

Ácido hialurónico bajo peso molecular en un esquema de vacunación con células dendríticas

Tesis presentada por Manglio Miguel Rizzo para optar al grado de Doctor
en Ciencias Biomédicas por la Universidad Austral

Director de tesis: Prof. Dr. Guillermo D. Mazzolini

Co-Directora de tesis: Prof. Dra. Laura Alaniz

Pilar, Argentina, marzo de 2015

AGRADECIMIENTOS

Guillermo

Laura

Mariana

Mariana

Juan

Flavia

Esteban

Estanislao

.....

RESUMEN

El cáncer de colon es el segundo tumor más frecuente y la tercera causa de muerte por cáncer en el mundo. La única opción curativa es la cirugía en pacientes con estadio I y II de la enfermedad. Sin embargo, un 40% de los pacientes se diagnostican en estadio III y un 20% se presenta con enfermedad metastásica al momento del diagnóstico. Es necesario, por tanto, encontrar nuevas alternativas terapéuticas en pacientes con enfermedad avanzada. En este contexto, la inmunoterapia se presenta como una alternativa prometedora. Si bien se considera al cáncer de colon como una enfermedad pobremente inmunogénica, se ha demostrado que la presencia de infiltrado inflamatorio linfocitario en el tumor se correlaciona con mayor supervivencia lo cual hace pensar que la inmunoterapia con células dendríticas (CD) pulsadas con antígeno tumoral puede ser una herramienta terapéutica especialmente atractiva debido a su capacidad de inducir una respuesta inmunitaria específica contra dichos antígenos. Existen múltiples esquemas de preparación y administración de CD, y la gran mayoría de ellas se encuentra aún en estudio.

Ácido hialurónico (AH) es un glicosaminoglicano lineal componente de la matriz extracelular (MEC) y que está presente en diversos tejidos, especialmente en aquellos con células con alta tasa de replicación. La función de AH no es del todo conocida, depende de su peso molecular y de su ubicación respecto a las células. Se reconoce su importancia en relación al cáncer y a procesos inflamatorios. Los fragmentos de AH o especies de bajo peso molecular (AH BPM) son considerados moléculas con actividad pro-inflamatoria.

El *objetivo* de este trabajo de tesis fue poner a punto la técnica de generación y caracterización de CD autólogas pulsadas con extracto tumoral murino y humano, y establecer pautas que mejoren su eficiencia terapéutica como vacuna antitumoral.

Para esto estudiamos la relación entre ácido hialurónico y el comportamiento biológico de distintas líneas de células tumorales. Observamos que AH BPM posee actividad antitumoral directa, siendo capaz de disminuir la proliferación celular y de inducir la apoptosis de la célula tumoral *in vitro*. Luego, y a partir de estos resultados, analizamos los efectos de la aplicación de ácido hialurónico por vía intravenosa (i.v.) en un modelo de adenocarcinoma de colon heterotópico en ratones BALB/c. Así pudimos demostrar que AH BPM administrado en forma sistémica tiene la capacidad de inducir una potente respuesta inmunitaria antitumoral retrasando de forma significativa la velocidad del crecimiento tumoral e incrementando la supervivencia media de los ratones. Observamos además, que esplenocitos aislados de estos ratones tratados con AH BPM presentan una mayor capacidad proliferativa al ser estimulados *ex vivo* con CD pulsadas con antígeno tumoral y una mayor secreción de la citoquina inmunoestimuladora IL-12. Este fenómeno se asocia también a un incremento de las células CD11c⁺/CMH-II⁺ en el bazo y un aumento del infiltrado inflamatorio tumoral compuesto por células CD3⁺CD8⁺.

Posteriormente, evaluamos el uso de esta molécula en un protocolo de vacunación con CD pulsadas con antígeno tumoral (CD/LT) en un modelo de cáncer de colon heterotópico (subcutáneo) murino. Se evaluó su capacidad inmunoestimuladora *in vitro* en cultivos de CD

(CD/LT/AH BPM). AH BPM indujo una mayor expresión de las moléculas de coestímulo CD86 y CMH-II, un incremento en la secreción de IL-12, una menor producción de IL-10, y una mayor capacidad de estimulación de la proliferación linfocitaria en un ensayo de cultivo mixto linfocitario (CML). También evidenciamos en CD/LT/AH BPM una mayor capacidad migratoria hacia sobrenadante proveniente de esplenocitos de ratones portadores de tumor y hacia la quimiocina CCL21, a expensas de una mayor expresión de CCR7. A pesar de que TNF- α tuvo un efecto similar en cuanto a la maduración de las CD, CD/LT/AH BPM presentó mayor capacidad de migrar *in vitro* hacia CCL19 y CCL21 de manera independiente de CD44 o TLR4. Este efecto fue superior al generado por otras moléculas comúnmente utilizadas en protocolos de activación de CD como son polyI:C, LPS y TNF- α ; este efecto estuvo parcialmente asociado a un aumento en la expresión de CCR7. Más importante aún fue observar en un modelo de cáncer de colon heterotópico murino que AH BPM incrementó de manera significativa la migración *in vivo* de CD/TL hacia el ganglio linfático regional.

Luego estudiamos los efectos de AH BPM sobre CD/LT generadas a partir de células mononucleares de sangre periférica provenientes de donantes sanos (DS) y de pacientes con cáncer de colon. Pudimos evidenciar que el pre-tratamiento de CD/LT humanas con AH BPM induce su maduración e incrementa su capacidad de estimular la proliferación linfocitaria. Además, es capaz de aumentar su migración *in vitro* hacia sobrenadante de ganglio linfático y CCL21, lo que se asoció a un aumento de la síntesis del ARNm de CCR7. Por otra parte, incrementa la síntesis del ARNm de IL-8, disminuye su migración hacia esta citoquina y hacia el sobrenadante generado con células tumorales. De manera importante, AH BPM indujo la actividad de la metaloproteasa 2, mecanismo asociado a la migración de CD a través del espacio intersticial. En consonancia con estos resultados observamos en un modelo de cáncer de colon humano implantado de forma sc en ratones nude que las CD/LT/AH BPM migraron en mayor proporción hacia el ganglio linfático regional, y en menor cuantía hacia el tumor.

Finalmente, demostramos que la vacunación con CD/LT pre tratadas con AH BPM, en el modelo de cáncer de colon murino, generó una potente respuesta inmunitaria antitumoral comparado con CD/LT sin pre tratar o tratadas con TNF- α , disminuyendo la velocidad de crecimiento tumoral y prolongando la supervivencia de los animales. Este resultado se asoció a una mayor capacidad proliferativa de esplenocitos provenientes de animales tratados con CD/TL/AH BPM con un perfil tipo Th1 (mayor producción de INF- γ y menor secreción de IL-10), y la inducción de una respuesta inmunitaria citotóxica específica más potente que la obtenida con CD/LT sin tratar.

Parte de los resultados del presente trabajo fueron publicados y presentados en las siguientes revistas y congresos:

Low molecular weight hyaluronan inhibits colorectal carcinoma growth by decreasing tumor cell proliferation and stimulating immune response.

Laura Alaniz, **Miguel Rizzo**, Mariana Malvicini, Jorge Jaunarena, Diego Avella, Catalina Atorrasagasti, Jorge B. Aquino, Mariana Garcia, Pablo Matar, Marcelo Silva, Guillermo Mazzolini. *Cancer Letters* 2009, 278: 9–16

Low molecular weight hyaluronan preconditioning of tumor-pulsed dendritic cells increases their migratory ability and induces immunity against murine colorectal carcinoma.

Laura Alaniz, **Manglio Rizzo**, Mariana G. Garcia, Flavia Piccioni, Jorge B. Aquino, Mariana Malvicini, Catalina Atorrasagasti, Juan Bayo, Itziar Echeverria, Pablo Sarobe, Guillermo Mazzolini. *Cancer Immunol Immunother* 2011, 60:1383–1395.

Low Molecular Weight Hyaluronan-Pulsed Human Dendritic Cells Showed Increased Migration Capacity and Induced Resistance to Tumor Chemoattraction.

Manglio Rizzo, Juan Bayo, Flavia Piccioni, Mariana Malvicini, Esteban Fiore, Estanislao Peixoto, Mariana G. García, Jorge B. Aquino, Ariel Gonzalez Campaña, Gustavo Podestá, Marcelo Terrés, Oscar Andriani, Laura Alaniz, Guillermo Mazzolini. *PlosOne*, 2014, 9, 9.

Ex vivo loading of autologous dendritic cells with tumor antigens.

Rizzo MM, Alaniz L, Mazzolini G. *Methods Mol Biol.* 2014;1139:41-4.

Altered hyaluronan biosynthesis and cancer progression: an immunological perspective.

Alaniz L, Garcia M, **Rizzo M**, Piccioni F, Mazzolini G. *Mini Rev Med Chem.* 2009 Nov 1;9(13):1538-46. Revisión.

Conditioning of dendritic cells with hyaluronic acid increases their migratory capacity.

Rizzo, M; Piccioni F; Bayo J; Fiore E; Malvicini M; Lloyd R; García M; Atorrasagasti C; Andriani O; Gonzalez Campaña A; Podestá G; Terres M; Alaniz L; Mazzolini G. *Hyaluronan 2013 meeting. Oklahoma, USA. Junio 2013.* Presentación oral

El acondicionamiento de células dendríticas con ácido hialurónico aumenta su capacidad de migración”.

Rizzo, M, Piccioni, F., Malvicini, M., Lloyd, R., García, M., Atorrasagasti, C., Bayo, J., Fiore, E., Alaniz, L., Andriani, O., Terrez, M., Mazzollini, G. *Poster en LVII Reunión Anual de la Sociedad Argentina de Investigación Clínica, Mar del Plata, Buenos aires, Argentina. Noviembre 2012.*

Low molecular weight hyaluronan-preconditioning of tumor-pulsed dendritic cells increases their migratory ability and induces immunity against murine colorectal carcinoma.

Rizzo M, Garcia MG, Piccioni F, Rodriguez A, Malvicini M, Kippes N, Atorrasagasti C, Aquino J, Alaniz L, Mazzolini G. *1° Congreso francés-argentino de Inmunología. Buenos Aires, Argentina. Noviembre. 2010. Libro de Resúmenes, pág. 106.* Presentación oral.

Efectos antitumorales del ácido hialurónico de bajo peso molecular en un modelo murino de cáncer de colon.

Miguel Rizzo, Mariana Malvicini, Jorge Jaunarena, Diego Abella, Catalina Atorrasagasti, Jorge B. Aquino, Mariana Garcia, Pablo Matar, Laura Alaniz, Guillermo Mazzolini. *LVI reunión científica de la sociedad argentina de inmunología conjuntamente con la XI jornada científica del grupo rioplatense de citometría de flujo. La Falda, Cordoba. Argentina 2008.*

ABREVIATURAS EMPLEADAS

µm:	micrómetro
ADN:	ácido desóxorribonucleico
Ag:	antígeno
AGlc:	ácido glucurónico
AH APM:	ácido hialurónico de alto peso molecular
AH BPM:	ácido hialurónico de bajo peso molecular
AH:	ácido hialurónico
AJCC:	American Joint Committee on Cancer
ARNm:	ácido ribonucleico mensajero
BSA:	albúmina bovina
cADN:	copia de ácido desoxirribonucleico.
CCR:	carcinoma colorectal
CD:	células dendríticas
CD44st:	CD44 estándar
CDwt:	células dendríticas wild type
CMH:	complejo mayor de histocompatibilidad
CML:	cultivo mixto linfocitario
CMSP:	células mononucleares de sangre periférica
CPA:	célula presentadora de antígeno
cpm:	cuentas por minuto
CTLA-4:	antígeno citotóxico 4 del linfocito T
Da:	Dalton
DAB:	diamino bencidina
DAG:	diacilglicerol
DAPI:	4',6-diamidino-2-phenylindolehydrochloride
DMSO:	dimetil sulfóxido

DS:	donante sano
EBV:	Epstein-Bar virus
EES:	error estándar de la media
EGF:	factor de crecimiento epitelial
EGFR:	receptor del factor de crecimiento epidérmico
ELISA:	ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas
FAT:	fibroblastos asociados al tumor
FDA:	food and drug administration
FITC:	isotiocianato de fluoresceína
GAG:	glicosaminoglicanos
G-CSF:	factor estimulante de colonias de granulocitos
GL:	ganglio linfático
GM-CSF:	factor estimulador de colonias de granulocitos y macrófagos
HAS:	hialurónico sintetasa
HBV:	virus de la hepatitis B
HCV:	virus de la hepatitis C
HGF:	factor de crecimiento hepatocitario
HLA:	antígeno leucocitario humano
HPV:	papilomavirus
Hs:	horas
Hyal:	hialuronidasa
i.p.:	intraperitoneal
i.v.:	intravenosa
IL:	interleuquina
IMF:	intensidad media de fluorescencia
INF:	interferón
IP:	ioduro de propidio

IP-10:	proteína 10 inducida por interferón gamma
ISGs:	genes estimulados por interferón
IVIS:	sistema de imágenes In Vivo Xenogen:
KDa:	kilodalton
LB:	linfocitos B
LPS:	lipopolisacáridos
LSP:	linfocitos de sangre periférica
LT:	linfocitos T
LTc:	linfocito T citotóxico
LTh:	linfocito T helper
LTreg:	linfocito T regulador
M:	molar
MAT:	macrófagos asociados al tumor
MCGL:	medio condicionado derivado de ganglio linfático
MCP-1:	proteína quimioattractante de monocitos
M-CSF:	factor estimulante de colonias de monocitos
MCT:	medio condicionado derivado de tumor
MDSC:	células supresoras de origen mieloide
MEC:	matriz extracelular
MIP- α :	proteína inflamatoria macrofágica α
MMP:	metaloproteinasas
NAcGlc:	N-Acetilglicosamina
NK:	células asesinas naturales
oAH:	oligosacáridos de ácido hialurónico
PAMP:	patrones moleculares asociados a patógenos
PBS:	buffer fosfato salino
PD-1:	programed cell dead

PDGF:	factor de crecimiento derivado de plaquetas
PE:	fico eritrina (flourocromo)
PGE2:	prostaglandinas E2
PI-3K:	fosfatidil-inositol trifosfato kinasa
PM:	peso molecular
Poly I:C:	del inglés <i>Polyinosinic-polycytidylic acid</i>
PS:	fosfatidil serina
qPCR:	reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real cuantitativa
RE:	retículo endoplásmico
REr:	retículo endoplásmico rugoso
ROI:	región de interés
rpm:	revoluciones por minuto
s.c:	subcutáneo
SDF-1:	factor derivado de células estromales 1
SDS:	dodecilsulfato sódico
SF:	solución fisiológica
SFB:	suero fetal bovino
TA:	temperatura ambiente
TBS:	solución buffer Tris-salino
TCR:	receptor células T
TGF:	factor transformador de crecimiento
TIMPs:	enzimas inhibidoras de las MMP
TLR:	toll like receptor
TMB:	tetra metil bencidina
TNF:	factor de necrosis tumoral
TRAIL:	ligando inductor de apoptosis relacionada con el TNF
U:	unidades enzimáticas

UA: unidades arbitrarias

VEGF: factor de crecimiento endotelio vascular

vs: versus

B2-m: beta 2 microglobulina

Contenido

1.	Introducción	19
1.1.	Sistema inmunitario	20
1.1.1.	Sistema inmunitario innato	21
1.1.2.	Inmunidad específica o adquirida	21
1.1.3.	Células presentadoras de antígeno: Células Dendríticas	23
1.1.3.1.	Procesamiento antigénico.....	24
1.1.3.2.	Migración	25
1.1.3.3.	Presentación antigénica: presentación cruzada	26
1.1.4.	Sinapsis linfocitaria.....	27
1.1.5.	Inmunología tumoral.....	29
1.1.6.	Sistema inmunitario en pacientes con cáncer	33
1.1.7.	Inmunoterapia.....	33
1.1.7.1.	Vacunas antitumorales basadas en células dendríticas.....	34
1.1.7.2.	Otras estrategias de inmunoterapia	36
1.2.	Cáncer de colon.....	38
1.2.1.	Incidencia y mortalidad	38
1.2.2.	Edad y factores socio-económicos	38
1.2.3.	Anatomía patológica	38
1.2.3.1.	Macroscopía	38
1.2.3.2.	Microscopía	38
1.2.4.	Patrón de diseminación y estadio de la enfermedad.....	38
1.2.5.	Manifestaciones clínicas.....	39
1.2.6.	Tratamiento.....	39
1.3.	Microambiente tumoral.....	40
1.3.1.	Célula tumoral.....	40
1.3.2.	Fibroblastos asociados al tumor (FAT)	40

1.3.3.	Matriz extracelular (MEC)	41
1.3.4.	Infiltrado inflamatorio	42
1.3.5.	Vasos sanguíneos	43
1.4.	Acido hialurónico.....	45
1.4.1.	Características físico-químicas	45
1.4.2.	Biosíntesis y degradación	45
1.4.3.	Funciones	47
1.4.4.	Receptores.....	49
1.4.5.	Ácido hialurónico y cáncer	50
1.4.6.	Modulación de la respuesta inmunitaria antitumoral	51
2.	Objetivos e hipótesis	53
2.1.	Objetivo general.....	54
2.2.	Objetivos específicos.....	54
2.3.	Hipótesis.....	54
3.	Materiales y métodos	55
Parte I	56
3.1.	Efecto antitumoral del ácido hialurónico en un modelo tumoral murino	56
3.1.1.	Reactivos	56
3.1.2.	Obtención de oligosacáridos de AH	56
3.1.3.	Animales y líneas celulares.....	56
3.1.4.	Medición por citometría de flujo de la expresión de CD44, capacidad de unión y presencia de ácido hialurónico adherido a la membrana celular	57
3.1.5.	Proliferación celular <i>in vitro</i>	57
3.1.6.	Detección de apoptosis <i>in vitro</i>	58
3.1.7.	Obtención de extractos citoplasmáticos.....	58
3.1.8.	Inmunoblotting.....	59
3.1.9.	Modelo tumoral y esquema de tratamiento.....	59
3.1.10.	Penetración a los tejidos de AH inoculado.....	60

3.1.11.	Análisis del infiltrado inflamatorio tumoral por inmunohistoquímica.....	60
3.1.12.	Análisis del infiltrado inflamatorio tumoral por citometría de flujo.....	60
3.1.13.	Caracterización de esplenocitos de ratón.....	60
3.1.14.	Generación de CD derivadas de médula ósea de ratón.....	61
3.1.15.	Lisado tumoral.....	61
3.1.16.	Tratamiento de CD con mitomicina C.....	61
3.1.17.	Cultivo mixto linfocitario (CML).....	61
3.1.18.	ELISA IL-10, IL-12, VEGF.....	62
3.1.19.	Análisis estadístico.....	62
Parte II.....		63
3.2.	Efecto de AH BPM sobre CD derivadas de médula ósea de ratón.....	63
3.2.1.	Reactivos.....	63
3.2.2.	Animales.....	63
3.2.3.	Líneas celulares.....	63
3.2.4.	Generación de CD derivadas de médula ósea de ratón.....	63
3.2.5.	Lisado tumoral.....	64
3.2.6.	Ensayo de endocitosis.....	64
3.2.7.	Proliferación de CD.....	64
3.2.8.	Citometría de flujo.....	64
3.2.9.	Elisa IL-12 e IL-10.....	64
3.2.10.	Cultivo mixto linfocitario.....	65
3.2.11.	Migración <i>in vitro</i>	65
3.2.12.	Migración <i>in vivo</i>	66
3.2.13.	Análisis estadístico.....	67
Parte III.....		68
3.3.	Efecto de AH BPM sobre CD humanas derivadas de mononucleares de sangre periférica	68
3.3.1.	Reactivos.....	68

3.3.2.	Muestras de pacientes y donantes sanos	68
3.3.3.	Obtención de células mononucleares de sangre periférica (CMSP)	68
3.3.4.	Células dendríticas derivadas de mononucleares de sangre periférica.....	68
3.3.5.	Población mononuclear enriquecida con linfocitos de sangre periférica.....	69
3.3.6.	Tinción de linfocitos de sangre periférica con CFSE.....	69
3.3.7.	Lisado tumoral.....	69
3.3.8.	Análisis por citometría de flujo	69
3.3.9.	Cultivo mixto linfocitario	69
3.3.10.	Medio condicionado de ganglio linfático y tumoral	70
3.3.11.	Ensayo de migración <i>in vitro</i>	71
3.3.12.	Zimografía.....	71
3.3.13.	Obtención de ARN de CD/LT	71
3.3.14.	PCR cuantitativa en tiempo real.....	72
3.3.15.	Array de quimioquinas tumoral	72
3.3.16.	Ensayo de migración <i>in vivo</i>	72
3.3.17.	Análisis estadístico	73
Parte IV.....		74
3.4.	Vacunación con CD pre tratadas con AH BPM en ratones con cáncer de colon.....	74
3.4.1.	Modelo tumoral	74
3.4.2.	Ensayos de proliferación linfocitaria	74
3.4.3.	Ensayo de citotoxicidad.....	74
3.4.4.	Elisa IL-10 e INF- γ	74
3.4.5.	Análisis estadístico	75
4.	Resultados	76
Parte I		78
4.1.	Efecto antitumoral del ácido hialurónico en un modelo murino de cáncer de colon	78
4.1.1.	Líneas tumorales y su relación con AH.....	78

4.1.2.	AH inhibe la proliferación e induce la apoptosis en distintas líneas celulares....	80
4.1.3.	AH BPM actúa a través de CD44 modulando la fosforilación de Akt en células CT26	82
4.1.4.	AH inhibe la velocidad de crecimiento tumoral e incrementa la supervivencia de ratones portadores de tumor	84
4.1.5.	AH activa CD esplénicas y genera una respuesta antitumoral específica	88
4.1.6.	Niveles de VEGF e IL-10 sistémicos	91
4.2.	Efecto de AH BPM sobre CD derivadas de médula ósea de ratón	93
4.2.1.	Ácido hialurónico modula la capacidad endocítica de CD	93
4.2.2.	AH BPM no afecta la proliferación de CD.....	93
4.2.3.	AH BPM induce la maduración de CD derivadas de médula ósea de ratón	94
4.2.4.	AH BPM incrementa la migración de CD hacia sobrenadante de esplenocitos..	96
4.2.5.	La acción quimioattractante de CCL19/CCL21 es potenciada por el estímulo con AH BPM	97
4.2.6.	El efecto AH BPM sobre la migración de CD es independiente de CD44 y TLR4	99
4.2.7.	AH BPM induce la expresión de CCR7	100
4.2.8.	AH BPM aumenta la capacidad de migrar de DC generadas <i>ex vivo</i> en un modelo de cáncer colorectal	102
	Parte III	104
4.3.	Efecto de AH BPM sobre CD humanas derivadas de mononucleares de sangre periférica	104
4.3.1.	Característica de los pacientes y generación de las CD	104
4.3.2.	CD preincubadas con AH BPM inducen la proliferación linfocitaria	105
4.3.3.	AH BPM incrementa la capacidad de migrar de CD/LT hacia CCL21 e induce la expresión de CCR7.....	106
4.3.4.	El acondicionamiento de CD con AH BPM induce su migración al sobrenadante de ganglio linfático	107
4.3.5.	AH BPM reduce la capacidad de migrar de CD/LT hacia IL-8 e inhibe su atracción hacia medio condicionado tumoral	108
4.3.6.	El tratamiento con AH BPM induce la actividad de la metaloproteasa-2	110
4.3.7.	AH BPM modula la expresión de receptores de AH en CD	110

4.3.8.	CXCR y otros receptores implicados en el proceso de migración celular	111
4.3.9.	AH BPM aumenta la migración de CD/LT hacia el ganglio linfático regional in vivo	112
Parte IV	114
4.4.	Vacunación con CD pre tratadas con AH BPM en ratones con cáncer de colon.....	114
4.4.1.	La vacunación con CD pre tratadas con AH BPM inhibe la velocidad de crecimiento tumoral e incrementa la supervivencia de ratones portadores de tumor.....	114
4.4.2.	Esplenocitos derivados de animales con CCR tratados con CD/LT/AH BPM presentan un perfil inmunológico de tipo Th1 y una alta actividad citotóxica específica.....	116
5.	Discusión	119
6.	Conclusiones.....	133
7.	Bibliografía	136

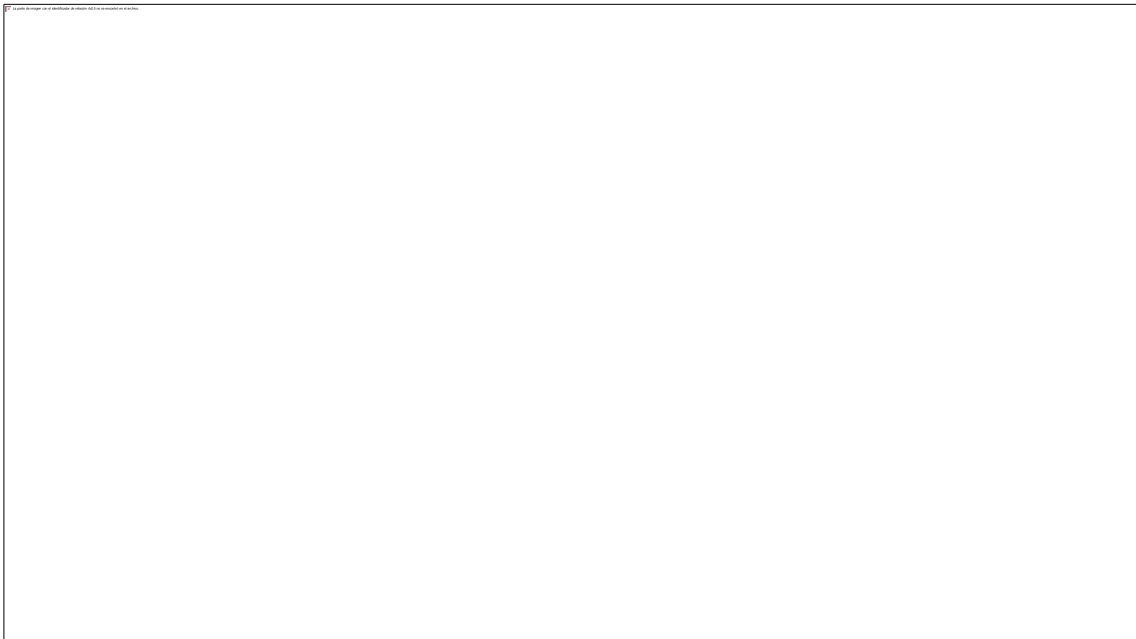
Introducción

1. Sistema inmunitario

El sistema inmunitario (SI) se podría definir como un conjunto de moléculas, células, estructuras y procesos biológicos destinados a eliminar potenciales toxas del organismo. Se distingue la respuesta inmunitaria específica o adaptativa, que se desarrolla contra un antígeno específico en un individuo concreto como por ejemplo la producción de anticuerpos contra un patógeno particular o contra alguno de sus productos. En muchos casos esta respuesta específica resulta, además, en lo que se denomina memoria inmunológica, hecho que genera protección inmunitaria ante la re-exposición al mismo antígeno a lo largo del tiempo. Estas características son algunas de las particularidades que la diferencian de la respuesta inmunitaria innata. Esta se activa inmediatamente frente a una gran variedad de toxas, de manera inespecífica y sin capacidad de generar memoria inmunológica, respondiendo de igual manera ante nuevas exposiciones a un mismo antígeno.

El término antígeno es utilizado para describir cualquier sustancia capaz de ser reconocida y neutralizada por el sistema inmunitario. Las proteínas, glicoproteínas, polisacáridos y ácidos nucleicos propios de los patógenos son los antígenos contra los cuales normalmente responde el SI. Sin embargo, también puede reconocer y activarse frente a una gran variedad de estructuras químicas como metales, drogas como la penicilina, o químicos orgánicos como venenos.

En conjunto, la respuesta inmunitaria innata y adaptativa, genera un sistema de defensa coordinado y eficaz. En ciertas situaciones basta la respuesta inmunitaria innata, pero en otras es seguida por la respuesta inmunitaria específica que neutraliza la noxa y genera una respuesta inmunológica específica de larga duración con protección frente a la exposición ulterior a ese antígeno (figura 1)(Murphy 2012).



Células que participan de la inmunidad innata y adquirida.

1. Sistema inmunitario innato

Cuando una noxa entra en contacto con un individuo la primera línea de defensa son, normalmente, barreras físicas y químicas dadas a nivel de la piel y mucosas. Si estas barreras son superadas intervienen los componentes propios del sistema inmunológico innato como el sistema del complemento, y células fagocíticas como macrófagos y neutrófilos. Al conjunto de estos procesos se lo denomina inmunidad innata, se activan en forma rápida (en horas), sin tener especificidad antigénica y sin capacidad de generar memoria inmunológica.

Las células del sistema inmunitario innato con capacidad de fagocitar son los monocitos y macrófagos, los polimorfonucleares y las células dendríticas (CD). Estas células poseen receptores de membrana o citoplasmáticos capaces de reconocer patrones moleculares estructurales típicos presentes en microorganismos o PAMP (patrones moleculares asociados a patógenos). La activación de estos receptores induce señales intracelulares activando genes pro-inflamatorios. En este sentido, uno de los receptores celulares más estudiados son los *receptores Toll-like receptors* (TLR), que reconocen patrones moleculares de patógenos como bacterias gram + y gram -. Así activan factores de transcripción que inducen genes pro-inflamatorios como son NFκB, AP-1 e interferón tipo I (INF-I), induciendo la síntesis y secreción de citoquinas y quemoquinas que favorecen y mantienen tanto la respuesta inmunitario innata como adaptativa (Luster 2002). Las principales citoquinas involucradas en la respuesta innata son IL1-β, IL-6, IL-12, TNF-α, IL-8 e INF-I (Beutler and Rietschel 2003).

Otras células que participan de la respuesta inmunitaria inespecífica son las células asesinas naturales (NK, del inglés *natural killers*). Estas comparten su origen con los linfocitos T (LT) y B (LB), y poseen receptores que reconocen moléculas anormales presentes en la superficie de células, por ejemplo tumorales o con infección viral, generando su muerte a través de la liberación de gránulos citotóxicos (granzima y perforinas) y de citoquinas. Las células NK son activadas por INFs de tipo I e IL-12, moléculas producidas principalmente por macrófagos y CD. Una vez activadas, secretan INFs de tipo II, citoquinas clave para el control de ciertas infecciones virales y que modulan la activación de los LT CD4⁺ induciendo una respuesta celular tipo Th1 capaz, a su vez, de activar a los macrófagos (ver cap. inmunidad específica) (Lanier 2008).

2. Inmunidad específica o adquirida

La respuesta inmunitaria específica o adquirida es precedida, desencadenada, dirigida y mantenida por la respuesta inmunitaria innata (Fearon and Locksley 1996). La principal célula que interviene en este proceso es el linfocito. En conjunto, estos reconocen cualquier antígeno al que un individuo pueda estar potencialmente expuesto (van den Berg, Yoder et al. 2004).

Se puede diferenciar una respuesta inmunitaria específica humoral mediada por anticuerpos, en la que participan LB; y una respuesta inmunitaria específica mediada por células, que son los LT.

