



Universidad de la Habana  
Facultad de Biología

**Proteoliposomas de muy pequeña talla:  
un nuevo adyuvante diseñado para la  
inmunoterapia del cáncer.**

Tesis presentada en opción al grado científico  
de Doctor en Ciencias Biológicas

Autor: **MCs. Circe Mesa Pardillo**

Tutor: **DrCs. Luis E. Fernández Molina**



**Centro de Inmunología Molecular  
Ciudad de la Habana,  
2005**



A mí mamá....





---

## **ABREVIATURAS**

por orden alfabético:

AcM	anticuerpo monoclonal
Ag	antígeno
APC	células presentadoras de antígenos (del inglés “Antigen presenting cells”)
APC <sub>f</sub>	aloficocianina (del inglés “allophycocyanin”)
ARNasa	ribonucleasas
bmDC	células dendríticas derivadas de médula ósea (del inglés “bone marrow dendritic cells”)
BCG	<i>Bacillus Calmette-Guerin</i>
BSA	Albúmina de suero bovino (del inglés “bovine serum albumin”)
CFSE	carboxi-fluoresceín diacetato succinimidil éster
CIM	Centro de Inmunología Molecular
CpG	ADN bacteriano no metilado con secuencias CpG
CPM	conteos por minuto
CTL	linfocitos T citotóxicos (del inglés “citotoxic T lymphocytes”)
D.E	desviación estándar
DC	células dendríticas (del inglés “dendritic cells”)
EJIVR	Edward Jenner Institute for Vaccine Research
FACS	citometría de flujo (del inglés “fluorescence activated cell sorter”)
FCS	suero fetal bovino (del inglés “fetal calf serum”)
FITC	isotiocianato de fluoresceína (del inglés “fluorescein iso-thiocyanate”)
FSC-H	dispersión del láser hacia adelante (del inglés “forward scatter”)
β-Gal	enzima β galactosidasa
GM-CSF	factor estimulador de colonias de granulocitos y macrófagos (del inglés “granulocyte macrophage colony stimulating factor”)
HSP	proteínas de estrés celular (del inglés “heat shock proteins”)
IAH	“Institute for Animal Health”
LPS	lipopolisacárido
M-CSF	factor estimulador de colonia de macrófagos (del inglés “macrophage colony stimulating factor”)
MHC	moléculas del sistema principal de histocompatibilidad (del inglés “major histocompatibility complex”)
NK	asesinas naturales (del inglés “natural killer”)
OVA	albúmina de huevo de pollo (del inglés “ovoalbumin”)
PAMP	patrones moleculares asociados a patógenos (del inglés “pathogen associated molecular patterns”)
PBMC	células mononucleares periféricas (del inglés “peripheral blood mononuclear cells”)
PBS	solución tamponada con Fosfato (del inglés “phosphate buffer solution”)
PE	ficoeritrina (del inglés “Phycoerythrin”)
PIC	ácido polyinosinoico-polycitidílico

---

---

PRR	receptores de reconocimiento de patrones (del inglés “pattern recognition receptors”)
SDS	dodecil sulfato de sodio (del inglés “sodium dodecylsulfate”)
SNK	prueba estadística de Student-Newman-Keuls
SSC-H	dispersión del láser hacia los lados (del inglés “side scatter”)
TAA	antígenos asociados a tumores (del inglés “tumor associated antigens”)
TAP	transportador asociado con la presentación de antígenos (del inglés “transporter associated with antigen presentation”)
TCR	receptor de células T (del inglés “T cell receptor”)
Th	células T cooperadoras (del inglés “T helper”)
TLR	receptores tipo Toll (del inglés “Toll like receptors”)
Treg	células T reguladoras
VEGF	factor de crecimiento del endotelio vascular (del inglés “vascular endothelial growth factor”)
VME	vesículas de membrana externa
VSSP	proteoliposomas de muy pequeña talla (del inglés “very small size proteoliposomes”)
X-Gal	5-bromo-4-cloro-3-indolil- $\beta$ -D-galactopiranosido

---

---

## ***SÍNTESIS***

En el Centro de Inmunología Molecular se diseñó y describió un nuevo adyuvante dirigido al uso en vacunas para tratamientos de pacientes inmunocomprometidos. Estos proteoliposomas de muy pequeño tamaño, llamados VSSP, combinan en su estructura el gangliósido GM3, para el que se han descrito propiedades inmunosupresoras del sistema inmune, y vesículas de membrana externa de *Neisseria meningitidis* con demostradas características inmunoestimuladoras.

En este trabajo se demuestra que los VSSP, independientemente del predominio del gangliósido en su estructura, proveen al sistema inmune de las señales de “peligro” necesarias para la activación de las células dendríticas, tanto humanas como murinas. Además, se evalúa cómo los VSSP en su interacción con estas células induce la secreción de citocinas inflamatorias, como la IL-12, que a su vez provocan la polarización hacia Th1 de las células T cooperadoras. Este estudio demuestra así mismo que los VSSP estimulan la actividad funcional de las células T citotóxicas específicas, fenómeno que es facilitado por la presentación cruzada de antígenos exógenos y por la independencia de la cooperación de las células T cooperadoras para la expansión primaria de las células T citotóxicas. Estas propiedades fueron, además, avaladas por experimentos que demuestran la actividad antitumoral de dos vacunas celulares adyuvadas con los VSSP.

---





---

**ÍNDICE**

<b>1</b>	<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA</b> .....	<b>9</b>
<b>2.1</b>	<b>Regulación de la respuesta del sistema inmune: papel instructivo del sistema inmune innato sobre el adaptativo</b> .....	<b>9</b>
2.1.1	Activación de la inmunidad innata a través de los receptores de reconocimiento de patrones	10
2.1.2	Maduración de las células dendríticas: proceso crucial para el inicio de la inmunidad.....	12
2.1.3	Activación de los linfocitos T CD4 <sup>+</sup> : polarización Th1-Th2.....	14
2.1.4	Presentación cruzada de antígenos: vía de presentación de antígenos exógenos a las células T citotóxicas.....	16
2.1.5	Activación de células T citotóxicas: dependencia de la cooperación de las células T CD4 <sup>+</sup>	18
<b>2.2</b>	<b>Nueva generación de adyuvantes: su impacto en la inmunoterapia del cáncer</b> .....	<b>20</b>
2.2.1	<i>Neisseria meningitidis</i> y sus componentes: capacidad adyuvante.....	22
<b>2.3</b>	<b>Retos que enfrentan los adyuvantes para la inmunoterapia activa del cáncer</b> .....	<b>26</b>
2.3.1	Captura de antígenos y fase de condicionamiento de las células dendríticas.....	26
2.3.2	Fase de activación de los linfocitos T.....	28
2.3.3	Fase efectora.....	29
<b>2.4</b>	<b>Los gangliósidos como inmunosupresores</b> .....	<b>31</b>
<b>3</b>	<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	<b>35</b>
<b>3.1</b>	<b>Reactivos, líneas celulares y animales de experimentación</b> .....	<b>35</b>
3.1.1	Ratones.....	35
3.1.2	Medios de cultivo .....	35
3.1.3	Líneas celulares.....	35
3.1.4	Estímulos y péptidos.....	36
3.1.5	Preparación de los VSSP.....	36
3.1.6	Anticuerpos monoclonales .....	37
3.1.7	Tetrámeros .....	37
<b>3.2</b>	<b>Ensayos</b> .....	<b>38</b>
3.2.1	Ensayos de citometría de flujo .....	38
3.2.2	Preparación de las células dendríticas humanas a partir de monocitos.....	39
3.2.3	Preparación de las células dendríticas murinas a partir de la médula ósea .....	40
3.2.4	Ensayo de protección de ribonucleasas para la determinación de citocinas y factores quimiotácticos proinflamatorios transcritos en las células dendríticas.....	41
3.2.5	Ensayos de medición de activación de las células T CD4 <sup>+</sup> aisladas del ratón transgénico DO11.10.....	42
3.2.6	Ensayos de estimulación del hibridoma B3Z para la evaluación de la presentación cruzada de antígenos.....	44

---

3.2.7	<i>Ensayo de tetrámeros para la determinación de la frecuencia de las células T CD8<sup>+</sup> específicas</i> .....	45
3.2.8	<i>Ensayo de ELISPOT para la determinación de las células T CD8<sup>+</sup> secretoras de IFN<math>\gamma</math></i> 46	
3.2.9	<i>Ensayo de citotoxicidad por liberación de <sup>51</sup>Cr para la determinación de la actividad funcional de las células T CD8<sup>+</sup></i> .....	48
3.2.10	<i>Ensayo de citotoxicidad in vivo para la determinación de la dependencia de la cooperación de las células T CD4<sup>+</sup> en la activación primaria de las células T CD8<sup>+</sup> específicas</i> 48	
3.2.11	<i>Ensayo de reto tumoral para la evaluación del efecto del tratamiento con vacunas de células irradiadas</i> .....	49
3.2.12	<i>Análisis estadísticos</i> .....	50
<b>4</b>	<b>RESULTADOS</b> .....	<b>53</b>
<b>4.1</b>	<b>Activación de las células dendríticas</b> .....	<b>53</b>
4.1.1	<i>Los VSSP inducen la maduración de las células dendríticas humanas</i> .....	53
4.1.2	<i>Los VSSP inducen la maduración de las células dendríticas murinas</i> .....	54
4.1.3	<i>Los VSSP inducen citocinas y factores quimiotácticos proinflamatorios en las células dendríticas murinas</i> .....	55
4.1.4	<i>EL LPS no es el único componente de los VSSP responsable de la activación de las células dendríticas</i> .....	56
<b>4.2</b>	<b>Polarización de la respuesta de las células T cooperadoras hacia Th1</b> .....	<b>59</b>
4.2.1	<i>Los VSSP inducen la secreción de IL-12p40/p70 por las células dendríticas</i> .....	59
4.2.2	<i>Los VSSP polarizan hacia Th1 a las células T CD4<sup>+</sup> vírgenes</i> .....	60
<b>4.3</b>	<b>Activación de los linfocitos T citotóxicos</b> .....	<b>61</b>
4.3.1	<i>La adyuvación de un péptido con los VSSP estimula la producción de IFN<math>\gamma</math> por las células T CD8<sup>+</sup> antígeno específicas</i> .....	61
4.3.2	<i>Los VSSP facilitan la presentación cruzada de la OVA a los linfocitos T CD8<sup>+</sup></i> .....	63
4.3.3	<i>La adyuvación de una proteína con los VSSP induce la expansión de las células T CD8<sup>+</sup> antígeno específicas</i> .....	64
4.3.4	<i>La adyuvación de una proteína con los VSSP estimula la producción de IFN<math>\gamma</math> por las células T CD8<sup>+</sup> antígeno específicas</i> .....	66
4.3.5	<i>La adyuvación de una proteína con los VSSP estimula la actividad citotóxica de las células T CD8<sup>+</sup> antígeno específicas</i> .....	67
4.3.6	<i>Los VSSP estimulan la activación primaria de las células T CD8<sup>+</sup> antígeno específicas en ausencia de la cooperación con las células T CD4<sup>+</sup></i> .....	68
<b>4.4</b>	<b>Actividad antitumoral</b> .....	<b>69</b>
4.4.1	<i>Vacunas celulares adyuvadas con los VSSP inducen actividad antitumoral</i> .....	69
<b>5</b>	<b>DISCUSIÓN</b> .....	<b>71</b>
<b>6</b>	<b>CONCLUSIONES</b> .....	<b>81</b>
<b>7</b>	<b>RECOMENDACIONES</b> .....	<b>83</b>
<b>8</b>	<b>REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	<b>85</b>

## ***1 INTRODUCCIÓN***

Desde hace dos décadas se ha notado un creciente interés en la aplicación de la inmunoterapia activa específica como una alternativa a la radioterapia y la quimioterapia para el tratamiento de los tumores malignos [1, 2]. Este interés ha sido motivado por un cúmulo de factores, entre los que se pueden mencionar el renacer de la teoría de la inmunovigilancia tumoral [3, 4] y la disponibilidad de antígenos (Ag) asociados a tumores (TAA- del inglés “tumour associated antigens”) bien definidos y caracterizados [5]. Durante estos años, las investigaciones científicas en el campo de la inmunoterapia activa del cáncer se concentraron fundamentalmente en revertir la baja inmunogenicidad de los TAA y en la comprensión de los mecanismos requeridos para la inducción y el mantenimiento de las respuestas inmunes. Numerosas estrategias se han evaluado y utilizado con el objetivo de incrementar la inmunogenicidad de los TAA y lograr una respuesta inmune específica y robusta [5, 6]. La mayoría de ellas se concentraron en la generación de linfocitos T citotóxicos (CTL- del inglés “cytotoxic T lymphocytes”) específicos por los péptidos derivados de los TAA y presentados en las moléculas de MHC I. Esto se debe fundamentalmente a que existe el consenso de que este tipo de respuesta desempeña un papel primordial en el control del crecimiento tumoral [7]. Uno de los enfoques encaminados a la generación de CTL consiste en aumentar la presentación de los TAA por las células dendríticas (DC- del inglés “dendritic cells”). Esto se ha logrado de dos formas fundamentalmente, la primera consiste en la vacunación con DC forzadas, a través de la pulsación o transfección *ex vivo*, a presentar los TAA [8-10]. Esta estrategia ha mostrado resultados alentadores en términos de inducción de respuestas citotóxicas específicas por los TAA [11, 12]. La segunda forma consiste en el aumento de la presentación de TAA por las DC *in vivo* mediante la utilización de adyuvantes. Los adyuvantes son productos que incrementan o modulan la respuesta inmune específica por un Ag, y por tanto son imprescindibles en las formulaciones de la mayoría de

las vacunas. Recientemente ha surgido un conjunto de teorías y conocimientos alrededor de la regulación del sistema inmune, los cuales han tenido una gran influencia en el desarrollo de los adyuvantes. Tal es el caso de las teorías de P. Matzinger y C. Janeway que plantean que el sistema inmune discrimina entre lo peligroso y lo inocuo a través de receptores no clonales que reconocen patrones moleculares asociados a estas señales “peligrosas” [13, 14]. Tomando como base estas teorías, se han descrito nuevas formulaciones de vacunas terapéuticas que utilizan adyuvantes derivados de patógenos con la capacidad peculiar de desencadenar la respuesta inmune a través de la activación de las DC, la polarización a Th1 de la respuesta de células T cooperadoras, la inducción de la presentación cruzada de los Ag y la subsecuente generación de CTL tumor específicos [15]. A pesar de estos progresos y en contraste con a los resultados obtenidos en los modelos animales, los avances clínicos de la inmunoterapia activa de las enfermedades malignas han sido, hasta el momento, discretos. En particular, la ausencia de correlación entre la respuesta inmune y la clínica en los pacientes tratados con vacunas de cáncer [16] ha provocado el análisis de las causas de este fenómeno.

Entre las múltiples causas que han emergido como puntos críticos de estudio, se encuentran los mecanismos de escape que utilizan las células tumorales para evadir al sistema inmune del hospedero. Estos van desde el concepto clásico de la presión inmunoselectiva que conduce al surgimiento de variantes tumorales resistentes, hasta el concepto recientemente comprendido de que los tumores inducen alteraciones supresoras del sistema inmune de los pacientes [17].

El efecto de los tumores sobre el sistema inmune se pone de manifiesto tanto en la fase de acondicionamiento como en la efectora. Un ejemplo clave lo constituye la inducción de la disfunción de las DC mediante el bloqueo de su diferenciación completa y la afectación de su maduración y motilidad [18-20]. Además, se promueve la acumulación de las células mieloides supresoras [21-23], lo que conduce a una marcada disminución en el número y las funciones de las

células más efectivas en la generación de la respuesta. En el compartimiento de las células T existen evidencias de que los tumores refuerzan los mecanismos de tolerancia induciendo anergia, deleción clonal [24, 25] y posiblemente también expandiendo o generando células T reguladoras [26, 27]. Para ejercer su efecto inmunosupresor los tumores utilizan, fundamentalmente, la secreción de sustancias solubles que actúan como mediadores moleculares [17]. Entre ellos se encuentran algunas citocinas, formas solubles de moléculas de adhesión, factores de crecimiento y moléculas que, como los gangliósidos, se sobreexpresan en los tumores [28-30]. Se han obtenido evidencias de que los gangliósidos son potentes estimuladores del crecimiento tumoral *in vivo* [31], y se ha demostrado su capacidad inhibitoria sobre múltiples eventos de la respuesta inmune celular [32]. Todos estos elementos sustentan la hipótesis de que los gangliósidos constituyen uno de los factores solubles más importantes en la inmunosupresión provocada por los tumores. Estos mecanismos de inmunosupresión son múltiples y no están completamente dilucidados. No obstante, está claro que tanto las DC como los linfocitos B y T son afectados de manera considerable por los gangliósidos derivados de tumores [32].

La comprensión de los mecanismos de evasión de los tumores y particularmente de su efecto sobre el sistema inmune del hospedero ha traído como resultado que el foco de atención actual de la inmunoterapia del cáncer se centre en el estudio de nuevas estrategias para inducir respuestas tumor específicas más robustas, así como contrarrestar los mecanismos de escape de los tumores. En este sentido la concepción de los adyuvantes para productos vacunales destinados a tratamientos en escenarios de inmunocompromiso tiene que cambiar. En un futuro cercano el tratamiento del cáncer con vacunas terapéuticas se apoyará no sólo en adyuvantes diseñados para proveer al sistema inmune de las señales necesarias para su correcta activación, sino también para intervenir en su recuperación de la inmunosupresión inducida por los tumores [33].

En el Centro de Inmunología Molecular (CIM), como resultado del esfuerzo por encontrar nuevos tratamientos efectivos para la terapia del cáncer, se ha diseñado un adyuvante con el objetivo no sólo de potenciar la respuesta Ag específica, sino también de interferir en la inmunosupresión inducida por los tumores. Para ello se combinó el gangliósido de mayor potencial supresor, el GM3, con un sistema bacteriano poseedor de propiedades inmunoestimuladoras documentadas, en este caso las vesículas de membrana externa (VME) de *Neisseria meningitidis*. Esta combinación dio lugar a proteoliposomas de muy pequeña talla (VSSP- del inglés “Very Small Size Proteoliposomes”) en los que la proporción molecular estimada gangliósido:proteína resultó ser 37:1 [34]. La inclusión del gangliósido se hizo, inicialmente, con el objetivo de generar una respuesta inmune específica que interfiriera con las propiedades inmunosupresoras de éste. Sin embargo, en este diseño existía el riesgo de que predominaran las propiedades inmunosupresoras del gangliósido GM3 y que el preparado, lejos de estimular la respuesta inmune contra los tumores, reforzara la inmunosupresión inducida por este. Sobre la base de los antecedentes descritos anteriormente y ante la necesidad de investigar las propiedades adyuvante de este preparado se formuló la siguiente **hipótesis**:

Al combinarse el gangliósido GM3 con las VME de *N. meningitidis* en los VSSP predominarán, al interactuar con el sistema inmune, las propiedades inmunestimuladoras inherentes al sistema bacteriano, manifestándose la activación de las DC, su condicionamiento para la polarización hacia Th1 de las células T cooperadoras y la activación de la rama efectora citotóxica del sistema inmune adaptativo.

A partir de esta hipótesis de trabajo se trazaron los siguientes **objetivos**:

1. Evaluar el efecto de los VSSP sobre la maduración de las DC
2. Determinar el efecto sobre la activación de linfocitos T CD4<sup>+</sup> de DC tratadas con los VSSP
3. Determinar el efecto de los VSSP sobre la activación de los CTL
4. Evaluar la capacidad adyuvante de los VSSP en modelos tumorales *in vivo*

Para el cumplimiento de estos objetivos se acometieron las siguientes tareas experimentales:

Objetivo 1:

- Comparación del efecto de los VSSP y de una señal de activación potente como el lipopolisacárido (LPS) sobre la maduración de las DC.
- Comparación del efecto de los VSSP y del LPS sobre la inducción de citocinas y factores quimiotácticos proinflamatorios por las DC.
- Evaluación del efecto de los VSSP sobre la maduración e inducción de la producción de citocinas y factores quimiotácticos proinflamatorios en las DC derivadas del ratón C3H/HeJ, hiporrespondedor al LPS.

Objetivo 2:

- Determinación de la capacidad de los VSSP de inducir la producción de IL-12 en DC.
- Determinación de la secreción de IL-4 e IFN $\gamma$  por las células T CD4<sup>+</sup> vírgenes provenientes del ratón transgénico DO11.10 y estimuladas con DC tratadas con los VSSP.

Objetivo 3:

- Determinación de la capacidad de los VSSP de inducir la presentación cruzada de la proteína albúmina de huevo de pollo (OVA) utilizando el hibridoma T CD8 específico B3Z.
- Evaluación de la capacidad de la mezcla de un péptido de ocho aminoácidos con los VSSP de activar linfocitos T citotóxicos e inducir la secreción de IFN $\gamma$  en el modelo de la OVA.
- Evaluación de la capacidad de la mezcla de una proteína soluble con los VSSP de aumentar la frecuencia de los CTL específicos, inducir la secreción de IFN $\gamma$  por los mismos y activar su actividad lítica en el modelo de la OVA.
- Evaluación de la capacidad de la mezcla de una proteína soluble con los VSSP de activar la respuesta primaria de los CTL en ausencia de la cooperación de las células T CD4<sup>+</sup> en el modelo de la OVA.

Objetivo 4:

- Evaluación de la actividad antitumoral inducida por vacunas celulares adyuvadas en los VSSP.

De estos estudios surgen dos **aportes al conocimiento**. En primer lugar, en este trabajo se demuestra que la inhibición de la activación de las DC y las células T producida por el gangliósido GM3, no se ponen de manifiesto cuando este es insertado en VME de *N. meningitidis*, lo cual contribuye a la inmunología de los gangliósidos y sus propiedades inmunosupresoras. Del mismo modo incrementa el conocimiento existente sobre las propiedades inmunoestimuladoras de las VME de *N. meningitidis*. En segundo lugar, y también relacionado con las propiedades inmunoestimuladoras de las VME de *N. meningitidis*, se aportan datos sobre el papel del LPS en estas propiedades. Hasta el momento de la realización de este trabajo los reportes sobre el efecto del LPS, presente en diferentes variantes de VME de *N. meningitidis*, sobre la maduración de las DC son contradictorios aunque indican que el LPS es prácticamente el único responsable de la activación de estas células [35-40]. Además, estos sugieren que el resto de los componentes, incluso aquellos para los que se han demostrado propiedades activadoras cuando se utilizan de forma aislada [41, 42], no intervienen cuando se encuentran formando parte de las vesículas. En este trabajo se muestra a los VSSP como la primera variante de VME de *N. meningitidis* que activa a las DC derivadas de una cepa de ratón hiporrespondedor al LPS, permitiendo que las propiedades activadoras de otros componentes de la vesícula, distintos del LPS, se pongan de manifiesto.

Uno de los bloques más relevantes y novedosos de este trabajo está formado por los resultados que demuestran, por primera vez, que preparados derivados de VME de *N. meningitidis* pueden activar la rama efectora citotóxica específica por los Ag acompañantes en una formulación vacunal. Este hallazgo constituye la **novedad científica** de esta tesis.

El conjunto de resultados compilados en este documento ha contribuido a sustentar el posible uso en la **práctica médica** de este adyuvante en dos vacunas de gangliósidos actualmente en ensayos



clínicos de fases I y II en cáncer de mama y melanoma en Cuba, España y Argentina. Además, se ensaya como adyuvante en una vacuna de HPV (cáncer de cerviz), en una anti-angiogénica y en otra de GnRH (cáncer de próstata) desarrolladas por los CIGB de La Habana y de Camagüey. Es el adyuvante seleccionado para la vacuna del receptor del factor de crecimiento epidérmico, actualmente en ensayos pre-clínicos en el CIM. Los VSSP están siendo evaluados como inmunorrestauradores en un ensayo clínico fase I en pacientes de SIDA en el instituto “Pedro Kourí” de Medicina Tropical.

Los resultados presentados en este trabajo han sido discutidos en nueve eventos internacionales y forman parte de seis publicaciones científicas, dos de ellas en la revista “Vaccine” (una aparecida y otra enviada) y otro artículo de revisión en la revista “Immunology and Cell Biology”. Además, hay tres reportes cortos, dos en la revista “Biotecnología Aplicada”, y un tercero también en “Vaccine”. Estos resultados forman parte de una patente solicitada en Cuba y en PCT. Por último, con los resultados de esta tesis se obtuvo el Premio Anual de la Academia de Ciencias de Cuba correspondiente al año 2004.



## **2 REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA**

### **2.1 Regulación de la respuesta del sistema inmune: papel instructivo del sistema inmune innato sobre el adaptativo**

Una inmunidad protectora es el resultado de la interrelación de dos sistemas cardinales: la inmunidad innata no Ag específica y la inmunidad adquirida Ag específica [43]. El sistema innato incluye varios componentes inmunorreguladores como el sistema del complemento, las células asesinas naturales (NK- del inglés “natural killer”), células fagocíticas, entre otros, que reconocen patógenos y/o daño en los tejidos del microambiente y señales de “peligro” [13, 43, 44]. Las células del sistema innato reconocen a los Ag no procesados a través de los receptores de reconocimiento de patrones (PRR-del inglés “pattern recognition receptors”). Entre estos tenemos la molécula CD14, el receptor de manosa, las moléculas de la familia del Toll, entre otros [14, 43, 45]. En contraste con las vías de reconocimiento no clonales, los linfocitos B y T, que forman parte del sistema inmune adaptativo, son capaces de crear por rearrreglo de sus genes de inmunoglobulinas y receptores de células T, respectivamente, gran cantidad de clones que expresan diferentes receptores que reconocen Ag o péptidos con altísima especificidad. Sin embargo, estas células Ag específicas no pueden distinguir las estructuras que requieren respuesta inmune de aquellas que no, por lo que necesitan ser instruidas por las células del sistema inmune innato [46]. Un vínculo esencial entre la inmunidad innata y la adaptativa es proveído por las células presentadoras de Ag (APC- del inglés “antigen presenting cells”), entre las cuales las DC son las más eficientes inductoras de las respuestas inmunes tanto primarias como secundarias [43, 46].

En el proceso de intercomunicación entre ambos sistemas, no basta solamente con activar el sistema inmune innato, sino que es necesario que este active las células de la inmunidad adaptativa involucradas en la respuesta protectora. Los CTL son los responsables de efectuar

las respuestas citotóxicas o de lisis celular; pero necesitan ser correctamente activados por las APC. En la mayoría de las células, los péptidos presentados en las moléculas del complejo principal de histocompatibilidad (MHC-del inglés “major histocompatibility complex”) de clase I, que son las reconocidas por las células T CD8<sup>+</sup>, se derivan de proteínas sintetizadas endógenamente. Los Ag capturados del microambiente por las APC, generalmente son presentados en las moléculas de MHC II [47]. Por lo tanto, la generación de CTL contra tumores o células infectadas por virus o bacterias intracelulares, requiere de la presentación de Ag exógenos por las MHC I. Este proceso, llamado presentación cruzada de Ag, sólo ocurre en un subtipo particular de DC, las DC CD8<sup>+</sup> [47, 48].

### *2.1.1 Activación de la inmunidad innata a través de los receptores de reconocimiento de patrones*

La detección y la defensa ante las infecciones es una tarea esencial para las especies metazoicas. La detección confiable de los patógenos es una tarea muy difícil de acometer debido a su amplia heterogeneidad molecular y a su rápida evolución. La estrategia de reconocimiento de patrones se basa en la detección de un conjunto limitado de patrones moleculares que son únicos en el mundo microbiano, y que están conservados en clases enteras de patógenos [49]. Los blancos de estos receptores, más conocidos como patrones moleculares asociados a patógenos (PAMP- del inglés “pathogen associated molecular patterns”) se detectan por los PRR, los cuales dan la señal de la presencia de infección al hospedero [14].

Los receptores tipo Toll (TLR- del inglés “Toll like receptors”) constituye la familia de PRR mejor caracterizada en los mamíferos. Aunque el número exacto de genes que codifican para los diferentes TLR puede variar entre las especies, de forma general se plantea que la mayoría de los mamíferos deben presentar entre 10 y 15 TLR. Estructuralmente, los TLR descritos

hasta el momento son proteínas de membrana que la atraviesan sólo una vez, y sus dominios extracelulares son grandes e incluyen entre 18 y 31 leucinas repetidas, que se supone participan en el reconocimiento de los ligandos. Los dominios intracelulares, de aproximadamente 200 aminoácidos, son similares entre sí y también al dominio citoplasmático del receptor de la IL-1 [50, 51].

Los TLR detectan múltiples PAMP, entre los que se incluyen el LPS (detectado generalmente por el TLR4) [52], lipoproteínas bacterianas y el ácido lipoteico (detectados por el TLR2) [53], la flagelina (detectada por el TLR5) [54], ADN bacteriano no metilado con secuencias CpG (CpG) (detectados por el TLR9) [55], ARN de doble cadena (detectado por el TLR3) [56] y ARN viral de simple cadena (detectado por el TLR7) [57-59]. Los TLR 1, 2, 4, 5 y 6 parecen estar especializados en el reconocimiento de compuestos que son únicos de bacterias y que nunca son producidos por el hospedero. Por tanto, su detección está encaminada directamente a discriminar entre lo propio y lo extraño. Por otra parte, los TLR 3, 7, 8 y 9 están especializados en la detección viral y reconocen ácidos nucleicos no privativos del mundo microbiano [51]. En este caso, la discriminación entre lo propio y lo no propio no está mediada fundamentalmente por la naturaleza molecular del ligando, sino por su accesibilidad a los TLR correspondientes. Estos TLR están localizados en los compartimientos intracelulares y detectan los ácidos nucleicos virales en los endosomas tardíos [60]. Debido a que los ácidos nucleicos del hospedero no están normalmente accesibles en estos compartimientos, no pueden provocar la activación de los TLR. Adicionalmente a la especificidad del ligando, los TLR de forma individual difieren en sus patrones de expresión y en las cascadas de señalización intracelular que activan [45, 50, 58]. Estudios realizados sobre la distribución de estos receptores en las células del organismo, mostraron que el TLR1 es ubicuo, ya que se expresa tanto en los monocitos y polimorfonucleares como en las células T,

B y NK. Las proteínas TLR2, 4 y 5 están restringidas a células mielo-monocíticas, y la molécula TLR3 es específica de las DC [61]. La expresión tisular de estos receptores también difiere. Por ejemplo, el TLR7 se expresa fundamentalmente en el pulmón, la placenta y el bazo, y el TLR8 es más abundante en el pulmón y en los leucocitos de sangre periférica. Por otra parte, el TLR9 se expresa preferencialmente en los tejidos ricos en células inmunes como el bazo, los nodos linfáticos, la médula ósea y en los leucocitos de sangre periférica [62].

