargia	0: actividad irrestricta 1: deambula menos 2: no se mueve o lo hace mínimamente	0: estado óptimo 1: movimiento limitado 2: sin movimiento
Respuesta a estímulo/fuerza	0: se aferra a la jaula 1: se aferra levemente a la jaula 2: no aferra a la jaula	0: estado óptimo 1: ofrece algo de resistencia 2: no ofrece resistencia
Mucositis	0: ausencia 1: presencia	0: ausencia 1: presente

9 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Para el análisis estadístico los resultados se analizaron con el software SPSS 17.0 (Statistical Package for the Social Sciences) para Windows. Las curvas de supervivencia se construyeron según el método Kaplan–Meier y las diferencias significativas se determinaron utilizando el test log rank. Para el volumen tumoral y los ensayos *in vitro* la significancia estadística se determinó utilizando test de Student y análisis de varianza (ANOVA). Se consideró que había diferencias significativas cuando el valor $p < 0,05$.

Para determinar el valor de punto de corte utilizado para calcular la sensibilidad, especificidad, valor predictivo negativo y valor predictivo positivo de la técnica PET/CT, se construyeron curva ROC utilizando la histología como “gold standard”, se eligió el punto de corte con un área bajo la curva (AUC) de 0,74 (95% IC 0,6-0,991). El valor establecido para considerar que un ratón presentaba linfoma residual fue igual o mayor a 2,45.

CAPÍTULO III

PUESTA A PUNTO DE UN MODELO DE ENFERMEDAD MÍNIMA RESIDUAL DE LINFOMA NO HODGKIN

1 OBJETIVO

Desarrollar un modelo murino de enfermedad mínima residual de LNH-B donde estudiar nuevas inmunoterapias. Este modelo nos permitirá contar con un contexto más similar al que se encontraría a nivel clínico. Se evaluará el efecto de la quimioterapia sobre la línea celular A20 *in vitro* y la toxicidad de la quimioterapia *in vivo*. Para determinar la remisión del linfoma A20 se implementará la técnica de imagenología molecular *in vivo* PET/CT, utilizada en la clínica para la monitorización de la enfermedad de los pacientes. Además, se estudiará el estado inmunológico de los animales sometidos al tratamiento quimioterápico.

2 RESULTADOS

2.1 Eficiencia de la quimioterapia y toxicidad *in vivo*

Para estudiar la citotoxicidad de los quimioterápicos sobre la línea tumoral A20 se realizaron ensayos *in vitro* en donde se determinó el IC₅₀, según se describe en Materiales y Métodos (M&M). El IC₅₀ para la doxorrubicina fue 25 nM y para la vincristina 1nM (resultados no mostrados). Por su parte, la ciclofosfamida y la dexametasona requieren metabolización hepática por lo que era esperada la falta de actividad *in vitro* de estas drogas (> 1μM)⁴⁹².

Por otro lado, los animales portadores de linfoma se trataron con dosis crecientes de CHOP, partiendo de las dosis previamente descritas para un modelo xenógrafo en ratón, que administraba las drogas ciclofosfamida (40 mg/kg), doxorrubicina (3,3 mg/kg) y vincristina (0,5 mg/kg) vía intravenosa (v.i.) y prednisona (0,2 mg/kg) por cinco días vía oral (v.o.)⁴⁹³. Estas dosis no mostraron ningún efecto antitumoral en los animales inmunocompetentes portadores de tumor A20 por lo que administramos el doble de dosis, pero el efecto tóxico fue demasiado elevado y los animales murieron con dicho tratamiento (resultados no mostrados). Por lo tanto, decidimos administrar dosis intermedias de las drogas aplicadas en dos ciclos separados por 10 días. La elección del intervalo entre los ciclos se basó en el resultado

obtenido del conteo de células de sangre periférica, en el cual se observó la regeneración de la médula ósea 10 días luego del primer ciclo de CHOP. Estos estudios permitieron encontrar el régimen óptimo para el tratamiento con CHOP, el cual consistió en administrar dos ciclos de CHOP (ciclofosfamida 100 mg/kg, doxorubicina 6 mg/kg, vincristina 0,1 mg/kg, dexametasona 0,2 mg/kg) vía i.p. separado por 10 días. A estas dosis particulares, los animales tuvieron buena tolerancia a la quimioterapia; en el grupo tratado con un ciclo de CHOP ningún animal murió por efecto del tratamiento, mientras que en el grupo con dos ciclos se observó una mortalidad del 18%. Mediante estudios de variación del peso corporal se evidenció que el nivel de toxicidad de la quimioterapia fue tolerado por los animales (Fig. 22A). La mayor disminución del peso corporal se observó 10 días luego de administrado el segundo ciclo de CHOP. Si tenemos en cuenta el Criterio de Eventos Adversos (CTCAE v3.0) para humanos ⁴⁹⁴, consideramos a esta pérdida de peso como severa (grado 3, mayor a 20 %), pero se revierte a los pocos días post-quimioterapia. Se observó neutropenia y monocitopenia transiente cinco días luego del primer ciclo de CHOP, pero los valores volvieron a recuperarse al día 10 post-1^{er} CHOP (Fig. 22B). Por el contrario, los valores de linfocitos en sangre periférica disminuyeron luego del primer ciclo de CHOP pero no vuelven a ser normales en el período de tiempo que duran los experimentos.

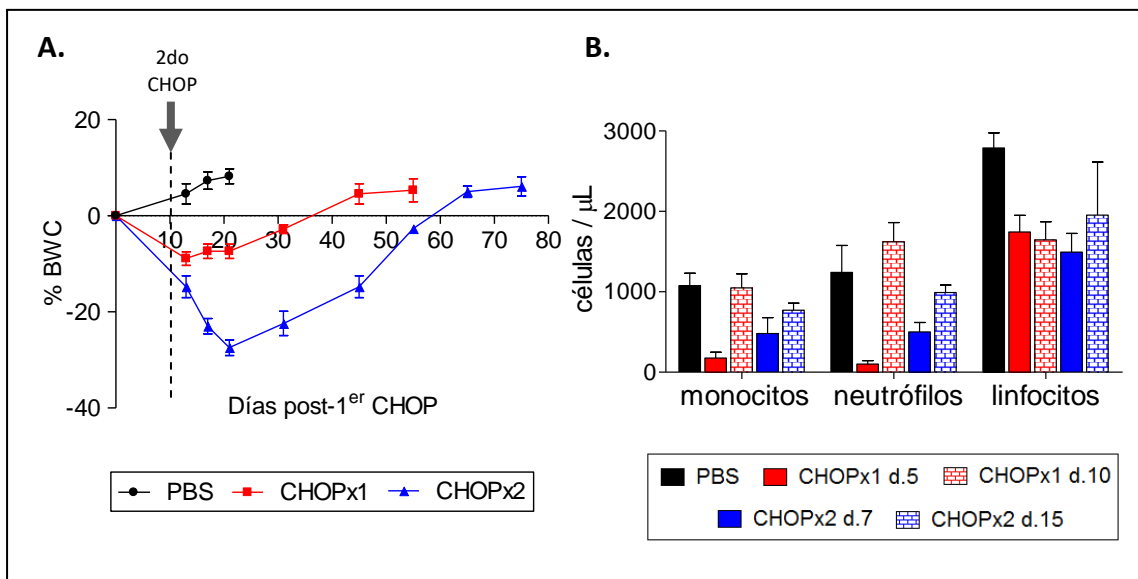


Figura 22. Toxicidad *in vivo* de la quimioterapia. A. Se muestra el porcentaje del cambio de peso corporal (% BWC) para los grupos PBS, CHOPx1 y CHOPx2. El 2^{do} ciclo de CHOP se indican con una flecha (día 10 post-1^{er} CHOP) **B.** Conteo de glóbulos blancos en sangre periférica. Se muestra el valor absoluto de monocitos, neutrófilos y linfocitos para el grupo sin tratar (PBS), para el grupo tratado a los días 5 y 10 luego de la administración del 1^{er} CHOP (CHOPx1 d.5 y CHOPx1 d.10, respectivamente) y a los 7 y 15 días luego del 2^{do} ciclo de CHOP (CHOPx2 d.7 y CHOPx2 d.15, respectivamente).

2.2 Crecimiento tumoral y sobrevida

Se evaluó el efecto del régimen de CHOP elegido en el desarrollo tumoral y la sobrevida de ratones portadores de LNH-B. Previamente, se describió que los tumores de los ratones portadores de linfoma A20 que no recibían ningún tratamiento tenían un crecimiento sostenido en el tiempo y la media de sobrevida fue aproximadamente 35 días³⁵⁴. Por el contrario, los animales que recibieron ya sea uno o dos ciclos de CHOP, mostraron una disminución del crecimiento tumoral a partir del día 25 p.i.t, inmediatamente después del primer ciclo de CHOP (Fig. 23A). En los animales que recibieron un solo ciclo de quimioterapia se observó una disminución del volumen tumoral cercana a cero, pero este período perduró pocos días. Sin embargo, en el grupo que recibió dos ciclos de CHOP, alrededor del 92% de los animales presentaron remisión clínica del tumor primario por un período de aproximadamente 20 días (Fig. 23A-B). Luego de este período los tumores comenzaron a crecer y los animales murieron a causa de la enfermedad. Se definió como punto final, donde el animal se sacrificó por razones éticas, un volumen tumoral de 4.000 mm³. Además dependiendo del grupo, algunos animales murieron de toxicidad debida al tratamiento quimioterápico o por dificultades respiratorias producidas por metástasis. En estos casos los animales fueron sacrificados por razones éticas antes de llegar al volumen tumoral pre-definido como punto de sacrificio (Tabla 12). Para los grupos que recibieron cualquiera de los regímenes de CHOP se observó una extensión de la sobrevida, pero dicha extensión fue significativamente mayor en los animales que recibieron dos ciclos de CHOP, con medias de sobrevida de 52 y 73 días para CHOPx1 y CHOPx2, respectivamente (Fig. 23C).

Tabla 12. Porcentaje de animales que mueren a causa de la toxicidad de la quimioterapia, metástasis, o por tumor primario.

	PBS	CHOPx1	CHOPx2
Toxicidad de la quimioterapia	NA	0%	18%
Metástasis	0%	25%	47%
Tumor primario (>4.000 mm³)	100%	75%	35%

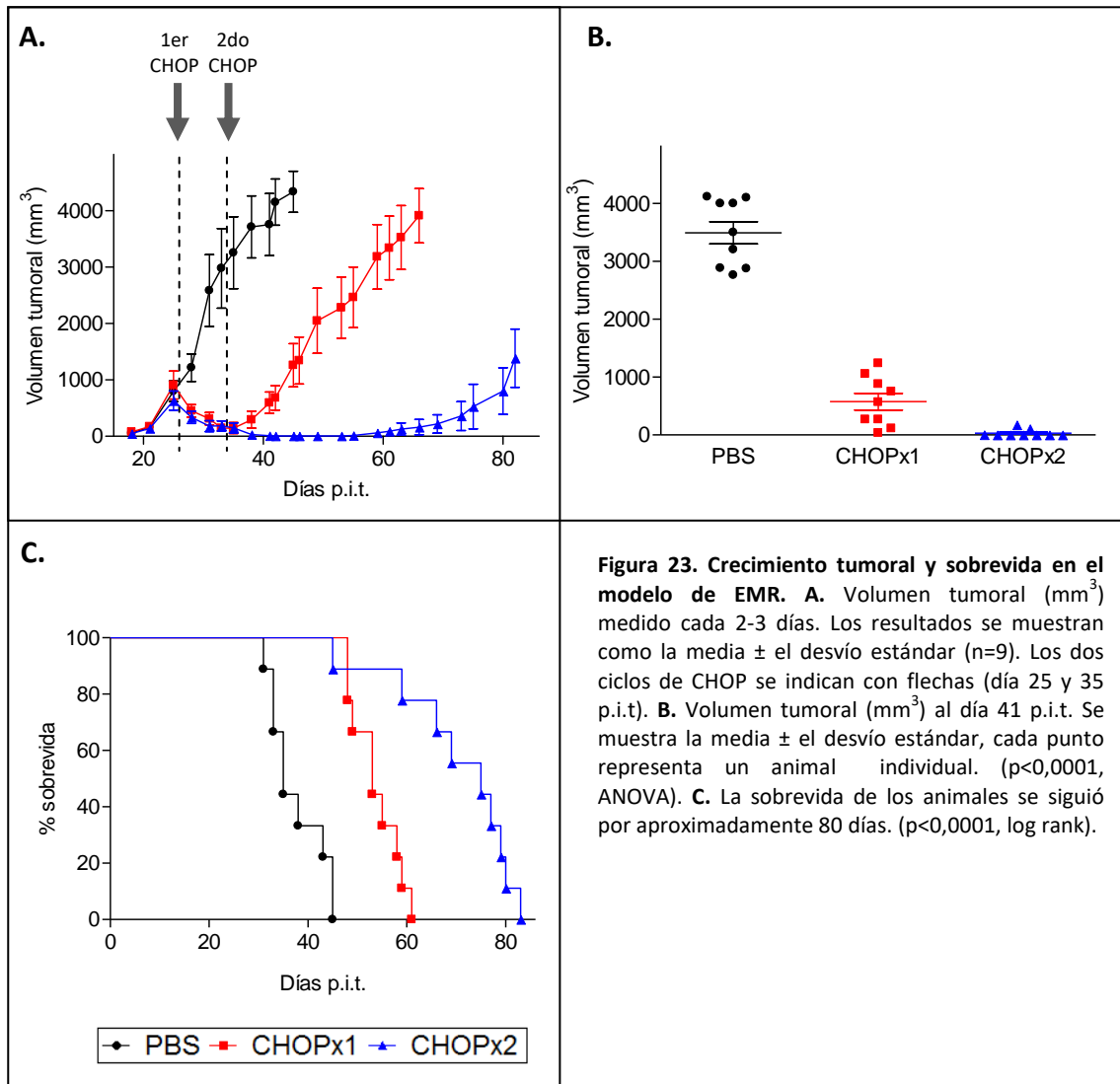


Figura 23. Crecimiento tumoral y sobrevida en el modelo de EMR. A. Volumen tumoral (mm³) medido cada 2-3 días. Los resultados se muestran como la media \pm el desvío estándar (n=9). Los dos ciclos de CHOP se indican con flechas (día 25 y 35 p.i.t). **B.** Volumen tumoral (mm³) al día 41 p.i.t. Se muestra la media \pm el desvío estándar, cada punto representa un animal individual. ($p < 0,0001$, ANOVA). **C.** La sobrevida de los animales se siguió por aproximadamente 80 días. ($p < 0,0001$, log rank).

2.3 Evaluación de la remisión tumoral en los ratones tratados con CHOP

2.3.1 Histología

Uno de los principales objetivos de este trabajo fue desarrollar un modelo pre-clínico de EMR de LNH de modo de contar con un contexto más similar al que se encuentra en la clínica donde investigar nuevas inmunoterapias. Para desarrollar dicho modelo tratamos a los animales con dos ciclos de CHOP y logramos una remisión clínica por un período de aproximadamente 20 días. Para confirmar dicha remisión, al día 45 p.i.t. se sacrificaron ratones del grupo PBS y CHOPx2 con los cuales se llevaron a cabo necropsias y análisis histológico. El estudio macroscópico mostró que en los

animales control (no tratados), había diseminación de la enfermedad con compromiso de ganglios linfáticos e hígado (Fig. 24A). Se observó infiltración de linfoma a nivel de ganglios inguinales y retroperitoneo. Por el contrario, en los animales del grupo CHOPx2 no se observó diseminación de la enfermedad (Fig. 24B). Por otro lado, se evaluó por histología tejido del sitio del tumor primario, ganglios drenantes y de retroperitoneo, bazo, hígado y cualquier tejido que presentara apariencia anormal, de modo de evaluar la infiltración por parte del linfoma. Al observar los cortes de hematoxilina-eosina, determinamos que el tumor se caracteriza por un patrón de crecimiento difuso con centrocitos y centroblastos (Fig. 25). Estas células son similares histológicamente a las encontradas en el LDGCB humano. Observamos compromiso de hígado en un 76 % de los animales del grupo control y 11 % para el grupo CHOPx2. La infiltración a nivel de hígado se caracterizó por células linfoides atípicas de gran tamaño con distribución perivenosa central dentro del parénquima hepático (Fig. 25D).



Figura 24. Necropsias de los animales con y sin tratamiento quimioterápico al día 45 p.i.t. A. Foto representativa de ratón sin tratamiento: se indica con flecha infiltración de linfoma en retroperitoneo (1) e hígado (2). **B.** Foto representativa de ratón del grupo CHOPx2 con remisión completa.

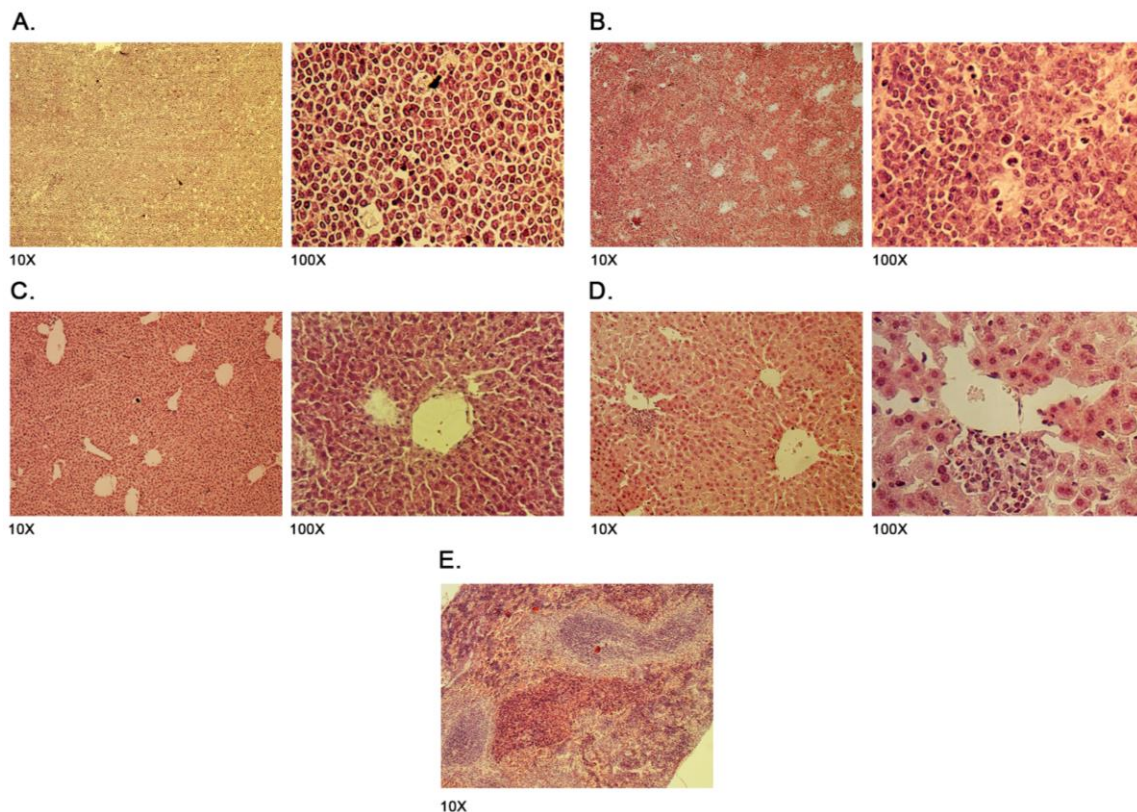


Figura 25. Estudio histológico con tinción hematoxilina-eosina del modelo de EMR. A. Tumor primario en ratón del grupo control (PBS): se observa la histología de LNH-B que corresponde a una infiltración difusa por centrocitocitos y centroblastos con patrón en cielo estrellado debido a la elevada tasa de proliferación. **B.** Corte de tejido de retroperitoneo de un ratón en el cual persiste la enfermedad post-quimioterapia: se observa similar histología que en tumor primario caracterizada por infiltración difusa con centrocitocitos y centroblastos. **C.** Corte de hígado de ratón en remisión completa post-quimioterapia: se observa la arquitectura típica de tejido hepático con la vena centrolobulillar con los sinusoides hepáticos dispuestos en forma radial. A 100X se observa en detalle los hepatocitos dispuestos alrededor de vena centrolobulillar. **D.** Corte de hígado de ratón en el cual persiste LNH post-CHOP: las células tumorales infiltrantes se observan a nivel del espacio porta. **E.** Corte de bazo de ratón en remisión completa: se observa la arquitectura normal del órgano sin infiltración de LNH, con la pulpa roja y blanca característica.

2.3.2 Evaluación de la remisión completa por PET/CT

En la actualidad, las técnicas de imagenología avanzadas permiten mejorar el diagnóstico de la enfermedad, y además, tienen gran potencial para utilizarlas en investigación pre-clínica, ya que con ellas se puede evaluar la respuesta a tratamientos y realizar el seguimiento de la enfermedad sin necesidad de sacrificar animales. Por este motivo, nos planteamos evaluar el uso de la técnica PET/CT como una alternativa para la monitorización *in vivo* de la enfermedad. Para ello, en primer lugar corroboramos que el análogo de la glucosa (^{18}F -FDG) fuera captado por las células del linfoma A20 en animales con tumor, confirmando que es un buen radiotrazador para

utilizar en el modelo A20⁴⁷⁴. Las imágenes de PET/CT se realizaron antes (día 25 p.i.t) y después (día 45 p.i.t) del tratamiento quimioterápico, de modo de evaluar la captación de ¹⁸F-FDG y confirmar la remisión completa. El valor del cociente B/NB post-CHOP, se fijó en 2,45 y fue calculado utilizando las curvas ROC, con la histología como “gold standard”, según se describe en M&M. Los animales que tenían valores de B/NB de 2,45 o más se consideraban con enfermedad residual. El valor de AUC fue de 0,74 (95% CI 0,600–0,991), con una sensibilidad de 85,7% y especificidad de 75%. Considerando el valor de corte, como era de esperar, las imágenes pre-CHOP (día 25 p.i.t) mostraron captación en el lugar del tumor primario, sin presencia de metástasis (Fig. 26A). Por otro lado, el análisis de las imágenes post-CHOP (día 45 p.i.t) reveló que la mayoría de los animales presentaban remisión completa (Fig. 26A). Algunos presentaron captación a nivel del sitio primario (Fig. 26B), en discordancia con los resultados histológicos, sugiriendo la existencia de falsos positivos. Los animales post-CHOP que tenían captación de ¹⁸F-FDG a nivel de tumor primario también presentaron captación a nivel de retroperitoneo e hígado (Fig. 26C), evidenciando la existencia de metástasis, en concordancia con los resultados obtenidos con la histología.

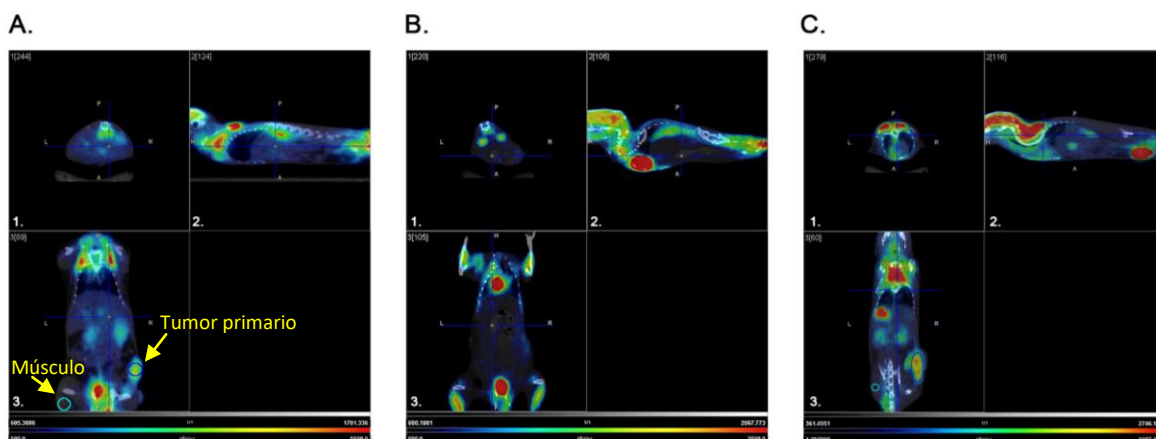


Figura 26. Seguimiento *in vivo* del LNH-B por PET/CT. Imágenes representativas de: A. Ratón portador de tumor A20 al día 25 p.i.t. (pre-CHOP). Se observa captación de FDG a nivel de tumor primario. Los Volúmenes de Interés (VOI) se señalan con círculos: tumor primario (azul) y músculo esquelético (celeste). Ratio B/NB: 4,5. **B.** Ratón en remisión completa al día 45 p.i.t. (post-CHOP). Los valores de captación de FDG, tanto en el sitio de tumor primario como en el resto de los órganos, están por debajo del nivel de detección. **C.** Ratón sin remisión de la enfermedad al día 45 p.i.t. (post-CHOP). Se observa tumor primario y metástasis hepática. Los VOIs se indican con círculos: tumor primario (azul), metástasis hepática (rojo), músculo esquelético (celeste). Ratio B/NB: 4,0, hígado/músculo: 3,3. Imagen 1: corte axial, 2: corte sagital, 3: corte coronal.

2.3.3 Estudio del LNH-B por rayos X

Se tomaron imágenes mediante rayos X (RX) en la cámara In-Vivo MS FX PRO (Bruker BioSpin, al día 15, 22 y 29 p.i.t. (Fig. 27). Con esta técnica no fue posible definir los bordes del tumor primario ni determinar la presencia de metástasis, por lo que se discontinuó el estudio.

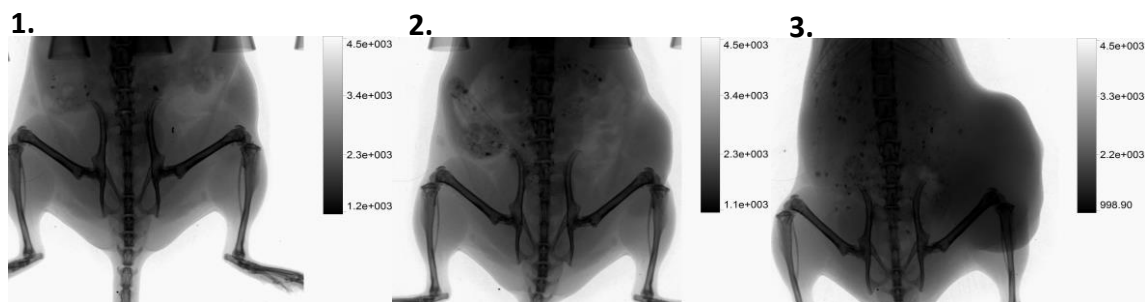


Figura 27. RX. Imágenes representativas de ratones con tumor primario (flecha roja) captadas a los días 15 (1), 22 (2) y 29 (3) post-inoculación de células A20 con la cámara In-Vivo MS FX PRO.

2.4 Estado inmunológico de los animales sometidos al tratamiento quimioterápico

Para evaluar el estado inmunológico de los animales tratados con CHOP, se sacrificaron cinco ratones por grupo al día 45 p.i.t. para extraer bazo y realizar ensayos de proliferación. Como se muestra en la Fig. 28, los animales sometidos a tratamiento quimioterápico mostraron tasas de proliferación frente a la estimulación con el mitógeno ConA similares a las encontradas en el grupo control (PBS).

Los animales del grupo CHOPx2 que tuvieron una respuesta parcial (con enfermedad residual), también fueron sacrificados al día 45 p.i.t. para extraer muestras de tumor primario y evaluar poblaciones infiltrantes de tumor. En el grupo CHOPx2 se observó un incremento en el número de linfocitos T CD4⁺ ($p=0,0023$) y CD8⁺ ($p=0,0034$) infiltrantes de tumor, en comparación con el grupo control (Fig. 29). El número de células NK, células T reguladoras (Tregs) y neutrófilos fue similar en ambos grupos.

Con las muestras de tumor también se realizó la cuantificación de citoquinas y quimioquinas por PCR en Tiempo Real. Se utilizó *B2m* como gen constitutivo y para

determinar el incremento relativo del ARNm para cada gen se relativizó con respecto al grupo PBS. En el grupo CHOPx2 se observó un incremento significativo en los niveles de ARNm para *Ccl3*, *Ccl4*, *Ccl5*, *Cxcl12*, *Il2*, *Il12* e *Ifng*, y una disminución de *Cxcr4* y *Tgfb* respecto al grupo control (Fig. 30).

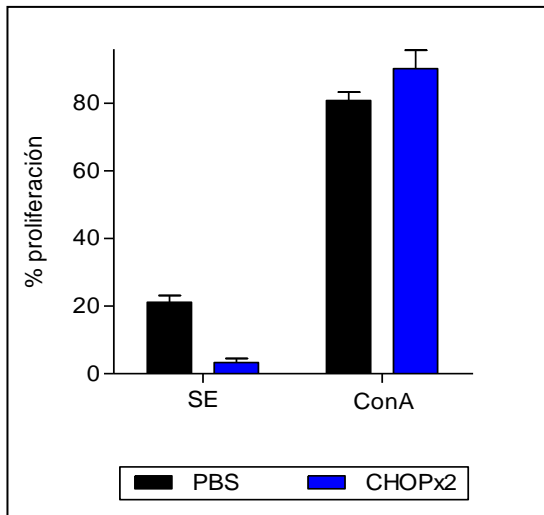


Figura 28. Ensayo de proliferación con esplenocitos. Se sacrificaron ratones del grupo PBS y CHOPx2 al día 45 p.i.t. para extraer bazo y realizar ensayos de proliferación. Los resultados se muestra como la media \pm desvío estándar (n=5) para las dos condiciones estudiadas, ConA o sin estimular (SE).

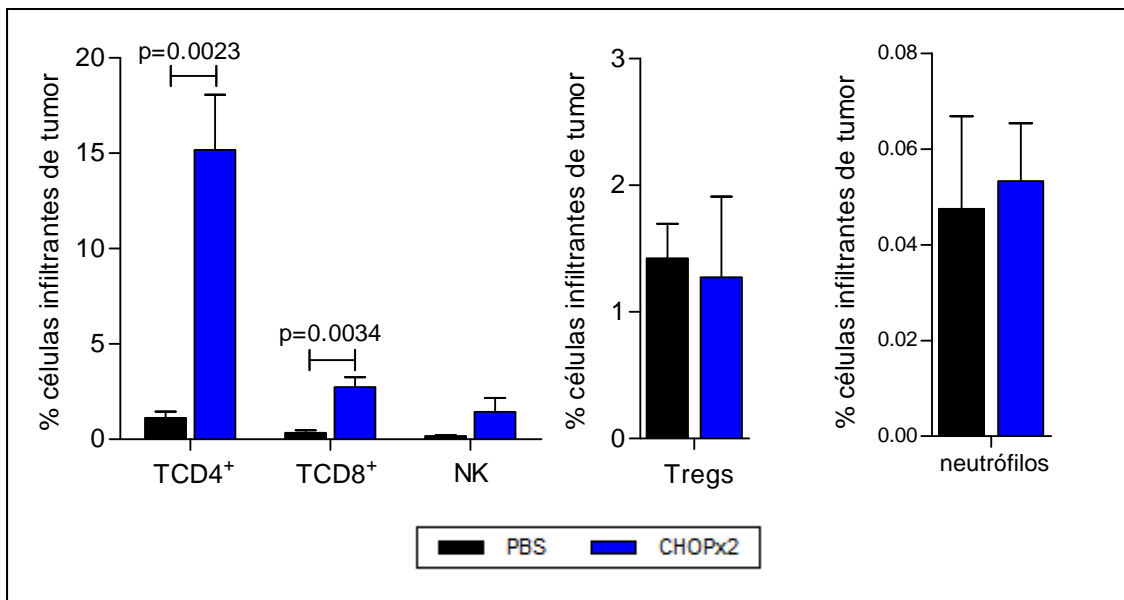


Figura 29. Células infiltrantes de tumor. Al día 45 p.i.t. se sacrificaron ratones del grupo PBS y CHOPx2 para extraer muestras de tumor para estudiar las poblaciones infiltrantes de tumor. Se determinó por citometría de flujo el porcentaje de linfocitos T CD4⁺ (CD3⁺ CD4⁺), T CD8⁺ (CD3⁺ CD8⁺), Tregs (CD3⁺ CD4⁺ CD25⁺ FoxP3⁺), células NK (CD3⁻ CD49b⁺), y neutrófilos (Gr1⁺ CD11b⁺). Los resultados se muestran como la media \pm desvío estándar (n=5). Las diferencias significativas se muestran con el valor p (test de Student).

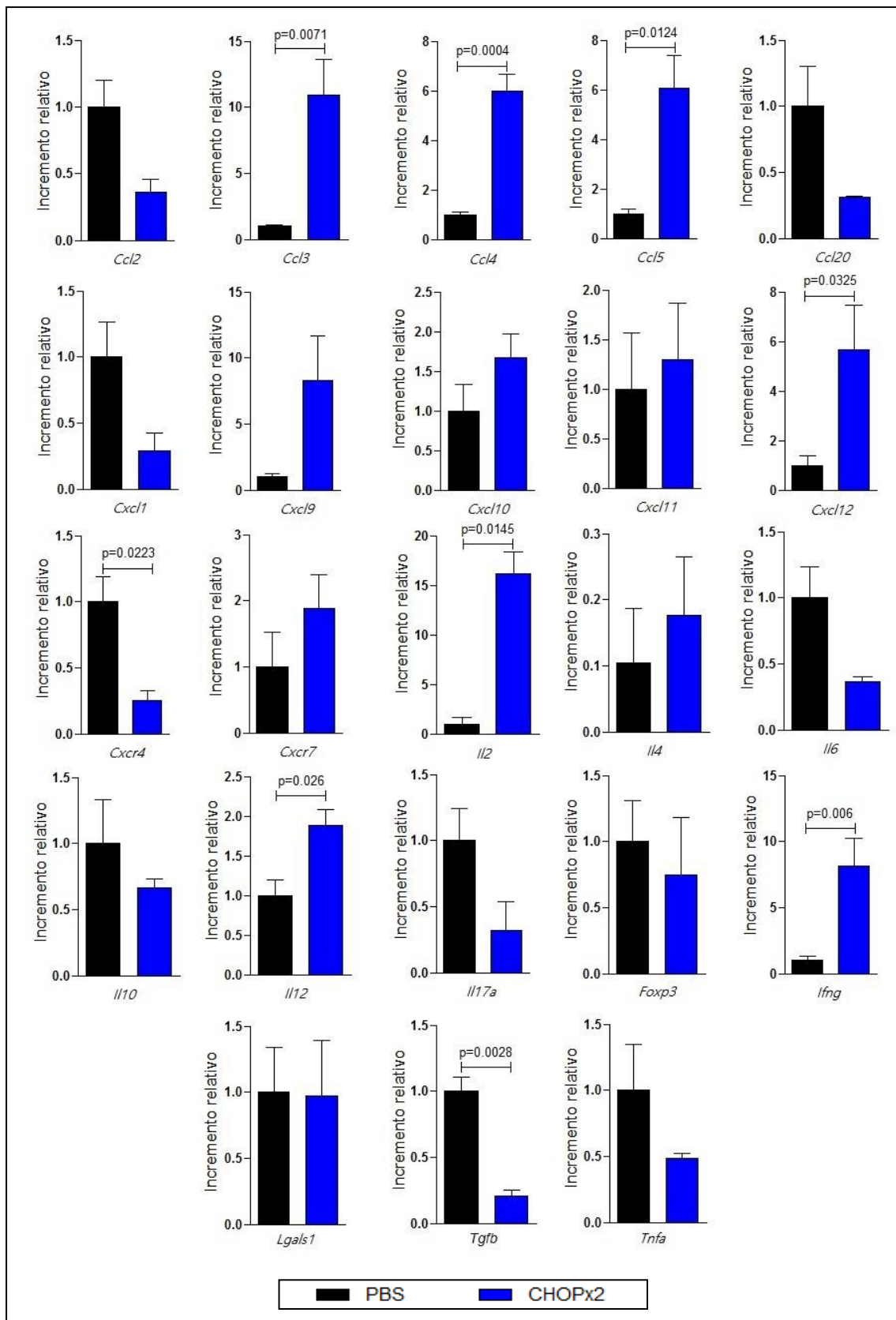


Figura 30. Expresión de quimioquinas y citoquinas en el microambiente tumoral. Al día 45 p.i.t. se sacrificaron ratones (n=5) de los grupos PBS y CHOPx2 para extraer muestras de tumor, en las que se estudiaron los niveles de ARNm de distintas citoquinas y quimioquinas. Los valores de ARNm se normalizaron utilizando *B2m* como gen constitutivo y los resultados se expresaron relativos a los niveles de ARNm del grupo PBS (incremento relativo). Los resultados se muestran como la media \pm el desvío estándar. Las diferencias significativas se muestran con el valor p (test de Student).

3 DISCUSIÓN

En los últimos años, las terapias contra LNH han tenido un gran avance ^{11,407}, sin embargo, las tasas de recaída siguen siendo insatisfactorias, motivando la búsqueda de inmunoterapias más efectivas. Los modelos animales son esenciales para la investigación y desarrollo de nuevas inmunoterapias, y el uso de ratones de laboratorio bien caracterizados es probablemente uno de los mejores sistemas de investigación. En ratones, el desarrollo del cáncer tiene características fisiológicas similares a las de humano, con adquisición de mutaciones en oncogenes y genes supresores de tumores equivalentes ^{495,496}. Los modelos xenógrafos están dentro de los más utilizados a la hora de evaluar la actividad de drogas a nivel pre-clínico, pero no son adecuados para estudiar inmunoterapias o el microambiente tumoral, ya que para ello se requieren animales inmunocompetentes ⁴⁶¹. Además, para determinar con mayor precisión la respuesta generada por inmunoterapias contra LNH, las mismas deberían ser evaluadas en un contexto más similar al que se encuentran los pacientes (tratamiento quimioterápico como primera línea). La quimioterapia puede modular distintos aspectos de la inmunobiología tumoral y la integración entre ésta y las inmunoterapias debe ser óptima de modo de minimizar interacciones antagónicas, promoviendo la sinergia entre ambas ⁴⁹⁷. Las terapias de combinación que integran distintas inmunoterapias, incluyendo las antagonistas de los puntos de control del sistema inmune, vacunas contra el cáncer, la quimioterapia, la radioterapia y la terapia molecular dirigida están actualmente en intensa investigación ⁴⁹⁷. Un ejemplo clínico es el uso de dosis de ciclofosfamida de 200 a 300 mg/m² un día antes de la vacunación con sialil-Tn (carbohidrato de la familia de las mucinas presente en la superficie de muchas células tumorales) conjugado a KLH, o 600 mg/m² administrado siete días antes de la vacunación puede disminuir el número de células Tregs en cáncer de mama metastásico ⁴⁹⁷. La inmunoterapia idealmente debe ser aplicada en un estado de EMR, o luego de que la masa tumoral sea reducida con quimioterapia. Esta estrategia debería minimizar el impacto negativo que tiene el tumor en el sistema inmune y además potenciaría los efectos de la inmunoterapia con agentes tradicionales. En este sentido, actualmente la combinación de tratamientos se está utilizando en varios tipos de cánceres, mostrando avances en la clínica. Muchos ensayos clínicos donde prueban

vacunas contra LNH mostraron una respuesta anti-tumoral luego de lograr la remisión completa o parcial con quimioterapia^{407,413,498,499}. Por todas estas razones, se propone que la investigación a nivel pre-clínico de tratamientos contra LNH debería realizarse en modelos que se asemejen más a lo que ocurre en la clínica.

Actualmente, la combinación de las cuatro drogas que componen el CHOP (ciclofosfamida, doxorubicina, vincristina y esteroides) junto con rituximab, son el tratamiento estándar de primera línea para el tratamiento de linfomas agresivos (el más frecuente LDGCB) y para la mayoría de los indolentes^{31,32,481,500}. Con el fin de definir condiciones pre-clínicas más adecuadas, se evaluó el uso de CHOP para generar un nuevo modelo en animales portadores de linfoma A20 que se asemeje más a la situación clínica. En primer lugar, estudiamos la sensibilidad *in vitro* que tienen las células A20 a las drogas que componen el CHOP. Encontramos que el valor de IC₅₀ para la doxorubicina y vincristina fue similar a las reportadas por DiJoseph et al. para otras líneas celulares de linfoma⁴⁹². Por su parte la sensibilidad de la línea celular A20 a la ciclofosfamida y dexametasona no pudo ser evaluada, ya que estas drogas requieren metabolización hepática. Posteriormente, se estudió la combinación de drogas *in vivo* en animales portadores de tumor A20. Se logró la remisión del linfoma administrando dos ciclos de CHOP separados por diez días, con resultados reproducibles. Dicha remisión perdura al menos por 20 días (estado de EMR), siendo esta ventana de tiempo razonable para investigar nuevas inmunoterapias. Se observó que el régimen de CHOP administrado fue bien tolerado, con neutropenia y pérdida de peso transiente.

Los ensayos de proliferación con esplenocitos y el estudio de células infiltrantes de tumor determinamos que la administración de la quimioterapia no genera inmunosupresión en los animales. La quimioterapia se consideró históricamente inmunosupresora, pero estudios recientes han demostrado que ciertos regímenes de drogas quimioterápicas pueden, además de ejercer su efecto citotóxico, aumentar la inmunidad tumoral. La quimioterapia puede promover la respuesta inmune anti-tumoral aumentando la inmunogenicidad de las células tumorales, o inhibiendo los circuitos inmunosupresivos que poseen las células tumorales⁵⁰¹⁻⁵⁰³. Recientemente, se describió el uso de gemcitabina en ratones que tenían deficiencia en la presentación cruzada de antígenos tumorales por parte de células dendríticas infiltrantes de tumor

⁵⁰³. En modelos pre-clínicos, una dosis baja de ciclofosfamida disminuye el número de células Tregs, promueve la maduración de las células dendríticas, cambia el fenotipo de células T CD4+ de Th2 a Th1, induce la diferenciación de células tipo Th17 y promueve la diferenciación de células T de memoria de largo plazo ⁵⁰². Algunos quimioterápicos, administrados en determinadas dosis, pueden mediar el efecto anti-tumoral, al menos en parte, induciendo la muerte celular inmunogénica, en la que está implicada la liberación de antígenos tumorales y DAMPs en el microambiente tumoral, lo que resulta en un microambiente pro-inflamatorio, donde se puede desarrollar inmunidad específica anti-tumoral ⁵⁰². A diferencia de lo que ocurre con la apoptosis celular, donde se induce muerte celular programada en un contexto tolerogénico, la muerte celular inducida por la quimioterapia produce cambios específicos en la superficie celular y liberación de mediadores solubles. Se ha observado que la exposición de calreticulina en la superficie celular es crítica para que dicha muerte celular se lleve a cabo ⁵⁰⁴. Posteriormente se produce la liberación de ATP que promueve el reclutamiento de células presentadoras de antígenos; en apoptosis tardía dicha presentación antigénica se ve aumentada por la señalización vía TLR4 en células dendríticas desencadenada por la liberación de HMGB1 ⁵⁰⁴. En particular, observamos que los animales que recibieron dos dosis de CHOP (grupo CHOPx2) tienen números más elevados de linfocitos T CD4+ y CD8+ infiltrantes de tumor, así como un aumento significativo de las citoquinas IL-2, IL-12 e IFN- γ , y una disminución en la expresión del gen *Tgfb*, reforzando la idea de que el tratamiento con CHOP puede estimular el desarrollo de inmunidad anti-tumoral efectiva ⁵⁰².

Existe cada vez más evidencia de que el microambiente tumoral juega un rol esencial en todos los aspectos de la biología del cáncer, incluyendo el crecimiento, angiogénesis, metástasis y progresión. En este sentido, se reconoce que las quimioquinas y sus receptores, originalmente identificadas como mediadores en enfermedades inflamatorias, sirven como puentes de comunicación críticos entre las células tumorales y las células del estroma para crear un microambiente permisivo para el crecimiento tumoral y la metástasis ^{236,302,505,506}. En melanoma, se ha demostrado que la sobre-expresión de varias citoquinas como *Ccl2*, *Ccl3*, *Ccl4*, *Ccl5*, *Cxcl9*, y *Cxcl10* en el microambiente tumoral se correlaciona con el reclutamiento de células T efectoras activadas que aumentan la inmunidad anti-tumoral ⁵⁰⁷. A la inversa,

también se ha visto bajos niveles de estas quimioquinas en melanomas y carcinoma colono rectales con poca infiltración de células con actividad anti-tumoral ⁵⁰⁷⁻⁵⁰⁹. Nuestros resultados mostraron un aumento significativo de la expresión de los genes *Ccl3*, *Ccl4* y *Ccl5* en el grupo CHOPx2 en comparación con el grupo PBS al día 45 p.i.t, en concordancia con los resultados previamente reportados, sugiriendo fuertemente que en nuestro modelo el tratamiento con quimioterapia induce una muerte celular inmunogénica. Más aún, en el grupo CHOPx2 encontramos un aumento significativo de la expresión de *Cxcl12*, pero no de su receptor CXCR4. El eje biológico CXCL12–CXCR4 se asocia a la invasión tumoral y metástasis. De hecho, se ha visto que CXCR4 es el receptor de quimioquinas más sobreexpresado en tumores humanos ²³⁶. En concordancia con esto último, el grupo sin tratamiento (PBS) presentó mayores niveles de ARNm para dicho gen. Además, se observó una expresión aumentada del gen *Tgfb* respecto al grupo CHOPx2, lo cual también podría asociarse al mal pronóstico de este grupo ^{221,510,511}.

Para confirmar la remisión tumoral y monitorizar la enfermedad *in vivo*, se llevó a cabo imagenología molecular utilizando PET/CT. Cuando el tumor no puede ser detectado clínicamente, el uso de PET luego de la administración de la quimioterapia, permite el diagnóstico de la remisión completa. La técnica de PET es una técnica no invasiva, fácil de realizar en animales anestesiados, que ofrece la posibilidad de observar el desarrollo tumoral de una forma dinámica. Recientemente, el uso del PET para el diagnóstico y monitorización de los pacientes con LNH, así como otro tipo de cánceres ha incrementado ^{468,512}. El radiotrazador más frecuentemente utilizado es el análogo de glucosa FDG, marcado con el radionucleido ¹⁸F. Varios estudios han demostrado la captación aumentada de ¹⁸F-FDG en la mayoría de los linfomas, con una buena correlación entre la intensidad de captación, malignidad del tumor y la actividad proliferativa ⁵¹³. Chaise & col. han demostrado la factibilidad del uso de ¹⁸F-FDG como radiotrazador en el modelo murino de alta carga tumoral A20 ⁴⁷⁴. En el presente estudio pudimos evaluar la respuesta al tratamiento detectando linfoma intra-abdominal y compromiso hepático. Hasta donde sabemos, el presente estudio es el primero en evaluar el valor de la FDG-PET para el seguimiento *in vivo* de la remisión tumoral posterior a la quimioterapia en un modelo murino de LNH. En los pacientes, es aceptado que las reacciones inflamatorias post-quimioterapia aumentan la tasa de

resultados falsos positivos obtenidos con PET. Para minimizar esto, el estudio de PET debe realizarse tres semanas luego de la quimioterapia ⁵¹⁴. Un estudio de metanálisis llevado a cabo por Zijlstra et al. reveló que la sensibilidad y especificidad fue de 72% (95% CI 61-82%) y 100% (95% CI 97-100%), respectivamente ⁵¹⁵. En nuestros estudios de PET, observamos una buena sensibilidad (85,7%), mientras que la especificidad fue 75%. La baja especificidad comparada a los resultados reportados en humanos, puede explicarse por la inflamación remanente post-CHOP en el momento de realizar el estudio.

En conclusión, se logró desarrollar un modelo pre-clínico de EMR de LNH mediante la administración de quimioterapia estándar similar a la utilizada en la clínica. Creemos que contar con un modelo de estas características es una herramienta importante para la evaluación de nuevas inmunoterapias, que contribuirá a cerrar la brecha entre los modelos pre-clínicos y ensayos clínicos.

Los resultados desprendidos de este trabajo fueron publicados en la revista arbitrada *Journal of Translational Medicine* ⁵¹⁶ (se adjunta artículo completo en Apéndice).

CAPÍTULO IV

IL-15 COMO

INMUNOTERAPIA PARA

LNH-B

1 OBJETIVO

Previamente nuestro grupo de trabajo reportó el efecto terapéutico que tiene la administración de una vacuna formulada con células de linfoma A20 infectadas con *Salmonella* previo a ser irradiadas, administrada junto con la citoquina IL-2 ⁴³¹. Además, esta citoquina también se utilizó en otra vacuna desarrollada por nuestro grupo, formulada con células tumorales lisadas e IL-2 adsorbida a hidróxido de aluminio ³⁵⁴. La administración de esta vacuna en ratones portadores de linfoma A20 produjo una respuesta antitumoral potente. Con estos antecedentes, en el presente trabajo planteamos estudiar en el modelo de EMR, la terapia que utiliza la vacuna a células enteras, pero en lugar de incluir IL-2, se modificarán las células A20 para que expresen la citoquina IL-15, ya que como hemos mencionado anteriormente, por sus características es mejor candidata para ser utilizada en terapias contra el cáncer que la IL-2. Se evaluará la respuesta antitumoral generada por esta aproximación terapéutica.

2 RESULTADOS

2.1 Modificación de las células A20 para que expresen de forma estable la citoquina IL-15

2.1.1 Clonado del gen *IL15* murino

El primer paso en la construcción de la vacuna fue el clonado del gen *IL15* murino en el vector plasmídico pcDNA3.1(-), amplificándolo a partir del plásmido pORF9mIL-15, según se describe en M&M. La búsqueda de los clones de interés se llevó a cabo mediante amplificación del fragmento IL-15 utilizando como molde “supuestos” plásmidos pcDNA3.1IL-15 (Fig. 31A) y por análisis de restricción con las enzimas BglII-EcoRI, y KpnI-Sall-PstI (FastDigest, Thermo Fisher Scientific) (Fig. 31B). Los tamaños de los fragmentos obtenidos con las digestiones fueron los esperados; la digestión con BglII-EcoRI genera los fragmentos de 1.076 pb (libera el fragmento clonado) y 4.485 pb, y con KpnI-Sall-PstI se generan los de 928 pb, 1.137 pb, 1.323 pb,

2.185 pb. Finalmente la construcción se corroboró mediante secuenciación (Ver Apéndice), y se denominó pcDNA3.1IL-15 (Fig. 32).