Los LT se distinguen de otras células por expresar en forma constitutiva la proteína de membrana CD3. Se clasifican en subpoblaciones en función de la expresión de proteínas de

membrana: LT “colaboradores” (LTh, del inglés: *helper*) que expresan CD4 (LT CD4⁺), o LT “citotóxicos” (LTc) que expresan CD8 (LT CD8⁺). Desde un punto de vista funcional los LTh se clasifican en LTh1, LTh2, LTh17 y LT reguladores (LTreg). Los LTh1 secretan INF- γ y TNF- α , y protegen al organismo contra infecciones bacterianas intracelulares y virales (Hsieh, Macatonia et al. 1993); los LTh2 se caracterizan por secretar IL-4, IL-5 e IL-13, y por actuar frente a infecciones parasitarias activando eosinófilos y mastocitos mediante la secreción de IgE (Finkelman, Shea-Donohue et al. 1997); los LTh17 secretan la familia de citoquinas de IL-17 induciendo la producción de quemoquinas en células epiteliales y estromales, estimulando de este modo la atracción de neutrófilos (Ye, Rodriguez et al. 2001); y, por último, los LTreg se caracterizan por secretar IL-10 (entre otras) e intervienen en mecanismos de regulación de la respuesta inmunitaria (Saraiva and O'Garra 2010) (figura 2).



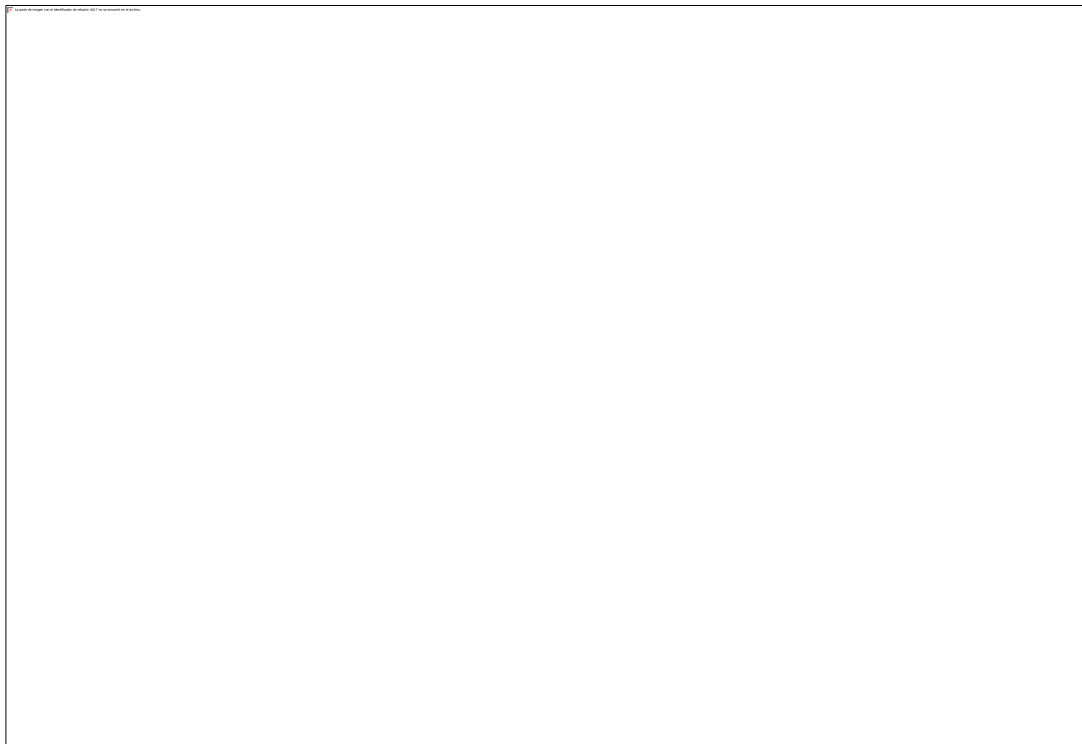
Subpoblaciones de linfocitos T helper.

Para que las células efectoras de la respuesta inmunitaria específica sean capaces de reconocer un antígeno particular, este debe ser “presentado” unido a un complejo de glicoproteínas ubicado en la membrana de ciertas células del organismo denominado complejo mayor de histocompatibilidad (CMH). Todas las células nucleadas tienen la capacidad de realizar esta “presentación antigénica” a través del CMH tipo I (CMH-I), pero solo un grupo de células especializadas son capaces de realizar la presentación antigénica en el contexto del CMH tipo II (CMH-II) por lo que se las conoce como “células presentadoras de antígeno” (CPA) (Germain 1994).

El CMH es sintetizado por un grupo numeroso de genes que en ratones se denomina H-2, y en humanos HLA (del inglés: *human leucocyte antigen*). Existen dos clases de CMH con múltiples polimorfismos. Para CMH-I se describen tres loci (H-2K, D y L en el ratón; y HLA-A-B-C en el hombre). CMH-II es codificado por las regiones I-A e I-E en el ratón, y HLA-D (DP, DQ y DR) en el hombre. Ambas moléculas poseen en su porción extracelular una hendidura capaz de ligar péptidos antigénicos(Villadangos 2001, Williams, Peh et al. 2002). De esta manera, un LT es capaz de reconocer una combinación particular de antígeno peptídico ligado a un tipo determinado de CMH, lo que agrega un grado mayor de especificidad al proceso de presentación antigénica.

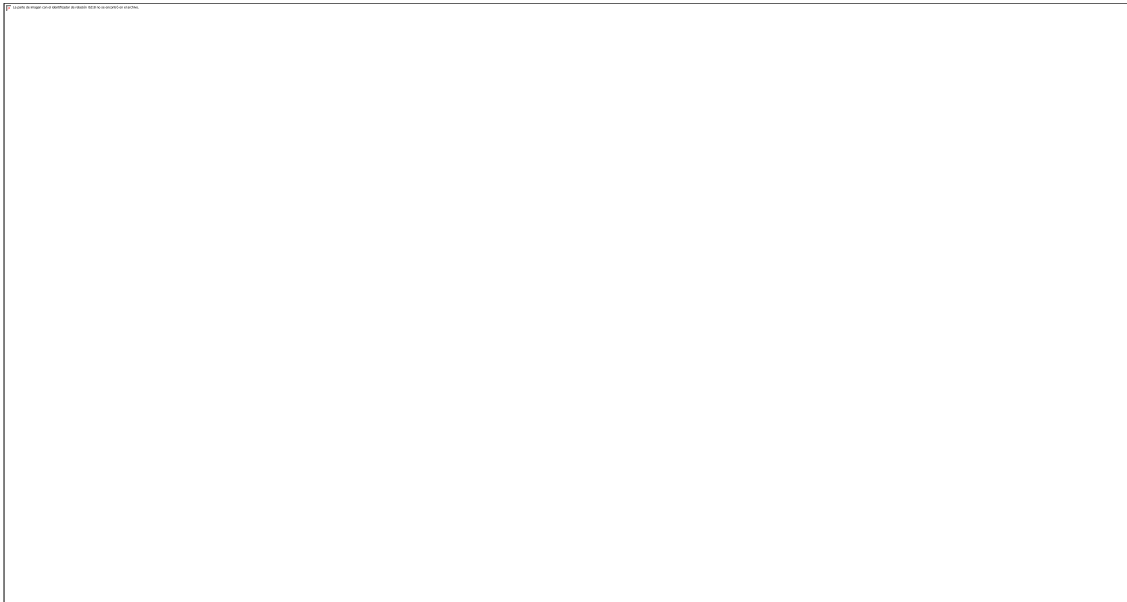
3. Células presentadoras de antígeno: Células Dendríticas

El nexo entre la respuesta inmunitaria innata y la adaptativa son las CPA. Estas células con capaces de entrar en contacto, endocitar, procesar y presentar un antígeno promoviendo una respuesta inmunitaria específica. Si bien los macrófagos y los LB pueden cumplir este rol, las únicas células con capacidad de estimular LT que no tuvieron contacto previo con el antígeno (LT *naive*) son las CD(Itano and Jenkins 2003). Estas tienen su origen en las células hematopoyéticas de la médula ósea. Se distinguen dos tipos de CD: las CD mieloides y las CD plasmocitoides(Yanofsky, Mitsui et al. 2013). Las primeras migran desde la médula ósea, por el torrente sanguíneo, en su mayoría en forma de precursores (monocitos), hacia diversos tejidos donde se diferencian y residen como CD inmaduras (CDi)(Heath, Belz et al. 2004) (figura 3). Estas células se caracterizan poseer una gran superficie de contacto con su entorno gracias a prolongaciones citoplasmáticas que le dan la posibilidad de captar antígenos presentes en el medio(Dalod, Chelbi et al. 2014).



Génesis y compartimentalización de células dendríticas. CD: células dendríticas. Adaptado de Nature Reviews 2002.

Según el fenotipo de CD que intervenga, estas células pueden formar parte en un proceso de tolerancia inmunológica o por el contrario inducir una respuesta inmunitaria específica. Si un antígeno es presentado a los linfocitos por CDi puede generar la deleción o anergia clonal del LT y/o inducir LTreg (Segura, Albiston et al. 2009). Por el contrario, cuando el antígeno o agente patógeno es endocitado en un contexto pro-inflamatorio las CDi sufren un profundo cambio fenotípico y funcional denominado "maduración". Durante el mismo disminuyen su capacidad de endocitosis, cambian el patrón de expresión de moléculas de adhesión y de quemoquinesis adquiriendo mayor movilidad y sensibilidad a quemoquinas presentes en el ganglio linfático, aumentando la expresión de moléculas implicadas en el proceso de presentación antigénica y estimulación linfocitaria como CMH-II, CD40, CD80 y CD86. Todos estos cambios adaptativos facilitan su migración al ganglio linfático regional y las capacidad para realizar una presentación antigénica eficaz a los LT (Banchereau and Steinman 1998, Gallucci, Lolkema et al. 1999, Sauter, Albert et al. 2000) (figura 4).



Respuesta inmunitaria específica. (1) Las células precursoras de células dendríticas (monocitos CD14⁺) migran a sitios de inflamación atraídos por moléculas como IL-1 β y TNF- α . (2) Allí se diferencian a células dendríticas (CD), capturan el antígeno, (3) adquieren mayor capacidad de migrar al ganglio linfático e (4) incrementan la expresión de moléculas de co-estímulo como CD80/CD86, CD40 e ICAM (5) En el ganglio linfático realizan la presentación antigénica y estimulación linfocitaria con reactividad antígeno específica. (6) Estos migran al lugar de inflamación donde reconocerán su péptido blanco. LTC: linfocito T citotóxico; LTh: linfocito T helper; MMP: metaloproteasas.

1. Procesamiento antigénico

Los antígenos alcanzan el citosol o vesículas citoplasmáticas de las CD a través de dos rutas principales. Los virus, y las bacterias de replicación intracelular, son procesados a través de una “vía endógena o citosólica”. Todas las células nucleadas del organismo son capaces de realizar este tipo de procesamiento antigénico. Durante el mismo la proteína a degradar es ubiquitinizada mediante la acción del complejo ubiquitinizante haciéndola susceptible a la acción del proteosoma, que degrada proteínas marcadas por ubiquitina. El producto final de su acción son péptidos de 8-10 aminoácidos pasibles de ser ligados al CMH-I para su posterior presentación antigénica a LT CD8⁺ (Fremont, Hendrickson et al. 1996).

Por el contrario, la mayoría de las bacterias y parásitos que proliferan en el espacio extracelular, así como partículas virales presentes en este sitio, son procesados por “vía endocítica”. Luego de su internalización por fagocitosis, endocitosis mediada por receptor o macropinocitosis, los antígenos son digeridos a péptidos de entre 13-18 aminoácidos por enzimas especializadas en el endosoma generado. Luego, estos endosomas se fusionan con la vacuola que contiene el CMH-II. Así el complejo péptido ligado al CMH-II es transportado a la membrana citoplasmática para ser presentado a los LT CD4⁺. Sólo las CPA son capaces de realizar este proceso (van Kasteren, Overkleeft et al. 2014) (figura 5).

2. Migración

Las CD luego de capturar, y a la vez que procesan el antígeno, migran a los órganos linfáticos secundarios donde realizan la presentación antigénica. Este proceso, en la mayoría de los casos, sucede en respuesta a estímulos pro-inflamatorios ya sea de origen químico (ej: sensibilizadores de contacto o irritantes), físico (ej: rayos UV o trauma) o biológicos (ej: microbios o tejidos necróticos). Estos estímulos inducen cambios “madurativos” en las CD que, entre otros aspectos funcionales, le otorgan la capacidad de movilizarse a través de la matriz extracelular mediante la secreción de enzimas y modifican la expresión de moléculas implicadas en la adhesión celular y quemoquinesis.

El eje quemoatóctico más estudiado en este contexto está conformado por el receptor de membrana CCR7 y sus ligandos CCL19-CCL21 (Forster, Davalos-Misslitz et al. 2008). CCR7 se expresa en CD maduras y se activa en respuesta a las quemoquinas CCL19 (proteína inflamatoria de macrófago o MIP-3 β) y CCL21 (quemoquina linfoide secundaria o SLC) (Dieu, Vanbervliet et al. 1998, Allavena, Sica et al. 2000, Ahamed, Haribabu et al. 2001), expresadas por células endoteliales linfáticas y del estroma del ganglio linfático. De esta manera, ante un estímulo madurativo, las CD migran al ganglio linfático regional por quemoatracción. De manera complementaria, y en algún caso supletoria, se producen otros cambios funcionales en las CD como la disminución de la expresión de receptores de quemoquinas que las retienen en sitios de inflamación, por ejemplo CCR2; disminuyen la expresión de moléculas relacionadas con la adhesión a la matriz extracelular como E-Caderina (Imhof and Aurrand-Lions 2004), aumentan la expresión de moléculas que degradan la matriz extracelular o que facilitan su motilidad a través de ella como metaloproteasas (MMP) 2 y 9, CD38 (Frasca, Fedele et al. 2006) y TIMP-2 (Yoshimura, Naka et al. 2007, Moller, Michel et al. 2008). Además, se ha descrito también que la migración de CD hacia los órganos linfáticos secundarios puede ser mediada por la activación de CXCR4 de forma independiente a CCR7 (Kabashima, Shiraishi et al. 2007). CXCR4 es un receptor de membrana expresado por CD activadas cuyo ligando es CXCL-12. Este

se sobreexpresa en vasos linfáticos en situaciones de inflamación (Kabashima, Shiraishi et al. 2007). Como resultado final, las CD estimuladas se desprenden del sitio de inflamación y migran a través del intersticio, atraviesan el endotelio linfático y se dirigen a la zona T del GL donde se pondrán en contacto con LT *naive* para hacer la presentación antigénica correspondiente.

Por otra parte, existe una menor proporción de CD que migran al GL sin haber sido expuestas a un estímulo pro-inflamatorio, presentando un aumento en la expresión de CCR7 sin los cambios típicos de una CD madura (Bouchon, Hernandez-Munain et al. 2001). No se conoce con exactitud cuál es el mecanismo implicado en este proceso pero se calcula que un 5% de las CD que migran al GL desde la piel son de este tipo (Tomura, Yoshida et al. 2008).

3. Presentación antigénica: presentación cruzada

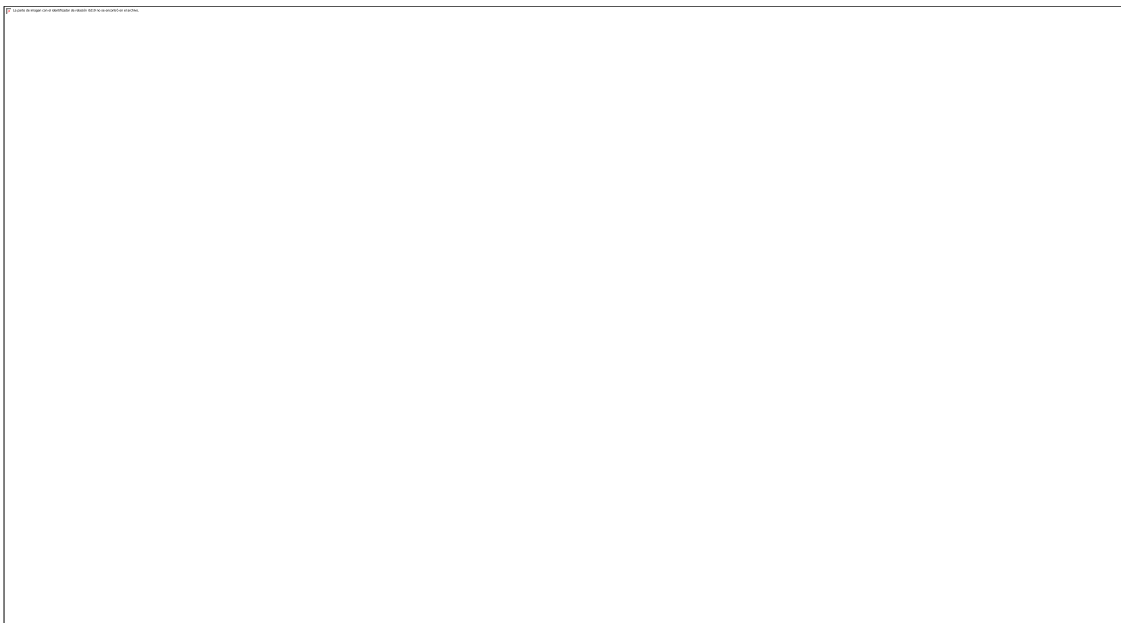
La presentación antigénica consiste en la exposición de moléculas antigénicas en la membrana celular de las CD a fin de ser reconocidos por los linfocitos. Existen al menos tres tipos de moléculas por medio de las cuales el antígeno puede ser presentado. Dos de ellas son codificadas por el CMH (clase I y clase II), como se mencionó anteriormente, y el tercer tipo de molécula, independiente de las anteriores, está codificado por el complejo CD1. Las moléculas del CMH presentan antígenos peptídicos, y las del complejo CD1 antígenos lipídicos. Nos referiremos aquí a la presentación mediada por el CMH.

Los antígenos endógenos son procesados por la vía del CMH-I. Esta molécula es un dímero sintetizado en el retículo endoplásmico rugoso (REr), formada por una cadena α y una cadena β -2-microglobulina (β -2-m). Estas cadenas se unen de manera no covalente en el REr hasta su unión con el antígeno. Los péptidos antigénicos procedentes del procesamiento en el proteosoma, entran al REr por un sistema específico denominado "complejo de transporte de péptidos antigénicos", al que se encuentra unido el complejo α - β -2-m. Así, los péptidos transportados al interior del REr se unen en ese mismo momento a la hendidura de la molécula del CMH-I, dando a este complejo su conformación definitiva, estable y plegada. Posteriormente el complejo formado, CMH-I-péptido, abandona el REr por un sistema de vesículas llegando a la membrana celular, produciéndose de este modo la exposición del antígeno en el medio extracelular (Bouvier 2003).

Por otra parte, los antígenos exógenos o procedentes del medio extracelular, que ingresan a las células en su mayoría por vía endocítica, son degradados a productos peptídicos en endosomas donde, al fusionarse con vesículas ascendentes, se unen al CMH-II. Este último está constituido por dos cadenas peptídicas α y β , sintetizadas por separado, adosadas al REr y ensambladas en su interior. Al igual que el CMH-I, este complejo es inestable hasta su unión con un péptido antigénico. Para evitar su degradación se asocia en un primer momento con una proteína denominada calnexina, la que luego es desplazada por la llamada cadena invariante Li. Esta última forma trímeros cuyas unidades se asocian con un CMH-II de forma tal que cubre el surco de unión al péptido hasta que este se una (Fremont, Hendrickson et al. 1996).

Existe un grupo de células especializadas, entre ellas un tipo específico de CD, que expresan CD11c/CD8 α /CD205 en ratón y CD141 en humanos, con la facultad de realizar lo que se

denomina presentación cruzada o *cross priming*(Heath, Belz et al. 2004, Jongbloed, Kassianos et al. 2010). El *cross priming* consiste en el procesamiento de productos peptídicos provenientes de antígenos exógenos por la vía de degradación endógena, uniéndolos finalmente al CMH-I. Para esto, la proteína, una vez endocitada, es liberada al citosol, ubiquitinizada y posteriormente procesada por el proteosoma. Los productos resultantes se unen al CMH-I en el REr y migran a la superficie celular en vesículas para realizar la presentación antigénica a LT CD8⁺. Esta capacidad de procesamiento antigénico *paradójico* otorga a las CD una característica diferencial con la posibilidad de gatillar una respuesta antitumoral citotóxica específica dirigida contra antígenos extracelulares. Cabe aclarar que también los péptidos generados por el proteosoma sufren autofagia y pueden ingresar a la vía de procesamiento exógeno y ser presentados por el CMH-II. (Ochsenbein, Sierro et al. 2001)(figura 5).



Procesamiento y presentación antigénica. Se muestra el procesamiento de antígenos endógenos, exógenos, y la presentación antigénica cruzada, o *cross priming*, que ocurre en células presentadoras de antígeno. LTc: linfocito T citotóxico; LTh: linfocito T helper; CMH: complejo mayor de histocompatibilidad; Ag: antígeno; RE: retículo endoplásmico.

4. Sinapsis linfocitaria

Se denomina sinapsis linfocitaria a la interacción entre la CPA y el linfocito durante la presentación antigénica. Deben intervenir una serie de moléculas (receptores, co-receptores y citoquinas) de manera coordinada para que resulte en una respuesta inmunitaria específica y eficaz(Hivroz, Chemin et al. 2012).

El primer paso es el contacto entre una CPA portadora de un antígeno y un linfocito que ocurre gracias a la interacción entre las moléculas de adhesión LFA-1 y CD2, presentes en linfocitos, con ICAM-1, ICAM-2 y CD58, expresado por las CPA activadas. De este modo ambas células permanecen en contacto un tiempo variable (días) durante el cual los linfocitos son

capaces de reconocer por medio de receptores proteicos de membrana (TCR) secuencias peptídicas específicas únicamente si se encuentran asociadas al CMH. Los TCR están formados por una subunidad α y una subunidad β , unidas por un puente disulfuro. Cada subunidad posee una región variable (V) codificada por cientos de genes, una región constante (C) y una región de unión (J, del inglés “*junction*”). La subunidad β posee además una región de diversidad (D). Las distintas combinaciones de genes (diversidad combinatoria) y su diversidad de unión (diversidad de las uniones) dan lugar a un número muy elevado de receptores TCR con la capacidad de reconocer prácticamente cualquier secuencia peptídica antigénica. Cada clon linfocitario posee un TCR específico (García and Adams 2005).

Para que la unión entre el TCR y su secuencia de aminoácidos blanco sea estable y desencadene una señal intracelular de activación en los linfocitos, se requiere de la presencia de un grupo de moléculas complementarias que se denominan CD3, CD4 y CD8. CD3 es un complejo proteico que actúa en forma complementaria con los TCR (Letourneur and Klausner 1992). CD4 y CD8 son glicoproteínas de membrana pertenecientes a la superfamilia de las inmunoglobulinas cuyos ligandos naturales son el CMH-II y I, respectivamente. El complejo TCR/CD3/CD4 o CD8 es capaz de reconocer péptidos únicamente unidos al CMH y generar una señal intracelular (*primer señal de activación*). Además, para que la activación linfocitaria sea completa, se requiere de una segunda señal dada por un co-receptor expresado en la membrana de los linfocitos (CD28) cuyos ligandos naturales pertenecen a la familia B7 (B7-1, CD80; B7-2, CD86) y están presentes en las CPA maduras. CD28, una vez estimulado, activa una enzima (fosfatidil inositol 3-quinasa; PI3-k) responsable de la activación de fosfolipasa C- γ generando como segundo mensajeros diacilglicerol (DAG) e inositol 1-4-5 trifosfato (IP₃). Esto resulta en el aumento citoplasmático de Ca⁺⁺, el reclutamiento en la membrana de proteínas de señalización Ras-GRP y una proteína serina/treonina quinasa llamada proteína quinasa C θ (Al-Lazikani, Lesk et al. 2000). Todo esto lleva a la activación de factores de transcripción inflamatorios como son el factor nuclear de linfocitos activados, factor de transcripción NF κ B, la cascada MAPK y el factor de transcripción AP-1, resultando en la síntesis y secreción de IL-2 e INF- γ , entre otras moléculas pro-inflamatorias (Acuto and Michel 2003). Esta *segunda señal de supervivencia* está regulada negativamente por CTLA-4 (CD152) y PD-1, presentes en los linfocitos. CTLA-4 se une a las proteínas B7 (CD80 y CD86) con mayor avidéz que CD28 desplazando a esta última y generando una señal intracelular negativa (Salama and Hodi 2011).



Señal de activación linfocitaria. Se muestran los receptores y co-receptores implicados en la primer y segunda señal de activación, así como las citoquinas que intervienen en la tercera señal de activación.

Existe una *tercera señal de diferenciación* en la que intervienen citoquinas como INF- γ , IL-4, IL-5, IL-10 entre otras, que inducen características particulares a los linfocitos efectores originando las distintas subpoblaciones ya mencionadas (Curtisinger and Mescher 2010) (figura 6).

5. Inmunología tumoral

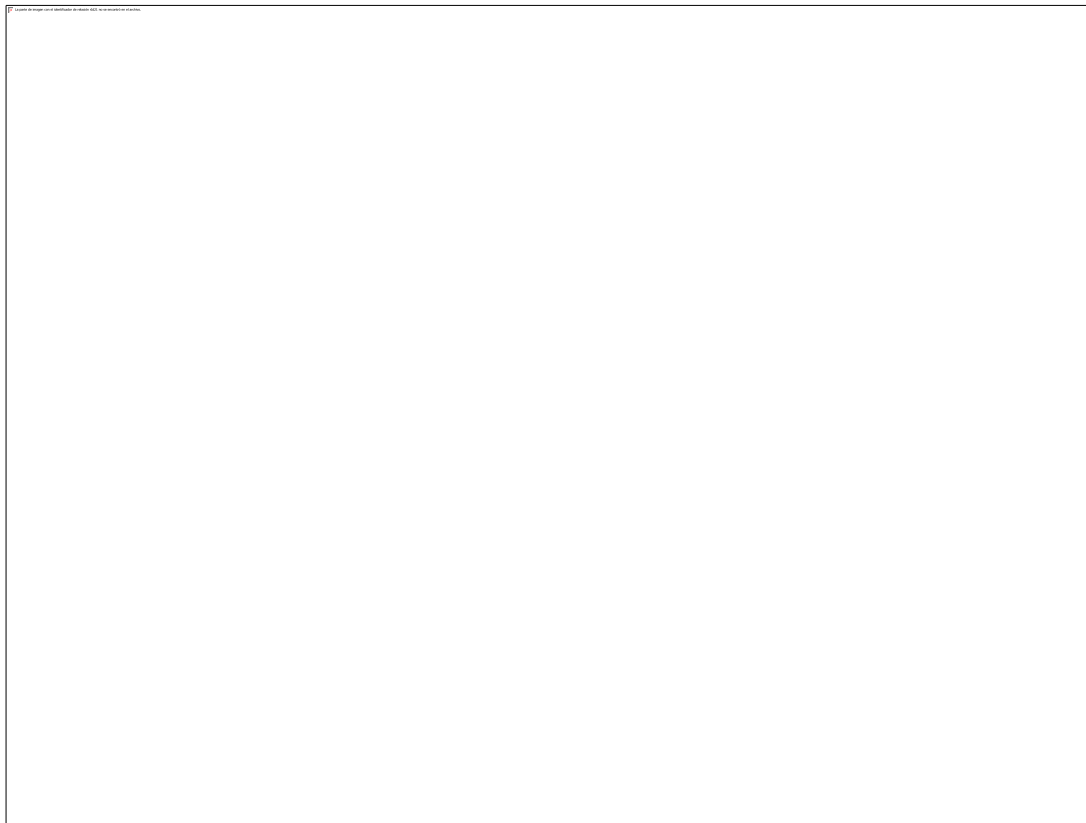
En el proceso de carcinogénesis la célula tumoral debe sortear mecanismos de control intrínseco y extrínseco que impiden la proliferación indiscriminada de células anormales. Uno de los mecanismos de control extrínseco es el sistema inmunitario a través del reconocimiento de antígenos tumorales y la ulterior eliminación de la célula tumoral.

De la inmunovigilancia a la “inmunoedición”

En 1909, Paul Ehrlich, estableció la teoría que el sistema inmunitario podría reprimir el crecimiento tumoral (Ehrlich 1909). Con esto se inició un siglo de discusión acerca del rol del sistema inmunitario en relación con el cancer. Cincuenta años más tarde, entre las décadas del 50 y del 70, se cristalizó el concepto de “inmunovigilancia” (Burnet 1970). Esta hipótesis sostiene que las células originadas en el timo, “controlan” constantemente los tejidos del organismo inhibiendo el desarrollo de células anormales. Luego se demostró que existen células pobremente inmunogénicas capaces de evadir el sistema inmunitario, dando lugar en la década del 90 al concepto de la “inmunoedición” (“inmunoediting”) en el que se distinguen tres etapas: eliminación, equilibrio y, finalmente, escape inmunológico (Dunn, Old et al. 2004).

Eliminación: En un tejido normal existen altas probabilidades de que surjan células anómalas a partir de células del propio organismo por mutaciones por azar originadas en las

celulas madre, la existencia de predisposición genética, y/o por la exposición a estímulos carcinogénicos como radiaciones, infecciones, procesos inflamatorios crónicos, etc(Tomasetti and Vogelstein 2015). Estas células aberrantes son reconocidas por el sistema inmunitario como extrañas, desencadenando en un primer momento una respuesta inmunitaria innata mediada por células NK, macrófagos, y otras celulas. La expresión de antígenos anómalos en este contexto genera, en un segundo momento, una respuesta inmunitaria específica mediada por LT CD8⁺ y CD4⁺ capaces de eliminarlas. Esta es la etapa de “eliminación” que coincide con el concepto de “inmunovigilancia” (figura 7).



Primera etapa en la inmuoedición: Eliminación de la célula tumoral. INF: interferón; TRAIL: ligando inductor de apoptosis relacionado a TNF; INF: interferón; IL-12: interleuquina 12.

Equilibrio: La eliminación de las células tumorales puede ser definitiva. Sin embargo, existe la posibilidad de que la eliminación no sea total quedando un grupo de células neoplásicas replicativas. Cuando la tasa de replicación y de eliminación celular se equiparan se llega a un equilibrio dinámico llamado “inmuoedición”, en el que las células aberrantes con menor capacidad inmunogénica son seleccionadas(Shankaran, Ikeda et al. 2001).Esta etapa de equilibrio e “inmuoedición” puede mantenerse hasta que se avanza a la etapa de “inmuoescape”.

Inmuoescape: Las células tumorales generan diversos mecanismos de resistencia como por ejemplo la disminución de la expresión de CMH-I(Algarra, Cabrera et al. 2000), resistencia aINF- γ (Kaplan, Shankaran et al. 1998), inducción de LT reg mediante la inhibición de la expresión de moléculas de co-estímulo como CD80, o aumento de la expresión y/o secreción de moléculas inmunosupresoras como galectina(Rubinstein, Alvarez et al. 2004),

indometacina(Uyttenhove, Pilotte et al. 2003), IL-10 o TGF- β (Khong and Restifo 2002). Como resultado final de este proceso, las células tumorales proliferan en un entorno en el que el sistema inmunitario no solo no es capaz de inhibirlas sino que les facilitaría su supervivencia. De esta manera, cuando el tumor ya es clínicamente evidente, superó el proceso de eliminación y equilibrio con la consiguiente *inmunoedición* que genera el escape del sistema inmunitario, dando lugar a tumores formados por células resistentes y pobremente inmunogénicas (figura 8).