### 2.1.2 *Maduración de las células dendríticas: proceso crucial para el inicio de la inmunidad*

Las DC son células especializadas en procesar Ag y presentarlos como péptidos insertados en los surcos de las moléculas de MHC, y así iniciar la respuesta inmune. Sin embargo, la captura de Ag y la iniciación de la respuesta inmune son funciones diferentes, llevadas a cabo por las DC en etapas diferentes de su desarrollo, normalmente conocidas como estados inmaduro y maduro. Estos dos términos aún tienen algunas imprecisiones, ya que intentan agrupar células encontradas en diferentes órganos o en condiciones patológicas, así como diferentes subtipos de DC o éstas generadas *in vitro* por diferentes métodos. No obstante, se puede generalizar definiendo a las DC inmaduras como aquellas con alta capacidad de capturar Ag, y con numerosos receptores y compartimientos celulares especializados en esta tarea [63]. Entre los mecanismos de captura de Ag de las DC inmaduras, está el de fagocitosis de microorganismos, partículas grandes completas [64] e incluso cuerpos apoptóticos [65]. También pueden formar grandes vesículas pinocíticas en las cuales se incorporan fluido extracelular y solutos, proceso conocido como macropinocitosis [66]. Además, expresan moléculas que median la endocitosis, incluyendo el receptor de fracciones constantes de inmunoglobulinas [67] y receptores de lectinas como el receptor de manosa [68], y DEC-205 [69]. La incorporación de Ag mediante macropinocitosis o endocitosis mediada por

receptores, facilita la presentación a niveles tales que picomoles o nanomoles de Ag son suficientes, contrastando con los niveles micromolares que necesitan otras APC [70].

En contraste, durante el proceso de maduración se desarrollan numerosas funciones adicionales que aumentan la capacidad de las DC de activar la respuesta inmune. Algunos de estos cambios que ocurren con la maduración incluyen: (i) aumento de la formación de complejos estables de MHC-péptidos [71-73]; (ii) aumento de la expresión superficial de moléculas coestimuladoras tales como CD80, CD86 y CD40 [74, 75]; (iii) síntesis de citocinas que influyen en la proliferación y diferenciación de las células T [76, 77]; y (iv) cambios en la producción de factores quimiotácticos y sus receptores que intensifican el tráfico de las DC en los vasos y órganos linfáticos [78-80].

La señalización a través de los PRR por los PAMP constituye el elemento fundamental que induce la maduración de las DC. Estos receptores inducen la expresión de las funciones coestimuladoras que se requieren para el inicio de la respuesta inmune. Los cambios que se asocian con el reconocimiento de patógenos, se engloban en los eventos que ocurren durante la maduración de las DC [81, 82]. El proceso de maduración de las DC también puede ocurrir en ausencia de infección, durante procesos violentos de activación de células T como las respuestas a alotransplantes [83], contactos alérgicos [84] o autoinmunidad [85]. Los receptores involucrados en la maduración de las DC en estas respuestas tan intensas mediadas por células T, no se han identificado. Se propone que los TLRs son activados por ligandos endógenos, como por ejemplo los sulfatos de heparina y ácidos hialurónicos. Además, los miembros de la familia del TNF, el ligando de CD40 (CD40-L) en los mastocitos y plaquetas y miembros de familias hematopoyéticas, como el factor estimulador de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF- del inglés “granulocyte macrophage colony stimulating

factor”), la IL-4 y la IL-13, influyen adicionalmente en el desarrollo y maduración de las DC [86, 87].

### 2.1.3 Activación de los linfocitos T CD4<sup>+</sup>: polarización Th1-Th2

Todos los linfocitos T CD4<sup>+</sup> o cooperadores (Th- del inglés “T helper”) al culminar su ontogenia se clasifican en un estado virgen Th0, y al ser activados por una DC se polarizan y diferencian a células T efectoras de tipo Th1 ó Th2 [88, 89]. Las células Th1 maduras secretan principalmente IL-2, IFN $\gamma$  y LT $\alpha$ , mientras que las células Th2 secretan fundamentalmente IL-4, IL-5, IL-9 e IL-13. Aunque actualmente no existe un consenso en la comunidad científica internacional, durante varios años se incluyeron la IL-6 y la IL-10 entre las citocinas que caracterizaban la respuesta Th2 [90-93]. Además, en humanos, no ha sido posible establecer esta división tan estricta como en los ratones [92, 94]. Por estas razones, la definición convencional de las células Th1 y Th2 depende estrictamente de la secreción de IFN $\gamma$  e IL-4. Las células Th1 secretan IFN $\gamma$  pero no IL-4, mientras que las Th2 secretan IL-4 pero no IFN $\gamma$ .

Las células Th1 son las reguladoras principales de la inmunidad de tipo 1. La citocina principal responsable de sus efectos proinflamatorios es el IFN $\gamma$ . El IFN $\gamma$  estimula la fagocitosis [95], el estallido de las reacciones oxidativas [96, 97], y la destrucción intracelular de los microbios [98, 99]. El IFN $\gamma$  también induce la sobreexpresión de la molécula de MHC I [100] y MHC II [95] en gran variedad de células, estimulando de esa forma la presentación de Ag a las células T CD8<sup>+</sup>. Esta citocina, conjuntamente con LT $\alpha$ , induce en otras estirpes celulares, como queratinocitos y fibroblastos [101], la secreción de citocinas proinflamatorias como el TNF $\alpha$  [102].



Las células Th2, por el contrario, estimulan la secreción de anticuerpos. En particular las citocinas IL-4 e IL-13 activan la proliferación de los linfocitos B, la producción de anticuerpos y el cambio de clases [103, 104]. De hecho, el cambio de clases de IgG a IgE no ocurre en ausencia de IL-4 e IL-13 [105, 106]. A diferencia de la inflamación estimulada por las citocinas de tipo 1, las inflamaciones provocadas por las citocinas de tipo 2 se caracterizan por la infiltración en los tejidos de eosinófilos y basófilos, así como por una desgranulación de los mastocitos, proceso que es dependiente del entrecruzamiento en la superficie de las inmunoglobulinas de tipo IgE [107-109].

La polarización de Th0 a Th1 ó Th2 depende fundamentalmente del entorno de citocinas. Las respuestas adaptativas Th1 son condicionadas por las citocinas IL-12, IL-23 e IL-27 [110]. Por el contrario, la polarización a Th2 está dirigida por la secreción de IL-4 [111, 112]. Estas citocinas son secretadas por las células del sistema inmune innato y están condicionadas por el conjunto de PRR que sean activados. En este sentido, se ha demostrado que las señalizaciones a través de los TLR generalmente inducen la secreción de IL-12 por las DC, lo cual se considera el mecanismo principal por el cual se favorecen las respuestas de tipo Th1 [113]. Esta teoría se apoya en los experimentos realizados en ratones deficientes de la proteína MyD88, los cuales muestran total incapacidad de generar respuestas Th1 específicas por Ag inyectados en adyuvante completo de Freund (cuyos componentes activan los TLR2 y TLR4). Por el contrario, en estos ratones, se preservó la respuesta Th2 generada inyectando el Ag en alúmina, adyuvante que induce predominantemente una respuesta Th2 [113, 114]. Otros experimentos realizados con el ratón deficiente de MyD88 demostraron la polarización a Th2 por defecto de las señales polarizadoras a Th1. Esto sugiere que la señalización a través de MyD88 está involucrada en las etapas iniciales de diferenciación a Th1 ó Th2 [115]. Por tanto, la interacción de los agentes infecciosos con los TLR constituye un evento temprano y crítico

en el proceso de diferenciación, y apunta hacia su importancia en la determinación cualitativa de la respuesta inmune adaptativa.

#### *2.1.4 Presentación cruzada de antígenos: vía de presentación de antígenos exógenos a las células T citotóxicas*

Las células T CD8<sup>+</sup> citotóxicas, las cuales reconocen Ag presentados por las moléculas MHC I, son importantes para la inmunidad contra virus, bacterias intracelulares y tumores. De forma general, es necesario que las proteínas se expresen dentro del citoplasma para que tengan acceso a la vía de presentación restringida a clase I [116]. Esta vía se conoce como la vía endógena de procesamiento y presentación, y se contrapone con la vía restringida a clase II, la cual generalmente presenta Ag exógenos [47].

A pesar de la aparente divergencia entre estas dos vías, hace alrededor de 20 años se demostró que bajo determinadas condiciones los Ag exógenos tenían acceso a la vía endógena de procesamiento y presentación [117]. Esta “presentación cruzada” de Ag se ha observado ya en muchas respuestas, tanto tolerogénicas como inmunogénicas [118, 119].

Los mecanismos moleculares de la presentación cruzada de Ag han comenzado a esclarecerse hace sólo uno o dos años. Recientemente, se describió la existencia de un proceso donde los fagosomas se funden con vesículas derivadas de las membranas del retículo endoplásmico (RE) [120-122]. Los compartimientos híbridos (fagosoma-RE) resultantes contienen moléculas MHC I recién sintetizadas, conjuntamente con los componentes de la maquinaria que se utiliza para el procesamiento y presentación de los péptidos en este tipo de moléculas, por ejemplo el transportador asociado con la presentación de Ag (TAP-del inglés “transporter associated with antigen presentation”), las moléculas tapasina, calreticulina y Erp57 [123]. El proceso comienza cuando los Ag son fagocitados y transportados hacia el citosol adyacente al fagosoma por un mecanismo en el que parece estar involucrado el complejo Sec 61 (un canal

multimolecular que es usado normalmente para transportar proteínas secretadas o de membrana del RE al citosol) [124-126]. Los Ag exógenos son entonces degradados por proteasomas asociados al fagosoma y los péptidos resultantes son transportados nuevamente al interior del fagosoma a través de TAP para ser ensamblados con las moléculas MHC I. Por último, estos complejos viajan a la superficie celular, pero directamente desde los fagosomas, sin pasar por el Golgi, a diferencia de la ruta clásica de presentación endógena [121].

Numerosos tipos de Ag pueden ser presentados de forma cruzada. Entre ellos se incluyen las proteínas solubles [127, 128], complejos inmunes [129, 130], bacterias intracelulares [131], parásitos [132] y Ag celulares [133-137]. Sobre estos últimos, se ha demostrado que varios tipos de células pueden ser presentados de forma cruzada, entre las que se incluyen células infectadas por virus [133, 134], tumores transfectados [138, 139], células de tejidos normales [135-137], etc. Los Ag celulares fueron los primeros para los que se describió el fenómeno de presentación cruzada. En esos estudios pioneros se inmunizaron ratones con células alogénicas y se evaluó la inducción de respuesta CTL restringida a las moléculas de MHC I [140]. Esas inmunizaciones generaron CTL específicos por los Ag menores de histocompatibilidad tanto del donante como, sorprendentemente, del hospedero.

Sobre la regulación a nivel celular y molecular del proceso de presentación cruzada, el conocimiento es aún muy limitado. Algunos tipos de células, entre los que se encuentra la subpoblación de DC CD8<sup>+</sup> [48, 127, 141, 142] y células endoteliales, presentan Ag de forma cruzada constitutivamente. Otros tipos de DC requieren, para realizar este proceso, de activación por otros estímulos como los inmunocomplejos [129], cooperación de las células T CD4<sup>+</sup> [143], ligandos de los TLRs [144] u otras señales aún sin identificar [145]. Esta área de estudio está emergiendo y sugiere que la capacidad de las DC de presentar Ag de forma cruzada debe ser regulada para que ocurra sólo bajo circunstancias específicas.

### *2.1.5 Activación de células T citotóxicas: dependencia de la cooperación de las células T CD4<sup>+</sup>*

El control de las infecciones por virus y la erradicación de tumores usualmente involucra la actividad lítica de los CTL. Su inducción de forma efectiva depende de varios factores, uno de los cuales y quizás el más importante es la cooperación de las células T CD4<sup>+</sup>. Durante los muchos años de investigación en este campo se han propuesto tres modelos de activación fundamentales. El modelo de “las tres células” propone que la ayuda o cooperación es sólo proveída por las células T CD4<sup>+</sup> que reconocen al Ag en la misma APC que el CTL. El modelo secuencial de “las dos células” propone que las células T CD4<sup>+</sup> interactúan primeramente con la APC, la cual entonces es capaz de activar los CTL vírgenes. Por último, el tercer modelo, el de “la DC condicionada”, es una variante del segundo y plantea que la DC puede ser condicionada para activar los CTL, en ausencia del primer encuentro con las células T CD4<sup>+</sup>, por determinados estímulos como son la interacción CD40-CD40-L (que es equivalente a la interacción con la célula T CD4<sup>+</sup>) o determinados estímulos virales y bacterianos [146]. Basados en estos modelos, fundamentalmente el segundo y el tercero, y en sus evidencias experimentales, se puede decir que existen respuestas CTL dependientes [147-152] e independientes [153-156] de la cooperación de las células T CD4<sup>+</sup>. En la mayoría de los casos las respuestas a patógenos son independientes de cooperación, salvo algunas excepciones descritas en la literatura [150, 152], mientras que las respuestas a Ag celulares como los Ag menores de histocompatibilidad, son dependientes de las células T CD4<sup>+</sup> [147-149, 152].

Por estas razones, durante muchos años, la comunidad científica internacional ha aceptado las variaciones en los requerimientos de la ayuda de las células Th por los CTL en dependencia del tipo de inmunógeno utilizado. La lógica fundamental de razonamiento para la existencia de

estas diferencias parece estar relacionada con la naturaleza inflamatoria del inmunógeno, aunque también pueden influir la frecuencia de los precursores [157, 158] y la avidéz del receptor de la célula T (TCR- del inglés “T cell receptor”) [159]. Sin embargo, con el advenimiento de nuevas tecnologías como los tetrámeros, el marcaje intracelular de IFN $\gamma$  y la medición de la activación de los CTL *in vivo*, que permiten la medición precisa de la frecuencia de células T específicas por un Ag, han surgido explicaciones alternativas a este fenómeno de la cooperación de las células T CD4<sup>+</sup>. En numerosos experimentos recientes se ha demostrado que la expansión secundaria de las células T CD8<sup>+</sup> de memoria está sensiblemente dañada si estuvo ausente la cooperación de las células T CD4<sup>+</sup> durante la fase de activación primaria [160-165]. Además, esta capacidad proliferativa secundaria de los CTLs resultó ser dependiente de cooperación incluso en aquellos escenarios previamente clasificados como independientes. Por el contrario, al examinarse detenidamente la expansión de los CTLs y las funciones efectoras en las respuestas primarias se pudo concluir que incluso para aquellas clasificadas como dependientes de cooperación, la expansión de los efectores primarios no se afectaba en ausencia de cooperación. A la luz de estos resultados, se revisaron varias de las observaciones anteriores y se evidenció que las respuestas dependientes de cooperación se habían medido después de una estimulación secundaria *in vitro*, mientras que las independientes de cooperación habían sido evaluadas en la fase de expansión primaria.

Aunque este conjunto de experimentos y resultados crearon un modelo unificador, varias excepciones de la regla condujeron al cuestionamiento, una vez más, de estas teorías [146]. Por ejemplo, la infección con el virus del herpes simple tipo 1 indujeron una expansión primaria eficiente de los CTLs específicos en ratones normales, pero absolutamente nula en ratones deficientes de la molécula MHC II [146]. Estos experimentos apuntan hacia la

posibilidad de que definitivamente la cooperación de los linfocitos T CD4<sup>+</sup> tenga un papel preponderante en determinadas respuestas primarias de CTL. Posiblemente, la naturaleza del estímulo y no el método de detección esté relacionado con la necesidad de la cooperación de las células T CD4<sup>+</sup>. Una vez más, con estos últimos resultados, se han vuelto a definir estímulos para CTL dependientes e independientes de cooperación, pero sólo para las respuestas de activación primaria [146]. No han sido descritas incongruencias con la definición de que las respuestas secundarias de los CTL de memoria dependen de la cooperación de las células T CD4<sup>+</sup> durante la expansión primaria.

## ***2.2 Nueva generación de adyuvantes: su impacto en la inmunoterapia del cáncer***

En la búsqueda de vacunas efectivas, no sólo contra patógenos sino también contra virus y tumores, se exploran diversas estrategias para lograr una inmunidad protectora. Los adyuvantes son un componente importante en las formulaciones vacunales. Sin embargo, muchos de ellos tienen efectos colaterales adversos, por lo que no son aceptados en la vacunación de humanos. Las nuevas teorías y conocimientos sobre la regulación del sistema inmune han abierto nuevos campos de experimentación en el diseño de vacunas y, particularmente, en la búsqueda de nuevos adyuvantes. Recientemente, se han identificado moléculas relacionadas con la inmunidad innata que podrían considerarse como una nueva generación de adyuvantes, ya que tienen la capacidad de madurar las DC, mediar la presentación cruzada de Ag acoplados a ellos y activar los CTL.

Entre las “señales de peligro” exógenas que han demostrado una excelente capacidad adyuvante se encuentran el *Bacillus Calmette-Guerin* (BCG) y el CpG. El BCG ha sido utilizado con cierto éxito como un agente antitumoral en el tratamiento del cáncer superficial de vejiga y melanoma [166, 167], y el CpG ha mostrado la capacidad de estimular potentes

respuestas específicas contra varios tipos de tumores en ensayos preclínicos [168]. Estas investigaciones preclínicas condujeron a numerosos ensayos clínicos que se encuentran en curso utilizando las secuencias CpG o al BCG como adyuvantes de vacunas terapéuticas para el cáncer. Otro derivado bacteriano para el cual se han descrito propiedades inmunopotenciadoras importantes y efecto antitumoral en ensayos preclínicos, es la proteína OmpA de la membrana externa de la bacteria Gram-negativa, *Klebsiella pneumoniae* [169]. La capacidad de todos estos derivados de activar las DC se ha demostrado en diversos escenarios. Por ejemplo, tanto el BCG como el CpG activan a las DC humanas y murinas, promoviendo el aumento en la expresión de las moléculas de MHC I, MHC II, CD80 y CD86 y la secreción de IL-12 [170-173]. También experimentos realizados con la proteína OmpA expresada de forma recombinante, mostraron que induce la maduración completa de las DC a través de la molécula TLR2 [169].

También se ha descrito que las células necróticas, pero no las apoptóticas, liberan las llamadas proteínas de estrés celular (HSP-del inglés “heat shock proteins”) [174]. Numerosos grupos han demostrado que diferentes HSP pueden activar a las DC y los macrófagos calificando así a las HSP como la primera gran familia de señales de peligro endógenas [175]. Los complejos HSP-péptidos derivados de tumores se han administrado como vacunas de cáncer personalizadas, y su acción ha sido evaluada en múltiples indicaciones, entre las que se incluyen el carcinoma renal, el melanoma metastásico, el cáncer gástrico y algunos tipos de leucemias [176].

Los estudios dedicados a investigar los mecanismos efectores efectivos contra el cáncer indican que los TAA son reconocidos por los CTL. Esto sugiere que la actividad de estos linfocitos es un mecanismo efector contra las células tumorales. Además, se considera el único fenómeno capaz de tener algún efecto sobre los tumores sólidos [177]. En el diseño de nuevos

adyuvantes para vacunas contra el cáncer, la capacidad de activar los mecanismos efectores citotóxicos constituye uno de los requisitos esenciales. Además, el reconocimiento de que determinadas señales pueden forzar determinadas vías de procesamiento y presentación de Ag, particularmente el fenómeno de presentación cruzada, ha conducido a que esta sea otra de las características deseadas en los adyuvantes para las vacunas de cáncer [178-180]. Entre los adyuvantes para los que se ha demostrado que facilitan estos procesos se encuentran también las secuencias de CpG, las HSP y la OmpA.

Las proteínas de estrés de las familias HSP-70 y HSP-90 facilitan la presentación cruzada de Ag. Los Ag peptídicos “chaperoneados” por las HSP purificadas cuando son inyectados en ratones activan respuestas CTL [181, 182]. Además, los Ag unidos a HSP son procesados intracelularmente de forma TAP-independiente y son eficientemente reconocidos por los CTL [183].

Existe el concepto de que el mecanismo de presentación cruzada por las DC es más eficiente cuando la captura de los Ag es mediada por un receptor, proceso que también puede ser manipulado por un adyuvante (por ejemplo las HSP) [184]. También se ha demostrado que el CpG conjugado a proteínas solubles media la presentación cruzada de la proteína, mediante el cambio de la pinocitosis como mecanismo de captura de la proteína sola por el mediado por un receptor del conjugado [17].

### *2.2.1 Neisseria meningitidis y sus componentes: capacidad adyuvante*

La bacteria *N. meningitidis* es una de las dos especies patógenas del género *Neisseria*. El meningococo, como comúnmente se le conoce, es un diplococo Gram-negativo que presenta dos membranas celulares separadas por una lámina de peptidoglicano. El 50 % del exterior de la membrana externa lo constituyen moléculas anfífilas de LPS, endotoxina principal de esta



bacteria. Otros componentes importantes de la membrana externa son las proteínas transmembranas. Entre ellas se encuentran las porinas de clase 1 y clase 2 ó 3, las proteínas unidoras de transferrina (TBP), la Opa, la Opc, entre otras. Además, los meningococos virulentos expresan unas proyecciones filamentosas llamadas pili [185].

Los componentes aislados de la membrana externa de *N. meningitidis* se han estudiado como Ag en el diseño de vacunas contra la meningitis, debido a su alta inmunogenicidad. Sin embargo, hasta el momento, las únicas vacunas que han mostrado cierta efectividad consisten en preparados más complejos [186, 187]. No obstante, estos componentes se han utilizado como moléculas transportadoras o adyuvantes. Por ejemplo, se ha demostrado que las porinas estimulan la respuesta inmune a sustancias poco inmunogénicas como polisacáridos, péptidos y glicolípidos. Esta propiedad podría estar asociada a que las porinas aumentan la expresión de la molécula coestimuladora CD86 en las células B, aunque no afectan la expresión de CD80 [42]. Este efecto de las porinas sobre las células B es dependiente de las moléculas MyD88 y TLR2 [41]. A pesar de este estudio preliminar realizado con las porinas, de forma general las propiedades inmunoestimuladoras de las proteínas de la membrana externa de *N. meningitidis* han sido poco estudiadas.

Se han demostrado propiedades inmunoestimuladoras también de los pili. Sin embargo, quizás la más importante es su capacidad de unirse a las células del sistema inmune. Por ejemplo, los monocitos humanos son capaces de discriminar entre los cocos pilados y los no pilados, ya que tienen la capacidad de unirse solamente a las bacterias piladas [188].

Las VME derivadas de los meningococos se han utilizado tanto como adyuvantes o transportadores de Ag, como en la generación de vacunas antimeningocócicas. Las vacunas antimeningocócicas en uso consisten, precisamente, en VME a las que se les eliminó parte

del LPS [186, 187]. Al evaluar estas preparaciones en humanos, se demostró su inmunogenicidad y su capacidad de generar títulos de anticuerpos bactericidas.

Las VME han mostrado gran capacidad adyuvante al ser conjugadas a Ag importantes para otras enfermedades. Por ejemplo, al conjugar el polisacárido tipo B de *Haemophilus influenzae* a las VME se indujeron anticuerpos protectores en ratones jóvenes. En ese estudio se demostró que tanto el tamaño del bazo como el número de esplenocitos en él fue mayor en los ratones inmunizados. Además, los análisis inmunohistoquímicos demostraron que este incremento en la talla del bazo se debía a un aumento en el número de macrófagos en él, lo cual podría ser la explicación de la capacidad adyuvante de las VME en esa preparación [189].

Nuevas tecnologías se desarrollaron también para utilizar las VME como transportadoras y adyuvantes. Por ejemplo, se ha demostrado que estructuras supramoleculares de características similares a los cocleatos derivadas de VME de *N. meningitidis* serogrupo B, tienen una potente actividad adyuvante, de proteínas y ADN plasmídico, tanto a nivel sistémico como mucosal [38]. También se ha descrito la tecnología del proteosoma, en la cual las proteínas de membrana forman unas estructuras multimoleculares que consisten en vesículas membranosas de 60-100 nm de diámetro [190]. La conjugación hidrofóbica de péptidos poco inmunogénicos a los proteosomas indujo altos títulos de IgG en ratones sin el uso de adyuvantes adicionales [190]. Estos proteosomas también se utilizaron como transportadores y adyuvantes para inducir respuesta específica a gangliósidos como el GM2 y el GD3. Con el gangliósido GD3 incorporado a los proteosomas se generaron anticuerpos de tipo IgM capaces de inducir citotoxicidad mediada por complemento, pero no se detectaron anticuerpos de tipo IgG [191].

De forma general, las propiedades adyuvantes de estas vesículas y sus variantes parecen estar asociadas a la presencia del LPS. Por ejemplo, estudios de la capacidad de activar a las DC de las vesículas derivadas de bacterias salvajes y mutantes que no expresan el LPS, demostraron

que estas últimas eran muy poco efectivas [192]. Además, sólo las bacterias salvajes estimulaban la secreción de IL-12, IL-6 y TNF $\alpha$  [37, 40]. En esta línea, también hay varios reportes, pero con derivados vesiculares de estas bacterias y en ratones deficientes de la señalización a través de la molécula TLR4, que indican que en ausencia del estímulo del LPS la activación de las DC es marginal. Los autores de estos estudios, reclaman que los componentes distintos al LPS tienen alguna contribución a este fenómeno. Sin embargo, los datos mostrados no son convincentes. Además, en ambos casos se reafirma un papel protagónico e indispensable del LPS para la polarización hacia Th1 de las células Th [35, 39]. Otro adyuvante derivado de las VME lo constituyen los VSSP. Estos proteoliposomas de muy pequeña talla son obtenidos a partir de la combinación de las VME de *N. meningitidis* serogrupo B y el gangliósido GM3. La composición molecular de los VSSP ha sido poco caracterizada. Sin embargo, se ha determinado que por cada molécula de proteína en el preparado, hay 37 moléculas del gangliósido GM3, aproximadamente [193]. Además, la relación másica del LPS respecto al total de proteínas es del 10 %.

Los VSSP se han evaluado como adyuvantes promotores de la respuesta de anticuerpos específicos por el propio GM3. Estos estudios demostraron que con la inmunización de ratones, monos y humanos con este preparado se inducen anticuerpos de tipo IgM e IgG específicos tanto por el gangliósido como por las proteínas de *N. meningitidis*. En el caso particular de la producción de IgG anti-GM3, este constituyó el primer reporte de inducción de anticuerpos de este subtipo contra este gangliósido [34, 194]. Por otra parte, la inmunización de ratones C57BL/6 con los VSSP como monoterapia, indujo la protección de estos animales ante el reto con la línea tumoral de melanoma B16 [195].

### ***2.3 Retos que enfrentan los adyuvantes para la inmunoterapia activa del cáncer***

Los requisitos de un adyuvante para el desarrollo de vacunas terapéuticas para el tratamiento de pacientes de cáncer, difieren de los requisitos de los adyuvantes convencionales. En primer lugar, los pacientes que recibirán la inmunoterapia son pacientes inmunocomprometidos, ya que por ejemplo tienen dañados los mecanismos de procesamiento y presentación de Ag, y la inhibición de la reactividad a Ag propios controlada por las células T reguladoras está reforzada [196]. En segundo lugar, los Ag tumorales son generalmente propios y por tanto poco inmunogénicos. Por último, los tumores desarrollan mecanismos para evadir al sistema inmune, como por ejemplo, los mecanismos de edición tumoral, baja o ausencia de expresión de las moléculas de MHC I o la secreción de citocinas o moléculas supresoras [5]. Por tanto, los adyuvantes de las vacunas para el tratamiento del cáncer deben no sólo estimular respuestas a Ag poco inmunogénicos, sino también intervenir en la inmunosupresión inducida por los tumores. Estos adyuvantes tienen que enfrentar diferentes retos en las diferentes etapas de la generación de inmunidad antitumoral durante la vacunación.

#### *2.3.1 Captura de antígenos y fase de condicionamiento de las células dendríticas*

La primera fase de la vacunación ocurre en el sitio de inyección e incluye no solo la entrega del Ag a las DC, sino también su activación. Sin embargo, una de las características más significativas en los pacientes de cáncer es que tienen dañadas las funciones de las DC [197]. Existen cada vez más evidencias de que la progresión del crecimiento tumoral en pacientes de cáncer, está asociado con la acumulación de células mieloides inmaduras, monocitos y macrófagos, aparejada con una marcada disminución en el número y las funciones de las DC [21-23]. Adicionalmente, las DC aisladas de pacientes con leucemia mieloide crónica

mostraron alteraciones en la organización de la actina y daños en su capacidad de migración, lo cual evidentemente influye en los mecanismos de captura de Ag [198].

Uno de los pioneros en estos estudios, el Dr. David Carbone, ha mostrado que las DC de pacientes de cáncer disminuyen la expresión de las moléculas coestimuladoras CD86, CD40 y MHC-II, resultando en un fenotipo que es consistente con un estado inmaduro y no activado de la DC [18]. De igual forma, se ha encontrado que las DC aisladas de sangre periférica de pacientes con cáncer de mama o tumores de cabeza y cuello, tienen reducida la capacidad de estimular la respuesta inmune alogénica y de células T Ag específicas [19, 20].

Los defectos en el funcionamiento de las DC en pacientes de cáncer son sistémicos más que locales [199]. En un estudio de 18 pacientes con cáncer de cabeza y cuello, la función de las DC de sangre periférica y de nódulos linfáticos estuvo igualmente afectada. Esto sugiere que factores solubles pudieran ser los responsables de inducir estos cambios en las DC. También se han demostrado afectaciones en los mecanismos de diferenciación de los monocitos a DC, con la consecuente maduración temprana y disfuncional [200]. Muchos factores han estado implicados en la diferenciación deficiente de las DC. Utilizando anticuerpos neutralizantes se ha demostrado el papel preponderante del factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF-del inglés “vascular endothelial growth factor”) y posiblemente del factor estimulador de colonias de macrófagos (M-CSF-del inglés “macrophage colony stimulating factor”) en la diferenciación de las DC [201]. En particular, los estudios *in vitro* muestran que el VEGF inhibe la diferenciación y la maduración de las DC a través de la supresión del factor de transcripción NF- $\kappa$ B en las células madres hematopoyéticas. Estudios inmunohistoquímicos también han mostrado una correlación inversa entre la densidad de DC y la expresión del VEGF. Estos hallazgos están asociados con un mal pronóstico en pacientes con tumores

malignos [202]. Se ha informado que la IL-6 está involucrada en una diferenciación deficiente de las DC [203]. Anticuerpos neutralizantes anti-IL-6 y anti-M-CSF abrogan el efecto negativo de sobrenadantes de carcinomas de células renales en la diferenciación de DC. Además, la incubación de células progenitoras CD34<sup>+</sup> con IL-6 y M-CSF modula la diferenciación celular de los monocitos a DC [204]. Finalmente, la IL-10, una citocina asociada a fenómenos supresores de la respuesta inmune, ha mostrado su influencia en el reclutamiento y función de las DC en sistemas tumorales y no tumorales [205, 206]. Se ha encontrado que la exposición *in vitro* a la IL-10 inhibe la generación de las DC y su maduración y previene la polarización de la respuesta de células Th hacia Th1 [207].

### 2.3.2 Fase de activación de los linfocitos T

Las DC activadas de forma apropiada proveen, en los órganos linfoides, las dos señales fundamentales para la activación de los linfocitos T: la presentación del Ag o señal 1 y las señales coestimuladoras o señal 2. Sin embargo, en algunas situaciones la presentación o coestimulación insuficientes conducen a una también insuficiente respuesta de las células T e incluso a la anergia de las mismas. El proceso de activación eficiente de las células T puede ser modulado por adyuvantes.

En ocasiones, la entrega apropiada de las dos señales a los linfocitos T no es suficiente para estimular la respuesta inmune. En las vacunas terapéuticas para el tratamiento del cáncer, ocurre este fenómeno con mucha frecuencia. En general, las metástasis tumorales alcanzan los órganos linfoides y secretan numerosos factores solubles como el TGF- $\beta$ , la IL-10 o la prostaglandina E<sub>2</sub>, que afectan directamente las funciones de los linfocitos T activados [208]. Por ejemplo, la IL-10 es la principal causante de la inducción de anergia, y niveles altos de esta citocina se han detectado en pacientes con tumores sólidos, así como en tumores malignos

hematopoyéticos [24, 25]. El TGF- $\beta$  inhibe la proliferación de las células T y su diferenciación a CTL y células Th [209].