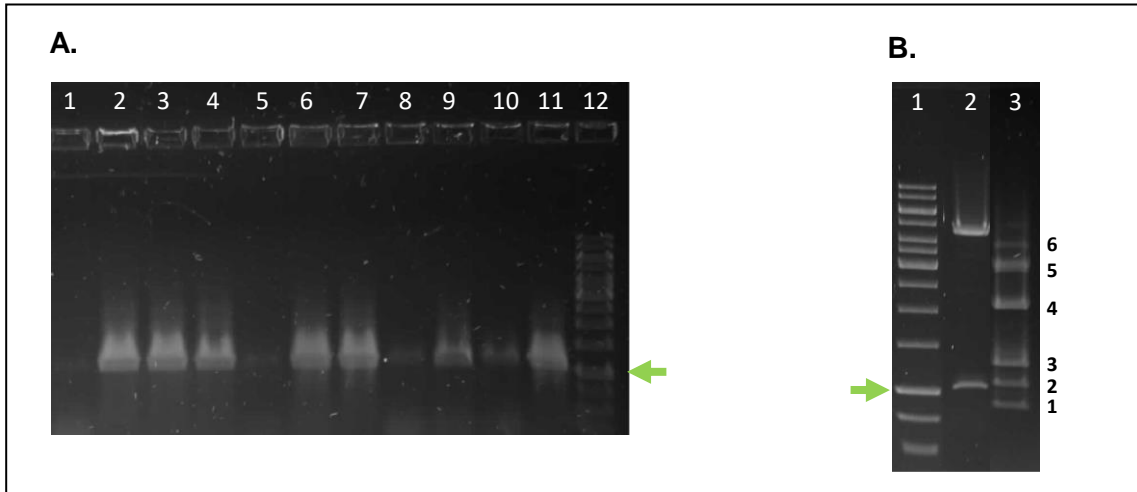


Figura 31. Búsqueda de los clones de interés. A. Gel de agarosa 0,8% donde se observa la amplificación por PCR del fragmento clonado a partir de supuestos clones portadores de la construcción de interés, 1) control negativo, 2-11) supuestos clones de interés, 12) Ladder 1Kb (bandas de menor a mayor (kb): 0,5, 0,75, 1, 1,5, 2, 2,5, 3, 3,5, 4, 5, 6, 8 y 10). B. Gel de agarosa 0,8% donde se corrieron las digestiones con distintas enzimas de restricción de uno de los clones que amplificó el fragmento que contiene el gen *IL15*, 1) Ladder 1Kb, 2) construcción digerida con BglIII+EcoRI (nótese la liberación del fragmento clonado de 1.076 pb), 3) construcción digerida con KpnI+PstI+Sall. Se corroboró que el patrón de bandas fuera el correcto si la construcción era la deseada: 1- 928 pb, 2- 1.137 pb, 3- 1.323 pb, 4- 2.185 pb, 5- dos bandas juntas (3.113 pb y 3.322 pb), 6- 4.250 pb, en 5 y 6 las bandas se deben a la digestión parcial con Sall. La flecha verde indica el fragmento de 1.000 pb del Ladder 1kb.

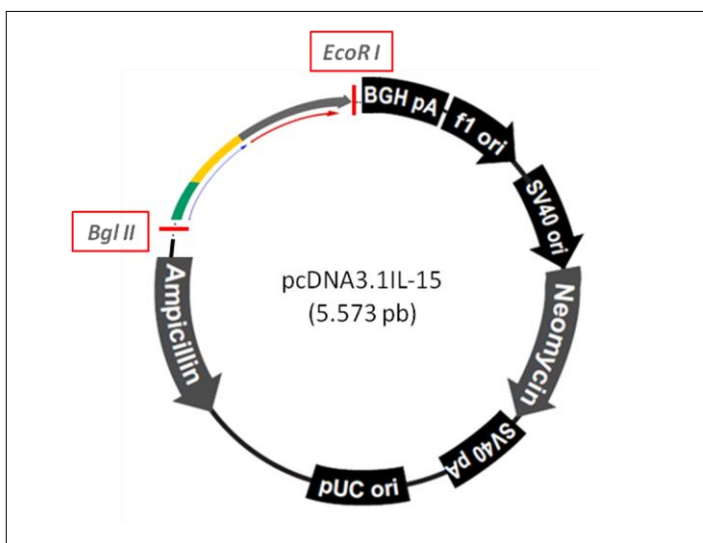


Figura 32. pcDNA3.1IL15. Construcción resultante del clonado del fragmento que porta el gen codificante para la citoquina IL-15 en el vector pcDNA3.1(-).

2.1.2 Transfección de la línea tumoral A20

Previo a la transfección de las células A20, se realizó la prueba de sensibilidad de dicha línea celular al antibiótico neomicina, resistencia que porta el vector pcDNA3.1(-). La dosis de selección recomendada por el fabricante para la línea tumoral A20 es 400 $\mu\text{g/ml}$, pero se eligió la de 100 $\mu\text{g/ml}$ dado que a los 10 días de agregado el antibiótico, no se observaron diferencias significativas entre la dosis elegida y las de 300-700 $\mu\text{g/ml}$ (Fig. 33).

La transfección de las células A20 se llevó a cabo por la técnica de nucleofección, según se describe en M&M. La transfección con el plásmido reportero pmaxGFP evidenció una eficiencia de transfección de 80% (resultados no mostrados). La línea celular transfectada con el plásmido portador del gen para IL-15 se denominó A20 (IL-15) y la transfectada con el plásmido control, A20 (pcDNA3.1).

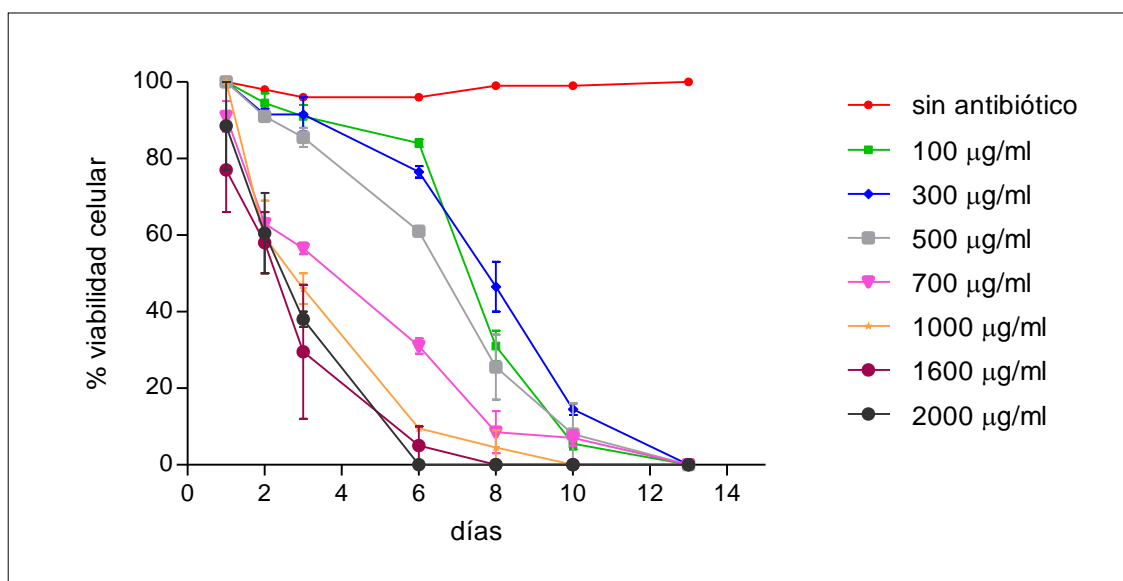


Figura 33. Prueba de sensibilidad al antibiótico neomicina. En la gráfica se muestra el porcentaje de viabilidad celular para cada dosis probada \pm desvío estándar. Para determinar el % de viabilidad se utilizó azul de Tripán y para cada dosis se realizaron triplicados.

2.1.3 Estudio de la expresión de la citoquina IL-15

En primer lugar, se estudió la expresión de *IL15* en distintos clones transfectantes mediante RT-PCR (Fig. 34). Los clones para los que se encontraron los mayores niveles de ARNm de *IL15* fueron los números 3, 4, 5 y 10. Posteriormente

estos clones se analizaron por WB para ver la citoquina a nivel proteico. Sorprendentemente, no pudimos detectar la proteína de interés en ninguna de las muestras, tanto en sobrenadantes como en pellets. Cabe mencionar que el control positivo utilizando de IL-15 recombinante dio una banda de aproximadamente 14 kDa (resultados no mostrados), lo que concuerda con el tamaño descrito por el fabricante (13,4 kDa) para la proteína recombinante.

Finalmente, y como alternativa para poder evidenciar la producción de la proteína, se realizaron ensayos con MTT, utilizando la línea celular CTLL-2, dependiente de IL-15, para determinar la actividad biológica de esta citoquina según se describe en M&M. Cabe aclarar, que dada la dificultad para crecer las células CTLL-2, estudiamos el sn de cultivo del clon N° 5 de A20 (IL-15), debido a que en este clon observamos los mayores niveles de ARNm de *Il15*, y el clon N° 1 de A20 (pcDNA3.1), elegido de forma arbitraria. Se observó una mayor proliferación de las células CTLL-2, visualizada como mayor procesamiento del MTT, en las células cultivadas con el sobrenadante de cultivo de A20 (IL-15) ($p=0,0005$, ANOVA) (Fig. 35A). Además, se ensayaron distintas diluciones del sobrenadante, observándose un efecto dosis respuesta. En particular se observaron diferencias significativas para la dilución $\frac{1}{2}$ ($p=0,0014$, test de Student) y $\frac{1}{4}$ ($p=0,016$, test de Student). (Fig. 35B). Interpolando en la curva de calibración la O.D del sobrenadante de cultivo de células productoras de IL-15 (0,38 unidades de absorbancia), se determinó que la producción de IL-15 es de 10,75 ng/ml cada 5×10^4 células (Fig. 36).

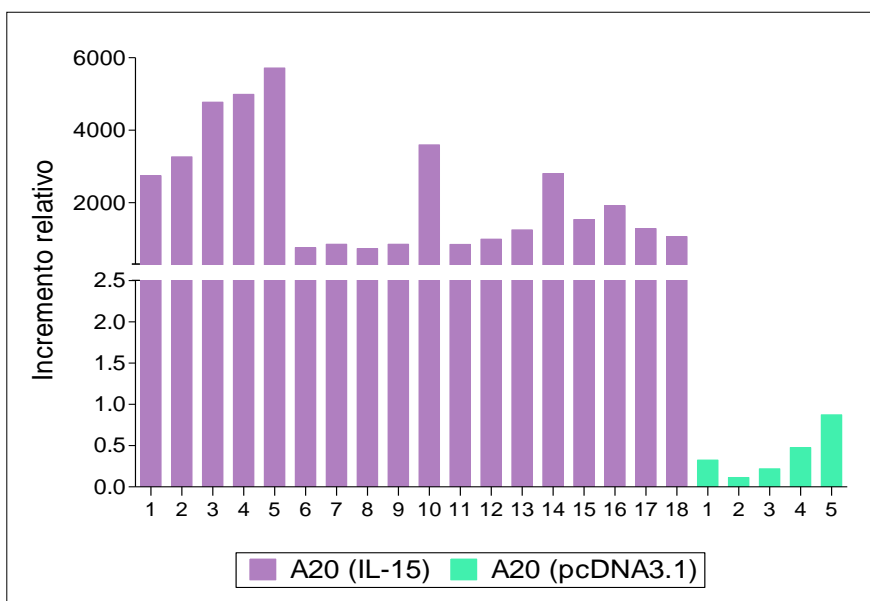


Figura 34. RT-PCR. Se representa el incremento relativo para varios clones portadores del plásmido pcDNA3.1IL-15 (1-18) y del plásmido vacío pcDNA3.1 (1-5). Se utilizó β -actina como gen constitutivo y se relativizó contra el plásmido vacío.

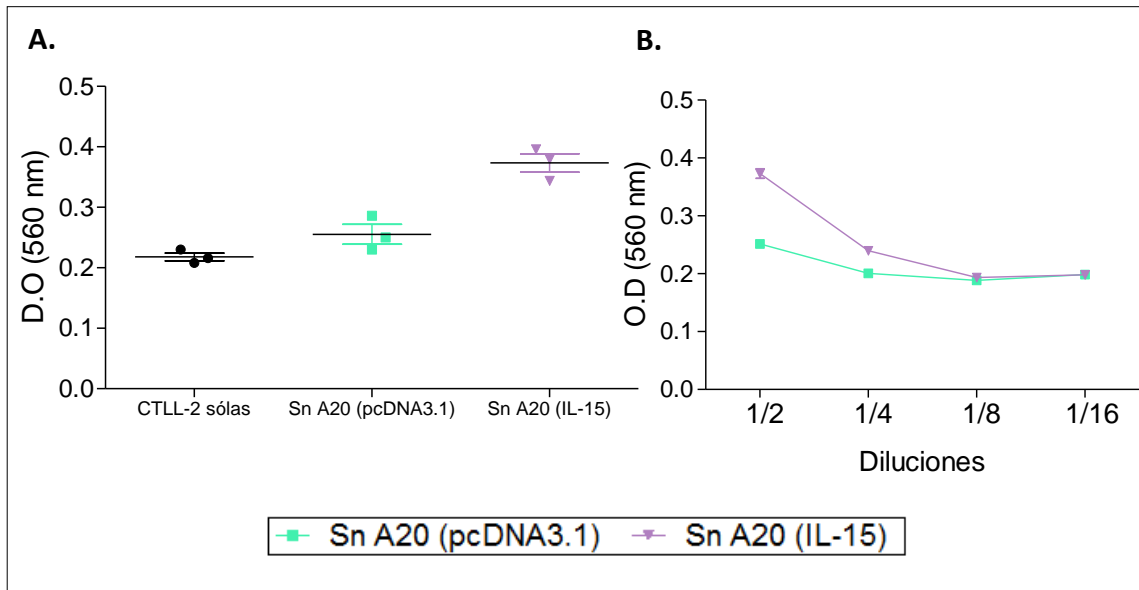


Figura 35. Estudio de la actividad biológica de la IL-15. A. Se muestra la media \pm desvío estándar de la D.O. para la dilución $\frac{1}{2}$ de los distintos sobrenadantes (Sn), cada condición se realizó por triplicado. B. Ensayo dosis respuesta con Sn de células productoras de IL-15 y Sn de células A20 transfectadas con el plásmido vacío.

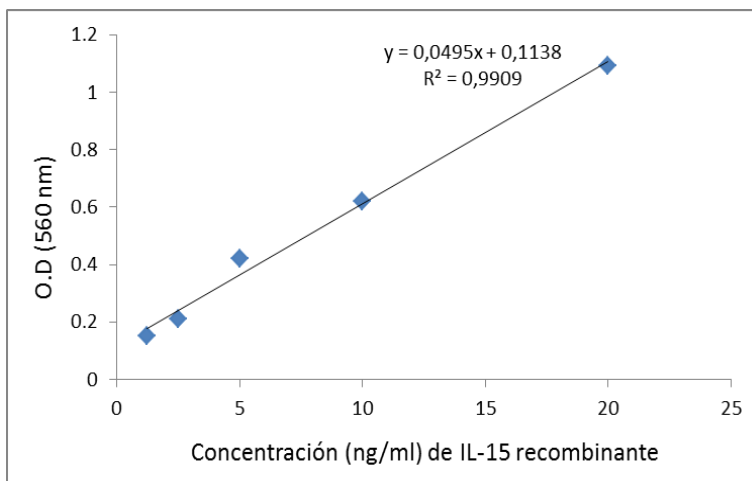


Figura 36. Curva de calibración con el estándar de citoquina IL-15. Para determinar la concentración de IL-15 en el sobrenadante de cultivo de células A20 (IL-15), se construyó la curva de calibración realizando diluciones $\frac{1}{2}$ del estándar de IL-15, partiendo de 20 ng/ml. Posteriormente se interpoló la O.D obtenida para dicho sobrenadante utilizando la ecuación de la curva.

2.1.4 Estudio de la tumorigenicidad de las células transfectantes

Se realizó un estudio para evaluar en forma comparativa la tumorigenicidad de las células transfectadas, ya sea con el plásmido portador del gen codificante para *IL15* o con el plásmido vacío, en comparación con las células sin transfectar. Para ello se inocularon 1×10^6 células A20, A20 (IL-15) (clon N° 5) o A20 (pcDNA3.1) (clon N° 1) en ratones BALB/c (n=5). Todos los animales desarrollaron tumor, y la cinética de crecimiento tumoral y sobrevida de las células transfectadas con el plásmido vacío

fue similar a la observada para las A20 sin modificar (Fig. 37). Por su parte, en los animales a los cuales se les implantaron las células A20 (IL-15), se observó un retardo en el crecimiento tumoral, diferencias significativas observadas al día 38 p.i.t. ($p=0,0013$, ANOVA), y sobrevida extendida ($p=0,002$, log rank). Para los siguiente ensayos se continuó utilizando el clon N° 5 de A20 (IL-15) y N°1 de A20 (pcDNA3.1).

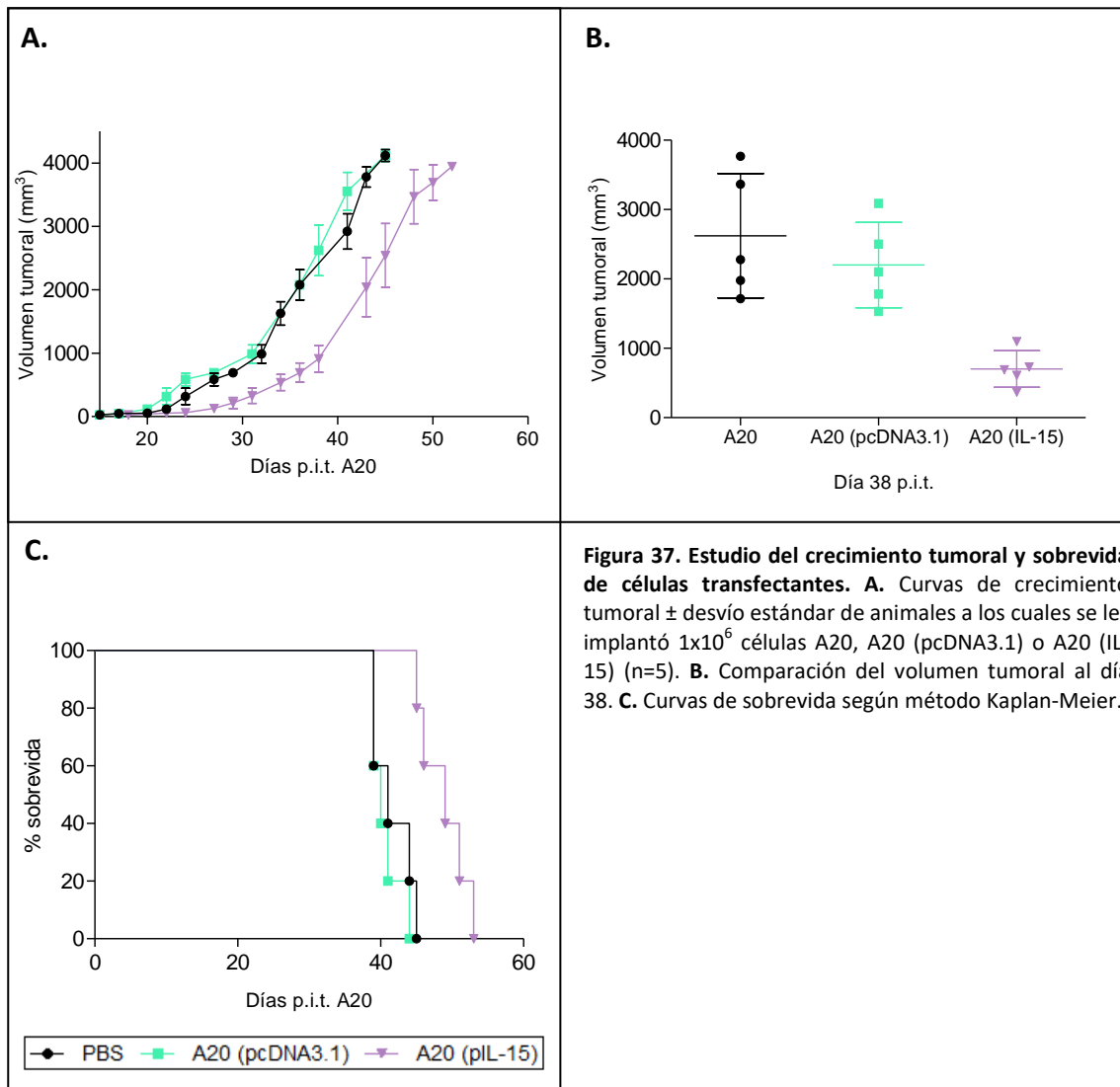


Figura 37. Estudio del crecimiento tumoral y sobrevida de células transfectantes. **A.** Curvas de crecimiento tumoral ± desvío estándar de animales a los cuales se les implantó 1×10^6 células A20, A20 (pcDNA3.1) o A20 (IL-15) (n=5). **B.** Comparación del volumen tumoral al día 38. **C.** Curvas de sobrevida según método Kaplan-Meier.

2.2 Generación de una vacuna celular

Para generar la vacuna, las células modificadas productoras de IL-15 se infectaron con *Salmonella* para aumentar la expresión de moléculas co-estimuladoras

y MHC II, y posteriormente se irradiaron para eliminar la tumorigenicidad. Para la vacuna control se realizó el mismo procedimiento utilizando las células A20 (pcDNA3.1).

2.2.1 Infección de las células A20 productoras de IL-15 con *Salmonella*

Previamente nuestro grupo de trabajo reportó que la infección de las células A20 con la cepa atenuada de *Salmonella* LVR01 (MOI 100:1) provoca un aumento en la expresión de moléculas co-estimuladoras (CD80, CD86 y CD40) y MHC de clase II en la superficie de las células, postulando que esto las convertía en mejores presentadoras de antígenos para ser utilizadas en la construcción de una vacuna ⁴³¹. En el presente trabajo corroboramos dicho resultado y además observamos que la infección con LVR01 tuvo el mismo efecto en las células transfectantes A20 (IL-15) y A20 (pcDNA3.1) ($p < 0,0001$, test de Student). En la Fig. 38 los valores mostrados en los gráficos corresponden a la resta de los promedios de triplicados de MFI menos el promedio de triplicados de MFI de los controles isotipos, antes y después de la infección con LVR01, para cada tipo de células estudiado.

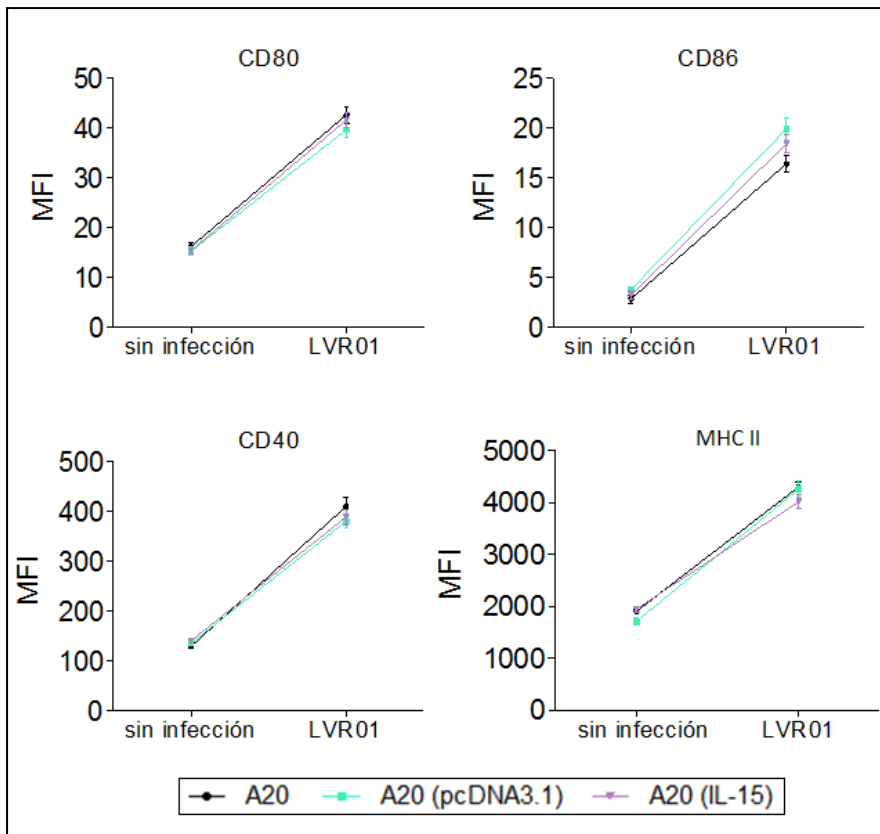


Figura 38. Estudio de la expresión de moléculas co-estimuladoras y MHC II por CF. Los gráficos muestran la expresión basal (sin infectar) de distintos marcadores de superficie (CD80, CD86, CD40 y MHC II) en las células A20, A20 (IL-15) y A20 (pcDNA3.1), y luego de infectarlas con LVR01.

2.2.2 Puesta a punto de la irradiación de las células A20 y transfectantes

Utilizando la irradiación, se pretende lograr que las células pierdan la capacidad tumorigénica, pero que permanezcan metabólicamente activas, siendo capaces de presentar antígenos y producir IL-15. Las células A20, A20 (IL-15) y A20 (pcDNA3.1) se irradiaron por distintos tiempos (10, 15, 20, 30, 45 y 60), y por CF se determinó que 10 minutos de irradiación (equivalente a una dosis de irradiación de aproximadamente 7000 cGy) es suficiente para producir el arresto de las células en la fase G2 y disminución de la fase S. En esta condición, a las 24 hs comienza a observarse el aumento de la fase G2/M comparando el ciclo celular previo a la irradiación. A los 5 días se observó un alto porcentaje de debris celular, con ausencia de fase S. En la Fig. 39 y Tabla 13 se muestran los resultados obtenidos por CF a distintos tiempos luego de 10 min de irradiación de las distintas células.

En paralelo a la CF se llevó a cabo el estudio de la viabilidad celular de las células irradiadas con el colorante vital azul de Tripán. En la Tabla 14 se muestran los porcentajes de viabilidad celular a distintos tiempos para la irradiación de 10 min. Se observó una disminución en la viabilidad celular a las 24hs post-irradiación. Análogo a los resultados obtenidos con el estudio de CF, a los 5 días se vio un alto porcentaje de debris celular y ausencia casi total de células viables.

Finalmente para corroborar que estas células a utilizar en las preparaciones vacunales no fueran tumorigénicas, se inocularon de forma s.c. 1×10^6 células irradiadas a cinco ratones sanos y se comprobó que estos no desarrollaron LNH-B.

En conclusión logramos desarrollar una vacuna formulada con células A20 que expresan IL-15, activadas por infección con *Salmonella* (A20 (IL-15)-SL), no tumorigénicas, para utilizar como tratamiento de LNH-B en animales con EMR.

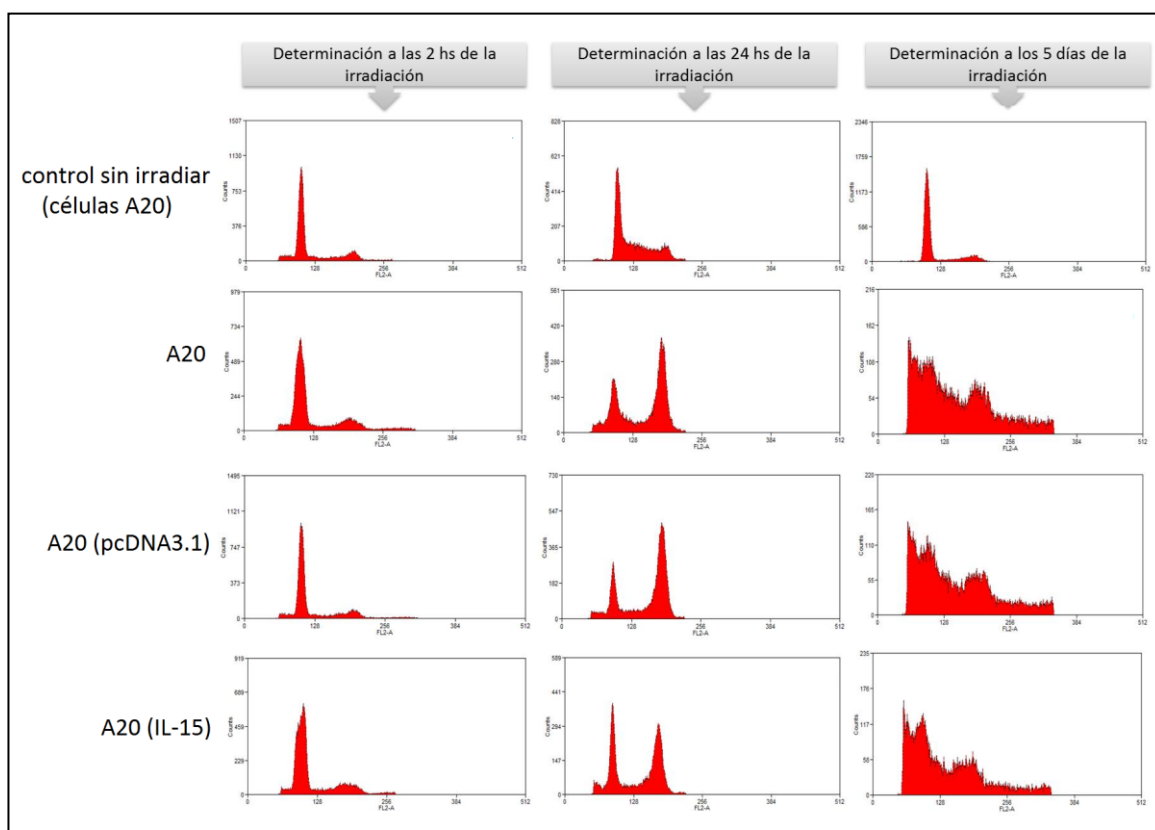


Figura 39. Puesta a punto de la irradiación de las células A20. Se muestran los resultados del ensayo de ploidía realizados a las 2 y 24 hs, y 5 días luego de irradiar las células A20, A20 (pcDNA3.1) y A20 (IL-15) por 10 min. Se muestra el control sin irradiar para las células A20, cuyo comportamiento fue similar a los controles correspondientes para A20 (pcDNA3.1) y A20 (IL-15).

Tabla 13. Ciclo celular determinado por CF a distintos tiempos luego de la irradiación de las células A20 (pcDNA3.1)/A20 (IL-15) por 10 min. Se muestra el % de células en cada fase del ciclo celular.

	Tiempo post-irradiación				
	0 hs	2 hs	24 hs	72 hs	5 días
A20					
G0-G1	75	70	65	80	91
G2-M	12	9	7,2	10	5
S	18	40	23	7	3
A20 (pcDNA3.1)					
G0-G1	72	62	70	86	98
G2-M	7	6,4	9	8,5	2
S	21	31,6	21	5,5	0
A20 (IL-15)					
G0-G1	79	65	68	84	96
G2-M	10	7	8,7	8	3
S	11	38	19	8	1

Tabla 14. % viabilidad celular utilizando el colorante vital azul de Tripán a distintos tiempos luego de la irradiación de las células.

Tiempo post-irradiación	% Viabilidad celular		
	A20	A20 (pcDNA3.1)	A20 (IL-15)
0 hs	91	95	93
4 hs	92	93	96
24 hs	70	65	63
72 hs	35	28	30
5 días	9	4	6

2.3 Ensayos *in vivo* con la vacuna A20 (IL-15)-SL

En primer lugar se realizó un ensayo utilizando el modelo de linfoma A20 de alta carga tumoral donde se administraron dos dosis de la vacuna A20 (IL-15)-SL o de la vacuna control A20 (pcDNA3.1)-SL a los días 3 y 7 p.i.t. Las curvas de crecimiento tumoral y sobrevida se muestran en la Fig. 40. En el grupo tratado con la vacuna A20 (IL-15)-SL observamos un retardo significativo en el crecimiento tumoral (al día 33 p.i.t respecto a A20 (pcDNA3.1)-SL y PBS ($p < 0,05$, ANOVA)), y mayor sobrevida en comparación con los controles (respecto a PBS ($p < 0,006$, log rank) y al vacunado con A20 (pcDNA3.1)-SL, ($p < 0,026$, log rank)), por lo que decidimos realizar ensayos para evaluar el efecto terapéutico de esta vacuna en el modelo de EMR de LNH-B descrito en el capítulo anterior. En primer lugar estudiamos el efecto terapéutico que producía la administración de dos dosis de vacuna (días 46 y 50 p.i.t). Los resultados obtenidos muestran un aumento significativo en la sobrevida libre de progresión en el grupo tratado con A20 (IL-15)-SL respecto a los animales que reciben solo la quimioterapia (CHOPx2, $p < 0,0001$, log rank) y a los vacunados con A20 (pcDNA3.1)-SL ($p < 0,001$, log rank). A nivel de sobrevida global, se vio un incremento significativo en los animales del grupo vacunado con A20 (IL-15)-SL (media de 75 días p.i.t) respecto al grupo CHOPx2 (media de 68 días p.i.t) ($p < 0,043$, log rank). Aunque no observamos diferencias significativas entre el grupo vacunado con A20 (IL-15)-SL y el vacunado con A20 (pcDNA3.1)-SL (media de 69 días p.i.t), notamos una tendencia en el aumento de la sobrevida global para el primero (Fig. 41A), por lo que decidimos utilizar otro

esquema de vacunación, administrando cinco dosis de la vacuna (días 46, 50, 54, 57 y 61 p.i.t), de modo de potenciar el efecto terapéutico. Con este régimen de vacunación además de observar las diferencias significativas descritas para el ensayo anterior, vimos una sobrevida global extendida en los ratones tratados con la vacuna A20 (IL-15)-SL (media de 89 días p.i.t) respecto al vacunado con A20 (pcDNA3.1)-SL ($p < 0,014$, log rank), (Fig. 41B). Cabe mencionar que para los ensayos donde utilizamos el modelo de EMR, las curvas de crecimiento tumoral y sobrevida se construyeron teniendo en cuenta sólo los animales que tenían remisión completa de la enfermedad al momento de administrar la primera dosis de vacuna.

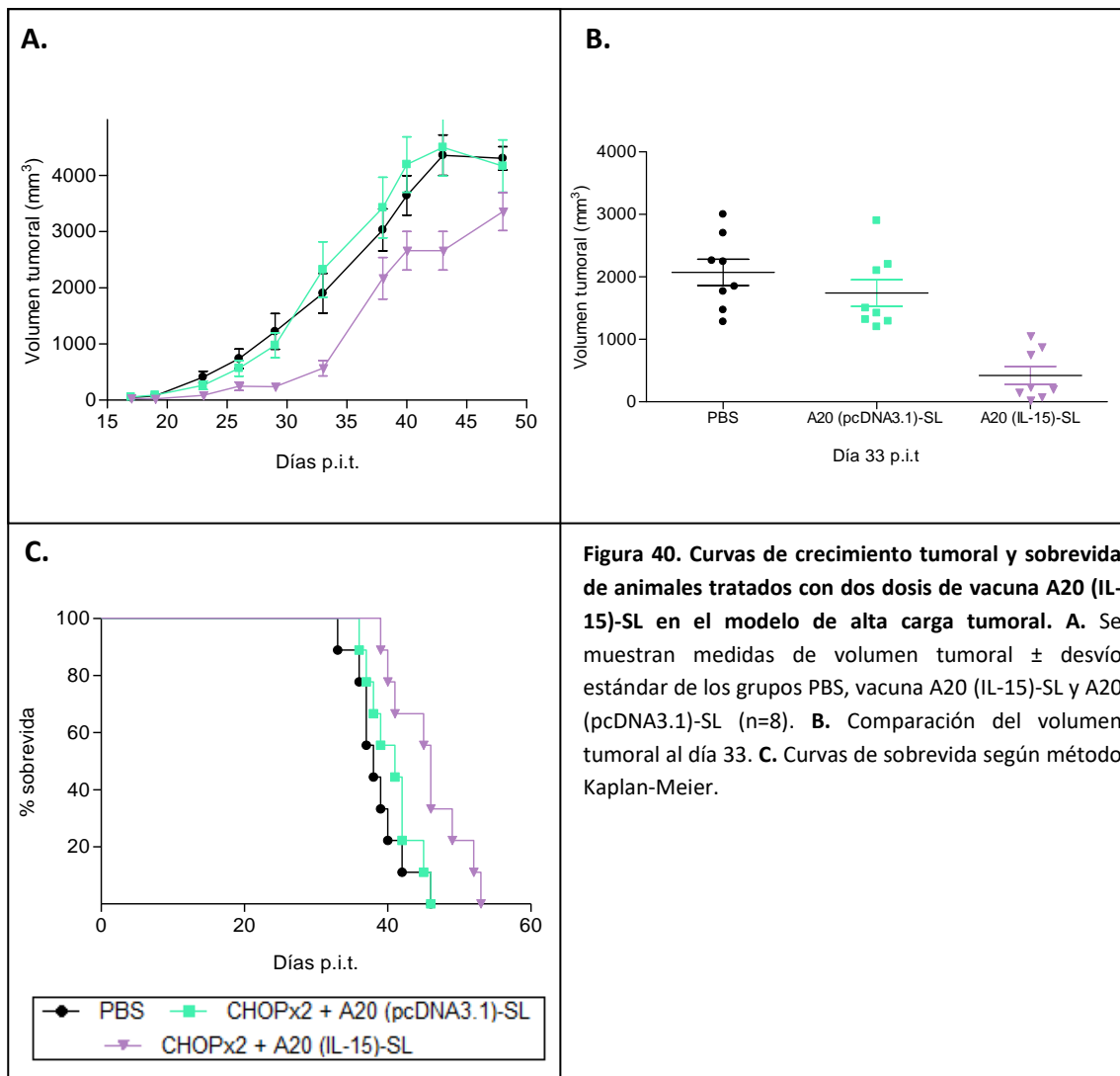


Figura 40. Curvas de crecimiento tumoral y sobrevida de animales tratados con dos dosis de vacuna A20 (IL-15)-SL en el modelo de alta carga tumoral. A. Se muestran medidas de volumen tumoral \pm desvío estándar de los grupos PBS, vacuna A20 (IL-15)-SL y A20 (pcDNA3.1)-SL ($n=8$). **B.** Comparación del volumen tumoral al día 33. **C.** Curvas de sobrevida según método Kaplan-Meier.

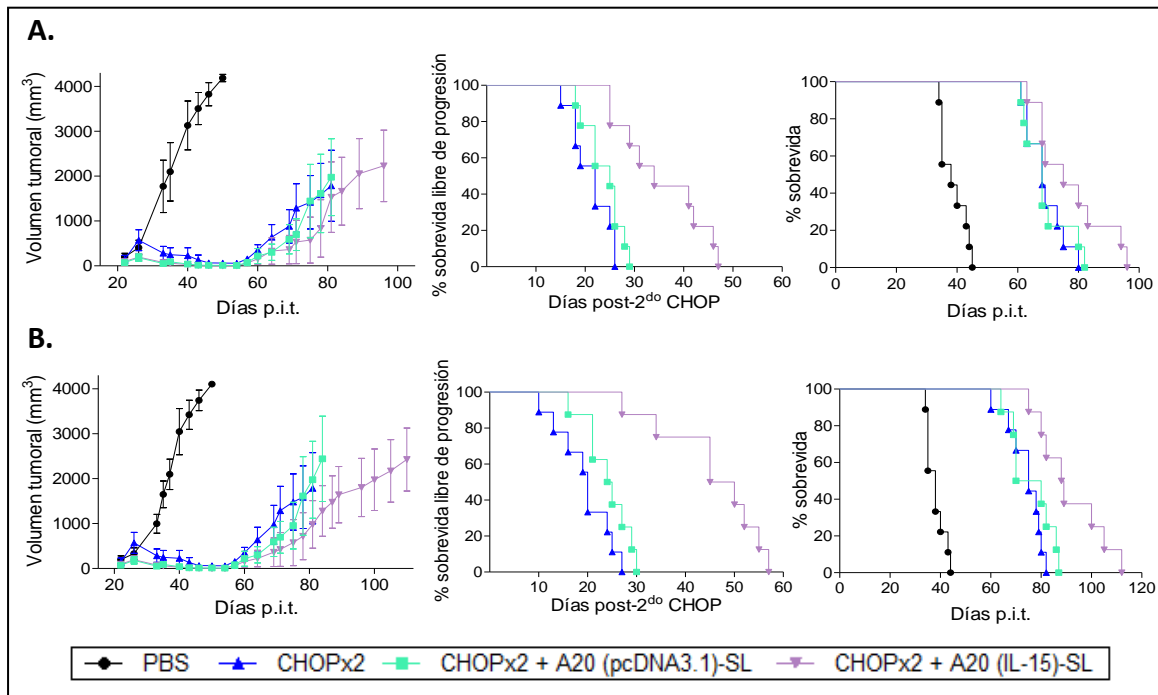


Figura 41. Curvas de crecimiento tumoral y sobrevida (según método Kaplan-Meier) de animales con EMR de LNH-B tratados con las preparaciones vacunales. A. Se muestran las curvas de crecimiento tumoral, sobrevida libre de progresión y sobrevida global para animales PBS, y animales con EMR tratados ya sea con la vacuna A20 (IL-15)-SL o A20 (pcDNA3.1)-SL, o sin tratamiento (CHOPx2) (n=9). Las vacunas se administraron los días 46 y 50 p.i.t. **B.** Curvas de crecimiento tumoral, sobrevida libre de progresión y sobrevida global para los mismos grupos que en (A). En este caso se administraron cinco dosis de vacuna (días 46, 50, 54, 57 y 61 p.i.t.).

2.4 Estudio de la respuesta inmune generada por la administración de la vacuna A20 (IL-15)-SL en ratones en estado de EMR

Dado que en términos de sobrevida con el esquema de vacunación de cinco dosis se observó una mejoría en los animales vacunados con A20 (IL-15)-SL respecto al resto de los grupos, se estudió la respuesta inmune de los animales a los días 60 y 70 p.i.t. El criterio por el cual elegimos este momento para llevar a cabo dicho estudio estuvo basado en que quisimos determinar los mecanismos efectores involucrados en la respuesta antitumoral, estudiando a los animales en el momento en que el volumen tumoral comienza a ser diferente entre los grupos. Cabe mencionar que los ensayos a nivel de tumor se realizaron no antes de los 70 días p.i.t ya que era necesario contar con un volumen tumoral suficiente como para extraer muestras tanto para realizar RT-PCR de tumor total, como para lograr separar poblaciones celulares particulares. Para esta última técnica se necesitó partir de un número considerable de células totales, ya

que se debían obtener las poblaciones celulares aisladas en un número suficiente como para realizar posteriormente el estudio de la expresión de citoquinas por RT-PCR.

Además de estudiar la respuesta inmune a nivel tumoral, a nivel sistémico se estudió la proliferación de esplenocitos y se realizaron ensayos de citotoxicidad mediada por células NK. Sumado a ello, a nivel humoral se midieron los niveles de anticuerpos totales contra las células tumorales A20.

2.4.1 Análisis de los niveles de ARNm de citoquinas y quimioquinas en el microambiente tumoral

Al día 70 p.i.t. se sacrificaron ratones portadores de EMR tratados con la vacuna A20 (IL-15)-SL, A20 (pcDNA3.1)-SL y control sin tratar (CHOPx2), para extraer muestras de tumor y estudiar los niveles de ARNm de distintas citoquinas y quimioquinas. Se observó un aumento significativo en la expresión de los genes *Ccl3*, *Ccl5*, *Ccl20*, *Cxcr4* e *Ifng* en el grupo vacunado con A20 (IL-15)-SL en comparación con el resto de los grupos ($p < 0,05$, ANOVA). Además, la expresión de *Il10* se vio significativamente disminuida en el grupo vacunado con A20 (IL-15)-SL respecto al vacunado con A20 (pcDNA3.1)-SL ($p < 0,0076$, ANOVA) (Fig. 42).

Para poder evaluar la expresión de citoquinas y quimioquinas en las diferentes poblaciones inmunes en particular, se llevó a cabo separación celular de linfocitos T CD4⁺, CD8⁺, y células NK de muestras de tumor, utilizando el clasificador celular de alta velocidad FACS Aria Fusion (BD Biosciences). Se observó un incremento significativo en la expresión de *Ifng* por parte de células NK en el grupo tratado con la vacuna A20 (IL-15)-SL en comparación con el resto de los grupos ($p < 0,0041$, ANOVA) (Fig. 43). Además, los niveles de ARNm de *Il10*, *Tgfb* y *Foxp3* se vieron significativamente reducidos en la población de células T CD4⁺ infiltrantes de tumor de los grupos vacunados respecto al grupo sin vacunar (CHOPx2) ($p < 0,02$, $p < 0,01$, $p < 0,05$, ANOVA, para *Il10*, *Tgfb* y *Foxp3*, respectivamente).

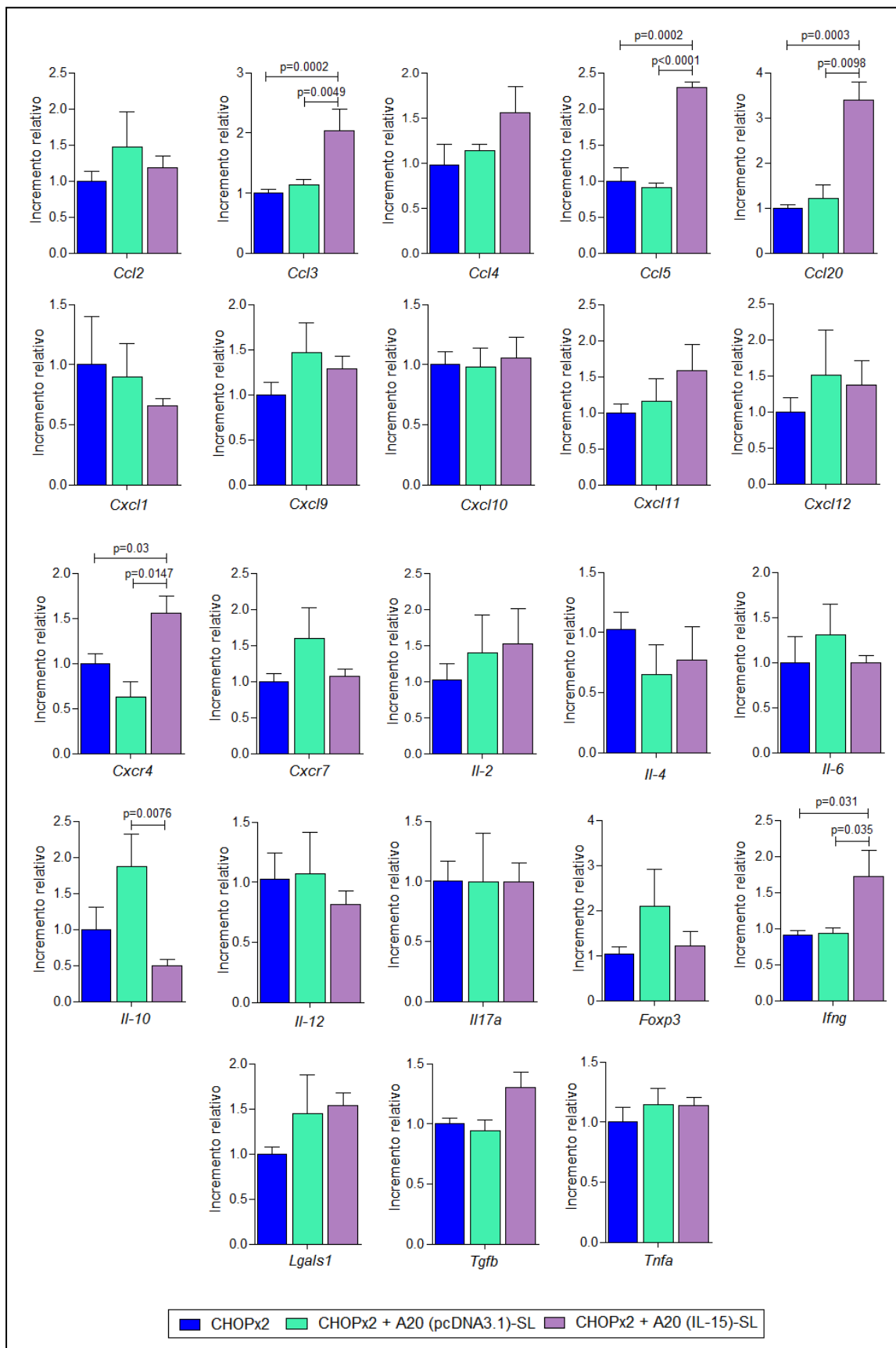


Figura 42. Expresión de citoquinas y quimioquinas en el microambiente tumoral en animales con EMR tratados con la vacuna A20 (IL-15)-SL. Al día 70 p.i.t. se sacrificaron ratones en recaída que fueron tratados ya sea con la vacuna A20 (IL-15)-SL o A20 (pcDNA3.1)-SL, y sin tratamiento (CHOPx2) para extraer muestras de tumor, en las que se estudiaron los niveles de ARNm para distintas citoquinas y quimioquinas. El gen constitutivo utilizado fue *B2m* y los resultados se expresaron relativos a los niveles de ARNm del grupo CHOPx2; se muestra la media \pm el desvío estándar (n=5). Las diferencias significativas se indican con el valor p (ANOVA).

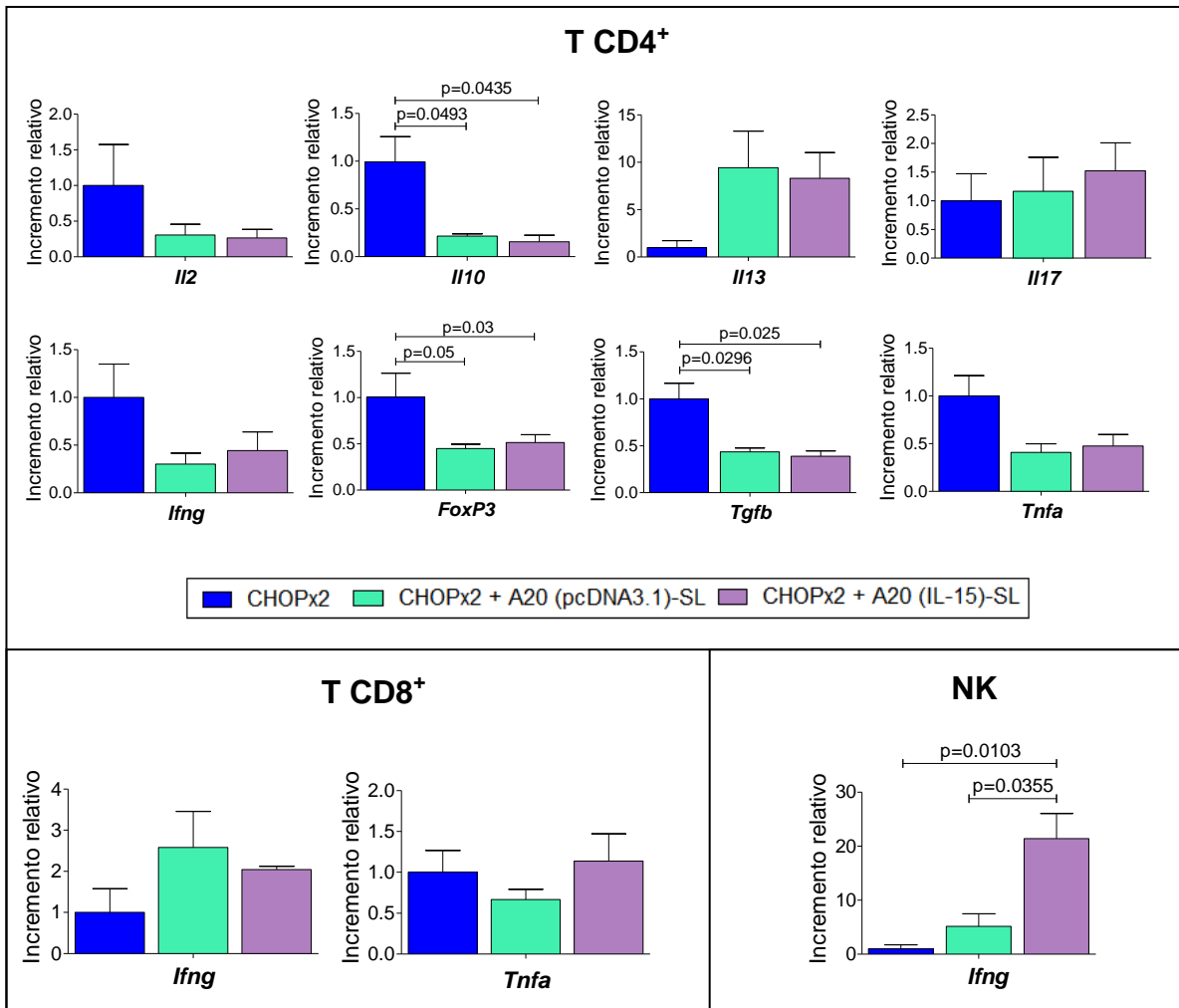


Figura 43. Expresión de citoquinas a partir de poblaciones infiltrantes de tumor al día 70 p.i.t. Mediante RT-PCR se estudió la expresión de citoquinas en poblaciones separadas por “sorting” celular (células NK, T CD8⁺ y T CD4⁺) en los grupos tratados con las vacunas A20 (IL-15)-SL, control A20 (pcDNA3.1) y sin tratamiento (CHOPx2). El gen constitutivo utilizado fue *B2m* y los resultados se expresaron relativos a los niveles de ARNm del grupo CHOPx2; se muestra la media \pm el desvío estándar (n=5). Las diferencias significativas se indican con el valor p (ANOVA).