Tercera etapa en la inmunoedición: inmunoescape. LTreg: linfocito T regulador; IL-10: interleuquina 10; TGF- β : Factor de crecimiento de fibroblasto β .

Antígenos tumorales

Se describen diversos antígenos según se originen a partir de productos virales, de mutaciones – germinales o adquiridas- del ADN, o por traslocaciones cromosómicas(Novellino, Castelli et al. 2005).

Los antígenos de origen viral que se conocen son por ejemplo productos del virus de la hepatitis B y C en el hepatocarcinoma, las proteínas E6/E7 del HPV en el cáncer de cuello uterino, y EBNA-1 del EBV en linfomas(Long, Parsonage et al. 2010, van der Burg and Melief 2011).

La mutación somática de genes puede dar origen a péptidos tumorales por el intercambio de aminoácidos, alterando el marco de lectura genético o extendiendo la secuencia de codificación más allá del codón de finalización normal. En los pacientes con cáncer, el 50% de los antígenos reconocidos por los linfocitos T se originan a partir de este tipo de aberraciones, y el otro 50% responde a mutaciones germinales. Por ejemplo la mutación de CDK4 genera una menor sensibilidad al gen supresor de tumor INK4A que resulta en una proliferación celular descontrolada; la mutación del gen de caspasa 8 (CASP8) modifica el codón de terminación lo

que genera la síntesis de una proteína con menor capacidad de gatillar la apoptosis celular(Li, Egloff et al. 2014). Otros procesos oncogénicos involucran la traslocación cromosómica dando origen a proteínas pasibles de ser procesadas y presentadas en el contexto del CMH-I como son por ejemplo BCR-ABL y ETV6-AML1(Wolfel, Hauer et al. 1995, Mandruzzato, Brasseur et al. 1997, Yotnda, Firat et al. 1998, Yotnda, Garcia et al. 1998).

Se han descrito más de 60 mutaciones germinales que dan origen a productos peptídicos relacionados al desarrollo de tumores. Los genes pertenecientes a la familia MAGE relacionados con melanoma y cáncer de pulmón, los genes GAGE (antígeno G), CTAG (antígeno de cáncer de testículo) y SSX (del inglés "*sinovial sarcoma X breakpoint*") (Tureci, Sahin et al. 1996, Van Der Bruggen, Zhang et al. 2002). La importancia del conocimiento de estos antígenos tumorales radica en la posibilidad de dirigir una terapia inmunitaria de manera específica.

Respuesta inmunitaria antitumoral innata

El primer mecanismo de defensa antitumoral lo constituye la respuesta inmunitaria innata. Se desconoce el proceso exacto a través del cual esto sucede, pero productos de células tumorales muertas estimulan a las CD que secretan INF- β . Los INF-I inducen la transcripción de genes pro-inflamatorios y facilitan la presentación antigénica cruzada estimulando así la expansión de LTc(Gajewski, Schreiber et al. 2013). Los macrófagos presentes en el seno tumoral atraídos por quemoquinas, participan también en la respuesta antitumoral a través de, entre otros mecanismos, la secreción de TNF- α , la liberación de enzimas lisosómicas y la liberación de intermediarios del oxígeno y óxido nítrico(Nardin and Abastado 2008).

Respuesta inmunitaria antitumoral específica

Los linfocitos T son las principales células encargadas de regular y ejecutar la respuesta inmunitaria específica antitumoral. Estas células reconocen al antígeno presentado por las CPA en el contexto del CMH en órganos linfáticos secundarios. Allí, los LT *naive* en presencia de IL-12 se diferencian a LTh1 capaces de reconocer antígenos peptídicos asociados a CMH-II (Germain and Hendrix 1991). En tejidos periféricos secretan grandes cantidades de INF- γ y TNF- α con efecto antitumoral directo a través de, por ejemplo, la inducción de la producción de especies reactivas del oxígeno(Schattner, Mascarenhas et al. 1996, Hung, Hayashi et al. 1998). Sin embargo, su principal función en la respuesta antitumoral es la de generar e incrementar la respuesta inmunitaria específica mediada por LTc a través de su interacción directa con estas células o mediada por CPA o células NK. Los LTh activados expresan CD40L que interactúa con CD40 presente en la superficie de CD induciendo la expresión de CMH y moléculas de co-estímulo, e incrementa la producción de citoquinas tales como IL-12 e IL-2 indispensables para la respuesta de LTc(Bennett, Carbone et al. 1998, Schoenberger, Toes et al. 1998, Toes, Schoenberger et al. 1998). En ciertas circunstancias son capaces también de reconocer al antígeno presentado por la misma célula tumoral induciendo la secreción de citoquinas antitumorales en el tumor(Kobayashi, Nagato et al. 2006), y de generar y mantener memoria inmunológica mediada por LT CD8⁺(Janssen, Lemmens et al. 2003, Shedlock and Shen 2003). Por otro lado, los LTh son capaces de gatillar una respuesta humoral antitumoral en la que participan los LB. Esta respuesta mediada por anticuerpos específicos desencadena la

muerte celular por activación del complemento o mediante citotoxicidad celular mediada por anticuerpos(Shishido, Varahan et al. 2012).

Finalmente, son los LTC los principales responsables de ejecutar la respuesta antitumoral. Estos son capaces de reconocer la célula blanco a través de su receptor de membrana, e inducir su muerte a través de dos mecanismos: citólisis mediada por gránulos de perforina/granzima; o mediante la activación de receptores de la familia de TNF como TNFR, Fas o TRAIL. Asimismo, son capaces de secretar una serie de citoquinas pro-inflamatorias como por ejemplo INF- γ (Berke 1995, Kontny, Hammerle et al. 2001).

6. Sistema inmunitario en pacientes con cáncer

El microambiente tumoral “inmunosupresor”, clave para el desarrollo del cáncer, en algunos casos tiene expresión a nivel sistémico. De hecho, existe correlación entre la presencia de moléculas inmunosupresoras en suero como IL-10 y el receptor soluble de IL-2 (sIL-2R), con el estadio de la enfermedad neoplásica(Berghella, Pellegrini et al. 1997, Pellegrini, Berghella et al. 1997). También se ha demostrado en pacientes con cáncer en estadios avanzados un desequilibrio en la respuesta inmunitaria Th1/Th2(Pellegrini, Berghella et al. 1996). En este sentido, los pacientes con melanoma metastásico tienen una menor activación de genes estimulados por interferón (ISG) y menor capacidad de fosforilación de STAT-1 en células inmunitarias circulantes(Critchley-Thorne, Yan et al. 2007, Critchley-Thorne, Simons et al. 2009, Mortarini, Vegetti et al. 2009). A su vez, en pacientes con tumor de cabeza y cuello(Bergmann, Strauss et al. 2007, Chikamatsu, Sakakura et al. 2007) y melanoma(Fecchi, Mitchell et al. 2006), se encontró mayor cantidad de LTreg en sangre periférica;en pacientes con CCR y cáncer de páncreas se observa un aumento en el número de granulocitos activados circulantes(Schmielau and Finn 2001) y de células mieloides supresoras(Nagaraj and Gabrilovich 2007), las que estarían implicadas en la supresión de la respuesta mediada por células T(Kusmartsev, Nagaraj et al. 2005, Sinha, Clements et al. 2007).

7. Inmunoterapia

La inmunoterapia contra el cánceres uno de los campos terapéuticos de mayor interés dentro de la oncología(Kirkwood, Butterfield et al. 2012). Básicamente, consiste en la manipulación del sistema inmunitario a fin de generar una respuesta antitumoral efectiva capaz de inducir regresiones tumorales objetivas duraderas y memoria inmunológica. Esta herramienta terapéutica se ha desarrollado activamente durante los últimos años demostrando gran efectividad en modelos animales, y resultados promisorios en la clínica. Sin embargo, a pesar de que en muchos casos se consiga estimular una respuesta inmunitaria específica, esta no siempre implica la reducción o eliminación del tumor. Esto es debido a que existen “barreras de defensa” en el tumor o en su microambiente que generan una disociación entre la respuesta inmunitaria sistémica y el infiltrado inflamatorio presente en el seno tumoral (Lee, Yee et al. 1999, Morse, Hobeika et al. 2008).

Las estrategias de inmunoterapia más utilizadas se centran principalmente en la estimulación inespecífica del sistema inmunitario con el uso de moléculas inmunomoduladoras y/o anticuerpos monoclonales(Callahan and Wolchok 2013), la estimulación antigénica específica mediante el uso de vacunas con CD por ejemplo(Vonderheide and Nathanson 2013),

o la aplicación de tratamientos con células como la terapia adoptiva con la infusión de linfocitos T efectores y NK(Sun, Beilke et al. 2009, Goff, Smith et al. 2010, Rosenberg 2011).

1. Vacunas antitumorales basadas en células dendríticas

La inmunoterapia con CD es una alternativa esperanzadora para el tratamiento del cáncer, aunque todavía no ha demostrado un beneficio clínico claro. Consiste en la diferenciación *in vitro* de células progenitoras de CD, su activación y cargado antigénico *ex vivo*, para luego ser inyectadas nuevamente en el paciente. Existen diversos protocolos de diferenciación y activación de las mismas, así como también distintas alternativas para dirigir la especificidad de la respuesta inmunitaria (figura 9)(Palucka and Banchereau 2012). Esta diversidad de protocolos de generación de CD deriva en una gran heterogeneidad en los resultados alcanzados (Radford, Tullett et al. 2014).

Diferenciación y maduración: la fuente y el medio de cultivo utilizados para la generación y maduración de las CD determina su posterior funcionalidad. El modo de obtención que parecería más adecuado para su posterior uso en un protocolo de vacunación son las células mononucleares de sangre periférica del propio paciente (PBMC). Otra posibilidad es su diferenciación a partir de células troncales hematopoyéticas, obteniendo una población celular que no parece ser la óptima para estos protocolos(Palucka and Banchereau 2013).

Para la diferenciación y maduración a partir de PBMC se han utilizado diferentes *coktails* de citoquinas, siendo GM-CSF e IL-4 las más frecuentemente utilizadas (Sallusto and Lanzavecchia 1994). Las CD así obtenidas presentan un fenotipo inmaduro por lo que requieren de un estímulo adicional para ser utilizadas como vacuna terapéutica(Zou and Tam 2002). La inoculación de CD inmaduras puede inhibir la respuesta inmunitaria mediada por LT CD8⁺ e inducir la aparición de LT específicos productores IL-10, citoquina con capacidad inmunosupresora(Dhodapkar, Steinman et al. 2001, Jonuleit, Giesecke-Tuettenberg et al. 2001). Por el contrario, las CD maduras y activadas son capaces de inducir una respuesta LT CD8⁺ y CD4⁺ productores de INF- γ (Schuler-Thurner, Schultz et al. 2002). De este modo, se puede asegurar que el estado madurativo y de activación de las CD utilizadas en estos protocolos es determinante para la inmunización activa de los pacientes con cáncer (Figdor, de Vries et al. 2004).

Activación: para la activación de CD se utilizan distintas moléculas o factores en forma aislada o combinadas entre sí. Estas moléculas pueden ser tan variadas como: i) productos de microbios que actúan vía TLR(Kim, Kim et al. 2011), lectinas tipo-C(Cambi and Figdor 2005), y NOD *like receptors intracitoplasmáticos* (NLRs) (revisado en Ting y cols.)(Martinon and Tschopp 2005, Ting and Davis 2005, Delbridge and O'Riordan 2007, Mariathasan and Monack 2007); ii) células que incluyen subpoblaciones LT, NK, y LT $\gamma\delta$ (Munz, Steinman et al. 2005) ; iii) productos celulares como CD40-L y citoquinas pro-inflamatorias como IL-1- β , TNF, IL-6 y prostaglandina E2; y iv) productos de células muertas(Gallucci, Lolkema et al. 1999) que incluyen HSP(Srivastava and Maki 1991),*high-mobility group box 1 protein* (HMGB1)(Lotze and Tracey 2005), β -defensina(Biragyn, Ruffini et al. 2002) y ácido úrico(Rock, Hearn et al. 2005). De todas estas, las moléculas más empleadas son IL-1 β , IL-6, TNF, IFN- α , IFN- γ , PGE2 y poly I:C(Banchereau, Schuler-Thurner et al. 2001, Giermasz, Urban et al. 2009).

Fuente de antígeno: las fuentes de antígeno que pueden emplearse para el cargado de las CD son muy diversas: proteínas totales, lisado tumoral, péptidos restringidos por HLA, RNA, híbridos o fusiones celulares, entre otras (Timmerman and Levy 1999). Una de las estrategias más empleada consiste en la utilización de péptidos derivados de antígenos conocidos (Gilboa 1999). Esta fuente de antígenos presenta algunas limitaciones como la restricción a un tipo HLA determinado, el número limitado de antígenos conocidos y asociados al tumor, y la inducción de un repertorio limitado de clones de LT, acotando de este modo la respuesta antitumoral inducida. Es por esto que se postula que las CD cargadas con antígeno tumoral total podrían tener un beneficio agregado, permitiendo el procesamiento y selección de epitopes de forma "natural" dando como resultado una respuesta inmunitaria que involucre diversos clones de LT CD4⁺ y CD8⁺. En consonancia con esto, numerosos datos clínicos muestran que el uso de CD cargadas con mezclas antigénicas complejas (lisado de células tumorales, exosomas, células tumorales apoptóticas/necróticas, transfección con RNA total proveniente de células tumorales, hibridomas entre células tumorales y células dendríticas), genera una respuesta inmunitaria más eficaz (Nestle, Alijagic et al. 1998, Chiang, Benencia et al. 2010, Prins, Wang et al. 2013). Sin embargo, existen problemas de reproducibilidad de estos resultados dada la heterogeneidad en la población de CD empleadas, las variadas vías de administración y esquemas terapéuticos puestos en práctica. Además, la utilización de antígenos tumorales totales expone a las CD a un gran número de antígenos desconocidos, algunos de ellos capaces de inhibir su maduración así como a la posibilidad de generar una respuesta autoinmune.

Vía de administración: una vez inoculadas las CD, deben migrar al ganglio linfático donde harán la presentación antigénica a los linfocitos. Se han experimentado distintas alternativas para que esto ocurra de manera óptima como por ejemplo la administración de las CD por vía subcutánea o intradérmica, intravenosa (Chang, Osman et al. 2005), intratumoral (Mazzolini, Alfaro et al. 2005) e intraganglionar (Fong, Brockstedt et al. 2001, Bedrosian, Mick et al. 2003, Gilliet, Kleinhans et al. 2003). De todas estas la vía subcutánea y la inoculación periganglionar fueron las que demostraron mayor eficacia (Lesterhuis, de Vries et al. 2011) a pesar de que menos del 1% de las células inoculadas migran al GL regional (Morse, Coleman et al. 1999, de Vries, Lesterhuis et al. 2005). Para incrementar este porcentaje se han utilizado con relativa eficacia ciertas citoquinas como PGE2 y TNF- α (Scandella, Men et al. 2002, Martín-Fontecha, Sebastiani et al. 2003), induciendo una mayor capacidad de migrar hacia el GL.



Protocolos de vacunación con células dendríticas: fuente, diferenciación, moléculas de activación y cargado antigénico. Adaptada de Critical Reviews in Oncohematology 65 (2008) 191–199.

Resultados de ensayos clínicos: Hasta la fecha se han publicado numerosos ensayos clínicos basados en la administración de CD autólogas pulsadas con lisado tumoral para el tratamiento del carcinoma de cuello uterino (Santin, Bellone et al. 2005), carcinoma de riñón (Itsumi and Tatsugami 2010), melanoma (Redman, Chang et al. 2008), cáncer de próstata (Reyes, Salazar et al. 2013), sarcoma uterino (Hernando, Park et al. 2002), cáncer de ovario (Stiff, Czerlanis et al. 2013), hepatocarcinoma (Iwashita, Tahara et al. 2003) y tumores sólidos pediátricos (Lasky, Panosyan et al. 2013). Este ha demostrado ser un tratamiento seguro, capaz de inducir una respuesta inmunitaria antitumoral y generar un pequeño porcentaje de respuestas clínicas objetivas (Timmerman and Levy 1999, Anguille, Smits et al. 2014). Demostró generar inmunidad específica y una pequeña proporción de respuesta tumoral duradera en pacientes con linfoma (Hsu, Benike et al. 1996, Timmerman, Czerwinski et al. 2002), melanoma metastásico (Nestle, Alijagic et al. 1998, Thurner, Haendle et al. 1999) y cáncer de pulmón de células no pequeñas (Fong, Hou et al. 2001). En pacientes con cáncer de próstata hormonosensible el uso de una vacuna basada en CPA enriquecidas, cultivadas con una proteína de fusión entre fosfatasa ácida prostática y GM-CSF (factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos) demostró beneficio en términos de supervivencia libre de enfermedad (Kantoff, Higano et al. 2010). Sin embargo, por su alto costo y su beneficio clínico discutido, no es aún una práctica clínica habitual aunque la FDA aprobó su comercialización en Estados Unidos de Norteamérica (Holko and Kawalec 2014).

2. Otras estrategias de inmunoterapia

Por ser una estrategia que ha revolucionado el tratamiento del cáncer en la actualidad, haré una mención sucinta sobre el uso de anticuerpos monoclonales inmunoestimuladores como son ipilimumab y nivolumab (Perez-Gracia, Labiano et al. 2014).

Ipilimumab es un anticuerpo monoclonal anti-CTLA-4 aprobado por la FDA para el tratamiento del melanoma avanzado en el año 2011(Hodi, O'Day et al. 2010). CTLA-4 (del inglés *Citotoxic T Lymphocyte Antigen*) es un receptor de membrana presente en LT que inhibe el sistema inmunitario. Esta molécula es capaz de unirse a moléculas de co-estímulo como CD80 y CD86, presentes en las CPA, con mayor afinidad que CD28. De esta manera, inhibe el estímulo secundario de los LT mediada por las CPA(Hodi, O'Day et al. 2010).

Nivolumab es un anticuerpo monoclonal anti-PD-1. PD-1 (del inglés *Programmed Cell Death Protein*) es una proteína de membrana perteneciente a la superfamilia de las inmunoglobulinas presente en los linfocitos cuya función es la inhibición de la respuesta inmunitaria. El uso de nivolumab como inhibidor de esta molécula, aunque aún está en estudio, ha demostrado beneficios sorprendentes en muchos tipos de tumores como cáncer de pulmón de células no pequeñas, melanoma y cáncer renal(Topalian, Hodi et al. 2012).

2. Cáncer de colon

1. Incidencia y mortalidad

El cáncer de colon(CCR) es el tercer cáncer en frecuencia en varones y el segundo más frecuente en mujeres. Se diagnostican cerca de 13.558 casos por año en Argentina, lo que representa el 11,8% del total de tumores. La mortalidad asociada a esta patología se calcula cercana a las 6.900 personas/año (<http://www.msal.gov.ar/inc/>) (Jemal, Center et al. 2010).

2. Edad y factores socio-económicos

La edad es el factor demográfico más importante que incide en la aparición del CCR. De hecho, el CCR esporádico aumenta drásticamente por encima de los 45-50 años. Sin embargo, en los últimos años se ha registrado un aumento en la incidencia de esta patología en poblaciones más jóvenes probablemente debido, al menos en parte, a su diagnóstico más precoz (Lee, Fletcher et al. 1994, Davis, Marcet et al. 2011).

La incidencia de CCR y su mortalidad es mayor en países desarrollados. Este hecho podría estar relacionado con el tipo de dieta con alto contenido graso, el consumo de carnes rojas, el sedentarismo y la obesidad, que se dan en estos países(Landis, Murray et al. 1998).

3. Anatomía patológica

1. Macroscopía

A pesar de que el CCR se origina a partir de lesiones adenomatosas en general, su evolución puede adoptar diferentes patrones con un crecimiento tanto invasivo como expansivo. Los tumores del colon proximal habitualmente crecen como pólipos o masas exofíticas. Por el contrario, aquellos tumores que crecen en el colon izquierdo presentan más frecuentemente un crecimiento circunferencial. Así, la manifestación clínica más frecuente es constipación, diarrea u obstrucción intestinal(Carraro, Segala et al. 2001, Katoh, Yamashita et al. 2011). A pesar de estas diferencias en su apreciación macroscópica, los tumores derechos e izquierdos son similares en cuanto a su pronóstico(Weiss, Pfau et al. 2011).

2. Microscopía

La variedad histopatológica más frecuente es el adenocarcinoma. El grado de diferenciación histológica se basa en su capacidad de formar estructuras glandulares y la morfología celular (citología). Los tumores bien o moderadamente diferenciados presentan un patrón glandular, los indiferenciados están constituidos por formaciones sólidas con cordones celulares, marcada atipia y pleomorfismo celular, y un alto índice mitótico. Existen algunos tumores que producen gran cantidad de mucina. Generalmente tienen un comportamiento localmente invasivos y una menor respuesta al tratamiento quimioterápico tanto adyuvante como neoadyuvante(Shin, Yu et al. 2011, Lee, Han et al. 2013).Se pueden hallar también otros tipos histológicos, como el carcinoma adenoescamoso, tumor neuroendócrico y el carcinoma medular.

4. Patrón de diseminación y estadio de la enfermedad

El CCR se disemina por vía linfática y hemática, por contigüidad y transperitoneal. El sitio más frecuente de diseminación son los ganglios linfáticos regionales, hígado y pulmón. Por vía hematológica drenan en primer lugar en el hígado. Son una excepción los tumores que crecen en el tercio inferior del recto, que pueden metastatizar a pulmón directamente debido al drenaje venoso de la vena hemorroidal inferior a la vena cava inferior.

Para su estadificación se usa actualmente el sistema TNM de la AJCC / UICC basada en datos clínicos y anatomopatológicos. Considera la profundidad de la lesión, el número de ganglios linfáticos afectados y la presencia de metástasis a distancia. Esta forma de estadificar da información pronóstica y terapéutica(<https://cancerstaging.org>).

5. Manifestaciones clínicas

El CCR se detecta habitualmente en tres contextos clínicos: por la presencia de síntomas y/o signos sugestivos; por su búsqueda activa a través del tamizaje en pacientes asintomáticos de riesgo; o de urgencia por perforación, obstrucción o sangrado agudo gastrointestinal. La forma de diagnóstico más frecuente es por síntomas o por sangrado oculto en materia fecal. Sin embargo, el rastillaje ha demostrado ser eficaz en la prevención y el diagnóstico precoz de CCR en pacientes asintomáticos(Levin, Lieberman et al. 2008). La videocolonoscopia en pacientes asintomáticos de riesgo disminuye un 18% (11-25%; IC: 95%) la incidencia y un 21% (20-35%) la mortalidad por CCR(Brenner, Stock et al. 2014).

6. Tratamiento

El tratamiento del CCR varía según el estadio de la enfermedad. Al momento del diagnóstico, en el 80% de los casos, se encuentra localizado, es decir confinada al colon y/o ganglios linfáticos regionales, y el único tratamiento curativo es el quirúrgico. En ciertos casos con alto riesgo de recaída pueda requerirse también quimioterapia adyuvante(Berger, Sigurdson et al. 2005). El restante 20% de los pacientes a los que se les diagnostica CCR se presentan con enfermedad metastásica de inicio. Los sitios más frecuentes de metástasis son hígado, pulmón, ganglio linfático y peritoneo. En este estadio la enfermedad es incurable, adquiere mayor importancia el tratamiento quimioterápico y, eventualmente, quirúrgico, con una supervivencia a 5 años del 10% aproximadamente(Sargent, Kohne et al. 2009).

3. Microambiente tumoral

El microambiente tumoral es el conjunto de elementos que constituyen un tumor. Clásicamente se ha considerado a las células tumorales como el principal elemento de este sistema. Sin embargo, en el tumor co-existen un gran número de elementos celulares y no celulares que evolucionan e interaccionan junto a las células neoplásicas. Actualmente se reconoce la importancia de cada uno de estos elementos y, más específicamente aún, las relaciones que se establecen entre ellos como un factor clave durante la carcinogénesis, la progresión de una neoplasia y su respuesta al tratamiento (Juntila and de Sauvage 2013). De modo esquemático y a fin de comprender este complejo sistema se pueden identificar cinco elementos: células tumorales, matriz extracelular, células inflamatorias, vasos sanguíneos y factores solubles (figura 10).

1. Célula tumoral

Una neoplasia se origina a partir de la proliferación clonal de una célula con una alteración genética germinal y/o somática. A pesar de esto, en un mismo tumor coexisten células con diferente potencialidad proliferativa y/o de auto-renovación. Se postulan dos modelos que explicarían este hecho: el modelo estocástico y el modelo jerárquico. El modelo estocástico postula que todas las células tumorales tienen el mismo potencial de iniciar y mantener el crecimiento tumoral pero su actividad se determina a partir de factores extrínsecos dados por el microambiente tumoral (células del sistema inmunitario, factores de crecimiento, estado de oxigenación, etc) y/o factores intrínsecos (ej: momento del ciclo celular en el que se encuentra) (Anderson, Weaver et al. 2006). El modelo jerárquico propone una jerarquía funcional de los distintos tipos celulares. Existiría distinta capacidad proliferativa de forma análoga a lo que sucede en tejidos normales. Las células maduras con muy baja capacidad proliferativa son reemplazadas por un pool de progenitores rápidamente proliferativos que a su vez se mantienen por un pequeño grupo de células troncales, las que poseen mayor capacidad de proliferar y de diferenciarse. De acuerdo a este modelo un tumor mantiene esta misma jerarquía con un grupo de células que son biológicamente diferentes a la población de células que forman la masa tumoral, con capacidad de auto-renovación, manteniendo su potencialidad proliferativa en las células hijas (Greaves and Maley 2012).

2. Fibroblastos asociados al tumor (FAT)

Los fibroblastos, células de origen mesenquimático, componen y mantienen la estructura de los tejidos. En situación basal o quiescente secretan una serie de sustancias que actúan en forma autócrina y/o parácrina con efecto antitumoral (Dotto, Weinberg et al. 1988). Debido a su gran plasticidad, los FAT, adquieren características particulares como una mayor capacidad proliferativa, de producir matriz extracelular y de secretar citoquinas claves que pueden facilitar el crecimiento tumoral. Los FAT secretan TGF- β (del inglés *transform growth factor*) que actúa sobre las células epiteliales provocando por un lado el arresto celular y apoptosis (Bierie and Moses 2010) y, por otro, inducen un fenotipo mesenquimático que se denomina transición epitelio-mesenquimal. Esta transformación fenotípica da a los tumores un comportamiento más agresivo y con mayor capacidad de generar metástasis (Bierie and Moses 2010, Gao, Vahdat et al. 2012). De hecho, el aumento de células estromales ha sido correlacionado con mal pronóstico en pacientes con cáncer de páncreas (Fujita, Ohuchida et al.

2010) y mama(Yamashita, Ogawa et al. 2012). Se ha descrito también para los FAT un potente efecto pro-angiogénico mediado por la secreción HGF (factor de crecimiento hepatocitario), VEGF (factor de crecimiento endotelio vascular) y SDF-1 (factor derivado de células estromales I)(Orimo, Gupta et al. 2005, Polanska and Orimo 2013).

3. Matriz extracelular (MEC)

La matriz extracelular es el conjunto de moléculas secretadas por las células que se encuentran en el espacio extracelular. Su función es proveer sostén estructural y bioquímico a las células, y sirve como sustrato para la adhesión, la comunicación y diferenciación celular. Por MEC se entiende matriz intersticial, presente en el espacio intercelular, y la membrana basal, sitio particular y especializado de la MEC a la que se adhieren las células epiteliales. Uno de los primeros eventos en la formación del microambiente tumoral es el remodelado de la MEC generando un entorno dinámico que facilita el inicio y la progresión tumoral. Se ha demostrado ciertas propiedades o características de la MEC pueden impactar sustancialmente sobre el comportamiento tumoral y la respuesta al tratamiento(Anderson, Weaver et al. 2006). De hecho, la MEC es remodelada en forma continua por enzimas con actividad proteolítica perteneciente a familias de proteasas. Las proteasas dependientes de metales (metaloproteasas) son las más relevantes y las que han sido descritas en la gran mayoría de los tumores malignos como responsables de la degradación de la MEC. Las serinas-proteasas y las catepsinas, son otras dos familias de proteasas menos estudiadas. En general, las proteasas que intervienen en el proceso de invasión tumoral son idénticas a las que intervienen en procesos fisiológicos de remodelado tisular pero con aumento en su actividad, alteración en algunos de los mecanismos de regulación de su expresión y/o actividad, cambios en la compartimentalización (actividad enzimática en sitios no usuales), etc. Durante el proceso de degradación de la matriz se liberan también factores de crecimiento que actúan sobre las células tumorales y no tumorales, y amplifican el proceso de crecimiento e invasión tumoral(Klein, Vellenga et al. 2004, Kessenbrock, Plaks et al. 2010).

La MEC está compuesta por cuatro macromoléculas principales: sistema colágeno, fibras elásticas, glicosaminoglicanos (GAG) y proteoglicanos, y glicoproteínas(Scott 1995).

El *colágeno* y el *sistema elástico* son el componente más abundante y en conjunto forman el armazón de la MEC. Existen 25 tipos diferentes de colágenos siendo el más abundante el de tipo I, componente del tejido conectivo. Este es secretado por las células al espacio extracelular en forma de pro-colágeno que al ser clivado se transforma en colágeno. Numerosas moléculas de colágeno unidas pueden adoptar su estructura fibrilar (fibrinas). Las fibrinas se unen entre sí para formar fibras de colágeno. Existe también colágeno no fibrilar cuya función es unir fibras de colágeno entre sí y con otros componentes de la MEC. La membrana basal está formada por colágeno tipo IV, estructura más flexible que las fibras de colágeno. En el sistema elástico la proteína principal se denomina elastina, la cual abunda en tejidos y órganos con capacidad elástica(Kielty, Sherratt et al. 2002).

Los *glicosaminoglicanos* son polímeros de disacáridos con una alta densidad de cargas negativas capaces de unir agua y cationes. Los que están unidos a una proteína se los conoce como *proteoglicanos*. El único GAG que se conoce como cadena de polisacáridos pura es el ácido hialurónico (AH). Los GAG unidos a proteínas son el heparán sulfato, dermatán sulfato y

el queratán sulfato. Participan en el equilibrio hidroelectrolítico y ácido-base de la MEC. Las glicoproteínas actúan como moléculas de adhesión, importantes en la interacción célula-célula y célula-matriz. Las más importantes son la fibronectina y la laminina.

Existen también en la MEC proteínas no estructurales capaces de modular una gran variedad de procesos biológicos. En el contexto del tumor son expresadas de forma diferencial durante su desarrollo y su efecto es altamente influenciado por el entorno en el que se encuentren. Son secretadas por las mismas células tumorales, o por células del estroma como los FAT o los macrófagos asociados al tumor (MAT), y están implicadas en la inducción de la proliferación, invasión, remodelado de la MEC y diseminación tumoral (Wong and Rustgi 2013). Además, la MEC contiene otras proteínas que interactúan con receptores de membrana celular, estableciéndose un verdadero “diálogo” entre la MEC y las células del entorno transfiriendo información de uno a otro lado. Ciertas proteínas de matriz activan receptores tirosín kinasa como integrinas, EGFR o FAK presentes en las células tumorales, afectando la migración, la proliferación y la capacidad de metastatizar de estas células (Pupa, Menard et al. 2002, Alphonso and Alahari 2009).

4. Infiltrado inflamatorio

En diferentes tipos de tumores el tipo y grado del infiltrado inflamatorio puede tener correlación clínica, valor pronóstico y/o predictivo (ver cap. 1.1.4.4). En este sentido, los grupos celulares que componen el infiltrado inflamatorio más estudiados son los linfocitos, los macrófagos asociados al tumor (MAT) y las células mieloides supresoras (MDSC).