Las DC que migran desde la periferia pueden ser procesadas por las DC residentes en los órganos linfoides, y los Ag presentados de forma cruzada a los linfocitos T [210, 211]. Sin embargo, las DC residentes también son susceptibles a la inmunosupresión inducida por los tumores en los órganos linfoides. Numerosas citocinas producidas por los tumores, como por ejemplo el GM-CSF, el M-CSF, la IL-6 y la IL-10, están implicadas en la deficiente maduración de estas DC. Por ejemplo, el GM-CSF es el responsable de la mielopoyesis en individuos portadores de tumores [212, 213]. Más recientemente, se ha demostrado que la administración crónica de GM-CSF en ratones conduce a la generación de las llamadas células mieloides supresoras [23]. Estas células son las responsables de la pérdida de la respuesta de CTL ante una reestimulación con un Ag. Además, también se ha demostrado que estas células inhiben la producción de IFN $\gamma$  por las células T CD8<sup>+</sup> en respuesta a un péptido específico en el contexto de MHC I [214].

El VEGF estimula la proliferación de las células endoteliales y su producción está estrechamente asociada con un mal pronóstico para el paciente de cáncer [215]. El efecto del VEGF no sólo está relacionado con la formación de la neovasculatura tumoral, sino que también es utilizado por los tumores para dañar a las DC. Ha sido demostrado que el VEGF inhibe la activación de múltiples linajes de células hematopoyéticas, lo cual provoca el aumento del número de células B inmaduras y de las células supresoras mieloides [216].

### 2.3.3 Fase efectora

Los linfocitos activados migran a los tejidos tumorales para llevar a cabo sus funciones efectoras. En un inicio el tumor crece sin causar destrucción del tejido normal que lo rodea, y

por tanto no es detectado por el sistema inmune, ni siquiera en el caso en que la vacunación haya sido efectiva. Cuando el tumor crece causa la destrucción del tejido que le rodea, y crea el ambiente necesario para alertar y atraer a las células del sistema inmune, las cuales se enfrentan entonces, a los mecanismos de defensa del tumor [217].

La destrucción del tumor es la tarea más difícil de una vacuna de cáncer. Muchas vacunas de cáncer han logrado inducir la activación específica de células T CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup>. Sin embargo, esto no ha sido suficiente para producir la regresión del tumor [218].

Un linfocito T CD8<sup>+</sup> apropiadamente activado tiene que enfrentarse a varios de los mecanismos que utilizan los tumores para escapar. Tal es el caso de la disminución en la expresión de MHC I en las células tumorales. Este fenómeno previene el reconocimiento de los tumores y por tanto la lisis por parte de los CTL. Existen muchos datos que apoyan que la disminución de la expresión de los alelos HLA-A y HLA-B es algo común e importante clínicamente, ya que correlaciona negativamente con el pronóstico de supervivencia [219, 220].

También se ha demostrado que para algunos tumores la presencia de IFN $\gamma$  incrementa de forma significativa la densidad de MHC I en las membranas [221]. Otro mecanismo mediante el cual el IFN $\gamma$  tiene actividad antitumoral es a través de la inhibición de la angiogénesis [222].

La inducción de células T no respondedoras, sin que ello implique su eliminación, contribuye en buena medida al escape de los tumores. Como se describió anteriormente, las DC pueden ser afectadas por productos derivados de los tumores como la IL-10, e inducir la anergia, en lugar de la activación, en las células T específicas por los tumores [223, 224]. Por otra parte, quizás el ejemplo más directo de inducción de un estado de no respuesta en las células T involucra el mecanismo de Fas/FasL. Después de la activación, las células T expresan la molécula Fas (CD95) y se hacen susceptibles a la muerte celular mediada por este mecanismo.



Sin embargo, contraria a la visión clásica de que las células tumorales causan la muerte de los linfocitos T porque expresan FasL, la realidad es que las células T en el microambiente tumoral son inducidas a expresar también el FasL, conduciendo a la inducción de la muerte de unas por las otras, a través de los mecanismos clásicos basados en la activación de las caspasas [225].

Recientemente ha habido un renacer en el interés por las células Treg  $CD4^+/CD25^+$ , las cuales tienen un papel fundamental en muchos aspectos de la tolerancia inmunológica. Como la inmunidad contra los tumores es, en parte, un proceso autoinmune, se ha postulado que las Treg pueden también inhibir la generación de respuesta contra los tumores [226]. En numerosos modelos tumorales, la inyección de un anticuerpo monoclonal (AcM) anti-CD25, elimina las células  $CD4^+/CD25^+$  y previene la progresión tumoral [227]. La activación de las Treg no se circunscribe solamente a la especificidad por Ag tumorales, sino por cualquier Ag del entorno tumoral que sea presentado al sistema inmune [228]. El ambiente inmunosupresor alrededor de los tumores puede conducir, por sí mismo a la activación de Treg, quizás previniendo la activación de las DC y por tanto desfavoreciendo la activación de las células T efectoras convencionales. De hecho, los resultados de varios experimentos *in vitro* indican que las DC estimuladas en condiciones particulares y no completamente maduras promueven la activación de células Treg [26, 27].

#### **2.4 Los gangliósidos como inmunosupresores**

Los gangliósidos son glicoesfingolípidos, que están sobreexpresados en la membrana de las células tumorales y son liberados por estas en cantidades considerables en forma de monómeros, micelas y vesículas de membrana [28-30]. De hecho, la concentración de estos lípidos en el microambiente tumoral es muy alta, y sus niveles en el suero y el fluido ascítico

de animales y humanos portadores de tumores son mayores que en los individuos normales [229]. Por otra parte, como los gangliósidos liberados por los tumores pueden incorporarse a la membrana de las células del hospedero [230], es posible que estas moléculas modulen la interacción del tumor con el sistema inmune. Se han obtenido evidencias de que los gangliósidos son potentes estimuladores del crecimiento tumoral *in vivo* [31], y se ha demostrado su capacidad inhibitoria sobre múltiples eventos de la respuesta inmune celular [32]. Todos estos elementos sustentan la hipótesis de que los gangliósidos son uno de los factores solubles más importantes en la inmunosupresión provocada por los tumores.

La actividad inmunosupresora de los gangliósidos depende de su estructura molecular, tanto de las características de la porción ceramida como de la localización y número de las moléculas de ácido siálico. Por ejemplo, comparando una serie de gangliósidos purificados de cerebro humano normal, aquellos con un ácido siálico terminal enlazado a un oligosacárido compacto neutro poseen la mayor actividad inmunosupresora [231]. Por otra parte, los gangliósidos con cadenas más cortas de ácido graso en la estructura de la ceramida son más potentes inhibiendo la proliferación *in vitro* de los linfocitos humanos, en respuesta a un Ag soluble, que aquellos con cadenas más largas de ácido graso. Precisamente las especies de gangliósidos que tienen cadenas cortas de ácido graso (y por tanto mayores propiedades inmunosupresoras), son liberadas preferentemente por las células tumorales en su microambiente, lo cual contribuye a evadir su eliminación por el sistema inmune [28].

Los mecanismos de inmunosupresión inducida por los gangliósidos son múltiples y no están completamente dilucidados. No obstante, está claro que tanto las APC como los linfocitos B y T son afectados de manera considerable por los gangliósidos derivados de tumores [32]. Por ejemplo, hay resultados sobre el efecto inmunosupresor de los gangliósidos *in vivo* donde se demuestra que el GM3 afecta la capacidad del sistema inmune de rechazar alotransplantes de

corazón o pulmones [232]. Además, se ha demostrado que gangliósidos purificados de cerebro bovino suprimen la severidad clínica de la encefalitis alérgica experimental inducida en ratones diabéticos no-obesos por la administración de un péptido de la glicoproteína de mielina de oligodendrocitos [233]. Por otra parte, los gangliósidos tumorales afectan la respuesta inmune específica por tumores. MacKallip y colaboradores probaron que gangliósidos purificados de células tumorales FBL-3 (eritroleucemia) inhiben *in vitro* la respuesta linfoproliferativa secundaria específica a este tumor, así como la generación de CTL específicos por el tumor. Por otra parte, estos esfingolípidos producen *in vivo* una inhibición de la respuesta inmune antitumoral, tanto primaria como secundaria. Los estudios anteriores aportan evidencias de que el metabolismo de los gangliósidos es un factor activo en el proceso de formación del tumor [32].

Se ha demostrado también que la exposición de esplenocitos de ratón a algunos gangliósidos, conduce a una reducción de la transcripción de los genes que codifican para las citocinas asociadas a las células Th1: IL-2 e IFN- $\gamma$ . Este efecto se debe posiblemente al bloqueo por los gangliósidos de la localización nuclear de la proteína NF- $\kappa$ B activada, la cual es un factor de transcripción involucrado en la expresión de varios genes que codifican para citocinas. Sin embargo, la transcripción de los genes que codifican para las citocinas asociadas a las células Th2, como la IL-4, así como para la citocina inmunosupresora IL-10, no se afecta por el tratamiento de los esplenocitos con los gangliósidos [234]. Por otra parte, Kanda describió que los gangliósidos GD1a y GM3 inducen un incremento de la producción de IL-10 por las células T humanas [235]. Estos resultados sugieren que los gangliósidos liberados por los tumores modifican el balance de la respuesta inmune antitumoral de un patrón Th1 a un patrón Th2, lo que provoca una reducción en la respuesta inmune celular que puede resultar crítica para la eliminación del tumor [236].

Las DC también son afectadas por los gangliósidos. Por ejemplo, las DC humanas incubadas con el gangliósido GD1a, muestran una reducción en la expresión de CD40 y de CD80 pero no de CD86, así como una marcada inhibición de la secreción de las citocinas IL-6, IL-12 y TNF- $\alpha$ . Incluso, cuando estas DC son pulsadas con toxoide tetánico, la expresión de moléculas coestimuladoras y la secreción de citocinas inflamatorias permanecen inalteradas, y no inducen la proliferación normal de las células T en respuesta al Ag [237-240].

Además, los gangliósidos derivados de neuroblastomas, tanto humanos como murinos, inhiben la generación de DC funcionalmente activas a partir de precursores CD34<sup>+</sup> humanos y de precursores hematopoyéticos murinos, lo cual se evidencia por la baja expresión de las moléculas CD80, CD83 y CD86, así como por la afectación de la función aloestimuladora de estas APC [241]. También se ha informado que los gangliósidos GM3 y GD3 purificados de melanoma humano inhiben la diferenciación fenotípica y funcional de las DC derivadas de monocitos, e inducen su apoptosis [242]. Los gangliósidos también bloquean la producción de TNF $\alpha$  [243], de IL-1 [244] y la presentación antigénica [245] por los monocitos humanos, así como la producción de óxido nítrico por los macrófagos murinos [246].

### **3 MATERIALES Y MÉTODOS**

#### **3.1 Reactivos, líneas celulares y animales de experimentación**

##### *3.1.1 Ratones*

Parte de los ratones C57BL/6 y BALB/c utilizados en la experimentación se obtuvieron del Centro Nacional para la Producción de Animales de Laboratorio (CENPALAB, Cuba) y durante la experimentación se mantuvieron en el bioterio del CIM (Cuba). Los ratones transgénicos DO11.10 y parte de los ratones C57BL/6 y BALB/c se criaron y mantuvieron en la unidad libre de patógenos específicos del “Institute for Animal Health” (IAH, Reino Unido) y los C3H/HeJ se obtuvieron de Harlan UK (Reino Unido). Los ratones utilizados en la experimentación tenían entre 6 y 12 semanas de edad al inicio de los experimentos. Todas las manipulaciones y experimentos se realizaron de acuerdo con las directrices establecidas por el CIM (Cuba) y el IAH (Reino Unido) para el manejo de los animales de laboratorio.

##### *3.1.2 Medios de cultivo*

Se utilizaron los medios de cultivo RPMI 1640 (Gibco, Reino Unido) con glutamina I y 25 mM HEPES (Gibco, Reino Unido) y D'MEM con glutamina I y 25 mM HEPES (Life Technologies Ltd., Reino Unido). Ambos medios se suplementaron con suero fetal bovino (FCS- del inglés “fetal calf serum”) al 10 % (Gibco, Reino Unido), penicilina 100 U/ml, estreptomicina 100 µg/ml y 2-mercaptoetanol 50 µM.

##### *3.1.3 Líneas celulares*

La línea de fibroblasto murino MC57G, el adenocarcinoma de colon CT26 [247] y los hibridomas productores de inmunoglobulinas de rata específicos a moléculas murinas YTS, RIL172, JIJ.10, GK1.5, RAGB2 y TIB120 se obtuvieron de la “American Type Culture Collection” (ATCC, EEUU) y se cultivaron en D'MEM. La línea celular de carcinoma mamario F3II fue donada por el Dr. D.

Alonso de la Universidad de Quilmes (Argentina), y también se cultivó en D'MEM [248]. La línea celular B3Z fue donada por el Dr. N. Shastri de la Universidad de California (EEUU) y se cultivó en RPMI [249].

#### *3.1.4 Estímulos y péptidos*

El LPS purificado a partir de la cepa 44/76 de *N. meningitidis* serogrupo B fue gentilmente proveído por el Dr. Svein Andersen, del Edward Jenner Institute for Vaccine Research (EJIVR, Reino Unido). La OVA grado VI y el ácido polinosinoico-policitidílico (PIC) se obtuvieron de Sigma Chemical (Reino Unido). Se utilizaron los péptidos sintéticos OVA<sub>257-264</sub> (SIINFEKL), OVA<sub>323-339</sub> (ISQAVHAAHAEINEAGR) y E7<sub>49-57</sub> (RAHYNIVTH), perteneciente este último a la proteína E7 del virus de papiloma humano tipo 16.

#### *3.1.5 Preparación de los VSSP*

Los VSSP se produjeron en el CIM (Cuba) [34]. Para ello se partió de VME de *N. meningitidis* serogrupo B cepa 385 purificadas en el Instituto Finlay (Cuba) [250]. Para la obtención de los VSSP, las VME se disolvieron a una concentración final de 1 mg/mL en la solución tampón Tris-Cl 0,01 M, pH 8,5, con desoxicolato de sodio 12 mM y dodecil sulfato de sodio (SDS- del inglés “sodium dodecylsulfate”) 1mM. A esta suspensión se le añadió igual masa de NAcGM3 extraído de eritrocitos de perros mediante el método de Folch modificado [251]. La mezcla se mantuvo en agitación a 4°C y a las 18 horas se sometió a un proceso de diálisis por 14 días, en la solución tampón Tris-Cl 0,01 M pH 8,5, utilizando una membrana Spectra/Por de límite de poro de 3,5 KDa (Spectrum Medical Industries, Texas). La preparación dializada resultante se centrifugó a  $10^5 \times G$  durante una hora, el precipitado se descartó y al sobrenadante se le determinaron las concentraciones de proteínas y gangliósidos por los métodos de Lowry [252] y de resorcinol [253], respectivamente.

Finalmente la solución obtenida conteniendo los VSSP se esterilizó por filtración a través de una membrana de acetato de celulosa (0,2  $\mu\text{m}$ ) (Sartorius, Germany) y se almacenó a 4°C hasta su uso.

### *3.1.6 Anticuerpos monoclonales*

Los siguientes AcM con sus respectivos controles de isotipo se obtuvieron de BD Pharmingen (Reino Unido) y se utilizaron para Citometría de Flujo (FACS- del inglés “fluorescence activated cell sorter”):

AcM de ratón específicos para las moléculas humanas CD83 (HIT3a), CD86 (IT2.2) y HLA-DR (G46-6), todos conjugados a ficoeritrina (PE- del inglés “phycoerythrin”);

AcM de hámster específicos para las moléculas murinas CD11c (HL3) y CD40 (HM40-3), conjugados a PE e isotiocianato de fluoresceína (FITC- del inglés “fluorescein iso-thiocyanate”), respectivamente;

AcM de rata específicos para las moléculas murinas MHC II/I-E<sup>d</sup> (2G9), CD86/B7.2 (GL1), CD4 (RM4-4), todos conjugados a FITC;

AcM de rata específico para la molécula murina CD8 (YTS.169) conjugado a Cy5- ficoeritrina (Cy5PE);

AcM de rata específicos para las moléculas murinas IL-12p40/70 (C15.6), TNF $\alpha$  (MP6-XT22) y CD4 (RMA-5), conjugados a alofocianina (APC<sub>r</sub>- del inglés “allophycocyanin”).

También se utilizaron sobrenadantes de cultivo de los hibridomas productores de AcM (ATCC, EEUU) YTS, RIL172, JIJ.10, GK1.5, RAGB2 y TIB120. Estos hibridomas producen AcM específicos para las moléculas CD8, CD4, Thy1.2, CD4, B220 o MHC II, respectivamente.

### *3.1.7 Tetrámeros*

Para el análisis de la frecuencia de las células T CD8<sup>+</sup> específicas para el péptido SIINFEKL, se utilizó el tetrámero H-2K<sup>b</sup>-SIINFEKL conjugado a PE (ProImmune, Reino Unido).

## **3.2 Ensayos**

### *3.2.1 Ensayos de citometría de flujo*

La expresión de las moléculas de superficie evaluadas en los diferentes ensayos se determinó por FACS como se describe a continuación. Para minimizar las uniones inespecíficas, las células se incubaron previamente durante 15 min en solución tamponada con fosfato (PBS- del inglés “phosphate buffered solution”) con azida sódica (0,09 %) y suero normal de ratón al 2 %. Después,  $5 \times 10^5$  células por muestra se incubaron a 4°C con los respectivos AcM conjugados a los fluoróforos durante otros 15 min.

La detección intracelular de TNF $\alpha$  e IL-12p40/p70 se realizó con los juegos de reactivos BD Cytotfix/Citoperm<sup>TM</sup> Plus y BD GolgiPlug<sup>TM</sup> (BD Pharmingen, Reino Unido), según el siguiente protocolo recomendado por el fabricante. Las células en cultivo con los respectivos estímulos se incubaron las últimas ocho horas con brefeldina A (GolgiPlug<sup>TM</sup>) a una concentración final de 10  $\mu$ g/mL. Seguidamente las células se colectaron, se lavaron y se marcaron las moléculas de superficie como se describe en el párrafo anterior. Posteriormente, el proceso de fijación y permeabilización se realizó con el reactivo Cytotfix/Citoperm<sup>TM</sup> manteniendo las células en agitación constante durante 10 min a 4°C y en la oscuridad. Finalmente, las células se incubaron con los AcM específicos para TNF $\alpha$  e IL-12p40/p70 durante 15 min a 4°C.

En ambos métodos, una vez marcadas las células se lavaron extensivamente y  $10^4$  células como máximo se adquirieron empleando un citómetro de flujo FACScan. Solo en el caso de la determinación de fluorescencia emitida por APC<sub>f</sub> se utilizó un citómetro de flujo FACScalibur. Ambos citómetros se obtuvieron de Becton Dickinson (EEUU). Todas las muestras se caracterizaron en cuanto a la intensidad de fluorescencia emitida por los fluoróforos con los que se marcaron y en cuanto a la granulocidad y al tamaño de las células. Estos dos últimos parámetros están dados por la dispersión del láser hacia los lados (SSC-H- del inglés “side scatter”) y hacia delante (FSC-H- del



inglés “forward scatter”), respectivamente. Todos estos datos obtenidos, se analizaron usando el programa WinMDI versión 2.8.

### *3.2.2 Preparación de las células dendríticas humanas a partir de monocitos*

Las DC humanas se diferenciaron *in vitro* a partir del cultivo de monocitos humanos en presencia del GM-CSF e IL-4 [254]. Para ello las células mononucleares periféricas (PBMC- del inglés “peripheral blood mononuclear cells”) se aislaron a partir de sangre heparinizada de donantes sanos utilizando el método clásico de la centrifugación en un gradiente de densidad Histopaque ( $\rho=1,077$ ) (Sigma, Reino Unido). Las PBMC se colectaron de la interfase y se lavaron tres veces con PBS suplementada con EDTA 2 mM, albúmina de suero bovina (BSA- del inglés “bovin serum albumin”) 0,5 % y un 10 % de suero autólogo inactivado a 56°C durante 30 min. A partir de las PBMCs, se obtuvieron las células CD14<sup>+</sup> o monocitos, por selección negativa tras una separación en gradiente magnético utilizando el juego de reactivos comerciales para el aislamiento de los monocitos MidiMACS (Miltenyi Biotech GmbH, Alemania). Para la purificación se incubaron las PBMCs con un coctel de AcMs haptenizados específicos por las moléculas humanas CD3, CD7, CD19, CD45RA, CD56 ó IgE, durante cinco min, a 6°C. Seguidamente, las células se lavaron con la solución de PBS suplementado descrita anteriormente y se incubaron con AcM anti-haptenos conjugados a microperlas durante 15 min, a 6°C. Las células marcadas se aplicaron a columnas LS<sup>+</sup> (Miltenyi Biotech GmbH, Alemania) sometidas a un campo magnético. De esta forma, la fracción celular compuesta por las células CD3<sup>+</sup>, CD7<sup>+</sup>, CD19<sup>+</sup>, CD45RA<sup>+</sup>, CD56<sup>+</sup> e IgE<sup>+</sup> quedó retenida en la columna, mientras que la fracción eluyente estaba formada en más del 90 % por las células CD14<sup>+</sup>.

La fracción celular enriquecida en monocitos, obtenida por purificación con perlas magnéticas, se cultivó a una densidad de  $5 \times 10^5$  células/mL en RPMI suplementado con GM-CSF humano

recombinante a 50 ng/mL e IL4 a  $10^3$  U/mL (R&D Systems, Reino Unido). El medio de cultivo se sustituyó por medio fresco cada tres días. Al séptimo día las DC obtenidas se colectaron, se lavaron y se cultivaron a una concentración de  $10^6$  células/mL en RPMI solo o en presencia del LPS (0,1  $\mu$ g/mL) o los VSSP (1  $\mu$ g/mL). Al cabo de 18 horas, las células se colectaron y su fenotipo y marcadores de activación se analizaron por FACS. La concentración del LPS utilizada garantiza la maduración de las DC humanas obtenidas de monocitos [254] y la concentración de los VSSP se calculó a partir del contenido del LPS en estas partículas, estimado en alrededor del 10 %.

### *3.2.3 Preparación de las células dendríticas murinas a partir de la médula ósea*

Las DC murinas utilizadas se obtuvieron a partir de precursores aislados de la médula ósea (bmDC- del inglés “bone marrow DC”) [255]. Con este objetivo se extrajeron, en condiciones estériles, los huesos fémur y tibia de los ratones recién sacrificados por dislocación cervical. Los extremos de los huesos se cortaron y la médula se aisló mediante el paso de un flujo de medio de cultivo por el interior del hueso con una aguja 23Gx1”. Las células extraídas se sembraron en placas de seis pozos (TPP, Switzerland), a una densidad de  $6 \times 10^5$  células/mL en 3 mL de medio D’MEM suplementado con 20 ng/mL de GM-CSF (R&D Systems, Reino Unido). Entre las 72 y 90 horas de cultivo, se añadieron otros 3 mL de medio de cultivo suplementado con GM-CSF. A los siete días de cultivo las células se colectaron y se sometieron a un proceso de purificación de las bmDC por selección positiva mediante perlas magnéticas, utilizando el juego de reactivos comerciales para el aislamiento de las DC murinas CD11c/MACS (Miltenyi Biotech GmbH, Alemania). Para la purificación, las células se incubaron con una solución de AcM anti-CD11c conjugado a microperlas durante 15 min, a 6°C. Las células marcadas se aplicaron a columnas LS<sup>+</sup> (Miltenyi Biotech GmbH, Alemania) sometidas a un campo magnético. De esta forma, la fracción celular compuesta por las células CD11c<sup>+</sup> quedó retenida en la columna, mientras que la fracción eluyente, con las posibles células

contaminantes, se descartó. Finalmente, se eluyeron las DC al desacoplar las columnas del campo magnético. La fracción resultante, con más del 96 % de pureza, se cultivó a una densidad de  $10^6$  células/mL en D'MEM solo o en presencia del LPS (1  $\mu\text{g/mL}$ ) o los VSSP (10  $\mu\text{g/mL}$ ). La concentración del LPS utilizada garantiza la maduración de las bmDC [255] y la concentración de los VSSP se calculó a partir del contenido del LPS en estas partículas. En los ensayos de determinación de maduración o secreción de las citocinas intracelulares por FACS, las células se colectaron a las 18 de cultivo. En el caso del análisis de la expresión de las citocinas y los factores quimiotácticos proinflamatorios a nivel de ARNm, las células se colectaron a las ocho horas de cultivo.

#### *3.2.4 Ensayo de protección de ribonucleasas para la determinación de citocinas y factores quimiotácticos proinflamatorios transcritos en las células dendríticas*

Para la determinación a nivel de ARNm de citocinas y factores quimiotácticos proinflamatorios, las bmDC derivadas de los ratones C57BL/6 o C3H/HeJ se cultivaron en medio solo o en presencia del LPS (1  $\mu\text{g/mL}$ ) o los VSSP (10  $\mu\text{g/mL}$ ). A las ocho horas de cultivo las células se lavaron y su ARN total se aisló utilizando el juego de reactivos comerciales RNeasy Midi (Qiagen Ltd, Reino Unido). Para ello las células colectadas se lisaron utilizando una solución tampón que contiene isotiocianato de guanidinio suministrada en el juego de reactivos, y se añade etanol al 70 % para crear las condiciones que promueven la unión selectiva del ARN a las membranas de sílica-gel de las columnas RNeasy. El ARN total se unió a las membranas y los contaminantes se descartaron eficientemente por lavados sucesivos. El ARN retenido en las columnas se eluyó con agua libre de ribonucleasas (ARNasas), y se cuantificó determinando la absorbancia de las muestras a las longitudes de onda de 260 y 280 nm en un espectrofotómetro DU-600 (Beckman, Reino Unido)

Una vez aislados y cuantificados los ARN, se llevó a cabo el ensayo de protección de ARNasa utilizando el sistema de reactivos RiboQuant<sup>TM</sup> (BD Pharmingen, Reino Unido). Los juegos de

moldes mCK-5, para la determinación de ARNm correspondiente a las proteínas Ltn, RANTES, Eotaxin, MIP-1 $\beta$ , MIP-1 $\alpha$ , MIP-2, IP-10, MCP-1, TCA-3, L32 y GAPDH; y mCK-2b que contiene moldes de ADN para determinar IL-12p35, IL-12p40, IL-10, IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-1Ra, IL-18, IL-6, IFN $\gamma$ , MIF, L32 y GAPDH, se adquirieron también de Pharmingen. El ensayo se llevó a cabo utilizando los moldes de ADN para sintetizar las sondas marcadas con [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]UTP (37MBq) (ICN, Reino Unido) usando la ARN polimerasa T7. Seguidamente, cada uno de los ARNs blanco aislados de las DC se hibridaron con las sondas marcadas durante toda la noche y luego se digirieron con ARNasa A y T1 de acuerdo con el protocolo sugerido por el fabricante. Las muestras se trataron con proteinasa K y luego el ARN se extrajo con cloroformo y se precipitó en presencia de acetato de amonio. Las muestras y los moldes marcados se aplicaron en un gel de acrilamida al 5 % bajo un campo eléctrico de 50 W de potencia. El gel se adsorbió sobre un papel de filtro, se secó al vacío y luego se expuso, durante 18 horas, a una pantalla de almacenamiento de fosfoimágenes. Las pantallas, una vez expuestas, se analizaron por densitometría en un ‘Storm 860 Phosphoimager’ con el programa Scanner Control 4.1 a una resolución de 50  $\mu$ m y se visualizaron usando el programa ImageQuant NT 4.2a. Todo el equipamiento y programas para el tratamiento de imágenes se adquirió en Molecular Dynamics (Reino Unido) La intensidad de cada banda se corrigió con su valor de fondo y las diferencias entre cada muestra se normalizaron usando el valor correspondiente al del gen de mantenimiento celular GAPDH.

### *3.2.5 Ensayos de medición de activación de las células T CD4<sup>+</sup> aisladas del ratón transgénico DO11.10*

Para este ensayo se aislaron las células Th vírgenes del ratón transgénico DO11.10. En este ratón, de fondo genético BALB/c, todas las células T CD4<sup>+</sup> presentan el receptor (TCR-del inglés “T cell receptor”) específico para el péptido de la OVA inmunodominante para la molécula de MHC II/I-A<sup>d</sup>, 323-ISQAVHAAHAEINEAGR-339 [256]. Para la purificación de las células se extrajeron los

bazos de los ratones transgénicos y se hizo una suspensión celular en medio RPMI. Los esplenocitos se preincubaron en PBS y BSA al 0,5 %. Una vez bloqueadas las uniones inespecíficas, se hizo un primer paso de purificación de las células vírgenes por selección positiva mediante perlas magnéticas, utilizando el juego comercial de reactivos CD62-L/MACS (Miltenyi Biotech GmbH, Alemania). Para esta primera selección los esplenocitos se incubaron, durante 15 min a 6°C, con una solución de AcM anti-CD62-L conjugado a microperlas. Las células marcadas se aplicaron a columnas LS<sup>+</sup> (Miltenyi Biotech GmbH, Alemania) sometidas a un campo magnético. De esta forma, la fracción celular compuesta por las células CD62-L<sup>+</sup> quedó retenida en la columna, mientras que la fracción eluyente, con las posibles células contaminantes, se descartó. Finalmente, se eluyeron las células vírgenes al desacoplar las columnas del campo magnético. La fracción resultante, con más del 90 % de pureza, se marcó con un AcM específico para la molécula CD4 conjugado a APC<sub>f</sub>, según el protocolo descrito para los ensayos de citometría de flujo. Finalmente, las células positivas para el fluoróforo APC<sub>f</sub> se seleccionaron y colectaron con más de un 99 % de pureza en un Citómetro de Flujo Separador de Células (MoFlo FACS sorter, Cytomation, Reino Unido).

Las células T CD4<sup>+</sup> vírgenes se incubaron, por triplicado, con bmDC de ratones BALB/c pre-tratadas con medio de cultivo solo o con el LPS (1 µg/mL) o los VSSP (10 µg/mL). En detalles, 10<sup>3</sup> bmDC inactivadas por una dosis de radiación  $\gamma$  de 2,5 Gy, se cocultivaron, en placas de 96 pozos (NUNC<sup>TM</sup>, Canadá), con 5 x 10<sup>4</sup> células T purificadas, en presencia del péptido OVA 323-ISQAVHAAHAEINEAGR-339 a las concentraciones de 0, 30, 90 y 150 nM.

Los niveles de proliferación de las células T CD4<sup>+</sup> se determinaron midiendo la incorporación de [<sup>3</sup>H]-TdR (1 µCi/pozo) (Amersham, Reino Unido) en el cuarto día del cultivo. La radiactividad se determinó en un contador de centelleo para microplacas Topcount (Wallac, Finlandia).