2.4.2 Proliferación de esplenocitos

Al día 70 p.i.t. se sacrificaron cinco ratones de cada grupo para extraer bazo y realizar ensayos de proliferación, según se describe en M&M. Observamos que frente a una re-estimulación con el lisado A20, se produce un aumento significativo en el porcentaje de proliferación de los esplenocitos totales en el grupo vacunado con A20 (IL-15)-SL respecto al sin vacunar (CHOPx2) ($p=0,0004$) y al tratado con A20 (pcDNA3.1)-SL ($p=0,0332$). Sin embargo, no observamos diferencia en la proliferación frente a la estimulación con lisado de B16F1 (línea tumoral no relacionada), corroborando que se trata de una respuesta antígeno-específica (Fig. 44A). Se observó que en particular las células que proliferan son los linfocitos T CD8⁺ (Fig. 44B).

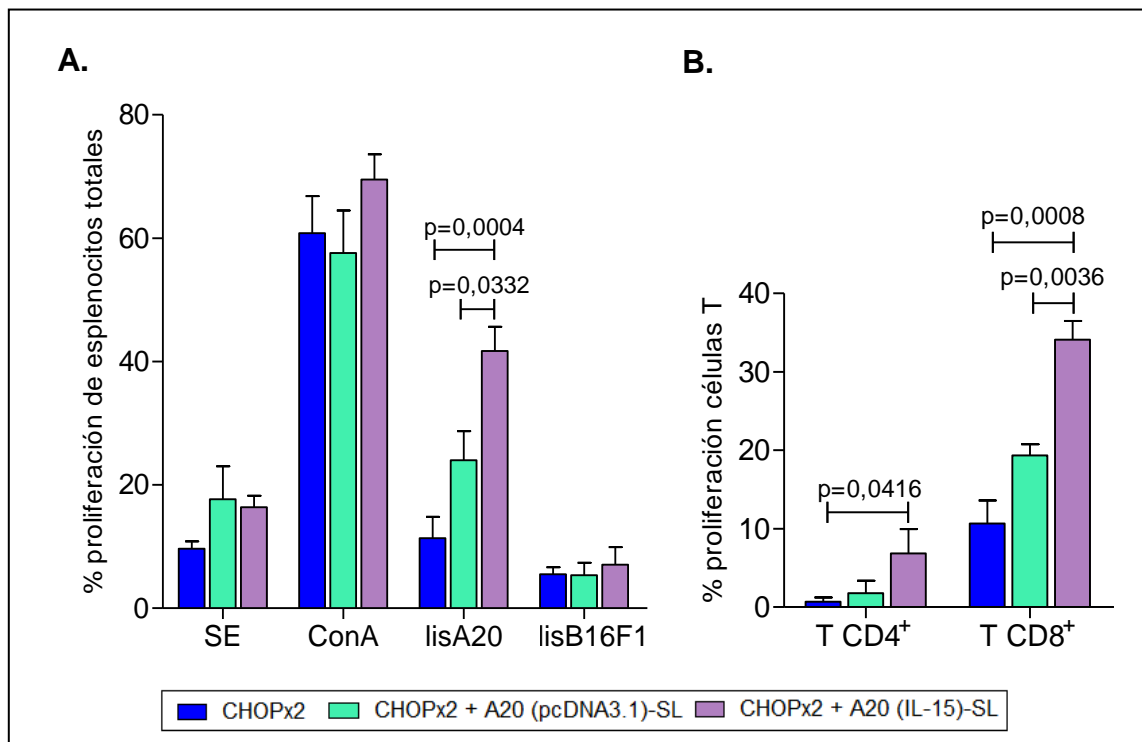


Figura 44. Estudio de la respuesta proliferativa de esplenocitos. Al día 70 p.i.t. se sacrificaron ratones del grupo CHOPx2, CHOPx2 + A20-SL y CHOPx2 + A20 (IL-15)-SL para extraer bazo y realizar ensayos de proliferación. **A.** Los resultados se muestran como la media \pm desvío estándar (n=5) del porcentaje de proliferación de esplenocitos totales para las distintas condiciones, sin estimular (SE), ConA, lisado de A20 (lisA20) y lisado de B16F1 (lisB16F1). **B.** Los resultados se muestran como la media \pm desvío estándar del porcentaje de proliferación de linfocitos T CD4⁺ y T CD8⁺ (n=5) frente a la estimulación con el lisado de células A20. Las diferencias significativas se indican con el valor p (ANOVA).

2.4.3 Estudio de la citotoxicidad mediada por células NK en animales tratados con la vacuna A20 (IL-15)-SL

Al día 60 p.i.t. se sacrificaron cinco ratones de cada grupo para extraer bazo. Los mismos fueron homogeneizados y se prepararon como una suspensión celular. Para el ensayo de citotoxicidad mediada por células NK los esplenocitos se utilizaron como células efectoras (E) y la línea celular YAC-1 como células blanco (B). Los resultados mostraron que el grupo vacunado con A20 (IL-15)-SL tuvo mayor porcentaje de citotoxicidad mediada por NK respecto a los demás grupos, observándose diferencias significativas para la mayoría de los ratios (todos menos 6,25:1 y 12,5:1) ($p < 0,05$, ANOVA) (Fig. 45A). Cabe mencionar que el incremento en la citotoxicidad es debido a un aumento en la capacidad citotóxica de las células NK, ya

que el porcentaje de éstas en bazo fue el mismo para los tres grupos analizados (Fig. 45B).

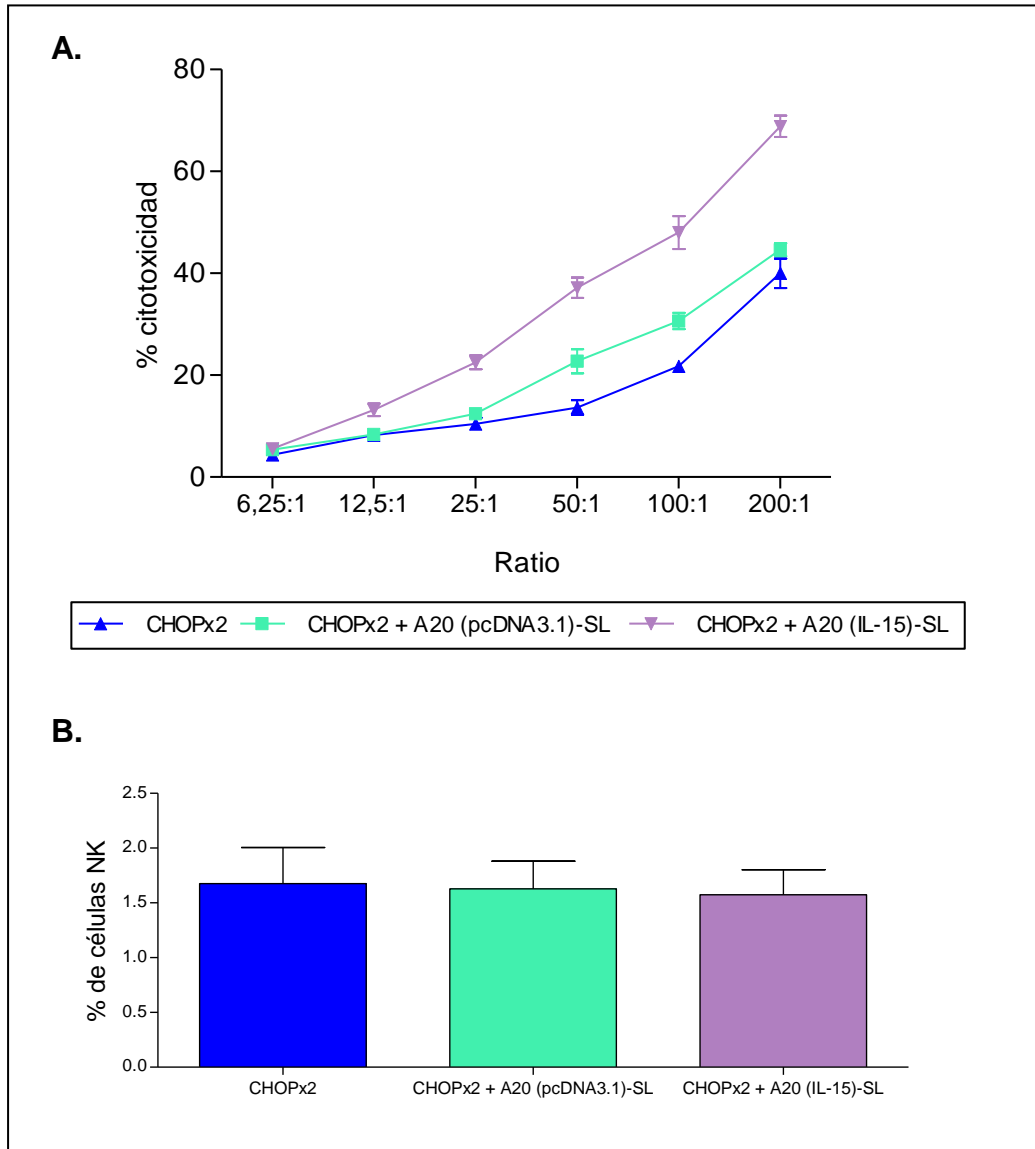


Figura 45. Porcentaje de citotoxicidad mediada por células NK. A. Se muestra el porcentaje de citotoxicidad mediada por células NK a diferentes ratios E:B. Los resultados se muestran como la media \pm desvío estándar (n=5). **B.** Porcentaje de células NK en los tres grupos, los resultados se muestran como la media \pm desvío estándar.

2.4.4 Estudio de la respuesta humoral en los animales tratados con la vacuna A20 (IL-15)-SL

La respuesta humoral generada contra las células tumorales A20 se estudió al día 70 p.i.t. mediante ELISA según se describe en M&M. Se observó que el grupo

vacunado con A20 (IL-15)-SL tiene mayores niveles de anticuerpos totales IgG anti-A20 respecto a los demás grupos ($p < 0,0001$, ANOVA) (Fig. 46).

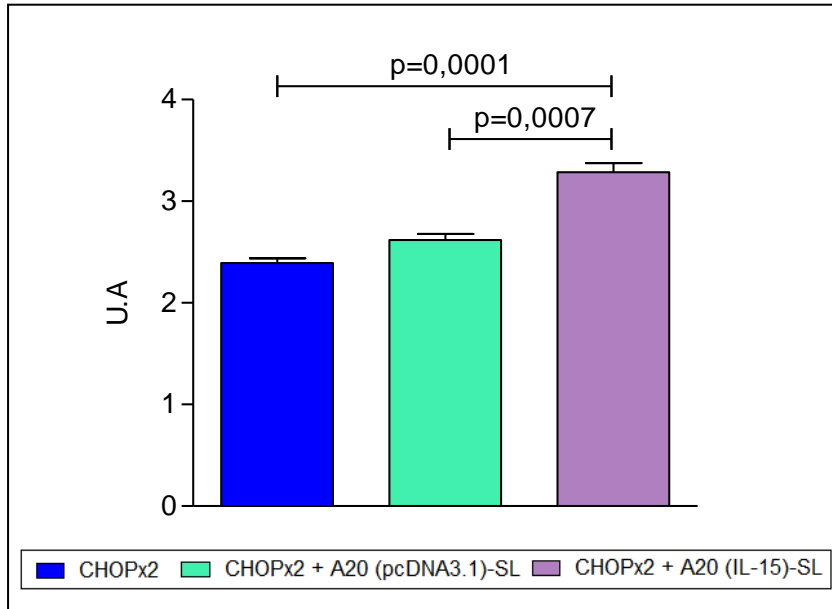


Figura 46. Respuesta inmune humoral contra las células tumorales A20. A. Al día 70 p.i.t. se determinaron los niveles de anticuerpos totales IgG anti-A20 en suero mediante ELISA para los grupos CHOPx2, CHOPx2 + A20-SL y CHOPx2 + A20 (IL-15)-SL. Los resultados se muestran como la media de unidades arbitrarias (U.A.) \pm desvío estándar ($n=4$). Las diferencias significativas se indican con el valor p (ANOVA).

3 DISCUSIÓN

A pesar de los avances que se han producido en el tratamiento para LNH, lográndose elevadas tasas de remisión completa, una gran proporción de pacientes recaen debido a la presencia de células malignas imperceptibles por las técnicas diagnósticas^{444,517}, por lo que en la actualidad uno de los principales desafíos es el desarrollo de estrategias que eliminen la EMR. Dentro de estas terapias se incluye el uso de anticuerpos monoclonales, drogas conjugadas a anticuerpos, moléculas inhibitoras del crecimiento y supervivencia celular, terapia adoptiva de células T, y radioinmunoterapia, tal como fue mencionado en el Capítulo I^{19,22,298,304,407,414,453-455}. Existe evidencia que la eficiencia de una inmunoterapia aumenta cuando se aplica con una carga tumoral menor. En este sentido, se ha visto que la respuesta antitumoral que resulta de la administración de inmunoterapias es más efectiva en pacientes en remisión completa o en respuesta parcial luego del tratamiento quimioterápico

413,457,458,498,499,518,519. Trabajos previos en nuestro laboratorio reportaron el beneficio terapéutico de administrar una vacuna formulada con células modificadas por la infección con *Salmonella* en combinación con IL-2, en el modelo de linfoma A20 de alta carga tumoral. Sin embargo, a pesar del efecto observado todos los ratones murieron. Aunque no fue corroborado, los resultados sugieren que parte de esta falla en la respuesta al tratamiento pudo ser debida al reclutamiento de las células inmunosupresoras Tregs, probablemente promovido por la IL-2 que formaba parte de la vacuna. Estos resultados motivaron el desarrollo de alternativas como las planteadas en el presente trabajo, sustituyendo el uso de IL-2 por IL-15 y probando su efecto en animales con EMR de LNH-B. Para ello generamos una nueva vacuna terapeutica que consiste en el uso de células A20 productoras de IL-15, modificadas por la infección con *Salmonella*. Aunque la única citoquina actualmente aprobada por la FDA para la terapia contra el cáncer es IL-2, la IL-15 se considera una candidata con mejor potencial ya que promueve la expansión de células efectoras con actividad antitumoral, principalmente células T CD8⁺ de memoria y células NK, y no tiene efecto inmunoestimulador sobre las células Tregs, ni promueve la muerte celular inducida por activación de los linfocitos T (AICD, del inglés) ^{363,364,369,520,521}. Por este motivo decidimos utilizar IL-15 en lugar de IL-2, como parte de una terapia para el tratamiento de LNH. Otro punto fundamental de este trabajo, es haber estudiado la inmunoterapia en un contexto más similar al encontrado en la clínica, como lo es el modelo de EMR. En particular para IL-15 se ha descrito que potencia el efecto de la quimioterapia en un modelo pre-clínico de cáncer de pulmón y prolonga la remisión inducida por la administración de ciclofosfamida en un modelo pre-clínico de rhabdomiosarcoma ^{522,523}. Los resultados presentados en este capítulo concuerdan con estos reportes, ya que se observó que los animales con EMR tratados con la vacuna A20 (IL-15)-SL presentan una sobrevida extendida respecto al resto de los grupos.

Cabe mencionar que si bien no observamos la expresión de IL-15 a nivel proteico en la línea celular utilizada en la vacuna, corroboramos su funcionalidad mediante el ensayo de actividad biológica en células CTTL-2. El hecho de no detectar la proteína por WB podría explicarse por la corta vida media y poca estabilidad que presenta esta citoquina. De hecho, se ha visto que *in vivo* la funcionalidad de IL-15 mejora al estabilizarse luego de la unión al receptor IL-15R α en la superficie celular

^{363,524}. Además, se ha descrito la dificultad de detectar IL-15 en sobrenadante ya que se expresa en baja cantidad ⁵²⁵. Existen dos isoformas para IL-15, una con un péptido señal corto (SSP), no secretoria, y otra con un péptido señal largo (LSP), secretoria ⁵²⁶. Como se explicó en M&M el gen *Il15* contenido en el fragmento amplificado a partir del plásmido pORF9-mIL-15 corresponde a la isoforma secretoria pero como está reportado, se traduce en menor cantidad ⁵²⁶, lo que también podría explicar la dificultad de detectar esta citoquina a nivel proteico.

Igualmente, observamos un aumento significativo de la actividad citotóxica de las células NK en el grupo tratado con A20 (IL-15)-SL, lo cual concuerda con el efecto que tiene la IL-15 sobre esta población. Los resultados de RT-PCR de muestras de tumor total revelaron una expresión de *Ifng* significativamente aumentada en el grupo tratado con la vacuna A20 (IL-15)-SL respecto al resto de los grupos. La presencia de IFN- γ se considera fundamental para desarrollar una respuesta antitumoral efectiva. Se ha observado que concentraciones reducidas de IFN- γ en pacientes con cáncer tienen un efecto negativo sobre la expresión del MHC y, por lo tanto, sobre la inmunogenicidad tumoral ^{79,221,511}. Por otro lado, nuestro análisis de expresión genica de poblaciones infiltrantes de tumor particulares, mostró que las células NK infiltrantes de tumor expresan mayores niveles de *Ifng* en el grupo tratado con la vacuna A20 (IL-15)-SL respecto al resto de los grupos, sugiriendo que el aumento en la expresión de esta citoquina a nivel intratumoral, se debe fundamentalmente a la presencia de un número mayor de NK activadas en los animales que recibieron la vacuna terapéutica. En concordancia con ello, se encuentra en desarrollo la terapia adoptiva de células para el tratamiento de linfomas y leucemias, en donde se infunden células NK de memoria previamente expandidas *in vitro* utilizando IL-15 ^{81,89}.

Por otra parte, observamos que la expresión de *Il10*, *Tgfb* y *Foxp3* en la población de células T CD4⁺ infiltrantes de tumor fue significativamente menor en animales que recibieron las preparaciones vacunales en comparación con el grupo CHOPx2, sugiriendo que en este último grupo la población celular CD4⁺ podrían corresponder a células Tregs, ya que las mismas son la principal fuente de estas citoquinas inmunosupresoras ^{221,511}. Probablemente el microambiente tumoral en el grupo CHOPx2 ya tenía un perfil inmunosupresor al momento en que se realizó la separación celular (70 días p.i.t.), mientras que en los animales tratados con las

vacunas esto no sucedió; en concordancia con el hecho de que los animales del grupo CHOPx2 tuvieron menor sobrevida.

Uno de los principales objetivos de la inmunoterapia para el tratamiento del cáncer es la generación de respuesta celular T específica que promueva la eliminación del tumor. Como mencionamos en el Capítulo I, la inducción de dicha respuesta requiere de dos señales: 1) el reconocimiento de péptidos específicos de tumor presentados en moléculas de MHC I (reconocidos por linfocitos T CD8+), o MHC II (reconocidos por T CD4+), y 2) la unión de moléculas co-estimuladoras CD28 (en la célula T) con B7.1/2 (en la célula APC) ⁶¹. La mayoría de los tumores de células B no son capaces de inducir una respuesta celular T. Datos experimentales han mostrado que las células B tumorales en comparación con las células B normales son ineficientes en la presentación de antígenos y por lo tanto la construcción de una vacuna celular en este tipo de neoplasias puede conducir a la anergia de las células T más que a su activación ^{218,275}. Resultados previos en nuestro laboratorio ⁴³¹ mostraron que la infección de las células A20 con LVR01 aumenta la expresión de moléculas co-estimuladoras, por lo que decidimos realizar el mismo procedimiento con las células productoras de IL-15 utilizadas para la formulación de nuestra vacuna, de modo de promover una presentación antigénica eficiente. Efectivamente, observamos que la infección con la cepa atenuada de *Salmonella* promueve un aumento significativo en la expresión de estas moléculas de superficie tanto en células A20, como en las células transfectantes (A20 (IL-15) y A20 (pcDNA3.1)).

El tratamiento con la vacuna A20 (IL-15)-SL generó una respuesta inmune celular antígeno-específica a nivel sistémico, ya que en este grupo la estimulación de esplenocitos con un lisado de células A20 provocó un aumento de la proliferación celular, aumento que no se observó al estimular con un antígeno no relacionado (lisado de línea tumoral B16F1). En particular, se observó que las células que proliferan son los linfocitos T CD8⁺, lo que está en consonancia con el efecto mencionado de IL-15 sobre la expansión de células T CD8⁺ ^{363,521}. También observamos una respuesta antígeno-específica a nivel humoral con producción de anticuerpos IgG anti-A20. En linfomas, las respuestas efectoras mediadas por anticuerpos han demostrado ser de gran importancia, siendo los anticuerpos monoclonales anti-CD20 parte del tratamiento estándar contra LNH. Estos anticuerpos pueden tener un efecto

antitumoral directo ya sea por apoptosis o por otro tipo de vías de muerte celular, citotoxicidad dependiente de complemento (CDC) y citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC) mediada por células que presentan receptores para Fc, como células NK y macrófagos que expresan FcR3a^{22,33}.

Aunque existe evidencia que la administración de IL-15 es eficiente como tratamiento antitumoral los resultados aún no son óptimos. Se ha observado que IL-15 unida al receptor 15R α tiene mayor afinidad por IL-15R β / γ C que la IL-15 libre. La unión del complejo IL-15/IL-15R α a IL-15R β / γ C en la superficie de la célula efectora se conoce como transpresentación^{362,370–374}. En la actualidad se encuentran en desarrollo terapias que combinan IL-15 con la subunidad α de su receptor (IL-15R α). Se ha observado que el uso del complejo IL-15/IL-15R α mejora la proliferación y aumenta la actividad antitumoral de las células NK y T CD8⁺, lo que conduce a una respuesta antitumoral mejorada respecto a la utilización de IL-15 sola^{371,377,378}. En los últimos años la investigación se ha centrado en la transfección de células dendríticas^{527,528} o tumorales^{374,529} con ADN codificante para IL-15 e IL-15R α . Hasta el momento se han realizado ensayos tanto pre-clínicos como clínicos en fase I/II que utilizan esta estrategia terapéutica, y también en combinación con otras terapias, con resultados promisorios^{353,369}. Por lo tanto, a futuro podríamos mejorar el efecto terapéutico de nuestra vacuna transfecando las células A20 para que expresen dicho complejo IL-15/IL-15R α , de modo de crear células que transpresenten IL-15 y así activar células que expresen el complejo IL-15R β / γ .

En conclusión, en el presente trabajo modificamos las células A20 para que expresen de la citoquina IL-15, y utilizamos dichas células como una inmunoterapia efectiva para el tratamiento de LNH-B. Nuestros resultados demuestran que la vacuna formulada con células tumorales A20 productoras de IL-15, modificadas por infección con *Salmonella* previo a ser irradiadas genera una potente respuesta inmune específica en un modelo de EMR, evidenciada por la producción de quimioquinas pro-inflamatorias y expresión de IFN- γ a nivel del microambiente tumoral, acompañado de una respuesta linfoproliferativa antígeno-específica a nivel sistémico, niveles de anticuerpos IgG anti-A20 aumentados y una mayor capacidad citotóxica de las células NK. En su conjunto, todas estas respuestas estarían traduciéndose en un aumento de la sobrevivencia de los animales que recibieron dicho tratamiento.

CAPÍTULO V

EVALUACIÓN DE
***SALMONELLA* COMO**
INMUNOTERAPIA EN
COMBINACIÓN CON
QUIMIOTERAPIA PARA
EL TRATAMIENTO DE
LNH-B

1 OBJETIVO

En trabajos previos de nuestro laboratorio, evaluamos el uso de *Salmonella* como inmunoterapia activa inespecífica para el tratamiento de LNH-B, y comprobamos que la administración de esta bacteria retrasa el crecimiento tumoral y prolonga la sobrevida en animales portadores de linfoma A20. Sin embargo, también observamos que a pesar del establecimiento de una respuesta antitumoral potente en los animales tratados con la inmunoterapia, que retrasa el desarrollo del linfoma, todos los animales terminan muriendo por crecimiento del tumor primario y enfermedad diseminada. En función de esos resultados previos, en el presente estudio nos propusimos investigar si el tratamiento de los animales portadores de linfoma con quimioterapia similar a la usada en la clínica, impacta en el potencial terapéutico de *Salmonella*. Sumado a ello, se decidió evaluar y caracterizar la respuesta inmune desarrollada en los animales sometidos a dicha terapia combinada.

2 RESULTADOS

2.1 Crecimiento tumoral y sobrevida

Se estudió el efecto de la administración i.t. de tres dosis de la cepa de LVR01 (días 18, 32 y 39 p.i.t), en ratones portadores de LNH-B tratados con quimioterapia tipo CHOP (días 25 y 35 p.i.t), evaluando el crecimiento tumoral, sobrevida global y sobrevida libre de progresión. Al igual que lo descrito previamente por nuestro grupo de trabajo ³⁴⁶, los animales tratados con tres dosis de LVR01 (días 18, 25 y 32 p.i.t) (LVR01x3) tuvieron una sobrevida global prolongada (media de 48 días), comparado con los animales que no recibieron tratamiento (PBS) (media de 35 días) ($p < 0,0001$, log rank) (Fig. 47A). Por otro lado, y tal como se describió en el capítulo III, el 92% de los animales que recibieron dos ciclos de CHOP mostraron remisión clínica del tumor primario por un período de 20 días luego del segundo ciclo de CHOP. Posteriormente los animales recaen y terminan muriendo, ya sea por tumor primario o por metástasis

(media de supervivencia global de 72 días). Sin embargo, el tratamiento con LVR01 en combinación con CHOP retrasó de forma significativa el crecimiento tumoral, y aumentó la supervivencia global ($p=0,009$, log rank) y supervivencia libre de progresión ($p<0,0001$, log rank) en comparación con el grupo CHOPx2 (Fig. 47A-B). Para el tratamiento combinado, también se observó una extensión de la supervivencia global respecto al tratamiento con tres dosis de LVR01 ($p<0,0001$, log rank) (Fig. 47A). Se evaluó el volumen tumoral al día 40 y 80 p.t.i y consistentemente los animales del grupo CHOPx2 + LVR01x3 tuvieron un volumen tumoral significativamente menor en comparación con otros grupos ($p<0,0001$, ANOVA/test de Student) (Fig. 47C).

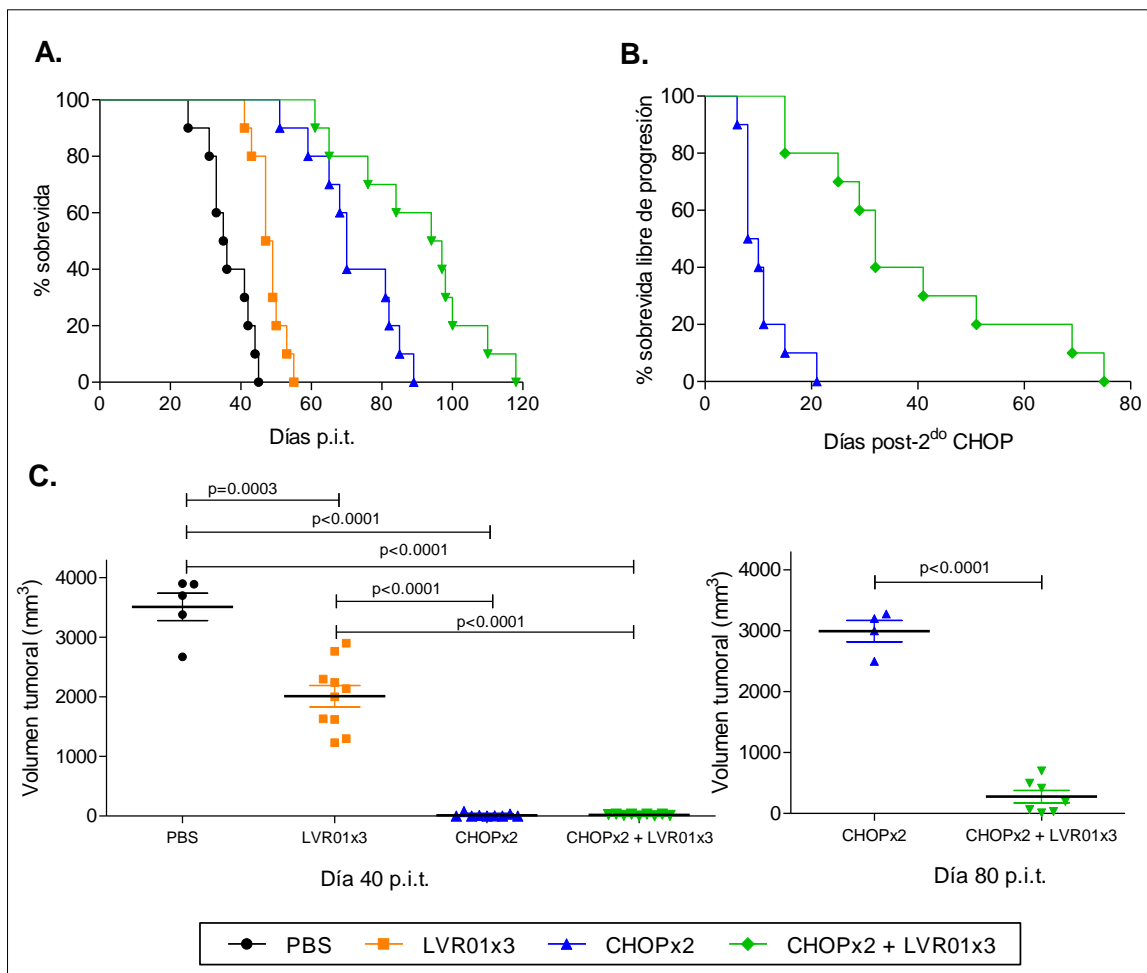


Figura 47. Curvas de supervivencia y volumen tumoral. A. La supervivencia global de los animales se siguió por 120 días. (n=10). B. Supervivencia libre de progresión luego del 2^{do} ciclo de CHOP para los grupos CHOPx2 y CHOPx2 + LVR01x3. C. Volumen tumoral (mm³) al día 40 p.i.t. para todos los grupos y al día 80 p.i.t. para los grupos CHOPx2 y CHOPx2 + LVR01x3. Se muestra la media \pm el desvío estándar, cada punto representa un animal individual.

2.2 Estudio de la respuesta inmune

Dado que observamos un retardo en el crecimiento tumoral y aumento de la sobrevida en los animales tratados con *Salmonella* y quimioterapia, quisimos determinar cuáles eran los mecanismos efectores de la respuesta inmune que subyacen al efecto antitumoral observado. Para ello, se estudió la infiltración de poblaciones celulares inmunes y expresión de citoquinas y quimioquinas en el microambiente tumoral, y a nivel sistémico se realizaron proliferaciones celulares con esplenocitos, detección de citoquinas en sobrenadante de esplenocitos estimulados, y ensayos de citotoxicidad mediada por NK. A nivel humoral se midieron los niveles de anticuerpos totales contra las células tumorales A20. Además se realizaron ensayos de depleción *in vivo* de poblaciones celulares inmunes.

2.2.1 Estudio de poblaciones celulares infiltrantes de tumor por citometría de flujo

Al día 45 p.i.t. se sacrificaron cinco ratones de los grupos PBS, LVR01x3 y aquellos de CHOPx2 y CHOPx2+LVR01x3 que tenían linfoma residual luego del tratamiento quimioterápico, para extraer muestras de tumor y estudiar las poblaciones celulares infiltrantes. Elegimos este momento para el sacrificio de los animales ya que estábamos a 10 días del 2^{do} ciclo de CHOP (día 35 p.i.t) y a 7 días de la última dosis de LVR01 (día 39 p.i.t), CHOPx2+LVR01x3, por lo que consideramos que a este tiempo las células inmunes se recuperan del efecto citotóxico de la quimioterapia y se podría montar una respuesta celular. Además, los animales PBS y muchos del grupo LVR01x3 estaban al límite de volumen tumoral como para ser sacrificados, por lo que si dejábamos transcurrir más días debíamos sacrificar animales y no hubiéramos tenido un número suficiente como para realizar los estudios. Cabe aclarar que dada la necesidad de extraer muestras de tumor para llevar a cabo estos estudios, la selección de los ratones de los grupos que recibieron quimioterapia estuvo sesgada a elegir aquéllos que tuvieron una respuesta subóptima con el tratamiento (linfoma residual/respuesta parcial), no siendo representativos de la media de los animales. Sin embargo, los datos desprendidos de este estudio son importantes para caracterizar el tipo de microambiente tumoral en estos animales. El número de células T CD4⁺ fue

significativamente mayor en los tres grupos que recibieron alguno de los tratamientos (LVR01x3, CHOPx2 o CHOPx2 + LVR01x3), en comparación con el grupo no tratado (PBS) ($p < 0,0001$, ANOVA) (Fig. 48). Por el contrario, el número de células Tregs fue significativamente menor en cualquiera de los grupos tratados en comparación con el PBS ($p = 0,0019$, ANOVA). Por su parte, el número de células T CD8⁺ fue significativamente mayor en animales tratados con la terapia combinada respecto a los demás grupos ($p = 0,0002$, ANOVA). Los animales que recibieron tratamiento con *Salmonella*, ya sea sólo o en combinación con quimioterapia, mostraron un aumento significativo del número de células NK intratumorales y neutrófilos en comparación con los grupos PBS y CHOPx2 ($p = 0,0002$, $p = 0,0004$, ANOVA, para NK y neutrófilos, respectivamente) (Fig. 48). Además, la quimioterapia también indujo un aumento en las células NK intratumorales aunque significativamente menor que la terapia con *Salmonella* ($p = 0,0323$) (Fig. 48). A su vez el número de NK y neutrófilos fue similar en los animales que recibieron el tratamiento combinado, y en aquéllos tratados con LVR01 como monoterapia (Fig. 48).

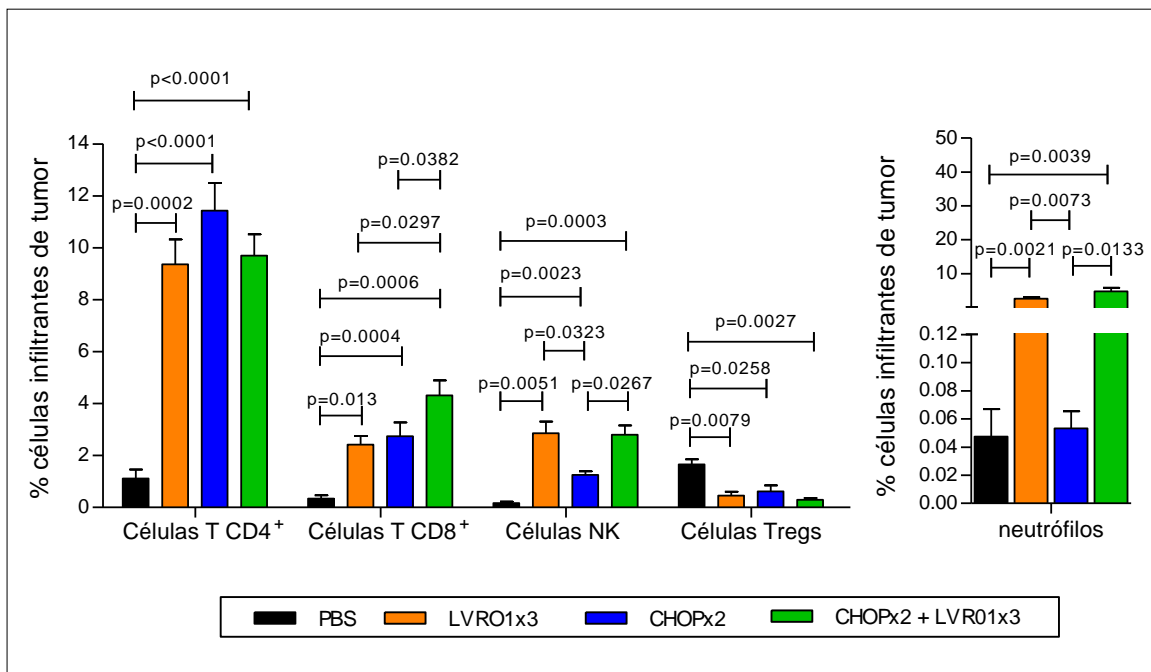


Figura 48. Poblaciones celulares inmunes infiltrantes de tumor. Al día 45 p.i.t. se sacrificaron ratones de los grupos PBS, LVR01x3, CHOPx2 y CHOPx2 + LVR01x3 para extraer tumor y estudiar las poblaciones celulares infiltrantes de tumor. Se muestra el porcentaje de células T CD4⁺ (CD3⁺ CD4⁺), T CD8⁺ T (CD3⁺ CD8⁺), células NK (CD3⁺ CD49b⁺), Tregs (CD3⁺ CD4⁺ CD25⁺ FoxP3⁺), y neutrófilos (Gr1⁺ CD11b⁺). Los resultados se expresaron como la media \pm desvío estándar (n=5). Las diferencias significativas se indican con el valor p (ANOVA).

2.2.2 Estudio del perfil de citoquinas y quimioquinas en el microambiente tumoral

Además de la fenotipificación de las poblaciones infiltrantes de tumor al día 45 p.i.t., con las muestras de tumor se realizó el estudio del perfil de citoquinas y quimioquinas expresadas en el microambiente tumoral. El estudio de los niveles de ARNm para las distintas citoquinas y quimioquinas se llevó a cabo según se describe en M&M, y los resultados se muestran en la Fig. 49. Se observó un incremento significativo en la expresión de *Ccl3*, *Ccl5* e *Ifng* con cualquiera de los tratamientos (*Salmonella*, CHOP o la combinación) y una disminución significativa en la expresión de *Tgfb* respecto al grupo no tratado ($p=0,0008$, $p<0,0001$, $p<0,0001$ y $p=0,0031$, ANOVA, para cada gen, respectivamente) (Fig. 49). El tratamiento quimioterápico produjo el aumento de la expresión génica de *Ccl4* ($p<0,0001$), *Cxcl12* ($p=0,0115$) e *Il2* ($p=0,05$), y disminución de *Cxcr4* ($p=0,0225$), mientras que la terapia con *Salmonella* aumentó la expresión de *Ccl2* ($p=0,0039$), *Ccl20* ($p=0,0108$), *Lgals1* ($p=0,004$) e IL-4 ($p=0,0072$).

Los resultados obtenidos muestran que el tratamiento combinado promueve un microambiente tumoral que se asemeja al perfil inducido con cada tratamiento por separado, aunque con algunas diferencias. En particular, sólo el tratamiento combinado indujo un aumento significativo en la expresión de *Cxcl1* ($p<0,0001$). Además, la administración de quimioterapia produjo el aumento significativo en la expresión de *Il12*, pero el tratamiento con *Salmonella* contrarresta este efecto en el grupo con la terapia combinada. Por el contrario, *Salmonella* produjo un aumento en la expresión de *Tnfa* y *Foxp3*, pero esto no se mantuvo en el tratamiento combinado (Fig. 49).

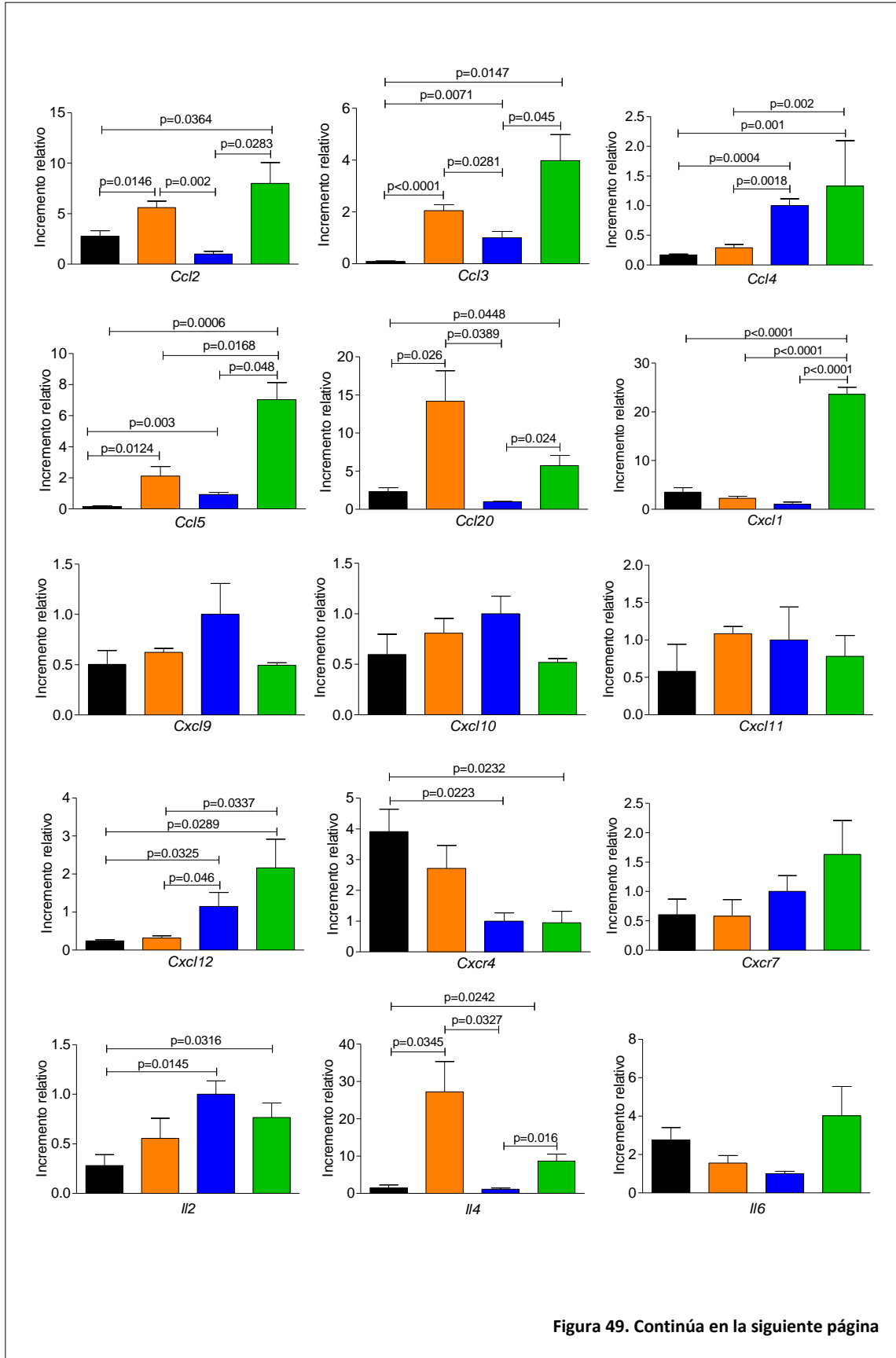


Figura 49. Continúa en la siguiente página

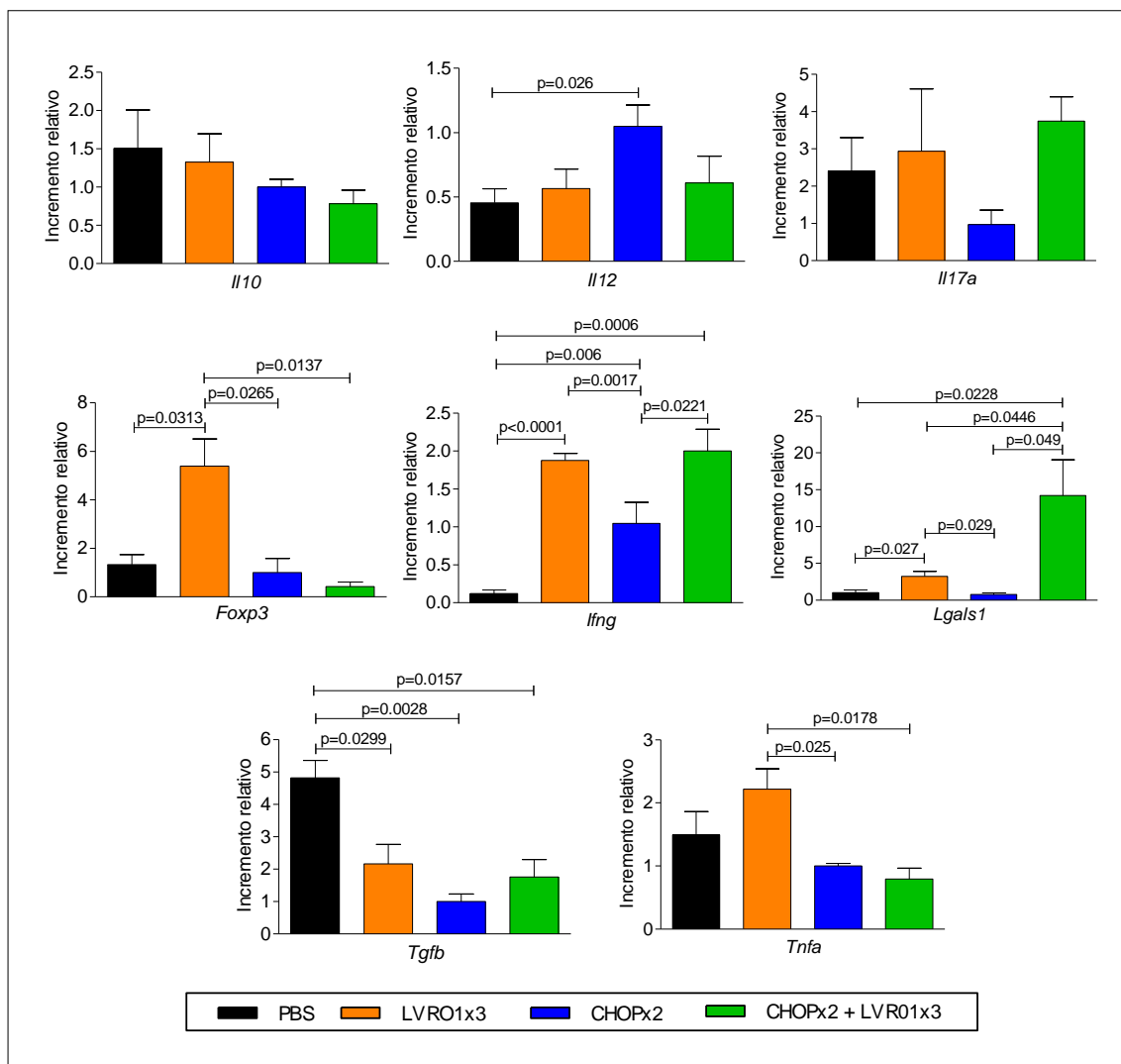


Figura 49. Expresión de quimioquinas y citoquinas en el microambiente tumoral en animales tratados con LVR01. Al día 45 p.i.t. se sacrificaron ratones (n=5) de los grupos PBS, LVR01, CHOPx2 y CHOPx2 + LVR01x3 para extraer muestras de tumor en las que se estudiaron los niveles de ARNm para distintas quimioquinas y citoquinas. El gen constitutivo utilizado fue *B2m* y los resultados se expresaron relativos a los niveles de ARNm del grupo CHOPx2 de cada día (incremento relativo). Los resultados se muestran como la media \pm el desvío estándar. Las diferencias significativas se indican con el valor p (ANOVA).

2.2.3 Estudio de la respuesta antígeno-específica en bazo

Al día 45 p.i.t. se sacrificaron ratones de los grupos PBS, LVR01x3, CHOPx2 y CHOPx2 + LVR01x3 para extraer bazo y realizar ensayos de proliferación. El mismo procedimiento se realizó los días 60 y 70 p.i.t. para los grupos CHOPx2 y CHOPx2 + LVR01x3. Cabe señalar que al día 45 p.i.t. los bazos con los que se hicieron estos ensayos provenían de los mismos ratones en los que se estudió el microambiente tumoral (con respuesta parcial), mientras que al día 60 p.i.t. los animales estaban en remisión, y al día 70 p.i.t. ya estaban en recaída (estuvieron en estado de EMR y luego

el tumor volvió a crecer). No se observó proliferación antígeno-específica con el lisado de A20 en ninguno de los días estudiados (Fig. 50), pese a que en todos los casos las muestras proliferaron frente a la estimulación mitogénica con Con A.

Además al día 60 p.i.t. se sacrificaron cinco ratones más de los grupos CHOPx2 y CHOPx2 + LVR01x3 para extraer bazo, los cuales se procesaron para determinar niveles de ARNm para distintas citoquinas luego de la estimulación antigénica. Se observó un incremento en la expresión de los genes *Il10* e *Il12* en los esplenocitos estimulados con el lisado de células A20 (lisA20) en los ratones que recibieron la terapia combinada, pero no en ratones que recibieron solo quimioterapia ($p=0,0066$, $p=0,0016$, ANOVA, para cada gen, respectivamente) (Fig. 51A). Más aún, se determinó que esta respuesta fue específica de antígeno, ya que la estimulación con un lisado de B16F1 (lisB16F1) (antígeno no relacionado), previamente utilizado en nuestro laboratorio, no produjo ninguna modificación en la expresión génica.

Además, se midió por ELISA la concentración de citoquinas en el sobrenadante de las proliferaciones realizadas al día 60 p.i.t. para los grupos CHOPx2 y CHOPx2 + LVR01x3. Como se muestra en la Fig. 51B los esplenocitos de animales del grupo CHOPx2 + LVR01x3 mostraron una producción incrementada de IL-2 cuando fueron estimulados de forma específica con lisA20 en comparación con el control SE ($p=0,0021$). Además, en estos sobrenadantes también se midió la concentración de las citoquinas IL-10, IL-12 e IFN- γ , pero sus concentraciones se encontraron por debajo del límite de detección de la técnica.