Los linfocitos son las principales células efectoras de la inmunidad adquirida o específica. Como se explicó previamente, estos pueden ser linfocitos efectores LTc, LTh o LTreg. Por su papel inmunosupresor en esta sección nos detendremos en estos últimos. Los LTreg se identifican por ser células CD4⁺/CD25⁺/FOP3 (*forkhead/winged helix transcription factor*)⁺. Pueden originarse en el timo como LTreg (centrales) o ser linfocitos efectores que sufren un cambio fenotípico en un tejido periférico (LTreg periférico). Los LTreg se caracterizan por suprimir la respuesta inmunitaria a través de la secreción de IL-10. En sangre periférica corresponde al 5-10% de los linfocitos CD4⁺ y, del 20% al 30% dentro del tumor. Se ha demostrado que la relación LT eff / LT FOXP⁺ es un marcador pronóstico en algunos tumores (Naito, Saito et al. 1998, Nakano, Sato et al. 2001, Sato, Olson et al. 2005).

Los MAT son claves en la génesis tumoral a partir de procesos de inflamación crónica. Se los encuentra principalmente en sitios de hipoxia y son atraídos por quemoquinas como MCP-1 (*monocyte chemoattractant protein-1*), M-CSF (*monocyte colony stimulating factor*), G-CSF (*granulocyte colony stimulating factor*), y VEGF (*vascular endothelial growth factor*) (Leek and Harris 2002). Estas moléculas son secretadas por los FAT y otras células del sistema inmunitario. Pueden promover el crecimiento tumoral a través de la producción de factores pro-angiogénicos, la secreción de enzimas para el remodelado de la MEC y la supresión del sistema inmunitario. En general, su presencia en el tumor se asocia a peor pronóstico (Zhang, Gao et al. 2011, Zhang, Wang et al. 2011).

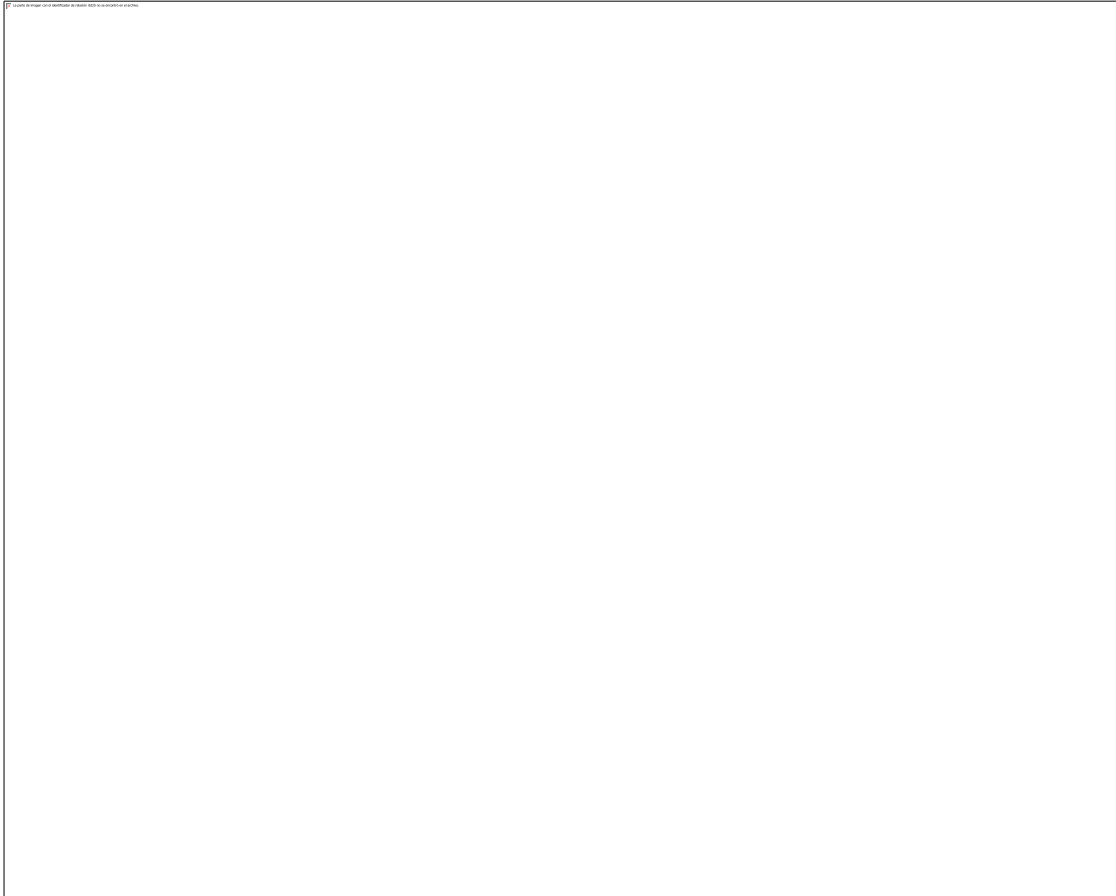
Las MDSC constituyen una población heterogénea de células inmaduras compuesta por macrófagos, granulocitos, CD y otras poblaciones de origen mieloides en estadios tempranos de

diferenciación que ejercen una actividad inmunosupresora en el microambiente tumoral(Gabrilovich and Nagaraj 2009). En ratones, las MDSC se definen como células con un fenotipo Gr-1⁺ CD11b⁺ que se acumulan en el bazo, y en algunos casos en ganglios linfáticos de animales portadores de tumor(Gabrilovich, Velders et al. 2001). Las MDSC endocitan proteínas solubles *in vivo*, las procesan y luego presentan los epitopes antigénicos e inducen anergia en los linfocitos T. Además promueven la expansión de células T reguladoras CD4⁺CD25⁺ Foxp3⁺*in vivo* de manera dependiente de la presencia de IFN- α e IL-10(Huang, Pan et al. 2006).

5. Vasos sanguíneos

La red de vasos que irriga un tumor es heterogénea, dinámica y, muchas veces, limitante del crecimiento tumoral(Ferrara and Kerbel 2005). El mecanismo principal por el que se forman es a partir de vasos pre-existentes por brotación (angiogénesis). Sin embargo pueden generarse también a partir del reclutamiento y diferenciación de células progenitoras endoteliales (vasculogénesis), por división de vasos pre-existentes (intususcepción), por encarcelamiento de vasos presentes en el tejido no tumoral que es rodeado por el tumor (ocurre en tejidos altamente vascularizados; se lo denomina coaptación), a partir de células endoteliales y células tumorales que adoptan un fenotipo endotelioide (mosaismo) o a partir de células tumorales completamente (mimetismo vascular)(Carmeliet and Jain 2011, Kushner and Bautch 2013).

Es probable que así como en los tejidos del sistema se encuentran vasos con características específicas, esta misma situación se repita en los tumores(Rosenberg and Aird 1999). La formación de vasos anormales y pobremente diferenciados asociada a la gran tasa de replicación celular habitualmente presente en una neoplasia genera un limitado aporte de nutrientes y numerosas áreas de hipoxia contribuyendo a la heterogeneidad intra-tumoral e inter-tumoral. Esta heterogeneidad tiene implicancias pronósticas y terapéuticas. De hecho, la densidad de vasos es un factor de mal pronóstico en pacientes con carcinoma de pulmón de células no pequeñas(Meert, Paesmans et al. 2002), CCR(Des Guetz, Uzzan et al. 2006) y cáncer de mama(Uzzan, Nicolas et al. 2004). Además, la elevada expresión de VEGF-A, ligando pro-angiogénico, se ha asociado a un peor pronóstico en CCR, pulmón y renal(Hegde, Jubb et al. 2013).



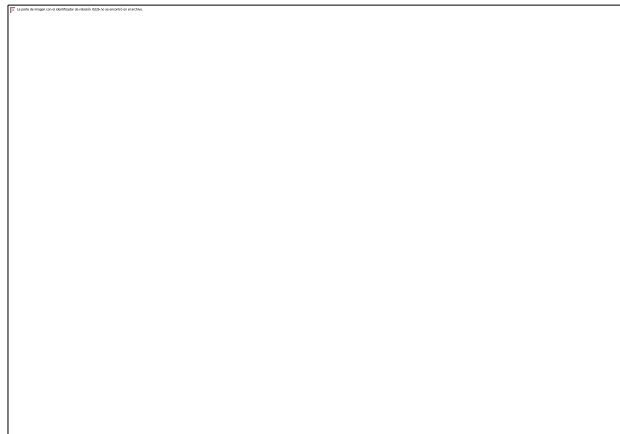
Microambiente tumoral en esquema.

4. Acido hialurónico

1. Características físico-químicas

El ácido hialurónico, miembro de la familia de los glicosaminoglicanos (GAG), está compuesto por una cadena linear de disacáridos (ácido glucurónico o AGlc, y N-acetilglucosamina o NAcGlc) (figura 11) (Fraser, Laurent et al. 1997). Cada disacárido posee una masa molecular de 400 daltons (Da) y una longitud aproximada de 1 nm. El número de disacáridos que puede alcanzar una molécula de AH es de 25.000 con un peso molecular de 10^7 Da y una medida de hasta 25 μm (Laurent, Laurent et al. 1996). A pH neutro su carga es negativa, y se diferencia del resto de los GAG por su gran longitud y por carecer de grupos sulfatos (Fraser, Laurent et al. 1997). Consecuencia de esto es que las soluciones ricas en AH poseen gran viscosidad, elasticidad y capacidad de retener moléculas de H_2O (Fraser, Laurent et al. 1997). Además, y a pesar de su simple estructura química, se ha demostrado que AH regula una gran variedad de procesos biológicos como el crecimiento, adhesión, migración y diferenciación celular (Laurent, Laurent et al. 1996, Fraser, Laurent et al. 1997, Termeer, Sleeman et al. 2003, Itano 2008, Stern 2008, Volpi, Schiller et al. 2009), e interviene en otros procesos fisiopatológicos más complejos como la reparación de heridas, inflamación e inmunidad (Termeer, Sleeman et al. 2003, Itano 2008). Los efectos de AH están asociados a su peso molecular y su concentración, el tipo de tejido en que se encuentra y su localización respecto a la célula (Itano 2008).

En situaciones fisiológicas está presente en el organismo en su forma nativa de alto peso molecular (AH APM), con una masa molecular que varía entre $0,5 \times 10^6$ y 10^7 Da. Sin embargo, en algunas circunstancias puede hallarse como una molécula de bajo peso molecular (AH BPM), con una masa que varía entre 1×10^4 y $0,5 \times 10^5$. Este último está asociado a procesos fisiopatológicos como inflamación y cáncer, teniendo un efecto pro-angiogénico y pro-inflamatorio (Tammi, Day et al. 2002). Se pueden encontrar fragmentos más pequeños conocidos como oligómeros ($\geq 10^4$ Da), con efectos similares al AH-BPM (Termeer, Benedix et al. 2002, Fieber, Baumann et al. 2004, Matou-Nasri, Gaffney et al. 2009).



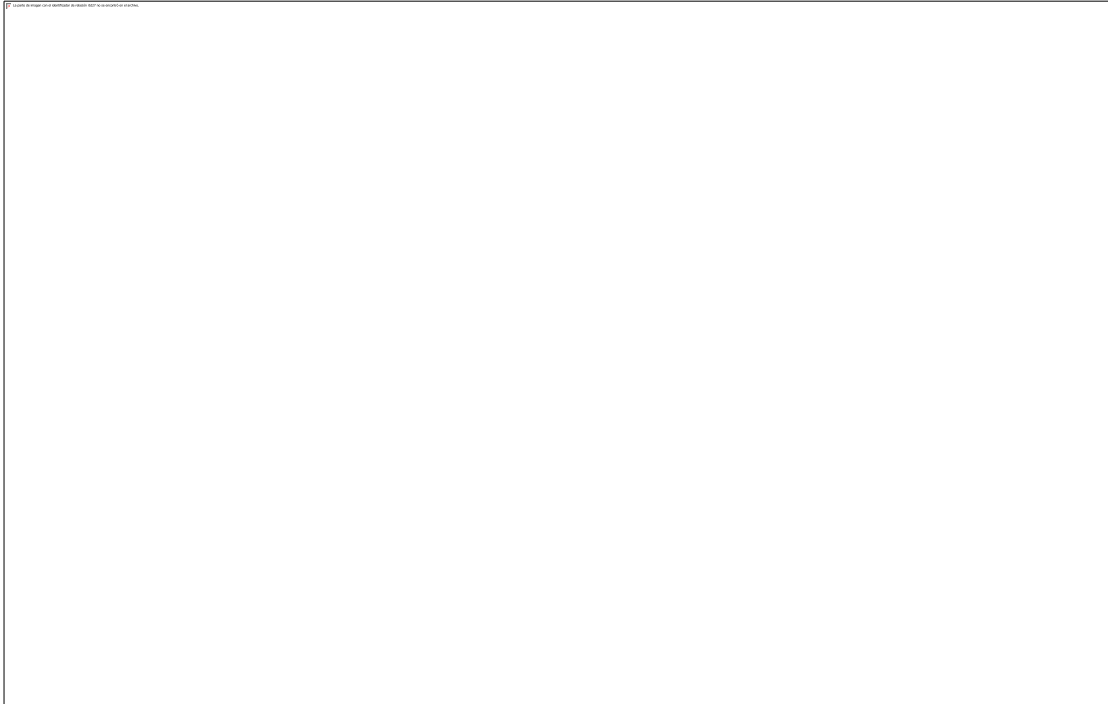
Ácido hialurónico. Estructura química.

2. Biosíntesis y degradación

La tasa de renovación de AH es importante en el mantenimiento de la homeostasis de los tejidos. De hecho, si bien su catabolismo varía de tejido en tejido, se calcula que un 30% del AH total del organismo es reemplazado diariamente (Tammi, Day et al. 2002). En este proceso participan de forma coordinada mecanismos de síntesis y degradación.

En mamíferos, AH puede ser sintetizado por tres isoenzimas (HAS-1, HAS-2 y HAS-3). Estas enzimas, proteínas integrales de membrana, agregan AGlc y NAcGlc a la cadena de AH que crece desde la membrana celular hacia el espacio extracelular, usando UDP-AGlc y UDP-NAcGlc como sustrato (Weigel and DeAngelis 2007). El primer, y más importante paso, en la regulación de la síntesis de AH es la expresión de HAS. Luego existen cambios de tipo post transcripcional y/o en el transporte a la membrana celular de esta proteína, así como cambios en la disponibilidad del sustrato, que afectan la síntesis de AH (Vigetti, Ori et al. 2006, Jokela, Jauhainen et al. 2008, Tammi, Passi et al. 2011). Las diferentes isoenzimas poseen una homología estructural del 55-70% (Spicer and McDonald 1998). Desde un punto de vista funcional, la principal diferencia entre ellas radica en la cantidad y tamaño de AH capaz de sintetizar. HAS-1 y HAS-3 producen AH BPM principalmente ($2-20 \times 10^5$ Da). Por el contrario HAS-2 produce AH de mayor peso molecular ($\geq 2 \times 10^6$) (Itano 2008) (figura 12).

La degradación de AH ocurre por procesos enzimáticos y no enzimáticos. Las enzimas con actividad hidrolasa que degradan AH son endoglicosidasas o hialuronidasas (Hyal), y exoglicosidasas. En humanos se han descrito 6 genes para Hyal: Hyal1, Hyal2, Hyal3, Hyal4, Hyal-P1 y Hyal-PH20 (específico del esperma). Sin embargo, solo se ha demostrado actividad enzimática hialuronidasa en el producto de tres secuencias: Hyal1, Hyal2 y Hyal-PH-20. Hyal2, presente en la membrana de células somáticas, cataboliza AH presente en el espacio extracelular generando fragmentos de entre 50 y 100 disacáridos (20 kDa aproximadamente). Hyal1, presente en el interior de los lisosomas, degrada AH de cualquier peso molecular generando tetrasacáridos como producto final más frecuente. Estas enzimas pueden actuar de manera secuencial, es decir que los productos de la acción de Hyal2 son metabolizados en el compartimento lisosomal por Hyal1, o en forma individual por vías separadas. Hyal-PH20, presente en el esperma, es necesaria para la fertilización del óvulo (Stern 2008).



Representación esquemática del proceso de síntesis y degradación de ácido hialurónico.

Existen dos exoglicosidasas que actúan sobre la cadena de AH en el lisosoma: N-glucuronidasa y β -N-acetilglucosidasa. Estas enzimas remueven secuencialmente unidades de azúcar del extremo no reducido de la cadena de AH que se genera por acción de las Hyal (Stern and Jedrzejewski 2006) (figura 12).

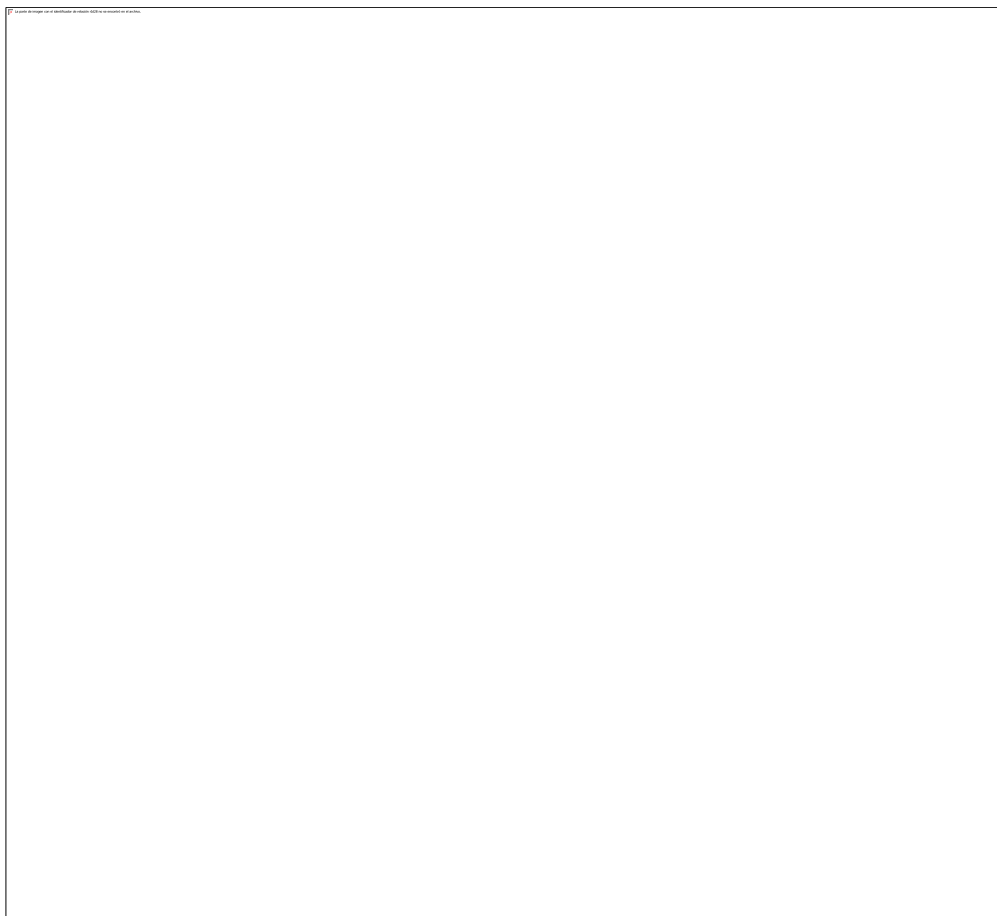
Existen también mecanismos no enzimáticos de degradación de AH como son las especies reactivas del oxígeno tales como anión superóxido (Rees, Hawkins et al. 2004), peróxido de hidrógeno (Hawkins and Davies 1996), radical hidroxilo (Al-Assaf, Meadows et al. 2000), óxido nítrico (Vilar, Ghael et al. 1997), etc.

3. Funciones

Si bien AH se concentra particularmente en el espacio pericelular de células en proliferación y migración, se puede ubicar en la MEC, en la superficie celular y dentro de la célula. Por esto puede afectar el comportamiento celular de tres modos: i) modificando las propiedades biomecánicas del espacio extra y pericelular; ii) mediante la acción directa sobre receptores de membrana que gatillan cascadas de señalización intracelular; y, por último, iii) actuando desde dentro de la célula sobre receptores intracelulares.

Clásicamente se ha reconocido a AH como una molécula netamente estructural presente en el estroma de los tejidos. En la MEC tiene una clara función de sostén, influyendo en su hidratación y sus características fisicoquímicas, particularmente en el humor vítreo del ojo, el líquido sinovial en las articulaciones y en la dermis (Fraser, Laurent et al. 1997). Además, interactúa con otros componentes de la MEC como versican, neurocan y aggrecan formando complejos glicoproteicos que la estructuran tridimensionalmente (Day and Prestwich 2002).

Por medio de su interacción con receptores celulares AH señala por diferentes vías actuando principalmente sobre la motilidad y la supervivencia de distintos tipos celulares, y regulando la expresión de genes implicados en procesos inflamatorios como por ejemplo IL-1, IL-8, MIP-1 α y metaloproteasas (Sohara, Ishiguro et al. 2001, Toole and Hascall 2002, Bourguignon, Singleton et al. 2003). Se ha identificado la expresión diferencial de HA en ovocitos previo a la ovulación, en células en estado proliferativo o en migración durante la morfogénesis, el remodelamiento y la reparación de tejidos (Toole 2001, Slevin, Krupinski et al. 2007). Sobre células endoteliales el efecto de AH varía según se trate de AH BPM o AH APM. AH BPM estimula la migración y proliferación, e induce la formación de vasos, a través de la activación de CD44 y RHAMM ((del inglés: *receptor for hayluronic- acid- mediated- motility*) que activan a su vez la transcripción de genes de respuesta temprana como c-fos y c-jun. En contraposición, la pre-incubación de estas células con AH APM neutraliza estos efectos (Deed, Rooney et al. 1997, Savani, Cao et al. 2001, Slevin, Kumar et al. 2002).



Esquema de los receptores y funciones de ácido hialurónico. Adaptado de Mini Rev Med Chem. 2009.

También se describe la presencia de AH en el espacio intracelular en relación al ciclo celular. Podría llegar a este compartimento por síntesis *de novo* o por endocitosis. Durante la fase G2/M se observa mayor concentración intracelular, en relación a los haces mitóticos y a RHAMM, lo que hace pensar que podría cumplir una función la estabilización de los usos mitóticos (Brecht, Mayer et al. 1986, Maxwell, Keats et al. 2003).

4. Receptores

La gran heterogeneidad de fenómenos biológicos que desencadena y en los que participa AH se debe, en gran medida, a la diversidad de moléculas a las que es capaz de unirse. Estas presentan diferencias de expresión en los distintos tejidos, localización celular, especificidad, afinidad y mecanismos de regulación, lo que agrega complejidad al sistema (Day and Prestwich 2002) (figura 13)

CD44 es el principal receptor de AH, y el mejor caracterizado. Es una glicoproteína transmembrana de 90 kDa codificada por un único gen ubicado en el brazo corto del cromosoma 11. Se encuentra en una gran variedad de tipos celulares como linfocitos T, granulocitos, monocitos, fibroblastos, queratinocitos y células epiteliales. Participa en múltiples procesos fisiológicos y patológicos como la adhesión y migración celular, la hematopoyesis y en la progresión tumoral (Yasuda, Nakano et al. 2002). Presenta múltiples isoformas producto de splicing alternativo entre 12 de 20 exones (Ponta, Sherman et al. 2003). Estructuralmente se compone por un dominio extracelular capaz de unirse a AH (exones 1-5 y 16), un dominio transmembrana (exón 18) y un dominio citoplasmático (exón 20). La forma estándar y que se encuentra con más frecuencia se denomina CD44st. Las isoformas se denominan CD44v1-10 y varían en su porción proximal extracelular (Fox, Fawcett et al. 1994). Algunas isoformas, como CD44v-9 y CD44v-6, se han asociado a procesos metastásicos (Wielenga, Heider et al. 1993, Khan, Cook et al. 2005). Su capacidad de unirse a AH depende de la célula que lo expresa, la isoforma, la densidad de expresión y su glicosilación. Se pueden reconocer tres estados del receptor: i) forma activa que une a AH constitutivamente, ii) forma inducible que une a AH después de su estimulación con un factor inductor (ej: TNF), iii) forma inactiva que es incapaz de unirse a AH (English, Lesley et al. 1998, Katoh, Miyagi et al. 1999, Lesley, Hascall et al. 2000, Ponta, Sherman et al. 2003). Luego de ser estimulado, CD44 interactúa con proteínas del citoesqueleto y/o gatilla cascadas de señalización intracelular a través de su dominio intracitoplasmático.

Existen además otras moléculas que comparten con CD44 el denominado "sitio de unión" a AH. LYVE-1 (del inglés: lymphatic-vessel endothelial hyaluronan receptor 1), el segundo receptor descrito con este dominio, es expresado en células endoteliales y participa en la degradación de AH (Prevo, Banerji et al. 2001). Los proteoglicanos agregan, versican, brevican y neurocan, componentes de la MEC, forman grandes complejos glicoproteicos por su unión a AH. La proteína inducida por TNF (TSG-6) es secretada en respuesta a estímulos inflamatorios y une a AH. Participa en la migración leucocitaria y el remodelado de la MEC (Day and Prestwich 2002, Ponta, Sherman et al. 2003).

Otros receptores en cambio, sin compartir el "sitio de unión" específico a AH, son capaces de interactuar con esta molécula. Son ejemplo de estos la glicoproteína inhibidor-inter- α (I- α -I), y el receptor intracelular RHAMM. I- α -I es un proteoglicano con función inhibidora de serina

proteasa compuesto por un condroitín sulfato ligado a bikunin y dos cadenas pesadas (HC1 y HC2, del inglés *heavy chains*). Es capaz de unirse a AH de forma covalente como no covalente. RHAMM es principalmente un receptor intracitoplasmático e intranuclear, pero puede ser expresado en forma transitoria en la membrana celular. Participa en procesos de migración y proliferación celular (Day and Prestwich 2002, Zhou, Weigel et al. 2002).

AH puede actuar también de manera indirecta sobre otros receptores. Por ejemplo su unión a CD44 induce la interacción con TLR2/4 que señala a través de la vía MyD88 y activa NFκB con la consecuente expresión de genes y producción de citoquinas y quemoquinas pro-inflamatorias (Termeer, Benedix et al. 2002, Bourguignon, Wong et al. 2011). AH-CD44 interactúa también con EGFR resultando en un incremento en la motilidad celular a través de la vía PKC/Akt (Kim, Lee et al. 2008).

5. Ácido hialurónico y cáncer

Como ya fue mencionado un tumor es un complejo sistema en el que interactúan elementos celulares como son las células tumorales, fibroblastos, células endoteliales, células del sistema inmunitario, y elementos no celulares como citoquinas, quemoquinas, factores de crecimiento y diferentes moléculas que conforman la MEC (Zou 2005, Laconi, Doratiotto et al. 2008). Este sistema genera un “ambiente” particular en el tumor, conocido como “microambiente tumoral”, que determina su capacidad de crecer y metastatizar (Zou 2005).

AH es un componente importante del microambiente tumoral. De hecho, en cáncer de mama, ovario, próstata, páncreas, colon y estómago la síntesis de AH se encuentra exacerbada con una relación Has/Hyal aumentada (Boregowda, Appaiah et al. 2006, Itano and Kimata 2008). Aunque no se conoce con exactitud cuál el mecanismo, ha sido implicado en el proceso de progresión tumoral. La expresión elevada de HAS está asociado a tumores más agresivos en el caso del cáncer de colon, mama, melanoma y mesotelioma (Itano, Sawai et al. 1999, Yamada, Itano et al. 2004, Bharadwaj, Rector et al. 2007). Por otra parte, una excesiva degradación de AH o un aumento en la actividad de Hyal da como resultado la generación de fragmentos de AH u oligómeros que inhiben la señalización que genera AH APM (Ghatak, Misra et al. 2002). Estos oligómeros podrían afectar directamente la supervivencia de las células tumorales induciendo apoptosis (Alaniz, Garcia et al. 2006). Paradójicamente se ha demostrado que la sobreexpresión de Hyal en cáncer de próstata, vejiga, y cabeza y cuello, promueve la invasión tumoral (Lokeshwar, Lokeshwar et al. 1996, Pham, Block et al. 1997, Franzmann, Schroeder et al. 2003).

El rol de AH en el tumor es complejo y depende de su concentración, de su peso molecular (Toole, Ghatak et al. 2008) y de su capacidad de interactuar con otras proteínas de la MEC (ej: TSG-6, SHAP) (Obayashi, Yabushita et al. 2008). Su localización (intra o extracelular) es otra característica importante que influye en su efecto biológico (Evanko and Wight 1999, Hascall, Majors et al. 2004, Day and de la Motte 2005). Algunos reportes dan cuenta de que AH facilitaría la tumorigénesis por su interacción con numerosos receptores como CD44, RHAMM, LYVE-1, TLR-2 y TLR-4 (Day and de la Motte 2005). Los mecanismos que podrían estar implicados son: i) la estimulación de la proliferación y la resistencia a la apoptosis de las células tumorales por la activación de la vía de señalización de supervivencia como MAPK, y PI3K/AKT (Yu, Toole et al. 1997, Fujita, Kitagawa et al. 2002, Bourguignon, Singleton et al. 2003, Toole 2004);

ii) estimulación de la migración e invasión a través de la estimulación de la expresión de metaloproteasas y el rearrreglo de proteínas del citoesqueleto como ankirina y Tiam-1 (Bourguignon 2001, Zhang, Thant et al. 2002); iii) modulación de genes de resistencia a multidrogas como MDR o MRP: mientras que AH-APM refuerza la actividad de MDR, los fragmentos de AH tienen el efecto contrario (Misra, Ghatak et al. 2003, Cordo Russo, Garcia et al. 2008); iv) promoción de la angiogénesis a través de la estimulación de la proliferación y migración de células endoteliales por la inducción de la señalización de FAK y ERK (Savani, Cao et al. 2001, Slevin, Kumar et al. 2002).

Probablemente la concentración y el balance entre AH APM y AH BMP, u oligómeros de AH, determine el rol de esta molécula en la progresión tumoral y la respuesta inmunitaria (Laconi, Doratiotto et al. 2008).

6. Modulación de la respuesta inmunitaria antitumoral

La falla en el reconocimiento y la destrucción de las células tumorales por parte del sistema inmunitario puede llevar al “escape” tumoral (Rabinovich, Gabrilovich et al. 2007). AH en sus diferentes formas es un potente regulador de la respuesta inmunitaria (Mummert 2005) y podría estar implicado en este proceso. Afecta la adhesión, proliferación, migración y activación de diversas células inflamatorias que expresan sus receptores (CD44, TLR-2, TLR-4, RHAMM, etc) (Jiang, Liang et al. 2007).