En paralelo, el mismo experimento se escaló a placas de 24 pozos (NUNC™, Canadá), y al tercer día se le añadieron al cultivo el ionóforo de calcio ionomicina a 500 ng/mL (Sigma, EEUU) y forbol 12-miristato-13-acetato (PMA- del inglés “phorbol 12-myristate 13-acetate”) a 50 ng/mL (Sigma, EEUU), para amplificar la secreción total de proteínas por las células. Al cabo de 18 horas de incubación, los sobrenadantes de cultivo se colectaron para los ensayos de determinación de las citocinas IL-2, IL-4 e IFN $\gamma$  usando los respectivos juegos de reactivos comerciales de ELISA para ratón Quantikine™ (R&D Systems Ltd, Reino Unido). Este ensayo consiste en un ELISA cuantitativo tipo “sandwich”, donde los patrones de las citocinas y las muestras se añaden a placas pre-recubiertas con AcMs específicos para las citocinas en evaluación. Luego de la incubación y lavados extensivos, las sustancias no unidas a la placa son descartadas y se añade un AcM específico para la citocina, conjugado a la enzima peroxidasa. Por último, se añade la solución del sustrato, también suministrada en el juego de reactivos, y se lee la densidad óptica a 405 nm en un lector de ELISA (Organon Teknika, Austria).

### *3.2.6 Ensayos de estimulación del hibridoma B3Z para la evaluación de la presentación cruzada de antígenos*

Para la evaluación *in vitro* de la presentación del péptido inmunodominante OVA 257-SIINFEKL-264 en la molécula MHC I/H2-K<sup>b</sup>, se incubaron las bmDC obtenidas de ratones C57BL/6 con la OVA (10  $\mu$ g/mL) sola o mezclada con el LPS (0,1  $\mu$ g/mL) o con los VSSP (100  $\mu$ g/mL). Después de ocho horas de incubación se cultivaron cantidades graduales de DC con  $5 \times 10^4$  células de la línea B3Z en placas de 96 pozos (NUNC™, Canadá). Esta línea celular es un hibridoma T CD8<sup>+</sup> específico por el complejo péptido-MHC I: SIINFEKL-H2-K<sup>b</sup>, y porta el gen de la enzima  $\beta$ -galactosidasa ( $\beta$ -Gal) bajo el control del promotor de la IL-2 [249]. Al cabo de 16 horas de incubación se descartaron los sobrenadantes y a las células remanentes se les añadió el sustrato de la enzima  $\beta$ -Gal, 5-bromo-4-cloro-3-indolil- $\beta$ -D-galactopiranosido (X-Gal) (1,5 mg/mL de X-Gal en

PBS-Nonidet-P40 0,25 %) (Sigma–Aldrich, Reino Unido). Las células se incubaron con el sustrato a una temperatura de 37°C hasta el desarrollo del color azul en el control positivo del experimento, que consistió en las células B3Z activadas con las DC pulsadas con el péptido SIINFEKL. La activación del hibridoma B3Z se determinó por la absorbancia a 405 nm medida en un lector de ELISA (Organon Teknika, Austria). Los datos se obtienen después de restar el valor correspondiente a la activación del B3Z con las DC no estimuladas.

Para la evaluación *in vivo* de la presentación del péptido SIINFEKL en la molécula de MHC I, se aislaron los esplenocitos totales de los ratones C57BL/6 inmunizados por vía subcutánea, 24 horas antes, con 50 µg de la OVA en PBS o mezclada con 200 µg de los VSSP. Seguidamente,  $5 \times 10^5$  células se incubaron toda la noche con  $10^6$  células B3Z en placas de 24 pozos. Para la detección de β-Gal, las células se colectaron, se fijaron en PBS-0,5 % glutaraldehído (Sigma-Aldrich, Reino Unido) y se incubaron con la solución de X-Gal descrita en el ensayo *in vitro*. Finalmente, las células azules de cada muestra se contaron en una cámara de Neubauer bajo un microscopio óptico. En este caso se utilizaron los mismos controles positivos y negativos descritos para el ensayo *in vitro*.

### 3.2.7 *Ensayo de tetrámeros para la determinación de la frecuencia de las células T CD8<sup>+</sup> específicas.*

Para evaluar la frecuencia de clones T CD8<sup>+</sup> específicos para un Ag producto de la inmunización, grupos de tres ratones C57BL/6 se inyectaron por vía subcutánea los días 0, 1 y 8 con 1 mg de la OVA en PBS o mezclados con 200 µg de los VSSP. En este ensayo se utilizó como adyuvante de referencia el PIC, el cual se administró, en dosis de 100 µg cada vez, el día cero mezclado con la OVA y solo los días 1 y 2. La selección de la dosis de la OVA y los esquemas de inmunización se basaron en la experiencia previa con sistemas de adyuvación similares del EJIVR (Reino Unido) [257]. Todos los ratones se sacrificaron el día 10 y los esplenocitos totales se aislaron y se incubaron

con el tetramero H2-K<sup>b</sup>-SIINFEKL conjugado a PE (ProImmune, Reino Unido) durante 40 min, a temperatura ambiente y en la oscuridad. Seguidamente, las células se incubaron con un AcM específico para la molécula murina CD8 conjugado a Cy5PE (BD PharMingen, Reino Unido) durante cinco min en las mismas condiciones ambientales. Por último, se adquirieron 10<sup>4</sup> eventos en la ventana correspondiente a las células CD8<sup>+</sup> en un FACScan (Becton Dickinson, EEUU) y la frecuencia de las células H2-K<sup>b</sup>-SIINFEKL<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> se determinó utilizando el programa WinMDI versión 2.8.

### *3.2.8 Ensayo de ELISPOT para la determinación de las células T CD8<sup>+</sup> secretoras de IFN $\gamma$*

Con el objetivo de evaluar la secreción de IFN $\gamma$  por las células T CD8<sup>+</sup> activadas por la inmunización con diferentes Ags se utilizó un ensayo de ELISPOT. Primeramente se inyectaron por vía subcutánea, grupos de tres ratones C57BL/6, los días 0, 1 y 8 con 1 mg de la OVA o los días 0 y 14 con 50  $\mu$ g de los péptidos SIINFEKL o RAHYNIVTH. Ambos sistemas antigénicos se administraron en PBS o mezclados con 200  $\mu$ g de los VSSP. Los ratones se sacrificaron los días 10 ó 21 para las proteínas y los péptidos, respectivamente. Los esplenocitos de los ratones, después de lisados los eritrocitos con una solución de NH<sub>4</sub>Cl (0,83 %), se sometieron a un proceso de enriquecimiento en las células T CD8<sup>+</sup>. Para ello las células de cada ratón se incubaron durante 15 min a 4°C con los sobrenadantes de cultivo de las líneas celulares TIB120, GK1.5 y RAGB2, todas productoras de AcMs de rata de isotipo IgG específicos para las moléculas de ratón MHC II, CD4 y B220, respectivamente. Seguidamente, las células se trataron durante 40 min a 4°C y en agitación constante, con un AcM anti-IgG de rata acoplado a perlas magnéticas DynaBeads (Dyna, Reino Unido). Por último, para eliminar las células reconocidas por los AcM de los sobrenadantes utilizados: APCs, T CD4<sup>+</sup>, y B, respectivamente, las muestras individuales se sometieron a un



campo magnético y se colectaron las células no unidas, obteniéndose poblaciones enriquecidas en las células T CD8<sup>+</sup>.

Estas células (10<sup>5</sup>/pozo) se cocultivaron, durante 36 horas, en microplacas con membranas de éster-celulosa Multi-Screen HA (Millipore, Reino Unido), previamente recubiertas con el AcM de captura anti-IFN $\gamma$  (R4-6A2) (BD Pharmingen, Reino Unido), con las células estimuladoras singénicas irradiadas (30 Gy) (5 x 10<sup>5</sup>/pozo), en presencia o ausencia de péptido (1  $\mu$ M). Estas células estimuladoras consistieron en una fracción enriquecida en APCs por eliminación de las células T. Para ello, esplenocitos de ratones C57BL/6 vírgenes se trataron *in vitro* con una mezcla de sobrenadantes de las líneas YTS, RIL172, JIJ.10 y complemento de conejo (V H Bio Ltd, Reino Unido) durante 30 min a 37°C. Estas líneas celulares producen AcM, de rata de isotipo IgM específicos para las moléculas murinas CD8, CD4 y Thy1.2, respectivamente, con los que se eliminaron las células T CD8<sup>+</sup>, T CD4<sup>+</sup> y T totales. Al cabo de las 36 horas de incubación de las células efectoras, estimuladoras y el péptido, las placas se lavaron y los puntos equivalentes a las células T CD8<sup>+</sup> productoras de IFN $\gamma$  se marcaron con un AcM anti- IFN $\gamma$  conjugado a biotina (XMG1.2) (BD Pharmingen, Reino Unido) y luego con un AcM anti-biotina conjugado a fosfatasa alcalina (Vector Laboratories, Reino Unido). Finalmente el revelado colorimétrico se hizo con el juego de reactivos comerciales AP-Substrate (Bio-Rad Laboratories, Reino Unido). Los puntos se contaron bajo un estereoscopio y los datos se obtienen una vez restados los valores correspondientes a los pozos a los que no se añadió péptido. Se consideraron positivas aquellas muestras en las que el número de puntos en los pozos con péptido era más del doble más 10 puntos con relación al pozo sin péptido correspondiente. Por último, los valores obtenidos se normalizaron con respecto al porcentaje de células T CD8<sup>+</sup> totales añadidas en los pozos, el cual se determinó, en todos los casos, por FACS.

### 3.2.9 *Ensayo de citotoxicidad por liberación de <sup>51</sup>crómo para la determinación de la actividad funcional de las células T CD8<sup>+</sup>*

Grupos de tres ratones C57BL/6 se inyectaron por vía subcutánea los días 0, 1 y 8 con 1 mg de la OVA en PBS o mezclada con 200 µg de los VSSP. Los ratones se sacrificaron el día 10 y los esplenocitos totales se aislaron y se incubaron, en presencia del péptido SIINF EKL (1 µM), con igual número de células estimuladoras aisladas por el procedimiento descrito anteriormente para los experimentos de ELISPOT. A los cinco días de incubación se contaron los blastos por exclusión con el colorante tripán azul, los cuales se utilizaron como células efectoras del experimento de citotoxicidad. Las células blanco utilizadas consistieron en la línea de fibroblasto murino MC57G, la cual se radio-marcó por incubación con una sal de <sup>51</sup>crómo (100 µCi) (Amersham, Reino Unido) durante una hora. Para el ensayo se mezclaron en placas de 96 pozos diferentes relaciones de células efectoras y blanco con o sin el péptido SIINF EKL durante seis horas. Al finalizar la incubación, se colectaron los sobrenadantes y se midió la radiación gamma en término de conteos por minuto (CPM) en un contador TopCount (Wallac, Finlandia). Como controles de liberación máxima y espontánea se emplearon los sobrenadantes de cultivo de células MC57G tratadas con SDS 10 % y sin tratar, respectivamente. El porcentaje de lisis se calculó mediante la fórmula:

$$\frac{CPM(muestra) - CPM(espontánea)}{CPM(máxima) - CPM(espontánea)} \cdot 100.$$

Los datos se muestran corregidos por el valor de lisis

obtenida con las células MC57G no pulsadas con el péptido SIINF EKL.

### 3.2.10 *Ensayo de citotoxicidad in vivo para la determinación de la dependencia de la cooperación de las células T CD4<sup>+</sup> en la activación primaria de las células T CD8<sup>+</sup> específicas*

Grupos de tres ratones C57BL/6 se inyectaron por vía subcutánea con una dosis de 1 mg de la OVA en PBS o mezclada con 200 µg de los VSSP. En paralelo, a otros dos grupos de ratones igualmente tratados, se les administró cada tres días comenzando el día anterior a la dosis de Ag, 1 mg de un

AcM anti-CD4 semipurificado por precipitación con  $\text{NH}_4\text{SO}_4$  a partir del sobrenadante de cultivo del hibridoma GK1.5. Con este tratamiento se garantizó que los niveles de las células T  $\text{CD4}^+$  en el ratón estuvieran por debajo del 1 % durante toda la experimentación, lo cual se confirmó por FACS. Al décimo día después de la dosis de la OVA, a los ratones se les inocularon, por la vena de la cola, las células blanco susceptibles a la lisis por las células T  $\text{CD8}^+$  específicas para la OVA generadas por la inmunización. Estas células blanco se generaron a partir de esplenocitos totales de ratones singénicos marcados con el fluoróforo carboxi-fluoresceín diacetato succinimidil éster (CFSE) (Molecular Probes, Reino Unido). Para ello, se incubaron  $10^7$  células/mL en PBS durante 10 min con CFSE 1  $\mu\text{M}$  para obtener las células marcadas con una mayor intensidad de fluorescencia ( $\text{CFSE}^{++}$ ), y con CFSE 100 nM para obtener las células marcadas con una menor intensidad ( $\text{CFSE}^+$ ). Seguidamente, las células  $\text{CFSE}^{++}$  se incubaron con el péptido SIINFEKL 1  $\mu\text{M}$  durante 90 min a  $37^\circ\text{C}$  y 5 %  $\text{CO}_2$ , mientras que las  $\text{CFSE}^+$  se dejaron sin pulsar como control negativo interno. Después de lavadas, las células  $\text{CFSE}^{++}$  se mezclaron en una relación 1:1 con las  $\text{CFSE}^+$ , y  $60 \times 10^6$  de esta mezcla de células blanco se inyectaron a cada ratón. Al cabo de 16 horas, los ratones se sacrificaron y el ganglio inguinal más cercano al sitio de inmunización se extrajo. Las células del ganglio se aislaron y se determinó, por FACS, el número de las células  $\text{CFSE}^+$  y  $\text{CFSE}^{++}$ , fijando la adquisición de  $5 \times 10^3$  eventos en la ventana correspondiente a las células  $\text{CFSE}^+$ . El

porcentaje de lisis específica se determinó por la fórmula:  $100 - \frac{\text{CFSE}^{++}}{\text{CFSE}^+} \cdot 100$ .

### *3.2.11 Ensayo de reto tumoral para la evaluación del efecto del tratamiento con vacunas de células irradiadas*

En los dos modelos tumorales evaluados: CT26 y F3II, se inmunizaron ratones BALB/c en el flanco izquierdo del lomo por vía subcutánea con PBS o con  $10^6$  células tumorales irradiadas (75 Gy) solas o adyuvadas con 200  $\mu\text{g}$  de los VSSP. A los 10 días de la vacunación,  $5 \times 10^4$  ó  $10^5$  células viables

de CT26 y F3II, respectivamente, se inocularon en el flanco derecho del lomo, también por vía subcutánea. Los animales se monitorearon durante los 60 días siguientes y los diámetros perpendiculares de los tumores F3II y CT26 se midieron semanalmente o cada tres días, respectivamente, con un pie de rey. Los volúmenes tumorales se calcularon mediante la fórmula:

$\frac{\pi}{6} \cdot \text{Diámetro}_{\text{mayor}} \cdot \text{Diámetro}_{\text{menor}}^2$ . Por razones éticas, los animales se sacrificaron cuando los tumores excedían un volumen de 10 mm<sup>3</sup> o cuando las condiciones generales de salud estaban afectadas.

### *3.2.12 Análisis estadísticos*

Para todos los análisis estadísticos realizados, se utilizaron los programas TonyStat [258] y el editor de gráficos GraphPad Prism versión 4.00. En todas las muestras se comprobó la normalidad mediante la prueba de Kolmogorov-Smirnov y la homogeneidad de varianza mediante la prueba de Bartlett.

Para evaluar la significación estadística de las diferencias entre los grupos de datos obtenidos en los experimentos de activación de las células T CD4<sup>+</sup> derivadas de la cepa de ratón transgénico DO11.10 y a los volúmenes tumorales determinados en los experimentos antitumorales con el carcinoma mamario F3II, se utilizó un análisis de varianza de clasificación simple y la prueba de Tukey para las comparaciones pareadas. En el resto de los ensayos, los datos no mostraron homogeneidad de varianza y/o una distribución normal aún después de las transformaciones de los datos. En estos casos, se utilizó la prueba no paramétrica de Kruskal Wallis y las comparaciones múltiples se realizaron por la prueba de comparación de rangos no paramétrica Student-Newman-Keuls (SNK). Sólo en el experimento de activación *in vitro* del hibridoma B3Z se realizó la prueba de la U de Mann-Whitney. Para el análisis de las diferencias en el tiempo a la progresión de los

tumores de los grupos retados con el carcinoma de colon CT26, se utilizó la prueba de Kaplan-Meier, y para las comparaciones entre los grupos la prueba de Log-Rank.

Las diferencias se consideraron significativas cuando  $P \leq 0,05$ .

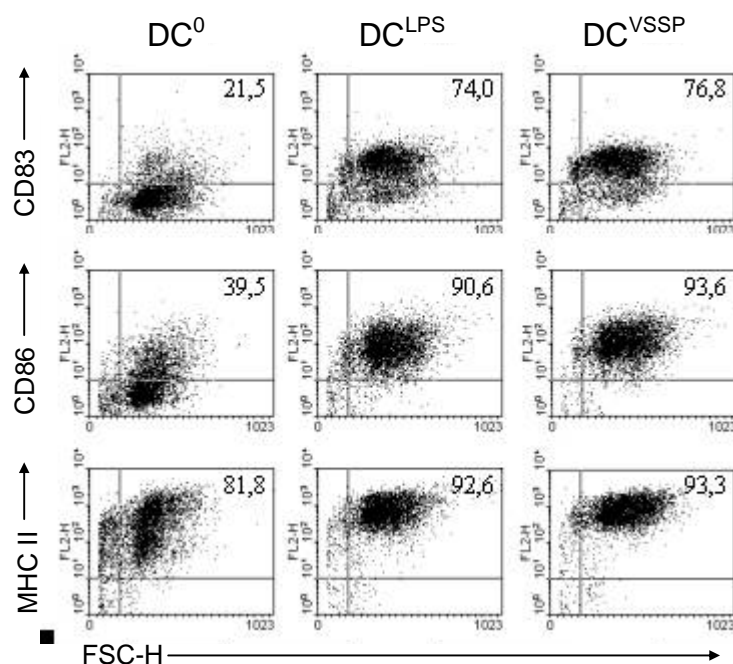


## 4 RESULTADOS

### 4.1 Activación de las células dendríticas

#### 4.1.1 Los VSSP inducen la maduración de las células dendríticas humanas

Los VSSP contienen en su estructura componentes para los cuales se han descrito propiedades estimuladoras de la maduración de las DC, como el LPS [259] y las porinas P1 y P3 de *N. meningitidis* [35, 42]. Sin embargo, el gangliósido GM3, el cual es un componente muy representado en los VSSP (37 moléculas de gangliósido por cada molécula de proteína), inhibe este fenómeno [242]. La capacidad de los VSSP de activar o inhibir el proceso de maduración se evaluó en DC humanas derivadas de monocitos. El cultivo de estas células con 1  $\mu\text{g/mL}$  de los VSSP provocó la inducción de la molécula CD83 y de la molécula coestimuladora CD86 en más del 70 y 90 % de las mismas, respectivamente. Además, se observó un aumento en los niveles de expresión de la molécula MHC II. El fenotipo de las DC maduras generadas por los VSSP resultó similar al inducido por el LPS a 0,1  $\mu\text{g/mL}$ , el cual se utilizó como control positivo de inducción de maduración de las DC humanas (Figura 1).

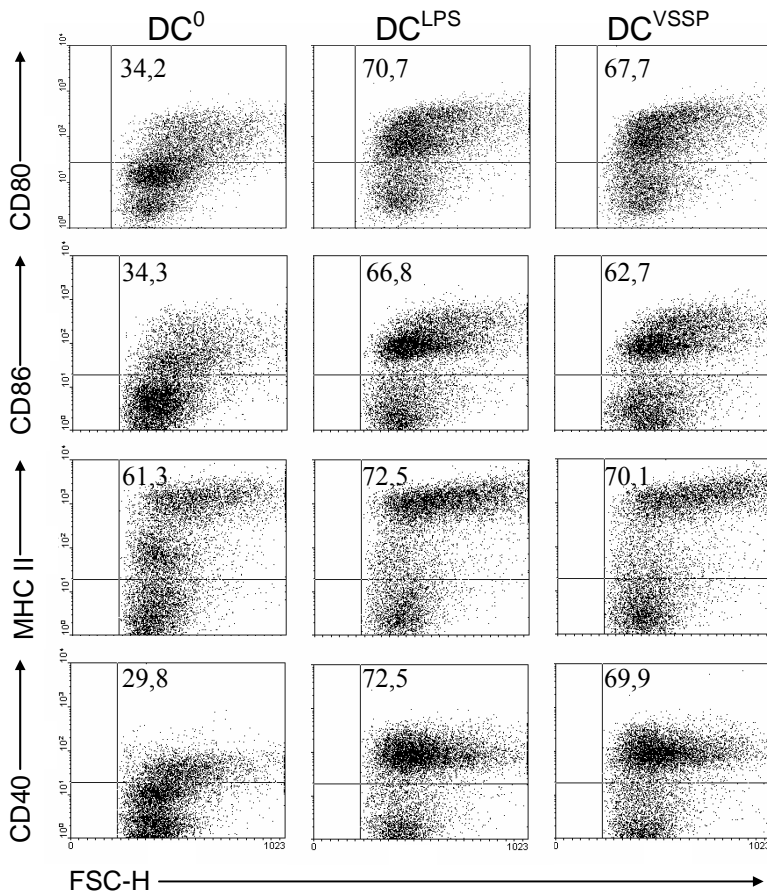


**Figura 1.** Inducción de la maduración de las DC por los VSSP. DC humanas derivadas de monocitos se cultivaron durante 24 horas en presencia de los VSSP, del LPS o medio de cultivo y se determinó mediante citometría de flujo la expresión superficial de las moléculas MHC II, CD83 y CD86. En la figura se presentan los gráficos de puntos de tamaño (FSC-H) vs intensidad de fluorescencia correspondientes a cada muestra, y se indica además, el porcentaje de las células positivas para cada molécula evaluada. Todos los gráficos en su conjunto son representativos de un experimento repetido cuatro veces.

4.1.2 Los VSSP inducen la maduración de las células dendríticas murinas

Con el objetivo de evaluar el efecto de los VSSP sobre las DC de origen murino, se utilizaron bmDC derivadas de las cepas de ratón C57BL/6 ó BALB/c que se cultivaron durante 24 horas en presencia de los VSSP, del LPS o de medio de cultivo sólo, estos últimos como control positivo y negativo, respectivamente. El tratamiento de las bmDC con los VSSP a 10 µg/mL provocó que se duplicaran los porcentajes de células positivas para las moléculas coestimuladoras CD40, CD80 y CD86. En el caso de la molécula de MHC II, los VSSP indujeron un aumento en la intensidad media de fluorescencia de 60,3 unidades, correspondientes a las DC no tratadas, a 119,6, sin embargo, no tuvo un impacto considerable en el porcentaje de células positivas.

En este sistema de DC murinas, tampoco se encontraron diferencias entre la activación inducida por los VSSP y el LPS a 1 µg/mL (Figura 2).

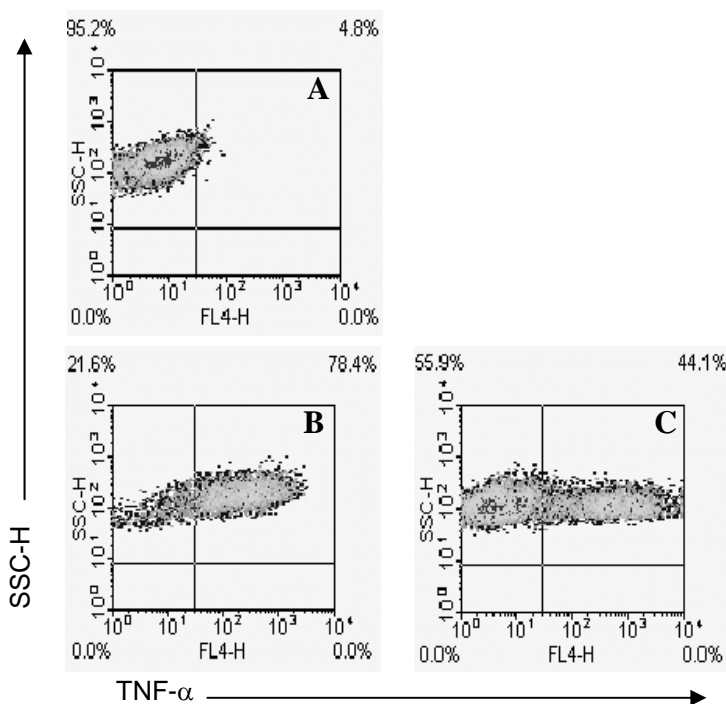


**Figura 2.** Inducción de la maduración de las DC por los VSSP. Las bmDC se cultivaron durante 24 horas en presencia de los VSSP, del LPS o medio de cultivo, y se determinó mediante citometría de flujo la expresión superficial de las moléculas MHC II, CD80, CD86 y CD40. En la figura se presentan los gráficos de puntos de tamaño (FSC-H) vs intensidad de fluorescencia correspondientes a cada muestra, y se indica además el porcentaje de células positivas para cada molécula evaluada. Todos los gráficos en su conjunto pertenecen a un experimento realizado con las bmDC derivadas del ratón C57BL/6 representativo de tres repeticiones realizadas con las bmDC obtenidas de ratones de las cepas C57BL/6 y BALB/c.



#### 4.1.3 Los VSSP inducen citocinas y factores quimiotácticos proinflamatorios en las células dendríticas murinas

El condicionamiento de la respuesta inmune adaptativa está dado por la llamada tercera señal, también aportada por la DC. Estas señales consisten fundamentalmente en el conjunto de citocinas y factores quimiotácticos secretados por las DC durante y después del proceso de maduración [115]. La secreción de TNF- $\alpha$ , una de las citocinas que con más frecuencia se asocia a respuestas proinflamatorias mediadas por el LPS [260], se determinó por marcaje intracelular en las bmDC tratadas con los VSSP o el LPS. Como se muestra en la figura 3, los VSSP indujeron la secreción de TNF- $\alpha$  en el 44 % de las DC, mientras que el LPS lo hizo en el 78 %.



**Figura 3.** Producción de TNF- $\alpha$  por las DC estimuladas con los VSSP. Las DC derivadas de médula ósea se estimularon con medio de cultivo (A), el LPS (1  $\mu$ g/mL) (B) o los VSSP (10  $\mu$ g/mL) (C). Seguidamente se determinó la producción intracelular de TNF- $\alpha$ . Los datos se presentan en gráficos de distribución de densidad de intensidad de fluorescencia vs granulocidad (SSC-H) correspondientes a cada muestra, y se indica además el porcentaje de células en cada cuadrante. Los gráficos son representativos de tres repeticiones.

Además del TNF- $\alpha$ , se evaluaron otras citocinas y factores quimiotácticos proinflamatorios mediante la técnica de protección de ARNasa. La expresión de estas proteínas se determinó a nivel de ARNm en las bmDC, después de ocho horas de cultivo en presencia de los VSSP (10  $\mu$ g/mL), el LPS (1  $\mu$ g/mL) o medio solamente. Los VSSP indujeron, en las bmDC derivadas de ratones de la cepa C57BL/6, la síntesis de los ARNm para las proteínas de las familias MIP e IL-1, y las citocinas

IL-12p40, IL-18 e IL-6 (Figura 4). La relación entre la intensidad de las bandas correspondientes a los genes transcritos en las bmDC tratadas con los VSSP y las tratadas con el LPS fue aproximadamente igual a uno, indicando que ambos estímulos produjeron señales muy similares en las bmDC.

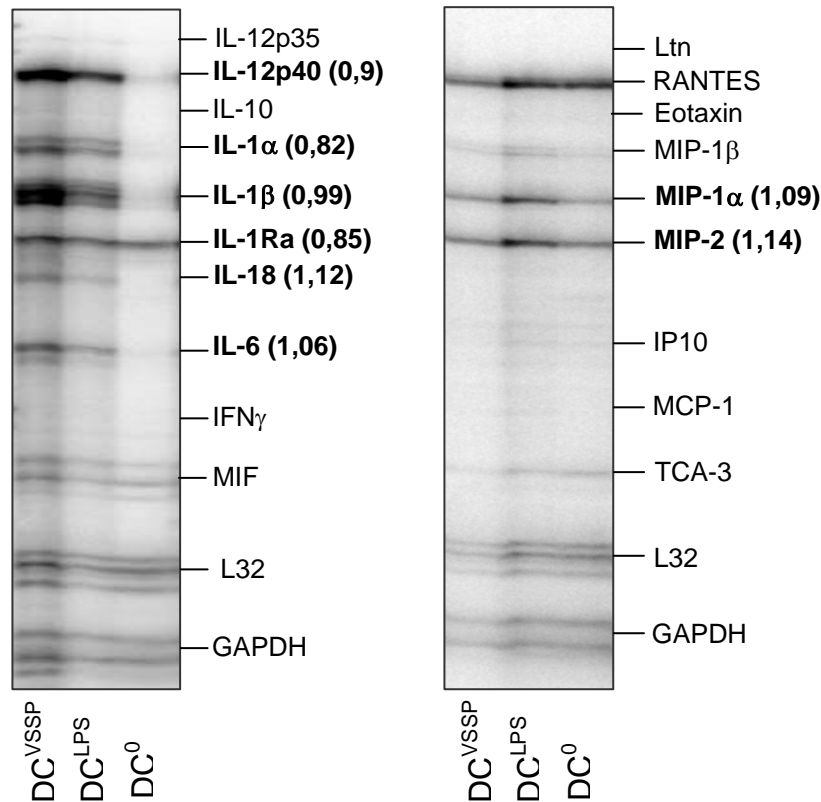
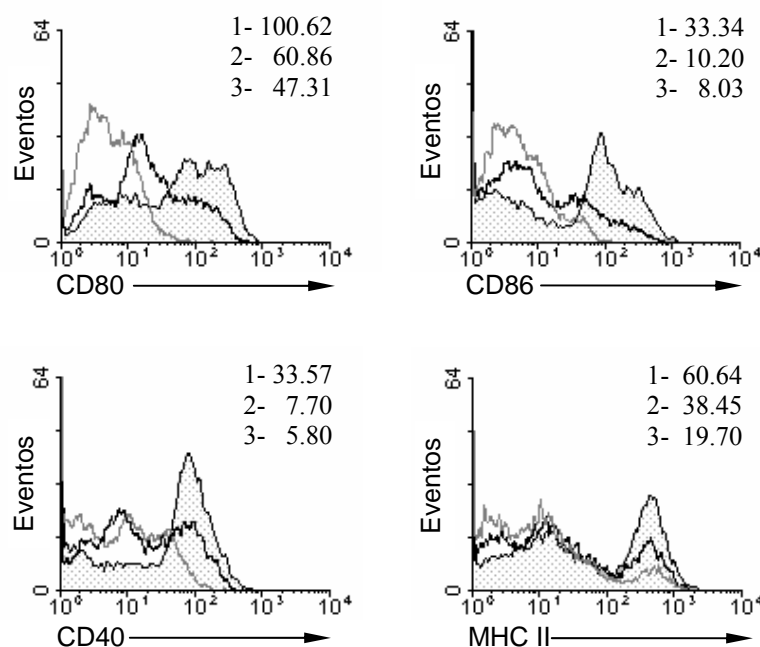


Figura 4. Citocinas y factores quimiotácticos inflamatorios inducidos por los VSSP en las bmDC derivadas de ratones C57BL/6. Las bmDC se cultivaron en presencia de los VSSP ( $DC^{VSSP}$ ), el LPS ( $DC^{LPS}$ ) o medio de cultivo sólo ( $DC^0$ ), y ocho horas después se extrajo el ARN. Seguidamente, se determinó la transcripción de algunas citocinas y factores quimiotácticos inflamatorios mediante un ensayo de protección de ARNasa. Los nombres en **negritas** corresponden a las proteínas en las que la transcripción del gen fue inducida por los VSSP ( $DC^{VSSP}/DC^0 \geq 2$  después de la normalización respecto a la intensidad de las bandas correspondientes al gen de mantenimiento celular GAPDH), y los números entre paréntesis indican la relación entre  $DC^{VSSP}/DC^{LPS}$ . Las fotografías de los geles mostradas en la figura son representativas de dos experimentos realizados de forma independiente.