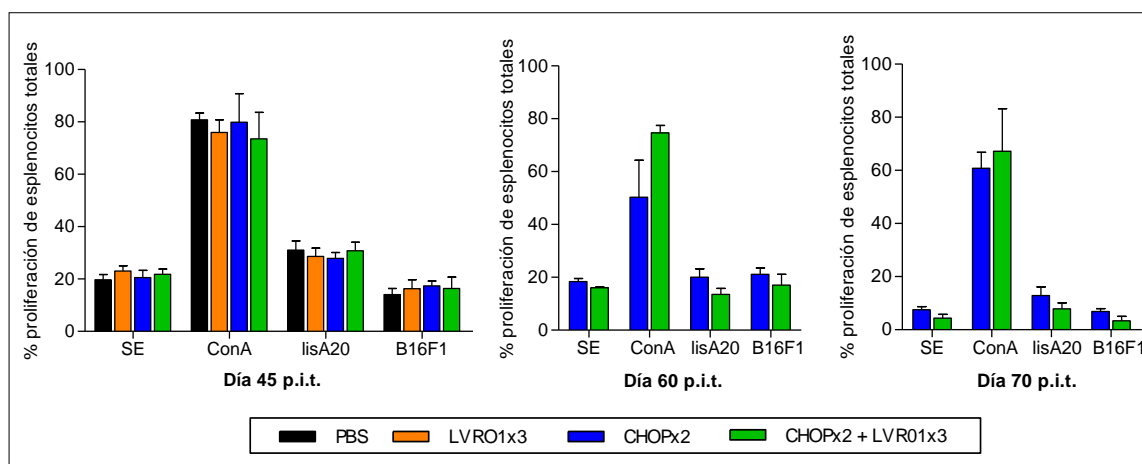
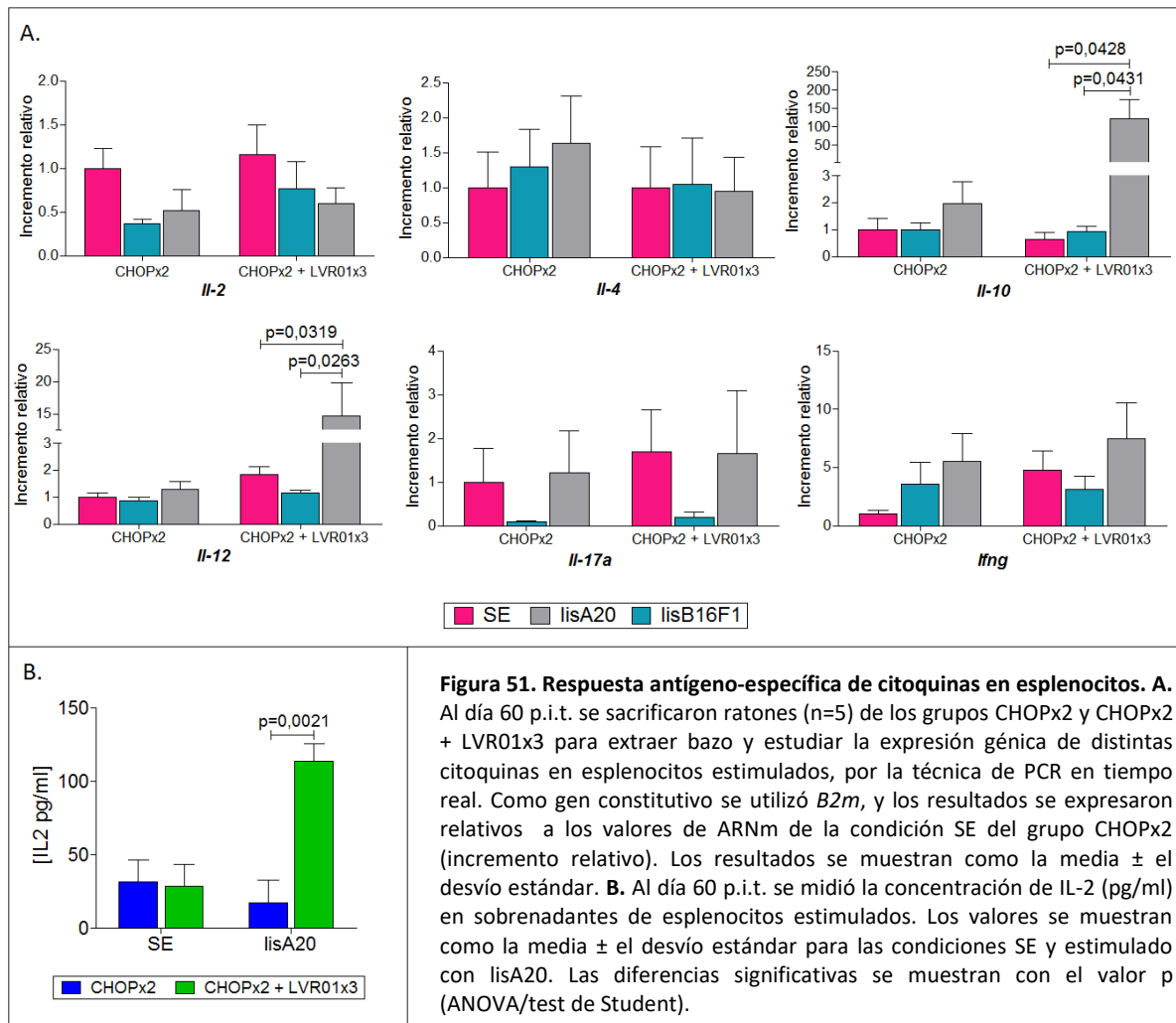


Figura 50. Estudio de la respuesta proliferativa de esplenocitos. Ensayos de proliferación con esplenocitos para los grupos PBS, LVR01x3, CHOPx2 y CHOPx2 + LVR01x3 al día 45 p.i.t. y para los grupos CHOPx2 y CHOPx2 + LVR01x3 al día 60 y 70 p.i.t. Los resultados se muestran como la media \pm desvío estándar ($n=5$) para las distintas condiciones: sin estimular (SE). ConA. lisado de A20 (lisA20) v lisado de B16F1 (lisB16F1).



2.2.4 Estudio de la citotoxicidad mediada por NK en animales tratados con LVR01

Al día 60 p.i.t. se sacrificaron cinco ratones del grupo CHOPx2 y CHOPx2 + LVR01x3 para extraer bazo. Los esplenocitos se utilizaron como células efectoras (E) y la línea celular YAC-1 como células blanco (B), según se describe en M&M. Se observó un aumento significativo en el porcentaje de citotoxicidad mediada por células NK en el grupo CHOPx2 + LVR01x3 respecto al grupo CHOPx2 para todos los ratios E:B ($p < 0,0001$, t-test) (Fig. 52A). El porcentaje de células NK fue el mismo para ambos grupos (Fig. 52B).

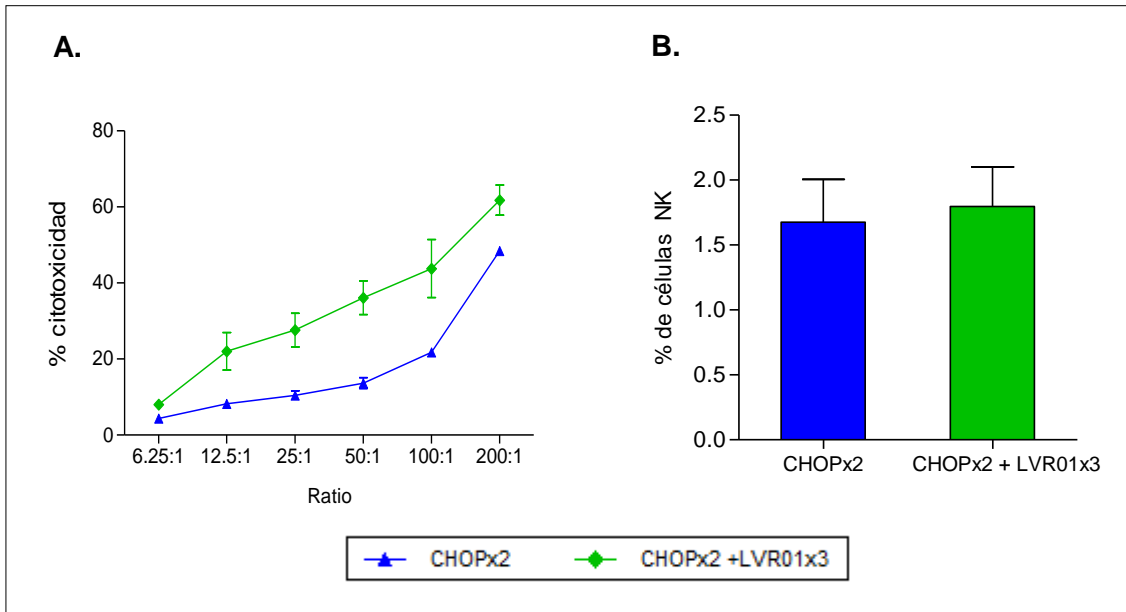


Figura 52. Citotoxicidad mediada por NK. A. Se muestra el porcentaje de citotoxicidad mediada por NK a diferentes ratios E:B. Los resultados se muestran como la media \pm desvío estándar (n=5). ($p < 0,0001$, t-test). B. Porcentaje de células NK para el grupo CHOPx2 y CHOPx2 + LVR01x3.

2.2.5 Determinación de anticuerpos específicos contra antígenos tumorales

Para el estudio de la respuesta humoral antitumoral se realizó ELISA de detección de anticuerpos totales IgG anti-A20. Las muestras de suero se colectaron los días 12, 22, 36 y 42 p.i.t para los grupos PBS y LVR01x3, y 36, 42 y 65 para CHOPx2 y CHOPx2 + LVR01x3, además al día 0 se sacrificaron ratones del grupo naïve (Fig. 53). En los grupos que recibieron LVR01, tanto en ratones con tratamiento quimioterápico como sin tratamiento, se observó una respuesta humoral IgG anti-A20 significativamente mayor en comparación con los grupos sin tratamiento para el día 22 p.i.t. en adelante. Al igual que el grupo PBS, el grupo tratado sólo con quimioterapia (CHOPx2), no mostró variación en el nivel de anticuerpos anti-A20 a lo largo del tiempo.

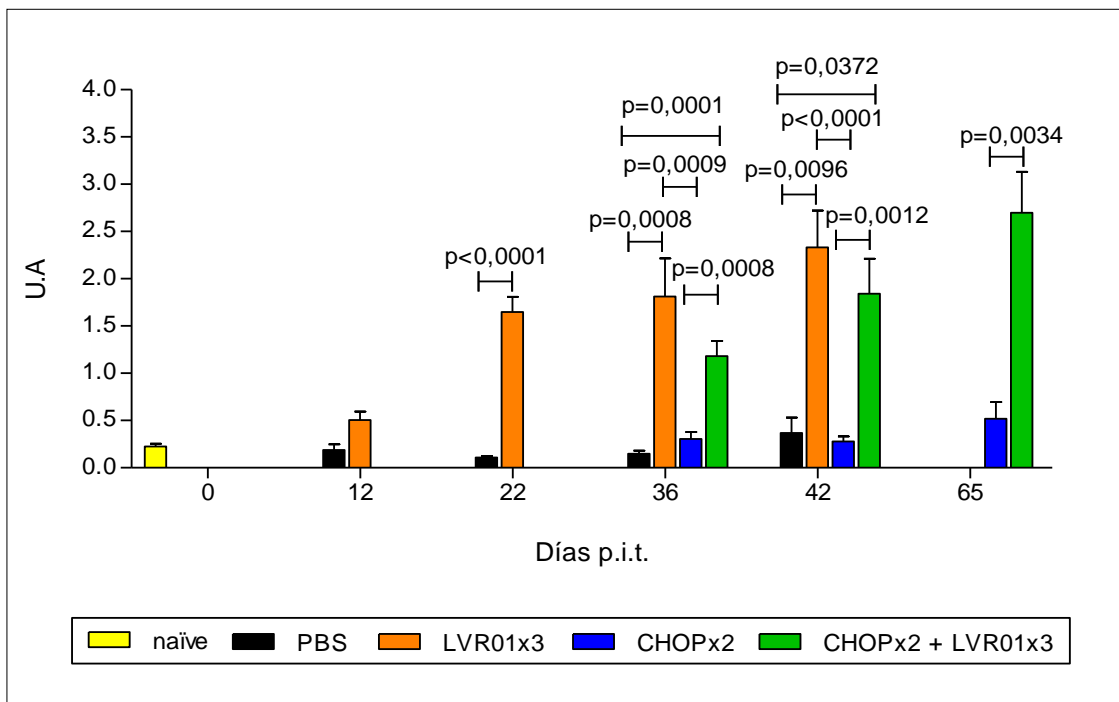


Figura 53. Respuesta inmune humoral contra las células tumorales A20. A. Se determinaron los niveles de anticuerpos IgG anti-A20 en suero para el grupo PBS y LVR01x3 a los días 0, 12, 22, 36 y 42 p.i.t., y para CHOPx2 y CHOPx2 + LVR01x3 a los días 36, 42 y 63. Los resultados se muestran como la media de unidades arbitrarias (U.A) \pm desvío estándar. Las diferencias significativas se indican con el valor p (ANOVA/test de Student).

2.2.6 Ensayos de depleción de poblaciones celulares inmunes

Para evaluar la relevancia de distintas poblaciones celulares en la respuesta inmune anti-tumoral generada por la administración de LVR01, se llevaron a cabo ensayos de depleción celular. En primer lugar se hicieron los bancos maestros de los hibridomas GK1.5 (anti-CD4), 2.43 (anti-CD8), RB68C5 (anti-GR1) y HB152 (isotipo control), y se produjeron los anticuerpos según se describe en M&M. Posteriormente se pusieron a punto las dosis de anticuerpos que debemos administrar para mantener depletadas las poblaciones de linfocitos T CD4+, T CD8+, y neutrófilos. Por CF se corroboró la depleción de las distintas poblaciones celulares, utilizando una dosis de 100 μ g/ml de los días 1, 2, 3, 5, 7 y refuerzos cada una semana. Para el caso de los neutrófilos, aunque logramos la depleción, no pudimos mantenerla en el tiempo ya la utilización del anticuerpo anti-Gr1 producía esplenomegalia en los animales y finalmente morían.

Una vez puesto a punto los regímenes de inoculación, se realizaron ensayos *in vivo*, administrando los distintos anticuerpos en ratones del grupo CHOPx2 + LVR01x3, a los días -1, 0, 1, 3, 5, 13 y 20, tomando como día 0 la administración de la primera dosis de LVR01. No se observaron diferencias significativas a nivel de volumen tumoral ni de sobrevida entre los grupos de ratones carentes de linfocitos colaboradores y citotóxicos con el grupo control (CHOPx2 + LVR01x3) (Fig. 54).

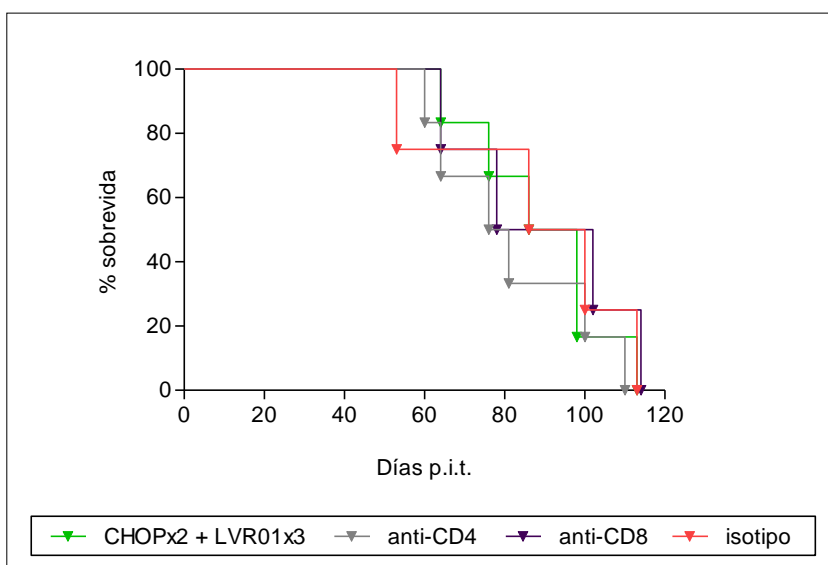


Figura 54. Curvas de sobrevida según método Kaplan-Meier. Se muestran las curvas de sobrevida para los grupos CHOPx2 + LVR01x3 y para los grupos inoculados con los distintos anticuerpos depletantes: anti-CD4, anti-CD8, anti-NK e isotipo control (n=6).

2.3 Estudio de la condición física y comportamental de los animales

Además de estudiar el efecto antitumoral de *Salmonella*, se evaluó el efecto de la administración de la bacteria en la condición física y comportamental de los ratones tratados con quimioterapia. Para ello, se estudiaron distintos parámetros, tanto clínicos como paraclínicos, en animales de los grupos CHOPx2 y CHOPx2 + LVR01. Dentro de los clínicos, se midió la condición corporal (BC), “grooming”, dolor, letargia, respuesta-fuerza, y mucositis; y para el estudio paraclínico se realizó hemograma y funcional hepático. La escala utilizada para los parámetros clínicos se indica detalladamente en M&M, a modo de resumen 0 corresponde al estado óptimo del animal, 1 revela presencia y 2 es exacerbación de la sintomatología/patología. La medición de los parámetros se realizó a distintos tiempos. Al día 44 p.i.t. (9 días post-

2^{do} CHOP) se observan diferencias significativas a nivel del “grooming” ($p=0,0075$) y letargia ($p=0,0256$), que se traducen en una mejoría del estado global de los ratones tratados con CHOP a los cuales se les administró *Salmonella* ($p=0,0455$, test de Student) (Fig. 55A). Las diferencias encontradas a nivel clínico estuvieron acompañadas por las encontradas a nivel paraclínico en los hemogramas, donde se observó un aumento significativo en la cantidad de glóbulos blancos (GB) y neutrófilos, y mayor concentración de hemoglobina en los animales tratados con la terapia combinada respecto a los del grupo CHOPx2 ($p=0,05$, $p=0,0467$, y $p=0,0388$, respectivamente) (Fig. 55B). Las diferencias en el número de GB y neutrófilos también se observaron al día 62 p.i.t.

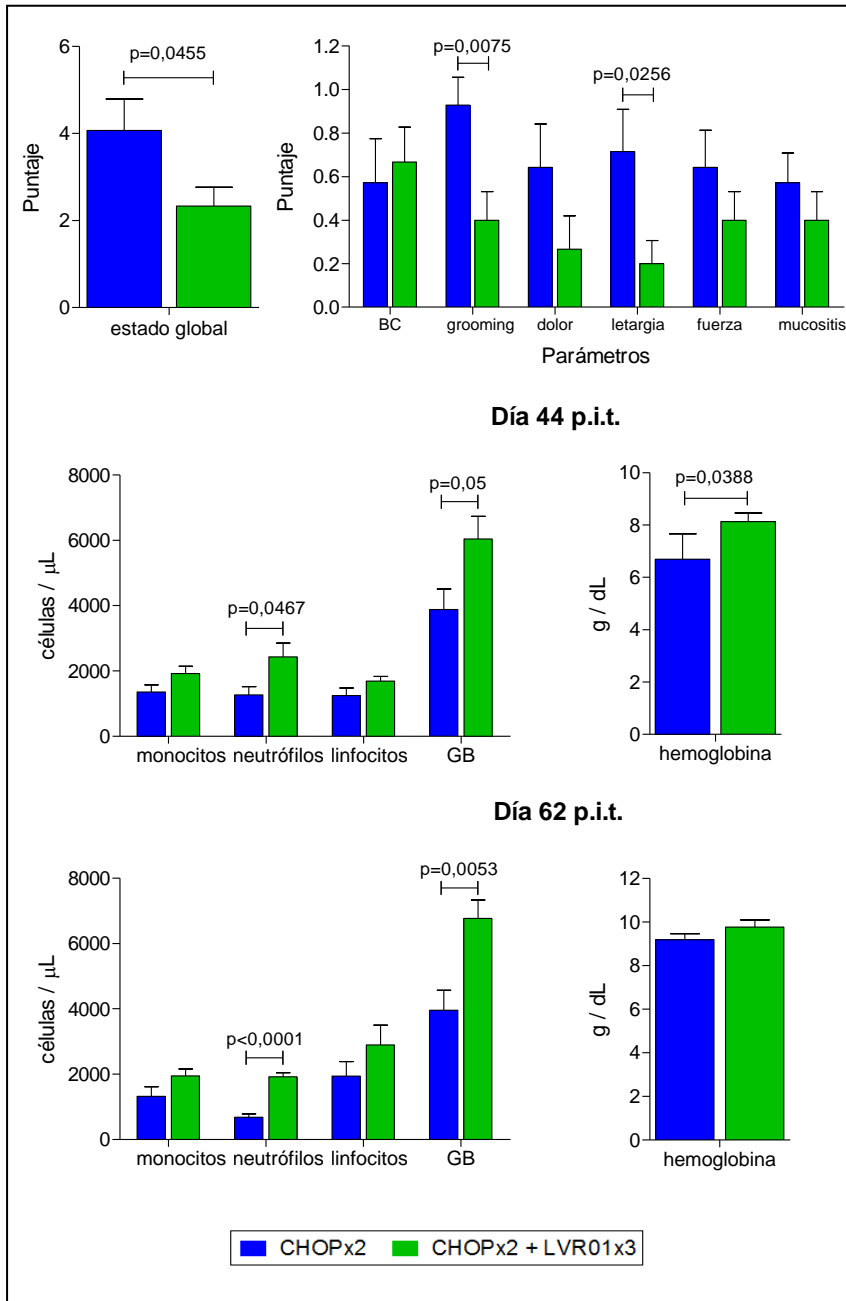


Figura 55. Estudio del estado general de los animales. A. Estudio clínico. Se muestra el estado global de los animales de los grupos CHOPx2 y CHOPx2 + LVR01x3, y los parámetros utilizados para determinarlo. Los resultados se muestran como la media \pm desvío estándar del puntaje para cada parámetro estudiado ($n=15$). Las diferencias significativas se indican con el valor p. BC: condición corporal **B.** Estudio paraclínico. Se muestra la cantidad de células sanguíneas y concentración de hemoglobina \pm desvío estándar, obtenidos de hemogramas realizados a los días 44 y 62 p.i.t. en animales de los grupos CHOPx2 y CHOPx2 + LVR01x3 ($n=5$). Las diferencias significativas se indican con el valor p. GB: glóbulos blancos.

3 DISCUSIÓN

En el presente trabajo demostramos que la inmunoterapia con *Salmonella* es una buena opción terapéutica para el tratamiento del LNH-B, pudiendo ser administrada en forma conjunta con quimioterapia. Planteamos estudiar la inmunoterapia en animales tratados con CHOP, tratamiento estándar de primera línea para el LNH agresivo y el más utilizado para tratar LNH indolente^{31,32,481,500}, con el objetivo de aumentar la probabilidad de éxito al transferir a ensayos clínicos los resultados obtenidos con una inmunoterapia a nivel pre-clínico.

En los últimos años, el progreso en el área de la inmunología y bacteriología ha convertido a las bacterias en un blanco de investigación para el tratamiento del cáncer. Las características del microambiente tumoral, incluyendo vasos sanguíneos anormales y regiones hipóxicas y necróticas hace que sea propicio para la colonización por bacterias tanto anaerobias obligadas (*Clostridium*, *Bifidobacterium*), como facultativas (*Streptococcus*, *Escherichia coli*, *Listeria* y *Salmonella*)³¹¹⁻³²². En particular, *Salmonella* ha sido usada como una terapia antitumoral efectiva contra distintos tipos de cáncer, incluyendo melanoma, pulmón, colon, mama, renal, hepático, próstata y hematológicos^{307,321,323,325,341-345,530}. Existe gran cantidad de literatura que evidencia que esta bacteria posee una actividad antitumoral intrínseca que depende de la cepa y modelo experimental utilizados^{334,341,531}. *Salmonella* promueve una fuerte señal pro-inflamatoria debido a la cantidad de PAMPs que presenta. Éstos estimulan la maduración de las células APC a un fenotipo inmunoestimulador. Las células APC maduras producen IL-12, TNF- α , IL-1 β , IL-6, IFN α y β , activando las células T. De esta forma, una señal de peligro promueve la co-estimulación y una respuesta efectiva de células T^{531,532}. Además, se induce la infiltración de neutrófilos y una respuesta de células T específicas de tumor, con reducción de poblaciones inmunosupresoras como son las células MDSCs y Tregs^{341,533}.

Previamente, nuestro grupo de trabajo reportó que la infección *in vitro* con *Salmonella* LVR01 induce la apoptosis de las células A20, y que la administración i.t. de LVR01 produce una respuesta inmune antitumoral, con retardo en el crecimiento tumoral y sobrevida extendida³⁴⁶. Sin embargo en la clínica, los pacientes con LNH se

someten a quimioterapia como tratamiento de primera línea, por lo que es importante estudiar si la terapia con *Salmonella* puede ser utilizada en un contexto que incluya la administración de quimioterapia. En capítulos anteriores, se describió la posibilidad de aplicar la misma quimioterapia utilizada en pacientes (CHOP) en ratones con linfoma A20. Demostramos que además de su efecto citotóxico, la quimioterapia promovió un microambiente tumoral pro-inflamatorio y una respuesta inmune antitumoral asociada a un retardo en el crecimiento tumoral y extensión de la sobrevida. Se ha descrito que el uso de quimioterapia como terapia adyuvante y neoadyuvante en varios tumores metastásicos (mama, colon, gástrico, uretra y vejiga), reduce el riesgo de recaída y mejora las tasas de sobrevida global⁵³⁴⁻⁵³⁹. Apoyando la idea del uso de *Salmonella* como inmunoterapia en ratones tratados con CHOP, existen reportes de otros grupos demostrando que la administración de *Salmonella* mejora el efecto antitumoral de la ciclofosfamida en un modelo murino de melanoma, aumenta la respuesta inmune antitumoral en ratones tratados con cisplatina en cáncer de pulmón y hepatoma, y disminuye la actividad tumoral en un modelo pre-clínico de cáncer de colon metastásico al ser administrada junto la droga quimioterápica 5-fluorouracil⁵⁴⁰⁻⁵⁴³. También se ha visto que la utilización de bacterias anaerobias estrictas como *Clostridium novyi*, aumenta la eficacia terapéutica de la administración de doxorrubicina y vincristina en modelos pre-clínicos de cáncer de colon^{544,545}. En nuestro caso, observamos que el uso de *Salmonella* como inmunoterapia no sólo produce los mismos efectos clínicos observados con LVR01 como monoterapia, sino que en combinación con CHOP promueve un efecto antitumoral aumentado, con un retraso en el crecimiento tumoral y extensión de la sobrevida global, y sobrevida libre de progresión en animales con linfoma, en comparación con las terapias por separado. Además, otro hallazgo interesante fue que más allá de la respuesta antitumoral que produjo el tratamiento con *Salmonella*, el análisis comparativo de parámetros clínicos y para-clínicos demostraron que la administración de la bacteria mejoró de forma significativa la condición física de los animales, lo cual sería altamente beneficioso cuando pensamos en el estado de los pacientes bajo tratamiento quimioterápico. La respuesta inmune innata y adaptativa desarrollada fue más potente en los animales tratados con la terapia combinada, observándose en algunos casos un efecto aditivo, y en otros, efectos que sólo aparecen cuando se aplica la terapia combinada.

El estudio de las poblaciones infiltrantes de tumor mostró un aumento significativo de linfocitos T CD4⁺ y una disminución en células Tregs respecto al grupo no tratado (PBS) para cualquiera de los tratamientos administrados. En concordancia con el aumento de T CD4⁺, a nivel tumoral se observó una expresión significativamente aumentada de *Il2* e *Ifng* en todos los grupos tratados respecto al control sin tratar, que como describimos anteriormente son citoquinas clave para montar una respuesta antitumoral efectiva. La reducción del número de Tregs observado en los grupos tratados con LVR01 respecto al grupo no tratado, concuerda con el efecto reportado producto de la administración i.t. de *Salmonella*, i.e. disminución de poblaciones celulares inmunosupresoras que promueve el cambio de un microambiente tumoral inmunosupresor a uno inmunogénico^{533,546}. También en el grupo CHOPx2 el número de Tregs fue menor respecto al grupo sin tratar, probablemente debido a la administración de la ciclofosfamida como parte del CHOP. Se ha descrito que la administración de algunas drogas quimioterápicas, incluyendo la ciclofosfamida, suprimen la población de células Tregs, mejorando la inmunidad antitumoral^{207,547}.

Por otro lado, se observó un aumento significativo de los neutrófilos asociados a tumor (TAN, del inglés) en los animales tratados con *Salmonella* en comparación con los demás grupos (PBS, CHOPx2). En concordancia con estos resultados, previamente nuestro grupo de trabajo reportó que la administración i.t. de LVR01 provoca un aumento en el reclutamiento de neutrófilos al tumor, lo cual se correlacionó con un efecto terapéutico beneficioso³⁴⁶. Esta observación es coherente dado que en términos generales la presencia de *Salmonella* en el tejido se asocia al reclutamiento de neutrófilos⁵⁴⁸. En concordancia con nuestros resultados, Vendrell & col. reportaron que los neutrófilos son la principal población infiltrante de tumor luego de administrar *Salmonella* i.t. en un modelo pre-clínico de linfoma T³⁴⁷. Además, observamos un aumento significativo de la expresión de *Ccl3*, quimioquina producida por macrófagos, cuya función principal es el reclutamiento y activación de neutrófilos^{505,549}. Se ha descrito la participación de CCL3 en varios tipos de neoplasias hematológicas⁵⁵⁰. Otra quimioquina atrayente de neutrófilos es CXCL1, expresada por neutrófilos, macrófagos y células epiteliales. El aumento de esta quimioquina se observó sólo en el grupo tratado con la terapia combinada. En particular, se ha descrito la participación de

CXCL1 en los procesos de angiogénesis, arteriogénesis, inflamación, y tumorigénesis 222,551,552 .

La población de células NK infiltrantes de tumor también se vio aumentada en los grupos tratados con LVR01, independientemente de la quimioterapia. Este aumento, concuerda con el aumento en la expresión de *Ccl2*, *Ccl3*, y *Ccl5* observado en estos grupos, ya que una de las funciones de estas quimioquinas es el reclutamiento de células NK ⁵⁵³. Sin embargo, también se ha descrito la implicancia de estas quimioquinas en distintas patologías que involucran al sistema inmune, incluido el cáncer ⁵⁵⁴. Por otro lado, al día 63 p.i.t. se observó un aumento en la citotoxicidad de las células NK a nivel sistémico en el grupo que recibe la terapia combinada frente al que recibe sólo el tratamiento quimioterápico. Las células NK se han descrito como efectores críticos en la inmunología tumoral y recientemente se ha visto que poseen atributos tanto del sistema inmune innato como del adaptativo, moldeando la respuesta antígeno específica de las células T y B ^{80,81}. Más aún, estudios clínicos recientes aportaron evidencia que las células NK son altamente eficientes contra tumores hematológicos siendo una estrategia terapéutica prometedora ^{87,88}.

Otra observación fue que la terapia combinada aumenta de forma significativa el número de células T CD8⁺ que se reclutan al tumor respecto al resto de los grupos. Estos resultados son congruentes con el aumento de la expresión de *Ifnγ* observado en el grupo donde se administró la terapia combinada. Tanto los linfocitos T citotóxicos como las células NK son unas de las principales poblaciones celulares productoras de esta citoquina. Como ya se mencionó en capítulos anteriores, la presencia de IFN-γ se considerada fundamental para desarrollar una respuesta antitumoral efectiva ^{79,221,511}.

Corroboramos que la respuesta antitumoral desarrollada por la administración de *Salmonella* en ratones tratados con CHOP es antígeno-específica, ya que la estimulación de los esplenocitos con el lisado de células A20, pero no con un lisado de B16, en ratones tratados con la terapia combinada, promueve la expresión de las citoquinas IL-10 e IL-12 a nivel de ARNm y de IL-2 a nivel proteico. También a nivel humoral observamos que la respuesta antitumoral desarrollada por la administración de LVR es antígeno-específica. En concordancia con este resultado, previamente Grille & col. observaron la producción antígeno-específica de anticuerpos IgG anti-A20 en ratones portadores de LNH A20 tratados con LVR01 ³⁴⁶. Como ya se mencionó en el

capítulo anterior, en linfomas, las respuestas efectoras mediadas por anticuerpos son de gran importancia, siendo los anticuerpos monoclonales anti-CD20 parte del tratamiento estándar contra LNH ^{22,33}.

Como mencionamos en otros capítulos, las quimioquinas y sus receptores son de gran importancia para la interacción entre el tumor y el estroma, promoviendo un ambiente permisivo para el escape tumoral, o un ambiente inmunogénico que retrase su desarrollo ^{236,302,505-509}. Nuestros resultados mostraron que la administración de *Salmonella* en combinación con CHOP induce un aumento en la expresión de varias quimioquinas pro-inflamatorias, que como ya mencionamos concuerda con el aumento en el número de células infiltrantes de tumor (neutrófilos, células NK, y linfocitos T CD4+ y CD8+ T) observado los ratones del grupo CHOPx2 + LVR01x3. Más aún, en el grupo sin tratar se observó un incremento en los niveles de ARNm de *Tgfb* a nivel tumoral en comparación con los grupos tratados, citoquina descrita como uno de los principales factores inmunosupresores secretado por células supresoras como Tregs, además de por células tumorales ^{221,511}. Además, en el grupo PBS se observó un incremento significativo en la expresión de *Cxcr4*, en concordancia con el hecho de que este receptor se ha visto sobreexpresado en varios cánceres humanos ²²¹. Observamos un aumento de la expresión de *Cxcl12* en el tumor de animales tratados con CHOP, ya sea con o sin administración de *Salmonella*, respecto a los demás grupos. Como describimos en capítulos anteriores, el eje CXCL12-CXCR4/CXCR7 se asocia a progresión tumoral y metástasis ²³⁶, sin embargo no observamos aumento de ARNm para ninguno de los receptores en estos ratones.

Un hallazgo peculiar fue el aumento significativo de la expresión génica de *Lgals1* en el grupo tratado con la terapia combinada. Las galectinas son una familia de proteínas de unión a carbohidratos con una afinidad por β -galactósidos implicados en la adhesión célula-célula, interacciones célula-matriz, homeostasis del sistema inmune y crecimiento celular ²²⁹. Se ha descrito que galectina-1 está sobreexpresada en diferentes tumores, contribuyendo a la evasión de la respuesta inmune, promoviendo la apoptosis de células T, angiogénesis y transformación ²³⁰⁻²³³. En particular, se describió el papel de las galectinas en las neoplasias hematológicas, observándose una asociación entre el aumento de la expresión de galectina-1 con la progresión tumoral en el linfoma de Hodgkin y la leucemia linfocítica crónica, mientras que la galectina-3

desempeña un papel secundario en la leucemia mielógena crónica y el mieloma múltiple, y se sobreexpresa en LDGCB, siendo uno de los mejores genes para discriminar entre linfoma folicular indolente y LDGCB ²³⁴. Tal vez, el aumento de la expresión de *Lgals1* se debe a que los animales se encuentran en la condición subóptima (linfoma residual). Sin embargo, no se encontró una disminución de los linfocitos T, como posible efecto de la galectina-1, sino que contrariamente se observó un aumento en esta población. Se necesitarían otros estudios para determinar el verdadero rol de esta proteína en la actividad antitumoral desarrollada por la terapia con *Salmonella* ^{229,555}.

En conclusión, encontramos que la administración i.t. de *Salmonella* LVR01 en combinación con el tratamiento quimioterápico tipo CHOP provoca una reducción notoria del tumor con un marcado beneficio terapéutico que se traduce en un aumento en la supervivencia global y libre de progresión en comparación con cada tratamiento por separado. *Salmonella* estimula tanto la respuesta innata como la adaptativa, con infiltración de poblaciones inmunes al tumor y una elevada expresión de genes para quimioquinas y citoquinas pro-inflamatorias, y el desarrollo de una respuesta humoral específica contra el tumor A20. Aunque aún faltan estudios para determinar con mayor exactitud cuáles son los efectores de la respuesta inmune antitumoral que subyacen la actividad antitumoral observada en los animales tratados con *Salmonella*, nuestros resultados sugieren que las células NK son grandes actores. El utilizar la línea celular YAC-1 en los ensayos de citotoxicidad, nos permite afirmar que dicha citotoxicidad está mediada por células NK, pero no sabemos cómo es el contexto de donde provienen estas células. Probablemente existan otras variables (por ejemplo otras poblaciones de células inmunes, citoquinas, etc.) que contribuyan a la activación de estas células, por lo que a futuro sería fundamental trabajar en contextos deficientes para estos factores, y complementariamente realizar transferencia adoptiva o reconstitución de citoquinas en estos animales. Por su parte, el tratamiento quimioterápico ejerce su efecto antitumoral tanto por citotoxicidad directa como por favorecer un microambiente tumoral inmunogénico. Proponemos que el uso de la cepa atenuada de *Salmonella*, LVR01, como terapia adyuvante al tratamiento convencional como es la quimioterapia, podría ser una estrategia terapéutica interesante para el tratamiento de LNH-B. Más aún, dada la seguridad probada para

esta cepa, esta estrategia terapéutica podría ser fácilmente transferible a ensayos clínicos.

CAPÍTULO VI

CONCLUSIONES FINALES Y PERSPECTIVAS

Este trabajo se centró en el desarrollo de nuevas inmunoterapias para LNH evaluadas en un modelo murino que se asemeja más al contexto clínico, de modo de aumentar la probabilidad de éxito al transferir los resultados obtenidos en estudios pre-clínicos a ensayos clínicos. Para ello, establecimos un modelo de EMR de LNH-B donde los ratones portadores de linfoma A20 reciben quimioterapia tipo CHOP, siendo este uno de los esquemas más utilizados como tratamiento de primera línea para este tipo de neoplasias. Además de desarrollar dicho modelo, pudimos demostrar el estado de inmunocompetencia en los animales que desarrollan EMR, característica esencial a la hora de evaluar la efectividad de una inmunoterapia. Asimismo, logramos implementar el uso de PET/CT para el seguimiento *in vivo* de la enfermedad en los animales, técnica estándar utilizada para la monitorización de la enfermedad y respuesta a tratamientos en pacientes.

La línea tumoral A20 utilizada presenta similar biología e histología al LDGCB, siendo este último el LNH más común. Sin embargo, debido a la heterogeneidad de estas neoplasias, como perspectiva a futuro planteamos utilizar otros modelos de LNH de células B y T con diferente grado de agresividad biológica para investigar la posibilidad de establecer este modelo de EMR, de modo de aumentar la aplicabilidad del mismo. Por otro lado, sería interesante incorporar al plan de quimioterapia un anticuerpo monoclonal anti-CD20 murino de similar efectividad terapéutica al rituximab, de manera de poder estudiar la respuesta inmune generada por las inmunoterapias en el contexto de depleción linfocitaria-B.

Previamente nuestro grupo de trabajo determinó que la administración de *Salmonella* en el modelo de linfoma A20 de alta carga tumoral desencadena una respuesta antitumoral notoria ³⁴⁶. En el presente trabajo corroboramos dichos resultados y demostramos que persiste siendo efectiva la terapia cuando se administra en conjunto con poliquimioterapia. Además, determinamos que *Salmonella* puede ser utilizada como terapia adyuvante en ratones tratados con quimioterapia, teniendo también el beneficio de mejorar la condición física de los animales. Consideramos que este último punto merece un estudio más detallado y exhaustivo para poder determinar en forma fehaciente si la administración de *Salmonella* impacta positivamente en el estado general de los animales sometidos a quimioterapia, ya que esto sería un elemento positivo a la hora de considerar la aplicación de esta

inmunoterapia en pacientes bajo tratamiento quimioterápico. El retraso del crecimiento tumoral y extensión de sobrevida observada en los animales tratados con *Salmonella*, se asocia a un aumento de la respuesta inmune antitumoral, tanto innata como adaptativa, con infiltración de poblaciones celulares efectoras al tumor y una elevada expresión de genes para quimioquinas y citoquinas pro-inflamatorias, así como el desarrollo de una respuesta en anticuerpos específica contra el tumor A20. El tratamiento quimioterápico ejerce a su vez un efecto antitumoral por citotoxicidad directa, pero además promueve un microambiente tumoral inmunogénico. Por lo antes mencionado, pensamos que el uso de la cepa atenuada de *Salmonella*, LVR01, como terapia adyuvante en un tratamiento convencional, como es la quimioterapia, podría ser una estrategia terapéutica interesante para LNH-B que amerita continuar estudiando .

Dada la demostrada seguridad clínica de cepas atenuadas de *Salmonella* ³³³, esta estrategia terapéutica podría ser fácilmente transferible a ensayos clínicos, incluso en Uruguay, siendo fácil de implementar y con bajo costo. Previo al diseño de ensayos clínicos fase I, sería conveniente realizar estudios pre-clínicos para evaluar si la administración de *Salmonella* vía oral (v.o) e intravenoso (i.v) tiene el mismo efecto terapéutico observado con la administración i.t, de modo de demostrar la factibilidad de aplicar la terapia a ensayos clínicos. En este sentido, en modelos de melanoma y carcinoma de pulmón se reportó la acumulación de *Salmonella* a nivel tumoral cuando la bacteria se administró v.o. ⁵⁵⁶. Esta misma acumulación se describió en pacientes con melanoma administrando *Salmonella* por vía i.v. ^{343,557}. Teniendo en cuenta estos antecedentes, tenderíamos a pensar que la transferencia a la clínica de nuestra inmunoterapia con *Salmonella* tendría razonable probabilidad de éxito.

Previamente nuestro grupo de trabajo reportó el efecto terapéutico que tiene la administración de una vacuna formulada con células de linfoma A20 infectadas con *Salmonella* previo a ser irradiadas, administrada junto con la citoquina IL-2 ⁴³¹. Además, esta citoquina también se utilizó en otra vacuna desarrollada por nuestro grupo, formulada con células tumorales lisadas e IL-2 adsorbida a hidróxido de aluminio ³⁵⁴. La administración de esta vacuna en ratones portadores de linfoma A20 produjo una respuesta antitumoral potente, aunque se observó un aumento notorio en el número de células Tregs. Con estos antecedentes, decidimos estudiar en el

modelo de EMR, el abordaje que utiliza la vacuna a células enteras, pero en lugar de incluir IL-2, modificamos las células A20 para que expresen IL-15. Ya se comentó en capítulos previos las ventajas de utilizar IL-15 frente a IL-2 en terapias contra cáncer, destacando la generación de memoria de células NK y T CD8⁺, y el hecho de no reclutar células Tregs. En concordancia con lo anterior, el uso de nuestra inmunoterapia no generó aumento de Tregs. La principal ventaja que tiene el uso de la vacuna a células enteras desarrollada en el presente trabajo, es que desencadena una respuesta específica contra tumor, ya que la vacuna incluye antígenos específicos de linfoma A20 (célula entera), y es la propia célula tumoral (APC) quien expresa IL-15, contribuyendo a generar el contexto adecuada de presentación antigénica. A futuro, una estrategia para mejorar la respuesta obtenida con la vacuna a células enteras que desarrollamos, podría ser transfectar las células A20 para que expresen el complejo IL-15/IL-15R α ya que tiene mayor afinidad por IL-15R β / γ C que la IL-15 libre, facilitando así la transpresentación explicada en el capítulo IV. En este sentido existen reportes del beneficio terapéutico que tiene el uso del complejo IL-15/IL-15R α , aumentando la proliferación y actividad antitumoral de las células NK y T CD8⁺, lo que conduce a una respuesta antitumoral mejorada respecto a la utilización de IL-15 sola ^{353,369,371,377,378}. También se observó que la utilización de una vacuna a DCs expresando dicho complejo genera una respuesta inmune antitumoral más potente que cuando expresa la citoquina sola ⁵²⁸.

En hematología, el desarrollo que tiene hoy en día la terapia celular y la implementación de terapias personalizadas en la clínica (por ejemplo alotransplante de progenitores hematopoyéticos, infusión de linfocitos de donante y más recientemente utilización de células estromales mesenquimales expandidas *in vitro* y reinfundidas al paciente y la utilización de CAR-T) hace posible la utilización de vacunas como la desarrollada en el presente trabajo. Más aún, a la brevedad se espera disponer de un centro de terapia celular en el Hospital de Clínicas, donde se podría eventualmente implementar la estrategia terapéutica personalizada planteada en el presente trabajo.

Respecto a los efectores inmunes que determinan la repuesta antitumoral observada con las inmunoterapias desarrolladas, aunque falta aún realizar más estudios, los resultados obtenidos sugieren que las células NK son una de las poblaciones celulares inmunes con mayor participación en la respuesta antitumoral,

por lo que a futuro sería fundamental realizar ensayos de depleción para esta población celular y complementariamente transferencia adoptiva de estas células a ratones deficientes. Además, para el caso de la terapia con IL-15 sería necesario profundizar en el estudio de la memoria de las células NK y T CD8⁺, ya que como hemos mencionado anteriormente, se ha visto que esta citoquina, además de promover la proliferación y activación de estas células, favorecen el desarrollo de memoria³⁶².

En conclusión, hemos avanzado en el diseño de inmunoterapias efectivas para el tratamiento de LNH, evaluadas en un modelo pre-clínico que se acerca al contexto en el que se encuentran los pacientes en la clínica. Consideramos que estas inmunoterapias ameritan ser testeadas en ensayos clínicos fase I.

CAPÍTULO VII

REFERENCIAS

1. Sans-Sabrafen, J., Raebel, C. B., Corrons, J. L. V. *Hematología clínica*. (Elsevier, 2006).
2. Shankland, K. R., Armitage, J. O., Hancock, B. W. Non-Hodgkin lymphoma. *Lancet* **380**, 848–857 (2012).
3. Cancer Research UK. <http://www.cancerresearchuk.org/health-professional/cancer-statistics/statistics-by-cancer-type/non-hodgkin-lymphoma#heading-Zero>. Available at: <http://www.cancerresearchuk.org/health-professional/cancer-statistics/statistics-by-cancer-type/non-hodgkin-lymphoma#heading-Zero>.
4. Chiu, B. C. & Hou, N. Epidemiology and Etiology of Non-Hodgkin Lymphoma. *Cancer Treat. Res.* **165**, 1–25 (2015).
5. SEER Cancer Statistics Factsheets: Non-Hodgkin Lymphoma. National Cancer Institute. Bethesda, M. <https://seer.cancer.gov/statfacts/html/nhl.htm>.
6. Schottenfeld, D. & Fraumeni, J. F. *Cancer Epidemiology and Prevention*. (2006). doi:10.1093/acprof:oso/9780195149616.001.0001
7. Globocan 2012. <http://globocan.iarc.fr/Pages/Map.aspx>.
8. Skrabek, P., Turner, D., Seftel, M. Epidemiology of Non-Hodgkin Lymphoma. *Transfus. Apher. Sci.* **49**, 133–138 (2013).
9. Koff, J. L., Chihara, D., Phan, A., et al. To Each Its Own: Linking the Biology and Epidemiology of NHL Subtypes. *Curr. Hematol. Malig. Rep.* **10**, 244–255 (2015).
10. Barrios, E., Garau, M., Alonso, R., M. C. *IV Atlas De Incidencia Del Cancer*. (2014).
11. Howlader, N., Noone, A. M., Krapcho, M., et al. *SEER Cancer Statistics Review, 1975-2012, National Cancer Institute*. http://seer.cancer.gov/csr/1975_2012/. (2015).
12. Cancer Research UK. <http://www.cancerresearchuk.org/health-professional/cancer-statistics/statistics-by-cancer-type/non-hodgkin-lymphoma/survival#heading-Zero>.
13. Guerard, E. J. & Bishop, M. R. Overview of Non-Hodgkin's Lymphoma. *Dis Mon* **58**, 208–218 (2012).
14. Zhang, Y., Dai, Y., Zheng, T. Risk Factors of Non-Hodgkin Lymphoma. *Expert Opin Med Diagn* **5**, 539–550 (2011).
15. Swerdlow, S. H., Campo, E., Pileri, S. A., et al. The 2016 revision of the World Health Organization classification of lymphoid neoplasms. *Blood* **127**, 2375–2391 (2016).
16. Jaffe, E. S., Harris, N. L., Stein, H., et al. Classification of lymphoid neoplasms: The microscope as a tool for disease discovery. *Blood* **112**, 4384–4399 (2008).
17. Evens A. M., B. K. *Non-Hodgkin Lymphoma*. *Cancer Treat Res* **165**, (2015).
18. Matsuki, E. & Younes, A. Checkpoint Inhibitors and Other Immune Therapies for Hodgkin and Non-Hodgkin Lymphoma. *Curr. Treat. Options Oncol.* **17**, (2016).
19. Read, E. D., Eu, P., Little, P. J., et al. The status of radioimmunotherapy in CD20+ non-Hodgkin's lymphoma. *Target. Oncol.* **10**, 15–26 (2015).
20. Knapp, C. M. & Whitehead, K. A. In pursuit of a moving target: nanotherapeutics for the treatment of non-Hodgkin B-cell lymphoma. *Expert Opin. Drug Deliv.* **11**, 1923–37 (2014).
21. Mondello, P. & Younes, A. Emerging drugs for diffuse large B-cell lymphoma. *Expert Rev. Anticancer Ther.* **15**, 439–451 (2015).

22. Solimando, A. G., Ribatti, D., Vacca, A., et al. Targeting B-cell non Hodgkin lymphoma: New and old tricks. *Leuk. Res.* **42**, 1–12 (2016).
23. Jahangiri, S., Friedberg, J., Barr., P. Emerging protein kinase inhibitors for the treatment of non-Hodgkin's lymphoma. *Expert Opin. Emerg. Drugs* **19**, 367–83 (2014).
24. Siddiqi, T. & Rosen, S. T. Novel biologic agents for non-Hodgkin lymphoma and chronic lymphocytic leukemia-part 2: adoptive cellular immunotherapy, small-molecule inhibitors, and immunomodulation. *Oncology (Williston Park)*. **29**, 299–308 (2015).
25. Choe, H. & Ruan, J. Next Generation of Targeted Molecules for Non-Hodgkin Lymphomas: Small-Molecule Inhibitors of Intracellular Targets and Signaling Pathways. *Oncology (Williston Park)*. **30**, 1–14 (2016).
26. Merli, M., Ferrario, A., Maffioli, M., et al. Investigational therapies targeting lymphocyte antigens for the treatment of non-Hodgkin's lymphoma. *Expert Opin. Investig. Drugs* **24**, 1–16 (2015).
27. Blum, K. A. B-cell receptor pathway modulators in NHL. *Hematol. Am Soc Hematol Educ Program*. **2015**, 82–91 (2015).
28. Jagadeesh, D. & Smith, M. R. Antibody Drug Conjugates (ADCs): Changing the Treatment Landscape of Lymphoma. *Curr. Treat. Options Oncol.* **17**, (2016).
29. Coiffier, B., Lepage, E., Briere, J., et al. CHOP chemotherapy plus rituximab compared with CHOP alone in elderly patients with diffuse large-B-cell lymphoma. *N Engl J Med* **346**, 235–242 (2002).
30. Kriachok, I. A. Filonenko, K. S., Gubareva, G. O., et al. Efficiency therapy with rituximab in patients with non-Hodgkin's lymphomas. *Lik Sprav.* 117–21 (2011).
31. Gordon, L.I., Harrington, D., Andersen, J., et al. Comparison of a second-generation combination chemotherapeutic regimen (m-BACOD) with a standard regimen (CHOP) for advanced diffuse non-Hodgkin's lymphoma. *N Engl J Med* **327**, 1342–9 (1992).
32. Coleman, M., Lammers, P. E., Ciceri, F., et al. Role of Rituximab and Rituximab Biosimilars in Diffuse Large B-Cell Lymphoma. *Clin. Lymphoma, Myeloma Leuk.* **16**, 175–181 (2016).
33. Feugier, P. A review of rituximab, the first anti-CD20 monoclonal antibody used in the treatment of B non-Hodgkin's lymphomas. *Future Oncol.* **11**, 1327–42 (2015).
34. Coiffier, B. Rituximab and CHOP-like chemotherapy in good-prognosis diffuse large-B-cell lymphoma. *Nat. Clin. Pract. Oncol.* **3**, 594–595 (2006).
35. Smith, S.M. New drugs for the treatment of non-Hodgkin lymphomas. *Chin Clin Oncol* **4**, (2015).
36. Gotwals, P., Cameron, S., Cipolletta, D., et al. Prospects for combining targeted and conventional cancer therapy with immunotherapy. *Nat. Rev. Cancer* (2017). doi:10.1038/nrc.2017.17
37. Young, R. M. & Staudt, L. M. Targeting pathological B cell receptor signalling in lymphoid malignancies. *Nat Rev Drug Discov* **12**, 229–243 (2013).
38. Grover, N. S. & Park, S. I. Novel targeted agents in hodgkin and non-hodgkin lymphoma therapy. *Pharmaceuticals* **8**, 607–636 (2015).
39. Goy, A., Bernstein, S. H., Kahl, B. S., et al. Bortezomib in patients with relapsed or refractory mantle cell lymphoma: Updated time-to-event analyses of the multicenter phase 2 PINNACLE study. *Ann. Oncol.* **20**, 520–525 (2009).
40. Mato, A. R., Feldman, T., Goy, A. Proteasome Inhibition and Combination Therapy for Non-Hodgkin's Lymphoma: From Bench to Bedside. *Oncologist* **17**, 694–707 (2012).