Las células mononucleares de sangre periférica en presencia de TNF- α , IL-2 e INF- γ secretado por linfocitos activados incrementan su capacidad de adhesión a AH (Levesque and Haynes 2001). Este participa en el reclutamiento y retención de leucocitos en sitios de inflamación (Mikecz, Brennan et al. 1995), y concretamente, AH y versican en forma conjunta facilitan la adhesión, migración y activación de macrófagos asociados al tumor (Kobayashi, Miyoshi et al. 2010). Además, fragmentos de AH a través de CD44 y TLR, induce la expresión de mediadores inflamatorios en macrófagos murinos y humanos, incrementando la síntesis de MIP-1, MCP-1, RANTES, óxido nítrico sintetasa, IL-1, IL-6, IL-8 y TNF- α (Noble, Lake et al. 1993, McKee, Penno et al. 1996, Yamawaki, Hirohata et al. 2009). Sobre macrófagos activados con LPS HA induce un fenotipo M2 (He, Zhang et al. 2013). En CD estimula su maduración vía TLR-4 (Termeer, Benedix et al. 2002, Termeer, Sleeman et al. 2003, Do, Nagarkatti et al. 2004) y facilita la interacción CD-LT durante la presentación antigénica (Mummert, Mummert et al. 2002).

Por otra parte, los linfocitos T *naive*, luego de ser activados, incrementan la expresión de CD44 adquiriendo gran afección por AH (Siegelman, DeGrendele et al. 1999). Este ha demostrado ser un importante co-estímulo para su proliferación mediada por IL-2 (Mahaffey and Mummert 2007). AH y versican participan además en la adhesión y migración de estas células a tejidos inflamados (Evanko, Potter-Perigo et al. 2012). AH nativo induce apoptosis en linfocitos *naive* estimulados con PMA o agonistas CD3 indicando que induce la muerte por activación en LT y, por lo tanto, finalización de la respuesta inmunitaria (Ruffell and Johnson 2008); facilita el efecto supresor de LTreg en tejidos periféricos (Bollyky, Lord et al. 2007); y promueve un fenotipo regulador en LT, con aumento de la expresión de FoxP3, la secreción de IL-10 y la expresión de TGF- β en su membrana (Bollyky, Falk et al. 2009). Por todo esto se postula a AH APM como un elemento para la homeostasis de los tejidos, y a AH BPM y sus

fragmentos como un signo de alarma endógeno para el sistema inmunitario(Scheibner, Lutz et al. 2006) (figura 14).



Ácido hialurónico en el contexto tumoral. El predominio de ácido hialurónico de bajo peso molecular (AH BPM) o alto peso molecular (AH APM) impacta en células tumorales, células inflamatorias y angiogénesis. LT: linfocito T; LTreg: linfocito T regulador. Adaptado de Mini Rev Med Chem. 2009.

Objetivos e hipótesis

5. Objetivo general

El *objetivo general* de este trabajo de tesis es poner a punto la técnica de generación y caracterización de CD autólogas pulsadas con extracto tumoral murino y humano, y evaluar el uso de ácido hialurónico en forma aislada y como adyuvante en un esquema de vacunación con CD.

6. Objetivos específicos

1. Evaluar el efecto antitumoral del ácido hialurónico de bajo peso molecular (AH BPM) *in vitro* e *in vivo*.

1. Evaluar en líneas tumorales de origen murino y humano el efecto de AH BPM exógeno sobre su proliferación y apoptosis.

2. Evaluar el efecto antitumoral de la administración sistémica de AH BPM en un modelo de cáncer de colon heterotópico.

2. Analizar los efectos del uso de AH BPM exógeno en el cultivo de células dendríticas derivadas de médula ósea de ratón y pulsadas con antígeno tumoral (CD/LT) en cuanto a su estado madurativo y su capacidad de migrar *in vitro* e *in vivo*.

3. Analizar los efectos del uso de AH BPM exógeno en el cultivo de CD/LT derivadas de células mononucleares de sangre periférica, de donantes sanos y de pacientes con cáncer de colon, en cuanto a su estado madurativo y capacidad de migrar *in vitro* e *in vivo*.

4. Estudiar el efecto inmunoestimulador y la eficacia terapéutica de la vacunación con CD/LT cultivadas en presencia de AH BPM en un modelo de cáncer de colon subcutáneo murino.

1. Hipótesis

Nuestra *hipótesis de trabajo* se basa en que si bien la inmunoterapia con células dendríticas es una alternativa valiosa para el tratamiento del cáncer, un paso limitante para su éxito terapéutico es la capacidad de migración de las mismas al ganglio linfático regional tras su administración. En este contexto, ácido hialurónico de bajo peso molecular podría constituir un adyuvante efectivo otorgándoles un perfil "inflamatorio" induciendo en ellas una mayor capacidad de migrar y de presentación antigénica. Esto resolvería un obstáculo sin solución hasta el momento en los esquemas de vacunación con células dendríticas.

Materiales y métodos

Parte I

2. Efecto antitumoral del ácido hialurónico en un modelo tumoral murino

1. Reactivos

Se utilizó AH APM recombinante ($1,5-1,8 \times 10^6$ Da) y AH BPM ($1-3 \times 10^5$ Da) de CPN spol.s.r.o República Checa, suministrado por Farmatrade, Buenos Aires, Argentina. Se preparó una solución stock de 5 mg/ml y se descartó la contaminación con LPS mediante un ensayo con lisado amebocyte Limulus (LAL), con una sensibilidad de detección de 0,05-0,1 unidades de endotoxina (EU) por ml (Sigma-Aldrich).

Los oligosacáridos de HA (oHA) fueron obtenidos mediante digestión enzimática de AH APM, como se describe posteriormente (Alaniz, Garcia et al. 2006). Por este método se obtienen fragmentos de AH tan pequeños como tetrasacáridos formado por dos disacáridos de longitud (AH4: 700 Da) hasta fragmentos de 14 oligosacáridos formados por 7 unidades de disacáridos (AH14: 2600 Da). Se usó también AH proveniente de tráquea bovina marcado con FITC (PM: 1×10^5 Da) marca Calbiochem para algunos experimentos.

2. Obtención de oligosacáridos de AH

AH APM (250 μ g en 50 μ l) fue tratado con 100 U hyaluronidasa (40 U/ μ l en PBS; pH 7,4) durante 12 hs a 37°C. Luego, para desnaturalizar la enzima y finalizar la reacción, se incubó la muestra 10 minutos a 90°C. Posteriormente se liofilizó y guardó a temperatura ambiente hasta su uso. Para determinar la eficiencia de hidrólisis de la enzima se realizó incubaciones a distintos tiempos (1, 3, 6, 12 y 24 horas). También se filtró con filtros de cut off 10.000 o 30.000 Da de PM, a fin de separar los fragmentos mayores a 56 KDa.

3. Animales y líneas celulares

Fueron utilizados ratones BALB/c (adquiridos en Biofucal S.A., Bs. As, Argentina), cuidados en las instalaciones de nuestro laboratorio. Todos los procedimientos fueron realizados de acuerdo con las guías para el uso y cuidado de animales de laboratorio de la Consejo Nacional de Investigaciones de los Estados Unidos de América y aprobados por el comité de ética de la facultad de Ciencias Biomédicas de la Universidad Austral.

Para los distintos experimentos se usó las siguientes líneas celulares:

CT26: línea de adenocarcinoma de colon indiferenciado murino, inducido con N-nitroso-N-metiluretano en ratones BALB/c (H-2d) y provista gentilmente por el Dr. J. Prieto de la Universidad de Navarra, España (Brattain, Strobel-Stevens et al. 1980). Estas células fueron cultivadas en medio DMEM (GIBCO, Invitrogen, USA).

Hepa129: línea de hepatocarcinoma singénico con ratones C3H/He, provistas gentilmente por el Dr. Volker Schmitz (Universidad de Bonn, Alemania). Estas células fueron cultivadas en RPMI 1640 (GIBCO, Invitrogen Argentina, Buenos Aires, Argentina).

PANCO2: línea de adenocarcinoma de páncreas murina establecida originalmente por Corbett y col. Estas células fueron cultivadas en medio DMEM (GIBCO, Invitrogen, USA) cedidas gentilmente por el Dr. J. Prieto de la Universidad de Navarra, España.

LoVo (LoVo ATCC[®] CCL-229[™]): línea de adenocarcinoma de colon humano, originada a partir de una metástasis ganglionar supraclavicular. Estas células fueron cultivadas en DMEM 50% / DF12 50% (GIBCO, Invitrogen, USA).

Todos los medios de cultivo fueron enriquecidos con 10% suero fetal bovino (SFB) (GIBCO, Invitrogen, USA), 2 mM de L-glutamina, 100 U/ml de estreptomycin y 100 mg/ml de penicilina, y mantenidos a 37°C en atmósfera de 5% de CO₂.

4. Medición por citometría de flujo de la expresión de CD44, capacidad de unión y presencia de ácido hialurónico adherido a la membrana celular

Células en cultivo fueron contadas, ajustadas en número (1×10^6), resuspendidas e incubadas durante 30 minutos a temperatura ambiente en 100 μ l de buffer FACS (BF) (PBS/ 1% albúmina de suero bovino o BSA)+ suero normal de ratón al 2%. Fueron lavadas e incubadas durante 45 minutos a 4° C con anticuerpo anti CD44 (KM81; 10 μ g/ml) o su respectivo control de isotipo (BD Biosciences, USA). Luego fueron lavadas dos veces con BF (10 minutos cada vez), fueron fijadas durante 10 minutos a temperatura ambiente con 300 μ l de paraformaldehído al 1% en PBS y se conservaron en oscuridad a 4°C hasta ser analizadas.

La capacidad de unir AH fue evaluada en las células mediante la utilización de AH marcado con FITC. Para esto, las células (1×10^6) fueron incubadas protegidas de la luz con AH FITC (1:10) durante 1 h a temperatura ambiente. Luego fueron lavadas y fijadas para su posterior análisis. La interacción de AH con CD44 fue medida a través de la incubación de las células con anti CD44 (KM81; 100 μ g/ml) durante 1 h a temperatura ambiente, antes de adicionar AH FITC.

El AH adherido a la membrana celular fue evaluado mediante el uso de una proteína capaz de unirse a AH (AH BP; Calbiochem) biotinilada. Las células fueron incubadas en hielo durante 30 minutos con AH BPM, luego fueron lavadas e incubadas con estrepto-avidina conjugada con PE. Posteriormente se cuantificó por citometría de flujo las células PE+. Para el control de la especificidad de esta reacción, se omitió la incubación con AH BPM.

Todas estas muestras fueron procesadas con citómetro de flujo (FACSCalibur, Becton Dickinson-BD, USA). Los datos fueron analizados usando el programa WinMDI 2.9 (Scripps Institute, La Jolla, CA).

5. Proliferación celular *in vitro*

Las células CT26, LOVO, HEPA129 y PANC02 (1×10^4 células en placa de cultivo de 96 wells, fondo en U) fueron incubadas en presencia de AH (20 y 100 $\mu\text{g/ml}$) en su forma de APM o de BPM (200 μl volumen total), a 37°C. En los ensayos de bloqueo de CD44, las células fueron pre-incubadas durante 45 min con anti CD44 (KM81) (10 $\mu\text{g/ml}$) antes del agregado de AH. Luego de 24 hs los cultivos fueron tratados con timidina tritiada 1 $\mu\text{Ci/ml}$ (actividad específica 20 Ci/mmol; Perkin Elmer) (timidina[3H]) durante 6 hs. Posteriormente las células fueron cosechadas, lisadas con NaOH 0,1 M/dodesilsulfato sódico (SDS; del inglés, *sodium dodecyl sulfate*) 1% (150 μl) y filtrada con filtros para retener timidina[3H]. Se lavó el filtro con tricloroacético al 10% (3 veces) y luego con etanol 100% (3 veces). Una vez secos los filtros fueron embebidos en líquido de centelleo (PPO (5g/l) / POPOP (0,3 g/l) / HAc glacial disuelto en tolueno) y se midió su actividad radioactiva utilizando un contador de centelleo β (Beckman LS 6500).

6. Detección de apoptosis *in vitro*

Las células CT26, LOVO, HEPA129 y PANC02 ($5 \times 10^5/\text{ml}$) fueron tratadas con 20 $\mu\text{g/ml}$ de AH de APM y de BPM, anticuerpo anti CD44 (KM81; 10 $\mu\text{g/ml}$) o su control de isotipo IgG proveniente de rata, en condiciones similares a las descritas en los ensayos de proliferación. Luego de 24 hs se cosecharon tanto las células presentes en el sobrenadante como las adheridas al plástico, fueron re-suspendidas en PBS frío, centrifugadas a 2500 RPM durante 5 minutos a 4°C (2 veces) y re-suspendidas nuevamente en 100 μl de Buffer Binding (1 x).

La apoptosis celular fue detectada por citometría de flujo mediante el uso de anexina V e ioduro de propidio (IP) (Alaniz, Garcia et al. 2006), lo que permitió la detección *in situ* de cambios en la superficie celular que se presentan de manera temprana en el proceso apoptótico. Las células fueron incubadas protegidas de la luz con anexina V FITC (5 μl) (eBiosciences) durante 10-15 minutos a temperatura ambiente. Luego se lavó con 200 μl de buffer binding y se resuspendió en 100 μl del mismo buffer. En el momento de realizar la medición por citometría se agregó 5 μl de IP (eBiosciences). Se utilizó citómetro FACSCalibur, Becton Dickinson-BD y los datos fueron analizados con el software WinMDI 2.9 (Scripps Institute, La Jolla, CA). El porcentaje de células apoptóticas fue determinado mediante la suma del porcentaje de células presente en ambos cuadrantes derechos o por la intensidad de fluorescencia obtenida en el histograma.

Para su cuantificación por microscopía de fluorescencia se tomó una alícuota de 50 μl de la suspensión celular, se adicionó 2.5 μl de naranja de acridina y 2.5 μl de IP, se mezcló suavemente, se incubó durante 10 minutos protegido de la luz y luego se visualizó con microscopía de fluorescencia (Nikon Eclipse CFI60) con una cámara digital (Polaroid, modelo DMC1, Cambridge). Se calculó el índice de apoptosis como la relación del n° células apoptóticas (estadio temprano y tardío) con los distintos tratamientos en comparación con el n° células apoptóticas (estadio temprano y tardío) presentes en el cultivo celular sin tratamiento.

7. Obtención de extractos citoplasmáticos

Las células fueron tratadas con AH (APM o BPM) durante 1 h como se describió previamente (3.1.5). Para la obtención de extractos citoplasmáticos, las células (1×10^7) fueron lavadas en

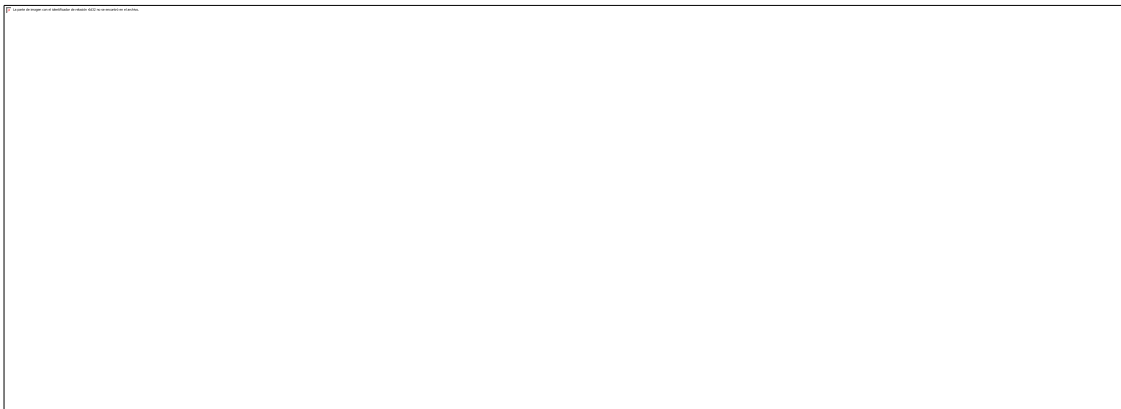
PBS frío, fueron re-suspendidas en 0,5-1 ml de buffer de lisis citoplasmático (Tris pH=8 0,02M, ClNa 0,15 M, FNa 0,1M, PMSF 1 mM, ortovanadato de Na pH=10 1mM, glicerol 10%, NP-40 1%, Leupetina, Aprotinina) e incubadas durante 25 minutos a 4°C con agitación cada 5 minutos. Luego se centrifugó durante 30 minutos a 12.000 RPM a 4°C, y se alicuotó y almacenó a -70 °C hasta su uso. (Alaniz, Garcia et al. 2006)

8. Inmunoblotting

Se colocó cantidades iguales de extracto proteico en un gel de electroforesis de sodio duodecilsulfato (SDS-PAGE), se transfirió a una membrana de nitrocelulosa, se bloqueó con PBS, Glicina 2% y molico 3% durante toda la noche. Luego se lavó durante 5 minutos con PBS-Tween 0,05% dos veces. Se incubó con anticuerpos primario específicos anti Akt fosforilado (Akt-p) (1/700) y Akt (1/600) (Cell Signaling Technology, Inc.) durante 2 hs a 37° C. Se lavó durante 10 minutos 4 veces, se incubó con anticuerpo conjugado anti rabbit (1/10.000) durante 1,5 hs a 37° C, se lavó y se reveló con solución de revelado. El resultado fue cuantificado mediante un análisis densitométrico de las imágenes digitales obtenidas usando Image Scion software.

9. Modelo tumoral y esquema de tratamiento

Los ratones, en grupos de 8 a 10, fueron inoculados con 5×10^6 células CT26 en forma subcutánea (s.c.) en el flanco derecho. Cinco días más tarde, los ratones fueron tratados durante cinco días consecutivos con AH APM o AH BPM en forma intravenosa (i.v) ($20 \mu\text{g}/100 \mu\text{l}$ de solución fisiológica). El grupo control fue tratado con solución fisiológica (SF). Se midió el diámetro mayor (L) y el diámetro menor (A) tumoral con un calibre, tres veces por semana. El volumen tumoral se calculó con la siguiente fórmula: $(L \times A^2)/2$. Se sacrificó a 3-4 animales por grupo pasados 9 días de la inoculación del tumor, se disecó el bazo en condiciones estériles y se obtuvo esplenocitos para su análisis por citometría de flujo o ensayos de cultivo mixto linfocitario (figura 15).



Modelo tumoral de adenocarcinoma de colon subcutáneo. Inoculación de células CT26 (5×10^5). Luego de 5 días, un grupo de animales recibió tratamiento con AH BPM durante 5 días consecutivos. Se analizó el infiltrado inflamatorio intratumoral, población de esplenocitos por citometría y proliferación linfocitaria a los 9 días postinoculación del tumor. Se evaluó la velocidad del crecimiento tumoral y la supervivencia de los ratones.

10. Penetración a los tejidos de AH inoculado

Con la finalidad de documentar la presencia del AH exógeno tanto en el tumor como en el bazo, a los 9 días de inoculado el tumor, los ratones fueron tratados en forma intravenosa con AH marcado con FITC (Calbiochem, USA). Luego de una hora los animales fueron sacrificados, se disecó el tejido correspondiente, se preparó y cortó. El análisis de la marca se realizó usando un microscopio de fluorescencia Nikon Eclipse CFI60.

11. Análisis del infiltrado inflamatorio tumoral por inmunohistoquímica

Los ratones fueron sacrificados y el tejido tumoral fue fijado con formalina buffer fosfato al 10%, fue embebido en parafina, cortado en secciones de 5 μm de espesor y lavado en PBS, deshidratado en xileno y posteriormente rehidratado. Se bloqueó la peroxidasa endógena con agente bloqueante de peroxidasa (Vectastain ABC Elite; Vector Laboratorios, Burlingame, CA, USA). Avidina y biotina endógenas fueron también bloqueadas usando el kit bloqueante de Laboratorios Vector. Para la detección de linfocitos T intratumoral, los cortes tumorales fueron incubados durante 45 minutos a 4°C con anti CD3 biotinilado (anticuerpo contra la cadena ϵ del complejo CD3 asociado al receptor de la célula T; 1/100) (BD, Biosciences, USA) y posteriormente incubados con el reactivo avidina-peroxidasa (Sigma Aldrich, USA). Los cortes fueron lavados con PBS e incubados con el sustrato cromógeno diaminobenzadina (DAB)(Setton-Avruij, Aquino et al. 2002). El número de células CD3⁺ por campo (magnificación 200 x) fue cuantificado considerando todos los campos de un mismo tumor. Para el análisis estadístico se utilizó el programa GraphPad Prism 4 (La Jolla, CA, USA).

12. Análisis del infiltrado inflamatorio tumoral por citometría de flujo

El tejido tumoral fue colocado en tubos con PBS frío hasta ser disgregado. Se cortó en pequeños fragmentos con un bisturí y se digirió incubando en agitación continua durante 45 minutos con colagenasa I (0,05%; relación tumor: volumen 1:4). Se filtró la solución obtenida con mesh utilizando Buffer Hanks sin Ca⁺⁺ ni Mg⁺. Se realizaron 3 lavados con SF a fin de recuperar la mayor cantidad de células posibles. Se centrifugó a 2500 rpm durante 5 min a 4°C. Los glóbulos rojos fueron lisados con buffer lisis (3 ml) durante 5 minutos a temperatura ambiente. Se completó el volumen con PBS y se centrifugó a 2500 rpm durante 5 min a 4°C. Posteriormente las células fueron procesadas como los descrito en 3.1.4 para su análisis por citometría de flujo. Los anticuerpos utilizados fueron: anti CD3 FITC (1/50), anti CD4 PE (1/50) y anti CD8 PE (1/50), y sus respectivos controles de isotipo. Luego fueron lavadas dos veces con BF (10 minutos cada vez), fueron fijadas durante 10 minutos a temperatura ambiente con 300 μl de paraformaldehído al 1% en PBS y se conservaron en oscuridad a 4°C hasta ser analizadas en el citómetro de flujo (FACSCalibur, Becton Dickinson-BD, USA). Se analizó y comparó la intensidad media de fluorescencia.

13. Caracterización de esplenocitos de ratón

El teñido y el análisis de la citometría flujo de las células provenientes de bazo se realizó como fue descrito en 3.1.4(Alaniz, Cabrera et al. 2002). Las células (1×10^6) fueron incubadas en hielo durante 30 minutos con diferentes anticuerpos: anti CD11c FITC, anti CMH-II PE y anti CD80 APC (BD Biosciences, USA) para esplenocitos o su respectivo control de isotipo (BD

Biosciences, USA). Luego las células fueron lavadas dos veces con BF (10 minutos cada vez), fueron fijadas durante 10 minutos a temperatura ambiente con 300 µl de paraformaldehído al 1% en PBS y se conservaron en oscuridad a 4°C hasta ser analizadas en el citómetro de flujo (FACSCalibur, Becton Dickinson-BD, USA). Se analizó el porcentaje de células con marca positiva respecto al total de células.

14. Generación de CD derivadas de médula ósea de ratón

Las células dendríticas de médula ósea fueron obtenidas como se ha descrito previamente (Talmor, Mirza et al. 1998). Brevemente, células provenientes de la médula ósea de ratón (1×10^6 células/ml) fueron colocadas en placas P6 y cultivadas durante 7 días en presencia de GM-CSF (20 ng/ml) e IL-4 (20 ng/ml) (BD, Bioscience) a 37°C con 5% CO₂ atmosférico. El medio de cultivo fue reemplazado al tercer y quinto día de cultivo. Las células no adheridas fueron recolectadas y utilizadas al séptimo día de cultivo. En los experimentos en los que se estudió el efecto de AH, las células fueron tratadas con AH BPM durante 24 hs previo al ensayo (20 µg/ml). La expresión de moléculas de superficie fue analizada por citometría de flujo como se describió en el apartado anterior. Las CD fueron pulsadas con lisado tumoral (1,2 gr de proteínas) a 37°C durante 18 hs, fueron centrifugadas, caracterizadas por citometría de flujo y usadas en los experimentos.

15. Lisado tumoral

El lisado tumoral fue obtenido a partir del cultivo *in vitro* de células CT26. El medio de cultivo fue removido por aspiración y las células fueron lavadas con SF 2 veces. Se colocó las placas sobre hielo y la mono-capa celular fue removida con un "scrap". Se recolectó la suspensión celular en un tubo falcon 50 ml, se centrifugó a 530 g por 5 minutos a 4°C. Se lavó 2 veces más y se resuspendió en 2,5 ml de SF cada 5×10^7 células. Posteriormente, las células fueron lisadas con 5 ciclos consecutivos de congelado a -196°C (en nitrógeno líquido) y descongelado a 37°C en un baño de agua caliente durante 5 minutos. Las partículas más grandes fueron removidas mediante centrifugación a 300 g durante 10 minutos a 18-20°C. Posteriormente se filtró con filtros de baja unión a proteínas, de 0,22 µm de diámetro. La concentración de proteínas se midió por el método de Bradford. Luego fue alicuotado y congelado a -80°C hasta su uso.

16. Tratamiento de CD con mitomicina C

CD derivadas de médula ósea a una concentración de $1-2 \times 10^5$ fueron tratadas con mitomicina C 25 µg/ml durante 30 minutos a 37°C con 5% CO₂ atmosférico protegidas de la luz. Posteriormente fueron lavadas 3 veces con medio RPMI sin suero.

17. Cultivo mixto linfocitario (CML)

Los esplenocitos de bazo de ratones con tumor s.c. (en el noveno día de inoculación), tratados o no durante 5 días con AH BPM, fueron obtenidos mediante la maceración del bazo con el émbolo de una jeringa de 10 ml. Los glóbulos rojos fueron lisados mediante la adición de solución de lisis (NH₄Cl 0,15 M, KHCO₃ 1 mM, Na₂-EDTA 0,1 mM). Posteriormente las células fueron cultivadas durante 5 días a 37°C en una atmósfera con CO₂ 5% junto con CD singénicas previamente pulsadas con antígeno tumoral y tratadas con mitomicina (como fue descrito en el punto anterior), con una relación final 10:1 (1×10^5 esplenocitos : 1×10^4 CD, por pocillo). Al

cuarto día de cultivo, se agregó timidina[3H], permaneciendo en cultivo durante 18 hs más. Luego las células fueron lisadas y la actividad radioactiva fue medida utilizando un contador de centelleo β (Beckman LS 6500). Se midió la proliferación basal de linfocitos, linfocitos/AH BPM y CD/LT.

18. ELISA IL-10, IL-12, VEGF

La presencia de IL-10 e IL-12 fue evaluada en el sobrenadante de CML; IL-10 y VEGF fue evaluada en los sueros de los ratones. Esto se realizó mediante el empleo de enzimoimmunoensayo (ELISA) sandwich (RyD system) siguiendo el protocolo del fabricante. Brevemente, en placas Nunc Maxisorp de 96 pocillos fondo plano, se adicionó el anticuerpo captura monoclonal diluido en Buffer Carbonato (0.1M NaHCO₃/Na₂CO₃, pH 9.5) incubándose durante toda la noche a 4°C. El bloqueo se realizó con PBS + 10% SFB. Después de 1 hora se incubaron los estándares de concentración y las muestras durante 2 horas a temperatura ambiente. Luego se adicionó la solución detectora con un anticuerpo monoclonal biotinilado + avidina marcada con peroxidasa durante 1 hora. Se reveló con tetrametilbencidina (TMB) + peróxido de hidrógeno (H₂O₂) durante 30 minutos en oscuridad. La reacción se frenó con 2 N H₂SO₄. Se utilizó un lector de Elisa a dos longitudes de onda diferentes, 450nm y se corrigió a 570nm. Los lavados fueron realizados con PBS + 0,05% Tween-20. En cada experimento se realizó una curva de calibrado usando como estándar el correspondiente sustrato recombinante murino. Tanto los estándares como las muestras fueron procesados por duplicado.

19. Análisis estadístico

Para el procesamiento de los datos se realizó análisis t de Student o test de Mann-Whitney según corresponda (programa InStat, GraphPad). Las curvas de supervivencia fueron comparadas mediante el uso de log-rank test. Se consideró estadísticamente significativas las diferencias con una p menor o igual a 0,05.

Parte II

3. Efecto de AH BPM sobre CD derivadas de médula ósea de ratón

1. Reactivos

Fue utilizado ácido hialurónico recombinante de bajo peso molecular (AH BPM 1-3 x 10⁵ Da) descrito en 3.1.1. Se utilizó GM-CSF, TNF- α , CCL21 y CCL19 de PeproTech; y poly I:C de Invivogen.

2. Animales

Se utilizaron ratones BALB/c y C57BL/6 de 6-8 semanas de edad provistos por Biofucal S.A. (Buenos Aires, Argentina). Ratones B6.B10ScN-TLR4^{lps-del/Jtj} (TLR4 knockout) fueron provistos gentilmente por el Dr. F. Polack (Fundación de Niños, Buenos Aires, Argentina). Ratones CD44 (background C57BL/6) knockout fueron obtenidos del laboratorio Jackson. Los animales fueron cuidados en las instalaciones del nuestro laboratorio. Todos los procedimientos fueron realizados de acuerdo con las guías para el uso y cuidado de animales de laboratorio de la Consejo Nacional de Investigaciones de los Estados Unidos de América y aprobados por el comité de ética de la facultad de Ciencias Biomédicas de la Universidad Austral.

3. Líneas celulares

Se utilizó la línea de adenocarcinoma inducido CT26 descrita en el apartado anterior. También se empleó la línea celular YAC-1, línea celular de Leucemia virus-transformed lymphoma derivada de ratones A/Sn provista gentilmente por la Dra. Mirta Giordano (Academia Nacional de Medicina, Buenos Aires, Argentina). Las células fueron mantenidas en medio modificado Dulbecco's Eagle's suplementado con suero fetal bovino al 10%, L-glutamina 2 mM, estreptomycin 100 U/ml y penicilina 100 mg/ml, y fueron incubadas a 37°C en una atmósfera con CO₂ al 5%.

4. Generación de CD derivadas de médula ósea de ratón

Las CD fueron generadas a partir de células de la médula ósea de ratones BALB/c, C57BL/6, TLR4^{-/-}, y CD44^{-/-}, como fue descrito en 3.1.14. En los experimentos con AH, las células fueron tratadas con AH BPM (50 μ g/ml) desde el día 3. Al día 7 las CD fueron pulsadas con lisado tumoral solo (200 μ g/10⁶ células/ml), AH BPM (50 μ g/ml), TNF- α (20 ng/ml), LPS (1 μ g/ml), o poly I:C (10 μ g/ml), a 37°C durante 18 hs. Luego, las células fueron lavadas, caracterizadas por citometría de flujo y utilizadas en los diferentes experimentos (figura 16).



Protocolo de generación de CD. Se cultivaron células provenientes de médula ósea de ratones wild type (wt), CD44^{-/-} y TLR4^{-/-}. Se indican las citoquinas utilizadas. Se muestra una fotografía del cultivo tomada por microscopía de luz blanca.

5. Lisado tumoral

El lisado tumoral se obtuvo del mismo modo a como fue descrito en el apartado 3.1.15.

6. Ensayo de endocitosis

Las CD obtenidas de médula ósea de ratón ($2,5 \times 10^5$) fueron incubadas durante 30 minutos a 37°C con Dextran-FITC, con o sin AH de APM o de BPM (20 µg/ml). Como control negativo se realizó el mismo procedimiento a 4°C. Luego las células fueron lavadas y fijadas para su análisis por citometría de flujo.

7. Proliferación de CD

Se analizó el efecto de AH sobre su estado proliferativo mediante la incorporación de timidina[3H], del mismo modo a como fue descrito previamente en el apartado .