#### 4.1.4 EL LPS no es el único componente de los VSSP responsable de la activación de las células dendríticas

Las señales activadoras de los VSSP mostradas anteriormente fueron indistinguibles de las inducidas por el LPS solo. Para determinar si al eliminar la influencia estimuladora del LPS en los

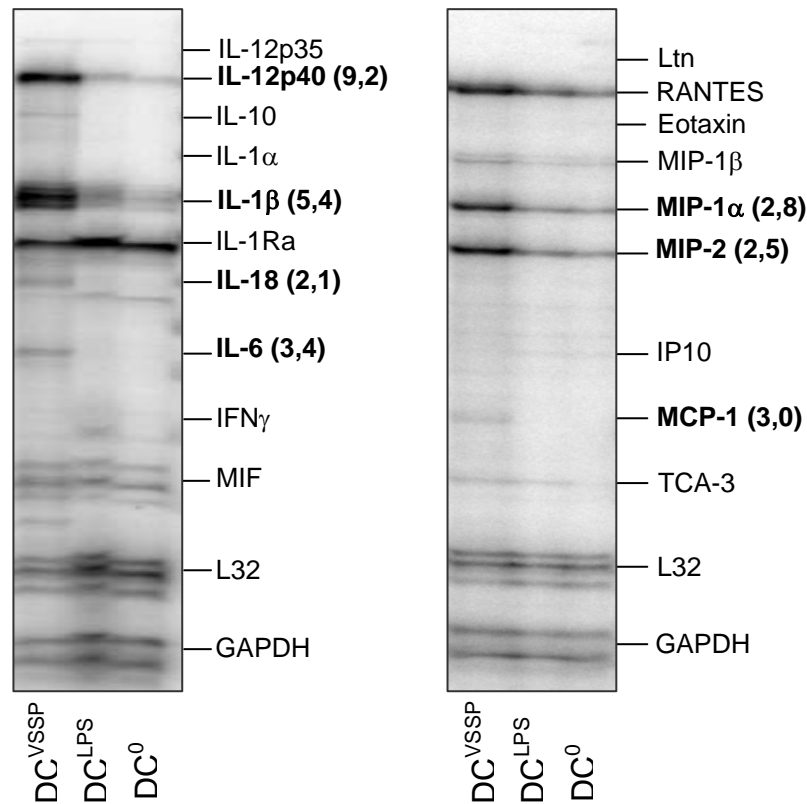
VSSP se manifestaba la actividad inhibidora del GM3, se emplearon DC derivadas de la cepa de ratón C3H/HeJ. Estos ratones tienen una mutación sin sentido en el dominio intracelular del receptor TLR4, responsable de los mecanismos de señalización en respuesta al LPS de *N. meningitidis* [52]. En estas bmDC se estudió la expresión superficial de los marcadores de maduración después de 24 horas en cultivo con el LPS (1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), los VSSP (10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) o medio de cultivo solamente. Como se esperaba, el efecto del LPS disminuyó considerablemente, tal como indica la baja expresión de las moléculas MHC II, CD40, CD80 y CD86 en las células tratadas con el mismo. Sin embargo, las DC tratadas con los VSSP mostraron un fenotipo maduro, caracterizado por un aumento en la expresión de las moléculas presentadoras y coestimuladoras (Figura 5).



**Figura 5.** Inducción de la maduración de las DC derivadas de la cepa de ratón C3H/HeJ hiporrespondedora al LPS por los VSSP. Las bmDC se cultivaron durante 24 horas en presencia de los VSSP (#1 e histograma relleno en gris punteado), del LPS (#2 y líneas negras) o de medio de cultivo sólo (#3 y líneas grises) y se determinó mediante citometría de flujo la expresión superficial de las moléculas MHC II, CD80, CD86 y CD40. Se indica además, la media de la intensidad de fluorescencia correspondiente a cada histograma. Los datos en la figura corresponden a un experimento repetido tres veces.

Un ensayo de protección de ARNasa, similar al que se utilizó para estudiar las citocinas y factores quimiotácticos proinflamatorios inducidos por los VSSP en las bmDC obtenidas de ratones C57BL/6, también se empleó para evaluar la contribución del LPS a las propiedades activadoras de los VSSP. En esta ocasión, se utilizó ARN aislado de las bmDC derivadas de ratones C3H/HeJ tratadas con los VSSP (10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), el LPS (1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) o medio de cultivo. Los resultados se

muestran en la figura 6. En estos experimentos se pudo corroborar que la cascada de señalización activada por el LPS y que culmina con la transcripción de los genes para las citocinas y factores quimiotácticos MIP-1 $\alpha$ , MIP-2, IL-12p40, IL-1 $\beta$ , IL-18 e IL-6, ocurre a través del TLR4. Notablemente, los VSSP activaron casi todos los genes que también fueron transcritos en las bmDC derivadas del ratón C57BL/6. Sólo los genes de la IL-1 $\alpha$  y la IL-1RA no se activaron en las bmDC derivadas del ratón C3H/HeJ, lo cual sugiere que los VSSP sí necesitan del LPS para inducir la producción de esta citocina en particular. Curiosamente, los VSSP activaron el gen del factor quimiotáctico MCP-1 sólo en ausencia de la señal del LPS.

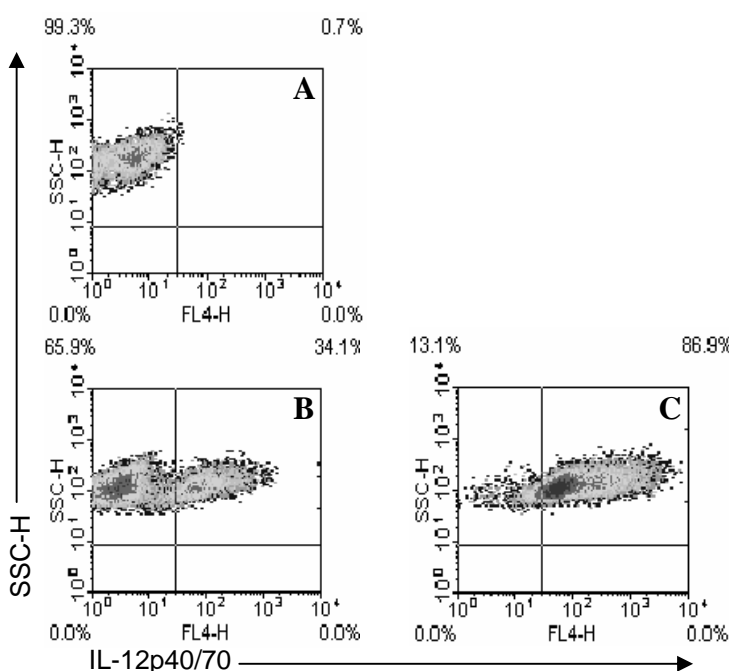


**Figura 6.** Citocinas y factores quimiotácticos inflamatorios inducidos en las DC derivadas de ratones C3H/HeJ por los VSSP. Las bmDC se cultivaron en presencia de los VSSP (DC<sup>VSSP</sup>), del LPS (DC<sup>0</sup>) o de medio de cultivo (DC<sup>0</sup>), y ocho horas después se extrajo el ARN. Seguidamente, se determinó la transcripción de algunas citocinas y factores quimiotácticos mediante un ensayo de protección de ARNasa. Los nombres en **negritas** corresponden a las proteínas en las que la transcripción del gen fue inducida por el VSSP (DC<sup>VSSP</sup>/DC<sup>0</sup> y LPS  $\geq 2$  después de la normalización respecto a la intensidad de las bandas correspondientes al gen de mantenimiento celular GAPDH), y los números entre paréntesis indican la relación entre DC<sup>VSSP</sup>/DC<sup>LPS</sup>. Las fotografías de los geles mostradas en la figura son representativas de dos experimentos realizados de forma independiente

## 4.2 Polarización de la respuesta de las células T cooperadoras hacia Th1

### 4.2.1 Los VSSP inducen la secreción de IL-12p40/p70 por las células dendríticas

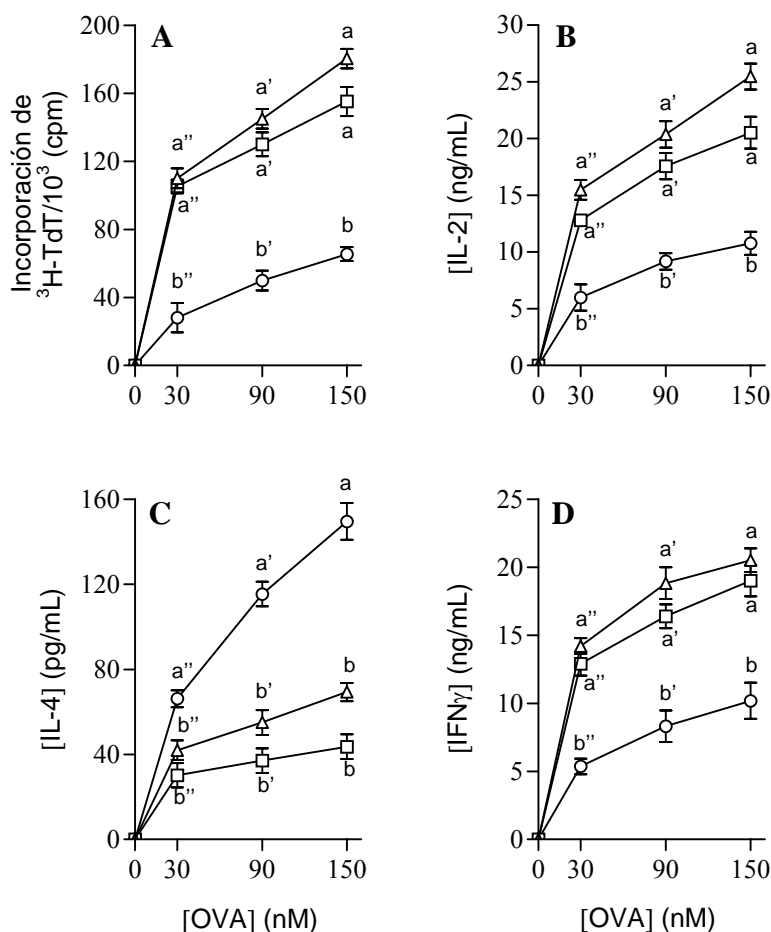
Los resultados anteriores de inducción de citocinas proinflamatorias, especialmente la transcripción del gen de la IL-12p40 en las bmDC cultivadas con los VSSP, sugieren que el preparado promueve en estas células un fenotipo de DC condicionado para polarizar la respuesta T cooperadora hacia Th1 (DC1). Por la importancia de este evento para la activación de una respuesta inmune efectiva contra los tumores, se decidió comprobar la capacidad de los VSSP de inducir la secreción de IL-12 activa. Con este objetivo se hizo un marcaje intracelular de esta citocina en las bmDC derivadas de ratones C57BL/6 y cultivadas por 16 horas en presencia de los VSSP, el LPS o medio de cultivo. En este experimento, se observaron diferencias entre las DC tratadas con el LPS (1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) o con los VSSP (10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) (Figura 7). Mientras que sólo el 34 % de las DC tratadas con el LPS secretaron IL-12p40/p70, más del 85 % de las tratadas con los VSSP produjeron esta citocina. Estos datos confirman que los VSSP polarizan las DC a un fenotipo DC1, y sugieren que el LPS no es el único componente responsable de este efecto de los VSSP.



**Figura 7.** Producción de IL-12p40/p70 por las DC estimuladas con los VSSP. DC derivadas de médula ósea se estimularon con medio de cultivo (DC<sup>0</sup>) (A), LPS (DC<sup>LPS</sup>) (B) o VSSP (DC<sup>VSSP</sup>) (C). Seguidamente se determinó la producción intracelular de IL-12p40/p70. Los datos se presentan en gráficos de distribución de densidad de intensidad de fluorescencia vs granulocidad (SSC-H) correspondientes a cada muestra, y se indica además el porcentaje de células en cada cuadrante. Los gráficos son representativos de tres repeticiones.

#### 4.2.2 *Los VSSP polarizan hacia Th1 a las células T CD4<sup>+</sup> vírgenes*

Una vez comprobada la capacidad de los VSSP de polarizar hacia DC1 mediante la estimulación de la secreción de IL-12 activa, se determinó el efecto de estas DC sobre las células T cooperadoras vírgenes. Las células T CD4<sup>+</sup> específicas por un péptido inmunodominante de la OVA presentado en MHC II, provenientes de ratones transgénicos DO11.10, se utilizaron como modelo experimental. Las células T CD4<sup>+</sup> vírgenes, obtenidas del bazo de estos ratones con más del 98 % de pureza por métodos de separación con perlas magnéticas y citometría de flujo, se estimularon con DC singénicas previamente cultivadas con los VSSP, el LPS o medio de cultivo. Como se muestra en la figura 8 (A y B), las bmDC tratadas tanto con los VSSP como con el LPS promovieron la proliferación de las células T CD4<sup>+</sup>/CD62-L<sup>+</sup> específicas para el péptido de la OVA. Como consecuencia de esta estimulación de las DC con los VSSP o el LPS, se detectó un incremento en tres veces de la cantidad de IFN $\gamma$  en el sobrenadante, comparado con las DC cultivadas en medio solo. Del mismo modo, las cantidades de IL-4 disminuyeron también tres veces aproximadamente (Figura 8 C y D). Las diferencias entre las células T CD4<sup>+</sup> estimuladas con DC<sup>VSSP</sup> o con DC<sup>0</sup>, en términos tanto de proliferación como de secreción de las tres citocinas evaluadas, fueron significativas según la prueba de Tukey ( $P < 0,01$ ), a las tres concentraciones de péptido evaluadas. En cambio, la misma prueba estadística reveló que no había diferencias entre las células T CD4<sup>+</sup> estimuladas con DC<sup>LPS</sup> o con DC<sup>VSSP</sup>.



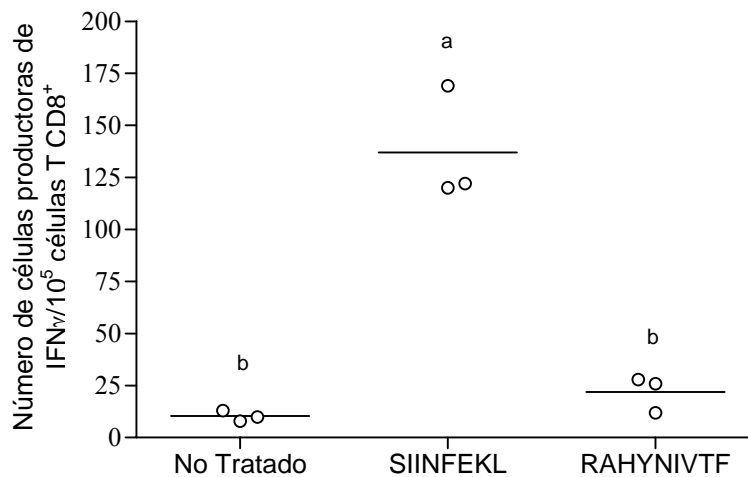
**Figura 8.** Polarización a Th1 de las células T CD4<sup>+</sup> específicas por la OVA, inducida por las DC tratadas con los VSSP. Las bmDC estimuladas con medio (×), LPS a 1 μg/mL (□) o VSSP a 10 μg/mL (△) se cocultivaron con células T CD4<sup>+</sup> vírgenes aisladas de la cepa de ratón transgénico DO11.10 en presencia de las concentraciones indicadas del péptido OVA<sub>323-339</sub>. La figura muestra los gráficos de incorporación de timidina tritjada (<sup>3</sup>H-TdT) (A) y la secreción de las citocinas IL-2 (B), IL-4 (C) e IFNγ (D), medidas por ELISA. Los datos se presentan como las medias ± desviación estándar, correspondientes a las mediciones realizadas en un experimento representativo de otros dos. Letras diferentes indican significación estadística según las pruebas de Tukey ( $P < 0.01$ ) realizadas para cada concentración del péptido de la OVA ensayadas.

### 4.3 Activación de los linfocitos T citotóxicos

#### 4.3.1 La adyuvación de un péptido con los VSSP estimula la producción de IFNγ por las células T CD8<sup>+</sup> antígeno específicas

Los péptidos constituyen una de las formas antigénicas más utilizadas en los ensayos preclínicos y clínicos de vacunas para el tratamiento de tumores malignos [261]. Por esta razón, la potencialidad de los VSSP de activar las células T CD8<sup>+</sup> específicas cuando es utilizado como adyuvante para

péptidos, se evaluó en un ensayo de ELISPOT para IFN $\gamma$ . Para ello se ensayó en ratones C57BL/6 un protocolo de administración de dos dosis del péptido inmunodominante OVA 257-SIINFEKL-264 o de un péptido no relacionado, mezclados con los VSSP. Como se muestra en la figura 9, apenas se detectaron células T CD8<sup>+</sup> específicas productoras de IFN $\gamma$  en los esplenocitos de los ratones no tratados o inyectados con un péptido irrelevante. Por el contrario, se midió una respuesta específica en aquellos ratones inmunizados con el péptido SIINFEKL adyuvado en los VSSP. Cerca del 0,15 % del total de las células T CD8<sup>+</sup> fueron específicas por el péptido SIINFEKL y produjeron IFN $\gamma$ . Las diferencias entre los grupos controles y el grupo inmunizado con la mezcla del péptido SIINFEKL y los VSSP resultaron estadísticamente significativas según la prueba de SNK ( $P < 0.05$ ).



**Figura 9.** Estimulación de las células T CD8<sup>+</sup> específicas inducida por la coinyección del péptido SIINFEKL y los VSSP. A ratones C57BL/6 se les suministraron dos dosis de 50  $\mu$ g, espaciadas por 14 días, de los péptidos SIINFEKL o RAHYNIVTF (control) en presencia de 200  $\mu$ g de los VSSP. Una semana después de la última dosis se evaluó la secreción de IFN $\gamma$  por las células T CD8<sup>+</sup> específicas por el péptido SIINFEKL. Los datos se presentan como el número de células T CD8<sup>+</sup> específicas productoras de IFN $\gamma$  calculadas a partir del número de puntos detectados y el porcentaje de células T CD8<sup>+</sup> en el bazo de cada animal. Letras diferentes indican significación estadística según la prueba de SNK ( $P < 0.05$ ). Este ensayo se repitió tres veces con resultados similares.



---

#### 4.3.2 Los VSSP facilitan la presentación cruzada de la OVA a los linfocitos T CD8<sup>+</sup>

Los experimentos que demostraron la capacidad de los VSSP de activar a los linfocitos T citotóxicos tras la inmunización con péptidos, no garantizaban el éxito para la inducción de CTL con vacunas cuyo sistema antigénico fueran proteínas. Este tipo de antígeno, a diferencia de los péptidos, primeramente tiene que ser procesado y sus fragmentos presentados de forma cruzada en las moléculas de MHC I [262].

Se diseñaron experimentos *in vitro* e *in vivo* para evaluar la capacidad de los VSSP de mediar la presentación cruzada. Primeramente, las bmDC derivadas de la cepa de ratón C57BL/6 y tratadas con la OVA sola (10 µg/mL) o con la OVA en los VSSP (10 µg/mL), se cultivaron *in vitro* con el hibridoma T CD8<sup>+</sup> B3Z, el cual contiene la enzima β-Gal bajo el control del promotor de la IL-2 y la expresa por estimulación con el complejo H2-K<sup>b</sup>-SIINFEKL. Como se observa en la figura 10A, se requiere de la presencia de los VSSP para estimular al hibridoma B3Z. Por el contrario, no se detectó actividad enzimática cuando se utilizó la OVA sola o la OVA en presencia del LPS (1 µg/mL). Las diferencias en la capacidad de estimular al hibridoma B3Z entre las DC tratadas con los VSSP y con el LPS o medio de cultivo sólo, resultaron significativas a las dos relaciones mayores DC:B3Z evaluadas, según las pruebas de SNK realizadas ( $P < 0.05$ ).

La medición de la inducción de la presentación cruzada también se realizó *in vivo*. Se inyectaron por vía intravenosa ratones C57BL/6 con 50 µg de la OVA sola o mezclada con 200 µg de los VSSP, y 18 horas después los esplenocitos totales de estos animales se utilizaron en el ensayo de estimulación del hibridoma B3Z. En este caso, sólo los esplenocitos aislados de ratones inmunizados con la OVA en los VSSP indujeron la expresión de la enzima β-Gal en el hibridoma (Figura 10B). En este experimento, la diferencia entre los grupos control e inmunizado con la OVA y los VSSP resultó estadísticamente significativa según la prueba de la U de Mann-Whitney ( $P < 0,05$ ).

Un dato a resaltar en ambos experimentos, el *in vitro* y el *in vivo*, es que los VSSP indujeron la máxima ocupación de las moléculas de MHC I. Esto se demuestra al comparar los niveles de activación del hibridoma B3Z inducidos por las APC tratadas o provenientes de ratones tratados con la OVA adyuvada en los VSSP, con los inducidos por las APC cargadas con exceso del péptido SIINFEKL.

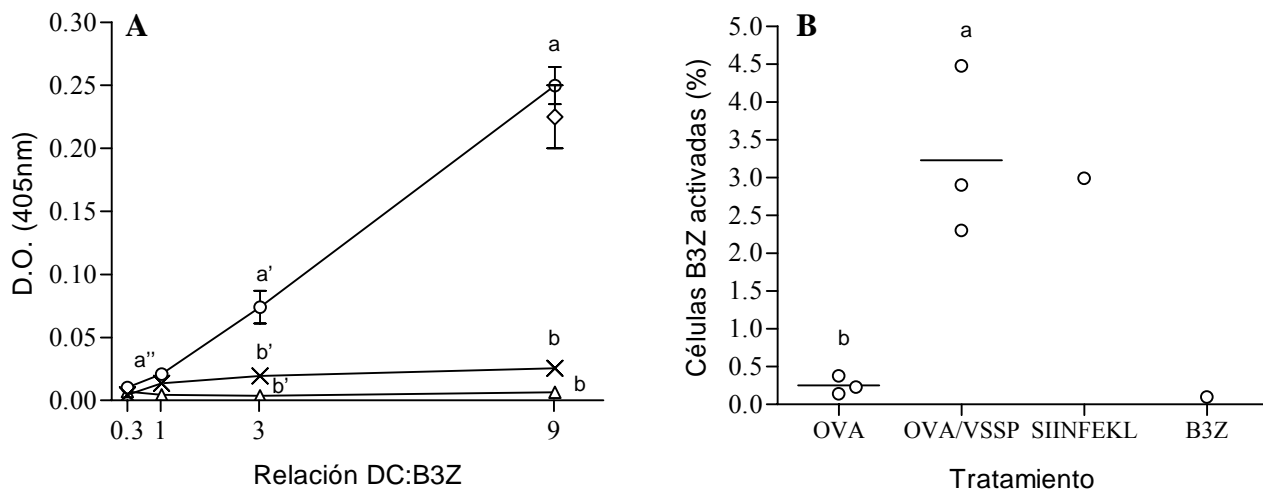


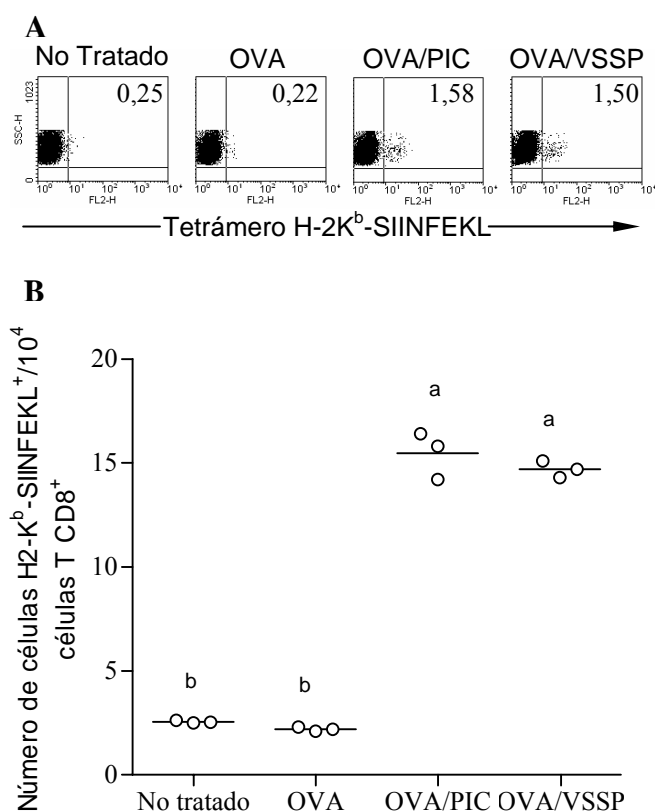
Figura 10. Activación *in vitro* e *in vivo* del hibridoma T CD8<sup>+</sup> B3Z, específico por el péptido SIINFEKL, por las DC estimuladas con los VSSP. Para la estimulación del hibridoma B3Z se utilizaron: en el ensayo *in vitro* (A), las bmDC a las que se les había adicionado previamente la OVA (Δ), la OVA y el LPS (×), o la OVA y los VSSP (○) y en el ensayo *in vivo* (B) esplenocitos aislados de ratones inmunizados con la OVA u la OVA y los VSSP. La activación del hibridoma se determinó midiendo la expresión de la enzima β-Gal. El gráfico (A) representa la densidad óptica a 405 nm una vez restados los valores correspondientes a la activación basal del hibridoma solo representado con el símbolo □ en (B). Los resultados se muestran como la media ± D.E. El gráfico (B) representa el porcentaje de células azules respecto al total de las B3Z contadas en cámara de Neubauer. En ambos experimentos se utilizó como señal de máxima ocupación de las moléculas de MHC I las APC cargadas con el péptido SIINFEKL (◇). Letras diferentes indican significación estadística según la prueba de la U de Mann Whitney ( $P < 0.05$ ) en (B) y según las pruebas de SNK ( $P < 0.05$ ) realizadas para cada relación DC:B3Z ensayadas en (A). Estos experimentos se repitieron tres veces con resultados similares.

#### 4.3.3 La adyuvación de una proteína con los VSSP induce la expansión de las células T CD8<sup>+</sup> antígeno específicas

Una vez demostrada la capacidad de los VSSP de mediar la presentación cruzada de la OVA, se imponía estudiar si subsecuentemente ocurría la estimulación de las células T CD8<sup>+</sup> específicas.

Para ello se inmunizaron ratones C57BL/6 con mezclas de la OVA y los VSSP o de la OVA y el

PIC, como adyuvante de referencia. Este polímero sintético mimifica ARN viral de doble cadena y es promotor de respuestas citotóxicas [263, 264]. La frecuencia de las células T CD8<sup>+</sup> específicas por la OVA se midió con el tetrámero H-2K<sup>b</sup>-SIINFEKL. La figura 11 muestra que la inyección de la OVA sola generó un 0,22 % de células T CD8<sup>+</sup> específicas por el péptido SIINFEKL, mientras que las inyecciones de la OVA en el PIC o en los VSSP provocaron que aumentaran en alrededor de 7 veces la frecuencia de estas células. Las diferencias entre los grupos de ratones no tratados o inmunizados con la OVA sola y los grupos inmunizados con la mezcla de la OVA y los VSSP u la OVA y el PIC resultaron estadísticamente significativas según la prueba de SNK ( $P < 0,05$ ).



**Figura 11.** Expansión de las células T CD8<sup>+</sup> específicas por el péptido SIINFEKL por la coinyección de la OVA y los VSSP. Ratones C57BL/6 se inyectaron, con la OVA sola, la OVA mezclada con los VSSP o el PIC o se dejaron sin tratamiento. Dos días después de la última dosis se midió el número de las células T CD8<sup>+</sup> específicas por el péptido SIINFEKL mediante citometría de flujo utilizando el tetrámero H2-K<sup>b</sup>-SIINFEKL conjugado a FITC. En (A) se muestra un gráfico de puntos proveniente de un animal representativo por grupo y correspondiente a las células CD8<sup>+</sup> (seleccionadas en una ventana previa), marcadas con el tetrámero. Se indica el porcentaje de células positivas. En (B) se muestran los números absolutos de las células T CD8<sup>+</sup> específicas por el péptido SIINFEKL detectadas en el bazo, calculadas a partir del porcentaje de células positivas al tetrámero y los conteos de células T CD8<sup>+</sup> realizados por citometría de flujo. Letras diferentes indican significación estadística según la prueba de SNK ( $P < 0,05$ ). Los datos mostrados son representativos de varios experimentos con resultados similares.

4.3.4 La adyuvación de una proteína con los VSSP estimula la producción de  $IFN\gamma$  por las células T  $CD8^+$  antígeno específicas

Entre las funciones efectoras de los CTL contra los tumores, la secreción de  $IFN\gamma$  juega un papel fundamental [265]. Para evaluar si las células T  $CD8^+$  específicas activadas por la inyección de la OVA en los VSSP secretaban  $IFN\gamma$ , se realizó un ensayo de ELISPOT. En la figura 12 se muestra cómo la inyección de la OVA adyuvada en los VSSP condujo a la producción de  $IFN\gamma$  por las células T  $CD8^+$  específicas por el SIINFEKL, el péptido inmunodominante de la OVA utilizado para medir la respuesta. No se observaron puntos indicativos de actividad en los pozos correspondientes a los esplenocitos de los ratones no tratados o tratados con la OVA sola. Las diferencias entre las respuestas generadas en los grupos controles respecto a la del grupo tratado con la OVA y los VSSP fueron estadísticamente significativas según la prueba de SNK ( $P < 0,05$ ).

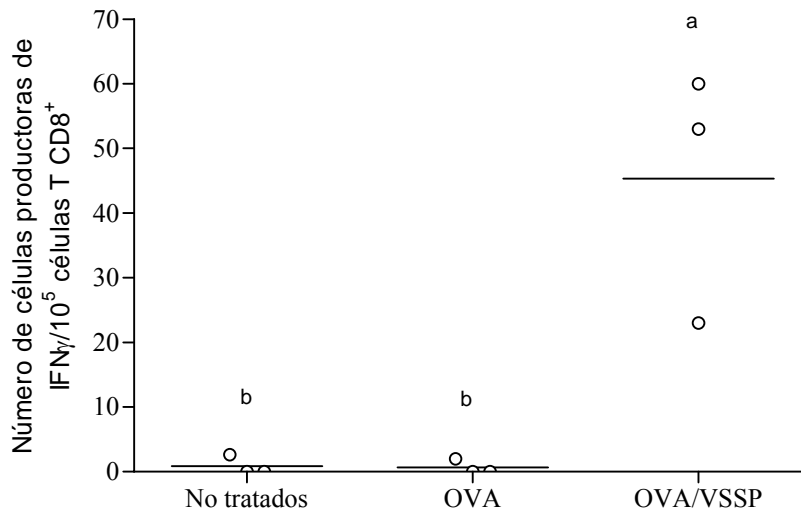


Figura 12. Secreción de  $IFN\gamma$  por las células T  $CD8^+$  específicas activadas por la coinyección de la OVA y los VSSP. Ratones C57BL/6 se inyectaron con la OVA sola ( $\Delta$ ), la OVA mezclada con los VSSP ( $\circ$ ) o se dejaron sin tratamiento ( $\square$ ). Dos días después de la última dosis se evaluó la secreción de  $IFN\gamma$  por las células T  $CD8^+$  específicas por el péptido SIINFEKL. Los datos se presentan como el número de células T  $CD8^+$  específicas productoras de  $IFN\gamma$ , calculadas a partir del número de puntos detectados y el porcentaje de células T  $CD8^+$  en el bazo de cada animal. Letras diferentes indican significación estadística según la prueba de SNK ( $P < 0.05$ ). Este ensayo se repitió tres veces con resultados similares.