41. Bose, P., Batalo, M. S, Holkova, B., et al. Bortezomib for the treatment of non-Hodgkin's lymphoma. *Expert Opin Pharmacother* **15**, 2443–2459 (2014).
42. Arkwright, R., Pham, T. M., Zonder, J. A., et al. The Preclinical Discovery and Development of Bortezomib for the Treatment of Mantle Cell Lymphoma. *Expert Opin. Drug Discov.* **12**, (2016).
43. Steiner, R. E. & Manasanch, E. E. Carfilzomib boosted combination therapy for relapsed multiple myeloma. *Onco Targets Ther.* **10**, 895–907 (2017).
44. Mitchell, B.S. Proteasome as an emerging therapeutic target in cancer. *N. Engl. J. Med.* **348**, 2597–2598 (2003).
45. Paoluzzi, L., Kitagawa, Y., Kalac, M., et al. A. New Drugs for the Treatment of Lymphoma. *Hematol. Oncol. Clin. North Am.* **22**, 1007–1035 (2008).
46. Rajkumar, S. V., Richardson, P. G., Hideshima, T., et al. Proteasome inhibition as a novel therapeutic target in human cancer. *J. Clin. Oncol.* **23**, 630–639 (2005).
47. Witzig, T. E., Nowakowski, G. S., Habermann, T. M., et al. A comprehensive review of lenalidomide therapy for B-cell non-Hodgkin lymphoma. *Annals of Oncology* **26**, (2015).
48. Lacy, M.Q. & McCurdy, A.R. Pomalidomide. *Blood* **122**, 2305–2310 (2013).
49. Santini, V., Melnick, A., Maciejewski, J. P., et al. Epigenetics in focus: Pathogenesis of myelodysplastic syndromes and the role of hypomethylating agents. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* **88**, 231–245 (2013).
50. Mummaneni, P. & Shord, S. S. Epigenetics and oncology. *Pharmacotherapy* **34**, 495–505 (2014).
51. Gangat, N., Patnaik, M. M., Tefferi, A. Myelodysplastic syndromes: Contemporary review and how we treat. *Am. J. Hematol.* **91**, 76–89 (2016).
52. Benedetti, R., Conte, M., Altucci, L. Targeting Histone Deacetylases in Diseases: Where Are We? *Antioxid. Redox Signal.* **23**, 99–126 (2015).
53. Ceccacci, E. & Minucci, S. Inhibition of histone deacetylases in cancer therapy: lessons from leukaemia. *Br. J. Cancer* **114**, 605–611 (2016).
54. Mottamal, M., Zheng, S., Huang, T. L., et al. Histone Deacetylase Inhibitors in Clinical Studies as Templates for New Anticancer Agents. *Molecules* **20**, 3898–3941 (2016).
55. Geutjes, E. J., Bajpe, P. K., Bernards, R. Targeting the epigenome for treatment of cancer. *Oncogene* **31**, 3827–44 (2012).
56. Besbes, S., Mirshahi, M., Pocard, M., et al. New dimension in therapeutic targeting of BCL-2 family proteins. *Oncotarget* **6**, 12862–71 (2015).
57. Del Poeta, G., Postorino, M., Pupo, L., et al. Venetoclax: Bcl-2 inhibition for the treatment of chronic lymphocytic leukemia. *Drugs Today (Barc)*. **52**, 249–60 (2016).
58. Baig, S., Seevasant, I., Mohamad, J., et al. Potential of apoptotic pathway-targeted cancer therapeutic research: Where do we stand? *Cell Death Dis.* **7**, e2058 (2016).
59. Hassan, M., Watari, H., Abualmaaty, A., et al. Apoptosis and molecular targeting therapy in cancer. *Biomed Res. Int.* **2014**, (2014).
60. Anderson, M. A., Huang, D., Roberts, A. Targeting BCL2 for the Treatment of Lymphoid Malignancies. *Semin. Hematol.* **51**, 219–227 (2014).
61. Abbas, A. K., Lichtman, A. H., Pillai, S. En: *Cellular and Molecular Immunology* 383–397 (Elsevier,

- 2015).
62. Burnet, F. M. The concept of immunological surveillance. *Prog. Exp. Tumor Res.* **13**, 1–27 (1970).
 63. Burnet, F. M. Immunological surveillance in neoplasia. *Transplant. Rev.* **7**, 3–25 (1971).
 64. Burnet, M. Cancer: a biological approach. III. Viruses associated with neoplastic conditions. IV. Practical applications. *Br. Med. J.* **1**, 841–7 (1957).
 65. Houghton, A. N. En: *General Principles of Tumor Immunotherapy* (2007).
 66. Dunn, G. P., Bruce, A. T., Ikeda, H., et al. Cancer immunoediting: from immunosurveillance to tumor escape. *Nat Immunol* **3**, 991–998 (2002).
 67. Corthay, A. Does the immune system naturally protect against cancer? *Front. Immunol.* **5**, 1–8 (2014).
 68. Ribatti, D. The concept of immune surveillance against tumors. The first theories. *Oncotarget* **5**, (2015).
 69. Mittal, D., Gubin, M. M., Schreiber, R. D., et al. New insights into cancer immunoediting and its three component phases-elimination, equilibrium and escape. *Curr. Opin. Immunol.* **27**, 16–25 (2014).
 70. Dunn, G. P., Old, L. J., Schreiber, R. D. The Three Es of Cancer Immunoediting. *Annu. Rev. Immunol.* **22**, 329–360 (2004).
 71. Schreiber, R. D., Old, L. J., Smyth, M. J. Cancer Immunoediting: Integrating Immunity's Roles in Cancer Suppression and Promotion. *Science.* **331**, 1565–1570 (2011).
 72. Zitvogel, L., Tesniere, A., Kroemer, G. Cancer despite immunosurveillance: immunoselection and immunosubversion. *Nat. Rev. Immunol.* **6**, 715–727 (2006).
 73. Bhatia, A. & Kumar, Y. Cancer-immune equilibrium: Questions unanswered. *Cancer Microenviron.* **4**, 209–217 (2011).
 74. MacKie, R. M., Reid, R., Junor, B. Fatal Melanoma Transferred in a Donated Kidney 16 Years after Melanoma Surgery. *N. Engl. J. Med.* **348**, 567–568 (2003).
 75. Romero, P. & Coulie, P. G. En *Tumor Immunology and Immunotherapy* (2014).
 76. Kaufman H. L. & Wolchok J. D. *General Principles of Tumor Immunotherapy. Journal of Chemical Information and Modeling* **53**, (Springer, 2007).
 77. Murphy, K. & Weaver, C. *Janeway's Immunology.* (2016).
 78. Sun, J. C & Lanier, L. L. Natural killer cells remember: An evolutionary bridge between innate and adaptive immunity? *Eur. J. Immunol.* **39**, 2059 (2009).
 79. Zamarron, B.F. & Chen, W. J. Dual Roles of Immune Cells and Their Factors in Cancer Development and Progression. *Int. J. Biol. Sci.* **7**, 651–658 (2011).
 80. Vivier, E., Raulet, D., Moretta, A., et al. Innate or adaptive immunity? The example of natural killer cells. *Science (80-.)*. **331**, 44–49 (2011).
 81. Guillerey, C., Huntington, N. D., Smyth, M. J. Targeting natural killer cells in cancer immunotherapy. *Nat. Immunol.* **17**, 1025–1036 (2016).
 82. Spies, T. Regulation of NKG2D ligands : a purposeful but delicate affair. *Nat Immunol* **9**, 1013–1015 (2008).

83. Farag, S. S., Fehniger, T. A., Ruggeri, L., et al. Review article Natural killer cell receptors : new biology and insights into the graft-versus-leukemia effect. *Blood* **100**, 1935–1948 (2002).
84. Woo, S. R., Corrales, L., Gajewski, T. F. Innate Immune Recognition of Cancer. *Annu. Rev. Immunol.* **33**, (2015).
85. Pahl, J. & Cerwenka, A. Tricking the balance: NK cells in anti-cancer immunity. *Immunobiology* **222**, 11–20 (2017).
86. Morvan, M. G. & Lanier, L. L. NK cells and cancer: you can teach innate cells new tricks. *Nat Rev Cancer* **16**, 7–19 (2016).
87. Kannan, G. S., Aquino-Lopez, A., Lee, D. A. Natural Killer Cells in Malignant Hematology: A Primer for the Non-Immunologist. *Blood Rev.* (2016). doi:10.1016/j.blre.2016.08.007
88. Eyileten, C., Majchrzak, K., Pilch, Z., et al. Immune Cells in Cancer Therapy and Drug Delivery. *Mediators Inflamm.* **2016**, 1–13 (2016).
89. Fehniger, T. A. & Cooper, M. A. Harnessing NK Cell Memory for Cancer Immunotherapy. *Trends Immunol.* **37**, 877–888 (2016).
90. Treffers, L. W., Hiemstra, I. H., Kuijpers, T. W., et al. Neutrophils in cancer. *Immunol. Rev.* **273**, 312–328 (2016).
91. Uribe-Querol, E. & Rosales, C. Neutrophils in cancer: Two sides of the same coin. *J. Immunol. Res.* **2015**, 1–21 (2015).
92. Swierczak, A., Mouchemore, K. A., Hamilton, J. A., et al. Neutrophils: important contributors to tumor progression and metastasis. *Cancer Metastasis Rev.* **34**, 735–51 (2015).
93. Finisguerra, V., Di Conza, G., Di Matteo, M., et al. MET is required for the recruitment of anti-tumoural neutrophils. *Nature* **522**, 349–53 (2015).
94. Smyth, M. J., Ngiow, S. F., Ribas, A., et al. Combination cancer immunotherapies tailored to the tumour microenvironment. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* **13**, 143–58 (2015).
95. Lichtenstein, A., Seelig, M., Berek, J., et al. Human Neutrophil-Mediated Lysis of Ovarian Cancer Cells By. *Blood* **74**, 805–809 (1989).
96. Zivkovic, M., Poljak-Blazi, M., Zarkovic, K., et al. Oxidative burst of neutrophils against melanoma B16-F10. *Cancer Lett.* **246**, 100–108 (2007).
97. Chen, Y. L., Chen, S. H., Wang, J. Y., et al. Fas ligand on tumor cells mediates inactivation of neutrophils. *J. Immunol.* **171**, 1183–1191 (2003).
98. Piccard, H., Muschel, R. J., Opendakker, G. On the dual roles and polarized phenotypes of neutrophils in tumor development and progression. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* **82**, 296–309 (2012).
99. Hubert, P., Heitzmann, A., Viel, S., et al. Antibody-dependent cell cytotoxicity synapses form in mice during tumor-specific antibody immunotherapy. *Cancer Res.* **71**, 5134–5143 (2011).
100. Fridlender, Z. G. & Albelda, S. M. Tumor-associated neutrophils: friend or foe? *Carcinogenesis* **33**, 949–55 (2012).
101. Scapini, P., Lapinet-Vera, J. A., Gasperini, S., et al. The neutrophil as a cellular source of chemokines. *Immunol. Rev.* **177**, 195–203 (2000).
102. Beauvillain, C., Delneste, I., Scotet, M., et al. Neutrophils efficiently cross-prime naive T cells *in vivo* Neutrophils efficiently cross-prime naive T cells *in vivo*. *Blood* **110**, 2965–2973 (2007).

103. Van Gisbergen, K. P. J. M., Geijtenbeek, T. B. H., Van Kooyk, Y. Close encounters of neutrophils and DCs. *Trends Immunol.* **26**, 626–631 (2005).
104. Cavallo, F., Giovarelli, M., Gulino, A. et al. Role of neutrophils and CD4+ T lymphocytes in the primary and memory response to nonimmunogenic murine mammary adenocarcinoma made immunogenic by IL-2 gene. *J. Immunol.* **149**, 3627–35 (1992).
105. Medina-Echeverz, J., Fioravanti, J., Zabala, M., et al. Successful colon cancer eradication after chemoimmunotherapy is associated with profound phenotypic change of intratumoral myeloid cells. *J. Immunol.* **186**, 807–815 (2011).
106. Fridlender, Z. G, Sun, J., Mishalian, I., et al. Transcriptomic analysis comparing tumor-associated neutrophils with granulocytic myeloid-derived suppressor cells and normal neutrophils. *PLoS One* **7**, e31524 (2012).
107. Kousis, P. C., Henderson, B. W., Maier, P. G., et al. Photodynamic Therapy Enhancement of Antitumor Immunity Is Regulated by Neutrophils. *Cancer Res.* **67**, 10501–10510 (2007).
108. Suttman, H. Neutrophil Granulocytes Are Required for Effective Bacillus Calmette-Guerin Immunotherapy of Bladder Cancer and Orchestrate Local Immune Responses. *Cancer Res.* **66**, 8250–8257 (2006).
109. Gordon, S. & Martinez, F. O. Alternative activation of macrophages: Mechanism and functions. *Immunity* **32**, 593–604 (2010).
110. Davies, L. C., Jenkins, S. J., Allen, J. E., et al. Tissue-resident macrophages. *Nat Immunol* **14**, 986–995 (2013).
111. Murray, P. J. & Wynn, T. A. Protective and pathogenic functions of macrophage subsets. *Nat. Rev. Immunol.* **11**, 723–737 (2012).
112. Hu, W., Li, X., Zhang, C., et al. Tumor-associated macrophages in cancers. *Clin. Transl. Oncol.* **18**, 251–258 (2015).
113. Chanmee, T., Ontong, P., Konno, K., et al. Tumor-associated macrophages as major players in the tumor microenvironment. *Cancers (Basel)*. **6**, 1670–1690 (2014).
114. Sica, A. & Mantovani, A. Macrophage plasticity and polarization: *in vivo* veritas. *J. Clin. Invest.* **122**, 787–795 (2012).
115. Zhao, H., Zhang, X., Chen, X., et al. Isoliquiritigenin, a flavonoid from licorice, blocks M2 macrophage polarization in colitis-associated tumorigenesis through downregulating PGE2 and IL-6. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **279**, 311–321 (2014).
116. Derlindati, E., Cas, A. D., Montanini, B., et al. Transcriptomic analysis of human polarized macrophages: More than one role of alternative activation? *PLoS One* **10**, 1–17 (2015).
117. Galdiero, M., Bonavita, E., Barajon, I., et al. Tumor associated macrophages and neutrophils in cancer. *Immunobiology* **218**, 1402–1410 (2013).
118. Fagone, P., Di Rosa, M., Palumbo, M., et al. Modulation of heat shock proteins during macrophage differentiation. *Inflamm. Res.* **61**, 1131–9 (2012).
119. Perdiguero, E. G. & Geissmann, F. Myb-independent macrophages: A family of cells that develops with their tissue of residence and is involved in its homeostasis. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* **78**, 91–100 (2013).
120. Wan, S., Zhao, E., Kryczek, I., et al. Tumor-Associated Macrophages Produce Interleukin 6 and Signal via STAT3 to Promote Expansion of Human Hepatocellular Carcinoma Stem Cells Shanshan. *Gastroenterology* **147**, 1393–1404 (2014).

121. Kang, F., Wang, L., Jia, H., et al. B7-H3 promotes aggression and invasion of hepatocellular carcinoma by targeting epithelial-to-mesenchymal transition via JAK2/STAT3/Slug signaling pathway. *Cancer Cell Int.* **15**, (2015).
122. Olmeda, D., Jordá, M., Peinado, H., et al. Snail silencing effectively suppresses tumour growth and invasiveness. *Oncogene* **26**, 1862–1874 (2007).
123. Amizadeh, M., Shamsadini, A., Arabzadeh, A., et al. Association of cagA Positive Helicobacter pylori Infection and Laryngeal Squamous Cell Carcinoma: A PCR Approach. *Indian J. Otolaryngol. Head Neck Surg.* **67**, 51–5 (2014).
124. Quiding-Järbrink, M., Raghavan, S., Sundquist, M. Enhanced M1 macrophage polarization in human helicobacter pylori-associated atrophic gastritis and in vaccinated mice. *PLoS One* **5**, (2010).
125. Hu, C., Guo, L., Feng, N., et al. MIF, secreted by human hepatic sinusoidal endothelial cells, promotes chemotaxis and outgrowth of colorectal cancer in liver prometastasis. *Oncotarget* **6**, 22410–23 (2015).
126. Mantovani, A., Schioppa, T., Porta, C., et al. Role of tumor-associated macrophages in tumor progression and invasion. *Cancer Metastasis Rev.* **25**, 315–322 (2006).
127. Palucka, K. & Banchereau, J. Cancer immunotherapy via dendritic cells. *Nat Rev Cancer* **12**, (2012).
128. Sabado, R. L., Balan, S., Bhardwaj, N. Dendritic cell-based immunotherapy. *Nat. Publ. Gr.* 1–22 (2016). doi:10.1038/cr.2016.157
129. Veglia, F. & Gabrilovich, D. I. Dendritic cells in cancer : the role revisited. *Curr. Opin. Immunol.* **45**, 43–51 (2017).
130. Galati, D., Corazzelli, G., De Filippi, R., et al. Dendritic cells in hematological malignancies. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* **108**, 86–96 (2016).
131. Abbas, A.K., Lichtman, A. H., Pillai, S. En: *Cellular and Molecular Immunology* (2015).
132. Seyfizadeh, N., Muthuswamy, R., Mitchell, D. A., et al. Migration of dendritic cells to the lymph nodes and its enhancement to drive anti-tumor responses. *Crit. Rev. Oncol. / Hematol.* **107**, 100–110 (2016).
133. Münz, C., Dao, T., Ferlazzo, G., et al. Mature myeloid dendritic cell subsets have distinct roles for activation and viability of circulating human natural killer cells. *Blood* **105**, 266–273 (2005).
134. Fujii, S., Shimizu, K., Kronenberg, M., et al. Prolonged IFN- γ -producing NKT response induced with α -galactosylceramide-loaded DCs. *Nat. Immunol.* **3**, 867–874 (2002).
135. Levings, M. K., Gregor, S., Tresoldi, E., et al. Differentiation of Tr1 cells by immature dendritic cells requires IL-10 but not CD25 + CD4 + Treg cells. *Blood* **105**, 1162–1169 (2005).
136. Jonuleit, H., Schmitt, E., Schuler, G., et al. Induction of interleukin 10-producing, nonproliferating CD4(+) T cells with regulatory properties by repetitive stimulation with allogeneic immature human dendritic cells. *J. Exp. Med.* **192**, 1213–22 (2000).
137. Cools, N., Ponsaerts, P., Tendeloo, V. F. I., et al. Balancing between immunity and tolerance: an interplay between dendritic cells, regulatory T cells, and effector T cells. *J Leukoc Biol.* **82**, 1365–74 (2007).
138. Tang, Q. & Bluestone, J. A. The Foxp3+ regulatory T cell: a jack of all trades, master of regulation. *Nat. Immunol.* **9**, 239–44 (2008).

139. Talmadge, J. E., Donkor, M., Scholar, E. Inflammatory cell infiltration of tumors: Jekyll or Hyde. *Cancer Metastasis Rev.* **26**, 373–400 (2007).
140. Ravichandran, K. S. Beginnings of a good apoptotic meal: the find-me and eat-me signaling pathways. *Immunity* **35**, 445–455 (2011).
141. Abbas, A. K., Lichtman, A. H., Pillai, S. En: *Cellular and Molecular Immunology* 231-238 (2015).
142. Lieberman, J. The ABCs of granule-mediated cytotoxicity: new weapons in the arsenal. *Nat. Rev. Immunol.* **3**, 361–370 (2003).
143. Andersen, M. H., Schrama, D., Thor Straten, P., et al. Cytotoxic T cells. *J Invest Dermatol* **126**, 32–41 (2006).
144. Reiser, J. & Banerjee, A. Effector, Memory, and Dysfunctional CD8+ T Cell Fates in the Antitumor Immune Response. *J. Immunol. Res.* **2016**, 1–14 (2016).
145. Annunziato, F. & Romagnani, S. Heterogeneity of human effector CD4+ T cells. *Arthritis Res Ther* **11**, 1–8 (2009).
146. Dobrzanski, M. J. Expanding roles for CD4 T cells and their subpopulations in tumor immunity and therapy. *Front. Oncol.* **3**, 1–19 (2013).
147. Zhu, J. & Paul, W. E. CD4 T cells : fates , functions , and faults. *Blood* **112**, 1557–1569 (2009).
148. Zhou, L., Chong, M. M. W., Littman, D. R. Plasticity of CD4+ T Cell Lineage Differentiation. *Immunity* **30**, 646–655 (2009).
149. Murphy, K. M. & Stockinger, B. Effector T cell plasticity: flexibility in the face of changing circumstances. *Nat. Immunol.* **11**, 674–680 (2010).
150. Tripathi, S. K. & Lahesmaa, R. Transcriptional and epigenetic regulation of T-helper lineage specification. *Immunol. Rev.* **261**, 62–83 (2014).
151. Zhu, J., Yamane, H., Paul, W. Differentiation of effector CD4 T cell populations. *Annu Rev Immunol.* **28**, 445–489 (2010).
152. Luckheeram, R. V., Zhou, R., Verma, A. D., et al. CD4 +T cells: Differentiation and functions. *Clin. Dev. Immunol.* **2012**, 1–12 (2012).
153. Williams, M., Tyznik, A. J., Bevan, M. J. Interleukin-2 signals during priming are required for secondary expansion of CD8+ memory T cells Matthew. *Nature* **441**, 890–893 (2006).
154. Fridman, W. H., Mlecnik, B., Bindea, G., et al. Immunosurveillance in human non-viral cancers. *Curr. Opin. Immunol.* **23**, 272–278 (2011).
155. Tan, T. T. & Coussens, L. M. Humoral immunity, inflammation and cancer. *Curr. Opin. Immunol.* **19**, 209–216 (2007).
156. Li, Z., Chen, L., Qin, Z. Paradoxical Roles of IL-4 in Tumor Immunity. *Cell. Mol. Immunol.* **6**, 415–422 (2009).
157. Korn, T., Bettelli, E., Oukka, M., et al. IL-17 and Th17 Cells. *Annu. Rev. Immunol.* **27**, 485–517 (2009).
158. Lin, W. & Karin, M. A cytokine-mediated link between innate immunity , inflammation , and cancer. *J. Clin. Investig.* **117**, 1175–1183 (2007).
159. Fabre, J., Giustiniani, J., Garbar, C., et al. Targeting the tumor microenvironment: The protumor effects of IL-17 related to cancer type. *Int. J. Mol. Sci.* **17**, (2016).

160. Murugaiyan, G. & Saha, B. Protumor vs antitumor functions of IL-17. *J. Immunol.* **183**, 4169–4175 (2009).
161. Chen, K. & Kolls, J. K. Interleukin-17A (IL17A). *Gene* (2017). doi:10.1016/j.gene.2017.01.016
162. Kawakami, Y., Tomimori, Y., Yumoto, K., et al. Inhibition of NK cell activity by IL-17 allows vaccinia virus to induce severe skin lesions in a mouse model of eczema vaccinatum. *J. Exp. Med.* **206**, 1219–25 (2009).
163. Wang, L., Yi, T., Kortylewski, M., et al. IL-17 can promote tumor growth through an IL-6-Stat3 signaling pathway. *J. Exp. Med.* **206**, 1457–64 (2009).
164. Wu, S., Rhee, K., Albesiano, E., et al. A human colonic commensal promotes colon tumorigenesis via activation of T helper type 17 T cell responses. *Nat. Med.* **15**, 1016–1022 (2009).
165. Kryczek, I., Banerjee, M., Cheng, P., et al. Phenotype, distribution, generation, and functional and clinical relevance of Th17 cells in the human tumor environments. *Blood* **114**, 1141–1150 (2009).
166. Moroz, A., Eppolito, C., Li, Q., et al. IL-21 Enhances and Sustains CD8+ T Cell Responses to Achieve Durable Tumor Immunity: Comparative Evaluation of IL-2, IL-15, and IL-21. *J. Immunol.* **173**, 900–909 (2004).
167. Zeng, R., Spolski, R., Finkelstein, S. E., et al. Synergy of IL-21 and IL-15 in regulating CD8+ T cell expansion and function. *J. Exp. Med.* **201**, 139–148 (2005).
168. Frederiksen, K. S., Lundsgaard, D., Freeman, J. A., et al. IL-21 induces *in vivo* immune activation of NK cells and CD8+ T cells in patients with metastatic melanoma and renal cell carcinoma. *Cancer Immunol. Immunother.* **57**, 1439–1449 (2008).
169. Chen, X., Du, Y., Lin, X., et al. CD4+CD25+ regulatory T cells in tumor immunity. *Int. Immunopharmacol.* **34**, 244–249 (2016).
170. Vicari, A. P. & Trinchieri, G. Interleukin-10 in viral diseases and cancer: Exiting the labyrinth? *Immunol. Rev.* **202**, 223–236 (2004).
171. O’Garra, A. & Murphy, K. M. From IL-10 to IL-12: how pathogens and their products stimulate APCs to induce T(H)1 development. *Nat. Immunol.* **10**, 929–32 (2009).
172. Curiel, T. J., Wei, S., Dong, H., et al. Blockade of B7-H1 improves myeloid dendritic cell-mediated antitumor immunity. *Nat Med* **8**, 562–567 (2003).
173. Kryczek, I., Zou, L., Rodriguez, P., et al. B7-H4 expression identifies a novel suppressive macrophage population in human ovarian carcinoma. *J. Exp. Med.* **203**, 871–881 (2006).
174. Zou, W. & Chen, L. Inhibitory B7-family molecules in the tumour microenvironment. *Nat. Rev. Immunol.* **8**, 467–77 (2008).
175. McKinstry, K. K., Strutt, T. M., Swain, S. L. The potential of CD4 T-cell memory. *Immunology* **130**, 1–9 (2010).
176. Taylor, J. J. & Jenkins, M. K. CD4+ memory T cell survival. *Curr. Opin. Immunol.* **23**, 319–323 (2011).
177. Strutt, T. M., McKinstry, K. K., Kuang, Y., et al. Memory CD4+ T-cell-mediated protection depends on secondary effectors that are distinct from and superior to primary effectors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **109**, E2551-60 (2012).
178. Golubovskaya, V. & Wu, L. Different subsets of T cells, memory, effector functions, and CAR-T immunotherapy. *Cancers (Basel)*. **8**, (2016).

179. Abbas, A. K., Lichtman, A. H., Pillai, S. En: *Cellular and Molecular Immunology* 239-261 (2015).
180. Shen, M., Sun, Q., Wang, J., et al. Positive and negative functions of B lymphocytes in tumors. *Oncotarget* **7**, 55828–55839 (2016).
181. Tsou, P., Katayama, H., Ostrin, E. J., et al. The emerging role of b cells in tumor immunity. *Cancer Res.* **76**, (2016).
182. Wang, J. Z., Zhang, Y. H., Guo, X. H., et al. The double-edge role of B cells in mediating antitumor T-cell immunity: Pharmacological strategies for cancer immunotherapy. *Int. Immunopharmacol.* **36**, 73–85 (2016).
183. Guy, T. V., Terry, A. M., Bolton, H. A., et al. Pro- and anti-tumour effects of B cells and antibodies in cancer: a comparison of clinical studies and preclinical models. *Cancer Immunol. Immunother.* (2016). doi:10.1007/s00262-016-1848-z
184. Bendelac, A., Rivera, M. N., Park, S. H., et al. Mouse CD1-specific NK1 T cells: development, specificity, and function. *Annu. Rev. Immunol.* **15**, 535–62 (1997).
185. Ambrosino, E., Terabe, M., Halder, R. C., et al. Cross-regulation between type I and type II NKT cells in regulating tumor immunity: a new immunoregulatory axis. *J. Immunol.* **179**, 5126–5136 (2007).
186. Berzofsky, J. A. & Terabe, M. A novel immunoregulatory axis of NKT cell subsets regulating tumor immunity. *Cancer Immunol. Immunother.* **57**, 1679–1683 (2008).
187. Robertson, F. C., Berzofsky, J. A., Terabe, M. NKT cell networks in the regulation of tumor immunity. *Front. Immunol.* **5**, 1–12 (2014).
188. Dhodapkar, M. V. En: *General Principles of Tumor Immunotherapy* (2007).
189. McEwen-Smith, R. M., Salio, M., Cerundolo, V. The regulatory role of invariant NKT cells in tumor immunity. *Cancer Immunol. Res.* **3**, 425–35 (2015).
190. Altman, J. B., Benavides, A. D., Das, R., et al. Antitumor Responses of Invariant Natural Killer T Cells. *J. Immunol. Res.* **2015**, (2015).
191. Kim, R., Emi, M., Tanabe, K. Cancer immunoediting from immune surveillance to immune escape. *Immunology* **121**, 1–14 (2007).
192. Tahir, S. M., Cheng, O., Shaulov, A., et al. Loss of IFN- γ Production by Invariant NK T Cells in Advanced Cancer. *J. Immunol.* **167**, 4046–4050 (2001).
193. Dhodapkar, M., Geller, M. D., Chang, D. H., et al. A reversible defect in natural killer T cell function characterizes the progression of premalignant to malignant multiple myeloma. *J. Exp. Med.* **197**, 1667–76 (2003).
194. Moodycliffe, M., Nghiem, D., Clydesdale, G., et al. Immune suppression and skin cancer development: regulation by NKT cells. *Nat. Immunol.* **1**, 521–5 (2000).
195. Terabe, M., Matsui, S., Noben-Trauth, N., et al. NKT cell-mediated repression of tumor immunosurveillance by IL-13 and the IL-4R-STAT6 pathway. *Nat. Immunol.* **1**, 515–520 (2000).
196. Godfrey, D. I. & Kronenberg, M. Going both ways: Immune regulation via CD1d-dependent NKT cells. *J. Clin. Invest.* **114**, 1379–1388 (2004).
197. Wu, L., Gabriel, C. L., Parekh, V. V., et al. Invariant natural killer T cells: Innate-like T cells with potent immunomodulatory activities. *Tissue Antigens* **73**, 535–545 (2009).
198. Brennan, P. J., Brigl, M., Brenner, M. B. Invariant natural killer T cells: an innate activation

- scheme linked to diverse effector functions. *Nat. Rev. Immunol.* **13**, 101–17 (2013).
199. Van Kaer, L. Regulation of immune responses by CD1d-restricted natural killer T cells. *Immunol Res* **30**, 139–153 (2004).
 200. Van Der Vliet, H. J. J., Molling, J. W., von Blomberg, V. M. E., et al. The immunoregulatory role of CD1d-restricted natural killer T cells in disease. *Clin. Immunol.* **112**, 8–23 (2004).
 201. Kondo, M., Sakuta, K., Noguchi, A., et al. Zoledronate facilitates large-scale ex vivo expansion of functional gammadelta T cells from cancer patients for use in adoptive immunotherapy. *Cytotherapy* **10**, 842–856 (2008).
 202. Tokuyama, H., Hagi, T., Mattarollo, S. R., et al. V γ 9V δ 2 T cell cytotoxicity against tumor cells is enhanced by monoclonal antibody drugs - Rituximab and trastuzumab. *Int. J. Cancer* **122**, 2526–2534 (2008).
 203. Fisher, J. P., Heuwerkerk, J., Yan, M., et al. $\gamma\delta$ T cells for cancer immunotherapy: A systematic review of clinical trials. *Oncoimmunology* **3**, e27572 (2014).
 204. Rey, J., Veuillen, C., Vey, N., et al. Natural killer and $\gamma\delta$ T cells in haematological malignancies: enhancing the immune effectors. *Trends Mol. Med.* **15**, 275–284 (2009).
 205. Rei, M., Pennington, D. J., Silva-Santos, B. The emerging protumor role of $\gamma\delta$ T lymphocytes: Implications for cancer immunotherapy. *Cancer Res.* **75**, 798–802 (2015).
 206. Liu, Y. & Cao, X. Immunosuppressive cells in tumor immune escape and metastasis. *J. Mol. Med.* **94**, 509–522 (2015).
 207. Oleinika, K., Nibbs, R. J., Graham, G. J., et al. Suppression, subversion and escape: The role of regulatory T cells in cancer progression. *Clin. Exp. Immunol.* **171**, 36–45 (2013).
 208. Upadhyay, R., Hammerich, L., Peng, P., et al. Lymphoma: Immune evasion strategies. *Cancers (Basel)*. **7**, 736–762 (2015).
 209. Nicholas, N. S., Apollonio, B., Ramsay, A. G. Tumor microenvironment (TME)-driven immune suppression in B cell malignancy. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res.* **1863**, 471–482 (2016).
 210. Vinay, D. S., Ryan, E. P., Pawelec, G., et al. Immune evasion in cancer: Mechanistic basis and therapeutic strategies. *Semin. Cancer Biol.* **35**, S185–S198 (2015).
 211. Topalian, S., Drake, C., Pardoll, D. Targeting the PD-1/B7-H1 (PD-L1) pathway to activate anti-tumor immunity. *Curr. Opin. Immunol.* **24**, 207–212 (2012).
 212. French, L. E. & Tschopp, J. Defective death receptor signaling as a cause of tumor immune escape. *Semin Cancer Biol* **12**, 51–55 (2002).
 213. Slavin-Chiorini, D. C., Kudo-Saito, M., Hodge, C., et al. Amplification of the lytic potential of effector/memory CD8+ cells by vector-based enhancement of ICAM-1 (CD54) in target cells: implications for intratumoral vaccine therapy. *Cancer Gene Ther.* **11**, 665–680 (2004).
 214. Chouaib, S., Meslin, F., Thiery, J., et al. Tumor resistance to specific lysis: A major hurdle for successful immunotherapy of cancer. *Clin. Immunol.* **130**, 34–40 (2009).
 215. Chaperot, L., Plumas, J., Jacob, M. C., et al. Functional expression of CD80 and CD86 allows immunogenicity of malignant B cells from non-Hodgkin's lymphomas. *Exp. Hematol.* **27**, 479–488 (1999).
 216. Schultze, J., Cardoso, A. A., Freeman, G. J., et al. Follicular lymphomas can be induced to present alloantigen efficiently: a conceptual model to improve their tumor immunogenicity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **92**, 8200–4 (1995).

217. Stopeck, A. T., Gessner, A., Miller, T. P., et al. Loss of B7.2 (CD86) and intracellular adhesion molecule 1 (CD54) expression is associated with decreased tumor-infiltrating T lymphocytes in diffuse B-cell large-cell lymphoma. *Clin. Cancer Res.* **6**, 3904–3909 (2000).
218. Pizzoferrato, E. B7-2 expression above a threshold elicits anti-tumor immunity as effective as interleukin-12 and prolongs survival in murine B-cell lymphoma. *Int. J. Cancer* **110**, 61–9 (2004).
219. Levitsky, H. I., Montgomery, J., Ahmadzadeh, M., et al. Immunization with granulocyte-macrophage colony-stimulating factor-transduced, but not B7-1-transduced, lymphoma cells primes idiotype-specific T cells and generates potent systemic antitumor immunity. *Sci. Technol.* **156**, 3858–3865 (2011).
220. Pizzoferrato, E. V. A., Chu, N. R., Hawley, T. S., et al. Enhanced Immunogenicity of B Cell Lymphoma Genetically Engineered to express both B7-1 and IL-12. *Hum. Gene Ther.* **2228**, 2217–2228 (1997).
221. Lippitz, B. E. Cytokine patterns in patients with cancer: A systematic review. *Lancet Oncol.* **14**, 218–28 (2013).
222. Burkholder, B., Huang, R., Burgess, R., et al. Tumor-induced perturbations of cytokines and immune cell networks. *Biochim. Biophys. Acta - Rev. Cancer* **1845**, 182–201 (2014).
223. Lippitz, B. E. & Harris, R. A. Cytokine patterns in cancer patients: A review of the correlation between interleukin 6 and prognosis. *Oncoimmunology* **5**, e1093722 (2016).
224. Muller, A. J. & Prendergast, G. C. Marrying immunotherapy with chemotherapy: Why say IDO? *Cancer Res.* **65**, 8065–8068 (2005).
225. Mills, C., Shearer, J., Evans, R., et al. Macrophage arginine metabolism and the inhibition or stimulation of cancer . Information about subscribing to The Journal of Immunology is online at : MACROPHAGE ARGININE METABOLISM AND THE INHIBITION OR STIMULATION OF CANCER '. *Journal Immunol.* **149**, 2709–2714 (2016).
226. Boutard, V., Havouis, R., Fouqueray, B., et al. Transforming growth factor-beta stimulates arginase activity in macrophages. Implications for the regulation of macrophage cytotoxicity. *J. Immunol.* **155**, 2077–84 (1995).
227. Xia, Y., Yeddula, N., Leblanc, M., et al. Reduced cell proliferation by IKK2 depletion in a mouse lung-cancer model. *Nat. Cell Biol.* **14**, 257–65 (2012).
228. Wu, A. A., Drake, V., Huang, H. S., et al. Reprogramming the tumor microenvironment: tumor-induced immunosuppressive factors paralyze T cells. *Oncoimmunology* **4**, e1016700 (2015).
229. Camby, I., Le Mercier, M., Lefranc, F., et al. Galectin-1: A small protein with major functions. *Glycobiology* **16**, (2006).
230. Cousin, J. & Cloninger, M. The Role of Galectin-1 in Cancer Progression, and Synthetic Multivalent Systems for the Study of Galectin-1. *Int. J. Mol. Sci.* **17**, 1566 (2016).
231. Lthijssen, V. & Griffioen, A. W. Galectin-1 and -9 in angiogenesis: A sweet couple. *Glycobiology* **24**, 915–920 (2014).
232. Astorgues-Xerri, L., Riveiro, M. E., Tijeras-Raballand, A., et al. Unraveling galectin-1 as a novel therapeutic target for cancer. *Cancer Treat. Rev.* **40**, 307–319 (2014).
233. Thijssen, V. L., Heusschen, R., Caers, J., et al. Galectin expression in cancer diagnosis and prognosis: A systematic review. *Biochim. Biophys. Acta* **1855**, 235–247 (2015).
234. Giordano, M., Croci, D. O., Rabinovich, G. Galectins in hematological malignancies. *Curr. Opin. Hematol.* **20**, 327–35 (2013).

235. Lykken, J. M., Horikawa, M., Minard-Colin, V., et al. Galectin-1 drives lymphoma CD20 immunotherapy resistance: validation of a preclinical system to identify resistance mechanisms. *Blood* **127**, 1886–1895 (2016).
236. Guo, F., Wang, Y, Liu, J., et al. CXCL12/CXCR4: a symbiotic bridge linking cancer cells and their stromal neighbors in oncogenic communication networks. *Oncogene* **35**, 816–26 (2016).
237. Gajewski, T. F., Schreiber, H., Fu, Y. Innate and adaptive immune cells in the tumor microenvironment. *Nat Immunol.* **14**, 1014–1022 (2013).
238. Kitamura, T., Qian, B., Pollard, J. W. Immune cell promotion of metastasis. *Nat Rev Immunol* **15**, 137–143 (2015).
239. McAllister, S. S. & Weinberg, R. The tumour-induced systemic environment as a critical regulator of cancer progression and metastasis. *Nat. Cell Biol.* **16**, 717–27 (2014).
240. Quail, D. & Joyce, J. Microenvironmental regulation of tumor progression and metastasis. *Nat. Med.* **19**, 1423–1437 (2013).
241. Vesely, M. D., Kershaw, M. H., Schreiber, R. D., et al. Natural innate and adaptive immunity to cancer. *Annu. Rev. Immunol.* **29**, 235–71 (2011).
242. Speiser, D. E., Ho, P. C., Verdeil, G. Regulatory circuits of T cell function in cancer. *Nat. Rev. Immunol.* **16**, 599–611 (2016).
243. Kusmartsev, S. & Gabrilovich, D. I. Immature myeloid cells and cancer-associated immune suppression. *Cancer Immunol. Immunother.* **51**, 293–298 (2002).
244. Gabrilovich, D. I., Velders, M. P., Sotomayor, E. M., et al. Mechanism of immune dysfunction in cancer mediated by immature Gr-1+ myeloid cells. *J. Immunol.* **166**, 5398–5406 (2001).
245. Bronte, V., Wang, M., Overwijk, W. W., et al. Apoptotic Death of CD8+ T Lymphocytes After Immunization: Induction of a Suppressive Population of Mac-1+ /Gr-1+ Cells¹. *J. Immunol.* **161**, 5313–5320 (1998).
246. Danna, E. A., Sinha, P., Gilbert, M., et al. Surgical Removal of Primary Tumor Reverses Tumor-Induced Immunosuppression Despite the Presence of Metastatic Disease. *Cancer Res.* **66**, 2205–2211 (2004).
247. Ostuni, R., Kratochvill, F., Murray, P. J., et al. Macrophages and cancer: From mechanisms to therapeutic implications. *Trends Immunol.* **36**, 229–39 (2015).
248. Kim, J., Bae, J. S., Tam, M. Tumor-Associated Macrophages and Neutrophils in Tumor Microenvironment. *Mediators Inflamm.* **2016**, 1–11 (2016).
249. Alderton, G. K. Resistance: turning macrophages on, off and on again. *Nat. Rev. Cancer* **14**, 154–5 (2014).
250. Farinha, P., Masoudi, H., Skinnider, B. F., et al. Analysis of multiple biomarkers shows that lymphoma-associated macrophage (LAM) content is an independent predictor of survival in follicular lymphoma (FL)
251. Sakai, A. & Yoshida, N. The role of tumor-associated macrophages on serum soluble IL-2R levels in B-cell lymphomas. *J. Clin. Exp. Hematop.* **54**, 49–57 (2014).
252. Fridlender, Z. G. & Albelda, S. M. Tumor-associated neutrophils: friend or foe? *Carcinogenesis* **33**, 949–55 (2012).
253. Cools-Lartigue, J., Spicer, J., Najmeh, S., et al. Neutrophil extracellular traps in cancer progression. *Cell. Mol. Life Sci.* **71**, 4179–94 (2014).

254. Tazzyman, S., Lewis, C. E., Murdoch, C. Neutrophils: Key mediators of tumour angiogenesis. *Int. J. Exp. Pathol.* **90**, 222–231 (2009).
255. Jablonska, J., Leschner, S., Westphal, K., et al. Neutrophils responsive to endogenous IFN-beta regulate tumor angiogenesis and growth in a mouse tumor model. *J. Clin. Invest.* **120**, 1151–64 (2010).
256. von Boehmer, H. & Daniel, C. Therapeutic opportunities for manipulating T(Reg) cells in autoimmunity and cancer. *Nat. Rev. Drug Discov.* **12**, 51–63 (2013).
257. Gardner, A. & Ruffell, B. Dendritic Cells and Cancer Immunity. *Trends Immunol.* **37**, 855–865 (2016).
258. Sato, K. Helper T Cell Diversity and Plasticity. *Circ. J.* **78**, 2843–2844 (2014).
259. Zong, J., Keskinov, A. A., Shurin, G. V., et al. Tumor-derived factors modulating dendritic cell function. *Cancer Immunol. Immunother.* **65**, 821–33 (2016).
260. Conejo-Garcia, J. R., Rutkowski, M. R., Cubillos-Ruiz, J. R. State-of-the-art of regulatory dendritic cells in cancer. *Pharmacol. Ther.* **164**, 97–104 (2016).
261. Tang, M., Diao, J., Cattral, M. S. Molecular mechanisms involved in dendritic cell dysfunction in cancer. *Cell. Mol. Life Sci.* **74**, 761–776 (2016).
262. Lombardi, V. C., Khaiboullina, S. F., Rizvanov, A. A. Plasmacytoid dendritic cells, a role in neoplastic prevention and progression. *Eur. J. Clin. Invest.* **45**, 1–8 (2015).
263. Saadeh, D., Kurban, M., Abbas, O. Plasmacytoid dendritic cell role in cutaneous malignancies. *J. Dermatol. Sci.* **83**, 3–9 (2016).
264. Schwartz, M., Zhang, Y., Rosenblatt, J. D. B cell regulation of the anti-tumor response and role in carcinogenesis. *J. Immunother. Cancer* **4**, 1–15 (2016).
265. Ding, T., Yan, F., Cao, S., et al. Regulatory B cell: New member of immunosuppressive cell club. *Hum. Immunol.* **76**, 615–21 (2015).
266. Hamai, A., Benlalam, H., Meslin, F., et al. Immune surveillance of human cancer: If the cytotoxic T-lymphocytes play the music, does the tumoral system call the tune? *Tissue Antigens* **75**, 1–8 (2010).
267. Papaioannou, N. E., Beniata, O. V, Vitsos, P., et al. Harnessing the immune system to improve cancer therapy. *Ann. Transl. Med.* **4**, 261 (2016).
268. Bachireddy, P., Burkhardt, U. E., Rajasagi, M., et al. Haematological malignancies: at the forefront of immunotherapeutic innovation. *Nat. Rev. Cancer* **15**, 201–215 (2015).
269. Ruella, M. & Kalos, M. Adoptive immunotherapy for cancer. *Immunol. Rev.* **257**, 14–38 (2014).
270. Seledtsov, V. I., Goncharov, A. G., Seledtsova, G. V. Clinically feasible approaches to potentiating cancer cell-based immunotherapies. *Hum. Vaccines Immunother.* **11**, 851–869 (2015).
271. Cheson, B. D. & Leonard, J. P. Monoclonal Antibody Therapy for B-Cell Non-Hodgkin's Lymphoma. *N. Engl. J. Med.* **359**, 613–626 (2008).
272. McLaughlin, B. P., Grillo-López, A. J., Link, B. K., et al. Rituximab Chimeric Anti-CD20 Monoclonal Antibody Therapy for Relapsed Indolent Lymphoma : Half of Patients Respond to a Four-Dose Treatment Program. *J. Clin. Oncol.* **16**, 2825–2833 (1998).
273. Friedberg, J. W. Rituximab maintenance in follicular lymphoma: PRIMA. *Lancet* **377**, 4–6 (2011).

274. Nadler, L. E. E. M., Ritz, J., Hardy, R., et al. Unique Cell Surface Antigen Identifying Lymphoid Malignancies of B Cell Origin. *J.Clin. Invest.* **67**, 134–140 (1981).
275. Anderson, C., Pinkus, S., Nadler, L. M. Expression of Human B Cell-Associated Antigens on Leukemias and Lymphomas: A Model of Human B Cell Differentiation. *Blood* **63**, 1424–1433 (1984).
276. Boross, P. & Leusen, J. H. W. Mechanisms of action of CD20 antibodies. *Am J Res* **2**, 676–690 (2012).
277. Klein, C., Lammens, A., Schäfer, W., et al. Epitope interactions of monoclonal antibodies targeting CD20 and their relationship to functional properties. *MAbs* **5**, 22–33 (2013).
278. Goldenberg, D. M., Rossi, E. A., Stein, R., et al. Properties and structure-function relationships of veltuzumab (hA20), a humanized anti-CD20 monoclonal antibody. *Blood* **113**, 1062–1071 (2009).
279. Mössner, E., Brünker, P., Moser, S., et al. Increasing the efficacy of CD20 antibody therapy through the engineering of a new type II anti-CD20 antibody with enhanced direct and immune effector cell – mediated B-cell cytotoxicity. *Blood* **115**, 4393–4403 (2010).
280. Bologna, L., Gotti, E., Manganini, M., et al. Glycoengineered, Anti-CD20 Monoclonal Antibody GA101 in B-Chronic Lymphocytic Leukemia Whole Blood Assays in Comparison with Rituximab and Alemtuzumab. *J. Immunol.* **186**, 3762–3769 (2011).
281. Herter, S., Birk, M. C., Klein, C., et al. Glycoengineering of Therapeutic Antibodies Enhances Monocyte/Macrophage-Mediated Phagocytosis and Cytotoxicity. *J. Immunol.* **19**, 2252–2260 (2014).
282. Siddiqi, T. & Rosen, S. T. Novel biologic agents for non-hodgkin lymphoma and chronic lymphocytic leukemia—Part 1: Monoclonal Antibodies. *Oncology* **29**, 1–8 (2015).
283. Ogura, M., Tobinai, K., Hatake, K., et al. Phase I study of inotuzumab ozogamicin (CMC-544) in Japanese patients with follicular lymphoma pretreated with rituximab-based therapy. *Cancer Sci.* **101**, 1840–1845 (2010).
284. Fayad, L., Offner, F., Smith, M. R., et al. Safety and clinical activity of a combination therapy comprising two antibody-based targeting agents for the treatment of non-hodgkin lymphoma: Results of a phase I/II study evaluating the immunoconjugate inotuzumab ozogamicin with rituximab. *J. Clin. Oncol.* **31**, 573–583 (2013).
285. Younes, A., Kim, S., Romaguera, J., et al. Phase I multidose-escalation study of the anti-CD19 maytansinoid immunoconjugate SAR3419 administered by intravenous infusion every 3 weeks to patients with relapsed/refractory B-cell lymphoma. *J. Clin. Oncol.* **30**, 2776–2782 (2012).
286. Ribrag, V., Dupuis, J., Tilly, H., et al. A dose-escalation study of SAR3419, an anti-CD19 antibody maytansinoid conjugate, administered by intravenous infusion once weekly in patients with relapsed/refractory B-cell non-hodgkin lymphoma. *Clin. Cancer Res.* **20**, 213–220 (2014).
287. Byrd, J. C., Kipps, T. J., Flinn, I. W., et al. Phase I study of the anti-CD40 humanized monoclonal antibody lucatumumab (HCD122) in relapsed chronic lymphocytic leukemia. *Leuk Lymphoma* **53**, (2012).
288. Fanale, M., Assouline, S., Kuruvilla, J., et al. Phase IA/II, multicentre, open-label study of the CD40 antagonistic monoclonal antibody lucatumumab in adult patients with advanced non-Hodgkin or Hodgkin lymphoma. *Br J Haematol.* **164**, 258–265 (2014).
289. Luqman, M., Klabunde, S., Lin, K., et al. The antileukemia activity of a human anti-CD40 antagonist antibody, HCD122, on human chronic lymphocytic leukemia cells. *Blood* **112**, 711–720 (2008).