8. Citometría de flujo

Las CD fueron marcadas según lo descrito en 3.1.12. Los anticuerpos utilizados fueron: anti CD11c (HL3), anti CMH-II (2G9), anti CD40 (3/23), anti CD80 (16-10^a1), anti CD86 (GL1), anti CCR7 (4B12), y sus respectivos controles de isotipo (control negativo) (BD Biosciences, San Diego, CA, USA), previa dilución apropiada en BF. Después de 30 minutos de incubación a 4°C, fueron lavadas dos veces con BF (10 minutos cada vez). Luego fueron fijadas durante 10 minutos a temperatura ambiente con 300 µl de paraformaldehído al 1% en PBS y se conservaron en oscuridad a 4°C hasta ser analizadas en el citómetro de flujo (FACSCalibur, Becton Dickinson-BD, USA). Los datos fueron analizados usando el software WinMDI2.9 (Scripps Institute, La Jolla, CA).

9. Elisa IL-12 e IL-10

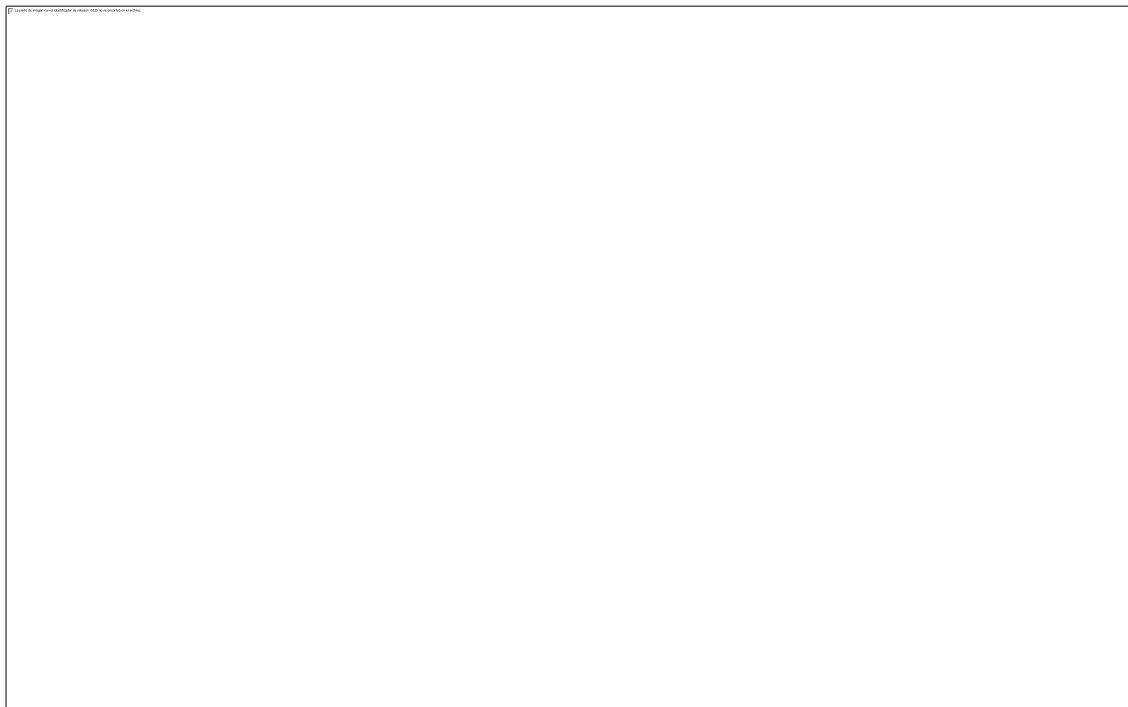
La presencia de IL-12 e IL-10 en el sobrenadante sin suero de las células en cultivo (CD/LT, CD/LT/AH BPM o DC/LT/TNF- α) fue determinada mediante el método de ELISA (OptEIAM, BD Biosciences Pharmingen, San Diego, CA, USA). La expresión de IL-10 e INF- γ fue determinada también en el sobrenadante de esplenocitos provenientes de ratones con tumor, tratados con CD/LT, CD/LT/AH BPM, DC/LT/TNF- α o solución fisiológica, y estimulados durante 5 días con células CT26 tratadas previamente con mitomicina C (como fue descrito para CD en 3.1.16). Además, la producción de IL-10 fue evaluada en el sobrenadante de las CD derivadas de ratones CD44-/- y TLR4-/- tratadas o no con AH BPM. Estos ensayos fueron realizados como tres experimentos independientes, por duplicado cada uno y según las instrucciones provistas por el fabricante (ver 3.1.18).

10. Cultivo mixto linfocitario

Se evaluó la capacidad de las CD/LT, CD/LT/LMW HA o CD/LT/TNF- α de estimular *in vitro* la proliferación de esplenocitos alogénicos mediante un CML. Las CD derivadas de médula ósea de ratón BALB/c (1×10^4) pulsadas con antígeno tumoral y tratadas con mitomicina C (descrito en 3.1.16) fueron co-cultivadas con esplenocitos alogénicos provenientes de ratones C57BL/6 (1×10^5) durante 5 días, en medio de cultivo RPMI. Al 4to día de cultivo se agregó timidina[3H], permaneciendo en cultivo durante 18 hs más. Posteriormente las células fueron lisadas y su actividad radioactiva fue medida utilizando un contador de centelleo β (Beckman LS 6500). Los datos se encuentran expresados como c.p.m. (media \pm DE; medidos por triplicado).

11. Migración *in vitro*

La capacidad de migración *in vitro* de las CD/LT fue evaluada en una cámara de Boyden de microquimiotaxis de 48 transwell (Neuroprobe, Inc., MA, USA). Las CD ($2,5 \times 10^4$ células/well) tratadas o no con AH BPM (50 μ g/ml), TNF- α (20 ng/ml), LPS (1 μ g/ml), o poly I:C (10 μ g/ml) fueron colocadas en el pocillo superior de la cámara, el cual se encuentra separado del pocillo inferior por una membrana de policarbonato con poros de 5 μ m de diámetro (membrana Nucleoporo, Neuroprobe, MA, USA). Como quimioattractante se colocó en el pocillo inferior CCL21 o CCL19 según correspondiera (100 ng/ml) o sobrenadante de cultivo de esplenocitos proveniente de ratones con tumor (figura 17). El sistema fue incubado durante 120 minutos a 37°C en una atmósfera húmeda con 5% CO₂. Luego se removió la membrana y las células que permanecieron en la cara superior de la misma fueron lavadas. Las células adheridas a la parte inferior de la membrana fueron fijadas con paraformaldehído 2% y teñidas con Giemsa May Grunwald. Posteriormente se contaron utilizando un microscopio de luz blanca (20 x). Fueron analizados diez campos/well, y se calculó el número promedio de células/campo \pm EEM. El índice de migración se calculó como la relación entre el número promedio de CD/LT tratadas por campo en comparación con el número promedio de CD/LT sin tratar por campo. Para el estudio del efecto del AH sobre la capacidad de migrar de las CD CD44-/- o TLR4-/-, se generó CD derivadas de ratones CD44-/- y TLR4-/-.



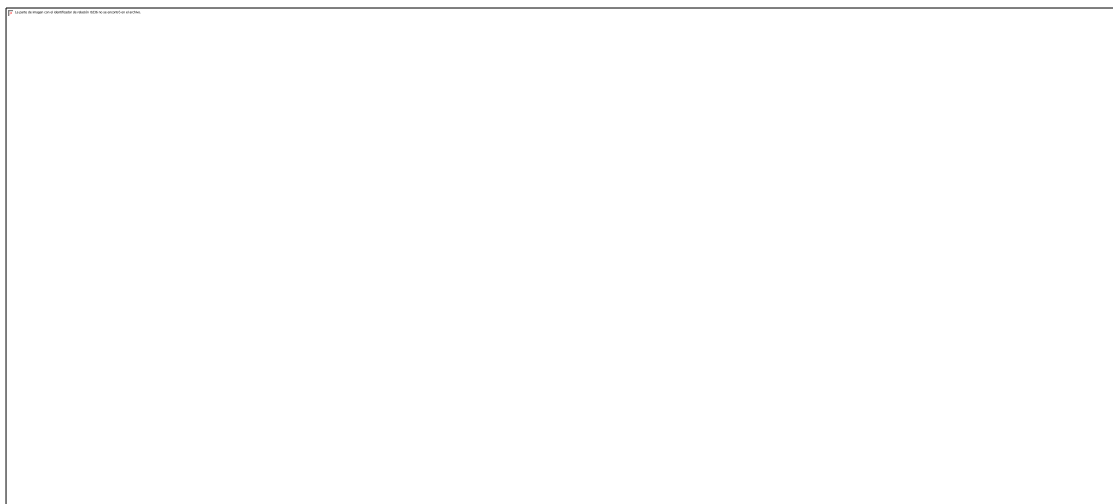
La cámara de Boyden modificada consta de un dispositivo inferior en el que se coloca el quimioattractante separado por una membrana porosa del dispositivo superior en el que se colocan las células. Las células con capacidad de migrar en respuesta al quimioattractante atravesarán los poros situándose de esta manera en la cara inferior de la membrana.

12. Migración *in vivo*

CD derivadas de médula ósea de ratones BALB/c (CD/LT o CD/LT/AH BPM) fueron teñidas con DiR o CMDil (Molecular Probes, Eugene, USA) para su posterior visualización en un bioluminómetro y su cuantificación por citometría, respectivamente. Luego de ser lavadas, se las incubó con el colorante correspondiente – 1×10^6 células en 1 ml de PBS con 4 μ l de DiR (2,5 mg/ml, disuelto en DMSO) o 1,25 μ l de CMDil (2 mg/ml, disuelto en DMSO)– durante 5 minutos a temperatura ambiente, y durante 15 minutos a 4°C. Luego fueron lavadas con PBS 3 veces, ajustadas a una concentración de 1×10^6 células en 75 μ l de SF, e inoculadas en forma s.c. en ratones con un tumor palpable (9 días postinoculación del tumor), en una zona equidistante entre la masa tumoral y el ganglio linfático inguinal más cercano.

CD marcadas con DiR fueron analizadas a las 24 y 48 hs de inoculadas mediante el uso del Sistema de imágenes Xenógeno *in vivo* (IVIS; Caliper Life Sciences, Hopkinton, MA, USA). Además, a las 48 hs, los ratones fueron sacrificados, el ganglio inguinal ipsilateral y el tumor, disecado y analizado. Las imágenes corporales completas se adquirieron con un tiempo de exposición de 0,5 segundos, mientras que para los órganos por separado el tiempo de exposición fue de 1 segundo. Para la cuantificación de las imágenes, se seleccionó y analizó una región de interés (ROI) con el programa Living Image versión 3.0 (Xenogen). El área ROI se estableció como constante, y la intensidad fue grabada como el promedio de fotones/segundo/cm² como se ha descrito previamente.

Para la cuantificación por citometría de flujo, luego de 48 h de inoculación de las CD, el ganglio linfático ipsilateral y el tumor fueron disecados. Se obtuvo una suspensión celular según el protocolo seguido en la sección A utilizando enzima colagenasa I (0,05%) (Calbiochem). Luego las células fueron fijadas con paraformaldehído 1% y analizadas en el citómetro de flujo (FACSCalibur, Becton-Dickinson, BD). Los datos fueron procesados utilizando el software WinMDI y se expresan como el número de células CMDil⁺ cada 1×10^6 células (figura 18).



Modelo de migración in vivo. Esquema del ensayo.

13. Análisis estadístico

Para el análisis estadístico se utilizó el método de Mann-Whitney o t de Student (programa InStat, GraphPad). Las curvas de supervivencia fueron comparadas mediante el uso de log-rank test. Se consideró estadísticamente significativas las diferencias con una p menor o igual de 0,05.

Parte III

4. Efecto de AH BPM sobre CD humanas derivadas de mononucleares de sangre periférica

1. Reactivos

Fue utilizado ácido hialurónico recombinante de bajo peso molecular (AH BPM 1-3 x 10⁵ Da) descrito en 3.1.1. Se utilizó GM-CSF (Pepro-Tech o Bioprofarma), CCL21 (Pepro-Tech), IL-8 y Ac anti IL-8 (R&D), y poly I:C (Invivogen).

2. Muestras de pacientes y donantes sanos

Se reclutaron muestras de pacientes con cáncer colorectal primario y metastásico (CCR) de nuestra institución, y de donantes sanos. El tejido tumoral y 20-40 ml de sangre periférica fueron obtenidos en el momento de la cirugía, bajo condiciones estériles, y fueron procesados según correspondiera según se describe en los próximos puntos. Las muestras fueron tomadas previo firma del consentimiento informado, y se les asignó un número de protocolo para mantener la confidencialidad de los datos, de acuerdo a los requerimientos de nuestro comité de evaluación institucional (CIE).

3. Obtención de células mononucleares de sangre periférica (CMSP)

Se recolectó muestra de sangre periférica en jeringa heparinizada. Esta fue mantenida a 4°C hasta su procesamiento con un máximo de 6 hs. El volumen de sangre se diluyó al medio con SF fría. Luego se colocó 10 ml de Ficoll-paque plus en tubos Falcon de 50 ml. Posteriormente se agregó suavemente, y con el tubo inclinado a 45°, 20 ml de la sangre diluida, y se centrifugó durante 30 minutos a 400xg (1400 rpm) a una temperatura de 24° C. De esta manera se observa una banda entre el suero y los eritrocitos formada por las células mononucleares. Se lavó 2 veces con SF a 2200 rpm durante 5 minutos. El pellet se re-suspendió en SFB y las células fueron contadas empleando una cámara de recuento de tipo Neubauer y tinción con Azul Tripán. Luego fueron usadas en los ensayos o fueron congeladas en suero-dimetil sulfóxido (DMSO) 10% (2 x 10⁶ células/ml) hasta su uso. El rédito fue de 2 x 10⁷ células cada 20 ml de sangre periférica.

4. Células dendríticas derivadas de mononucleares de sangre periférica

Las CMSP (1 x 10⁷ células/ml) fueron colocadas en placas de Petri de 6 pocillos durante 2 h a 37° C con 5% de CO₂ atmosférico humidificado, en medio DMEM sin suero. Luego las células adheridas fueron cultivadas durante 7 días en medio estándar RPMI 1640 (Euroclone, Milano, Italia), suplementado con SFB 10% (Euroclone), L-glutamina 2 mM, penicilina 100 U/ml, estreptomycin 100 µg/ml, GM-CSF humano recombinante (Bioprofarma, Growgen, 350 ng/ml), IL-4 humana recombinante (IL-4 R&D Systems 500 UI/ml) and 2-βMercaptoetanol (0,05 M). En los ensayos en los que se usó ácido hialurónico como estimulante, las células fueron tratadas desde el 3er día con AH BPM (50 µg/ml). Al 7mo días, las CD fueron pulsadas con lisado tumoral autólogo (200 µg/106 cel/ml) durante 18 h, con o sin AH BPM (50 µg/ml). Se utilizó como control poly (I:C) (10 µg/ml). Luego las células fueron centrifugadas y utilizadas en los experimentos. El rédito promedio fue de 2 x 10⁶ CD cada 20 ml de sangre periférica.

5. Población mononuclear enriquecida con linfocitos de sangre periférica

Las células MNSP fueron incubadas en placas de Petri de 6 pocillos durante 2 hs. La fracción de células que permaneció en el sobrenadante fue utilizada como fracción celular enriquecida de linfocitos (LSP). Estos fueron contados y congelados a -160°C en SFB con DMSO 10%. En el momento de su utilización fueron descongelados y contados nuevamente. Se obtuvo aproximadamente 6×10^6 LSP cada 20 ml de sangre periférica.

6. Tinción de linfocitos de sangre periférica con CFSE

Para realizar un cultivo mixto linfocitario LSP fueron teñidos con CFSE. Para esto las células fueron resuspendidas en PBS 0,1% BSA a 37°C a una concentración de 1×10^6 células/ml, teniendo la precaución de que no existan agregados celulares. Luego se agregó 2 μL de CFSE stock (5 mM diluído en DMSO)/ml de suspensión celular, obteniendo una concentración final de 10 μM , y se incubó durante 10 minutos a 37°C . Posteriormente se adicionó 5 volúmenes de medio de cultivo frío, se incubó en hielo durante 5 minutos, y se centrifugó y lavó con medio frío en 3 oportunidades. Finalmente fueron utilizadas.

7. Lisado tumoral

Tejido tumoral proveniente de pacientes fue tomado en condiciones de esterilidad en quirófano y preservado en seco a -80°C hasta su utilización. Para la generación del lisado tumoral se descongeló la pieza, se disgregó con jeringa y bisturí, y se lisaron las células mediante 5 ciclos de 5 minutos cada uno de congelación -196°C (nitrógeno líquido) y descongelación a 37°C en un baño de agua. A fin de remover los fragmentos más grandes, la solución obtenida se centrifugó a 300 g durante 10 minutos a $18-20^{\circ}\text{C}$. Se tomó el sobrenadante que fue filtrado con un filtro estéril, con baja unión a proteínas, de 0,22 μm (Millipore Express®). La concentración de proteínas en el lisado tumoral obtenido fue medida mediante un ensayo de Bradford. El lisado tumoral fue alicuotado y se almacenó para su posterior uso a -80°C .

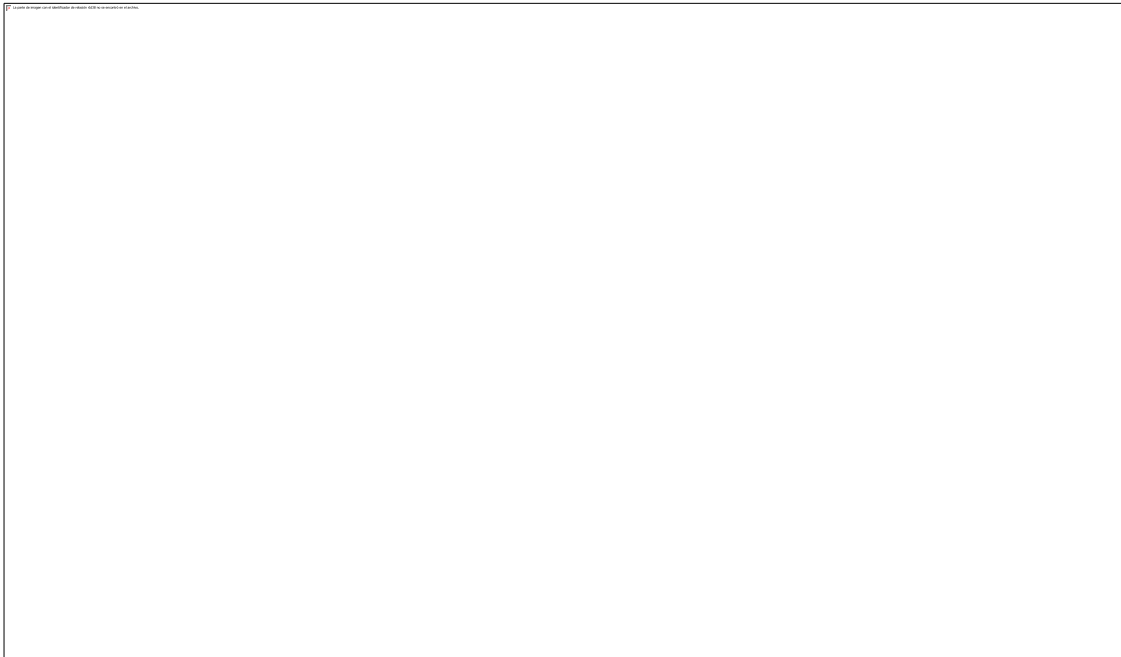
8. Análisis por citometría de flujo

La tinción y el análisis por citometría de flujo se realizaron según se describió en 3.1.12. Las células fueron teñidas con los siguientes anticuerpos conjugados con marcadores fluorescentes: anti CD11c (B-ly6), anti MHC-II (G46-6), anti CD40 (5C3), anti CD80 (L307.4), anti CD86 (2331), y su respectivo control de isotipo (BD Biosciences, San Diego, CA, USA). Luego se lavó en dos oportunidades con PBS-1% BSA, y las células fueron fijadas con paraformaldehído 1% y analizadas con citómetro de flujo (FACSCalibur, Becton Dickinson-BD, USA). Los datos fueron analizados usando el programa Cyflogic.

9. Cultivo mixto linfocitario

Para evaluar la capacidad de presentación antigénica de CD se generó CD/LT con o sin pre-tratar con AH BPM (ver 3.1.4) de DS y de pacientes, y LSP(ver 3.1.5) de DS marcados con CFSE (ver 3.1.6).

Ratones *nude* hembra fueron inoculados en forma intraperitoneal con CD/LT o CD/LT/AH BPM (1×10^6), y con LSP^{CFSE} de DS (5×10^6). Luego de 48 hs las células fueron recuperadas mediante lavado peritoneal y fueron incubadas durante 45 minutos a temperatura ambiente con un anticuerpo de ratón anti CD3 humano biotinilado (1/100) (BD) y avidina marcada con Texas Red (1:10) (Sigma). Las muestras fueron fijadas con paraformaldehído 1% y analizadas con FACSCalibur Flow Cytometer (Becton Dickinson). Se midió la proliferación basal de linfocitos solos, y de linfocitos/CD tratadas o no con AH BPM mediante la dilución de señal de CFSE en la población celular CD3⁺. Se expresó como la inversa de la diferencia en el porcentaje de células marcadas con CFSE (incremento de la proliferación) (figura 19).



Esquema del experimento. Se inoculó en ratones *nude* por vía intraperitoneal linfocitos de origen humano teñidos con CFSE (5×10^6) y CD/LT o CD/LT/AH BPM alogénicas ($1,5 \times 10^6$). 48 h más tarde se recolectaron las células mediante lavado peritoneal y fueron marcadas con anti CD3. La proliferación celular fue evaluada mediante citometría de flujo por dilución del marcador fluorescente seleccionando la población CD3⁺.

10. Medio condicionado de ganglio linfático y tumoral

Se implantó un fragmento de tumor fresco de CCR en forma s.c. en ratones *nude*. Una vez que creció, el animal fue sacrificado, y el tumor y el ganglio linfático regional fueron disecados, seccionados en pedazos menores a 1 mm³ y fueron colocados en una placa de cultivo de 24 pocillos (6 fragmentos/pocillo aproximadamente) con 500 µL de DMEM (L-glutamina 2 µmol/l, penicilina 100 U/ml y estreptomycin 100 mg/ml) con 0,05% BSA sin suero. Luego de 24 hs de cultivo a 37°C, se recolectó el sobrenadante y se almacenó a - 80°C hasta su uso.

11. Ensayo de migración *in vitro*

Para los ensayos de migración *in vitro* se utilizó el sistema de microquimiotaxis de Boydem. Las CD/LT (1,5-2,5 x 10⁴) tratadas o no con AH BPM (50 µg/ml), o poly I:C (10 µg/ml), fueron colocadas en el pocillo superior de la cámara. En el pocillo inferior se colocó como quimioattractante CCL21 (100 ng/ml), medio condicionado de ganglio linfático (MCGL), medio condicionado tumoral (MCT) o IL-8 humana recombinante (20 ng/ml; R&D). En los ensayos en los que se bloqueó IL-8, se adicionó al MCT un anticuerpo neutralizante anti IL-8 (20 µg/ml; R&D) y su control de isotipo al momento de la migración. La cámara fue incubada durante 4 h a 37°C en una atmósfera húmeda CO₂ 5%. Posteriormente fueron removidas las células de la cara superior de la membrana mediante sucesivos lavados en PBS y mecánicamente. Las células de la cara inferior, que atravesaron el poro de la membrana (migraron), fueron teñidas con DAPI y fueron contadas usando microscopía de fluorescencia UV, objetivo 10x. Se analizaron 5 campos/pocillo. Como control positivo se usó CD/LT estimuladas con poly I:C. Se comparó la media de células/campo ± DE de los distintos grupos de tratamientos, y los datos son expresados como la relación entre la media de células/campo ± DE respecto a la media de células/campo ± DE del grupo CD/LT (índice de migración).

12. Zimografía

La actividad de metaloproteasas en el sobrenadante de CD/LT con o sin pre-tratamiento con AH BPM fue determinada mediante zimografía. Para esto se midió y ajustó la concentración proteica de los mismos. Luego se sembraron 40 µl de los distintos sobrenadantes en geles de SDS 0,1%, poliacrilamida 10% y gelatina 0,1% (Sigma-Aldrich). Las muestras a analizar fueron corridas en geles de poliacrilamida al 7.5% (gel de separación) y 4% (gel de siembra) co-polimerizados con 0,1% gelatina. El gel fue incubado durante 30 minutos con buffer de lavado (Tris-HCl 50 mM y Triton X-100 2,5%) y el buffer de renaturalización (Tris-HCl 50 mM, Cl₂Ca 5mM, Cl₂Zn 1 µM y Triton X-100 2,5%). Luego se incubó durante 72 hs en buffer colagenasa (Tris-HCl 50 mM, Cl₂Ca 10mM, ClNa 200 mM y Triton X-100 2,5%). Finalmente fue teñido con Coomassie Brilliant Blue R-250 durante 30 minutos a temperatura ambiente y desteñido hasta observar las bandas con solución de destinción. La actividad gelatinasa se visualizó por tinción negativa; las imágenes del gel fueron obtenidas con una cámara digital (Canon EOS 5D), y fueron analizadas en un estudio densitométrico utilizando el programa ImageJ. La actividad relativa de metaloproteasa 2 (MMP-2) fue obtenida luego de normalizar su valor con las muestras provenientes de CD/LT sin tratar. Se utilizó sobrenadante de la línea celular HT1080 como control positivo de actividad MMP-2 y MMP-9 (Rodríguez-Salvador, Armas-Pineda et al. 2005).

13. Obtención de ARN de CD/LT

Para la extracción de ARN de CD/LT con o sin tratar con AH BPM, se utilizó TRIzol® reagent (Invitrogen). Siguiendo las indicaciones del fabricante, las células (1×10^6) fueron homogeneizadas con 1 ml de trizol. Se incubó a 25°C durante 5 minutos para la disociación del complejo de nucleoproteínas. Se agregó 200 µl de cloroformo/ml de trizol, se batió fuertemente durante 15 segundos y se incubó a 25°C 3 minutos más. Luego se centrifugaron las muestras a 12.000 g durante 15 minutos a 4°C. Para la precipitación del ARN se transfirió la fase acuosa a un nuevo tubo, se agregó 500 µl de isopropanol/ml trizol, y se incubó a 25° C 10 minutos. Se centrifugaron las muestras a 12.000 g, 10 min a 4°C. Luego se lavó el pellet de ARN con 1 ml Etanol 75%/ml de trizol, se mezcló con vortex y se centrifugó a 7.500 g durante 5 minutos a 4° C. Finalmente se dejó secar el pellet al aire, y se redisolvió el ARN en agua (30 µl) libre de ARNasa (SDS 0,5%). Se incubó durante 10 minutos a 55-60°C. Se tomó una alícuota para cuantificar, evaluar pureza e integridad.

14. PCR cuantitativa en tiempo real

A partir de 2 µg de ARN aislado, se realizó una transcripción reversa con 200 U de Transcriptasa Reversa SuperScript II (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) y 500 ng de primers Oligo (dT). Sobre el ADNc obtenido se realizó una PCR semicuantitativa. Cada 25 µl volumen de reacción contiene 1 unidad de Taq DNA polimerasa (Invitrogen), 16 µl de buffer de reacción PCR ((20 mM Tris-HCl, pH 8.4, and 50 mM KCl), 1,5 mM Mg2Cl, 200 mM de dNTPs y 0,4 mM de cada primer específico: TLR2 foward 5'-GGGTTGAAGCACTGGACAAT-3' y reverse 5'-CTGCCCTTGCAGATACCATT-3'; TLR4 foward 5'-TGAGCAGTCGTGCTGGTATC-3' y reverse 5'-CAGGGCTTTTCTGAGTCGTC-3'; CD44 foward 5'-GCGCAGATCGATTTGAATTAA-3' y reverse 5'-GTGCCCTTCTATGAACCCAT-3'; IL-8 foward 5'-GGTGCAGTTTTGCCAAGGAG-3' y reverse 5'-TTCCTTGGGGTCCAGACAGA-3'; CXCR1 foward 5'-TTTTCCGCCAGGCTTACCAT-3' y reverse 5'-AACACCATCCGCCATTTTGC-3'; CXCR2 foward 5'-TAAGTGGAGCCCCGTGGGG-3' y reverse 5'-TGGGCTCAGGGCAGGATG-3'; FPR1 forward 5'-CCCAGACCTAGAACTACCCA-3' y reverse 5'-AGGACAAAGGTGACTGCAAA3-'; CD38 forward 5'-TGAAGTTGGGAACTCAGACC-3' y reverse 5'-GTGAGGTCATCAGCAAGGTA-3'; CCRL2 forward 5'-CCTCTCCTGTATGCGTTTCT-3' y reverse 5'-TGGAATGGTCAGGTTCTTCC-3'. Las condiciones de la PCR fueron: 90 s a 94° C y luego 40 ciclos de 30 s a 94° C, 30 s a 60° C y 30 s a 72° C. DNAc fue cuantificado usando OligoGreen Single Stranded Quantification kit (Invitrogen) según las instrucciones del fabricante. Los datos fueron procesados como $\Delta\Delta C_t$. La cantidad relativa del producto de PCR amplificado de las CD/LT fue seteado como 1. Se utilizó un control sin templado (NTC) en cada una de las corridas de PCR, y todas las determinaciones fueron realizadas por triplicado.

15. Array de quimioquinas tumoral

El medio condicionado de tejido tumoral (MCT) fue generado según lo descrito en 3.1.10. La detección de quimioquinas fue realizada mediante el uso de un array de quimioquinas humanas (*human chemokine antibody array C1* (RayBio® C-Series)) según las instrucciones del fabricante. Las quimioquinas analizadas fueron: BLC, CCL28, CCL23, CTACK, CXCL16, EN78, Eotaxin1, Eotaxin2, Eotaxin3, Fractalkine, GCP2, GRO, GRO α , HCC4, I-309, I-TAC, IL-8, IP-10, XCL1, MCP-1, MCP-2, MCP-3, MCP-4, MDC, MIG, MIP-1 α , MIP-1 β , MIP-1 δ , MIP-3 α , MIP-3 β , MPIF1, NAP2, PARC, RANTES, SDF-1 α , SDF-1 β , TARC, TECK.

16. Ensayo de migración *in vivo*

En ratones *nude* con tumor humano s.c. inoculamos en forma también s.c. CD/LT tratadas o no con AH BPM y teñidas con CMDil, entre el tumor y el ganglio linfático inguinal más cercano (ver 3.2.12). Luego de 48 h los ratones fueron sacrificados, y el tumor y el ganglio linfático removidos. Para el análisis de las células presentes en el tumor y en el ganglio linfáticos, se incubó la muestra con d-colagensa 0,05% (Cambiochem), y posteriormente los glóbulos rojos fueron lisados utilizando solución de lisis (NH_4Cl 0,15 M, $\text{Na}_2\text{-EDTA}$). Las células fueron fijadas con paraformaldehído 1% y analizadas mediante citometría de flujo (FACSCalibur, Becton-Dickinson, BD). Los datos fueron posteriormente procesados utilizando el software Cyflogic. Se contabilizó el número de células CMDil⁺ cada 1×10^5 células.

17. Análisis estadístico

Para el procesamiento de los datos se realizó análisis pareado o test de Mann-Whitney según corresponda (programa InStat, GraphPad). Se consideró estadísticamente significativas las diferencias con una p menor o igual a 0,05.