#### 4.3.5 La adyuvación de una proteína con los VSSP estimula la actividad citotóxica de las células T CD8<sup>+</sup> antígeno específicas

El papel de los VSSP en la inducción de las células T CD8<sup>+</sup> específicas funcionalmente competentes se estudió mediante el ensayo clásico de liberación de <sup>51</sup>Cr. En estos experimentos las células blanco, que consistieron en fibroblastos MC57G cargados con el péptido SIINFEKL, sólo fueron lisadas por los esplenocitos aislados de los ratones inmunizados con la OVA y los VSSP. Las células extraídas de los ratones no inmunizados o inyectados con la OVA sola no resultaron citotóxicas en ninguna de las relaciones de células efectoras:blanco evaluadas (Figura 13). Las pruebas estadísticas de SNK confirmaron que las diferencias entre los grupos controles y el grupo inmunizado con la mezcla de la OVA y los VSSP eran significativas para todas las relaciones de células efectoras:blanco ensayadas ( $P < 0,05$ ).

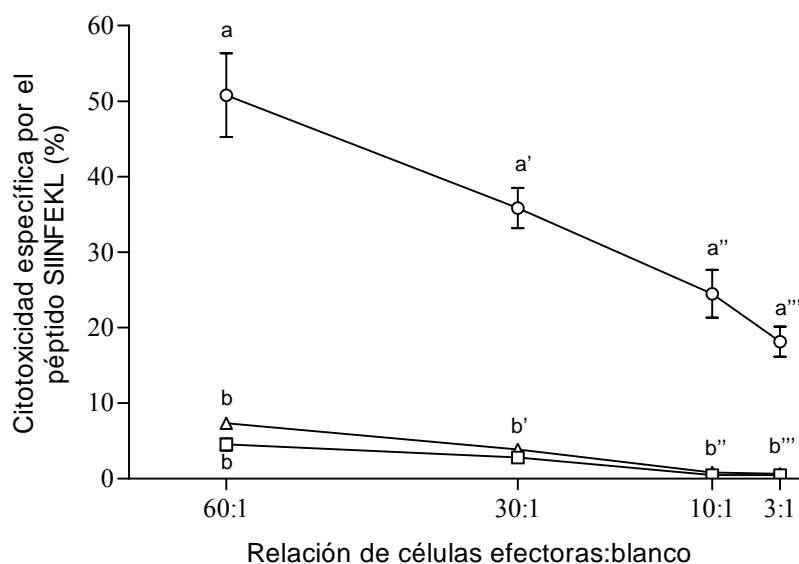
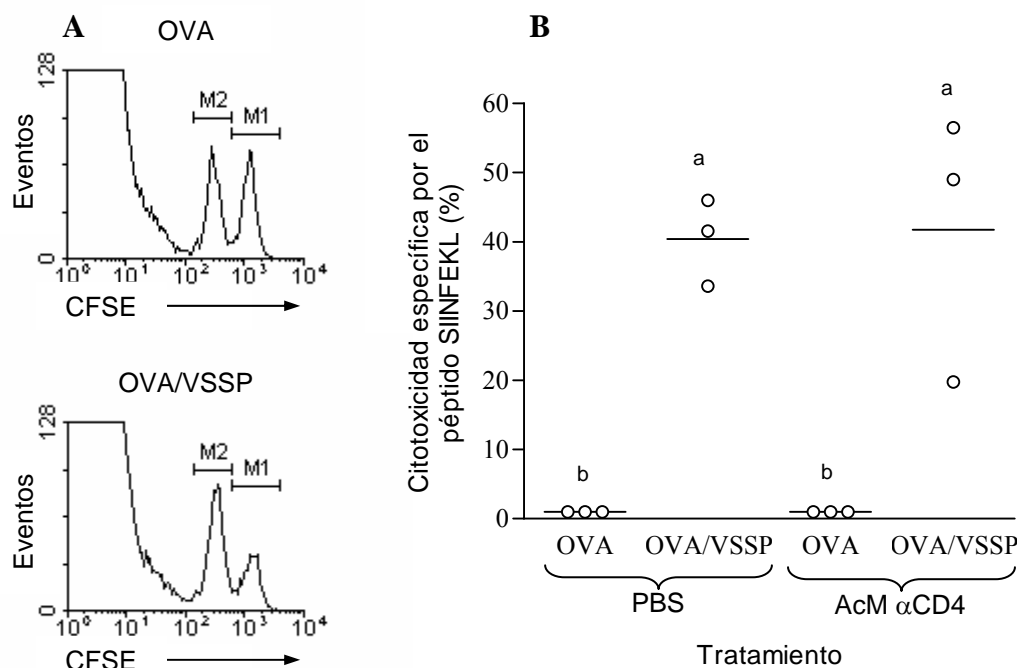


Figura 13. Actividad citotóxica de las células T CD8<sup>+</sup> específicas por el péptido SIINFEKL activadas por la coinyección de la OVA y los VSSP. Ratones C57BL/6 se inyectaron con la OVA sola (Δ), la OVA mezclada con los VSSP (○) o se dejaron sin tratamiento (×). Dos días después de la última dosis se evaluó la actividad lítica de estas células mediante el método de liberación de <sup>51</sup>Cr y utilizando como células blanco la línea de fibroblasto murino MC57G cargada con el péptido SIINFEKL. Los datos se presentan como media ± D.E. y son representativos de un experimento repetido tres veces. Letras diferentes indican significación estadística según las pruebas de SNK ( $P < 0.05$ ) realizadas para cada relación células efectoras:blanco ensayadas.

#### 4.3.6 *Los VSSP estimulan la activación primaria de las células T CD8<sup>+</sup> antígeno específicas en ausencia de la cooperación con las células T CD4<sup>+</sup>*

Se ha demostrado que existen estímulos capaces de inducir una respuesta CTL primaria en ausencia de la cooperación de las células T CD4<sup>+</sup> [146]. Para evaluar este fenómeno con nuestro sistema de adyuvación, se utilizó el ensayo de CTL *in vivo* después de una única dosis de la OVA sola o adyuvada con los VSSP, y se midió la respuesta específica por el péptido inmunodominante SIINFEKL. Además, con el objetivo de determinar si la activación de los linfocitos T CD8<sup>+</sup> ocurría en ausencia de las células T cooperadoras, se midió la respuesta CTL en ratones a los que les fueron eliminadas estas células. La eliminación de las células T CD4<sup>+</sup> se realizó por un tratamiento sistémico con un AcM específico para esta molécula y se utilizó PBS como control negativo de esta manipulación.

En este experimento se demostró que se produce la lisis del 40 % de las células blanco, cargadas con el péptido SIINFEKL y marcadas con la mayor concentración del fluoróforo CFSE, cuando se inoculan en los ratones previamente inmunizados con la OVA adyuvada en los VSSP. Por el contrario, no se detectó citotoxicidad específica en aquellos ratones inyectados con la OVA sola. Ambos resultados se mantuvieron invariables en los grupos de ratones tratados con el AcM anti-CD4. Las diferencias de citotoxicidad generada en los grupos de ratones inmunizados con la OVA sola respecto a la generada en los grupos tratados con la OVA y los VSSP fueron estadísticamente significativas según las pruebas de SNK ( $P < 0,05$ ).



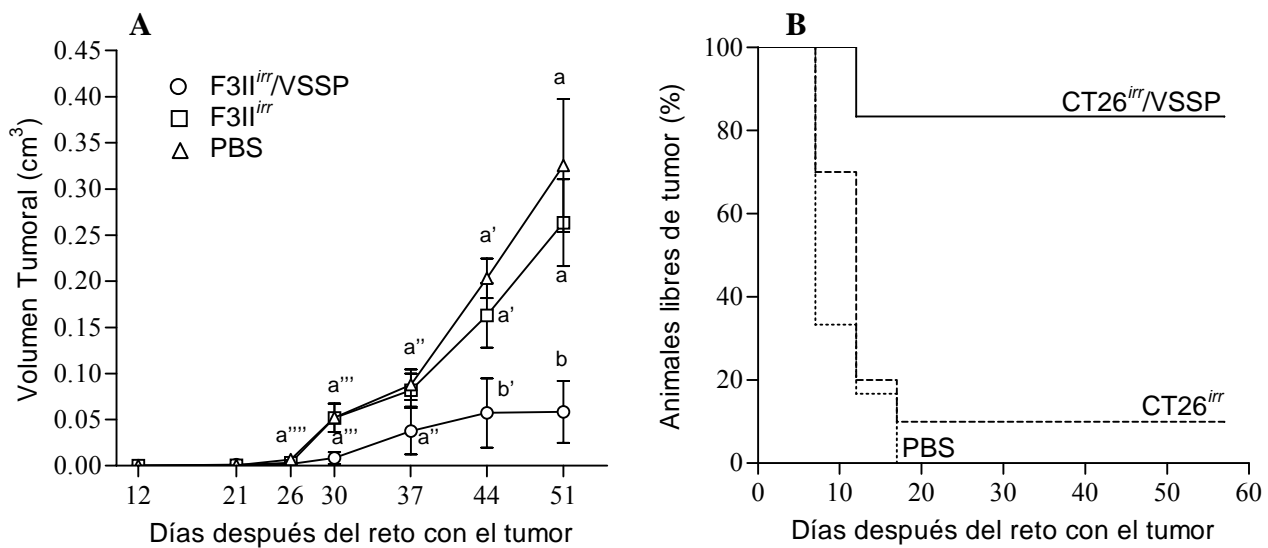
**Figura 14.** Citotoxicidad producida *in vivo* por la coinyección de la OVA y los VSSP a ratones a los que les fueron eliminadas las células T CD4<sup>+</sup>. La figura muestra la muerte de las células blanco cargadas con el péptido SIINFEKL y marcadas con CFSE<sup>++</sup> que se inocularon a los ratones ocho días después de una sola dosis de la OVA con o sin los VSSP. En (A) se muestra un histograma representativo de los grupos tratados con OVA o con OVA/VSSP. (M1=CFSE<sup>++</sup> y M2=CFSE<sup>+</sup>). El gráfico (B) muestra el porcentaje de lisis en los ratones individuales calculado a partir del número de eventos en M1 respecto a M2. Letras diferentes indican significación estadística según la prueba de SNK ( $P < 0.05$ ). Este experimento se repitió tres veces con resultados similares.

#### 4.4 Actividad antitumoral

##### 4.4.1 Vacunas celulares adyuvadas con los VSSP inducen actividad antitumoral

Las propiedades adyuvantes de los VSSP para células tumorales irradiadas como sistema antigénico se evaluaron en dos modelos: el carcinoma de colon CT26 y el carcinoma mamario F3II. La línea tumoral CT26 es muy inmunogénica [266], mientras que la F3II es de baja inmunogenicidad y desarrollando ambos tumores muy agresivos [248, 267, 268]. En estos ensayos se vacunaron ratones BALB/c con las células CT26 ó F3II irradiadas en presencia o no de los VSSP, y diez días después se retaron con las respectivas líneas tumorales. En el caso del ensayo con el modelo CT26, todos los ratones a los que se les inyectó PBS y el 90 % de los vacunados con las células irradiadas solas,

desarrollaron tumores. El resultado opuesto se obtuvo en los ratones inmunizados con la vacuna celular adyuvada en los VSSP, donde a los dos meses después de inoculado el tumor cinco de un total de seis ratones permanecían negativos (Figura 15B). Las diferencias entre los grupos evaluados en términos del porcentaje de animales libres de tumor a los dos meses después del reto tumoral, fue significativa según la prueba estadística de Log-Rank ( $P < 0,05$ ). En el modelo del carcinoma mamario F3II no se observaron eventos de rechazo tumoral, aunque sí se puso de manifiesto el efecto de los VSSP en la progresión del tumor. En los ratones inyectados con PBS o inmunizados con la vacuna celular sola los tumores crecieron rápidamente (Figura 15A). Por el contrario, la vacunación con las células irradiadas adyuvadas en los VSSP provocó que el volumen de los tumores alrededor del día 50 después del reto tumoral fuera cinco veces menor que el de los tumores en los ratones controles. Estas diferencias fueron estadísticamente significativas los días 44 y 51 después de inoculados los tumores según las pruebas de Tukey realizadas ( $P < 0,05$ ).



**Figura 15.** Respuesta antitumoral inducida por vacunas celulares adyuvadas en los VSSP en dos modelos tumorales. Ratones BALB/c se vacunaron con las células tumorales irradiadas (*irr*) mezcladas o no con los VSSP y diez días después se retaron con una dosis letal de las respectivas líneas celulares. En (A) se representa el crecimiento del carcinoma mamario F3II. Letras diferentes indican significación estadística según las pruebas de Tukey ( $P < 0,05$ ) realizadas para cada día de medición. En (B) se representa el porcentaje de animales sin tumor después del reto con la línea de carcinoma de colon CT26. Cada gráfico es representativo de dos experimentos individuales.



## 5 DISCUSIÓN

Aunque desde hace ya varios años se han descrito evidencias de los mecanismos de inmunosupresión inducida por los tumores, sólo recientemente la comunidad científica internacional ha comenzado a evaluar diversas estrategias para combinar tratamientos de inmunorrestauración con los de vacunación. Por otra parte, el diseño de adyuvantes que posean la capacidad de revertir estados de compromiso inmunológico es una idea aún inexplorada. Las únicas aproximaciones en este sentido han sido los reportes de algunas propiedades inmunorrestauradoras en adyuvantes ya establecidos y actualmente en evaluación clínica, pero que no habían sido seleccionados con este fin. Tal es el caso de las secuencias del CpG, el cual, suministrado como monoterapia en algunos modelos animales, ha provocado una fuerte actividad antitumoral caracterizada por la reversión del estado de no respuesta del sistema inmune ante un tumor en crecimiento [269]. En nuestro laboratorio del CIM, los VSSP fueron concebidos precisamente con ambos fines. Para ello se combinaron las propiedades inmunoestimuladoras de las VME de *N. meningitidis* con una de las sustancias inmunosupresoras secretadas por los tumores: el gangliósido GM3. La inclusión del gangliósido se hizo inicialmente teniendo en cuenta los trabajos de Livingston y colaboradores de que la inoculación en ratones de conjugados de VME de *N. meningitidis* con el gangliósido GD3 promueve la generación de anticuerpos IgM específicos por este gangliósido, que es relativamente inmunogénico [191, 270, 271]. También se había observado en pacientes de melanoma inmunizados con la vacuna de células alogénicas Canvaxin, que la inducción de anticuerpos anti-GM3 correlacionaba con una mejor supervivencia, sugiriéndose que esto podría deberse al secuestro del gangliósido circulante y la consecuente disminución de la supresión causada por este [272, 273]. En la concepción de los VSSP existía el riesgo de que predominaran las propiedades inmunosupresoras del gangliósido GM3 y que el preparado, lejos de estimular la respuesta inmune contra los tumores,

reforzara la inmunosupresión inducida por estos. La superioridad molecular relativa de 37 moléculas del gangliósido por cada molécula de proteína en los VSSP y la evidencia experimental de que al cultivar *in vitro* células T con este adyuvante disminuye la expresión de la molécula CD4 (De León J. -comunicación personal), evento que está descrito para el gangliósido libre [274], eran factores para tener en cuenta. Incluso existen reportes de que el GM3 inhibe la diferenciación, maduración y función de las DC humanas [242, 275]. Sin embargo, al evaluar *in vitro* el efecto de los VSSP sobre las DC, se demostró que estos constituyen un estímulo tan potente como el LPS en la inducción de la maduración de estas células, de procedencia tanto humanas como murinas. Con este resultado se demostró que los VSSP comparten la primera de las características que se han propuesto para la nueva generación de adyuvantes: la inducción de la maduración de las DC. La activación de estas células se demostró adicionalmente al evaluar determinadas citocinas inflamatorias y factores quimiotácticos inducidos por los VSSP, particularmente aquellos involucradas en la capacidad migratoria de las DC. Se demostró que en sólo ocho horas de estimulación con los VSSP, las DC expresan a nivel de ARNm las proteínas de la familia MIP-1. Se ha informado que estas proteínas contribuyen al reclutamiento de dos tipos de células al sitio de infección o vacunación: DC inmaduras y células T efectoras. Ambas funciones son críticas para la generación de la inflamación, el aumento de la vida media del Ag en la periferia y para el inicio de la fase efectora de la respuesta inmune [276]. En este caso los VSSP fueron un estímulo tan potente como el LPS, para el que ya se había descrito este efecto incluso *in vivo* [277]. La expresión de IL-1 $\alpha$  e IL-1 $\beta$  también se detectó en las DC tratadas con los VSSP. Se ha demostrado que estas citocinas también influyen en la migración y la maduración de las DC de los tejidos periféricos. Así, la secreción de estas citocinas por las DC del hospedero provocada por la interacción con los VSSP, podría influir en su movimiento hacia los nódulos linfáticos y la subsecuente activación de los linfocitos T [278].

Otra de las citocinas proinflamatorias inducida por los VSSP en las DC es el TNF $\alpha$ , aunque la cantidad relativa de células productoras es menor que cuando el estímulo empleado es el LPS. Existen diferencias entre el LPS de los VSSP y el utilizado como control del experimento. El primero, que forma parte de una vesícula que proviene de la cepa de *N. meningitidis* Cu-B385, tiene un inmunotipo L379. El segundo es LPS libre purificado de la cepa de *N. meningitidis* H44/76 y tiene un inmunotipo L3. Estas diferencias podrían ser las causas del resultado obtenido en el experimento de secreción de TNF $\alpha$  por las DC. Sin embargo, en primer lugar, aunque existen datos de que el LPS libre no es igualmente eficaz en la inducción de secreción de IL-12 por las DC humanas al compararse con el LPS que se encuentra formando parte de la bacteria [40], no hay reportes de este efecto para el TNF $\alpha$ . En segundo lugar, se ha reportado que las variantes de inmunotipos del LPS de *N. meningitidis* inducen la secreción de diferentes cantidades de TNF $\alpha$ , lo cual contribuye a la severidad de la enfermedad. No obstante, los inmunotipos L379 y L3 inducen iguales cantidades de TNF $\alpha$  [279]. Por estas razones, posiblemente no sean estas diferencias entre ambos LPS la causa de las diferencias en la secreción inducida de TNF $\alpha$ . Sin embargo, existe un reporte en la literatura científica acerca del efecto de los gangliósidos sobre la secreción de TNF $\alpha$ . En particular, se ha demostrado que la expresión de este gen en monocitos humanos, inducida por diferentes tipos de estímulos, es bloqueada por algunos gangliósidos entre los que se encuentra el GM3 [243]. Quizás en nuestro sistema la presencia del GM3 en los VSSP sea la causa de la disminución en la secreción de TNF $\alpha$  por las DC, al compararse con el LPS. Este efecto de los VSSP podría considerarse una ventaja, dado que el TNF $\alpha$  es una de las citocinas involucradas en el shock séptico [280]. Desde el punto de vista práctico esta podría ser una de las explicaciones para el bajo perfil de toxicidad que han presentado los pacientes tratados con este producto en varios ensayos clínicos. En un ensayo clínico fase I en pacientes con melanoma metastásico realizado en

Argentina, sólo en uno de los 26 pacientes se informó hipotensión severa y fiebre, mientras que el resto de los eventos de toxicidad se limitó a reacciones locales en el sitio de inyección [194]. Estos efectos adversos locales se asocian ayoritariamente al adyuvante oleoso Montanide ISA 51, con el cual se emulsionaron los VSSP utilizados en este ensayo en particular.

En este trabajo también se realizaron experimentos relacionados con el papel del LPS en las propiedades estimuladoras de las DC de los VSSP. Sobre este tema existen varios estudios a partir de mutantes de la bacteria *N. meningitidis* deficientes del LPS o con VME en DC derivadas de la cepa de ratón hiporrespondedora al LPS C3H/HeJ, que indican que el LPS es necesario para esta actividad [35-40]. En cambio, otros trabajos demuestran que sí existen componentes proteicos aislados de las vesículas con actividad inmunopotenciadora. Tal es el caso de las porinas P1 y P3, las cuales estimulan la expresión de la molécula CD86 a través del TLR2 e inducen la maduración y la secreción de IL-12 por las DC, respectivamente [35, 42, 281]. Este conjunto de evidencias indica que la actividad inmunopotenciadora de algunos componentes de las vesículas se pone de manifiesto cuando han sido aislados del contexto de la membrana. Sin embargo, al evaluar el efecto de los VSSP sobre las DC derivadas de la cepa de ratón C3H/HeJ, se demostró que estos son capaces de madurar estas células e inducir, a nivel de ARNm, las proteínas inflamatorias de la familia MIP y además las citocinas IL-1 $\beta$ , IL-12, IL-6 e IL18, para las cuales se había referido total dependencia de la señal del LPS [40]. Esto sugiere que la actividad estimuladora de los componentes de los VSSP diferentes del LPS se pone de manifiesto y que la señalización y activación ocurre a través de PRRs distintos del TLR4. Este resultado constituye el primer reporte convincente de que alguna variante de VME derivada de *N. meningitidis* estimula a las DC a través de señales diferentes de las proveídas por el LPS. No obstante, en estos experimentos también se observó que los VSSP no indujeron la expresión de IL-1 $\alpha$  e IL-1Ra en estas DC, lo que apunta a que, aunque los VSSP

pueden utilizar algún receptor diferente del TLR4, la señalización a través de este, por la interacción con el LPS también ocurre.

La polarización de la respuesta de células T cooperadoras a Th1 ó Th2 aún constituye un paradigma de la inmunología, y constituye un objetivo a alcanzar en cualquier evento de inmunorrestauración en cáncer. Un punto de vista desde el que se aborda esta temática es, precisamente, que las DC regulan este proceso. Se ha planteado la hipótesis de que las DC maduras portan una tercera señal [115] que refleja el ambiente inflamatorio en el que se indujo la maduración y que regula la polarización de las células T cooperadoras vírgenes. Algunos autores plantean que este fenómeno está relacionado con la expresión de moléculas coestimuladoras que un determinado patógeno induce en las DC [282], aunque el papel de los factores solubles está mejor definido en este fenómeno de diferenciación. El factor mejor explorado e importante en este fenómeno es la IL-12 producida por las APC, dado su carácter polarizador de los precursores vírgenes a células Th1 [283]. Más recientemente se ha descrito a la IL-4 como el factor polarizador a Th2 [112]. De acuerdo con esta hipótesis, se ha demostrado que derivados intracelulares de bacterias como la toxina de *Burdetella pertussis* inducen el desarrollo de las DC hacia las llamadas DC1, las cuales polarizan la respuesta de células T a Th1 [284, 285]. Por otra parte, toxinas derivadas de bacterias extracelulares como *Vibrio cholerae* o *Escherichia coli*, así como proteínas derivadas de alérgenos o nemátodos, promueven el desarrollo de DC deficientes en la producción de IL-12 (DC2) [286, 287]. Los VSSP por su parte indujeron en las DC la secreción de IL-12. Además se observó la expresión a nivel de ARNm de la IL-18, la cual actúa fundamentalmente como un factor de apoyo en la diferenciación a Th1 inducida por la IL-12 [288]. Este resultado apunta a que las DC activadas por los VSSP presentan un fenotipo DC1. Esta propiedad de los VSSP pudo ser comprobada en el experimento de activación de las células T singénicas en el modelo del ratón transgénico DO11.10, cuyas células T reconocen un péptido inmunodominante de la OVA en las moléculas de MHC clase II del ratón

BALB/c. En este experimento se demostró que las DC condicionadas por los VSSP transmiten señales a las células T cooperadoras vírgenes, las cuales son polarizadas a Th1 e inducidas a secretar IFN $\gamma$ . Una primera evidencia *in vivo* de esta propiedad polarizadora a Th1 de los VSSP lo constituye la respuesta de anticuerpos que se estimula con la monoterapia con estas nanopartículas. Tanto en los ratones como en los pacientes induce un patrón de subclases de anticuerpos de tipo Th1 [34]. La propiedad de los VSSP de inducir un fenotipo de DC1 lo coloca en el grupo de adyuvantes que, como el LPS y las secuencias CpG [285], inducen la producción de IL-12 en la DC y la subsecuente estimulación de un patrón Th1 en las células T cooperadoras.

El patrón polarizado de las células T CD4 a Th1 y la subsecuente secreción de IFN $\gamma$  por las mismas, es considerado uno de los factores primordiales para la activación de las células T citotóxicas [9]. La polarización a Th1 provocada por los VSSP implicó también la activación de las células T CD8 específicas por la OVA en las dos variantes antigénicas evaluadas. Una de las aproximaciones más utilizadas en la inmunoterapia activa contra el cáncer consiste en la vacunación con péptidos derivados de Ag tumorales, diseñados específicamente para asociarse con las células T en el contexto de MHC de clase I [261]. Numerosos ensayos clínicos en diferentes tipos de tumores han utilizado esta estrategia [289], resultando hasta el momento muy difícil aventurar conclusiones concernientes a su eficacia. En este trabajo los VSSP se revelan como un adyuvante con la capacidad de estimular respuestas citotóxicas específicas por un péptido de ocho aminoácidos, cantidad mínima necesaria para el anclaje en el surco de la molécula de MHC I [290]. Sorprendentemente, esta respuesta se generó por la inmunización con el péptido mezclado con los VSSP sin necesidad de crear una unión covalente entre ambos. Usualmente, las vacunas basadas en péptidos necesitan de la unión covalente a moléculas transportadoras [261] o utilizan adyuvantes de naturaleza oleosa para atraparlos dentro de las emulsiones [291]. Este resultado le confiere a los VSSP una ventaja tecnológica importante. Esta propiedad de los VSSP también se puso de

manifiesto para el sistema antigénico de las proteínas solubles. Varios de los experimentos compilados en esta tesis demuestran que los VSSP expanden, inducen la secreción de IFN $\gamma$  y estimulan la capacidad lítica de los CTL específicos por una proteína que acompaña. Esta capacidad de estimular linfocitos citotóxicos no requiere de la cooperación de las células T CD4 para la activación primaria. La activación de respuestas CTL se ha descrito para numerosos adyuvantes, como por ejemplo para la subunidad B de la toxina de *Shigella* [292], el CpG [293], las HSP [175], las OmpA [169], PROBAS [294], Tomatine [295], entre otros. Por otra parte, la propiedad de los VSSP de activar la respuesta citotóxica independientemente de la cooperación de las células T CD4 es un evento mucho menos frecuente y sólo se ha informado para el CpG [296], las OmpA [169] y las HSP [297]. Además, en los casos de las proteínas OmpA de *Klebsiella pneumoniae* y la subunidad B de la toxina de *Shigella* es necesaria la conjugación covalente del Ag al adyuvante para ejercer este tipo de función [169, 292]. La inducción de respuesta citotóxica por los VSSP constituye el primer reporte de esta propiedad para alguna proteína aislada o variante de VME de *N. meningitidis*. También constituye otra evidencia de que en los VSSP se ponen de manifiesto las propiedades activadoras de otros componentes diferentes del LPS, ya que este por sí solo es un débil activador de la respuesta de los CTL [298].

La estimulación de respuestas citotóxicas asociadas a la vacunación requiere de la presentación antigénica de moléculas suministradas por vía exógena en el contexto de las moléculas de MHC I [299]. Este fenómeno, conocido como presentación cruzada, puede ser facilitado por determinados adyuvantes como las HSP [182] y las secuencias CpG [184]. En cambio, el LPS, no interviene en este tipo de proceso. Aquí se pudo demostrar que los VSSP median la presentación cruzada de la OVA tanto *in vivo* como *in vitro* mediante la prueba de estimulación del hibridoma T CD8 B3Z. El receptor de células T de este hibridoma reconoce al péptido inmunodominante de OVA (257-SIINFEKL-264) en el contexto del haplotipo de MHC I de la cepa de ratón C57BL/6 [249]. En el

experimento *in vitro* se demostró que las DC tratadas con la OVA sola no estimulaban al hibridoma y que esto no se debía a la carencia de señales coestimuladoras o tipo dos en estas DC. Las DC tratadas con la OVA y el LPS, un fuerte inductor de señales coestimuladoras en las DC, tampoco estimularon al clon B3Z. Sólo la combinación de la OVA como fuente antigénica y de los VSSP como inductores de la presentación cruzada indujo la activación del hibridoma. Esta diferencia entre el LPS y los VSSP en cuanto a la inducción de la presentación cruzada corrobora los resultados obtenidos con las DC derivadas del ratón C3H/HeJ, donde se demostró que el efecto adyuvante de los VSSP no se debía solamente a la presencia del LPS en su composición. El escenario experimental *in vitro* de presentación cruzada también aporta otra evidencia del predominio en los VSSP de sus propiedades activadoras del sistema inmune, a pesar de las propiedades inmunosupresoras del gangliósido GM3. Se ha informado que el GM3 inhibe la maquinaria de procesamiento y presentación de Ag en MHC I [241]. En este caso, el hecho de que los VSSP faciliten el procesamiento de la OVA y la presentación de su péptido inmunodominante SIINFEKL en la molécula de MHC I indica que la capacidad inhibidora del gangliósido presente en los VSSP no se manifiesta en este preparado, al menos para este proceso.

El conjunto de propiedades de los VSSP que los sitúa en el selecto conjunto de adyuvantes de nueva generación se integran en la actividad antitumoral inducida por las vacunas celulares adyuvadas con estas partículas. Las vacunas de células tumorales completas han sido ampliamente investigadas debido a que se asume que contienen todos los Ag relevantes del tumor [218]. Este tipo de vacunas son generalmente suministradas con adyuvantes potentes y de alto perfil de citotoxicidad como el BCG, la toxina diftérica, virus inactivados, entre otros [299], propiciándose la presentación de la célula tumoral en un contexto inflamatorio para atraer a las APC del hospedero. En nuestros estudios con la línea de carcinoma de colon CT26, la mezcla de las células irradiadas con los VSSP previno la implantación de los tumores en más del 80 % de los animales. El rechazo tumoral, como



respuesta objetiva asociada a la vacunación, está generalmente ligado a la activación de los CTL. Además, la transferencia antigénica de la célula tumoral irradiada a la molécula de MHC I de la APC ocurre por un mecanismo de presentación cruzada. Por tanto la actividad antitumoral observada en este sistema aporta nuevas evidencias de que los VSSP es un adyuvante que media los fenómenos de inducción de presentación cruzada y de activación de los CTL. La otra línea tumoral evaluada fue el carcinoma mamario F3II, el cual, a diferencia del CT26 [266], es muy poco inmunogénico [267, 268, 300]. La adyuvación de las células irradiadas con los VSSP redujo significativamente el crecimiento tumoral de las células implantadas subcutáneamente, evento igualmente asociado con la actividad de las células T CD8. Este resultado ubica a los VSSP como un adyuvante útil en formulaciones con un amplio espectro de sistemas antigénicos, como proteínas, péptidos, células y gangliósidos.