290. Forero-Torres, A., Bartlett, N., Beaven, A., et al. Pilot study of dacetuzumab in combination with rituximab and gemcitabine for relapsed or refractory diffuse large B-cell lymphoma. *Leuk. Lymphoma* **54**, 277–283 (2012).
291. Mone, A., Cheney, C., Banks, A. L., et al. Alemtuzumab induces caspase-independent cell death in human chronic lymphocytic leukemia cells through a lipid raft-dependent mechanism. *Leukemia* **20**, 272–279 (2006).
292. Demko, S., Summers, J., Keegan, P., et al. FDA Drug Approval Summary: Alemtuzumab as Single-Agent Treatment for B-Cell Chronic Lymphocytic Leukemia. *Oncologist* **13**, 167–174 (2008).
293. Enblad, G., Hagberg, H., Erlanson, M., et al. A pilot study of alemtuzumab (anti-CD52 monoclonal antibody) therapy for patients with relapsed or chemotherapy-refractory peripheral T-cell lymphomas. *Blood* **103**, 2920–2925 (2004).
294. Gallamini, A., Zaja, F., Patti, C., et al. Alemtuzumab (Campath-1H) and CHOP chemotherapy as first-line treatment of peripheral T-cell lymphoma: results of a GITIL (Gruppo Italiano Terapie Innovative nei Linfomi) prospective multicenter trial. *Blood* **110**, 2316–2323 (2007).
295. Lundin, J., Hagberg, H., Repp, R., et al. Phase 2 study of alemtuzumab (anti-CD52 monoclonal antibody) in patients with advanced mycosis fungoides/Sézary syndrome. *Blood* **101**, 4267–4272 (2003).
296. Binder, C., Ziepert, M., Pfreundschuh, M., et al. CHO(E)P-14 followed by alemtuzumab consolidation in untreated peripheral T-cell lymphomas: final analysis of a prospective phase II trial. *Ann. Hematol.* **92**, 1521–1528 (2013).
297. Greenberg, P. D., Reusser, P., Goodrich, J. M., et al. Development of a Treatment Regimen for Human Cytomegalovirus (CMV) Infection in Bone Marrow Transplantation Recipients by Adoptive Transfer of Donor-Derived CMV-Specific T Cell Clones Expanded *In Vitro*. *Ann. NEW YORK Acad. Sci.* **636**, 184–95 (1991).
298. Perna, S. K., Huye, L. E., Savoldo, B. Management of patients with non-Hodgkin's lymphoma: focus on adoptive T-cell therapy. *ImmunoTargets Ther.* **4**, 55–63 (2015).
299. Geyer, M. B. & Brentjens, R. J. Review: Current clinical applications of chimeric antigen receptor (CAR) modified T cells. *Cytotherapy* **18**, 1393–1409 (2016).
300. Bridgeman, J. S. & Gilham, D. E. En: *Tumor Immunology and Immunotherapy* (2014).
301. Maher, J. Clinical Immunotherapy of B-Cell Malignancy Using CD19-Targeted CAR T-Cells. *Curr. Gene Ther.* **14**, 35–43 (2014).
302. Tang, H., Qiao, J., Fu, Y. X. Immunotherapy and tumor microenvironment. *Cancer Lett.* **370**, 85–90 (2016).
303. Alatrash, G., Daver, N., Mittendorf, E. A. Targeting Immune Checkpoints in Hematologic Malignancies. *Pharmacol. Rev.* **68**, 1014–1025 (2016).
304. Bryan, L. J. & Gordon, L. I. Blocking tumor escape in hematologic malignancies: The anti-PD-1 strategy. *Blood Rev.* **29**, 25–32 (2015).
305. Swaika, A., Hammond, W. A., Joseph, R. W. Current state of anti-PD-L1 and anti-PD-1 agents in cancer therapy. *Mol. Immunol.* **67**, 4–17 (2015).
306. Felgner, S., Kocijancic, D., Frahm, M., et al. Bacteria in Cancer Therapy: Renaissance of an Old Concept. *Int. J. Microbiol.* **2016**, 1–14 (2016).
307. Walker, J. M. *Bacterial Therapy of Cancer.* **1409**, (2016).

308. Coley, W. B. The Treatment of Inoperable Sarcoma by Bacterial Toxins (the Mixed Toxins of the *Streptococcus erysipelas* and the *Bacillus prodigiosus*). *Proc. R. Soc. Med.* **3**, 1–48 (1910).
309. Coley W. B. & Hoguet, J. P. Melanotic cancer*. *Ann Surg* **64**, 206–241 (1916).
310. Coley, W. B. The treatment of malignant tumors by repeated inoculations of erysipelas. With a report of ten original cases. 1893. *Clin. Orthop. Relat. Res.* **263**, 3–11 (1991).
311. Brown, J. M. & Wilson, W. R. Identification of a novel small-molecule inhibitor of the hypoxia-inducible factor 1 pathway. *Cancer Res.* **65**, 605–612 (2005).
312. Maletzki, C., Linnebacher, M., Kreikemeyer, B., et al. Pancreatic cancer regression by intratumoural injection of live *Streptococcus pyogenes* in a syngeneic mouse model. *Gut* **57**, 483–491 (2008).
313. Agrawal, N., Bettgowda, C., Cheong, I., et al. Bacteriolytic therapy can generate a potent immune response against experimental tumors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **101**, 15172–7 (2004).
314. Zhu, H., Li, Z., Mao, S., et al. Antitumor effect of sFlt-1 gene therapy system mediated by *Bifidobacterium Infantis* on Lewis lung cancer in mice. *Cancer Gene Ther.* **18**, 884–896 (2011).
315. Jiang, S. N., Phan, T. X., Nam, T. K., et al. Inhibition of tumor growth and metastasis by a combination of *Escherichia coli*-mediated cytolytic therapy and radiotherapy. *Mol. Ther.* **18**, 635–642 (2010).
316. Min, J. J., Kim, H. J., Park, J. H., et al. Non-invasive real-time imaging of tumors and metastases using tumor-targeting light-emitting *Escherichia coli*. *Mol. Imaging Biol.* **10**, 54–61 (2008).
317. Kim, S. H., Castro, F., Paterson, Y., et al. High efficacy of a *Listeria*-based vaccine against metastatic breast cancer reveals a dual mode of action. *Cancer Res.* **69**, 5860–5866 (2009).
318. Chorobik, P., Czaplicki, D., Ossysek, K., et al. *Salmonella* and cancer: From pathogens to therapeutics. *Acta Biochim. Pol.* **60**, 285–297 (2013).
319. Moreno, M., Kramer, M. G., Yim, L., et al. *Salmonella* as live trojan horse for vaccine development and cancer gene therapy. *Curr. Gene Ther.* **10**, 56–76 (2010).
320. Lin, I. Y. C., Van, T. T. H., Smooker, P. M. Live-Attenuated Bacterial Vectors: Tools for Vaccine and Therapeutic Agent Delivery. *Vaccines* **3**, (2015).
321. Wang, C., Kazmierczak, R. A., Eisenstark, A. Strains, Mechanism, and Perspective: *Salmonella*-Based Cancer Therapy. *Int. J. Microbiol.* **2016**, 1–10 (2016).
322. Walker, J. M. Bacterial Therapy of Cancer. *Bact. Ther. Cancer Methods Protoc. Mol. Biol.* **1409**, 195 (2016).
323. Nallar, S. C., Xu, D. Q., Kalvakolanu, D. V. Bacteria and genetically modified bacteria as cancer therapeutics: Current advances and challenges. *Cytokine* **89**, 160–172 (2016).
324. Van Dessel, N., Swofford, C. A., Forbes, N. S. Potent and tumor specific: arming bacteria with therapeutic proteins. *Ther. Deliv* **6**, 385–399 (2015).
325. Chabalgoity, J. A, Dougan, G., Mastroeni, P., et al. Live bacteria as the basis for immunotherapies against cancer. *Expert Rev. Vaccines* **1**, 495–505 (2002).
326. Böhle, A. & Brandau, S. Immune mechanisms in bacillus Calmette-Guerin immunotherapy for superficial bladder cancer. *J. Urol.* **170**, 964–9 (2003).
327. Forbes, N. S. Engineering the perfect (bacterial) cancer therapy. *Nat Rev Cancer* **10**, 785–794

- (2013).
328. Ryan, R. M., Green, J., Lewis, C. E. Use of bacteria in anti-cancer therapies. *BioEssays* **28**, 84–94 (2005).
 329. Sznol, M., Lin, S. L., Bermudes, D., et al. Use of preferentially replicating bacteria for the treatment of cancer. *J. Clin. Invest.* **105**, 1027–1030 (2000).
 330. Wei, M. Q., Mengesha, A., Good, D., et al. Bacterial targeted tumour therapy-dawn of a new era. *Cancer Lett.* **259**, 16–27 (2008).
 331. Schmidt, W., Fabricius, E. M., Schneeweiss, U. The tumour-*Clostridium* phenomenon: 50 Years of developmental research (Review). *Int. J. Oncol.* **29**, 1479–1492 (2006).
 332. Kimura, T., Aoki, K., Baba, T. Selective Localization and Growth of *Bifidobacterium bifidum* in mouse tumors following Intravenous administration. **40**, 2061–2068 (1980).
 333. Zheng, J. H. & Min, J. J. Targeted cancer therapy using engineered *Salmonella* Typhimurium. *Chonnam Med. J.* **52**, 173–84 (2016).
 334. Pawelek, J. M., Low, K. B., Bermudes, D. Tumor-targeted *Salmonella* as a novel anticancer vector. *Cancer Res.* **57**, 4537–4544 (1997).
 335. Pawelek, J. M., Low, K. B., Bermudes, D. Bacteria as tumour-targeting vectors. *Lancet Oncol.* **4**, 548–556 (2003).
 336. Agorio, C., Schreiber, F., Sheppard, M., et al. Live attenuated *Salmonella* as a vector for oral cytokine gene therapy in melanoma. *J. Gene Med.* **9**, 416–423 (2007).
 337. Leschner, S. & Weiss, S. *Salmonella*-allies in the fight against cancer. *J. Mol. Med.* **88**, 763–773 (2010).
 338. Toussaint, B., Chauchet, X., Wang, Y., et al. Live-attenuated bacteria as a cancer vaccine vector. *Expert Rev Vaccines* **12**, 1139–1154 (2013).
 339. Hoffman, R. M. & Zhao, M. Methods for the development of tumor-targeting bacteria. *Expert Opin. Drug Discov.* **9**, 741–750 (2014).
 340. Chabalgoity, J. A., Moreno, M., Carol, H., et al. *Salmonella* Typhimurium as a basis for a live oral *Echinococcus granulosus* vaccine. *Vaccine* **19**, 460–9 (2000).
 341. Avogadri, F., Martinoli, C., Petrovska, L., et al. Cancer Immunotherapy Based on Killing of *Salmonella*-Infected Tumor Cells. *Cancer Res.* **10**, 3920–3927 (2005).
 342. Zhao, M., Geller, J., Ma, H., et al. Monotherapy with a tumor-targeting mutant of *Salmonella* Typhimurium cures orthotopic metastatic mouse models of human prostate cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **104**, 10170–4 (2007).
 343. Toso, J. F., Gill, V. J., Hwu, P., et al. Phase I study of the intravenous administration of attenuated *Salmonella* Typhimurium to patients with metastatic melanoma. *J. Clin. Oncol.* **20**, 142–52 (2002).
 344. Wall, D. M., Srikanth, C. V., McCormick, B. A. Targeting Tumors with *Salmonella* Typhimurium - Potential for Therapy. *Oncotarget* **1**, 721–8 (2010).
 345. Nagakura, C., Hayashi, K., Zhao, M., et al. Efficacy of a genetically-modified *Salmonella* Typhimurium in an orthotopic human pancreatic cancer in nude mice. *Anticancer Res.* **29**, 1873–1878 (2009).
 346. Grille, S. Moreno, M., Bascuas, T., et al. *Salmonella enterica* serovar Typhimurium

- immunotherapy for B-Cell Lymphoma induces broad antitumor immunity with therapeutic effect. *Immunology* **143**, 428–437 (2014).
347. Vendrell, A., Gravisacoet, M. J., Goin, J. C., et al. Therapeutic effects of *Salmonella* Typhi in a mouse model of T-cell lymphoma. *J. Immunother.* **36**, 171–180 (2013).
 348. Kumar, H., Kawai, T., Akira, S. Toll-like receptors and innate immunity. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **388**, 621–5 (2009).
 349. Delbridge, L. M. & O’Riordan, M. X. Innate recognition of intracellular bacteria. *Curr. Opin. Immunol.* **19**, 10–16 (2007).
 350. Rozkova D., Novotna L., Pytlík R., et al. Toll-like receptors on B-CLL cells: Expression and functional consequences of their stimulation. *Int. J. Cancer* **126**, 1132–1143 (2010).
 351. Chabalgoity, J. A, Baz, A., Rial, A., et al. The relevance of cytokines for development of protective immunity and rational design of vaccines. *Cytokine Growth Factor Rev.* **18**, 195–207
 352. Jiang, T., Zhou, C., Ren, S. Role of IL-2 in cancer immunotherapy. *Oncoimmunology* **5**, e1163462 (2016).
 353. Floros, T. & Tarhini, A. A. Anticancer Cytokines: Biology and Clinical Effects of Interferon- α 2, Interleukin (IL)-2, IL-15, IL-21, and IL-12. *Semin. Oncol.* **42**, 539–548 (2015).
 354. Grille, S., Brugnini, A., Nese, M., et al. A B-cell lymphoma vaccine using a depot formulation of interleukin-2 induces potent antitumor immunity despite increased numbers of intratumoral regulatory T cells. *Cancer Immunol. Immunother.* **59**, 519–27 (2010).
 355. Ahmadzadeh, M. & Rosenberg, S. A. IL-2 administration increases CD4+CD25hi Foxp3+ regulatory T cells in cancer patients. *Blood* **107**, 2409–2414 (2006).
 356. Zhang, S., Dai, H., Wan, N., et al. Manipulating IL-2 availability amid presentation of donor MHC antigens suppresses murine alloimmune responses by inducing regulatory T cells. *PLoS One* **5**, (2010).
 357. Pulliam, S. R., Uzhachenkoa, R. V., Adunyaha, S. E., et al. Common Gamma Chain Cytokines in Combinatorial Immune Strategies against Cancer. *Immunol. Lett.* **169**, 61–72 (2016).
 358. de Vivar Chavez, A. R., Buchser, W., Basse, P. H., et al. Pharmacologic administration of interleukin-2: Inducing a systemic autophagic syndrome. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1182**, 14–27 (2009).
 359. Eisenbeis, C. F., Grainger, A., Fischer, B., et al. Combination Immunotherapy of B-Cell Non-Hodgkin's Lymphoma with Rituximab and Interleukin-2 : A Preclinical and Phase I Study. *Clin. Cancer Res.* **10**, 6101–6110 (2004).
 360. Gluck, W. L., Hurst, D., Yuen, A., et al. Phase I Studies of Interleukin (IL)-2 and Rituximab in B-Cell Non-Hodgkin's Lymphoma: IL-2 Mediated Natural Killer Cell Expansion Correlations with Clinical Response. *Clin. Cancer Res.* **10**, 2253–2264 (2004).
 361. Khan, K. D., Emmanouilides, C., Benson, D. M., et al. A phase 2 study of rituximab in combination with recombinant interleukin-2 for rituximab-refractory indolent non-Hodgkin's lymphoma. *Clin. Cancer Res.* **12**, 7046–7053 (2006).
 362. Rautela, J. & Huntington, N. D. IL-15 signaling in NK cell cancer immunotherapy. *Curr. Opin. Immunol.* **44**, 1–6 (2017).
 363. Wu, J. IL-15 Agonists: The Cancer Cure Cytokine Jennifer. *J Mol Genet Med* **7**, (2014).
 364. Waldmann, T. A. The biology of interleukin-2 and interleukin-15: implications for cancer therapy

- and vaccine design. *Nat. Rev. Immunol.* **6**, 595–601 (2006).
365. Pulendran, B., Dillon, S., Joseph, C., et al. Dendritic cells generated in the presence of GM-CSF plus IL-15 prime potent CD8+ Tc1 responses *in vivo*. *Eur. J. Immunol.* **34**, 66–73 (2004).
 366. Chapoval, A. I., Fuller, J. A., Kremlev, S. G., et al. Combination Chemotherapy and IL-15 Administration Induce Permanent Tumor Regression in a Mouse Lung Tumor Model: NK and T Cell-Mediated Effects Antagonized by B Cells. *J. Immunol.* **161**, 6977–6984 (1998).
 367. Girard, D., Paquet, M. E., Paquin, R., et al. Differential effects of interleukin-15 (IL-15) and IL-2 on human neutrophils: modulation of phagocytosis, cytoskeleton rearrangement, gene expression, and apoptosis by IL-15. *Blood* **88**, 3176–84 (1996).
 368. Van den Bergh, J. M. J., Van Tendeloo, V. F. I., Smits, E. L. J. M. Interleukin-15: New kid on the block for antitumor combination therapy. *Cytokine Growth Factor Rev.* **26**, 15–24 (2014).
 369. Pilipow, K., Roberto, A., Roederer, M., et al. IL15 and T-cell stemness in T-cell-based cancer immunotherapy. *Cancer Res.* **75**, 5187–5193 (2015).
 370. Waldmann, T. A. Interleukin-15 in the treatment of cancer. *Expert Rev. Clin. Immunol.* **10**, 1689–701 (2014).
 371. Stoklasek, T. A., Schluns, K. S., Lefrançois, L. Combined IL-15/IL-15R α immunotherapy maximizes IL-15 activity *in vivo*. *J. Immunol.* **177**, 6072–80 (2006).
 372. Epardaud, M., Elpek, K. G., Rubinstein, M. P., et al. Interleukin-15/interleukin-15R α complexes promote destruction of established tumors by reviving tumor-resident CD8+ T cells. *Cancer Res.* **68**, 2972–83 (2008).
 373. Tomic, V., Thomas, D. L., Kranz, D. M., et al. Myxoma virus expressing a fusion protein of interleukin-15 (IL15) and IL15 receptor α has enhanced antitumor activity. *PLoS One* **9**, e109801 (2014).
 374. Kobayashi, H., Dubois, S., Sato, N., et al. Role of trans-cellular IL-15 presentation in the activation of NK cell – mediated killing , which leads to enhanced tumor immunosurveillance. *Blood* **105**, 721–727 (2005).
 375. Xu, W., Jones, M., Liu, B., et al. Efficacy and Mechanism-of-Action of a Novel Superagonist Interleukin-15: Interleukin-15 Receptor α /Fc Fusion Complex in Syngeneic Murine Models of Multiple Myeloma. *Cancer Res.* **73**, 3075–3086 (2013).
 376. Gomes-Giacoia, E., Miyake, M., Goodison, S., et al. Intravesical ALT-803 and BCG treatment reduces tumor burden in a carcinogen induced bladder cancer rat model; a role for cytokine production and NK cell expansion. *PLoS One* **9**, (2014).
 377. Van den Bergh, J. M., Lion, E., Van Tendeloo, V. F., et al. L. IL-15 receptor α as the magic wand to boost the success of IL-15 antitumor therapies: The upswing of IL-15 transpresentation. *Pharmacol. Ther.* **170**, 73–79 (2016).
 378. Tamzalit, F., Barbieux, I., Plet, A., et al. IL-15/IL-15R α complex shedding following trans-presentation is essential for the survival of IL-15 responding NK and T cells. *PNAS* **111**, 8565–70 (2014).
 379. Dunn, G. P., Koebel, C. M., Schreiber, R. D. Interferons, immunity and cancer immunoediting. *Nat. Rev. Immunol.* **6**, 836–48 (2006).
 380. Gresser, I. & Belardelli, F. Endogenous type I interferons as a defense against tumors. *Cytokine Growth Factor Rev.* **13**, 111–118 (2002).
 381. Antonelli, G., Scagnolari, C., Moschella, F., et al. Twenty-five years of type I interferon-based

- treatment: A critical analysis of its therapeutic use. *Cytokine Growth Factor Rev.* **26**, 121–131 (2015).
382. Quesada, J. R., Reuben, J., Manning, J. T., et al. Alpha interferon for induction of remission in hairy-cell leukemia. *N. Engl. J. Med.* **310**, 15–18 (1984).
 383. Vedantham, S., Gamliel, H., Golomb, H. M. Mechanism of Interferon Action in Hairy Cell Leukemia: A Model of Effective Cancer Biotherapy. *Cancer Res.* **52**, 1056–1066 (1992).
 384. Thompson J. A. & Fefer, A. Interferon alpha in the treatment of hairy cell leukemia. *Cancer* **59**, 605–609 (1987).
 385. Talpaz, M., McCredie, K., Kantarjia, H., et al. Chronic myelogenous leukaemia: haematological remissions with alpha interferon. *Br. J. Haematol.* **64**, 87–95 (1986).
 386. Talpaz, M., Kantarjian, H. M., McCredie, K., et al. Hematologic remission and cytogenetic improvement induced by recombinant human interferon alpha A in chronic myelogenous leukemia. *N. Engl. J. Med.* **314**, (1986).
 387. Windbichler, G. H., Hausmaninger, H., Stummvoll, W., et al. Interferon-gamma in the first-line therapy of ovarian cancer: a randomized phase III trial. *Br. J. Cancer* **82**, 1138–44 (2000).
 388. Gleave, M. E., Elhilali, M., Fradet, Y., et al. Interferon Gamma-1b Compared with Placebo in Metastatic Renal-Cell Carcinoma. *N. Engl. J. Med.* **338**, 1265–1271 (1998).
 389. Lasfar, A., Zloza, A., Cohen-Solal, K. A. IFN-lambda therapy: Current status and future perspectives. *Drug Discov. Today* **21**, 167–171 (2016).
 390. de la Cruz-Merino, L., Grande-Pulido, E., Albero-Tamarit, A., et al. Cancer and immune response: old and new evidence for future challenges. *Oncologist* **13**, 1246–1254 (2008).
 391. Armitage, J. O. Emerging Applications of Recombinant Human Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor. *Blood* **92**, 4491–4508 (1998).
 392. Levitsky, H. I., Montgomery, J., Ahmadzadeh, M., et al. Immunization with granulocyte-macrophage colony-stimulating factor-transduced, but not B7-1-transduced, lymphoma cells primes idiotype-specific T cells and generates potent systemic antitumor immunity. *J. Immunol.* **156**, 3858–3865 (1996).
 393. Cartron, G., Zhao-Yang, L., Baudard, M., et al. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor potentiates rituximab in patients with relapsed follicular lymphoma: Results of a phase II study. *J. Clin. Oncol.* **26**, 2725–2731 (2008).
 394. Leonard, W. J. & Spolski, R. Interleukin-21: a modulator of lymphoid proliferation, apoptosis and differentiation. *Nat. Rev. Immunol.* **5**, 688–98 (2005).
 395. Hinrichs, C. S., Spolski, R., Paulos, C. M., et al. IL-2 and IL-21 confer opposing differentiation programs to CD8+ T cells for adoptive immunotherapy. *Blood* **111**, 5326–5333 (2008).
 396. Kasaian, M., Whitters, M. J., Carter, L. L., et al. IL-21 limits NK cell responses and promotes antigen-specific T cell activation: A mediator of the transition from innate to adaptive immunity. *Immunity* **16**, 559–569 (2002).
 397. Rodríguez-Bayona, B., Ramos-Amaya, A., Bernal, J., et al. Cutting edge: IL-21 derived from human follicular helper T cells acts as a survival factor for secondary lymphoid organ, but not for bone marrow, plasma cells. *J. Immunol.* **188**, 1578–81 (2012).
 398. Andorsky, D. J. & Timmerman, J. M. Interleukin-21 : biology and application to cancer therapy. *Expert Opin. Biol. Ther* **8**, 1295–1308 (2008).

399. Jin, H., Carrio, R., Yu, A., et al. Distinct activation signals determine whether IL-21 induces B cell costimulation, growth arrest, or Bim-dependent apoptosis. *J. Immunol.* **173**, 657–665 (2004).
400. Briones, J. Emerging therapies for B-cell non-Hodgkin lymphoma. *Expert Rev. Anticancer Ther.* **9**, 1305–16 (2009).
401. Leonard, J. P., Sherman, M. L., Fisher, G. L., et al. Effects of Single-Dose Interleukin-12 Exposure on Interleukin-12 – Associated Toxicity and Interferon-g Production. *Blood* **90**, 2541–2548 (1997).
402. Atkins, M. B., Robertson, M. J., Gordon, M., et al. Phase I Evaluation with of Intravenous Advanced Recombinant Human Interleukin 12 in Patients. *Clin. Cancer Res.* **3**, 409–17 (1997).
403. Zundler, S. & Neurath, M. F. Interleukin-12: Functional activities and implications for disease. *Cytokine Growth Factor Rev.* **26**, 559–568 (2015).
404. Rees, R. C. *Tumor Immunology and Immunotherapy*. (Oxford University Press Print, 2014). doi:10.1093/med/9780199676866.001.0001
405. Chodon, T., Koya, R. C., Odunsi, K. Active Immunotherapy of Cancer. *Immunol. Invest.* **44**, 817–836 (2015).
406. Obeid, J., Hu, Y., Slingluff, C. L. Vaccines, Adjuvants, and Dendritic Cell Activators - Current Status and Future Challenges. *Semin. Oncol.* **42**, 549–561 (2015).
407. Zappasodi, R., de Braud, F., Di Nicola, M. Lymphoma immunotherapy: Current status. *Front. Immunol.* **6**, 448 (2015).
408. Kwak, L. W., Campbell, M. J., Czerwinski, D. K., et al. Induction of immune responses in patients with B-cell lymphoma against the surface-immunoglobulin idiotype expressed by their tumors. *N. Engl. J. Med.* **327**, 1209–1215 (1992).
409. Rezvani, K. & De Lavallade, H. Vaccination strategies in lymphomas and leukaemias: Recent progress. *Drugs* **71**, 1659–1674 (2011).
410. Villanueva, H., de Cerio, A., Inoges, S., et al. BiovaxID®: a customized idiotype vaccine for the treatment of B-cell lymphoma. *Expert Rev. Vaccines* **10**, 1661–9 (2011).
411. Kwak, L. W., Young, H. A., Pennington, R. W., et al. Vaccination with syngeneic, lymphoma-derived immunoglobulin idiotype combined with granulocyte/macrophage colony-stimulating factor primes mice for a protective T-cell response. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **93**, 10972–7 (1996).
412. Disis, M. L., Bernhard, H., Shiota, F. M., et al. Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor: An Effective Adjuvant for Protein and Peptide-Based Vaccines. *Blood* **88**, 202–210 (1996).
413. Baio, F. E., Kwak, L. W., Weng, J. Towards an off-the-shelf vaccine therapy targeting shared B-cell tumor idiotypes. *Am J Blood Res* **4**, 46–52 (2014).
414. Briones, J. Therapeutic vaccines for non-Hodgkin B-cell lymphoma. *Clin. Transl. Oncol.* **10**, 543–51 (2008).
415. Yang, B., Jeang, J., Yang, A., et al. DNA vaccine for cancer immunotherapy. *Hum. Vaccin. Immunother.* **10**, 3153–64 (2014).
416. Syrengelas, A. D., Chen, T. T., Levy, R. DNA immunization induces protective immunity against B-cell lymphoma. *Nat. Med.* **2**, 1038–1041 (1996).
417. Amer, M. H. Gene therapy for cancer: present status and future perspective. *Mol. Cell. Ther.* **2**, 27 (2014).

418. Martin, M. E. & Rice, K. G. Peptide-guided Gene Delivery. *AAPS J.* **9**, 18–29 (2007).
419. Rosenberg, S. A, Yang, J. C., Restifo, N. P. Cancer immunotherapy: moving beyond current vaccines. *Nat. Med.* **10**, 909–915 (2004).
420. Belardelli, F., Ferrantini, M., Parmiani, G., et al. International meeting on cancer vaccines: How can we enhance efficacy of therapeutic vaccines? *Cancer Res.* **64**, 6827–6830 (2004).
421. Timmerman, J. M., Caspar, C. B., Lambert, S. L., et al. Idiotype-encoding recombinant adenoviruses provide protective immunity against murine B-cell lymphomas. *Blood* **97**, 1370–1377 (2001).
422. Darji, A., Guzmán, C. A., Gerstel, B, et al. Oral somatic transgene vaccination using attenuated *S. typhimurium*. *Cell* **91**, 765–775 (1997).
423. Roland, K. L. & Brenneman, K. E. *Salmonella* as a vaccine delivery vehicle. *Expert Rev. Vaccines* **12**, 1033–45 (2013).
424. Timmerman, J. M. & Levy, R. Linkage of foreign carrier protein to a self-tumor antigen enhances the immunogenicity of a pulsed dendritic cell vaccine. *J. Immunol.* **164**, 4797–4803 (2000).
425. de Gruijl TD, C. D. Cancer vaccine strategies get bigger and better. *Nat. Med.* **5**, (1999).
426. Timmerman, J. M., Czerwinski, D. K., Davis, T. A., et al. Idiotype-Pulsed Dendritic Cell Vaccination for B Cell Lymphoma: Clinical and Immune Responses in 35 Patients. *Blood* **99**, 1517–1526 (2002).
427. Pyzer, A. R., Avigan, D. E, Rosenblatt, J. Clinical trials of dendritic cell-based cancer vaccines in hematologic malignancies. *Hum Vaccin Immunother* **10**, 3125–31 (2014).
428. Anassi, E. & Ndefo, U. A. Sipuleucel-T (provenge) injection: the first immunotherapy agent (vaccine) for hormone-refractory prostate cancer. *P&T* **36**, 197–202 (2011).
429. Abraham, R. S. & Mitchell, D. A. Gene-modified dendritic cell vaccines for cancer. *Cytotherapy* **18**, 1446–1455 (2016).
430. Briones, J., Timmerman, J., Levy, R. *In Vivo* Antitumor Effect of CD40L-transduced Tumor Cells as a Vaccine for B-Cell Lymphoma. *Cancer Res.* **62**, 3195–3199 (2002).
431. Grille, S., Moreno, M., Brugnini, A., et al. A therapeutic vaccine using *Salmonella*-modified tumor cells combined with interleukin-2 induces enhanced antitumor immunity in B-cell lymphoma. *Leuk. Res.* **37**, 341–8 (2013).
432. Borrello, I., Biedrzycki, B., Sheets, N., et al. Autologous Tumor Combined with a GM-CSF-Secreting Cell Line Vaccine (GVAX®) Following Autologous Stem Cell Transplant (ASCT) in Multiple Myeloma. *Blood* **104**, (2004).
433. Wierda, W. G., Cantwell, M., Woods, S., et al. CD40-ligand (CD154) gene therapy for chronic lymphocytic leukemia. *Blood* **96**, 2917–2924 (2000).
434. Biagi, E., Rousseau, R., Yvon, E., et al. Responses to human CD40 ligand/human interleukin-2 autologous cell vaccine in patients with B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Clin. Cancer Res.* **11**, 6916–6923 (2005).
435. Li, L. & Petrovsky, N. Molecular Adjuvants for DNA Vaccines. *Curr. Issues Mol. Biol.* **22**, 17–40 (2017).
436. Robert Edelman. The Development and Use of Vaccine Adjuvants. *Mol. Biotechnol.* **21**, 129–148 (2002).

437. Petrovsky, N. & Aguilar, J. C. Vaccine adjuvants: Current state and future trends. *Immunol. Cell Biol.* **82**, 488–496 (2004).
438. Pott, C., Hoster, E., Delfau-Larue, M. H., et al. Molecular remission is an independent predictor of clinical outcome in patients with mantle cell lymphoma after combined immunochemotherapy: a European MCL intergroup study. *Blood* **115**, 3215–3224 (2010).
439. Pott, C., Schrader, C., Gesk, S., et al. Quantitative assessment of molecular remission after high-dose therapy with autologous stem cell transplantation predicts long-term remission in mantle cell lymphoma. *Blood* **107**, 2271–2279 (2006).
440. Rambaldi, A., Carlotti, C., Oldani, E., et al. Quantitative PCR of bone marrow BCL2 / IgH cells at diagnosis predicts treatment response and long-term outcome in follicular non-Hodgkin lymphoma. *System* **105**, 3428–3433 (2005).
441. Andersen, N. S., Donovan, J. W., Zuckerman, A., et al. Real-time polymerase chain reaction estimation of bone marrow tumor burden using clonal immunoglobulin heavy chain gene and bcl-1/JH rearrangements in mantle cell lymphoma. *Exp. Hematol.* **30**, 703–710 (2002).
442. Hauwel, M. & Matthes, T. Minimal residual disease monitoring : the new standard for treatment evaluation of haematological malignancies ? *Eur. J. Med. Sci.* **144**, (2014).
443. Schrappe, M. Minimal residual disease: optimal methods, timing, and clinical relevance for an individual patient. *Hematol. Am Soc Hematol* **2012**, 137–42 (2012).
444. Cohen, J. B., Kurtz, D. M., Staton, A. D., et al. Next-generation surveillance strategies for patients with lymphoma. *Future Oncol.* **11**, 1977–1991 (2015).
445. Pott, C., Brüggemann, M., Ritgen, M., et al. MRD Detection in B-Cell Non-Hodgkin Lymphomas Using Ig Gene Rearrangements and Chromosomal Translocations as Targets for Real-Time Quantitative PCR. *Methods Mol. Biol.* **971**, (2013).
446. Bettegowda, C., Sausen, M., Leary, R. J., et al. Detection of Circulating Tumor DNA in Early- and Late-Stage Human Malignancies. *Sci Transl Med* **6**, (2014).
447. Roschewski, M., Staudt, L. M., Wilson, W. H. Dynamic monitoring of circulating tumor DNA in non-Hodgkin lymphoma. *Blood* **127**, blood-2016-03-635219 (2016).
448. Ladetto, M., Brüggemann, M., Monitillo, L., et al. Next-generation sequencing and real-time quantitative PCR for minimal residual disease detection in B-cell disorders. *Leukemia* **28**, 1299–1307 (2013).
449. Flores, L. S., Paiva, B., Puig, N., et al. Next Generation Flow (NGF) for Highly Sensitive and Standardized Detection of Minimal Residual Disease in Multiple Myeloma. *Leukemia* (2017). doi:10.1038/leu.2017.29
450. Van Oers, M. H. J., Tönnissen, E., Van Glabbeke, M., et al. BCL-2/IgH polymerase chain reaction status at the end of induction treatment is not predictive for progression-free survival in relapsed/resistant follicular lymphoma: Results of a prospective randomized EORTC 20981 phase III intergroup study. *J. Clin. Oncol.* **28**, 2246–2252 (2010).
451. Liu, H., Johnson, J. L., Koval, G., et al. Detection of minimal residual disease following Induction Immunochemotherapy predicts progression free survival in mantle cell lymphoma: Final results of CALGB 59909. *Haematologica* **97**, 579–585 (2012).
452. Shiramizu, B., Goldman, S., Kusao, I., et al. Minimal disease assessment in the treatment of children and adolescents with intermediate-risk (Stage III/IV) B-cell non- Hodgkin lymphoma: a children’s oncology group report. **153**, 758–63 (2011).
453. Al Khabori, M., De Almeida, J. R., Guyatt, G. H., et al. Autologous stem cell transplantation in

- follicular lymphoma: A systematic review and meta-analysis. *J. Natl. Cancer Inst.* **104**, 18–28 (2012).
454. Forstpointner, R. & Dreyling, M. Rituximab maintenance versus radioimmunotherapy consolidation in follicular lymphoma: Which, when, and for whom? *Curr. Hematol. Malig. Rep.* **6**, 207–215 (2011).
455. Cheson, B. D. New agents in follicular lymphoma. *Best Pract. Res. Clin. Haematol.* **24**, 305–312 (2011).
456. Zappasodi, R., de Braud, F., Di Nicola, M. Lymphoma immunotherapy: Current status. *Front. Immunol.* **6**, 448 (2015).
457. Hsu, F. J., Caspar, C. B., Czerwinski, D., et al. Tumor-specific idiotype vaccines in the treatment of patients with B-cell lymphoma—long-term results of a clinical trial. *Blood* **89**, 3129–3135 (1997).
458. Weng, W. K. Clinical Outcome of Lymphoma Patients After Idiotype Vaccination Is Correlated With Humoral Immune Response and Immunoglobulin G Fc Receptor Genotype. *J. Clin. Oncol.* **22**, 4717–4724 (2004).
459. Bocchia, M., Bronte, V., Colombo, M. P., et al. *Antitumor vaccination: Where we stand. Haematologica* **85**, (2000).
460. Mak, I. W., Evaniew, N., Ghert, M. Lost in translation: animal models and clinical trials in cancer treatment. *Am. J. Transl. Res.* **6**, 114–8 (2014).
461. Donnou, S., Galand, C., Touitou, V., et al. Murine Models of B-Cell Lymphomas: Promising Tools for Designing Cancer Therapies. *Adv. Hematol.* **2012**, 1–13 (2012).
462. Israel, O., Keidar, Z., Bar-Shalom, R. Positron emission tomography in the evaluation of lymphoma. *Semin. Nucl. Med.* **34**, 166–179 (2004).
463. Messa, C., Bettinardi, V., Picchio, M., et al. PET/CT in diagnostic oncology. *Q J Nucl Med Molular Imaging* **48**, 66–75 (2004).
464. Juweid, M. E. & Cheson, B. D. Positron-emission tomography and assessment of cancer therapy. *N. Engl. J. Med.* **354**, 496–507 (2006).
465. Stumpe, K. D., Urbinelli, M., Steinert, H. C. et al. Whole-body positron emission tomography using fluorodeoxyglucose for staging of lymphoma: effectiveness and comparison with computed tomography. *Eur. J. Nucl. Med.* **25**, 721–8 (1998).
466. Isasi, C. R., Lu, P., Blafox, M. D. A metaanalysis of 18F-2-deoxy-2-fluoro-D-glucose positron emission tomography in the staging and restaging of patients with lymphoma. *Cancer* **104**, 1066–1074 (2005).
467. Gouliamos, A. D. & Patronas, N. J. *Imaging in Clinical Oncology.* (2014). doi:10.1007/978-88-470-5385-4
468. Kostakoglu, L. & Cheson, B. D. Current role of FDG PET/CT in lymphoma. *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging* **41**, 1004–1027 (2014).
469. Elstrom, R., Guan, L., Baker, G., et al. Utility of FDG-PET scanning in lymphoma by WHO classification. *Blood* **101**, 3875–3876 (2003).
470. Tsukamoto, N., Kojima, M., Hasegawa, M., et al. The usefulness of 18F-fluorodeoxyglucose positron emission tomography (18F-FDG-PET) and a comparison of 18F-FDG-PET with 67gallium scintigraphy in the evaluation of lymphoma: Relation to histologic subtypes based on the World Health Organization classific. *Cancer* **110**, 652–659 (2007).

471. Cheson, B. D., Pfistner, B., Juweid M. E., et al. Revised Response Criteria for Malignant Lymphoma. *J. Clin. Oncol.* **25**, 579–586 (2007).
472. Terasawa, T., Nihashi, T., Hotta, T., et al. PET for Posttherapy Assessment of Hodgkin ' s Disease and Aggressive Non-Hodgkin ' s Lymphoma : A Systematic Review. *Journal Nucl. Med.* **49**, 13–21 (2008).
473. Paul, R. Imaging for Detection of Lymphoma. *J Nucl Med* **28**, 288–292 (1987).
474. Chaise, C., Itti, E., Petegnief, I., et al. [F-18]-fluoro-2-deoxy-d-glucose positron emission tomography as a tool for early detection of immunotherapy response in a murine B cell lymphoma model. *Cancer Immunol. Immunother.* **56**, 1163–1171 (2007).
475. Kim, K. J., Kanellopoulos-langevin, C., Merwin, R. M., et al. Establishment and Characterization of BALB / c Lymphoma Lines with B Cell Properties. *J. Immunol.* **122**, 549–554 (1979).
476. Livak, K. J. & Schmittgen, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{(-\Delta\Delta CT)}$ method. *Methods* **25**, 402–408 (2001).
477. Sambrook, J.F & Russel, D.W.. Molecular cloning: a laboratory manual (Volume 3). 3rd Ed. Appendix 8: Commonly Used Techniques in Molecular (2001).
478. Schägger, H. Tricine – SDS-PAGE. *Nat. Protoc.* **1**, 16–23 (2006).
479. Soman, G., Yang, X., Jiang, H., et al. MTS dye based colorimetric CTLL-2 cell proliferation assay for product release and stability monitoring of interleukin-15: assay qualification, standardization and statistical analysis. *J. Immunol. Methods* **348**, 83–94 (2009).
480. Vindelov, L. L., Christensen, I. J., Nissen, N. I. A Detergent-Trypsin Method for the Preparation of Nuclei for Flow C Y t O metric DNA Analysis. *Cytometry* **3**, 323–327 (1983).
481. Zelenetz A. D., Gordon L. I., Wierda W. G., et al. Non-Hodgkin's Lymphomas. Version 4.2014. En: NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology (NCCN Guidelines). *National Comprehensive Cancer Network. 2014.* <https://www.nccn.org/about/nhl.pdf>. Accessed 20 Jun 2016. (2014). doi:10.1016/B978-1-4377-1604-7.00191-3
482. Tsukihara, H., Nakagawa, F., Sakamoto, K., et al. Efficacy of combination chemotherapy using a novel oral chemotherapeutic agent, TAS-102, together with bevacizumab, cetuximab, or panitumumab on human colorectal cancer xenografts. *Oncol. Rep.* **33**, 2135–42 (2015).
483. Hovhannisyan, N., Guillouet, S., Fillesoye, F., et al. Evaluation of the specificity of [18F]fludarabine PET/CT in a xenograft model of follicular lymphoma: comparison with [18F]FDG and impact of rituximab therapy. *EJNMMI Res.* **5**, 23 (2015).
484. Liu, D., Yu, J., Chen, H., et al. Statistical determination of threshold for cellular division in the CFSE-labeling assay. *J. Immunol. Methods* **312**, 126–136 (2006).
485. Duan, X., Huang, J., Ma, H. X., et al. Full Length Research Paper A flow cytometric assay for simultaneously measuring the proliferation and cytotoxicity of cytokine induced killer cells in combination with carboxyfluorescein succinimidyl ester (CFSE) labeling. *African J. Biotechnol.* **10**, 14598–14607 (2011).
486. Doherty, T. A., Soroosh, P., Broide, D. H., et al. CD4+ cells are required for chronic eosinophilic lung inflammation but not airway remodeling. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* **296**, L229-35 (2009).
487. Atherton, S. S., Newell, C. K., Kanter, M. Y., et al. T cell depletion increases susceptibility to murine cytomegalovirus retinitis. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **33**, 3353–60 (1992).
488. Stern, C., Kasnitz, N., Kocijancic, D., et al. Induction of CD4+ and CD8+ anti-tumor effector T cell

- responses by bacteria mediated tumor therapy. *Int. J. Cancer* **137**, 2019–2028 (2015).
489. Burkholder, T., Foltz, C., Karlsson, E., et al. Health Evaluation of Experimental Laboratory Mice. *Curr Protoc Mousese Biol* **2**, 145–165 (2012).
490. Ullman-Culleré, M. H. & Foltz, C. J. Body condition scoring: a rapid and accurate method for assessing health status in mice. *Lab Anim Sci* **49**, 319–323 (1999).
491. Langford, D. J., Bailey, A. L., Chanda, M. L., et al. Coding of facial expressions of pain in the laboratory mouse. *Nat Methods* **7**, 447–449 (2010).
492. DiJoseph, J. F., Dougher, M. M., Evans, D. Y., et al. Preclinical anti-tumor activity of antibody-targeted chemotherapy with CMC-544 (inotuzumab ozogamicin), a CD22-specific immunoconjugate of calicheamicin, compared with non-targeted combination chemotherapy with CVP or CHOP. *Cancer Chemother. Pharmacol.* **67**, 741–749 (2011).
493. Mohammad, R. M., Al-katib, A., Aboukameel, A., et al. Genistein sensitizes diffuse large cell lymphoma to CHOP (cyclophosphamide, doxorubicin, vincristine, prednisone) chemotherapy Genistein sensitizes diffuse large cell lymphoma to CHOP. *Mol Cancer Ther* **2**, 1361–1368 (2004).
494. National Institute of Cancer. Common Terminology Criteria for Adverse Events (CTCAE). Version 3., (2006).
495. Ostrand-Rosenberg, S. Animal models of tumor immunity, immunotherapy and cancer vaccines. *Curr. Opin. Immunol.* **16**, 143–150 (2004).
496. van Marion, D. M. S., Domanska, U. M., Timmer-Bosscha, H., et al. Studying cancer metastasis: existing models, challenges and future perspectives. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* **97**, 107–117 (2015).
497. Emens, L. A. & Middleton, G. The Interplay of Immunotherapy and Chemotherapy: Harnessing Potential Synergies. *Cancer Immunol. Res.* **3**, 436–443 (2015).
498. Sakamaki, I., Qin, H., Kwak, L. W. Translational development of vaccination strategies in follicular NHL. *Best Pract. Res. Clin. Haematol.* **24**, 295–304 (2011).
499. Schuster, S. J., Neelapu, S. S., Gause, B. L., et al. Vaccination with patient-specific tumor-derived antigen in first remission improves disease-free survival in follicular lymphoma. *J. Clin. Oncol.* **29**, 2787–2794 (2011).
500. Izutsu, K. Treatment of follicular lymphoma. *J Clin Exp Hematop* **10**, 31–37 (2014).
501. Nowak, A. K., Robinson, B. W. S., Lake, R. A. Synergy between chemotherapy and immunotherapy in the treatment of established murine solid tumors. *Cancer Res.* **63**, 4490–4496 (2003).
502. Chen, G. & Emens, L. A. Chemoimmunotherapy: reengineering tumor immunity. *Cancer Immunol Immunother* **62**, 203–216 (2013).
503. McDonnell, A. M., Lesterhuis, W. J., Khong, A., et al. Tumor-infiltrating dendritic cells exhibit defective cross-presentation of tumor antigens, but is reversed by chemotherapy. *Eur. J. Immunol.* **45**, 49–59 (2014).
504. Gebremeskel, S. & Johnston, B. Concepts and mechanisms underlying chemotherapy induced immunogenic cell death : Impact on clinical studies and considerations for combined therapies. **6**, (2015).
505. Keeley, E. C., Mehrad, B., Strieter, R. M. CXC Chemokines in Cancer Angiogenesis and Metastases. *Adv Cancer Res* **106**, 91–111 (2010).

506. Guan, X. Cancer metastases: Challenges and opportunities. *Acta Pharm. Sin. B* **5**, 402–418 (2015).
507. Harlin, H., Meng, Y., Peterson, A. C., et al. Chemokine Expression in Melanoma Metastases Associated with CD8+ T-Cell Recruitment. *Cancer Res.* **69**, 3077–3085 (2009).
508. Coppola, D., Nebozhyn, M., Khalil, F., et al. Unique ectopic lymph node-like structures present in human primary colorectal carcinoma are identified by immune gene array profiling. *Am. J. Pathol.* **179**, 37–45 (2011).
509. Messina, J. L., Fenstermacher, D. A., Eschrich, S., et al. 12-Chemokine gene signature identifies lymph node-like structures in melanoma: potential for patient selection for immunotherapy? *Sci. Rep.* **2**, 765 (2012).
510. Fernandes, J. V., Cobucci, R. N., Jatobá, C. A., et al. The Role of the Mediators of Inflammation in Cancer Development. *Pathol. Oncol. Res.* **21**, 527–534 (2015).
511. Atretkhany, K.S. N., Drutskaya, M. S., Nedospasov, S. A., et al. Chemokines, cytokines and exosomes help tumors to shape inflammatory microenvironment. *Pharmacol. Ther.* **168**, 98–112 (2016).
512. El-Galaly, T. C. & Hutchings, M. Imaging of Non-Hodgkin Lymphomas: Diagnosis and Response-Adapted Strategies. *Cancer Treat. Res.* **165**, 125–146 (2015).
513. Novelli, S., Briones, J., Flotats, A., et al. PET/CT Assessment of Follicular Lymphoma and High Grade B Cell Lymphoma - Good Correlation with Clinical and Histological Features at Diagnosis. *Adv. Clin. Exp. Med.* **24**, 325–330 (2015).
514. Juweid, M. E., Stroobants, S., Hoekstra, O. S., et al. Use of positron emission tomography for response assessment of lymphoma: Consensus of the imaging subcommittee of international harmonization project in lymphoma. *J. Clin. Oncol.* **25**, 571–578 (2007).
515. Zijlstra, J. M., Lindauer-van der Werf, G., Hoekstra, O. S., et al. 18F-fluoro-deoxyglucose positron emission tomography for post-treatment evaluation of malignant lymphoma: a systematic review. *Haematologica* **91**, 522–529 (2006).
516. Bascuas, T., Moreno, M., Mónaco, A., et al. A novel non-Hodgkin lymphoma murine model closer to the standard clinical scenario. *J. Transl. Med.* **14**, 323 (2016).
517. Allgayer, H. & Heiss, M. M. Minimal residual disease in solid cancer. Prognostic value and therapeutic consequences. *Fortschr. Med. Orig.* **119**, 1–4 (2001).
518. Michaud, H. A., Eliaou, J. F., Lafont, V., et al. Tumor antigen-targeting monoclonal antibody-based immunotherapy: Orchestrating combined strategies for the development of long-term antitumor immunity. *Oncoimmunology* **3**, e955684 (2014).
519. Palomba, M. L. Active immunotherapy: current state of the art in vaccine approaches for NHL. *Curr Oncol Rep* **14**, 433–440 (2013).
520. Burkett, P. R., Koka, R., Chien, M., et al. Coordinate expression and trans presentation of interleukin (IL)-15Ralpha and IL-15 supports natural killer cell and memory CD8+ T cell homeostasis. *J. Exp. Med.* **200**, 825–834 (2004).
521. Klebanoff, C. A., Finkelstein, S. E., Surman, D. R., et al. IL-15 enhances the *in vivo* antitumor activity of tumor-reactive CD8+ T cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **101**, 1969–1974 (2004).
522. Chapoval, A. I., Fuller, J. A., Kremlev, S. G., et al. Combination Chemotherapy and IL-15 Administration Induce Permanent Tumor Regression in a Mouse Lung Tumor Model: NK and T Cell-Mediated Effects Antagonized by B cells. *J. Imm* **161**, 6977–6984 (1998).

523. Evans, R., Fuller, J. A, Christianson, G., et al. IL-15 mediates anti-tumor effects after cyclophosphamide injection of tumor-bearing mice and enhances adoptive immunotherapy: the potential role of NK cell subpopulations. *Cell. Immunol.* **179**, 66–73 (1997).
524. Chertova, E., Bergamaschi, C., Chertov, O., et al. Characterization and favorable *in vivo* properties of heterodimeric soluble IL-15/IL-15R α cytokine compared to IL-15 monomer. *J. Biol. Chem.* **288**, 18093–18103 (2013).
525. Bergamaschi, C., Jalah, R., Kulkarni, V., et al. Secretion and biological activity of short signal peptide IL-15 is chaperoned by IL-15 receptor alpha *in vivo*. *J. Immunol.* **183**, 3064–72 (2009).
526. Fehniger, T. A. & Caligiuri, M. A. Interleukin 15: biology and relevance to human disease. *Blood* **97**, 14–32 (2001).
527. Steel, J. C., Ramlogan, C. A., Yu, P., et al. Interleukin-15 and its Receptor Augment Dendritic Cell Vaccination Against the neu Oncogene Through the Induction of Antibodies Partially Independent of CD4-help. *Cancer Res.* **70**, 1072 (2010).
528. Van den Bergh, J., Willemsen, Y., Lion, E., et al. Transpresentation of interleukin - 15 by IL-15 / IL-15R α mRNA- engineered human dendritic cells boosts antitumoral natural killer cell activity. *Oncotarget* **6**, (2015).
529. Morris, J. C., Ramlogan-Steel, C. A., Yu, P., et al. Vaccination with Tumor Cells Expressing IL-15 and IL-15R α Inhibit Murine Breast and Prostate Cancer. *Gene Ther.* **21**, 393–401 (2014).
530. Silva-Valenzuela, C. A., Desai, P. T., Molina-Quiroz, R. C., et al. Solid tumors provide niche-specific conditions that lead to preferential growth of *Salmonella*. *Oncotarget* **7**, 35169–35180 (2016).
531. Chang, W. W. & Lee, C. H. *Salmonella* as an innovative therapeutic antitumor agent. *Int. J. Mol. Sci.* **15**, 14546–14554 (2014).
532. Chorobik, P. & Marcinkiewicz, J. Therapeutic vaccines based on genetically modified *Salmonella*: A novel strategy in cancer immunotherapy. *Pol. Arch. Med. Wewn.* **121**, 461–467 (2011).
533. Chang, S., Kim, Y., Ko, H. Potential therapeutic anti-tumor effect of a *Salmonella*-based vaccine. *Hum. Vaccines Immunother.* **9**, 1654–1660 (2013).
534. Anampa, J., Makower, D., Sparano, J. A. Progress in adjuvant chemotherapy for breast cancer: an overview. *BMC Med.* **13**, 195 (2015).
535. Ribic, C. M., Sargent, D. J., Moore, M. J., et al. Tumor microsatellite-instability status as a predictor of benefit from fluorouracil-based adjuvant chemotherapy for colon cancer. *N. Engl. J. Med.* **349**, 247–57 (2003).
536. Paoletti, X., Oba, K., Burzykowski, T., et al. Benefit of adjuvant chemotherapy for resectable gastric cancer: a meta-analysis. *JAMA* **303**, 1729–1737 (2010).
537. Bocci, G. & Kerbel, R. S. Pharmacokinetics of metronomic chemotherapy: a neglected but crucial aspect. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* (2016). doi:10.1038/nrclinonc.2016.64
538. Zinman, L. N. & Vanni, A. J. Management of Proximal Primary Urethral Cancer. *Urol. Clin. North Am.* **43**, 505–513 (2016).
539. Rose, T. L. & Milowsky, M. I. Improving Systemic Chemotherapy for Bladder Cancer. *Curr. Oncol. Rep.* **18**, (2016).
540. Jia, L. J., Wei, D. P., Sun, Q. M., et al. Tumor-targeting *Salmonella* typhimurium improves cyclophosphamide chemotherapy at maximum tolerated dose and low-dose metronomic regimens in a murine melanoma model. *Int. J. Cancer* **121**, 666–674 (2007).