Parte IV

5. Vacunación con CDpre tratadas con AH BPM en ratones con cáncer de colon

1. Modelo tumoral

Células CT26 fueron inoculados en el flanco derecho de ratones BALB/c en forma s.c. (5×10^5 células/animal). Al 7mo día de la inoculación del tumor los animales se distribuyeron en grupos homogéneos según el tamaño tumoral (tamaño promedio: 85 mm³). Fueron tratados en el día 7 y 9 con SF o CD ($2,5 \times 10^5$) incubadas con LT, LT/AH BPM o LT/TNF- α según correspondiera. Se midió el diámetro mayor (L) y el diámetro menor (A) con un calibre tres veces por semana, y se calculó el volumen tumoral con la siguiente fórmula: $V=(LxA^2)/2$. Se documentó la muerte de los animales, y los resultados fueron expresados como porcentaje de supervivencia.

Para evaluar memoria inmunológica, los animales que permanecieron más de un mes libre de recaída tumoral fueron re-expuestos a las células tumorales (5×10^5 células CT26/animal). Animales sanos igualados por edad fueron inoculados con estas células y utilizados como grupo control.

2. Ensayos de proliferación linfocitaria

Se generó un cultivo de esplenocitos provenientes de ratones con tumor (14 días post inoculación) y tratados con SF, CD/LT, CD/LT/AH BPM o CD/LT/TNF- α . Los glóbulos rojos fueron lisados mediante la adición de solución de lisis (NH₄Cl 0,15 M, KHCO₃ 1 mM, Na₂-EDTA 0,1 mM). A fin de estimularlas, los esplenocitos fueron mantenidos en cultivo en placas de 96 well con fondo romo (1×10^5 /well) durante 5 días con medio RPMI-1640 enriquecido con SFB al 10% junto con células de adenocarcinoma murino CT26 (1×10^4 /well) previamente tratadas con mitomicina C (según fue descrito en 3.1.16). La tasa de proliferación linfocitaria fue evaluada mediante la incorporación de timidina[³H]. Cada muestra fue evaluada por triplicado.

3. Ensayo de citotoxicidad

Los ensayos de citotoxicidad se realizaron según los protocolos estándar (Malvicini, Rizzo et al. 2009). Esplenocitos (8×10^6 /well) estimulados *in viro* con células CT26 (8×10^5 /well) tratadas con mitomicina C. Al 5to día de cultivo, las células fueron cosechadas, lavadas y puestas en cultivo en una placa de 96 pocillos (4×10^6 /well; células efectoras). A fin de determinar la especificidad de los esplenocitos y la actividad NK, se utilizó dos tipos de células blanco, CT26 y YAC-1 (células resistentes a la actividad NK) respectivamente, a una concentración de 4×10^5 células/ml. Luego de 4 hs de incubación a 37°C, las células fueron centrifugadas y se tomó el sobrenadante. La actividad de citotoxicidad fue evaluada con un kit de detección de citotoxicidad LDH (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany) según las instrucciones del fabricante. Los resultados fueron expresados como valores relativos de lisis normalizados según el valor de LDH en el sobrenadante de las células no tratadas.

4. Elisa IL-10 e INF- γ

La presencia de IL-10 e INF- γ fue determinado en el sobrenadante de cultivo de esplenocitos y células CT26 (ver MLR, sección 3.4.2). Estos ensayos fueron realizados como tres experimentos independientes, por duplicado cada uno y según lo descrito en 3.1.18.

5. Análisis estadístico

Para el análisis estadístico se utilizó el método de Mann-Whitney o t de Student (programa InStat, GraphPad). Las curvas de supervivencia fueron comparadas mediante el uso de log-rank test. Se consideró estadísticamente significativas las diferencias con una p menor o igual de 0,05.

Resultados

En esta sección se muestran los resultados obtenidos que evalúan el efecto de la administración sistémica de ácido hialurónico de bajo peso molecular en un modelo tumoral murino, el efecto biológico de esta molécula sobre células dendríticas *in vitro*, y su utilización como adyuvante en un modelo de vacunación con células dendríticas murinas y humanas.

Parte I

6. Efecto antitumoral del ácido hialurónico en un modelo murino de cáncer de colon

En esta primera sección presentamos los resultados obtenidos en relación al efecto ocasionado por el empleo de ácido hialurónico sobre distintas líneas de células tumorales. Luego, y a partir de estos resultados, analizamos los efectos de la aplicación de ácido hialurónico por vía i.v. en un modelo de adenocarcinoma de colon heterotópico (subcutáneo) en ratones BALB/c.

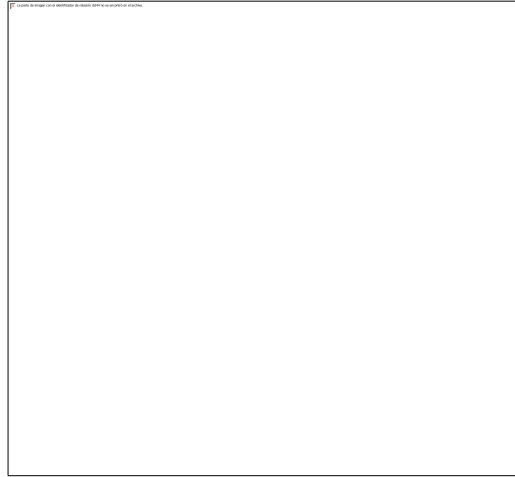
1. Líneas tumorales y su relación con AH

Para comprender la interacción que existe entre las células tumorales y el AH, en primer lugar evaluamos si las líneas celulares de origen murino CT26, HEPA 129 y PANC02, y las de origen humano LOVO, expresan CD44, principal receptor conocido de AH. Estudiamos también su capacidad de unir AH y, por último, si presentan AH unido a su membrana celular. Observamos que las células CT26 y HEPA129 presentan altos niveles de expresión de CD44 (84% y 73%, respectivamente) y en un alto porcentaje de ellas son capaces de unir AH (85% y 70%, respectivamente). Las células CT26 son las únicas de las células evaluadas que presentan capacidad de unir la proteína de unión a AH, lo cual indicaría que este líneo presenta AH adherido a su superficie (poseen 26% de marca positiva) (figura 20). La línea de adenocarcinoma humano LOVO evidenció un patrón de marcación similar que las líneas precedentes en cuanto a la expresión de CD44 (20%), la capacidad de unir AH (33%) y la presencia de AH en su membrana celular (1,7%). En las células provenientes de adenocarcinoma de páncreas murino PANC02 se observó una baja expresión de CD44 (4,9%), con gran capacidad de unión a AH (31%) y una expresión relativamente alta de esta molécula (8,8%).



Caracterización de diferentes líneas tumorales. Se estudió la expresión de CD44, la capacidad de unir AH FitC y la expresión de AH adherido a la membrana celular mediante una proteína capaz de unir AH marcada con FITC por citometría de flujo. Se muestran histogramas representativos de las líneas CT26, LOVO, HEPA129 y PANC02. Línea negra: control de isotipo. El resultado está expresado como porcentaje del total de las células marcadas positivamente (línea amarilla).

Teniendo en cuenta el alto porcentaje de células CT26 que expresa CD44 y su gran capacidad de unir AH, decidimos investigar la importancia relativa de este receptor para unir este glicosaminoglicano. Para ello realizamos un ensayo en el que las células fueron pre-incubadas con un anticuerpo bloqueante de CD44 (anti-KM81). Observamos que este bloqueo redujo un 22% la capacidad de unir AH FITC evidenciando que en parte AH se une a CD44 (80% y 58% marca positiva respectivamente) (figura 21), y que probablemente estén involucrados otros receptores en la unión de AH a estas células.



AH se une a células CT26 a través de CD44. Mediante citometría de flujo se analizó la capacidad de unión de AH FITC a células CT26 en estado basal, y luego de la incubación con un anticuerpo bloqueante de CD44 (antiCD44; KM81). Línea negra: células estado basal; línea roja: células pre-tratadas. Se expresa el porcentaje de bloqueo de unión de AH luego del tratamiento.

2. AH inhibe la proliferación e induce la apoptosis en distintas líneas celulares

Luego analizamos el efecto del AH exógeno sobre la proliferación celular *in vitro*. Así pudimos observar que AH BPM a una concentración de 20 µg/ml tiene un efecto anti-proliferativo comparado con el control (SF) sobre las células CT26 (8046 ± 937 d.p.m. vs. 15957 ± 402 d.p.m.; $p \leq 0,05$), LOVO (97927 ± 5129 d.p.m. vs 126377 ± 4110 d.p.m; $p \leq 0,05$) y PANC02 (12397 ± 1560 d.p.m. vs 25052 ± 1480 d.p.m; $p \leq 0,01$). En el caso de las células HEPA129 la incubación con AH APM (100 µg/ml) inhibió su proliferación (28807 ± 2856 d.p.m. vs 39074 ± 1779 d.p.m; $p \leq 0,05$)(figura 23).



Efecto anti-proliferativo de AH BPM. Proliferación in vitro de células tumorales tratadas con AH APM, BPM o solución fisiológica (control -) medido por la incorporación de timidina[3H]. Las barras representan la media \pm EEM de d.p.m (medido por triplicado). Mann Whitney t test; * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$.

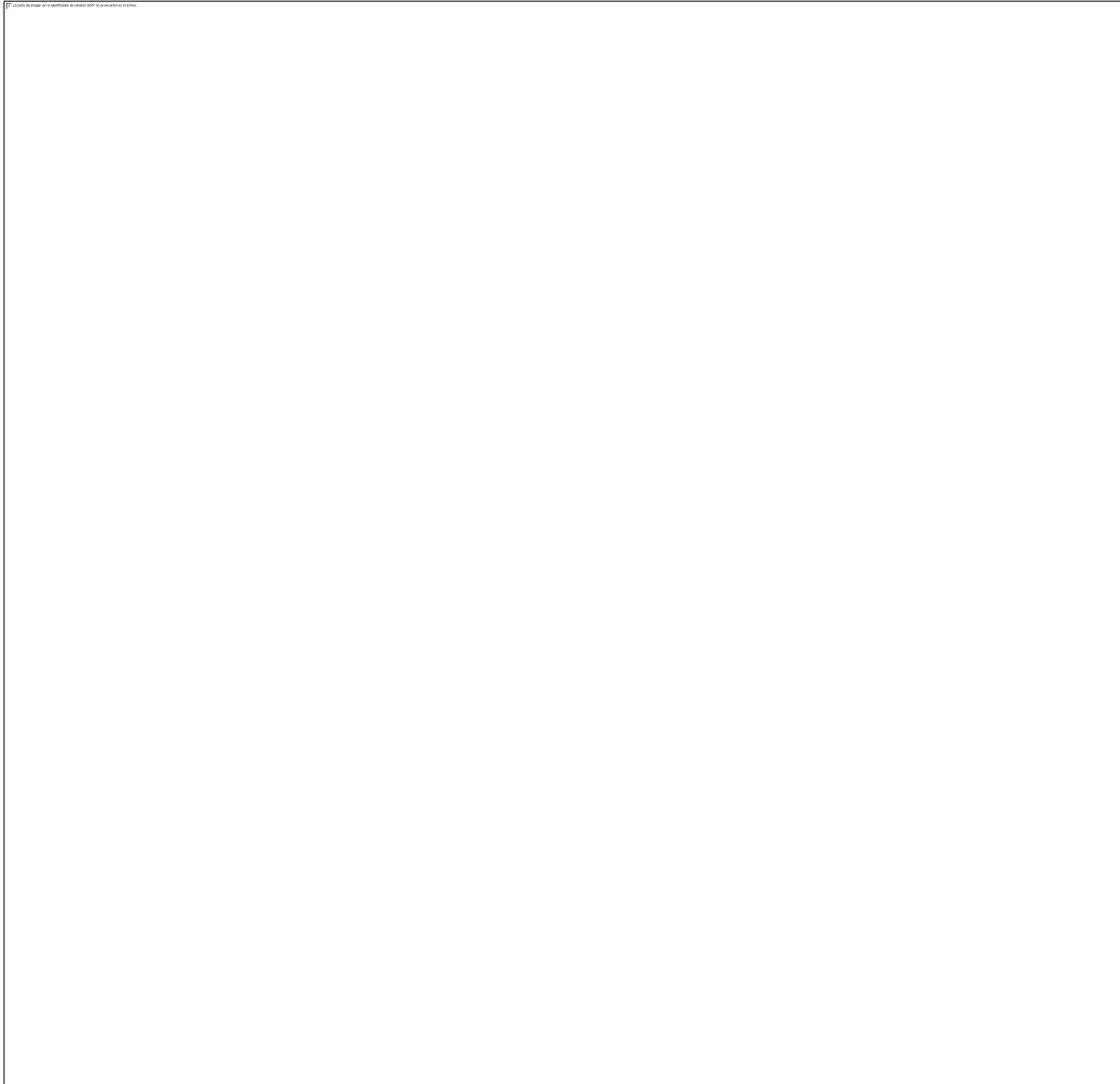
También analizamos el efecto de AH sobre el proceso de apoptosis celular mediante la tinción con yoduro de propidio/naranja de acridina. AH BPM a baja concentración (20 μ g/ml) fue un inductor de la apoptosis de las células CT26 ($2,1 \pm 0,34$ veces respecto al control; $p \leq 0,05$), HEPA129 ($2,3 \pm 0,44$ veces respecto al control; $p \leq 0,05$) y PANC02 ($2,3 \pm 0,23$ veces respecto al control; $p \leq 0,05$)(figura 23). Por otra lado, pudimos observar que AH APM y AH BPM a una alta concentración (100 μ g/ml) tienen un efecto anti apoptótico en células LOVO ($0,4 \pm 0,14$ y $0,25 \pm 0,06$ veces vs control, respectivamente; $p \leq 0,05$ y $p \leq 0,01$, respectivamente).



Efecto pro-apoptótico de AH BPM. Cuantificación de células apoptóticas y necróticas mediante la tinción con yoduro de propidio y naranja de acridina. Las barras representan el índice de apoptosis de las distintas líneas celulares tratadas durante 24 hs. con AH respecto a las células sin tratar (control -). Se grafica la media \pm EEM de 3 experimentos independientes. Mann Whitney t test; * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$.

3. AH BPM actúa a través de CD44 modulando la fosforilación de Akt en células CT26

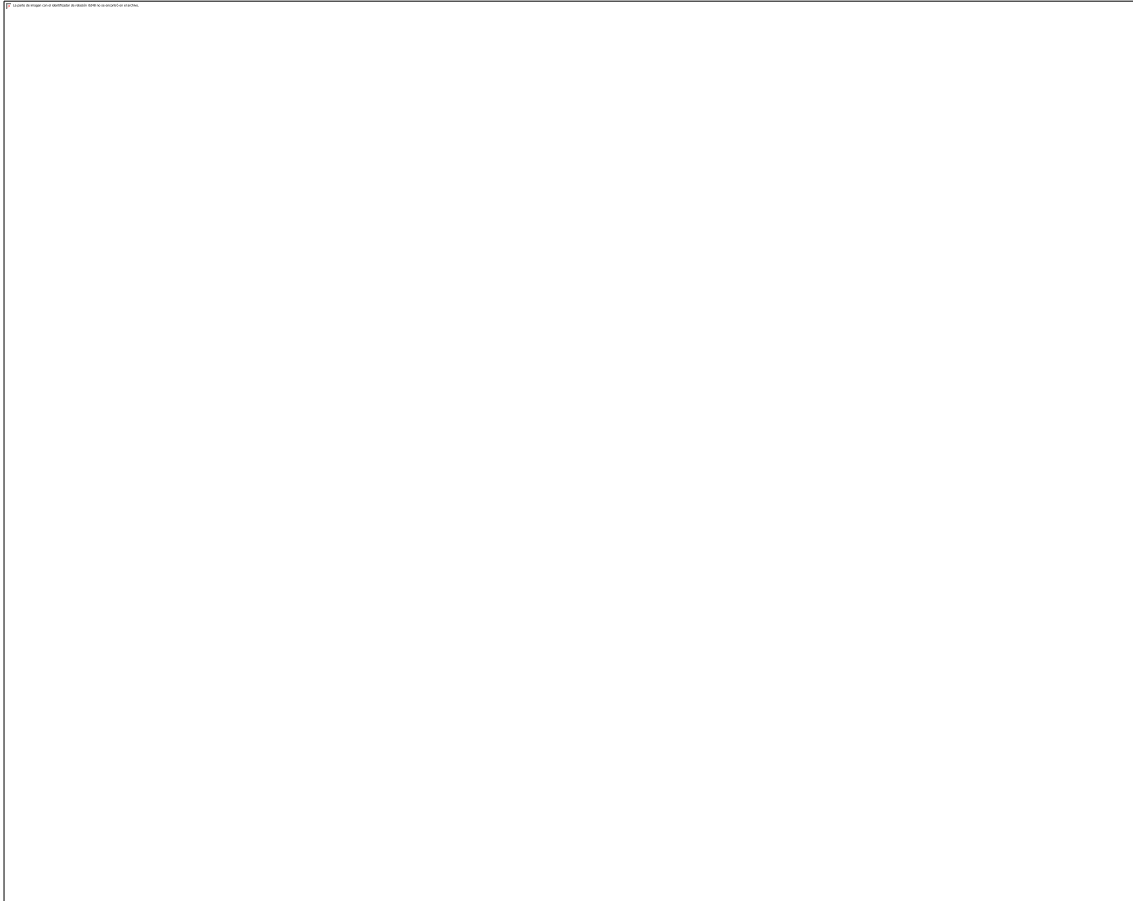
Luego estudiamos la participación de CD44 en los efectos pro-apoptóticos y anti-proliferativos de AH. Pudimos observar que bloqueando este receptor con un anticuerpo específico (KM81) los efectos anti-proliferativo y pro-apoptótico de AH BPM fueron inhibidos (figura 24 a y b, respectivamente).



El efecto anti-proliferativo y pro-apoptótico de AH BPM es mediado por CD44. a.

Cuantificación de células CT26 luego de su incubación con timidina[3H] durante 12 hs. Se analizó el efecto de AH BPM en presencia o no de un anticuerpo específico para CD44 (antiCD44, KM81). b. Porcentaje de apoptosis de células CT26 luego de tratarla o no con AH y de bloquear CD44. Se midió luego de teñir con AnexinaV FitC y yoduro de propidio (IP). Dot plot de un ensayo representativo (panel izquierdo) y análisis cuantitativo de 2 experimentos independientes (media \pm EEM) (panel derecho). Mann Whitney t test; * $p \leq 0,05$.

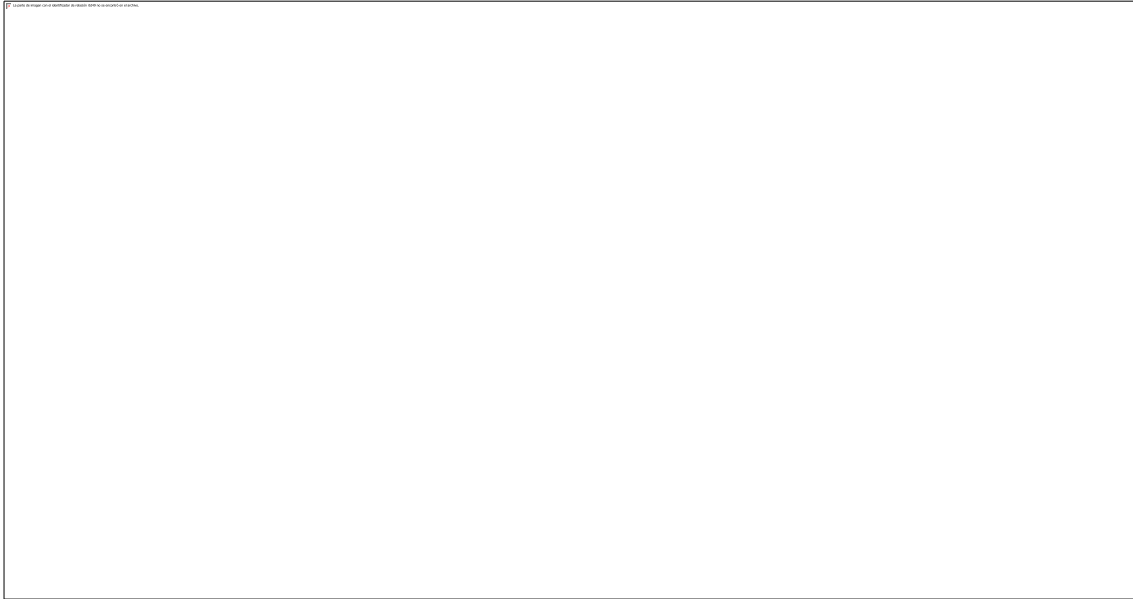
Estudiamos también los cambios en el estado de fosforilación de Akt (Akt-p), molécula de señalización implicada en mecanismos de supervivencia y migración celular, y modulada por AH (Alaniz, Garcia et al. 2006, Kim, Lee et al. 2008, Torre, Wang et al. 2010). El tratamiento con AH BPM redujo Akt-p un 50% respecto a las células sin tratar. Este efecto fue revertido parcialmente cuando las células fueron incubadas previamente con antiCD44 (figura 25).



El tratamiento con AH BPM inhibe la fosforilación de Akt. La expresión de Akt y Akt fosforilado (Akt-p) fue evaluada en las células CT26 por western blot. Los extractos citoplasmáticos fueron preparados a partir de células tratadas o no con AH BPM (20 µg/ml) durante 1 hs, antiCD44 más AH BPM o su control de isotipo más AH BPM. La expresión de Akt total fue usada como control de carga. Se realizó un análisis densitométrico de las bandas de western blot (a) y los resultados fueron expresados en unidades arbitrarias (b).

4. AH inhibe la velocidad de crecimiento tumoral e incrementa la sobrevida de ratones portadores de tumor

Teniendo en cuenta los resultados previos, y para evaluar el efecto del AH sobre el crecimiento tumoral *in vivo*, utilizamos un modelo murino de cáncer de colon. Para el desarrollo del mismo se utilizaron ratones BALB/c a los que se les inoculó en forma s.c. células CT26. Luego de 5 días y durante 5 días consecutivos, estos ratones fueron tratados de forma i.v. con 20 µg de AHAPM (1x10⁶ Da), AHBPM (1x10⁵ Da), oligómeros de AH (oAH) diluídos en 100 µl de SFo el vehículo solo a modo de control (SF). Así pudimos observar que el tratamiento con AH BPM y oAH, pero no el AH APM, incrementa la supervivencia media de los ratones con una sobrevida a los 35 días del 80%, 70% y 0% respectivamente (long Rank test, p≤0,01) (figura 26).



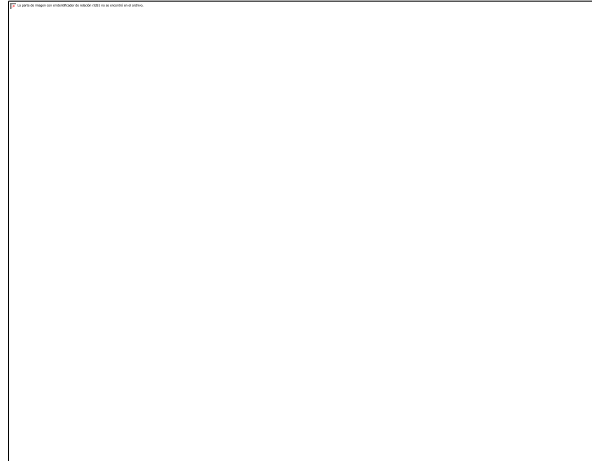
AH BPM incrementa la supervivencia de ratones con tumor. Ratones BALB/c fueron inoculados con células CT26 (5×10^5) en forma s.c. Al día 5to se inició el tratamiento durante 5 días consecutivos con 20 μg de AH APM, AH BPM, oAH o solución fisiológica (SF). Curva de supervivencia. Kaplan-Meier. Log-rank test.* AH BPM vs SF; $p \leq 0,01$.

Asimismo, tanto AH BPM como oAH disminuyeron la velocidad del crecimiento de los tumores e indujeron una respuesta tumoral completa en el 20% de los mismos (figura 27, a y b).



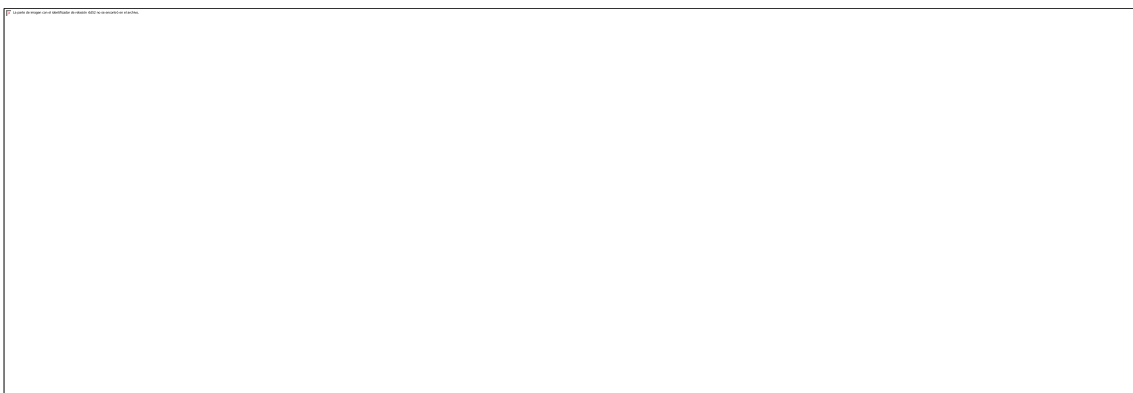
AH BPM disminuye la velocidad de crecimiento tumoral. Los ratones fueron inoculados con células CT26 y tratados con AH de distinto peso molecular durante 5 días. El volumen tumoral fue medido 3 veces por semana durante 30 días. a. Promedio del volumen tumoral en los distintos grupos de tratamiento (media \pm EEM mm³, n = 10 \pm 3). La flecha indica el inicio del tratamiento. Mann Whitney t test; *p \leq 0,05. b. Curva de crecimiento tumoral de cada ratón individual en los distintos grupos de tratamiento (media \pm EEM mm³).

Para comprobar que el AH inoculado accedió al tumor, en un grupo de ratones se inyectó en forma i.v. AH marcado con FITC. Mediante microscopia de fluorescencia pudimos observar su presencia en cortes histológicos de la lesión tumoral (Figura28).



AH inoculado alcanza el tejido tumoral. Microscopía de fluorescencia del tejido tumoral luego de la administración exógena de HA FITC en animales portadores de tumor (9no día). El panel insertado representa tejido tumoral obtenido de animales inyectados con solución fisiológica (400 x). AH BPM incrementa el infiltrado inflamatorio intratumoral

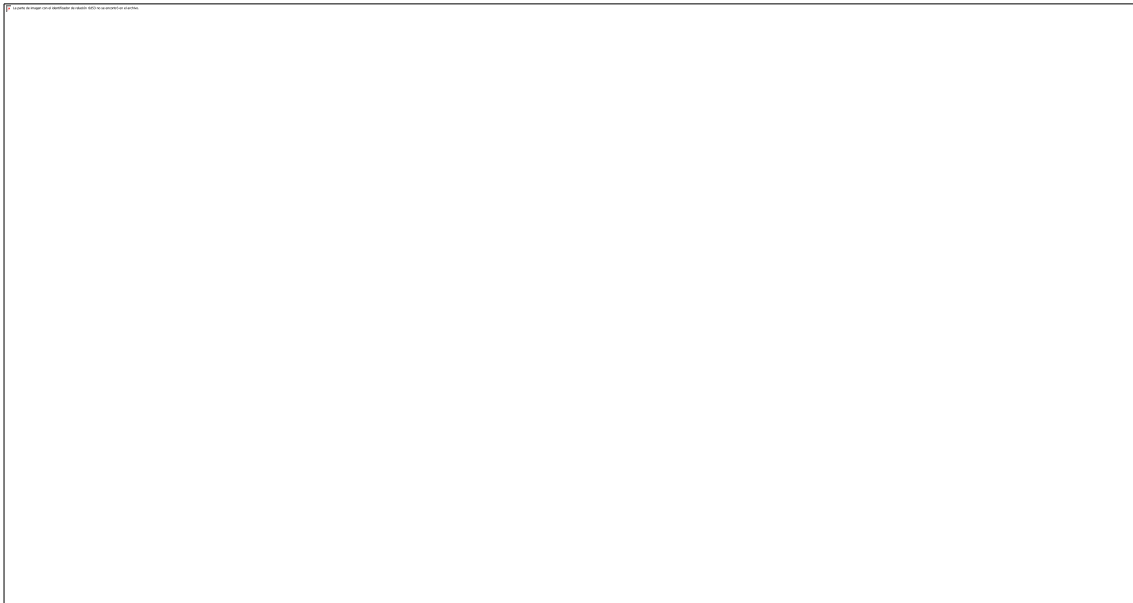
A fin de estudiar el efecto de AH sobre el sistema inmunitario en este modelo, analizamos el infiltrado inflamatorio intratumoral. Observamos en cortes histológicos teñidos con hematoxilina y eosina, y marcados por inmunohistoquímica que los animales tratados con AH BPM presentaban un mayor infiltrado de células CD3⁺ en comparación con los animales controles ($11 \pm 0,95$ células/campo vs $5,7 \pm 0,76$ células/campo; $p \leq 0,01$) (figura 29).



AH BPM incrementa el infiltrado inflamatorio intratumoral. Análisis histológico de tejido tumoral teñido con H&E. Las flechas señalan células infiltrantes mononucleares en tejido tumoral de un animal control (foto izquierda) y uno tratado con AH BPM (foto derecha).

Análisis semicuantitativo de células CD3⁺marcadas por inmunohistoquímica (gráfico de barras). Cuantificación: número de células positivas/tejido tumoral (200X). Los valores son expresados como la media \pm EEM. Mann Whitney. ** $p \leq 0,01$

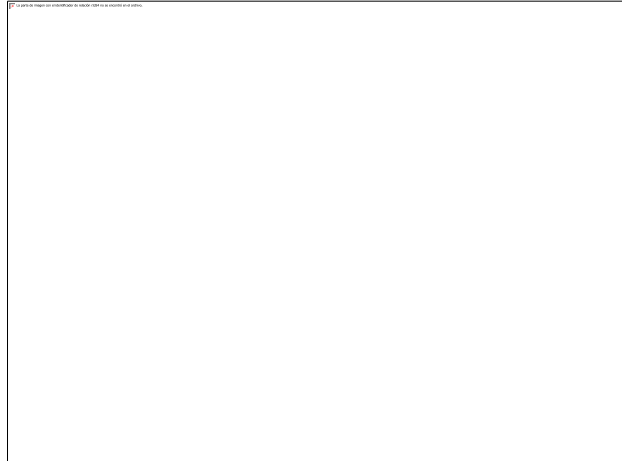
Luego caracterizamos este infiltrado mediante citometría de flujo observando un incremento significativo en el infiltrado inflamatorio de células CD3⁺ y CD3⁺/CD8⁺ en los tumores provenientes de ratones tratados con AH BPM respecto a ratones sin tratar (IMF: 124,7 vs 89,17; y 124 vs 84, respectivamente; $p \leq 0,05$) (figura 30).



AH BPM incrementa el infiltrado inflamatorio intratumoral de células CD3⁺/CD8⁺. Análisis del infiltrado inflamatorio intratumoral mediante citometría de flujo. Se muestra la comparación de un histograma representativo de un animal por grupo (sombra gris: SF; línea negra: AH BPM) (panel superior) y el análisis cuantitativo para la marcación CD3⁺, CD3⁺/CD4⁺ y CD3⁺/CD8⁺ (panel inferior). Las columnas representan la media geométrica \pm EES (n:10). Columna negra: SF; Columna roja: AH BPM. Mann Whitney t test; * $p \leq 0,05$.