Los estudios realizados evidencian propiedades adyuvantes de los VSSP tales como la maduración de las DC, la polarización a Th1 de las células T cooperadoras y la activación de los CTL, todos requisitos necesarios para que un adyuvante pueda ser utilizado en la inmunoterapia del cáncer. Este preparado, además, ha mostrado actividad antitumoral al aplicarse como monoterapia en el modelo preclínico del melanoma B16 [195] y adyuvante de vacunas celulares en los modelos CT26 y F3II. Basados en los resultados obtenidos en estos modelos preclínicos, los VSSP pudieran ser un promisorio adyuvante para la inmunoterapia del cáncer. No obstante, la capacidad inmunorrestauradora de estas vesículas queda aún por probarse. Hasta el momento, sólo existen evidencias de que la inmunización con los VSSP, tanto en ratones como en humanos, promueve la producción de anticuerpos de tipo IgG e IgM específicos por el gangliósido GM3 [34, 194]. Esto podría ser un indicio de las potencialidades restauradoras de los VSSP, ya que se ha sugerido que los anticuerpos de tipo IgM secuestran el GM3 circulante, y por tanto disminuye la inmunosupresión inducida por este [272, 273]. Además de la potencialidad de los VSSP para la inducción de

anticuerpos específicos por GM3, también se ha descrito el aumento de los niveles IFN $\gamma$  y la disminución de la citocina inmunosupresora IL-10 en pacientes de leucemia vacunados con este preparado [194, Guthmann M. -comunicación personal]. Esto indica que los VSSP podrían estar desempeñando un papel importante en la reversión del fenotipo supresor caracterizado por la secreción de IL-10 y la polarización hacia un fenotipo inflamatorio caracterizado por el IFN $\gamma$  sistémico.

## 6 CONCLUSIONES

1. En los VSSP predominan las señales inmunoestimuladoras sobre las supresoras ya que inducen la maduración de células dendríticas humanas y murinas con la consecuente secreción de citocinas y factores quimiotácticos proinflamatorios.
2. Los VSSP logran importantes niveles de activación de las DC incluso en células TLR4 disfuncionales, por lo que deben estar involucrando otros receptores de reconocimiento de patrones.
3. El efecto inmunoestimulador proinflamatorio de los VSSP sobre las DC logra instruir a las células T cooperadoras de forma tal que se polaricen a un fenotipo Th1.
4. Los VSSP promueven la presentación cruzada de antígenos acompañantes sobre las moléculas de MHC I.
5. Los VSSP clasifican en el selecto grupo de adyuvantes capaces de promover la activación de células T CD8<sup>+</sup> citotóxicas específicas sin la necesidad de la cooperación de las células T CD4<sup>+</sup>.
6. Los VSSP son capaces de potenciar la actividad antitumoral de vacunas celulares autólogas.



## **7 RECOMENDACIONES**

1. Determinar los componentes del patrón molecular asociado a patógenos presente en los VSSP.
2. Evaluar la capacidad de los VSSP de revertir la inhibición de la diferenciación y maduración de las células dendríticas inducida por factores solubles secretados por los tumores, particularmente el GM3.
3. Evaluar la capacidad adyuvante de los VSSP en ratones con tumores, fundamentalmente en modelos en los que el GM3 sea un factor inmunosupresor importante.
4. Evaluar la capacidad de los VSSP de revertir el inmunocompromiso inducido por tumores utilizando modelos preclínicos de trasplante alogénico.
5. Ampliar los ensayos clínicos en pacientes de cáncer con vacunas terapéuticas formuladas con los VSSP.



---

## 8 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Eckhardt, S., Recent progress in the development of anticancer agents. *Curr Med Chem Anti-Canc Agents*, 2002. **2**(3): p. 419-39.
2. Yu, Z. and N.P. Restifo, *Cancer vaccines: progress reveals new complexities*. *J Clin Invest*, 2002. **110**(3): p. 289-94.
3. Burnet, F.M., *The concept of immunological surveillance*. *Prog Exp Tumor Res*, 1970. **13**: p. 1-27.
4. L, T., ed. *Discussion of Cellular and Humoral Aspects of the Hypersensitive States*. 1959, Lawrence HS: New York.
5. Ko, E.C., X. Wang, and S. Ferrone, *Immunotherapy of malignant diseases. Challenges and strategies*. *Int Arch Allergy Immunol*, 2003. **132**(4): p. 294-309.
6. Todryk, S., *A sense of tumour for the immune system*. *Immunology*, 2002. **107**(1): p. 1-4.
7. Pardoll, D., *Does the immune system see tumors as foreign or self?* *Annu Rev Immunol*, 2003. **21**: p. 807-39.
8. Celluzzi, C.M., et al., Peptide-pulsed dendritic cells induce antigen-specific CTL-mediated protective tumor immunity. *J Exp Med*, 1996. **183**(1): p. 283-7.
9. Tuting, T., et al., Autologous human monocyte-derived dendritic cells genetically modified to express melanoma antigens elicit primary cytotoxic T cell responses in vitro: enhancement by cotransfection of genes encoding the Th1-biasing cytokines IL-12 and IFN-alpha. *J Immunol*, 1998. **160**(3): p. 1139-47.
10. Nair, S. and D. Boczkowski, *RNA-transfected dendritic cells*. *Expert Rev Vaccines*, 2002. **1**(4): p. 507-13.
11. Guermonprez, P., et al., *Antigen presentation and T cell stimulation by dendritic cells*. *Annu Rev Immunol*, 2002. **20**: p. 621-67.
12. Small, E.J., et al., Immunotherapy of hormone-refractory prostate cancer with antigen-loaded dendritic cells. *J Clin Oncol*, 2000. **18**(23): p. 3894-903.
13. Matzinger, P., *Tolerance, danger, and the extended family*. *Annu Rev Immunol*, 1994. **12**: p. 991-1045.
14. Medzhitov, R. and C.A. Janeway, Jr., *Innate immunity: the virtues of a nonclonal system of recognition*. *Cell*, 1997. **91**(3): p. 295-8.
15. Marciani, D.J., Vaccine adjuvants: role and mechanisms of action in vaccine immunogenicity. *Drug Discov Today*, 2003. **8**(20): p. 934-43.
16. Marincola, F.M., et al., *Tumors as elusive targets of T-cell-based active immunotherapy*. *Trends Immunol*, 2003. **24**(6): p. 335-42.
17. Pawelec, G., *Tumour escape: antitumour effectors too much of a good thing?* *Cancer Immunol Immunother*, 2004. **53**(3): p. 262-74.
18. Orsini, E., et al., The circulating dendritic cell compartment in patients with chronic lymphocytic leukemia is severely defective and unable to stimulate an effective T-cell response. *Cancer Res*, 2003. **63**(15): p. 4497-506.
19. Tas, M.P., et al., Depressed monocyte polarization and clustering of dendritic cells in patients with head and neck cancer: in vitro restoration of this immunosuppression by thymic hormones. *Cancer Immunol Immunother*, 1993. **36**(2): p. 108-14.
20. Gabrilovich, D.I., et al., Decreased antigen presentation by dendritic cells in patients with breast cancer. *Clin Cancer Res*, 1997. **3**(3): p. 483-90.
21. Almand, B., et al., Clinical significance of defective dendritic cell differentiation in cancer. *Clin Cancer Res*, 2000. **6**(5): p. 1755-66.
22. Almand, B., et al., Increased production of immature myeloid cells in cancer patients: a mechanism of immunosuppression in cancer. *J Immunol*, 2001. **166**(1): p. 678-89.
23. Bronte, V., et al., Identification of a CD11b(+)/Gr-1(+)/CD31(+) myeloid progenitor capable of activating or suppressing CD8(+) T cells. *Blood*, 2000. **96**(12): p. 3838-46.
24. Sarris, A.H., et al., Interleukin-10 levels are often elevated in serum of adults with Hodgkin's disease and are associated with inferior failure-free survival. *Ann Oncol*, 1999. **10**(4): p. 433-40.
25. Letterio, J.J. and A.B. Roberts, *Regulation of immune responses by TGF-beta*. *Annu Rev Immunol*, 1998. **16**: p. 137-61.
26. Pasare, C. and R. Medzhitov, Toll pathway-dependent blockade of CD4+CD25+ T cell-mediated suppression by dendritic cells. *Science*, 2003. **299**(5609): p. 1033-6.

27. Roncarolo, M.G., M.K. Levings, and C. Traversari, *Differentiation of T regulatory cells by immature dendritic cells*. J Exp Med, 2001. **193**(2): p. F5-9.
28. Ladisch, S., R. Li, and E. Olson, *Ceramide structure predicts tumor ganglioside immunosuppressive activity*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1994. **91**(5): p. 1974-8.
29. Kong, Y., R. Li, and S. Ladisch, *Natural forms of shed tumor gangliosides*. Biochim Biophys Acta, 1998. **1394**(1): p. 43-56.
30. Dolo, V., et al., *Enrichment and localization of ganglioside G(D3) and caveolin-1 in shed tumor cell membrane vesicles*. Biochim Biophys Acta, 2000. **1486**(2-3): p. 265-74.
31. Ladisch, S., S. Kitada, and E.F. Hays, *Gangliosides shed by tumor cells enhance tumor formation in mice*. J Clin Invest, 1987. **79**(6): p. 1879-82.
32. McKallip, R., R. Li, and S. Ladisch, *Tumor gangliosides inhibit the tumor-specific immune response*. J Immunol, 1999. **163**(7): p. 3718-26.
33. Mesa, C. and L.E. Fernandez, *Challenges facing adjuvants for cancer immunotherapy*. Immunol Cell Biol, 2004. **82**(6): p. 644-50.
34. Estevez, F., et al., *Enhancement of the immune response to poorly immunogenic gangliosides after incorporation into very small size proteoliposomes (VSSP)*. Vaccine, 1999. **18**(1-2): p. 190-7.
35. Al-Bader, T., et al., *Activation of human dendritic cells by the PorA protein of Neisseria meningitidis*. Cell Microbiol, 2004. **6**(7): p. 651-62.
36. Arigita, C., et al., *Liposomal meningococcal B vaccination: role of dendritic cell targeting in the development of a protective immune response*. Infect Immun, 2003. **71**(9): p. 5210-8.
37. Dixon, G.L., et al., *Dendritic cell activation and cytokine production induced by group B Neisseria meningitidis: interleukin-12 production depends on lipopolysaccharide expression in intact bacteria*. Infect Immun, 2001. **69**(7): p. 4351-7.
38. Perez, O., et al., *Novel adjuvant based on a proteoliposome-derived cochleate structure containing native lipopolysaccharide as a pathogen-associated molecular pattern*. Immunol Cell Biol, 2004. **82**(6): p. 603-10.
39. Rodriguez, T., et al., *Interactions of proteoliposomes from serogroup B Neisseria meningitidis with bone marrow-derived dendritic cells and macrophages: adjuvant effects and antigen delivery*. Vaccine, 2005. **23**(10): p. 1312-21.
40. Uronen-Hansson, H., et al., *Human dendritic cell activation by Neisseria meningitidis: phagocytosis depends on expression of lipooligosaccharide (LOS) by the bacteria and is required for optimal cytokine production*. Cell Microbiol, 2004. **6**(7): p. 625-37.
41. Massari, P., et al., *Cutting edge: Immune stimulation by neisserial porins is toll-like receptor 2 and MyD88 dependent*. J Immunol, 2002. **168**(4): p. 1533-7.
42. Wetzler, L.M., et al., *Neisserial porins induce B lymphocytes to express costimulatory B7-2 molecules and to proliferate*. J Exp Med, 1996. **183**(3): p. 1151-9.
43. Fearon, D.T. and R.M. Locksley, *The instructive role of innate immunity in the acquired immune response*. Science, 1996. **272**(5258): p. 50-3.
44. Ibrahim, M.A., B.M. Chain, and D.R. Katz, *The injured cell: the role of the dendritic cell system as a sentinel receptor pathway*. Immunol Today, 1995. **16**(4): p. 181-6.
45. Muzio, M., et al., *The human toll signaling pathway: divergence of nuclear factor kappaB and JNK/SAPK activation upstream of tumor necrosis factor receptor-associated factor 6 (TRAF6)*. J Exp Med, 1998. **187**(12): p. 2097-101.
46. Banchereau, J. and R.M. Steinman, *Dendritic cells and the control of immunity*. Nature, 1998. **392**(6673): p. 245-52.
47. Watts, C., *Capture and processing of exogenous antigens for presentation on MHC molecules*. Annu Rev Immunol, 1997. **15**: p. 821-50.
48. den Haan, J.M., S.M. Lehar, and M.J. Bevan, *CD8(+) but not CD8(-) dendritic cells cross-prime cytotoxic T cells in vivo*. J Exp Med, 2000. **192**(12): p. 1685-96.
49. Janeway, C.A., Jr. and R. Medzhitov, *Introduction: the role of innate immunity in the adaptive immune response*. Semin Immunol, 1998. **10**(5): p. 349-50.
50. Anderson, K.V., *Toll signaling pathways in the innate immune response*. Curr Opin Immunol, 2000. **12**(1): p. 13-9.
51. Takeda, K., T. Kaisho, and S. Akira, *Toll-like receptors*. Annu Rev Immunol, 2003. **21**: p. 335-76.



52. Poltorak, A., et al., Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutations in Tlr4 gene. *Science*, 1998. **282**(5396): p. 2085-8.
53. Takeuchi, O., et al., Differential roles of TLR2 and TLR4 in recognition of gram-negative and gram-positive bacterial cell wall components. *Immunity*, 1999. **11**(4): p. 443-51.
54. Smith, K.D., et al., Toll-like receptor 5 recognizes a conserved site on flagellin required for protofilament formation and bacterial motility. *Nat Immunol*, 2003. **4**(12): p. 1247-53.
55. Hemmi, H., et al., *A Toll-like receptor recognizes bacterial DNA*. *Nature*, 2000. **408**(6813): p. 740-5.
56. Alexopoulou, L., et al., Recognition of double-stranded RNA and activation of NF-kappaB by Toll-like receptor 3. *Nature*, 2001. **413**(6857): p. 732-8.
57. Heil, F., et al., Species-specific recognition of single-stranded RNA via toll-like receptor 7 and 8. *Science*, 2004. **303**(5663): p. 1526-9.
58. Diebold, S.S., et al., Innate antiviral responses by means of TLR7-mediated recognition of single-stranded RNA. *Science*, 2004. **303**(5663): p. 1529-31.
59. Lund, J.M., et al., *Recognition of single-stranded RNA viruses by Toll-like receptor 7*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2004. **101**(15): p. 5598-603.
60. Iwasaki, A. and R. Medzhitov, *Toll-like receptor control of the adaptive immune responses*. *Nat Immunol*, 2004. **5**(10): p. 987-95.
61. Hornung, V., et al., Quantitative expression of toll-like receptor 1-10 mRNA in cellular subsets of human peripheral blood mononuclear cells and sensitivity to CpG oligodeoxynucleotides. *J Immunol*, 2002. **168**(9): p. 4531-7.
62. Chuang, T.H. and R.J. Ulevitch, Cloning and characterization of a sub-family of human toll-like receptors: hTLR7, hTLR8 and hTLR9. *Eur Cytokine Netw*, 2000. **11**(3): p. 372-8.
63. Mellman, I. and R.M. Steinman, Dendritic cells: specialized and regulated antigen processing machines. *Cell*, 2001. **106**(3): p. 255-8.
64. Inaba, K., et al., Dendritic cell progenitors phagocytose particulates, including bacillus Calmette-Guerin organisms, and sensitize mice to mycobacterial antigens in vivo. *J Exp Med*, 1993. **178**(2): p. 479-88.
65. Rubartelli, A., A. Poggi, and M.R. Zocchi, The selective engulfment of apoptotic bodies by dendritic cells is mediated by the alpha(v)beta3 integrin and requires intracellular and extracellular calcium. *Eur J Immunol*, 1997. **27**(8): p. 1893-900.
66. Swanson, J.A. and C. Watts, *Macropinocytosis*. *Trends Cell Biol*, 1995. **5**(11): p. 424-8.
67. Sallusto, F. and A. Lanzavecchia, Efficient presentation of soluble antigen by cultured human dendritic cells is maintained by granulocyte/macrophage colony-stimulating factor plus interleukin 4 and downregulated by tumor necrosis factor alpha. *J Exp Med*, 1994. **179**(4): p. 1109-18.
68. Engering, A.J., et al., The mannose receptor functions as a high capacity and broad specificity antigen receptor in human dendritic cells. *Eur J Immunol*, 1997. **27**(9): p. 2417-25.
69. Jiang, W., et al., The receptor DEC-205 expressed by dendritic cells and thymic epithelial cells is involved in antigen processing. *Nature*, 1995. **375**(6527): p. 151-5.
70. Sallusto, F., et al., Dendritic cells use macropinocytosis and the mannose receptor to concentrate macromolecules in the major histocompatibility complex class II compartment: downregulation by cytokines and bacterial products. *J Exp Med*, 1995. **182**(2): p. 389-400.
71. Inaba, K., et al., The formation of immunogenic major histocompatibility complex class II-peptide ligands in lysosomal compartments of dendritic cells is regulated by inflammatory stimuli. *J Exp Med*, 2000. **191**(6): p. 927-36.
72. Pierre, P., et al., Developmental regulation of MHC class II transport in mouse dendritic cells. *Nature*, 1997. **388**(6644): p. 787-92.
73. Turley, S.J., et al., Transport of peptide-MHC class II complexes in developing dendritic cells. *Science*, 2000. **288**(5465): p. 522-7.
74. Tseng, S.Y., et al., B7-DC, a new dendritic cell molecule with potent costimulatory properties for T cells. *J Exp Med*, 2001. **193**(7): p. 839-46.
75. Caux, C., et al., B70/B7-2 is identical to CD86 and is the major functional ligand for CD28 expressed on human dendritic cells. *J Exp Med*, 1994. **180**(5): p. 1841-7.

76. Langenkamp, A., et al., Kinetics of dendritic cell activation: impact on priming of TH1, TH2 and nonpolarized T cells. *Nat Immunol*, 2000. **1**(4): p. 311-6.
77. Ebner, S., et al., Production of IL-12 by human monocyte-derived dendritic cells is optimal when the stimulus is given at the onset of maturation, and is further enhanced by IL-4. *J Immunol*, 2001. **166**(1): p. 633-41.
78. Yanagihara, S., et al., EB1/CCR7 is a new member of dendritic cell chemokine receptor that is up-regulated upon maturation. *J Immunol*, 1998. **161**(6): p. 3096-102.
79. Dieu, M.C., et al., Selective recruitment of immature and mature dendritic cells by distinct chemokines expressed in different anatomic sites. *J Exp Med*, 1998. **188**(2): p. 373-86.
80. Sozzani, S., et al., The role of chemokines in the regulation of dendritic cell trafficking. *J Leukoc Biol*, 1999. **66**(1): p. 1-9.
81. Janeway, C.A., Jr., *Approaching the asymptote? Evolution and revolution in immunology*. Cold Spring Harb Symp Quant Biol, 1989. **54 Pt 1**: p. 1-13.
82. Janeway, C.A., Jr., The immune system evolved to discriminate infectious nonself from noninfectious self. *Immunol Today*, 1992. **13**(1): p. 11-6.
83. Larsen, C.P., et al., Migration and maturation of Langerhans cells in skin transplants and explants. *J Exp Med*, 1990. **172**(5): p. 1483-93.
84. Enk, A.H. and S.I. Katz, *Early molecular events in the induction phase of contact sensitivity*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1992. **89**(4): p. 1398-402.
85. Abrams, J.R., et al., Blockade of T lymphocyte costimulation with cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4-immunoglobulin (CTLA4Ig) reverses the cellular pathology of psoriatic plaques, including the activation of keratinocytes, dendritic cells, and endothelial cells. *J Exp Med*, 2000. **192**(5): p. 681-94.
86. Kodaira, Y., et al., Phenotypic and functional maturation of dendritic cells mediated by heparan sulfate. *J Immunol*, 2000. **165**(3): p. 1599-604.
87. Termeer, C., et al., Oligosaccharides of Hyaluronan activate dendritic cells via toll-like receptor 4. *J Exp Med*, 2002. **195**(1): p. 99-111.
88. Rocken, M., et al., *Lectin-mediated induction of IL-4-producing CD4+ T cells*. *J Immunol*, 1991. **146**(2): p. 577-84.
89. Sad, S. and T.R. Mosmann, Single IL-2-secreting precursor CD4 T cell can develop into either Th1 or Th2 cytokine secretion phenotype. *J Immunol*, 1994. **153**(8): p. 3514-22.
90. Seder, R.A. and W.E. Paul, *Acquisition of lymphokine-producing phenotype by CD4+ T cells*. *Annu Rev Immunol*, 1994. **12**: p. 635-73.
91. Del Prete, G., E. Maggi, and S. Romagnani, Human Th1 and Th2 cells: functional properties, mechanisms of regulation, and role in disease. *Lab Invest*, 1994. **70**(3): p. 299-306.
92. Ladel, C.H., et al., *Lethal tuberculosis in interleukin-6-deficient mutant mice*. *Infect Immun*, 1997. **65**(11): p. 4843-9.
93. Yamamoto, M., et al., IL-6 is required for the development of Th1 cell-mediated murine colitis. *J Immunol*, 2000. **164**(9): p. 4878-82.
94. Yssel, H., et al., IL-10 is produced by subsets of human CD4+ T cell clones and peripheral blood T cells. *J Immunol*, 1992. **149**(7): p. 2378-84.
95. Spellberg, B. and J.E. Edwards, Jr., *Type 1/Type 2 immunity in infectious diseases*. *Clin Infect Dis*, 2001. **32**(1): p. 76-102.
96. Livingston, D.H., et al., The effect of tumor necrosis factor-alpha and interferon-gamma on neutrophil function. *J Surg Res*, 1989. **46**(4): p. 322-6.
97. Newburger, P.E., et al., Induction of phagocyte cytochrome b heavy chain gene expression by interferon gamma. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1988. **85**(14): p. 5215-9.
98. Dellacasagrande, J., et al., IFN-gamma-mediated control of *Coxiella burnetii* survival in monocytes: the role of cell apoptosis and TNF. *J Immunol*, 1999. **162**(4): p. 2259-65.
99. Marodi, L., R. Kaposzta, and E. Nemes, Survival of group B streptococcus type III in mononuclear phagocytes: differential regulation of bacterial killing in cord macrophages by human recombinant gamma interferon and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. *Infect Immun*, 2000. **68**(4): p. 2167-70.

100. Johnson, D.R. and J.S. Pober, Tumor necrosis factor and immune interferon synergistically increase transcription of HLA class I heavy- and light-chain genes in vascular endothelium. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1990. **87**(13): p. 5183-7.
101. Teunissen, M.B., et al., Interleukin-17 and interferon-gamma synergize in the enhancement of proinflammatory cytokine production by human keratinocytes. *J Invest Dermatol*, 1998. **111**(4): p. 645-9.
102. Nickoloff, B.J. and Y. Naidu, Perturbation of epidermal barrier function correlates with initiation of cytokine cascade in human skin. *J Am Acad Dermatol*, 1994. **30**(4): p. 535-46.
103. Punnonen, J. and J.E. de Vries, IL-13 induces proliferation, Ig isotype switching, and Ig synthesis by immature human fetal B cells. *J Immunol*, 1994. **152**(3): p. 1094-102.
104. Lai, Y.H. and T.R. Mosmann, Mouse IL-13 enhances antibody production in vivo and acts directly on B cells in vitro to increase survival and hence antibody production. *J Immunol*, 1999. **162**(1): p. 78-87.
105. Punnonen, J., et al., Interleukin 13 induces interleukin 4-independent IgG4 and IgE synthesis and CD23 expression by human B cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1993. **90**(8): p. 3730-4.
106. Snapper, C.M., et al., IgE class switching is critically dependent upon the nature of the B cell activator, in addition to the presence of IL-4. *J Immunol*, 1991. **147**(4): p. 1163-70.
107. Kawashima, T., et al., Linkage and association of an interleukin 4 gene polymorphism with atopic dermatitis in Japanese families. *J Med Genet*, 1998. **35**(6): p. 502-4.
108. Shi, H.Z., et al., Effect of inhaled interleukin-5 on number and activity of eosinophils in circulation from asthmatics. *Clin Immunol*, 1999. **91**(2): p. 163-9.
109. Li, L., et al., Effects of Th2 cytokines on chemokine expression in the lung: IL-13 potently induces eotaxin expression by airway epithelial cells. *J Immunol*, 1999. **162**(5): p. 2477-87.
110. Robinson, D.S. and A. O'Garra, *Further checkpoints in Th1 development*. *Immunity*, 2002. **16**(6): p. 755-8.
111. Schmitz, J., et al., Induction of interleukin 4 (IL-4) expression in T helper (Th) cells is not dependent on IL-4 from non-Th cells. *J Exp Med*, 1994. **179**(4): p. 1349-53.
112. Moser, M. and K.M. Murphy, *Dendritic cell regulation of TH1-TH2 development*. *Nat Immunol*, 2000. **1**(3): p. 199-205.
113. Maldonado-Lopez, R., et al., CD8alpha+ and CD8alpha- subclasses of dendritic cells direct the development of distinct T helper cells in vivo. *J Exp Med*, 1999. **189**(3): p. 587-92.
114. Maldonado-Lopez, R., et al., Role of CD8alpha+ and CD8alpha- dendritic cells in the induction of primary immune responses in vivo. *J Leukoc Biol*, 1999. **66**(2): p. 242-6.
115. Kalinski, P., et al., T-cell priming by type-1 and type-2 polarized dendritic cells: the concept of a third signal. *Immunol Today*, 1999. **20**(12): p. 561-7.
116. Pamer, E. and P. Cresswell, *Mechanisms of MHC class I-restricted antigen processing*. *Annu Rev Immunol*, 1998. **16**: p. 323-58.
117. Moore, M.W., F.R. Carbone, and M.J. Bevan, Introduction of soluble protein into the class I pathway of antigen processing and presentation. *Cell*, 1988. **54**(6): p. 777-85.
118. Pulaski, B.A., et al., Interleukin 3 enhances cytotoxic T lymphocyte development and class I major histocompatibility complex "re-presentation" of exogenous antigen by tumor-infiltrating antigen-presenting cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1996. **93**(8): p. 3669-74.
119. Kurts, C., et al., Class I-restricted cross-presentation of exogenous self-antigens leads to deletion of autoreactive CD8(+) T cells. *J Exp Med*, 1997. **186**(2): p. 239-45.
120. Guermonprez, P., et al., ER-phagosome fusion defines an MHC class I cross-presentation compartment in dendritic cells. *Nature*, 2003. **425**(6956): p. 397-402.
121. Ackerman, A.L., et al., Early phagosomes in dendritic cells form a cellular compartment sufficient for cross presentation of exogenous antigens. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2003. **100**(22): p. 12889-94.
122. Houde, M., et al., Phagosomes are competent organelles for antigen cross-presentation. *Nature*, 2003. **425**(6956): p. 402-6.
123. Cresswell, P., et al., *The nature of the MHC class I peptide loading complex*. *Immunol Rev*, 1999. **172**: p. 21-8.
124. Romisch, K., Surfing the Sec61 channel: bidirectional protein translocation across the ER membrane. *J Cell Sci*, 1999. **112 ( Pt 23)**: p. 4185-91.

125. Jarosch, E., et al., Protein dislocation from the endoplasmic reticulum--pulling out the suspect. *Traffic*, 2002. **3**(8): p. 530-6.
126. Matlack, K.E., W. Mothes, and T.A. Rapoport, *Protein translocation: tunnel vision*. *Cell*, 1998. **92**(3): p. 381-90.
127. Pooley, J.L., W.R. Heath, and K. Shortman, Cutting edge: intravenous soluble antigen is presented to CD4 T cells by CD8- dendritic cells, but cross-presented to CD8 T cells by CD8+ dendritic cells. *J Immunol*, 2001. **166**(9): p. 5327-30.
128. Staerz, U.D., H. Karasuyama, and A.M. Garner, *Cytotoxic T lymphocytes against a soluble protein*. *Nature*, 1987. **329**(6138): p. 449-51.
129. den Haan, J.M. and M.J. Bevan, Constitutive versus activation-dependent cross-presentation of immune complexes by CD8(+) and CD8(-) dendritic cells in vivo. *J Exp Med*, 2002. **196**(6): p. 817-27.
130. Regnault, A., et al., Fcgamma receptor-mediated induction of dendritic cell maturation and major histocompatibility complex class I-restricted antigen presentation after immune complex internalization. *J Exp Med*, 1999. **189**(2): p. 371-80.
131. Pfeifer, J.D., et al., Phagocytic processing of bacterial antigens for class I MHC presentation to T cells. *Nature*, 1993. **361**(6410): p. 359-62.
132. Belkaid, Y., et al., CD8+ T cells are required for primary immunity in C57BL/6 mice following low-dose, intradermal challenge with *Leishmania major*. *J Immunol*, 2002. **168**(8): p. 3992-4000.
133. Ramirez, M.C. and L.J. Sigal, Macrophages and dendritic cells use the cytosolic pathway to rapidly cross-present antigen from live, vaccinia-infected cells. *J Immunol*, 2002. **169**(12): p. 6733-42.
134. Sigal, L.J., et al., Cytotoxic T-cell immunity to virus-infected non-haematopoietic cells requires presentation of exogenous antigen. *Nature*, 1999. **398**(6722): p. 77-80.
135. Carbone, F.R. and M.J. Bevan, Class I-restricted processing and presentation of exogenous cell-associated antigen in vivo. *J Exp Med*, 1990. **171**(2): p. 377-87.
136. Kurts, C., et al., Constitutive class I-restricted exogenous presentation of self antigens in vivo. *J Exp Med*, 1996. **184**(3): p. 923-30.
137. Morgan, D.J., et al., *Ontogeny of T cell tolerance to peripherally expressed antigens*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1999. **96**(7): p. 3854-8.
138. Huang, A.Y., et al., Role of bone marrow-derived cells in presenting MHC class I-restricted tumor antigens. *Science*, 1994. **264**(5161): p. 961-5.
139. Huang, A.Y., et al., In vivo cross-priming of MHC class I-restricted antigens requires the TAP transporter. *Immunity*, 1996. **4**(4): p. 349-55.
140. Bevan, M.J., Cross-priming for a secondary cytotoxic response to minor H antigens with H-2 congenic cells which do not cross-react in the cytotoxic assay. *J Exp Med*, 1976. **143**(5): p. 1283-8.
141. Schulz, O. and C. Reis e Sousa, Cross-presentation of cell-associated antigens by CD8alpha+ dendritic cells is attributable to their ability to internalize dead cells. *Immunology*, 2002. **107**(2): p. 183-9.
142. Iyoda, T., et al., The CD8+ dendritic cell subset selectively endocytoses dying cells in culture and in vivo. *J Exp Med*, 2002. **195**(10): p. 1289-302.
143. Ferguson, T.A., et al., Uptake of apoptotic antigen-coupled cells by lymphoid dendritic cells and cross-priming of CD8(+) T cells produce active immune unresponsiveness. *J Immunol*, 2002. **168**(11): p. 5589-95.
144. Datta, S.K., et al., A subset of Toll-like receptor ligands induces cross-presentation by bone marrow-derived dendritic cells. *J Immunol*, 2003. **170**(8): p. 4102-10.
145. Delamarre, L., H. Holcombe, and I. Mellman, Presentation of exogenous antigens on major histocompatibility complex (MHC) class I and MHC class II molecules is differentially regulated during dendritic cell maturation. *J Exp Med*, 2003. **198**(1): p. 111-22.
146. Behrens, G., et al., *Helper T cells, dendritic cells and CTL Immunity*. *Immunol Cell Biol*, 2004. **82**(1): p. 84-90.
147. Krieger, N.R., D.P. Yin, and C.G. Fathman, *CD4+ but not CD8+ cells are essential for allorejection*. *J Exp Med*, 1996. **184**(5): p. 2013-8.
148. Bennett, S.R., et al., Induction of a CD8+ cytotoxic T lymphocyte response by cross-priming requires cognate CD4+ T cell help. *J Exp Med*, 1997. **186**(1): p. 65-70.
149. Guerder, S. and P. Matzinger, *A fail-safe mechanism for maintaining self-tolerance*. *J Exp Med*, 1992. **176**(2): p. 553-64.