541. Lee, C. H., Wu, C. L., Tai, Y. S., et al. Systemic administration of attenuated *Salmonella choleraesuis* in combination with cisplatin for cancer therapy. *Mol. Ther.* **11**, 707–716 (2005).
542. Chang, W. W., Lai, C. H., Chen, M. C., et al. *Salmonella* enhance chemosensitivity in tumor through connexin 43 upregulation. *Int. J. Cancer* **133**, 1926–1935 (2013).
543. Din, M. O., Danino, T., Prindle, A., et al. Synchronized cycles of bacterial lysis for *in vivo* delivery. *Nature* **536**, 81–5 (2016).
544. Dang, L. H., Bettegowda, C., Huso, D. L., et al. Combination bacteriolytic therapy for the treatment of experimental tumors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **98**, 15155–60 (2001).
545. Cheong, I., Huang, X., Bettegowda, C., et al. A bacterial protein enhances the release and efficacy of liposomal cancer drugs. *Science* **314**, 1308–11 (2006).
546. Hong, E. H., Chang, S. Y., Pyun, A. R., et al. Intratumoral injection of attenuated *Salmonella* vaccine can induce tumor microenvironmental shift from immune suppressive to immunogenic. *Vaccine* **31**, 1377–84 (2013).
547. Ahlmann, M. & Hempel, G. The effect of cyclophosphamide on the immune system: implications for clinical cancer therapy. *Cancer Chemother. Pharmacol.* **78**, 661–671 (2016).
548. Wick, M. J. Innate immune control of *Salmonella enterica* serovar typhimurium: Mechanisms contributing to combating systemic *Salmonella* infection. *J. Innate Immun.* **3**, 543–549 (2011).
549. Sherry, B., Tekamp-Olson, P., Gallegos, C., et al. Resolution of the two components of macrophage inflammatory protein 1, and cloning and characterization of one of those components, macrophage inflammatory protein 1 beta. *J. Exp. Med.* **168**, 2251–9 (1988).
550. Baba, T. & Mukaida, N. Role of macrophage inflammatory protein (MIP)-1alpha/CCL3 in leukemogenesis. *Mol Cell Oncol* **1**, e29899 (2014).
551. Vries, M. H. M., Wagenaar, A., Verbruggen, S. E. L., et al. CXCL1 promotes arteriogenesis through enhanced monocyte recruitment into the peri-collateral space. *Angiogenesis* **18**, 163–171 (2015).
552. Verbeke, H., Struyf, S., Laureys, G., et al. The expression and role of CXC chemokines in colorectal cancer. *Cytokine Growth Factor Rev.* **22**, 345–358 (2011).
553. Maghazachi, A. A. Role of Chemokines in the Biology of Natural Killer Cells. *Curr Top Microbiol Immunol* **341**, 37–58 (2010).
554. Qidwai, T. Chemokine genetic polymorphism in human health and disease. *Immunol. Lett.* **176**, 128–138 (2016).
555. Chiariotti, L., Salvatore, P., Frunzio, R., et al. Galectin genes: Regulation of expression. *Glycoconj. J.* **19**, 441–449 (2002).
556. Jia, L. J., Wei, D. P., Sun, Q. M., et al. Oral delivery of tumor-targeting *Salmonella* for cancer therapy in murine tumor models. *Cancer Sci.* **98**, 1107–1112 (2007).
557. Heimann, D. M. & Rosenberg, S. A. Continuous intravenous administration of live genetically modified *Salmonella* Typhimurium in patients with metastatic melanoma. *J. Immunother.* **26**, 179–180 (2003).
558. Rakoff-Nahoum, S. & Medzhitov, R. Toll-like receptors and cancer. *Nat. Rev. Cancer* **9**, 57–63 (2009).
559. Laguado, J. Aplicaciones de la Citometría de Flujo en Microbiología, Veterinaria y Agricultura. *Rev. MVZ Córdoba* **12**, 1077–1095 (2007).

ABREVIATURAS

CT	transferencia adoptiva de células
ADCC	citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos
ADCP	fagocitosis celular dependiente de anticuerpos
AICD	muerte celular inducida por la activación
APC	célula presentadora de antígeno
ASO	oligonucleótido anti-sentido
BC	condición corporal
BCG	bacilo de Calmette-Guerin
BiTEs	anticuerpos biespecíficos
Bregs	células B reguladoras
BWC	cambio en el peso corporal
CAR	receptor quimérico de antígeno
CAR-T	células T modificada para el receptor quimérico de antígeno
CDC	citotoxicidad dependiente del complemento
CF	citometría de flujo
CHOP	ciclofosfamida, doxorubicina, vincristina y prednisona/esteroides
CMV	citomegalovirus
ConA	Concanavalina A
CSF-1	factor de estimulación de colonias-1
CFSE	5(6)-Carboxy-fluorescein diacetate, succinimidyl ester
CTCAE	Criterio de Eventos Adversos
CTL	linfocito T citotóxico
DAMPs	patrones moleculares asociados a daño
DC	célula dendrítica
DCregs	células dendríticas reguladoras
DNMTi	inhibidores de DNA metiltransferasas
EF-1α	Factor de Elongación-1 α
EMR	enfermedad mínima residual
FcR	receptor Fc

18F-FDG	18F-2-flúor-2-desoxi-D-glucosa
GM-CSF	factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos
HDACi	inhibidores de histona desacetilasas
HTLV	virus de la leucemia humana de células T
IC50	concentración inhibitoria mínima
ICOS	co-estimulador inducible
Id	idiotipo
IDO	indoleamina 2,3 dioxigenasa
IKK2	inhibidor del factor nuclear kappa-B quinasa
iNKT	célula NKT invariante
i.p.	intraperitoneal
IP	ioduro de propidio
IRF4	factor de regulación del interferón 4
i.t.	intratumoral
iTregs	Tregs “inducidas”
KLH	hemocianina de lapa californiana
LAK	células asesinas activadas por linfoquinas
LDGCB	linfoma difuso a grandes células B
LF	linfoma folicular
lisB16F1	lisado de B16F1
lisA20	lisado de A20
LNH	Linfoma no Hodgkin
LNH-B	LNH a células B
mAb	anticuerpo monoclonal
LB	medio Luria-Bertani
LPS	lipopolisacárido
LVR01x3	3 dosis de LVR01
MDSC	célula mieloide supresora
MFI	intensidad media de fluorescencia
MMAE	monometil auristatin E
M-MLV RT	Moloney Murine Leukemia Virus Reverse Transcriptase
MMP	metaloproteinasa

MOI	multiplicidad de infección
NETs	trampas extracelulares de ADN liberadas por neutrófilos
NGF	CF de nueva generación
nTregs	Tregs “naturales”
PAMPs	patrones moleculares asociados a patógenos
PET/CT	tomografía por emisión de positrones/tomografía computarizada
PPRs	receptores de reconocimiento de patrones
qPCR	PCR cuantitativa
RCAS1	antígeno de superficie asociado al receptor
R-CHOP	terapia con rituximab y CHOP
ROC	Receiver Operating Characteristic curve
RORyt	receptor gamma relacionado al receptor huérfano del ácido retinoico
RT-PCR	PCR en tiempo real
s.c.	subcutánea
SE	control sin estimular
SEER	Surveillance, Epidemiology, and End-Results
SFB	suero fetal bovino
TAA	antígeno asociado a tumor
TAMs	macrófagos asociados a tumor
TANs	neutrófilos asociados a tumor
TCR	receptor de célula T
TIL	infiltrado de linfocitos T
TLR	receptores tipo toll
3D-MLEM	Maximum Likelihood Expectation Maximization
VOIs	volúmenes de interés

APÉNDICE

Table 1. 2016 WHO classification of mature lymphoid, histiocytic, and dendritic neoplasms

Mature B-cell neoplasms
Chronic lymphocytic leukemia/small lymphocytic lymphoma
Monoclonal B-cell lymphocytosis*
B-cell prolymphocytic leukemia
Splenic marginal zone lymphoma
Hairy cell leukemia
<i>Splenic B-cell lymphoma/leukemia, unclassifiable</i>
<i>Splenic diffuse red pulp small B-cell lymphoma</i>
<i>Hairy cell leukemia-variant</i>
Lymphoplasmacytic lymphoma
Waldenström macroglobulinemia
Monoclonal gammopathy of undetermined significance (MGUS), IgM*
μ heavy-chain disease
γ heavy-chain disease
α heavy-chain disease
Monoclonal gammopathy of undetermined significance (MGUS), IgG/A*
Plasma cell myeloma
Solitary plasmacytoma of bone
Extrasosseous plasmacytoma
Monoclonal immunoglobulin deposition diseases*
Extranodal marginal zone lymphoma of mucosa-associated lymphoid tissue (MALT lymphoma)
Nodal marginal zone lymphoma
<i>Pediatric nodal marginal zone lymphoma</i>
Follicular lymphoma
In situ follicular neoplasia*
Duodenal-type follicular lymphoma*
Pediatric-type follicular lymphoma*
<i>Large B-cell lymphoma with IRF4 rearrangement*</i>
Primary cutaneous follicle center lymphoma
Mantle cell lymphoma
In situ mantle cell neoplasia*
Diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL), NOS
Germinal center B-cell type*
Activated B-cell type*
T-cell/histiocyte-rich large B-cell lymphoma
Primary DLBCL of the central nervous system (CNS)
Primary cutaneous DLBCL, leg type
EBV ⁺ DLBCL, NOS*
<i>EBV⁺ mucocutaneous ulcer*</i>
DLBCL associated with chronic inflammation
Lymphomatoid granulomatosis
Primary mediastinal (thymic) large B-cell lymphoma
Intravascular large B-cell lymphoma
ALK ⁺ large B-cell lymphoma
Plasmablastic lymphoma
Primary effusion lymphoma
<i>HHV8⁺ DLBCL, NOS*</i>
Burkitt lymphoma
<i>Burkitt-like lymphoma with 11q aberration*</i>
High-grade B-cell lymphoma, with <i>MYC</i> and <i>BCL2</i> and/or <i>BCL6</i> rearrangements*
High-grade B-cell lymphoma, NOS*
B-cell lymphoma, unclassifiable, with features intermediate between DLBCL and classical Hodgkin lymphoma
Mature T and NK neoplasms
T-cell prolymphocytic leukemia
T-cell large granular lymphocytic leukemia
<i>Chronic lymphoproliferative disorder of NK cells</i>
Aggressive NK-cell leukemia
Systemic EBV ⁺ T-cell lymphoma of childhood*
Hydroa vacciniforme–like lymphoproliferative disorder*
Adult T-cell leukemia/lymphoma
Extranodal NK-/T-cell lymphoma, nasal type
Enteropathy-associated T-cell lymphoma

Table 1. (continued)

Monomorphic epitheliotropic intestinal T-cell lymphoma*
<i>Indolent T-cell lymphoproliferative disorder of the GI tract*</i>
Hepatosplenic T-cell lymphoma
Subcutaneous panniculitis-like T-cell lymphoma
Mycosis fungoides
Sézary syndrome
Primary cutaneous CD30 ⁺ T-cell lymphoproliferative disorders
Lymphomatoid papulosis
Primary cutaneous anaplastic large cell lymphoma
Primary cutaneous γδ T-cell lymphoma
<i>Primary cutaneous CD8⁺ aggressive epidermotropic cytotoxic T-cell lymphoma</i>
<i>Primary cutaneous acral CD8⁺ T-cell lymphoma*</i>
<i>Primary cutaneous CD4⁺ small/medium T-cell lymphoproliferative disorder*</i>
Peripheral T-cell lymphoma, NOS
Angioimmunoblastic T-cell lymphoma
<i>Follicular T-cell lymphoma*</i>
<i>Nodal peripheral T-cell lymphoma with TFH phenotype*</i>
Anaplastic large-cell lymphoma, ALK ⁺
Anaplastic large-cell lymphoma, ALK ⁻ *
<i>Breast implant–associated anaplastic large-cell lymphoma*</i>
Hodgkin lymphoma
Nodular lymphocyte predominant Hodgkin lymphoma
Classical Hodgkin lymphoma
Nodular sclerosis classical Hodgkin lymphoma
Lymphocyte-rich classical Hodgkin lymphoma
Mixed cellularity classical Hodgkin lymphoma
Lymphocyte-depleted classical Hodgkin lymphoma
Posttransplant lymphoproliferative disorders (PTLD)
Plasmacytic hyperplasia PTLD
Infectious mononucleosis PTLD
Florid follicular hyperplasia PTLD*
Polymorphic PTLD
Monomorphic PTLD (B- and T-/NK-cell types)
Classical Hodgkin lymphoma PTLD
Histiocytic and dendritic cell neoplasms
Histiocytic sarcoma
Langerhans cell histiocytosis
Langerhans cell sarcoma
Indeterminate dendritic cell tumor
Interdigitating dendritic cell sarcoma
Follicular dendritic cell sarcoma
Fibroblastic reticular cell tumor
Disseminated juvenile xanthogranuloma
Erdheim-Chester disease*

Provisional entities are listed in italics.
*Changes from the 2008 classification.

A continuación se muestra la secuencia de ADN del plásmido pORF9-mil-15, y en amarillo se indican las regiones donde hibridan los primers para amplificar el fragmento que contiene el gen codificante para IL-15.

SgfI (7) pBglII

1 GGATCTGCGATCGCTCCGGTGGCCGTCAGTGGGCGAGCGCACATCGCCACAGTCCCCGAGAAGTTGGGGGAGGGGTGCGCAATTGAACCGTGCCTA

101 GAGAAGGTGGCGCGGGTAAACTGGAAAGTGATGTCGTGACTGGCTCCGCCTTTTTCCGAGGGTGGGGGAGAACCCTATATAAGTCAGTAGTCGCC

HindIII (246)

201 GTGAACGTTCTTTTTCGCAACGGGTTTGCCGCCAGAACACAGCTGAAGCTTCGAGGGCTCGCATCTCTCCTTCACGGCCCGCCCTACCTGAGGCC

301 GCCATCCACGCCGTTGAGTCGGTTCGCGCCTCCGCCTGTGGTGCCTCTGAACTGCGTCCGCCCTAGGTAAGTTTAAAGCTCAGGTGAGACC

401 GGGCTTTGTCGGCGCTCCCTTGAGGCTACCTAGACTCAGCCGGCTCCACGCTTTGGCTGACCTGCTTGCTCAACTCTACGCTTTTGTTCGTTT

BspHI (569)

501 TCTGTTCTGCGCGTTACAGATCCAAGCTGTGACC GGCCCTACCTGAGATCACCGGTAGGAGGCCATCATGAAAATTTGAAACCATATATGAGGAAT

1▶MetLysI leLeuLysProTyrMetArgAsn

601 ACATCCATCTCGTCTACTTGTGTTTCCTTCTAAACAGTCACTTTTTAACTGAGGCTGGCATTTCATGTCTTCAATTTGGGCTGTGTCAGTGTAGGTCTCC

11▶ThrSerI leSerCysTyrLeuCysPheLeuLeuAsnSerHisPheLeuThrGluAlaGlyI leHisValPheI leLeuGlyCysValSerValGlyLeuP

701 CTA AAAACAGAGGCCAACTGGATAGATGTAAGATATGACCTGGAGAAAATTGAAAGCCTTATTC AATCTATTTCATATTGACACCACTTTATACACTGACAG

44▶roLysThrGluAlaAsnTrpI leAspValArgTyrAspLeuGluLysI leGluSerLeuI leGlnSerI leHisI leAspThrThrLeuTyrThrAspSe

801 TGACTTTCATCCAGTTGCAAAGTTACTGCAATGAAGTCTTCTCCTGGAATTGCAGGTTATTTTACATGAGTACAGTAAACATGACTCTTAATGAAACA

77▶rAspPheHisProSerCysLysValThrAlaMetAsnCysPheLeuLeuGluLeuGlnVal I leLeuHisGluTyrSerAsnMetThrLeuAsnGluThr

901 GTAAGAAACGTGCTCTACCTTGCAAACAGCACTCTGTCTTCAAACAAGAATGTAGCAGAATCTGGCTCAAGGAATGTGAGGAGCTGGAGGAGAAAACCT

111▶ValArgAsnValLeuTyrLeuAlaAsnSerThrLeuSerSerAsnLysAsnValAlaGluSerGlyCysLysGluCysGluGluLeuGluGluLysThrP

HindIII (1017) pEcoRI NheI (1093)

1001 TCACAGAGTTTTTGCAAAGCTTTATACGCATTTGCCAAATGTTTCATCAACACGTCTGACTGCACGGGAGCCCTTCCTCCGTGTTCTGTTATTGCTAGCTC

144▶heThrGluPheLeuGlnSerPheI leArgI leValGlnMetPheI leAsnThrSer•••

1101 GACATGATAAGATACATTGATGAGTTTGGACAAACCACAACCTAGAATGCAGTGAAAAAATGCCTTTATTTTGTAATTTTGATGCTATTGCTTTATTTG

1201 TGAATTTGTGATGCTATTGCTTTATTTGTAACCATTATAAGCTGCAATAAACAAGTTAACAAACAACATTGCATTCATTTTATGTTTCAGGTTACAGGG

SwaI (1355)

1301 GAGGTGTTGGGAGGTTTTTTAAAGCAAGTAAACCTCTACAAATGTGGTAGATCCATTAAATGTTAATTAAGAACATGTGAGCAAAAGGCCAGCAAAAGG

1401 CCAGGAACCGTAAAAAGGCCGCTTGCTGGCGTTTTTCCATAGGCTCCGCCCCCTGACGAGCATCACAAAAATCGACGCTCAAGTCAGAGGTGGCGAAA

1501 CCCGACAGGACTATAAAGATACCAGGCCTTTCCCCCTGGAAGCTCCCTCGTGGCTCTCTGTTCCGACCCTGCGGCTTACCGGATACCTGTCCGCCTTT

1601 CTCCCTTCGGGAAGCGTGGCGCTTCTCATAAGCTCAGCTGTAGGTATCTCAGTTCCGGTGTAGGTCGTTTCGCTCCAAGCTGGGCTGTGTGCACGAACCC

1701 CCGTTCAGCCCGACCGCTGCGCCTTATCCGGTAACATATCGTCTTGTAGTCCAAACCCGGTAAGACACGACTTATCGCCACTGGCAGCAGCCACTGGTAAACG

1801 GATTAGCAGAGCGAGGTATGTAGGCGGTGCTACAGAGTCTTGAAGTGGTGGCTAACTACGGCTACACTAGAAGAACAGTATTGGTATCTGCGCTCTG

1901 CTGAAGCCAGTTACCTTCGAAAAAGAGTTGGTAGCTCTTGATCCGGCAAACAACCACCGCTGGTAGCGGTGTTTTTTGTTTGCAAGCAGCAGATTA

2001 CGCGCAGAAAAAAGGATCTCAAGAAGATCCTTTGATCTTTTCTACGGGGTCTGACGCTCAGTGGAACGAAAACTCACGTTAAGGGATTTTGGTCATGCA

2101 TGAGACAATAACCTGATAAATGCTTCAATAATATTGAAAAAGGAAGATGAGTATTCAACATTTCCGTGTCGCCCTTATTCCCTTTTTTGCGGCATT

1▶MetSerI leGlnHisPheArgValAlaLeuI leProPhePheAlaAlaPh

2201 TTGCCTTCTGTTTTTGTCTACCCAGAAACCGTGGTGAAGTAAAGATGCTGAAGATCAGTGGGTGCACGAGTGGGTACATCGAACTGGATCTCAAC

17▶eCysLeuProValPheAlaHisProGluThrLeuValLysValLysAspAlaGluAspGlnLeuGlyAlaArgValGlyTyrI leGluLeuAspLeuAsn

2301 AGCGGTAAGATCCTTGAGAGTTTTCGCCCGAAGAAGCTTTTCCAATGATGACACTTTTAAAGTTCTGCTATGTGGCGCGGATTATCCCGATTTGACG

51▶SerGlyLysI leLeuGluSerPheArgProGluGluArgPheProMetMetSerThrPheLysValLeuLeuCysGlyAlaValLeuSerArgI leAspA

2401 CCGGCAAGAGCAACTCGGTCGCGCATACACTATTCTCAGAATGACTTGGTTGAGTACTCACCAAGTCAAGAAAGCATCTTACGGATGGCATGACAGT

84▶laGlyGlnGluGlnLeuGlyArgArgI leHisTyrSerGlnAsnAspLeuValGluTyrSerProValThrGluLysHisLeuThrAspGlyMetThrVa

2501 AAGAGAATTATGCAAGTGTCCATAACCATGAGTGATAACACTCGGCAACTTACTTCTGACACGATCGGAGGACCGAAGGAGCTAACCGCTTTTTTG

117▶IArgGluLeuCysSerAlaAlaI leThrMetSerAspAsnThrAlaAlaAsnLeuLeuLeuThrThrI leGlyGlyProLysGluLeuThrAlaPheLeu

2601 CACAACATGGGGATCATGTAACCTCGCTTGATCGTTGGGAACCGGAGCTGAATGAAGCCATACCAACGACGAGCGTGACACCACCGATGCCTGTAGCAA

151▶HisAsnMetGlyAspHisValThrArgLeuAspArgTrpGluProGluLeuAsnGluAlaI leProAsnAspGluArgAspThrThrMetProValAlaM

2701 TGGCAACACGTTGGCAAACCTATAACTGGCGAAGTACTACTCTAGCTTCCCGCAACAATAATAGACTGGATGGAGGCGGATAAAGTTGACGAGACC

184▶etAlaThrThrLeuArgLysLeuLeuThrGlyGluLeuLeuThrLeuAlaSerArgGlnGlnLeuI leAspTrpMetGluAlaAspLysValAlaGlyPr

2801 ACTTCTGCGCTCGGCCCTTCCGGCTGGCTGGTTTTATTTGCTGATAAATCTGGAGCCGGTGAGCGTGGGTCTCGCGGTATCATTGCAAGCACTGGGGCCAGAT

217▶oLeuLeuArgSerAlaLeuProAlaGlyTrpPheI leAlaAspLysSerGlyAlaGlyGluArgGlySerArgGlyI leI leAlaAlaLeuGlyProAsp

2901 GGTAAAGCCCTCCGATCGTAGTTATCTACACGACGGGGAGTCAGGCAACTATGGATGAACGAAATAGACAGATCGCTGAGATAGGTGCCTCACTGATTA

251▶GlyLysProSerArgI leValVal I leTyrThrThrGlySerGlnAlaThrMetAspGluArgAsnArgGlnI leAlaGluI leGlyAlaSerLeuI leL

3001 AGCATTGGTAACCTGCAGCAAGTTTACTCATATACCTTTAGATTGATTTAAACTTCATTTTTTAATTTAAAGGATCTAGGTGAAGATCCTTTTTTGA

284▶ysHisTrp•••

3101 TAATCTCATGCATGACATTAACTATAAAAAAGCGGTATCACGAGGCCCTTTCTGCTCGCGGTTTTCGGTGATGACGGTGAAAACCTCTGACACATGCA

3201 GCTCCCGGAGACGGTACAGCTTGCTGTAAGCGGATGCCGGGAGCAGACAAGCCCGTCAAGGCGCTCAGCGGGTGTGGCGGGTGTCCGGGCTGGCTT

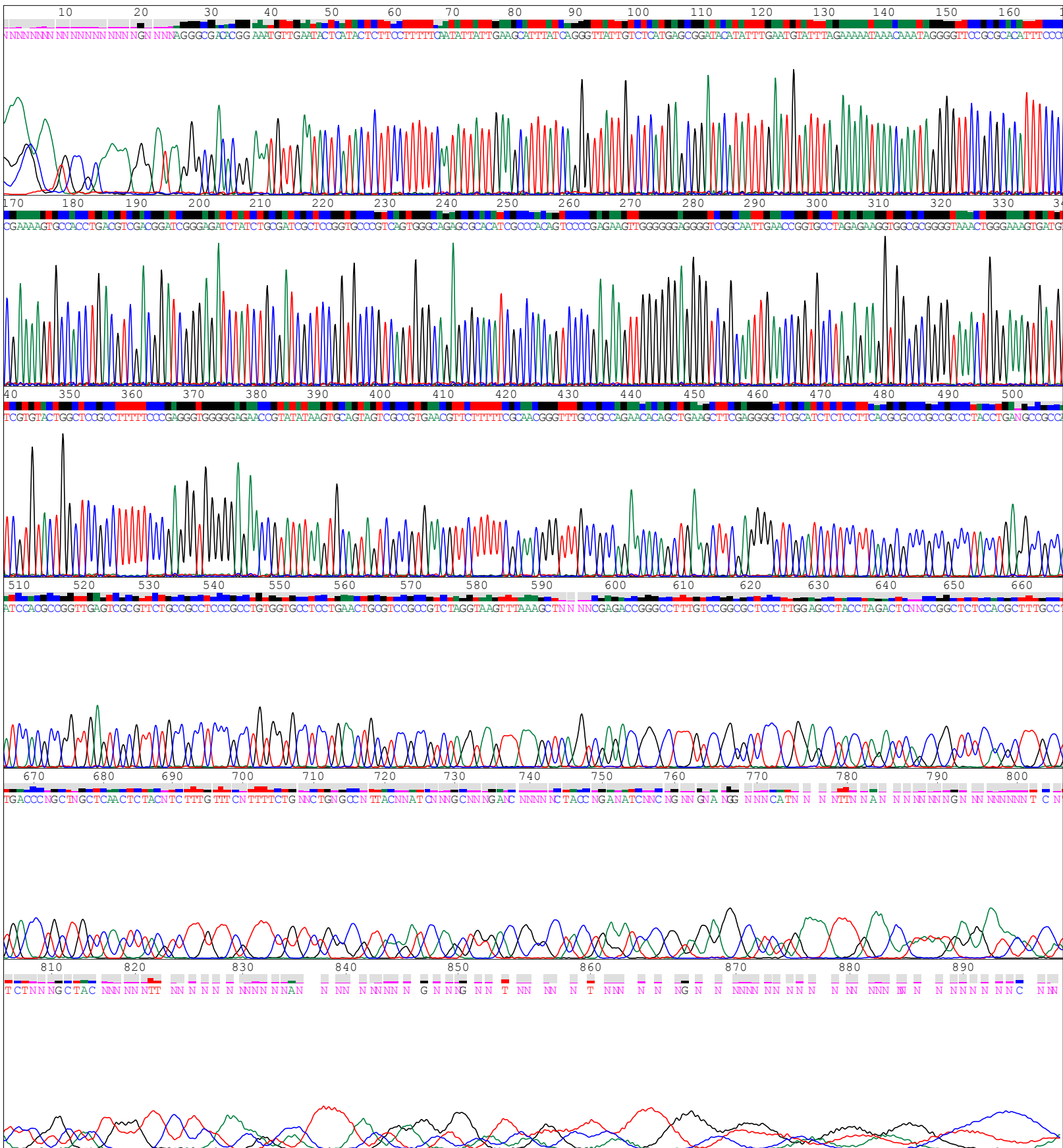
NotI (3361)

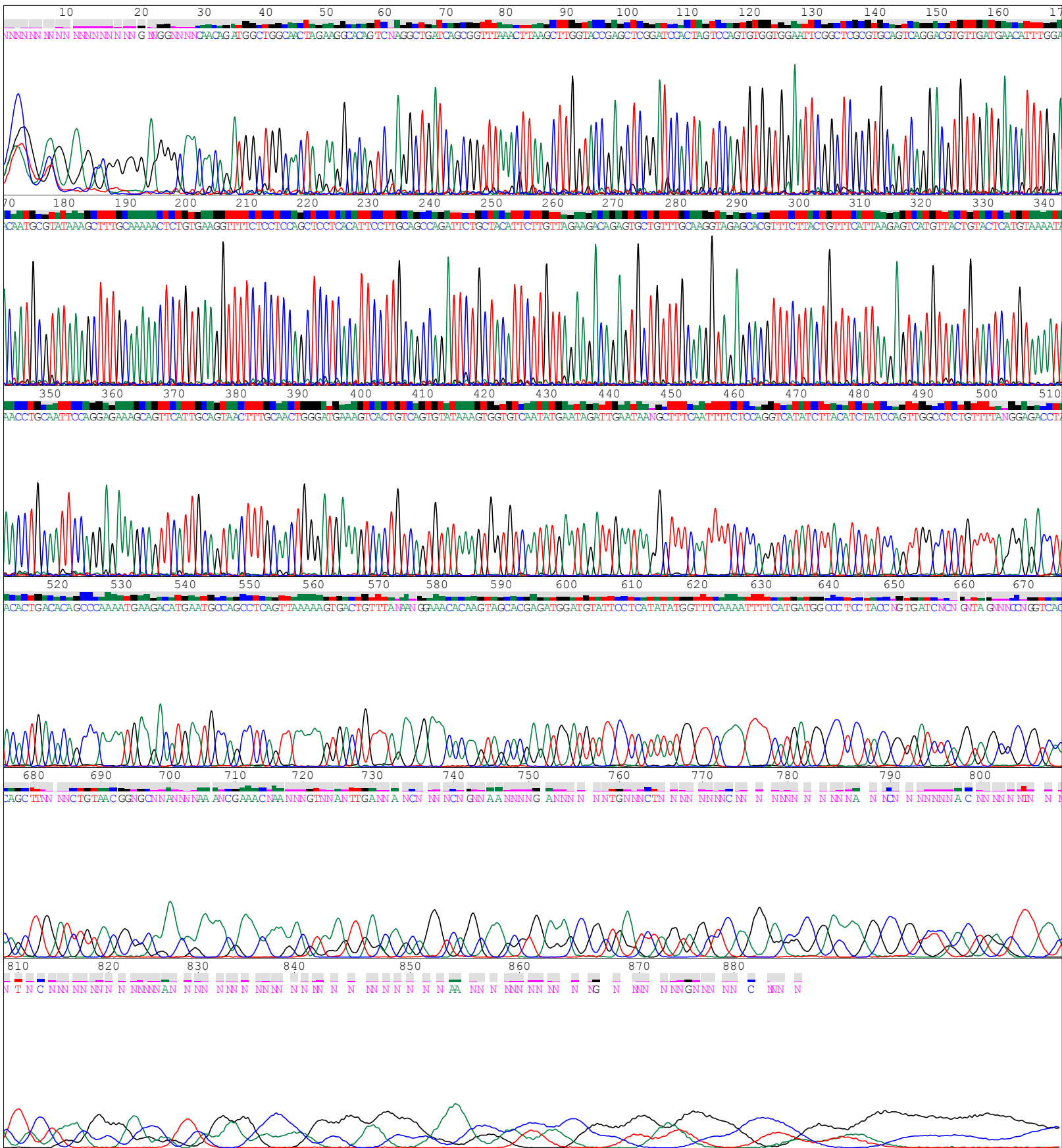
XhoI (3356)

3301 AACTATGCGGCATCAGAGCAGATTTGACTGAGAGTGACCATATGGTGACCGGATCTCGAGCGGCCGCAATAAAATATCTTTATTTTTCATTACATCTGTG

3401 TGTTGGTTTTTTGTGTAATCGTAACATAACGCTCTCCATCAAAAACAAAACGAAAACAAAACAACTAGCAAAATAGGCTGTCCCCAGTGC AAGTGCA

3501 GGTGCCAGAACATTTCTCTATCGAA





RESEARCH

Open Access



A novel non-Hodgkin lymphoma murine model closer to the standard clinical scenario

Thais Bascuas¹, María Moreno¹, Amy Mónaco¹, Laura Reyes³, Andrea Paolino³, Patricia Oliver³, María G. Kramer¹, Henry Engler³, José P. Pacheco⁴, Sofía Grille^{2†} and José A. Chabalgoity^{1*†}

Abstract

Background: Non-Hodgkin lymphomas (NHL) are the most frequent hemato-oncological malignancies. Despite recent major advances in treatment, a substantial proportion of patients relapses highlighting the need for new therapeutic modalities. Promissory results obtained in pre-clinical studies are usually not translated when moving into clinical trials. Pre-clinical studies are mainly conducted in animals with high tumor burden; instead patients undergo chemotherapy as first line of treatment and most likely are under remission when immunotherapies are applied. Thus, an animal model that more closely resembles patients' conditions would be a valuable tool.

Methods: BALB/c mice were injected subcutaneously with A20 lymphoma cells and after tumor development different doses of chemotherapy were assessed to find optimal conditions for minimal residual disease (MRD) establishment. Tumor growth and survival, as well as drugs side effects, were all evaluated. Complete lymphoma remission was monitored in vivo using positron emission tomography (PET), and the results were correlated with histology. Immunological status was assessed by splenocytes proliferation assays in NHL-complete remission mice and by analyzing tumor cell infiltrates and chemokines/cytokines gene expression in the tumor microenvironment of animals with residual lymphoma.

Results: Two cycles of CHOP chemotherapy at days 25 and 35 post-tumor implantation induced complete remission for around 20 days. PET showed to be a suitable follow-up technique for MRD condition with 85.7 and 75% of sensibility and specificity respectively. Proliferative responses upon mitogen stimulation were similar in animals that received chemotherapy and wild type mice. Tumors from animals with residual lymphoma showed higher numbers of CD4⁺ and CD8⁺ and similar numbers of NK, neutrophils and Tregs infiltrating cells as compared with non-treated animals. Gene expression of several cytokines as well as an array of chemokines associated with migration of activated T cells to tumor sites was upregulated in the tumor microenvironment of animals that received chemotherapy treatment.

Conclusions: We established a NHL-B pre-clinical model using standard chemotherapy to achieve MRD in immunocompetent animals. The MRD condition is maintained for approximately 20 days providing a therapeutic window of time where new immunotherapies can be tested in conditions closer to the clinics.

Keywords: Non-Hodgkin lymphoma (NHL), Immunotherapy, Chemotherapy, CHOP, Clinical, Positron emission tomography (PET), Minimal residual disease (MRD)

Background

Non-Hodgkin lymphomas (NHL) are the most frequent hemato-oncological malignancies. The current standard

of care for NHL treatment is chemotherapy, radiotherapy and monoclonal antibodies (i.e. Rituximab) [1]. Although these combined treatments can achieve high rates of complete remission, a substantial proportion of patients relapses with chemoresistant disease. Survival rates for NHL vary depending on the age, performance status, histological type, stage, (international prognostic index) IPI score and others prognostic factors. According to SEER

*Correspondence: jachabal@higiene.edu.uy

†Sofía Grille and José A. Chabalgoity share senior authorship

¹ Departamento de Desarrollo Biotecnológico, Instituto de Higiene, Facultad de Medicina, UdelaR, Montevideo, Uruguay

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



Cancer Statistics Review (CSR), the overall 5-year relative survival rate for all ages is 69%, and the 10-year relative survival rate is 59%; 86% for follicular lymphoma, and 61% for diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL) [2].

Active immunotherapy is a promising complementary approach for NHL treatment. Induction of tumor-specific adaptive immunity might generate long-lasting immunological memory able to prevent further relapses, and there is abundant literature demonstrating good rates of effectivity in pre-clinical models [3–5]. However, overall 85% of phase I–II clinical trials for novel treatments in cancer fail; and of those that progress to phase III, only half become approved for clinical use [6]. Pre-clinical NHL active immunotherapy studies are mainly performed in mice with high tumor burden that received no previous treatment, whereas clinical trials are performed in patients that have undergone chemotherapy and they are in complete or partial remission [3, 7]. Thus, murine models usually do not resemble the clinical scenario and this can be a major reason to explain the lack of consistency in results when moving into clinical trials [8]. The development of novel pre-clinical models that mimic the clinical setting could be valuable tool to explore new therapeutic strategies [9]. Particularly, it would be important to have a model in which animals achieved complete remission with chemotherapy and develop minimal residual disease (MRD) state.

We have previously assessed a murine NHL-B model where different immunotherapies were evaluated with promising results [10–12]. In the present study, we establish a new NHL-B pre-clinical model using standard chemotherapy (CHOP) to achieve complete response in immunocompetent animals. We believe that this model is more suitable to study new and optimized immunotherapies, thus it could be a valuable tool for pre-clinical studies that get closer to the clinics.

Methods

Animals and tumor cell line

Female BALB/c mice, 8–10 weeks old were used for in vivo experiments. Animals were housed on a 12:12 h light/dark cycles in racks with filtered air where food and water were given ad libitum.

The A20 cell line was derived from B lymphocytes of a naturally occurring reticulum cell sarcoma from an old BALB/cAnN mouse and was obtained from the American Type Culture Collection (Manassas, VA, USA). Cells were grown in RPMI-1640 medium (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) supplemented with 10% fetal bovine serum (PAN-Biotech, Aidenbach, Germany), 2 mM L-glutamine (Sigma) and 0.05 mM 2-mercaptoethanol (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) (RPMI complete medium) at 37 °C in 5% CO₂ atmosphere.

Cell transplantation

For tumor challenge, A20 were grown in culture and harvested in log phase, washed and resuspended to a final concentration of 5×10^6 cells/ml in PBS. 8–10 weeks-old syngeneic female BALB/c mice were injected subcutaneously (s.c.) into the right flank with 1×10^6 cells in 0.2 ml of PBS. Tumors were measured three times a week with a microcaliper in three dimensions, and tumor volumes were calculated as length \times width \times depth \times 0.5236, as previously described [13]. Mice were euthanized by cervical dislocation when tumors reached 3000 mm³ or before if they showed signs of distress. These time points were defined as survival time.

Chemotherapy treatment for MRD lymphoma model

The standard chemotherapy regimen in patients for aggressive NHL as well as the most used regimen for indolent NHL is a combination of cyclophosphamide, doxorubicin, vincristine and prednisone/steroids (CHOP) given every 21 days for 6–8 cycles [1, 14]. We used a CHOP regimen to treat mice bearing lymphoma where oral prednisone was substituted by intraperitoneal (i.p.) dexamethasone in order to achieve more uniform levels of steroid and to reduce chemical peritonitis. In each chemotherapy cycle we used the following doses: cyclophosphamide 100 mg/kg i.p., doxorubicin 6 mg/kg i.p., vincristine 0.1 mg/kg i.p. and dexamethasone 0.2 mg/kg i.p. At day 25 post-tumor implantation (p.t.i.), groups of mice ($n = 9$) that were inoculated with A20 cell line were treated either with one cycle of chemotherapy (CHOP \times 1), two cycles of chemotherapy (CHOP \times 2) or PBS as control and were followed for tumor growth and survival. Side effects were monitored, through weight changes evaluation and hematological toxicity. Lymphocytes, monocytes and neutrophils recovery post-CHOP were evaluated in an automated blood cell counter and in peripheral blood smears. Blood was obtained using a 27G needle puncturing the tail vein. This allows us to select the optimal period between CHOP cycles.

To avoid potential infections, prophylactic anti-infectious drugs (15 mg/kg of fluconazole and 20 mg/kg of acyclovir) were used during the neutropenia period.

Chemotherapy cytotoxicity

Cytotoxic effect of CHOP drugs on A20 tumor cell line was assessed in vitro by growth inhibition studies. Cells were seeded in 24-well plates at a density of 1×10^6 viable cells per well. Triplicate wells were treated with different concentrations of the drugs or PBS and Dimethyl sulfoxide (DMSO) as controls (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO). Cyclophosphamide, doxorubicin, and dexamethasone were tested 0.1, 1, 10, 100 nM and 1 μ M, and Vincristine was tested 10, 20, 30, 40, 50 and 70 nM. Plates

were incubated at 37 °C in a humidified incubator with 5% CO₂ for 96 h. Then, all cultures were monitored for cell viability using Trypan blue vital stain (Life Technologies, Carlsbad, CA), and Annexin V (BD Pharmingen, San Diego, CA) with Propidium iodide (PI) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO). The half maximal inhibitory concentration (IC₅₀) was calculated as the concentration (nM) that causes half of the cell mortality.

To evaluate *in vivo* toxicity, body weight was measured before and after CHOP administration. The body weight change (BWC) was calculated using the following formula: $BWC (\%) = \frac{[(\text{body weight on the last day}) - (\text{body weight on day 0})]}{(\text{body weight on day 0})} \times 100 (\%)$, as previously described [15].

Necropsy and histology

Mice were sacrificed at day 45 p.t.i. and necropsies were performed. Animals were examined macroscopically for lymphoma infiltration at primary sites or lymph nodes or other organs. Primary lymphoma site, inguinal and retroperitoneal lymph nodes, liver and spleen were removed and immersed in formalin buffered 10% at room temperature for 24 h. Organs were washed with PBS for 24 h at 4 °C and then immersed successively two times for 2 h in EtOH 95%, absolute alcohol, Xylol, paraffin and processed in paraffin blocks. Sections of 4 μm were cut and dewaxing immersed successively two times for 5 min in xylol and absolute alcohol, one time for 5 min in EtOH 95% and EtOH 90%. Then sections were washed three times with distilled water and stained with hematoxylin-eosin. Finally, sections were immersed successively for 3 s in EtOH 70%, EtOH 80%, EtOH 95%, absolute alcohol and Xylol, and assembled with Canada balsam. These sections were microscopically evaluated to detect lymphoma infiltration.

PET/CT imaging

Complete lymphoma remission was evaluated by *in vivo* imaging using positron emission tomography/computed tomography (PET/CT) scan with ¹⁸F-2-fluor-2-desoxy-D-glucosa (¹⁸F-FDG) as radiotracer. The study was performed in the Centro Uruguayo de Imagenología Molecular (CUDIM).

Image acquisition

PET/CT imaging in mice was performed using a tri-modality scanner (Triumph, Trifoil, Inc., US) with LYSO/LGSO scintillators (spatial resolution: 1.0 mm and an axial field of view: 3.75 cm). Data were acquired in list mode in a 184 × 184 × 31 matrix with pixel size: 0.25 × 0.25 × 1.175 mm; coincidence window width: 22.22 s.

Seventeen mice were evaluated by PET/CT, of which two died later on as result of cytotoxicity and thus were excluded from the analysis. Images were obtained before (day 25 p.t.i.) and after CHOP treatment when mice were in complete clinical remission (day 44 p.t.i.). The animals were anesthetized with 2% isoflurane in an oxygen flow of 2 l/min, placed in prone position on the scanner bed and injected via the caudal vein with 100 μl of (¹⁸F-FDG) (20 ± 5.4 MBq). PET images (static studies) acquisition started 30 min after radiotracer administration and performed over 60 min. Sinograms were reconstructed using 3D maximum likelihood expectation maximization (3D-MLEM).

Image analysis

Semi-quantitative analysis was done using PMOD software version 3.4 (PMOD Technologies, Ltd., Zurich, Switzerland). PET studies were co-registered with the corresponding CT scan studies for anatomical localization. Images were displayed as coronal, sagittal and axial slices.

For quantifying the specific uptake, volumes of interest (VOIs) were drawn manually on tumor as target (T) and skeletal muscle as non-target tissue (NT) [16]. The activity uptake was expressed as KBq/cc; results were expressed as T/NT.

Splenocyte proliferation assay

At day 45 p.t.i. mice in complete remission from CHOP×2 group as well as mice from PBS control were sacrificed and spleens were removed. Spleens were disrupted and prepared as a single-cell suspension. Splenocytes were stained with 1 μM of 5(6)-carboxyfluorescein diacetate *N*-succinimidyl ester (CFSE) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO). CFSE labeled splenocytes were incubated at 37 °C with 5% CO₂ in 24 wells plate at 2 × 10⁶ cells/ml density by triplicates in complete medium for 4 days and were stimulated with 1 μg/ml of Concanavalin A (ConA) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) or non-stimulated. After the incubation, cells were washed and stained with PI for 10 min in the dark at room temperature. Data were acquired by flow cytometry (FACS Canto II, Becton–Dickinson) and were analyzed with ModFit software (Verity Software House, Inc). For analysis, viable cells were gated based on FSC and PI profiles. The parent generation was set as the median fluorescence intensity using non-stimulated control sample.

Flow cytometry analysis of tumor-infiltrating cells

At day 45 p.t.i. mice with residual primary lymphoma from CHOP×2 group (i.e. animals with partial response to chemotherapy) as well as PBS control, were sacrificed

and tumors were removed and prepared as a single-cell suspension. Cells were immunostained at 4 °C in the dark for 30 min with the following panel of antibodies: FITC-conjugated anti-CD49b, PEcy7-conjugated anti-CD8, APC-conjugated anti-CD3, APCCy7-conjugated anti-CD4, PerCPCy5.5-conjugated anti-CD19, FITC-conjugated anti-CD4, PE-conjugated anti-FoxP3, PEcy7-conjugated anti-CD3, APC-conjugated anti-CD25, FITC-conjugated anti-Ly6C, PE-conjugated anti-Ly6G, (all reagents from BD Pharmingen, San Diego, CA). Optimal antibody concentration was previously defined by titration. For intracellular FoxP3 staining, cells were first stained with anti-CD4 and anti-CD25 antibodies, then fixed and permeabilized with a mouse FoxP3 buffer set (BD Pharmingen) according to the manufacturer's protocols. Cells were washed twice with permeabilization buffer and then incubated with anti-FoxP3 at 4 °C for 30 min in the dark. Flow cytometry data were collected on a FACS Canto II flow cytometer equipped with two lasers (Becton–Dickinson, Oxford, UK). For data acquisition and analysis, FACSDiva (Becton–Dickinson) and Infinicyt (Cytognos, Spain) software were used.

Determination of cytokines and chemokines in tumor microenvironment

Tumor microenvironment cytokines and chemokines mRNA levels were determined using quantitative reverse transcription-PCR. At day 45 p.t.i mice from PBS and CHOPx2 group, in which primary tumor persisted (partial remission), were sacrificed and tumors were removed, immersed in Trizol reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA) and stored at –80 °C until processed. Tumors were homogenized with an Ultra Turrax T8 homogenizer (IKA-Werke, Staufen, Germany) and RNA was extracted according to the manufacturer's instructions. RNA quality and quantity were assessed by spectrophotometric measurements at 260/280 nm in a NanoDrop 2000 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA). Before cDNA synthesis, 1 µg total RNA was treated with DNase I (Invitrogen), and first-strand cDNA synthesis was carried out using random primers (Invitrogen) and Moloney murine leukaemia virus reverse transcriptase (Invitrogen). Real-Time PCR (RT-PCR) was performed using a QuantiTect SYBR green PCR kit (Qiagen, Hilden, Germany) in a 7900HT RT-PCR System (Applied Biosystems, Foster City, CA). *B2m* gene was used as housekeeping gene. The primers used are listed in Table 1 and were used at a final concentration of 0.9 µM. The relative mRNA amount in each sample was calculated using the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method [17], where $\Delta Ct = Ct_{\text{gene of interest}} - Ct_{B2m}$ and expressed as relative mRNA levels in the test group compared with the control group (fold change).

Statistical analysis

Results were analyzed in SPSS 17.0 (Statistical Package for the Social Sciences) for Windows. Differences in survival times were determined using Kaplan–Meier and log-rank test. For tumor growth and in vitro assays the statistical significance of differences between study groups were analyzed using Student's t-test and analysis of variance (ANOVA). A value of $p < 0.05$ was considered statistically significant.

Receiver operating characteristic curve (ROC) was used to evaluate the T/NT ratio in the diagnosis of complete remission by assessing the area under the ROC curve (AUC), sensitivity, and specificity. The cut-off point was determined by maximizing the sum of sensitivity and specificity; histology was used as a gold standard variable.

Results

Chemotherapy efficacy and in vivo toxicity

First, we assessed the bioactivity of the cytostatic drugs on the A20 tumor cell line. The in vitro IC_{50} values obtained for doxorubicin and vincristine were 25 and 1 nM respectively, which are similar to the reported IC_{50} values of these two drugs on other tumor-sensitive cell lines, confirming the possibility of using them on the lymphoma model. Our results also confirmed that cyclophosphamide and dexamethasone cannot be evaluated in vitro since they both requires hepatic activation [18].