150. Kast, W.M., et al., Cooperation between cytotoxic and helper T lymphocytes in protection against lethal Sendai virus infection. Protection by T cells is MHC-restricted and MHC-regulated; a model for MHC-disease associations. *J Exp Med*, 1986. **164**(3): p. 723-38.
151. Schoenberger, S.P., et al., T-cell help for cytotoxic T lymphocytes is mediated by CD40-CD40L interactions. *Nature*, 1998. **393**(6684): p. 480-3.
152. Cardin, R.D., et al., Progressive loss of CD8+ T cell-mediated control of a gamma-herpesvirus in the absence of CD4+ T cells. *J Exp Med*, 1996. **184**(3): p. 863-71.
153. Ahmed, R., L.D. Butler, and L. Bhatti, T4+ T helper cell function in vivo: differential requirement for induction of antiviral cytotoxic T-cell and antibody responses. *J Virol*, 1988. **62**(6): p. 2102-6.
154. Buller, R.M., et al., Induction of cytotoxic T-cell responses in vivo in the absence of CD4 helper cells. *Nature*, 1987. **328**(6125): p. 77-9.
155. Liu, Y. and A. Mullbacher, The generation and activation of memory class I MHC restricted cytotoxic T cell responses to influenza A virus in vivo do not require CD4+ T cells. *Immunol Cell Biol*, 1989. **67** ( Pt 6): p. 413-20.
156. Nash, A.A., et al., Different roles for L3T4+ and Lyt 2+ T cell subsets in the control of an acute herpes simplex virus infection of the skin and nervous system. *J Gen Virol*, 1987. **68** ( Pt 3): p. 825-33.
157. Mintern, J.D., et al., Cutting edge: precursor frequency affects the helper dependence of cytotoxic T cells. *J Immunol*, 2002. **168**(3): p. 977-80.
158. Wang, B., et al., Multiple paths for activation of naive CD8+ T cells: CD4-independent help. *J Immunol*, 2001. **167**(3): p. 1283-9.
159. Heath, W.R., L. Kjer-Nielsen, and M.W. Hoffmann, *Avidity for antigen can influence the helper dependence of CD8+ T lymphocytes*. *J Immunol*, 1993. **151**(11): p. 5993-6001.
160. Bourgeois, C., B. Rocha, and C. Tanchot, *A role for CD40 expression on CD8+ T cells in the generation of CD8+ T cell memory*. *Science*, 2002. **297**(5589): p. 2060-3.
161. Janssen, E.M., et al., CD4+ T cells are required for secondary expansion and memory in CD8+ T lymphocytes. *Nature*, 2003. **421**(6925): p. 852-6.
162. Shedlock, D.J. and H. Shen, Requirement for CD4 T cell help in generating functional CD8 T cell memory. *Science*, 2003. **300**(5617): p. 337-9.
163. Sun, J.C. and M.J. Bevan, Defective CD8 T cell memory following acute infection without CD4 T cell help. *Science*, 2003. **300**(5617): p. 339-42.
164. von Herrath, M.G., et al., CD4-deficient mice have reduced levels of memory cytotoxic T lymphocytes after immunization and show diminished resistance to subsequent virus challenge. *J Virol*, 1996. **70**(2): p. 1072-9.
165. Belz, G.T., et al., Compromised influenza virus-specific CD8(+)-T-cell memory in CD4(+)-T-cell-deficient mice. *J Virol*, 2002. **76**(23): p. 12388-93.
166. Alexandroff, A.B., et al., *BCG immunotherapy of bladder cancer: 20 years on*. *Lancet*, 1999. **353**(9165): p. 1689-94.
167. Duda, R.B., et al., *Recombinant BCG therapy suppresses melanoma tumor growth*. *Ann Surg Oncol*, 1995. **2**(6): p. 542-9.
168. Brunner, C., et al., Enhanced dendritic cell maturation by TNF-alpha or cytidine-phosphate-guanosine DNA drives T cell activation in vitro and therapeutic anti-tumor immune responses in vivo. *J Immunol*, 2000. **165**(11): p. 6278-86.
169. Jeannin, P., et al., OmpA targets dendritic cells, induces their maturation and delivers antigen into the MHC class I presentation pathway. *Nat Immunol*, 2000. **1**(6): p. 502-9.
170. Jakob, T., et al., Activation of cutaneous dendritic cells by CpG-containing oligodeoxynucleotides: a role for dendritic cells in the augmentation of Th1 responses by immunostimulatory DNA. *J Immunol*, 1998. **161**(6): p. 3042-9.
171. Martin-Orozco, E., et al., Enhancement of antigen-presenting cell surface molecules involved in cognate interactions by immunostimulatory DNA sequences. *Int Immunol*, 1999. **11**(7): p. 1111-8.
172. Tsuji, S., et al., Maturation of human dendritic cells by cell wall skeleton of *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette-Guerin: involvement of toll-like receptors. *Infect Immun*, 2000. **68**(12): p. 6883-90.

173. Goldmann, O., M. Rohde, and E. Medina, Phagocytosis of bacille Calmette-Guerin-infected necrotic macrophages induces a maturation phenotype and evokes antigen-presentation functions in dendritic cells. *Immunology*, 2002. **107**(4): p. 500-6.
174. Basu, S., et al., Necrotic but not apoptotic cell death releases heat shock proteins, which deliver a partial maturation signal to dendritic cells and activate the NF-kappa B pathway. *Int Immunol*, 2000. **12**(11): p. 1539-46.
175. Colaco, C.A., Towards a unified theory of immunity: dendritic cells, stress proteins and antigen capture. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)*, 1998. **44**(6): p. 883-90.
176. Hoos, A. and D.L. Levey, Vaccination with heat shock protein-peptide complexes: from basic science to clinical applications. *Expert Rev Vaccines*, 2003. **2**(3): p. 369-79.
177. Heath, W.R. and F.R. Carbone, *Cytotoxic T lymphocyte activation by cross-priming*. *Curr Opin Immunol*, 1999. **11**(3): p. 314-8.
178. Nestle, F.O., et al., Vaccination of melanoma patients with peptide- or tumor lysate-pulsed dendritic cells. *Nat Med*, 1998. **4**(3): p. 328-32.
179. Sauter, B., et al., Consequences of cell death: exposure to necrotic tumor cells, but not primary tissue cells or apoptotic cells, induces the maturation of immunostimulatory dendritic cells. *J Exp Med*, 2000. **191**(3): p. 423-34.
180. Uono, H. and P.K. Srivastava, Heat shock protein 70-associated peptides elicit specific cancer immunity. *J Exp Med*, 1993. **178**(4): p. 1391-6.
181. Schild, H., et al., *Stress proteins and immunity mediated by cytotoxic T lymphocytes*. *Curr Opin Immunol*, 1999. **11**(1): p. 109-13.
182. Arnold, D., et al., Cross-priming of minor histocompatibility antigen-specific cytotoxic T cells upon immunization with the heat shock protein gp96. *J Exp Med*, 1995. **182**(3): p. 885-9.
183. Singh-Jasuja, H., et al., Cross-presentation of glycoprotein 96-associated antigens on major histocompatibility complex class I molecules requires receptor-mediated endocytosis. *J Exp Med*, 2000. **191**(11): p. 1965-74.
184. Maurer, T., et al., CpG-DNA aided cross-presentation of soluble antigens by dendritic cells. *Eur J Immunol*, 2002. **32**(8): p. 2356-64.
185. Robinson, A. and J. Melling, *Envelope structure and the development of new vaccines*. *J Appl Bacteriol*, 1993. **74** **Suppl**: p. 43S-51S.
186. Sierra, G.V., et al., Vaccine against group B *Neisseria meningitidis*: protection trial and mass vaccination results in Cuba. *NIPH Ann*, 1991. **14**(2): p. 195-207; discussion 208-10.
187. Bjune, G., et al., Effect of outer membrane vesicle vaccine against group B meningococcal disease in Norway. *Lancet*, 1991. **338**(8775): p. 1093-6.
188. Kinane, D.F., et al., *Phagocyte recognition of Neisseria gonorrhoeae*. *J Clin Lab Immunol*, 1982. **9**(3): p. 169-72.
189. Ambrosino, D.M., et al., Effect of *Haemophilus influenzae* polysaccharide outer membrane protein complex conjugate vaccine on macrophages. *J Immunol*, 1992. **149**(12): p. 3978-83.
190. Lowell, G.H., et al., Peptides bound to proteosomes via hydrophobic feet become highly immunogenic without adjuvants. *J Exp Med*, 1988. **167**(2): p. 658-63.
191. Livingston, P.O., et al., GD3/proteosome vaccines induce consistent IgM antibodies against the ganglioside GD3. *Vaccine*, 1993. **11**(12): p. 1199-204.
192. Steeghs, L., et al., Immunogenicity of outer membrane proteins in a lipopolysaccharide-deficient mutant of *Neisseria meningitidis*: influence of adjuvants on the immune response. *Infect Immun*, 1999. **67**(10): p. 4988-93.
193. Especificación para productos finales. Preparado vacunal NAcGM3/VSSP. ESP-4033, CIM: C. Habana.
194. Guthmann, M.D., et al., Active specific immunotherapy of melanoma with a GM3 ganglioside-based vaccine: a report on safety and immunogenicity. *J Immunother*, 2004. **27**(6): p. 442-51.
195. Carr, A., et al., A purified GM3 ganglioside conjugated vaccine induces specific, adjuvant-dependent and non-transient antitumour activity against B16 mouse melanoma in vitro and in vivo. *Melanoma Res*, 2001. **11**(3): p. 219-27.
196. O'Garra, A. and P. Vieira, *Regulatory T cells and mechanisms of immune system control*. *Nat Med*, 2004. **10**(8): p. 801-5.
197. Kusmartsev, S. and D.I. Gabrilovich, *Immature myeloid cells and cancer-associated immune suppression*. *Cancer Immunol Immunother*, 2002. **51**(6): p. 293-8.

198. Dong, R., et al., Dendritic cells from CML patients have altered actin organization, reduced antigen processing, and impaired migration. *Blood*, 2003. **101**(9): p. 3560-7.
199. Hoffmann, T.K., et al., Alterations in the frequency of dendritic cell subsets in the peripheral circulation of patients with squamous cell carcinomas of the head and neck. *Clin Cancer Res*, 2002. **8**(6): p. 1787-93.
200. Cerundolo, V., I.F. Hermans, and M. Salio, *Dendritic cells: a journey from laboratory to clinic*. *Nat Immunol*, 2004. **5**(1): p. 7-10.
201. Gabrilovich, D.I., et al., Production of vascular endothelial growth factor by human tumors inhibits the functional maturation of dendritic cells. *Nat Med*, 1996. **2**(10): p. 1096-103.
202. Saito, H., et al., Relationship between the expression of vascular endothelial growth factor and the density of dendritic cells in gastric adenocarcinoma tissue. *Br J Cancer*, 1998. **78**(12): p. 1573-7.
203. Menetrier-Caux, C., et al., Inhibition of the differentiation of dendritic cells from CD34(+) progenitors by tumor cells: role of interleukin-6 and macrophage colony-stimulating factor. *Blood*, 1998. **92**(12): p. 4778-91.
204. Norbury, C.C., et al., Class I MHC presentation of exogenous soluble antigen via macropinocytosis in bone marrow macrophages. *Immunity*, 1995. **3**(6): p. 783-91.
205. Yang, A.S. and E.C. Lattime, Tumor-induced interleukin 10 suppresses the ability of splenic dendritic cells to stimulate CD4 and CD8 T-cell responses. *Cancer Res*, 2003. **63**(9): p. 2150-7.
206. Brown, R.D., et al., Dendritic cells from patients with myeloma are numerically normal but functionally defective as they fail to up-regulate CD80 (B7-1) expression after huCD40LT stimulation because of inhibition by transforming growth factor-beta1 and interleukin-10. *Blood*, 2001. **98**(10): p. 2992-8.
207. Sharma, S., et al., T cell-derived IL-10 promotes lung cancer growth by suppressing both T cell and APC function. *J Immunol*, 1999. **163**(9): p. 5020-8.
208. Fayad, L., et al., Interleukin-6 and interleukin-10 levels in chronic lymphocytic leukemia: correlation with phenotypic characteristics and outcome. *Blood*, 2001. **97**(1): p. 256-63.
209. Crowley, M., K. Inaba, and R.M. Steinman, Dendritic cells are the principal cells in mouse spleen bearing immunogenic fragments of foreign proteins. *J Exp Med*, 1990. **172**(1): p. 383-6.
210. Inaba, K., et al., Efficient presentation of phagocytosed cellular fragments on the major histocompatibility complex class II products of dendritic cells. *J Exp Med*, 1998. **188**(11): p. 2163-73.
211. Tsuchiya, Y., et al., Production of colony-stimulating factor by tumor cells and the factor-mediated induction of suppressor cells. *J Immunol*, 1988. **141**(2): p. 699-708.
212. Oghiso, Y., et al., Differential induction of prostaglandin E2-dependent and -independent immune suppressor cells by tumor-derived GM-CSF and M-CSF. *J Leukoc Biol*, 1993. **53**(1): p. 86-92.
213. Gabrilovich, D.I., et al., Mechanism of immune dysfunction in cancer mediated by immature Gr-1+ myeloid cells. *J Immunol*, 2001. **166**(9): p. 5398-406.
214. Toi, M., et al., Clinical significance of the determination of angiogenic factors. *Eur J Cancer*, 1996. **32A**(14): p. 2513-9.
215. Ferrara, N. and T. Davis-Smyth, *The biology of vascular endothelial growth factor*. *Endocr Rev*, 1997. **18**(1): p. 4-25.
216. Davis, T.A., et al., Anti-idiotypic antibodies can induce long-term complete remissions in non-Hodgkin's lymphoma without eradicating the malignant clone. *Blood*, 1998. **92**(4): p. 1184-90.
217. Garcia-Lora, A., I. Algarra, and F. Garrido, *MHC class I antigens, immune surveillance, and tumor immune escape*. *J Cell Physiol*, 2003. **195**(3): p. 346-55.
218. Ribas, A., et al., Current developments in cancer vaccines and cellular immunotherapy. *J Clin Oncol*, 2003. **21**(12): p. 2415-32.
219. Kageshita, T., et al., Down-regulation of HLA class I antigen-processing molecules in malignant melanoma: association with disease progression. *Am J Pathol*, 1999. **154**(3): p. 745-54.
220. Bacso, Z., et al., INF-gamma rearranges membrane topography of MHC-I and ICAM-1 in colon carcinoma cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 2002. **290**(2): p. 635-40.
221. Carnaud, C., et al., Cutting edge: Cross-talk between cells of the innate immune system: NKT cells rapidly activate NK cells. *J Immunol*, 1999. **163**(9): p. 4647-50.
222. Steinbrink, K., et al., Interleukin-10-treated human dendritic cells induce a melanoma-antigen-specific anergy in CD8(+) T cells resulting in a failure to lyse tumor cells. *Blood*, 1999. **93**(5): p. 1634-42.

223. Steinbrink, K., et al., CD4(+) and CD8(+) anergic T cells induced by interleukin-10-treated human dendritic cells display antigen-specific suppressor activity. *Blood*, 2002. **99**(7): p. 2468-76.
224. Restifo, N.P., Not so Fas: Re-evaluating the mechanisms of immune privilege and tumor escape. *Nat Med*, 2000. **6**(5): p. 493-5.
225. Onizuka, S., et al., Tumor rejection by in vivo administration of anti-CD25 (interleukin-2 receptor alpha) monoclonal antibody. *Cancer Res*, 1999. **59**(13): p. 3128-33.
226. Shimizu, J., S. Yamazaki, and S. Sakaguchi, Induction of tumor immunity by removing CD25+CD4+ T cells: a common basis between tumor immunity and autoimmunity. *J Immunol*, 1999. **163**(10): p. 5211-8.
227. Gallimore, A. and S. Sakaguchi, *Regulation of tumour immunity by CD25+ T cells*. *Immunology*, 2002. **107**(1): p. 5-9.
228. Jonuleit, H., 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*, 2000. **192**(9): p. 1213-22.
229. Lu, P. and F.J. Sharom, *Immunosuppression by YAC-1 lymphoma: role of shed gangliosides*. *Cell Immunol*, 1996. **173**(1): p. 22-32.
230. Chang, F., R. Li, and S. Ladisch, *Shedding of gangliosides by human medulloblastoma cells*. *Exp Cell Res*, 1997. **234**(2): p. 341-6.
231. Ladisch, S., H. Becker, and L. Ulsh, Immunosuppression by human gangliosides: I. Relationship of carbohydrate structure to the inhibition of T cell responses. *Biochim Biophys Acta*, 1992. **1125**(2): p. 180-8.
232. Hachida, M., R. Irie, and D.L. Morton, *Significant immunosuppressive effect of ganglioside GM3 in organ transplantation*. *Transplant Proc*, 1990. **22**(4): p. 1663-5.
233. Sekiguchi, Y., et al., Brain-derived gangliosides suppress the chronic relapsing-remitting experimental autoimmune encephalomyelitis in NOD mice induced with myelin oligodendrocyte glycoprotein peptide. *J Neuroimmunol*, 2001. **116**(2): p. 196-205.
234. Irani, D.N., K.I. Lin, and D.E. Griffin, Brain-derived gangliosides regulate the cytokine production and proliferation of activated T cells. *J Immunol*, 1996. **157**(10): p. 4333-40.
235. Kanda, N., Gangliosides GD1a and GM3 induce interleukin-10 production by human T cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 1999. **256**(1): p. 41-4.
236. Birkle, S., et al., *Role of tumor-associated gangliosides in cancer progression*. *Biochimie*, 2003. **85**(3-4): p. 455-63.
237. Zumbansen, M. and W. Stoffel, Tumor necrosis factor alpha activates NF-kappaB in acid sphingomyelinase-deficient mouse embryonic fibroblasts. *J Biol Chem*, 1997. **272**(16): p. 10904-9.
238. Blackwell, T.S. and J.W. Christman, *The role of nuclear factor-kappa B in cytokine gene regulation*. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 1997. **17**(1): p. 3-9.
239. Bohuslav, J., et al., Regulation of an essential innate immune response by the p50 subunit of NF-kappaB. *J Clin Invest*, 1998. **102**(9): p. 1645-52.
240. Neurath, M.F., C. Becker, and K. Barbulescu, *Role of NF-kappaB in immune and inflammatory responses in the gut*. *Gut*, 1998. **43**(6): p. 856-60.
241. Shurin, G.V., et al., Neuroblastoma-derived gangliosides inhibit dendritic cell generation and function. *Cancer Res*, 2001. **61**(1): p. 363-9.
242. Peguet-Navarro, J., et al., Gangliosides from human melanoma tumors impair dendritic cell differentiation from monocytes and induce their apoptosis. *J Immunol*, 2003. **170**(7): p. 3488-94.
243. Ziegler-Heitbrock, H.W., et al., *Gangliosides suppress tumor necrosis factor production in human monocytes*. *J Immunol*, 1992. **148**(6): p. 1753-8.
244. Ariga, T., et al., Gangliosides inhibit the release of interleukin-1beta in amyloid beta-protein-treated human monocytic cells. *J Mol Neurosci*, 2001. **17**(3): p. 371-7.
245. Heitger, A. and S. Ladisch, *Gangliosides block antigen presentation by human monocytes*. *Biochim Biophys Acta*, 1996. **1303**(2): p. 161-8.
246. Bharti, A.C. and S.M. Singh, Inhibition of macrophage nitric oxide production by gangliosides derived from a spontaneous T cell lymphoma: the involved mechanisms. *Nitric Oxide*, 2003. **8**(1): p. 75-82.
247. Griswold, D.P. and T.H. Corbett, *A colon tumor model for anticancer agent evaluation*. *Cancer*, 1975. **36**(6 Suppl): p. 2441-4.



248. Alonso, D.F., et al., Characterization of F3II, a sarcomatoid mammary carcinoma cell line originated from a clonal subpopulation of a mouse adenocarcinoma. *J Surg Oncol*, 1996. **62**(4): p. 288-97.
249. Sanderson, S. and N. Shastri, *LacZ inducible, antigen/MHC-specific T cell hybrids*. *Int Immunol*, 1994. **6**(3): p. 369-76.
250. Campa, C., Sierra, G.V., Gutierrez, M.M., Garcia, L., Puentes, G.C., Sampedro, M.C., Sotolongo, F., Le Riverend, E.X. and Galguera, M.A., *Vaccine against group B Neisseria meningitidis, gammaglobulin and transfer factor*, in *European patent 0 301 992. US patent US5597572*. 1988: Cuba.
251. Folch, J., S. Arsove, and J.A. Meath, *Isolation of brain strandin, a new type of large molecule tissue component*. *J Biol Chem*, 1951. **191**(2): p. 819-31.
252. Powley, T.L., et al., Different effects of vagotomy and atropine on hypothalamic stimulation-induced feeding. *Behav Biol*, 1978. **23**(3): p. 306-25.
253. Svennerholm, L., Quantitative estimation of sialic acids. II. A colorimetric resorcinol-hydrochloric acid method. *Biochim Biophys Acta*, 1957. **24**(3): p. 604-11.
254. Palucka, K.A., et al., Dendritic cells as the terminal stage of monocyte differentiation. *J Immunol*, 1998. **160**(9): p. 4587-95.
255. Inaba, K., et al., Generation of large numbers of dendritic cells from mouse bone marrow cultures supplemented with granulocyte/macrophage colony-stimulating factor. *J Exp Med*, 1992. **176**(6): p. 1693-702.
256. Murphy, K.M., A.B. Heimberger, and D.Y. Loh, *Induction by antigen of intrathymic apoptosis of CD4+CD8+TCRlo thymocytes in vivo*. *Science*, 1990. **250**(4988): p. 1720-3.
257. Durand, V., et al., Shaping of adaptive immune responses to soluble proteins by TLR agonists: a role for IFN-alpha/beta. *Immunol Cell Biol*, 2004. **82**(6): p. 596-602.
258. Sigarroa, A., *Manual de práctica de biometría y diseño experimental.*, ed. E.P.y. Educación. 1987, C. Habana. 154.
259. Cella, M., et al., Inflammatory stimuli induce accumulation of MHC class II complexes on dendritic cells. *Nature*, 1997. **388**(6644): p. 782-7.
260. Leeson, M.C. and D.C. Morrison, Induction of proinflammatory responses in human monocytes by particulate and soluble forms of lipopolysaccharide. *Shock*, 1994. **2**(4): p. 235-45.
261. Sundaram, R., N.K. Dakappagari, and P.T. Kaumaya, *Synthetic peptides as cancer vaccines*. *Biopolymers*, 2002. **66**(3): p. 200-16.
262. Kovacsovics-Bankowski, M., et al., Efficient major histocompatibility complex class I presentation of exogenous antigen upon phagocytosis by macrophages. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1993. **90**(11): p. 4942-6.
263. Verdijk, R.M., et al., Polyriboinosinic polyribocytidylic acid (poly(I:C)) induces stable maturation of functionally active human dendritic cells. *J Immunol*, 1999. **163**(1): p. 57-61.
264. Fujimoto, C., et al., Polyriboinosinic polyribocytidylic acid [poly(I:C)]/TLR3 signaling allows class I processing of exogenous protein and induction of HIV-specific CD8+ cytotoxic T lymphocytes. *Int Immunol*, 2004. **16**(1): p. 55-63.
265. Ibe, S., et al., Tumor rejection by disturbing tumor stroma cell interactions. *J Exp Med*, 2001. **194**(11): p. 1549-59.
266. Wang, X.Y., et al., Hsp110 over-expression increases the immunogenicity of the murine CT26 colon tumor. *Cancer Immunol Immunother*, 2002. **51**(6): p. 311-9.
267. Hewitt, A.L. and K.W. Singletary, Soy extract inhibits mammary adenocarcinoma growth in a syngeneic mouse model. *Cancer Lett*, 2003. **192**(2): p. 133-43.
268. Jackson, S.J. and K.W. Singletary, Sulforaphane: a naturally occurring mammary carcinoma mitotic inhibitor, which disrupts tubulin polymerization. *Carcinogenesis*, 2004. **25**(2): p. 219-27.
269. Heckelsmiller, K., et al., Peritumoral CpG DNA elicits a coordinated response of CD8 T cells and innate effectors to cure established tumors in a murine colon carcinoma model. *J Immunol*, 2002. **169**(7): p. 3892-9.
270. Helling, F. and P.O. Livingston, *Ganglioside conjugate vaccines. Immunotherapy against tumors of neuroectodermal origin*. *Mol Chem Neuropathol*, 1994. **21**(2-3): p. 299-309.
271. Helling, F., et al., GD3 vaccines for melanoma: superior immunogenicity of keyhole limpet hemocyanin conjugate vaccines. *Cancer Res*, 1994. **54**(1): p. 197-203.
272. Irie, R.F., et al., Phase I pilot clinical trial of human IgM monoclonal antibody to ganglioside GM3 in patients with metastatic melanoma. *Cancer Immunol Immunother*, 2004. **53**(2): p. 110-7.

273. Ravindranath, M.H., et al., Ratio of IgG:IgM antibodies to sialyl Lewis(x) and GM3 correlates with tumor growth after immunization with melanoma-cell vaccine with different adjuvants in mice. *Int J Cancer*, 1998. **75**(1): p. 117-24.
274. Sorice, M., et al., Monosialoganglioside GM3 induces CD4 internalization in human peripheral blood T lymphocytes. *Scand J Immunol*, 1995. **41**(2): p. 148-56.
275. Wolf, M., et al., Gangliosides inhibit the development from monocytes to dendritic cells. *Clin Exp Immunol*, 2002. **130**(3): p. 441-8.
276. Sallusto, F., et al., Distinct patterns and kinetics of chemokine production regulate dendritic cell function. *Eur J Immunol*, 1999. **29**(5): p. 1617-25.
277. Kadl, A., et al., Analysis of inflammatory gene induction by oxidized phospholipids in vivo by quantitative real-time RT-PCR in comparison with effects of LPS. *Vascul Pharmacol*, 2002. **38**(4): p. 219-27.
278. Roake, J.A., et al., Dendritic cell loss from nonlymphoid tissues after systemic administration of lipopolysaccharide, tumor necrosis factor, and interleukin 1. *J Exp Med*, 1995. **181**(6): p. 2237-47.
279. Braun, J.M., et al., Proinflammatory responses to lipo-oligosaccharide of *Neisseria meningitidis* immunotype strains in relation to virulence and disease. *J Infect Dis*, 2002. **185**(10): p. 1431-8.
280. Heumann, D., et al., Contribution of TNF/TNF receptor and of Fas ligand to toxicity in murine models of endotoxemia and bacterial peritonitis. *J Inflamm*, 1995. **47**(4): p. 173-9.
281. Massari, P., et al., *The role of porins in neisserial pathogenesis and immunity*. *Trends Microbiol*, 2003. **11**(2): p. 87-93.
282. Luksch, C.R., et al., Intercellular adhesion molecule-1 inhibits interleukin 4 production by naive T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1999. **96**(6): p. 3023-8.
283. Trinchieri, G., Interleukin-12: a proinflammatory cytokine with immunoregulatory functions that bridge innate resistance and antigen-specific adaptive immunity. *Annu Rev Immunol*, 1995. **13**: p. 251-76.
284. Ausiello, C.M., et al., Cell-mediated immunity and antibody responses to *Bordetella pertussis* antigens in children with a history of pertussis infection and in recipients of an acellular pertussis vaccine. *J Infect Dis*, 2000. **181**(6): p. 1989-95.
285. de Jong, E.C., et al., Microbial compounds selectively induce Th1 cell-promoting or Th2 cell-promoting dendritic cells in vitro with diverse th cell-polarizing signals. *J Immunol*, 2002. **168**(4): p. 1704-9.
286. Williams, M.E., et al., Leukocytes of patients with *Schistosoma mansoni* respond with a Th2 pattern of cytokine production to mitogen or egg antigens but with a Th0 pattern to worm antigens. *J Infect Dis*, 1994. **170**(4): p. 946-54.
287. Xu-Amano, J., et al., Helper T cell subsets for immunoglobulin A responses: oral immunization with tetanus toxoid and cholera toxin as adjuvant selectively induces Th2 cells in mucosa associated tissues. *J Exp Med*, 1993. **178**(4): p. 1309-20.
288. Tanaka, F., et al., Rapid generation of potent and tumor-specific cytotoxic T lymphocytes by interleukin 18 using dendritic cells and natural killer cells. *Cancer Res*, 2000. **60**(17): p. 4838-44.
289. [http://www.cancer.gov/search/clinical\\_trials/](http://www.cancer.gov/search/clinical_trials/). 2002, National Cancer Institute: National Cancer Institute's Physician Data Query.
290. York, I.A. and K.L. Rock, Antigen processing and presentation by the class I major histocompatibility complex. *Annu Rev Immunol*, 1996. **14**: p. 369-96.
291. Lienard, D., et al., Ex vivo detectable activation of Melan-A-specific T cells correlating with inflammatory skin reactions in melanoma patients vaccinated with peptides in IFA. *Cancer Immun*, 2004. **4**: p. 4.
292. Haicheur, N., et al., The B subunit of Shiga toxin coupled to full-size antigenic protein elicits humoral and cell-mediated immune responses associated with a Th1-dominant polarization. *Int Immunol*, 2003. **15**(10): p. 1161-71.
293. Miconnet, I., et al., CpG are efficient adjuvants for specific CTL induction against tumor antigen-derived peptide. *J Immunol*, 2002. **168**(3): p. 1212-8.
294. Hanna, N. and K. Hariharan, Development and application of PROVAX adjuvant formulation for subunit cancer vaccines. *Adv Drug Deliv Rev*, 1998. **32**(3): p. 187-197.
295. Morrow, W.J., Y.W. Yang, and N.A. Sheikh, *Immunobiology of the Tomatine adjuvant*. *Vaccine*, 2004. **22**(19): p. 2380-4.
296. Sparwasser, T., et al., Bacterial CpG-DNA activates dendritic cells in vivo: T helper cell-independent cytotoxic T

- cell responses to soluble proteins. *Eur J Immunol*, 2000. **30**(12): p. 3591-7.
297. Moroi, Y., et al., Induction of cellular immunity by immunization with novel hybrid peptides complexed to heat shock protein 70. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2000. **97**(7): p. 3485-90.
298. Kelleher, M. and P.C. Beverley, Lipopolysaccharide modulation of dendritic cells is insufficient to mature dendritic cells to generate CTLs from naive polyclonal CD8+ T cells in vitro, whereas CD40 ligation is essential. *J Immunol*, 2001. **167**(11): p. 6247-55.
299. Yewdell, J.W., C.C. Norbury, and J.R. Bennink, Mechanisms of exogenous antigen presentation by MHC class I molecules in vitro and in vivo: implications for generating CD8+ T cell responses to infectious agents, tumors, transplants, and vaccines. *Adv Immunol*, 1999. **73**: p. 1-77.
300. Vazquez, A.M., et al., Antitumor properties of an anti-idiotypic monoclonal antibody in relation to N-glycolyl-containing gangliosides. *Oncol Rep*, 2000. **7**(4): p. 751-6.