We then treated A20-bearing animals with increasing doses of CHOP starting with doses used in a previously reported xenograft lymphoma model [19]. Those particular doses did not show any anti-tumor effect on A20-bearing immunocompetent animals, so we doubled them and found that they were too toxic and all animals succumbed to the treatment (results not shown). Thus, we decided to assess intermediate values and to apply two cycles separated ten days apart. This interval between cycles was decided based on results from white blood cells peripheral count that demonstrated complete bone marrow regeneration at day 10 post-chemotherapy. Overall, these studies provided us with an optimal CHOP doses regime for treatment as described in Methods. At these particular doses, animals had an acceptable tolerance to chemotherapy. Particularly, no animals died with one cycle of CHOP, while 18% of animals receiving two cycles of CHOP died by chemotherapy cytotoxicity. Low levels of toxicity were also evidenced by variations in body weight over time (Fig. 1a). The highest decrease in weight was observed ten days after second CHOP cycle, and after that, animals started to recover towards average normal body weight. Cachexia was not observed at any time after CHOP administration. Transient neutropenia and monocytopenia were observed post CHOP, but

Table 1 Sequences of primers used for quantitative RT-PCR

Gene	Forward primer (5'–3')	Reverse primer (5'–3')	Product length (bp)
<i>B2m</i>	CCTGCAGAGTTAAGCATGCCAG	TGCTTGATCACATGTCTCGATCC	72
<i>Ccl2</i>	CCCTCAACGGGAAGAACCAAA	CACATCAGGTACGATCCAGGC	72
<i>Ccl3</i>	AACATCATGAAGTCTCCAC	CCAAGACTCTCAGGCATTCA	294
<i>Ccl4</i>	GCCCTCTCTCTCTCTTGCT	GTCTGCCTCTTTTGGTCAGG	196
<i>Ccl5</i>	GGTACCATGAAGATCTCTGCA	AAACCCTCTATCTAGCTCAT	294
<i>Ccl20</i>	TTTTGGGATGGAATTGGACAC	TGCAGGTGAAGCCTTCAACC	69
<i>Cxcr4</i>	TTCTCATCTGGCCTTCATC	CTTTTCAGCCAGCAGTTTCC	92
<i>Cxcr7</i>	GCCGTACCATTTTGTGGTTC	TGCAACGCTGTAAAGAGCAC	96
<i>Cxcl1</i>	CTTGTTTCAGAAAATTGTCCAAA	ACGGTGCCATCAGAGCAGTCT	84
<i>Cxcl9</i>	TGGAGCAGTGTGGAGTTCGA	CCTCGGCTGGTGTGATG	73
<i>Cxcl10</i>	GCCGTCAATTTTGCCTCAT	GCTTCCCTATGGCCCTCATT	127
<i>Cxcl11</i>	CAAAATGGCAGAGATCGAGAAA	TGAGCCTTCATAGTAACAATCACTTCA	87
<i>Cxcl12</i>	GAAGTGGAGCCATAGTAATGCC	TCCAAGTGAAAAATACACCG	133
<i>Cxcl13</i>	CAACTGTTGTCGGTCTAAACATCAT	GGTCCAGATCACAACCTCAGTTTTG	89
<i>Gal-1 (Galectina-1)</i>	TGAACCTGGGAAAAGACAGC	TCAGCCTGGTCAAAGGTGAT	190
<i>Il2</i>	CCTGAGCAGGATGGAGAATTACA	CTTTCAATTCTGTGGCCTGCTTGGG	92
<i>Il4</i>	ACAGGAGAAGGGACGCCAT	GAAGCCCTACAGACGAGCTCA	95
<i>Il6</i>	GTTCTCTGGGAAATCGTGAAAA	AAGTGCATCATCGTTGTTTCATAA	78
<i>Il10</i>	CATTTGAATTCCCTGGGTGAGA	TGCTCCACTGCCTTGCTCTT	101
<i>Il12</i>	ATCACACGGGACCAAACCA	CAGGCAACTCTCGTTCTTGTTAGT	74
<i>Il17a</i>	CTCCAGAAGGCCCTCAGACTAC	GGGTCTTCATTGCGGTGG	69
<i>lfn3</i>	TCAGCAACAGCAAGGCGAAA	CCGCTTCTGAGGCTGGAT	143
<i>Tgfb</i>	GCTGAACCAAGGAGACGGAAAT	GAGTTTGTATCTTTGCTGTCAAGA	76
<i>Foxp3</i>	CCCAGGAAAAGACAGCAACCTT	TTCTACAACCAGGCCACTTG	89
<i>Tnfa</i>	CATCTCTCAAAATTCGAGTGACAA	CCTCCACTTGGTGGTTTGCT	63

normal values were recovered by day 10–15. Both CHOP cycles induced transient myelosuppression (Fig. 1b). Instead, lymphocytes levels in blood also decreased after CHOP, and values did not return to previous values within the time frame of the experiments.

All in all, these results showed that we had found a suitable chemotherapy treatment with reasonable toxicity levels.

Tumor development and survival rate

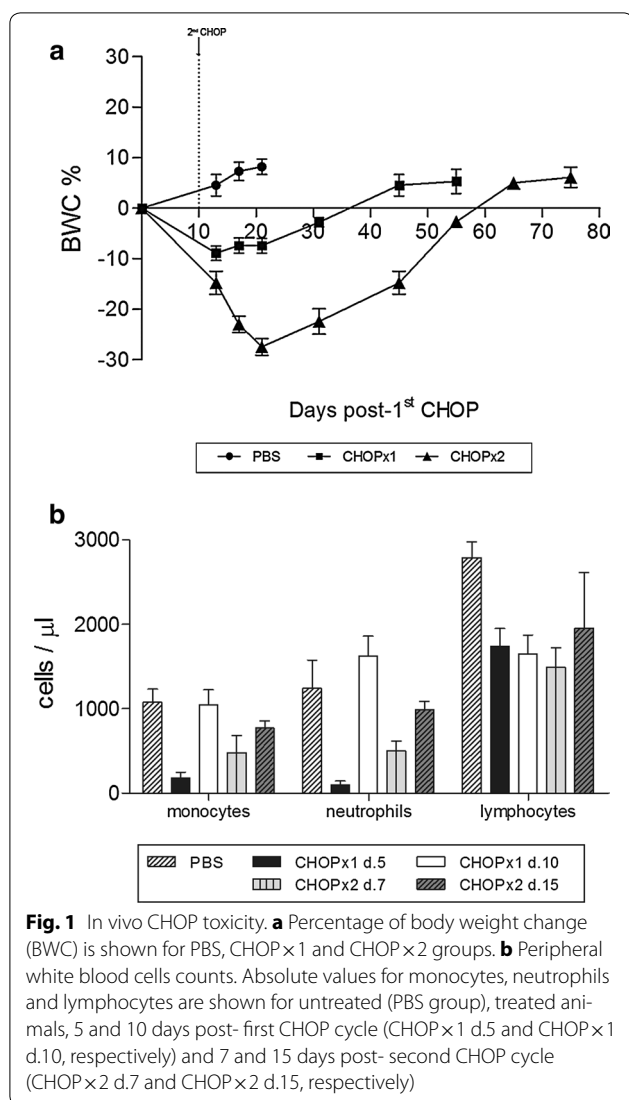
We then evaluated the effect of the selected CHOP regimen on tumor development and survival. As previously shown by us [10], A20-bearing animals that do not receive any treatment show sustained tumor growth over time and a median survival of around 35 days. On the contrary, animals receiving either one or two doses of chemotherapy showed a decrease in tumor growth from day 25 p.t.i., starting immediately after the first CHOP cycle (Fig. 2a). Mice receiving a single CHOP dose had a period when tumor volume decreases and it was close to zero, but this status lasted only for a few days. Instead, in the group of animals receiving two doses of CHOP, around 92% of animals showed clinical complete

remission of the primary tumor for a longer period of approximately 20 days (Fig. 2a, b). After that tumors started to grow again and eventually all mice died for lymphoma disease. Reasons of death among the animals depended of the particular treatment group and were either drug toxicity or respiratory distress, most likely due to metastasis, or the animals where euthanized for ethical reasons when the tumor reached a pre-defined volume size of 3000 mm³ (Table 2). Survival among animals receiving any chemotherapy regimen was extended, but it was significantly higher among animals receiving two cycles of chemotherapy (Fig. 2c).

Evaluation of remission in treated animals

Histology

A major aim of our work was to develop a lymphoma MRD model as a more suitable model for immunotherapy assessment. For this, we treated the animals with two doses of CHOP and achieved complete clinical remission during a period of around 20 days. To confirm complete remission in these animals, five mice per group were euthanized at day 45 p.t.i. to perform necropsies and histological analysis. Macroscopically, control animals (no



treatment) showed disseminated disease with extensive lymph nodes and/or hepatic involvement (Fig. 3a). There were lymphoma infiltrations at inguinal and retroperitoneal lymph nodes. Instead, CHOPx2 animals did not show any disseminated disease (Fig. 3b). We also evaluated by histology the primary tumor site, draining lymph nodes, retroperitoneal lymph nodes, spleen, liver and other tissues of abnormal appearance in order to evaluate lymphoma infiltration. Hematoxylin-eosin stained sections demonstrated tumor tissue consisting of a diffuse growth pattern with large and cohesive tumor cells with pleomorphic nuclei resembling centroblast and some small/medium size centrocyte-like cells. Numerous small vessels (capillaries and arterioles) were visible among the tumor cells (Fig. 4). These cells were histological similar to human DLBCL. Liver involvement was 76 and 11% for

control and CHOPx2 groups respectively as evaluated by histology. Liver lymphoma infiltration was characterized by atypical large lymphoid cells with central perivascular distribution within the liver parenchyma (Fig. 4d).

PET-CT evaluation

Advanced imaging techniques can improve disease assessment, not least because they allow response evaluation to treatment and follow-up without the need of sacrificing animals. We evaluated PET as an alternative for in vivo monitoring of the disease. For this, we first demonstrated glucose analogue (¹⁸F-FDG) uptake by A20 lymphoma cells in tumor-bearing mice confirming that ¹⁸F-FDG was a good radiotracer for PET imaging in A20 model.

PET-CT imaging was performed before (day 25 p.t.i.) and after (day 45 p.t.i.) CHOP treatment in order to evaluate ¹⁸F-FDG uptake and to confirm the complete remission (MRD negative status). Post-chemotherapy, T/NT cut-off value was set to 2.45 and calculated using a ROC curve with histology as a gold standard. T/NT values of 2.45 or more were considered residual lymphoma disease. The AUC reached 0.74 (95% CI 0.6–0.991), with a sensitivity of 85.7% and specificity of 75%. Considering this cut-off value, pre-CHOP imaging (day 25 p.t.i.) indicated primary tumor uptake without metastasis as expected (Fig. 5a). On the other hand, post-CHOP PET image analysis (day 45 p.t.i.) revealed complete remission in many animals (Fig. 5b). Other mice had uptake at the site of the primary tumor (Fig. 5c), in disagreement with the histology result, suggesting the existence of false positive. Animals that had residual primary tumor after CHOPx2 treatment also presented retroperitoneum and liver ¹⁸F-FDG uptake (Fig. 5c) evidencing the existence of metastasis in accordance with histology results.

Immunological status after chemotherapy treatment

In order to assess the immunological status of CHOP-treated animals, five mice per group were sacrificed at day 45 p.t.i. and spleens were removed for proliferation assays. As shown in Fig. 6, mice in complete remission showed similar proliferation rate upon mitogen stimulation than control mice (PBS).

Additionally, mice with residual lymphoma (partial response) post CHOPx2 treatment were also sacrificed at day 45 p.t.i., and the primary tumor was removed to evaluate tumor-infiltrating populations. Animal from CHOPx2 group showed significantly higher numbers of CD4⁺ (p = 0.0023) and CD8⁺ (p = 0.0034) tumor-infiltrating T cells as compared with animals from the control group (Fig. 7). Numbers of NK cells, regulatory T cells

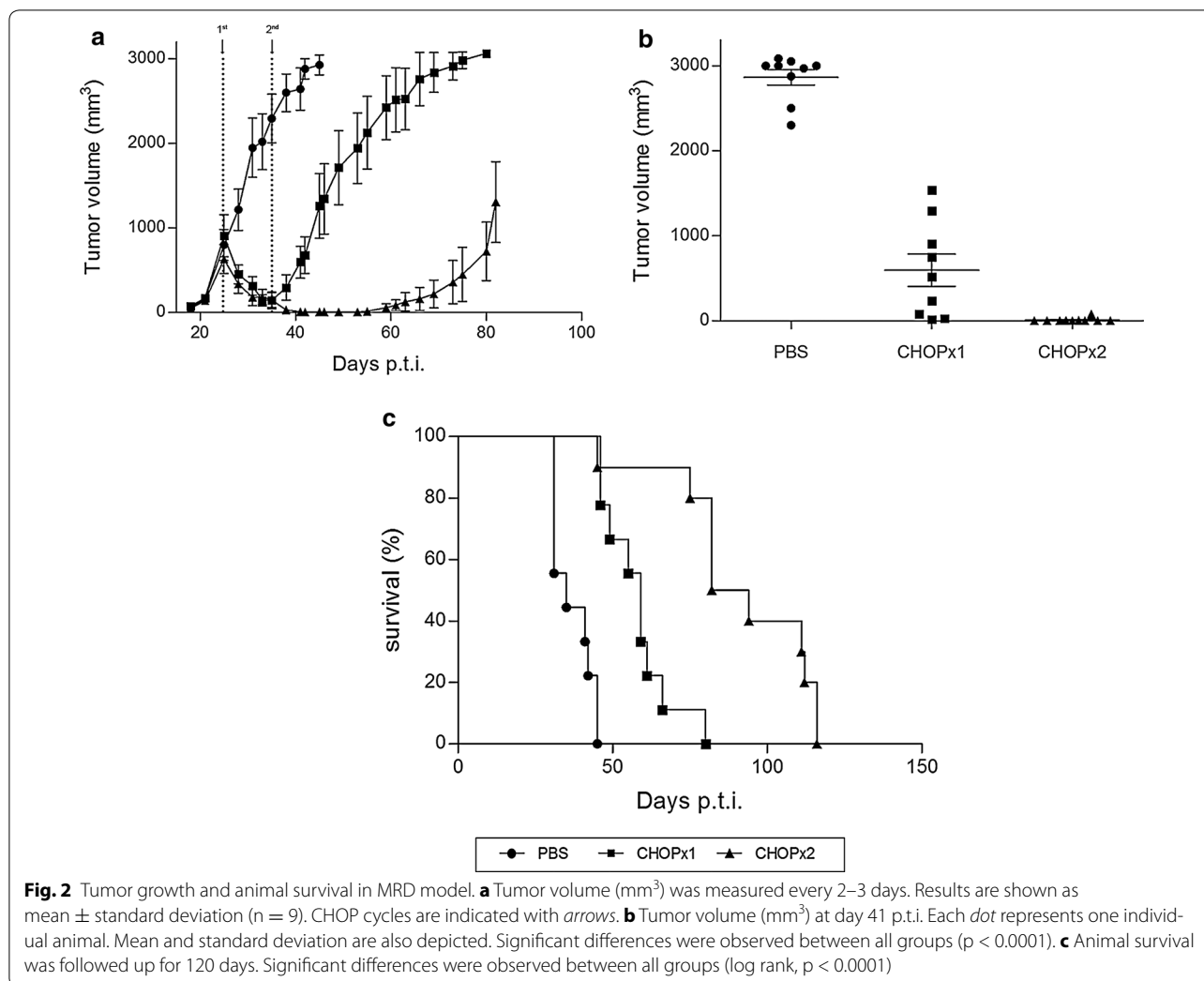


Table 2 Percentage of animal death related to drug resistance, metastatic disease and primary tumor

	PBS	CHOP x1	CHOP x2
Drug toxicity	NA	0%	18%
Metastatic disease	0%	25%	47%
Primary tumor (>3000 mm ³)	100%	75%	35%

NA not applicable

(Treg) and neutrophils cells in the tumors were similar in treated and non-treated animals. Analysis of cytokines and chemokines mRNA levels in the tumor microenvironment of animals with partial response to chemotherapy showed significant increases in mRNA levels for *Ccl3*, *Ccl4*, *Ccl5*, *Cxcl9*, *Cxcl12*, *Il2*, *Il12* and *Ifng* whereas *Cxcr4* and *Tgfb* gene expression were significantly repressed as compared with tumors from untreated mice (Fig. 8).

Discussion

Therapies against NHL have achieved substantial success in the last few years [2, 3], but rates of relapse are still high fostering the research on new therapeutic approaches. Animal models are essential for research and development of novel immunotherapies, and the use of well-characterized inbred laboratory mice is most likely one of the best experimental systems for cancer research. Cancer development has similar physiologic characteristics in mice and humans with the acquisition of mutations in equivalent oncogenes and suppression genes [20, 21]. Xenograft models are widely used to demonstrate pre-clinical activity of drugs prior clinical evaluation, but they are not adequate for testing immunotherapies or studying tumor microenvironment because these require immunocompetent mice [9]. Also, in order to more accurately predict human responses NHL immunotherapies should be tested in a similar context to that usually found

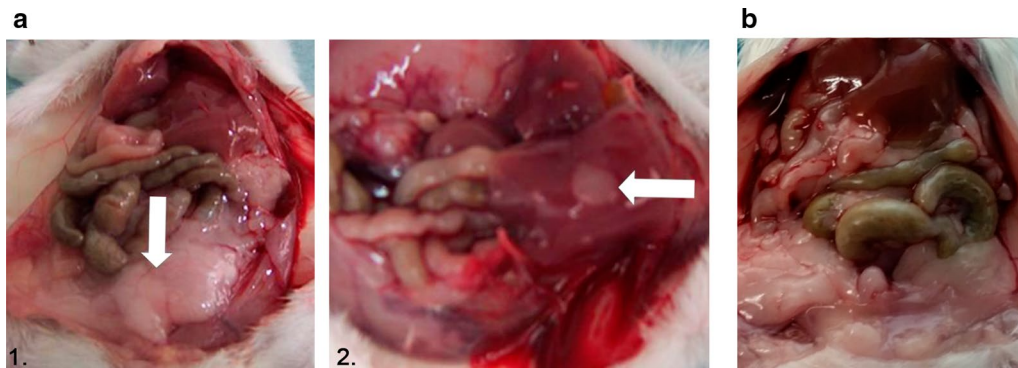


Fig. 3 Necropsy of chemotherapy-treated and untreated animals at day 45 p.t.i. **a** Untreated mouse: retroperitoneal (1) and hepatic (2) involvement are indicated with arrows. **b** CHOP x2-treated mouse in complete remission

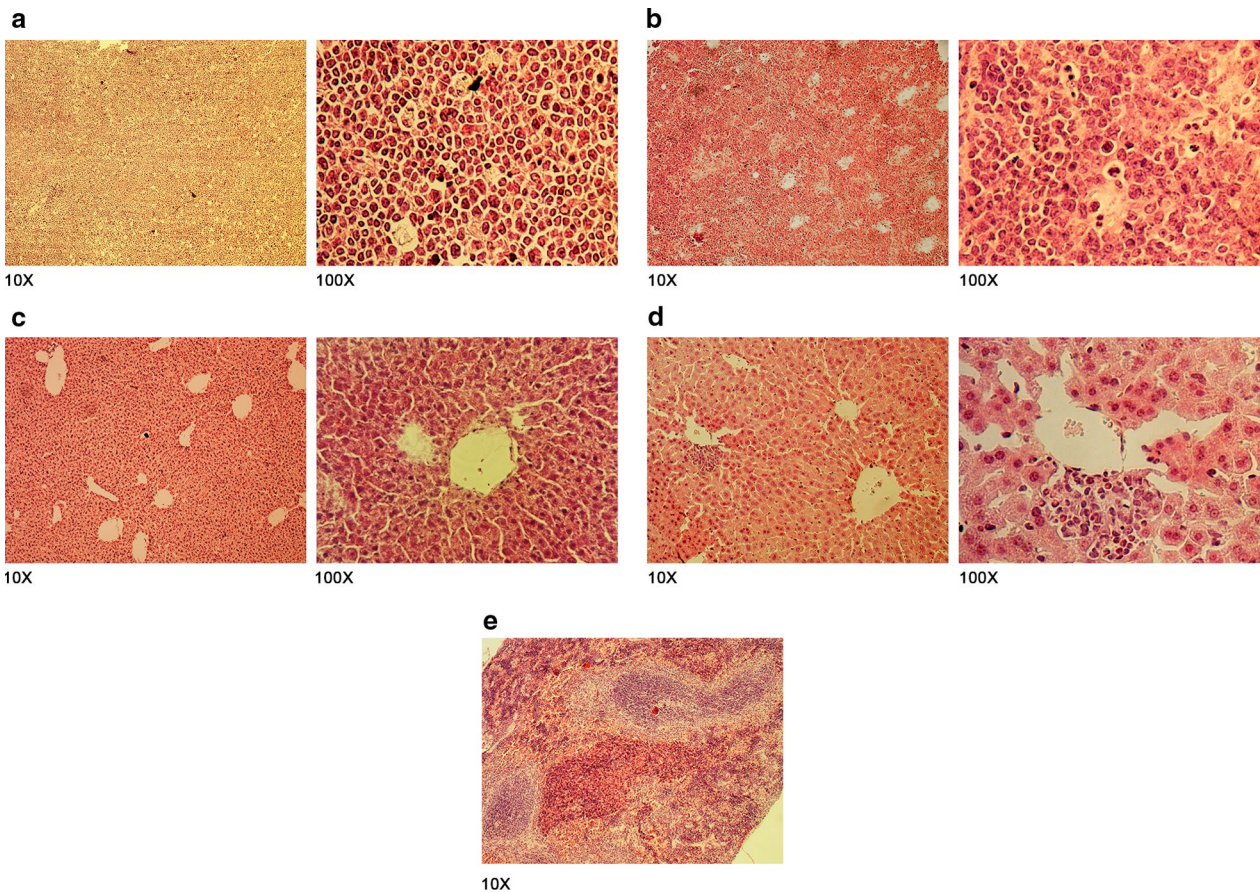
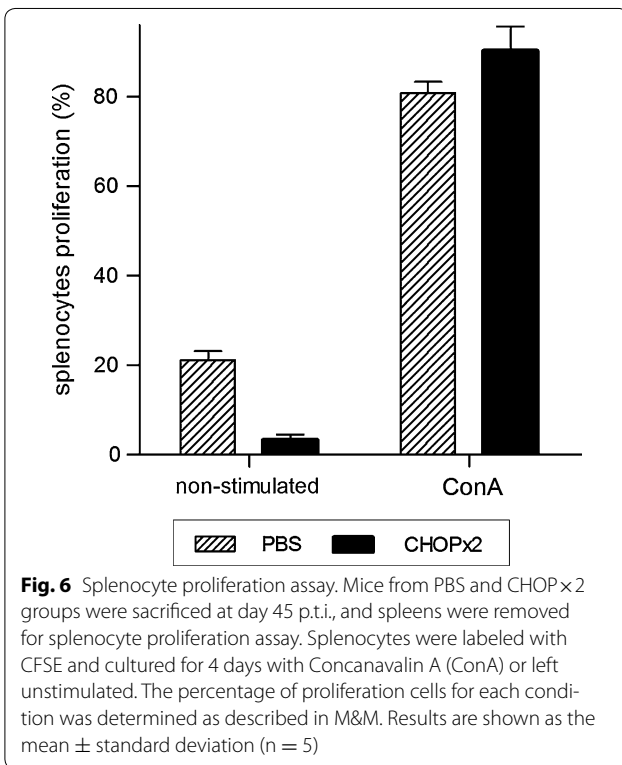
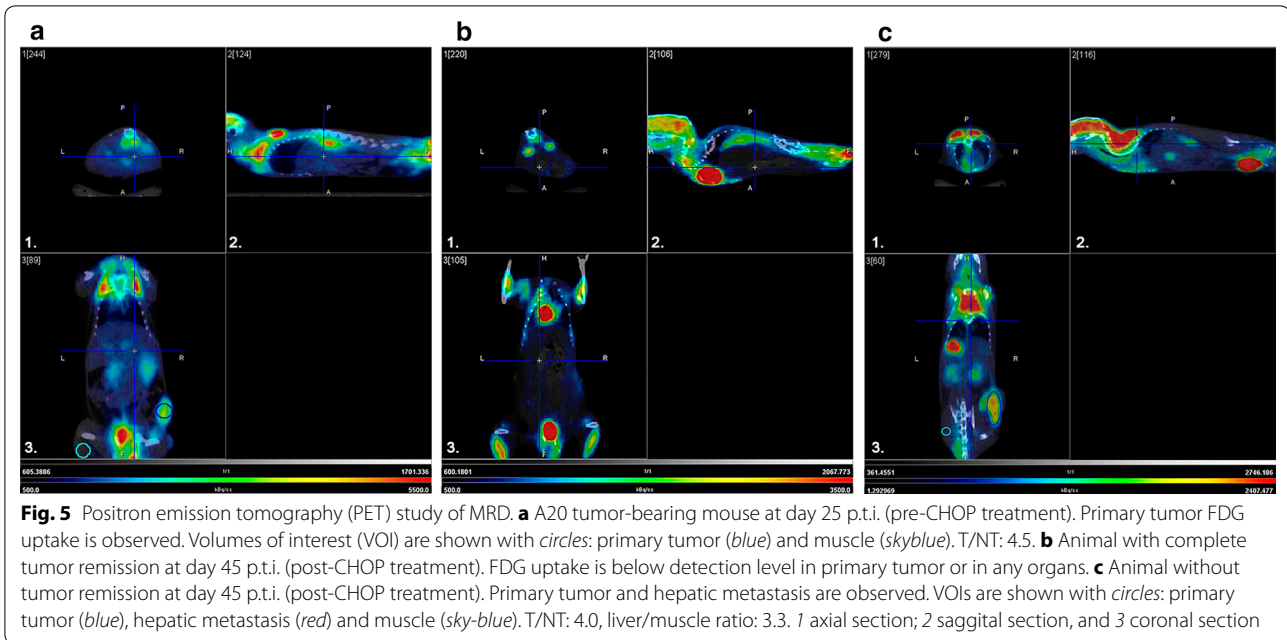


Fig. 4 Histological study of MRD. **a** Primary tumor sections from a control mouse (PBS group): NHL-B histology is observed and corresponds to a diffuse infiltration by centrocytes and centroblasts with a starry sky pattern, due to high proliferation rate. **b** Retroperitoneal sections from a mouse where NHL disease persists post-chemotherapy: similar histology of primary tumor is observed. **c** Liver sections from a mouse with complete remission: typical healthy hepatic architecture with the centrilobular veins and hepatic sinusoids is observed. **d** Tumor-infiltrated liver sections from a mouse where NHL disease persists post-chemotherapy: infiltrating tumor cells are observed in portal field. **e** Spleen section from mouse with complete remission: normal architecture with the white and red pulp is observed

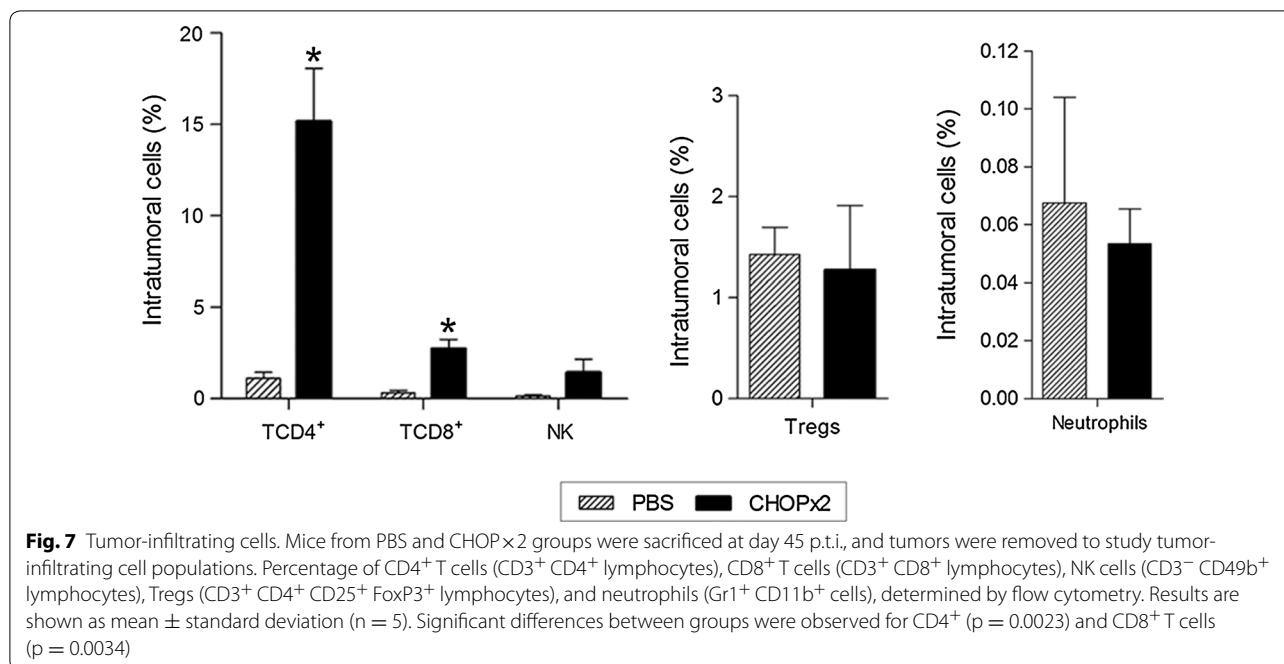


in humans, which for most of the cases implies chemotherapy-treated patients. Chemotherapy can modulate distinct features of tumor immunobiology and the optimal integration of immunotherapies with standard chemotherapies to minimize antagonistic interactions

and engage potential synergies is a major challenge [22]. Ideally, immunotherapy should be applied in the setting of MRD, after the tumor mass has been reduced with systemic chemotherapy. This strategy should minimize the negative impact of tumor bulk on the immune response and might work potentiating the immunological effects of chemotherapy. Indeed, the use of immunotherapy associated with traditional agents, as combination therapy, is now the standard for treatment of many types of cancer, improving clinical outcomes.

Many clinical trials with vaccines against NHL have shown anti-tumoral responses after achieving complete or partial remission with chemotherapy [3, 5, 23, 24]. For all these reasons, we propose that pre-clinical investigation in NHL should be attempted in a murine model that mimics that clinical setting.

The four-drug combination CHOP (cyclophosphamide, doxorubicin, vincristine, and steroids) with Rituximab has become the “standard” first line treatment for aggressive NHL (most frequently diffuse large B cell lymphoma) and it is the most used regimen for treat indolent lymphoma [1, 14, 25, 26]. In order to define more suitable pre-clinical conditions, we assessed the use of CHOP to generate a new model in A20-bearing animals that more closely resemble the clinical scenario. First, we tested the in vitro sensitivity of A20 cells to CHOP drugs. We found that the IC₅₀ for doxorubicin and vincristine in A20 cells were similar to those reported by DiJoseph et al. in other lymphoma cell line [18]. Since cyclophosphamide and dexamethasone could not be evaluated because they require hepatic activation, we then tested



the combination of drugs in vivo in A20-bearing animals, and found that a two-cycles drug schedule induces lymphoma remission for at least 20 days (MRD status) in a highly reproducible way. This schedule was well tolerated with transient and mild neutropenia and body weight loss.

We also found that administration of chemotherapy did not result in immunosuppression in A20-bearing animals. Cancer chemotherapy was historically considered as promoting immunosuppression, but recent studies have demonstrated that certain chemotherapies can instead augment tumor immunity in addition to their cytotoxic effect. Chemotherapy can promote anti-tumor immune responses by increasing the immunogenicity of malignant cell, or by inhibiting immunosuppressive circuits that are established by cancer [27–29]. Some chemotherapy drugs at their standard dose mediate their tumor effect, at least in part, by inducing immunogenic cell death, which involves the release of tumor antigens and danger-associated molecular patterns (DAMPs) in the tumor microenvironment, resulting in a proinflammatory microenvironment, where specific anti-tumor immunity may be developed [28]. It has also been demonstrated that chemotherapy can modulate the activity of immune T-cell subsets decreasing the number of Tregs cells, shifting CD4⁺ T helper phenotype from type 2 to type 1, inducing the differentiation of Th17 cells, and promoting the evolution of a durable T-cell memory [28]. We found that animals receiving the two CHOP doses (CHOPx2 group) have higher numbers of CD4⁺ and

CD8⁺ T cells recruited to the tumor as well as a significant increase in *Il12* and *Ifng* and a decrease in *Tgfb* gene expression reinforcing the idea that CHOP treatment may indeed stimulate the development of effective anti-tumor immunity [30].

Increasing evidence indicates that the tumor microenvironment has critical roles in all aspects of cancer biology, including growth, angiogenesis, metastasis and progression. In this regard, it is recognized that chemokines and their receptors, originally identified as mediators of inflammatory diseases, serve as critical communication bridges between tumor cells and stromal cells to create a permissive microenvironment for tumor growth and metastasis [31–34]. In melanoma, it has been demonstrated that up regulation of expression of several chemokine genes such as *Ccl2*, *Ccl3*, *Ccl4*, *Ccl5*, *Cxcl9*, and *Cxcl10* in the tumor microenvironment correlates with the recruitment of activated effector T cells to the tumor increasing antitumor immunity [35]. Conversely, it has also been reported low amount of these chemokines in poorly infiltrated melanomas and colorectal carcinomas [35–37]. Our results showing a significant increase in *Ccl3*, *Ccl4*, *Ccl5* and *Cxcl9* genes expression in CHOPx2 group versus PBS group at day 45 p.t.i. are in accordance with those previously reported results, and confirm that in our model post-chemotherapy mice are fully immunocompetent. Furthermore, in CHOPx2 group we found a significant increase in *Cxcl12* expression but not in expression of its receptor *cxc4*. The CXCL12–CXCR4 biological axis has been associated

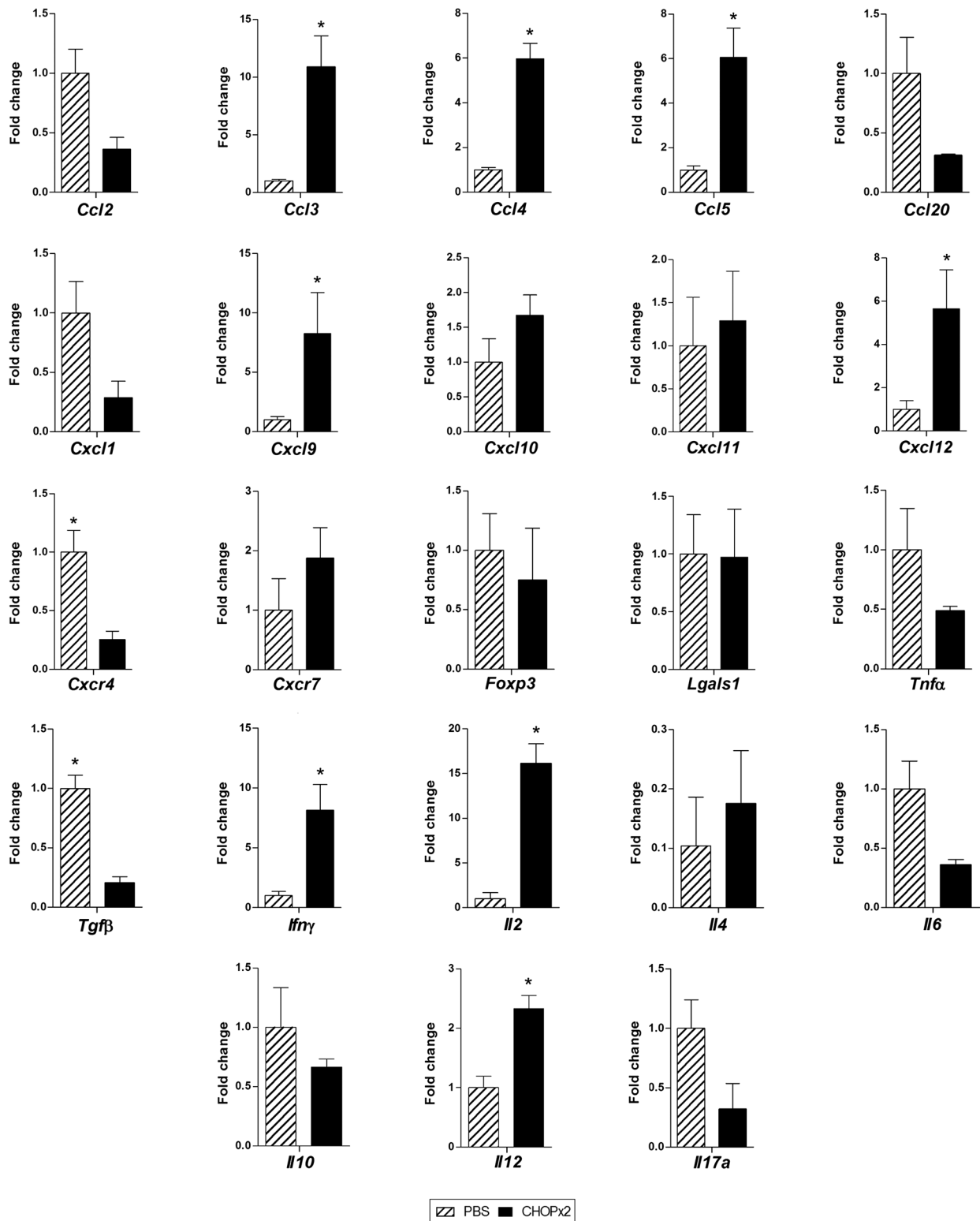


Fig. 8 Cytokine/chemokine gene expression levels in the tumor microenvironment. Mice from PBS and CHOPx2 groups were sacrificed at day 45 p.t.i., and tumors were removed to assess the expression of cytokine and chemokines genes by quantitative RT-PCR on total tumor RNA. Gene mRNA values were normalized to that of *B2m* mRNA, and the results are expressed relative to mRNA levels in the PBS group. Results are shown as mean \pm standard deviation (n = 5). Significant differences were observed for *Ccl3*, *Ccl4*, *Ccl5*, *Cxcr4*, *Cxcl9*, *Cxcl12*, *Il2*, *Il12*, *Il1g* and *Tgfb* genes (p < 0.05)

with tumor invasion and metastases. In fact, CXCR4 is the most common chemokine receptor overexpressed in human cancer [32].

To confirm remission and monitored the disease an *in vivo* imaging system (PET) was applied in our model. When tumor cannot be detected clinically the use of PET post-chemotherapy allows a diagnosis of complete remission. PET is a minimal invasive technology easy to perform on anaesthetized mice, offering serial dynamic observations of tumor development in the same animal. In recent years, the use of PET in the diagnosis and monitoring of NHL patients, as well as other types of cancer, has increased [30, 38]. The most frequent radiotracer used in oncology is the glucose analogue FDG labelled with the positron-emitting radionuclide ^{18}F . Several studies have demonstrated ^{18}F -FDG increased uptake in most lymphomas, with a good correlation between intensity uptake, malignancy and proliferation activity [39]. Chaise et al. demonstrated the feasibility of PET using ^{18}F -FDG in high-tumor burden A20 murine model [40]. In this study we could evaluate the treatment response detecting intra-abdominal lymphoma and hepatic involvement. There was a good correlation between PET images and histology. To the best of our knowledge, our study is the first to assess the value of FDG-PET for *in vivo* evaluation of post-chemotherapy remission in a murine NHL model. In patients, it is accepted that post-chemotherapy inflammatory reactions increase the rate of false positives results obtained with PET. To minimized this in NHL patient the PET scan should be performed after at least 3 weeks post-chemotherapy [41]. A meta-analysis performed by Zijlstra et al. revealed a pooled sensitivity and specificity of 72% (95% CI 61–82%) and 100% (95% CI 97–100%), respectively [42]. In our PET studies we reached a good sensitivity (85.7%) whereas specificity was 75%. The lower specificity results compared with data reported in human could be explained by the remaining inflammation at the time of our analysis.

Overall, we describe a NHL-B MRD syngeneic murine model as a novel tool to evaluate immunotherapies effectiveness as well as to study tumor microenvironment in relapse lymphoma. This model is unique in many aspects, inasmuch: (a) it uses fully immunocompetent mice; (b) remission is obtained by CHOP chemotherapy using the same cytostatic drugs that are the first line standard treatment for NHL in humans; (c) lymphoma complete remission is reached and maintained for a reasonable therapeutic window (20 days) where immunotherapies can be tested; (d) animals remains immunocompetent despite chemotherapy; (e) it uses an *in vivo* imaging system to follow disease evolution that correlates well with histology as gold standard.

Conclusions

We have developed a novel pre-clinical model for NHL lymphoma that resembles more closely the situation found in humans, providing a therapeutic window where immunotherapies can be tested in conditions closer to those found in patients. We feel that the availability of such a model provides an important tool for evaluating new immunotherapies and will help to bridge the gap between pre-clinical models and clinical trials.

Abbreviations

ANOVA: analysis of variance; AUC: area under the curve; BWC: body weight change; CFSE: 5(6)-carboxyfluorescein diacetate *N*-succinimidyl ester; CHOP: cyclophosphamide, doxorubicin, vincristine, steroids; CHOP×1: one cycle of CHOP regimen; CHOP×2: two cycles of CHOP regimen; ConA: concanavalin A; CRT: calreticulin; CSR: cancer statistics review; DAMPs: danger-associated molecular patterns; DLBCL: diffuse large B cell lymphoma; 3D-MLEM: 3D maximum likelihood expectation maximization; DMSO: dimethyl sulfoxide; ^{18}F -FDG: ^{18}F -2-Fluor-2-desoxy-D-glucosa; IC_{50} : half maximal inhibitory concentration; i.p: intraperitoneal; IPI: international prognostic index; MRD: minimal residual disease; NHL: non-Hodgkin lymphoma; NT: non-target tissue; PBS: phosphate-buffered saline; PET/CT: positron emission tomography/computed tomography; PI: propidium iodide; p.t.i: post-tumor implantation; ROC: receiver operating characteristic; RT-PCR: real time-polymerase chain reaction; s.c: subcutaneously; SEER: surveillance, epidemiology, and end results program; T: target tissue; Tregs: regulatory T cells; VOIs: volumes of interest.

Authors' contributions

SG and JAC conceived and supervised the project, designed the experiments and analyzed the data. TB designed and performed the experiments, and analyzed data. MM, AM and MGK helped with the *in vivo* experiments and analysis of the data. LR, AP, PO and HE designed PET experiments, performed and analyzed PET data. JPP helped in performing and analysis of histology experiments. TB, SG and JAC wrote the manuscript. All authors contributed with enriching discussions. All authors read and approved the final manuscript.

Author details

¹ Departamento de Desarrollo Biotecnológico, Instituto de Higiene, Facultad de Medicina, UdelaR, Montevideo, Uruguay. ² Cátedra de Hematología, Hospital de Clínicas, Facultad de Medicina, UdelaR, Montevideo, Uruguay. ³ Área de Investigación y Desarrollo, Departamento Biomédico, Centro Uruguayo de Imagenología Molecular (CUDIM), Montevideo, Uruguay. ⁴ Área de Patología Funcional y Morfológica, Departamento de Patología, Facultad de Veterinaria, UdelaR, Montevideo, Uruguay.

Acknowledgements

The authors are indebted with B.N. Carlos Chavez and B.N. Nancy Seiler for chemotherapy reconstitution in the Chemotherapy Preparation Area available in the Hospital de Clínicas, Montevideo, Uruguay. We also thank B.Sc. Lucía Blixen for her valuable contribution in imaging edition and Guy Tejedor (Animal Facility, Instituto de Higiene) for excellent technical assistance.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Availability of data and materials

All raw data supporting our findings is available on request.

Ethics approval

All protocols for animal experimentation were carried out in accordance with procedures authorized by the Comisión Nacional de Experimentación Animal (CNEA), from Uruguay, to whom this work was previously submitted.

Funding

This work was supported by a grant of the Agencia Nacional de Investigación e Innovación (ANII) (FMV_1_2011_1_7181), Uruguay. T.B. was supported by PEDECIBA and received a fellowship from ANII.

Received: 22 July 2016 Accepted: 4 November 2016

Published online: 22 November 2016

References

- Zelenetz AD, Gordon LI, Wierda WG, Abramson JS, et al. Non-Hodgkin's lymphomas. Version 4.2014. In: NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology (NCCN Guidelines). National comprehensive cancer network; 2014. <https://www.nccn.org/about/nhl.pdf>. Accessed 20 Jun 2016.
- Howlander N, Noone AM, Krapcho M, Garshell J, Miller D, Altekruse SF, Kosary CL, Yu M, Ruhl J, Tatalovich Z, Mariotto A, Lewis DR, Chen HS, Feuer EJ CK, editors. SEER cancer statistics review, 1975–2012, National Cancer Institute. http://seer.cancer.gov/csr/1975_2012/.
- Zappasodi R, de Braud F, Di Nicola M, Koeck S, Zwierzina M, Huber JM, et al. Lymphoma immunotherapy: current status. *Front Immunol*. 2015;6:448.
- Farkona S, Diamandis EP, Blasutig IM. Cancer immunotherapy: the beginning of the end of cancer? *BMC Med*. 2016;14:73.
- Baio FE, Kwak LW, Weng J. Towards an off-the-shelf vaccine therapy targeting shared B-cell tumor idiotypes. *Am J Blood Res*. 2014;4:46–52.
- Ledford H. Translational research: 4 ways to fix the clinical trial. *Nature*. 2011;477:526–8.
- Bocchia M, Bronte V, Colombo MP, De Vincentiis A, Di Nicola M, Forni G, et al. Antitumor vaccination: where we stand. *Haematologica*. 2000;11:1172–206.
- Mak IW, Evaniew N, Ghert M. Lost in translation: animal models and clinical trials in cancer treatment. *Am J Transl Res*. 2014;6:114–8.
- Donnou S, Galand C, Touitou V, Sautès-Fridman C, Fabry Z, Fisson S. Murine models of B-cell lymphomas: promising tools for designing cancer therapies. *Adv Hematol*. 2012;2012:1–13.
- Grille S, Brugnini A, Nese M, Corley E, Falkenberg FW, Lens D, et al. A B-cell lymphoma vaccine using a depot formulation of interleukin-2 induces potent antitumor immunity despite increased numbers of intratumoral regulatory T cells. *Cancer Immunol Immunother*. 2010;59:519–27.
- Grille S, Moreno M, Brugnini A, Lens D, Chabalgoity JA. A therapeutic vaccine using *Salmonella*-modified tumor cells combined with interleukin-2 induces enhanced antitumor immunity in B-cell lymphoma. *Leuk Res*. 2013;37:341–8.
- Grille S, Moreno M, Bascuas T, Marqués JM, Muñoz N, Lens D, et al. *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium* immunotherapy for B-cell lymphoma induces broad antitumor immunity with therapeutic effect. *Immunology*. 2014;143:428–37.
- Agorio C, Schreiber F, Sheppard M, Fernandez M, Martinez MA, Chabalgoity JA. Live attenuated *Salmonella* as a vector for oral cytokine gene therapy in melanoma. *J Gene Med*. 2007;9:416–23.
- Gordon LI, Harrington D, Andersen J, Colgan J, Glick J, Neiman R, Mann R, Resnick GD, Barcos M, Gottlieb A, et al. Comparison of a second-generation combination chemotherapeutic regimen (m-BACOD) with a standard regimen (CHOP) for advanced diffuse non-Hodgkin's lymphoma. *N Engl J Med*. 1992;327:1342–9.
- Tsukihara H, Nakagawa F, Sakamoto K, Ishida K, Tanaka N, Okabe H, et al. Efficacy of combination chemotherapy using a novel oral chemotherapeutic agent, TAS-102, together with bevacizumab, cetuximab, or panitumumab on human colorectal cancer xenografts. *Oncol Rep*. 2015;33:2135–42.
- Hovhannisyann N, Guillouet S, Fillesoye F, Dhilly M, Patin D, Galateau F, et al. Evaluation of the specificity of [18F]fludarabine PET/CT in a xenograft model of follicular lymphoma: comparison with [18F]FDG and impact of Rituximab therapy. *EJNMMI Res*. 2015;5:23.
- Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. *Methods*. 2001;25:402–8.
- Dijoseph JF, Dougher MM, Evans DY, Zhou BB, Damle NK. Preclinical anti-tumor activity of antibody-targeted chemotherapy with CMC-544 (inotuzumab ozogamicin), a CD22-specific immunoconjugate of calicheamicin, compared with non-targeted combination chemotherapy with CVP or CHOP. *Cancer Chemother Pharmacol*. 2011;67:741–9.
- Mohammad RM, Al-katib A, Aboukameel A, Sarkar F, Kucuk O. Genistein sensitizes diffuse large cell lymphoma to CHOP (cyclophosphamide, doxorubicin, vincristine, prednisone) chemotherapy. *Mol Cancer Ther*. 2004;2:1361–8.
- Ostrand-Rosenberg S. Animal models of tumor immunity, immunotherapy and cancer vaccines. *Curr Opin Immunol*. 2004;16:143–50.
- van Marion DMS, Domanska UM, Timmer-Bosscha H, Walenkamp AME. Studying cancer metastasis: existing models, challenges and future perspectives. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2016;97:107–17.
- Emens LA, Middleton G. The interplay of immunotherapy and chemotherapy: harnessing potential synergies. *Cancer Immunol Res*. 2015;3:436–43.
- Sakamaki I, Qin H, Kwak LW. Translational development of vaccination strategies in follicular NHL. *Best Pract Res Clin Haematol*. 2011;24:295–304.
- Schuster SJ, Neelapu SS, Gause BL, Janik JE, Muggia FM, Gockerman JP, et al. Vaccination with patient-specific tumor-derived antigen in first remission improves disease-free survival in follicular lymphoma. *J Clin Oncol*. 2011;29:2787–94.
- Izutsu K. Treatment of follicular lymphoma. *J Clin Exp Hematol*. 2014;10:31–7.
- Coleman M, Lammers PE, Ciceri F, Jacobs IA. Role of Rituximab and Rituximab biosimilars in diffuse large B-cell lymphoma. *Clin Lymphoma Myeloma Leuk*. 2016;16:175–81.
- Nowak AK, Robinson BWS, Lake RA. Synergy between chemotherapy and immunotherapy in the treatment of established murine solid tumors. *Cancer Res*. 2003;63:4490–6.
- Chen G, Emens LA. Chemoimmunotherapy: reengineering tumor immunity. *Cancer Immunol Immunother*. 2013;62:203–16.
- McDonnell AM, Lesterhuis WJ, Khong A, Nowak AK, Lake RA, Currie AJ, et al. Tumor-infiltrating dendritic cells exhibit defective cross-presentation of tumor antigens, but is reversed by chemotherapy. *Eur J Immunol*. 2014;45:1–11.
- El-Galaly TC, Hutchings M. Imaging of non-Hodgkin lymphomas: diagnosis and response-adapted strategies. In: Evens AM, Blum KA, editors. *Cancer treatment research*. Springer: International Publishing; 2015. p. 125–46.
- Keeley C, Mehrad B, Strieter RM. CXCL chemokines in cancer angiogenesis and metastases. *Adv Cancer Res*. 2010;106:91–111.
- Guo F, Wang Y, Liu J, Mok SC, Xue F, Zhang W. CXCL12/CXCR4: a symbiotic bridge linking cancer cells and their stromal neighbors in oncogenic communication networks. *Oncogene*. 2016;35:816–26.
- Guan X. Cancer metastases: challenges and opportunities. *Acta Pharm Sin B*. 2015;5:402–18.
- Tang H, Qiao J, Fu YX. Immunotherapy and tumor microenvironment. *Cancer Lett*. 2016;370:85–90.
- Harlin H, Meng Y, Peterson AC, Zha Y, Tretiakova M, Slingluff C, et al. Chemokine expression in melanoma metastases associated with CD8+ T-Cell recruitment. *Cancer Res*. 2009;69:3077–85.
- Coppola D, Nebozhyn M, Khalil F, Dai H, Yeatman T, Loboda A, et al. Unique ectopic lymph node-like structures present in human primary colorectal carcinoma are identified by immune gene array profiling. *Am J Pathol*. 2011;179:37–45.
- Messina JL, Fenstermacher DA, Eschrich S, Qu X, Berglund AE, Lloyd MC, et al. 12-Chemokine gene signature identifies lymph node-like structures in melanoma: potential for patient selection for immunotherapy? *Sci Rep*. 2012;2:765.
- Kostakoglu L, Cheson BD. Current role of FDG PET/CT in lymphoma. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*. 2014;41:1004–27.
- Novelli S, Briones J, Flotats A, Sierra J. PET/CT assessment of follicular lymphoma and high grade B Cell lymphoma—good correlation with clinical and histological features at diagnosis. *Adv Clin Exp Med*. 2015;24:325–30.
- Chaise C, Itti E, Petegnief Y, Wirquin E, Copie-Bergman C, Farcet JP, et al. [F-18]-fluoro-2-deoxy-D-glucose positron emission tomography as a tool for early detection of immunotherapy response in a murine B cell lymphoma model. *Cancer Immunol Immunother*. 2007;56:1163–71.
- Juwaid ME, Stroobants S, Hoekstra OS, Mottaghy FM, Dietlein M, Guermazi A, et al. Use of positron emission tomography for response assessment of lymphoma: consensus of the imaging subcommittee of international harmonization project in lymphoma. *J Clin Oncol*. 2007;25:571–8.
- Zijlstra JM, Lindauer-van der Werf G, Hoekstra OS, Hooft L, Huijgens PC. 18F-fluoro-deoxyglucose positron emission tomography for post-treatment evaluation of malignant lymphoma: a systematic review. *Haematologica*. 2006;91:522–9.