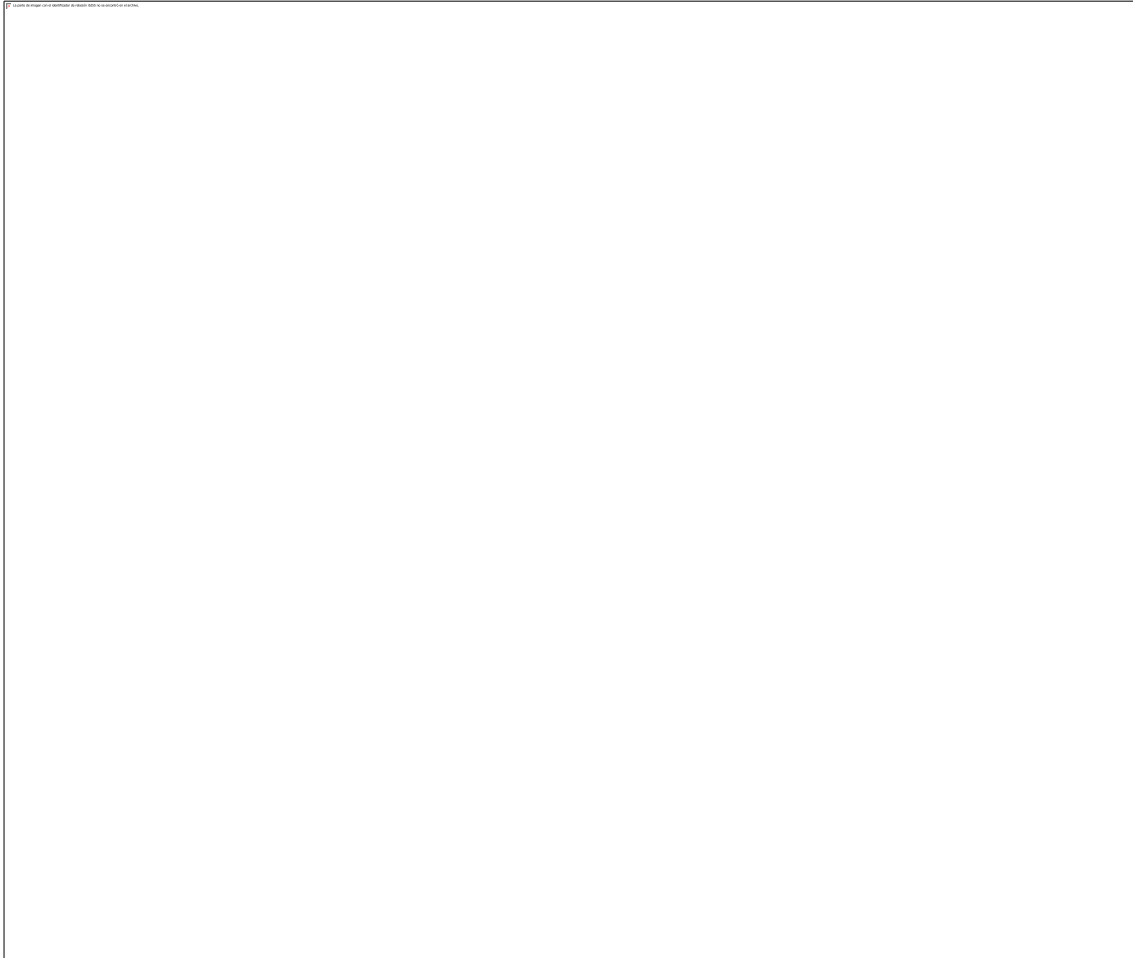
5. AH activa CD esplénicas y genera una respuesta antitumoral específica

A la luz de estos resultados y teniendo en cuenta que uno de los principales órganos que participan del metabolismo de AH exógeno es el bazo, analizamos si el AH BPM inoculado en forma i.v. se deposita en este órgano. Para esto inyectamos AH FITC por vía i.v. en animales portadores de tumor y así pudimos comprobar por microscopia de fluorescencia en cortes histológicos su localización esplénica (figura 31).



AH se deposita en el bazo. Microscopía de fluorescencia de tejido esplénico luego de la administración exógena de HA FITC en animales portadores de tumor (día 9 post-inoculación del tumor). El panel insertado representa tejido obtenido de animales inyectado con solución fisiológica (400 X).

Entonces estudiamos si este glicosaminoglicano inoculado modifica la actividad de células dendríticas presentes en este órgano. Para esto aislamos células esplénicas de animales tratados y sin tratar con AH BPM, y las marcamos con anticuerpo anti CD11c y CMH-II. Así observamos que el tratamiento con AH BPM incrementa de manera significativa el nivel de expresión de CMH-II en esplenocitos ($47 \pm 1,4\%$ vs $39 \pm 1,9\%$; $p \leq 0,05$) y, particularmente, en el grupo de células CD11⁺ ($30 \pm 1,7\%$ vs $27 \pm 0,4\%$, $p \leq 0,05$) (figura 32).



AH BPMactiva CD esplénicas. a. Caracterización fenotípica de las CD derivadas de bazo de animales tratados o no (control -) con AH BPM (día 9 post-inoculación del tumor). Dot plot de esplenocitos de ratones tratados o no con AH BPM (panel izquierdo). Análisis cuantitativo de la expresión de los marcadores CD11c y MHC-II efectuado por citometría de flujo. Los datos son expresados como la media \pm DE de % de expresión. Mann Whitney t test; * $p \leq 0,05$.

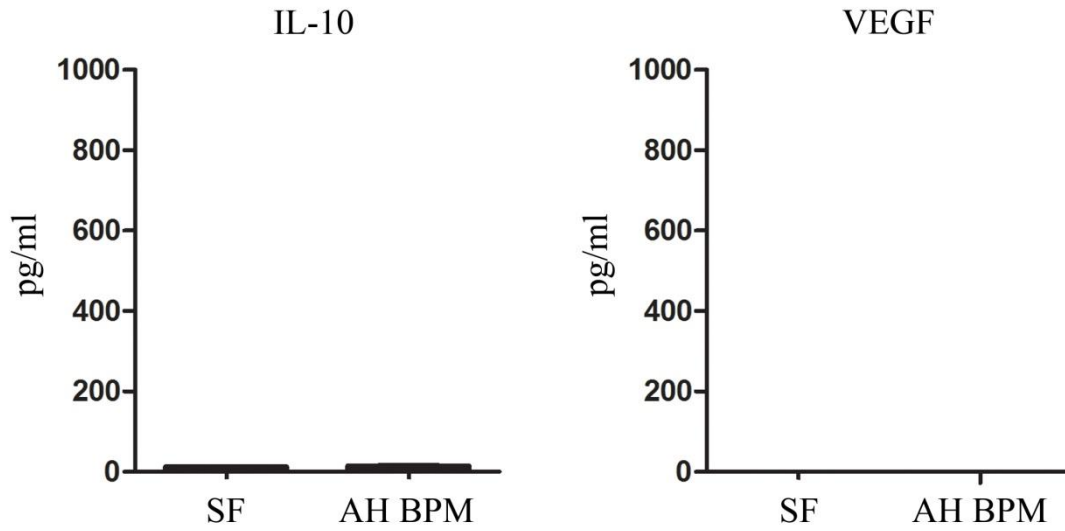
Más aún, al 9^{no} día luego de iniciado el tratamiento, los esplenocitos de ratones tratados con AH BPM y portadores de tumor demostraron una actividad proliferativa significativamente mayor que los provenientes de ratones sin tratar, en presencia de CD singénicas pulsadas con antígeno tumoral (12.550 ± 2.572 d.p.m. vs 8.155 ± 2.844 d.p.m; $p \leq 0,05$) (figura 33, a). También pudimos demostrar que en el sobrenadante del cultivo de estos esplenocitos hubo un incremento significativo en la concentración de IL-12p70 (975 ± 271 pg/ml vs 175 ± 66 pg/ml; $p \leq 0,05$) y una disminución de IL-10 de un 50% (96 ± 50 pg/ml vs 175 ± 21 pg/ml; $p = 0,4$), perfil de citoquinas que caracteriza a la respuesta inmunitaria tipo Th1 necesaria para una respuesta antitumoral efectiva (figura 33, b).



AH BPM induce unperfil de respuesta inmunitario de tipoTh1. a. Cultivo mixto linfocitario de esplenocitos derivados de animales controles o tratados con AH BPM. Las células fueron incubadas en presencia de CD singénicas -pulsadas con extracto tumoral y tratadas con mitomicina C- durante 5 días. La proliferación fue determinada por adición de timidina[3H] 18 hs antes de finalizar el cultivo. Los datos fueron expresados como la media \pm EEM de d.p.m. (medido por triplicado). b. Determinación por ELISA de los niveles de IL-10 (panel superior) e IL-12 (panel inferior) en sobrenadante de cultivo del experimento anterior. Mann Whitney t test; * $p \leq 0,05$.

6. Niveles de VEGF e IL-10 sistémicos

Teniendo en cuenta que los niveles séricos de VEGF e IL-10 en el contexto tumoral se los consideran como factor de mal pronóstico (Berghella, Pellegrini et al. 1997, Hegde, Jubb et al. 2013), decidimos evaluar si el tratamiento con AH BPM sistémico modifica su concentración sérica. Mediante la técnica de ELISA pudimos determinar que los niveles de VEGF e IL-10 en ambos grupos de ratones eran bajos y similares (0,13 pg/ml vs 0,14 pg/ml, y 12 pg/ml vs 10 pg/ml, respectivamente; p NS) (figura 34).



AH BPM no modifica la concentración sérica de IL-10 ni VEGF. Determinación por ELISA de los niveles de IL-10 (panel izquierdo) y VEGF (panel derecho) en suero de ratones tratados con solución fisiológica (SF) o AH BPM.

Parte II

7. Efecto de AH BPM sobre CD derivadas de médula ósea de ratón

Teniendo en cuenta los datos previos, y la relación entre AH, sistema inmunitario y cáncer(Alaniz, Garcia et al. 2009), planteamos la posibilidad del uso de esta molécula en un protocolo de vacunación con CD pulsadas con antígeno tumoral. Para esto evaluamos sus efectos *in vitro* en cultivos de CD. Asimismo, estudiamos en un modelo tumoral murino los efectos de esta molécula sobre las CD en cuanto a su capacidad de migrar hacia el ganglio linfático y su potencial inductor de una respuesta inmunitaria antitumoral eficaz.

1. Ácido hialurónico modula la capacidad endocítica de CD

CD fueron obtenidas de médula ósea de ratones BALB/c de acuerdo a lo descrito previamente en la sección materiales y métodos. Luego de 7 días de cultivo, se evaluó su capacidad de endocitosis en presencia o no de AH de distinto PM utilizando dextran-FITC. Observamos que la presencia de AH APM disminuye su capacidad de endocitosis un 75% respecto al control, a diferencia de la molécula de bajo PM que no la modifica (figura 35).

AH BPM no altera la capacidad de endocitosis de CD. Citometría de flujo CD cultivadas con DEXTRAN-FITC en presencia de PBS, AH APM y AH BPM. Histograma representativo. Sombra gris: control isotipo; línea amarilla: señal FitC.

2. AH BPM no afecta la proliferación de CD

A fin de evaluar si el tratamiento con AH modifica la viabilidad de las CD, decidimos estudiar su estado proliferativo. Mediante un ensayo de proliferación mediante el estudio de la incorporación celular de timidina [3H] pudimos evidenciar que esta molécula, en sus diversos tamaños, no afecta la tasa de replicación celular (figura 36).



AH BPM no afecta la tasa de proliferación basal de CD in vitro. Las CD fueron incubadas durante 24 hs con SF, AH BPM, AH APM u oAH. Las barras representan la media de c.p.m. \pm EES de las CD según los distintos tratamientos.

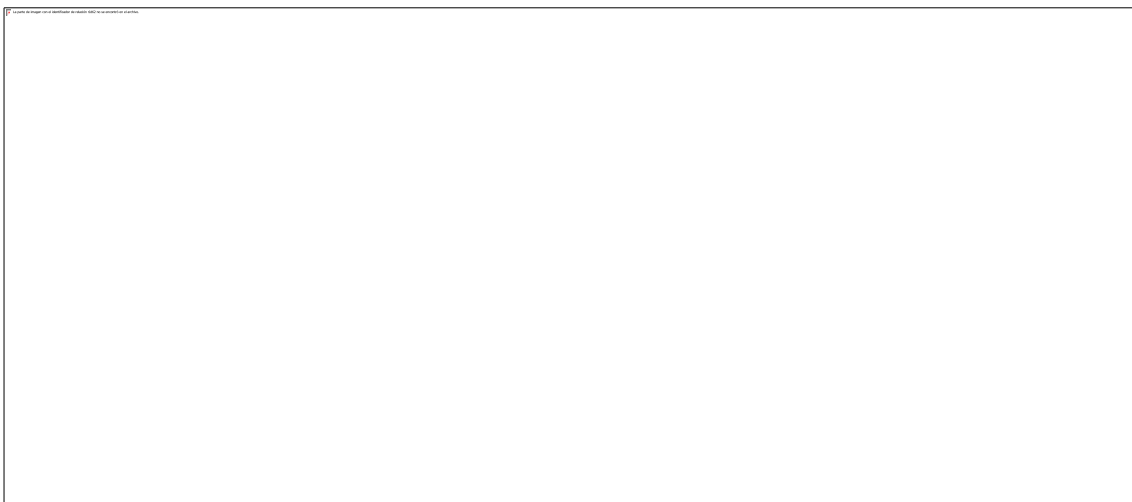
3. AH BPM induce la maduración de CD derivadas de médula ósea de ratón

Con el objetivo de analizar el efecto de AH BPM sobre el estado madurativo de CD pulsadas con antígeno tumoral, estas fueron cultivadas desde el 3^{er} día con AH BPM (CD/LT/AH BPM). Se utilizó como grupo control CD/LT y CD/LT activadas con TNF- α . Al 7^{mo} día las células fueron pulsadas con antígeno tumoral derivado de la línea tumoral CT26 durante 18 hs. Para su análisis se seleccionó mediante citometría de flujo la población CD11⁺, a la que se le midió el porcentaje de expresión de moléculas implicadas en el proceso de presentación antigénica y activación linfocitaria. De esta forma se observó que el pre-tratamiento con AH BPM indujo un incremento significativo en el porcentaje de expresión de CMH-II ($72 \pm 3\%$) y CD86 ($65 \pm 6\%$) en comparación con CD/LT ($56 \pm 10\%$ y $54 \pm 2,5\%$, respectivamente) ($p \leq 0,05$). TNF- α indujo en CD/LT un incremento en la expresión de CMH-II ($73 \pm 3\%$) y CD40 ($65 \pm 2,8\%$) sin modificar la expresión de CD86 ($44 \pm 1,3\%$) (figura 37).



AH BPM induce la maduración y activación de CD/LT. Análisis fenotípico mediante citometría de flujo del cultivo de CDpulsadas con antígeno tumoral (CD/LT), y tratadas o no con AH BPM (CD/LT/AH BPM) o TNF- α (CD/LT/TNF- α). Para su análisis, las células CD11c+ fueron seleccionadas, y se estudió la co-expresión de marcadores de maduración y activación. Los datos son expresados como la media \pm DE %. One-way anova; * $p \leq 0,05$ vs CD/LT.

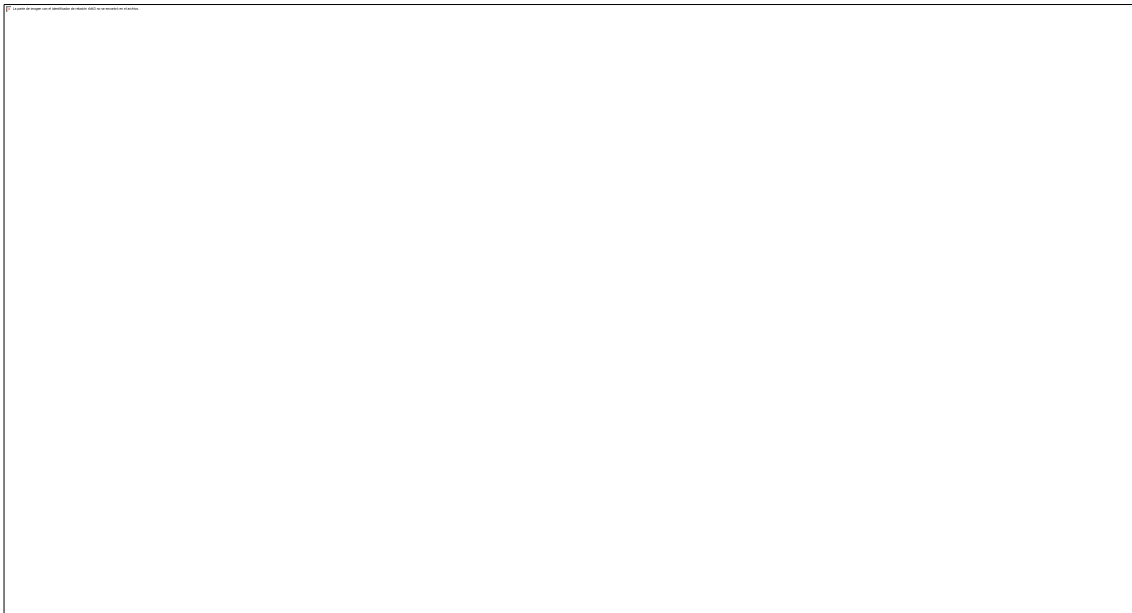
Consistentemente con estos resultados hallamos que AH BPM indujo un incremento en la secreción de IL-12p70 comparado con CD/LT sin tratar o CD/LT activadas con TNF- α (170 ± 134 pg/ml vs 56.33 ± 12 pg/ml vs. 53 ± 8 pg/ml respectivamente; $p \leq 0,05$), según se pudo detectar en el sobrenadante del cultivo de las CD. Los niveles de IL-10 en los mismos sobrenadantes fueron significativamente menores en el grupo CD/LT/AH BPM (399 pg/ml) comparado con CD/LT (527 pg/ml) y CD/LT/TNF- α (519.7 ± 15 pg/ml) ($p \leq 0,05$) (figura 38).



El pre-tratamiento de CD/LT con AH BPM induce la secreción de citoquinas con perfil Th1. La expresión de IL-12 (panel izquierdo) e IL-10 (panel derecho) fue determinada mediante ensayo de ELISA en sobrenadante de cultivo de CD/LT, CD/LT/AH BPM, y CD/LT/TNF- α . Los resultados

se muestran como la media \pm DE pg/ml y corresponde a tres experimentos independientes. Mann Whitney t test; * $p \leq 0,05$.

A fin de estudiar su capacidad de presentación antigénica, realizamos un co-cultivo de estas CD provenientes de ratones BALB/c con esplenocitos alogénicos derivados de ratones C57BL/6. Pudimos observar que linfocitos en presencia de CD/LT/AH BPM mostraron una actividad proliferativa significativamente mayor que los expuestos a CD/TL sin tratar (43.765 ± 2.308 d.p.m. vs 15.763 ± 1.189 d.p.m; $p \leq 0,05$) (figura 39). Estos datos sugieren que la incubación de CD/LT con AH BPM tiene un potente efecto sobre su maduración y activación, en parte similar al visto en el grupo tratado con TNF- α , favoreciendo un estado pro-inmunogénico y anti-inmunosupresivo, y resultando en una mayor capacidad de estimular la proliferación linfocitaria *in vitro*.



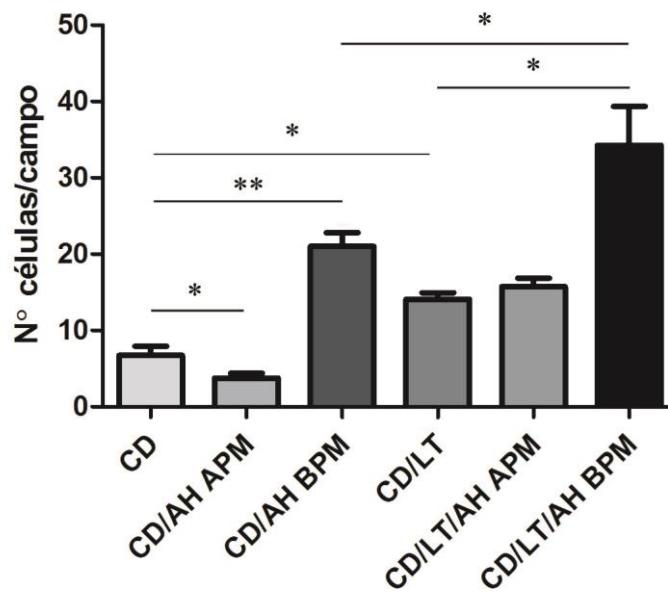
AH BPM incrementa la capacidad de estimular la proliferación linfocitaria de CD/LT.

Representación gráfica de un cultivo mixto linfocitario. CD/LT, CD/LT/AH BPM y CD/LT/TNF- α , tratadas con mitomicina C, fueron co-cultivadas con esplenocitos alogénicos. Su actividad proliferativa fue medida mediante la incorporación de timidina[3 H]. Los datos representan la media \pm DE de d.p.m, de mediciones realizadas por triplicado. Mann Whitney t test; * $p \leq 0,05$.

4. AH BPM incrementa la migración de CD hacia sobrenadante de esplenocitos

La migración de las CD hacia el ganglio linfático para su posterior interacción con células linfoides es un paso crítico para la inducción de una respuesta inmunitarioantitumoral (Martín-Fonoteca, Sebastiani et al. 2003, Tuyaeerts, Aerts et al. 2007), y un desafío para los protocolos de vacunación basados en CD (Adema, de Vries et al. 2005, Skalova, Mollova et al. 2010). Por esto decidimos investigar si el acondicionamiento de CD con AH BPM es capaz de modificar su

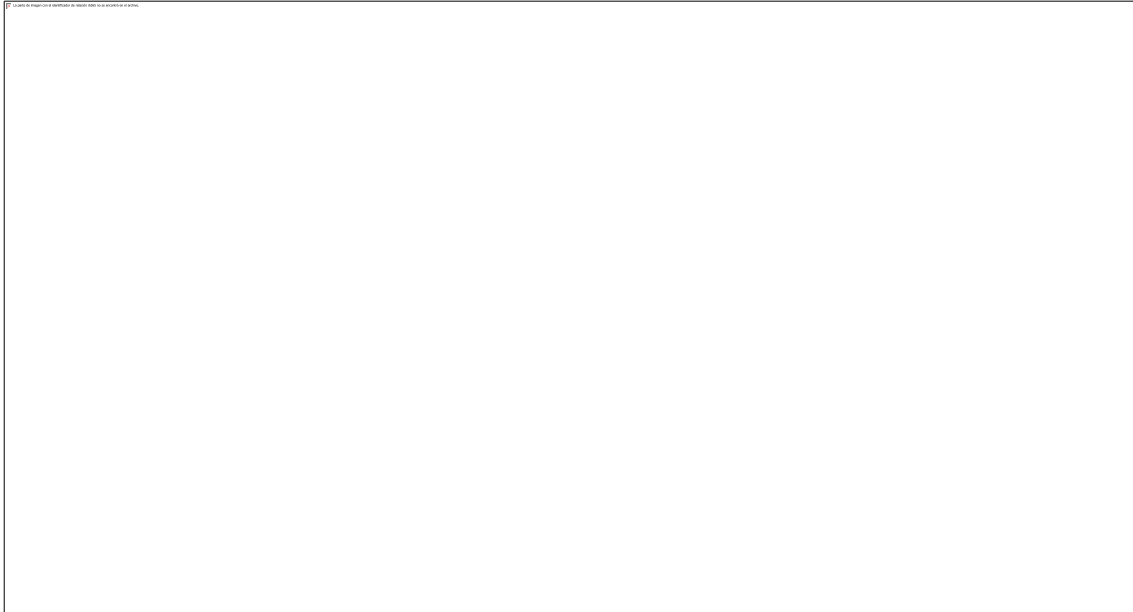
capacidad de migrar *in vitro*. Para esto realizamos un ensayo de migración de CD pulsadas y sin pulsar con antígeno tumoral, y pre-tratadas o no con AH BPM, hacia el sobrenadante de un cultivo de esplenocitos proveniente de ratones con tumor. Así pudimos determinar que las CD migran menos hacia el sobrenadante que las CD/LT ($6,7 \pm 1,2$ células/campo vs $14,1 \pm 0,8$ células/campo, respectivamente; $p \leq 0,001$). Al ser pre-tratadas con AH BPM tanto CD como CD/LT incrementaron su capacidad de migrar ($6,7 \pm 1,2$ vs $21 \pm 1,7$ células/campo, y $14,1 \pm 0,8$ vs 34 ± 5 células/campo, respectivamente; $p \leq 0,05$). AH APM inhibió la migración de CD ($3,7 \pm 0,6$ células/campo; $p \leq 0,05$) y no afectó la migración de CD/LT ($15,7 \pm 1,1$ células/campo) (figura 40).



AH BPM incrementa la migración de CD hacia el sobrenadante de linfocitos. Ensayo de migración en un sistema de Boyden modificado. En la cámara superior se colocaron CD y en la cámara inferior sobrenadante de cultivo de esplenocitos singénicos derivado de ratones portadores de tumor. Luego de 4 hs de cultivo las células fueron fijadas, teñidas con May-Grunwald y luego visualizadas mediante microscopía de luz blanca. Las barras muestran la media de células/campo \pm EEM. Mann Whitney t test; * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,001$.

5. La acción quimioattractante de CCL19/CCL21 es potenciada por el estímulo con AH BPM

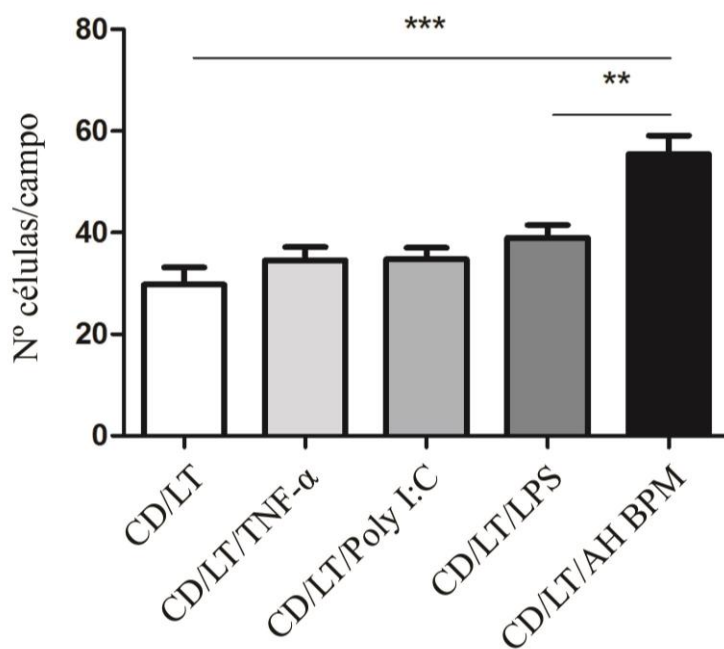
A fin de aclarar el mecanismo implicado en esta respuesta, decidimos estudiar la migración de CD/LT *in vitro* hacia CCL19 y CCL21, quimioattractantes secretados en órganos linfáticos, claves para de la migración de CD. Así pudimos observar que el tratamiento de CD/LT con AH BPM indujo un incremento significativo en su capacidad de migrar tanto hacia CCL19 ($32,8 \pm 1,8$ vs $13,1 \pm 1,4$ células/campo; $p \leq 0,05$) como hacia CCL21 ($34,2 \pm 1,9$ vs $13,6 \pm 1,7$ células/campo; $p \leq 0,01$) (figura 41).



El pre-tratamiento con AH BPM induce la migración de CD/LT en respuesta a CCL19 y CCL21.

Ensayo de migración en sistema de Boyden modificado. En la cámara superior se colocó CD/LT pre-tratadas o no con AH BPM y, en la cámara inferior DMEM, CCL21 (100 ng/ml) o CCL19 (100 ng/ml). Se grafica el promedio de células/campo \pm EEM. Mann Whitney t test, * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$.

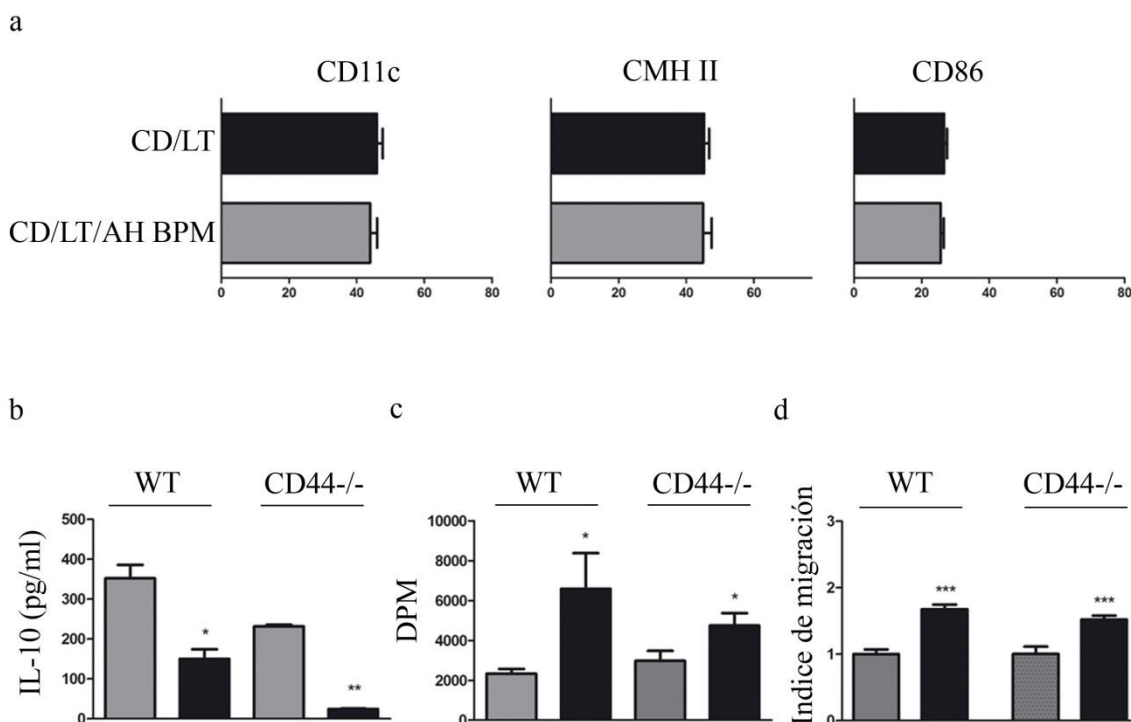
Luego pudimos demostrar que este efecto visto en CD/LT/AH BPM fue incluso superioral generado por otras moléculas comúnmente utilizadas en cocktails de maduración como son TNF- α , poly I:C y LPS(Moller, Michel et al. 2008)(figura 42).



AH BPM estimula la migración de CD/LT superando a $\text{TNF-}\alpha$, poly I:C y LPS. Ensayo de migración de CD/LT hacia CCL21. Las CD/LT fueron activadas con $\text{TNF-}\alpha$, poly I:C, LPS o AH BPM. Las barras representan número medio células/campo \pm EEM. Mann Whitney t test; ** $p \leq 0,01$, CD/LT/AH BPM vs CD/LT/LPS; *** $p \leq 0,001$, CD/LT/AH BPM vs CD/LT.

6. El efecto AH BPM sobre la migración de CD es independiente de CD44 y TLR4

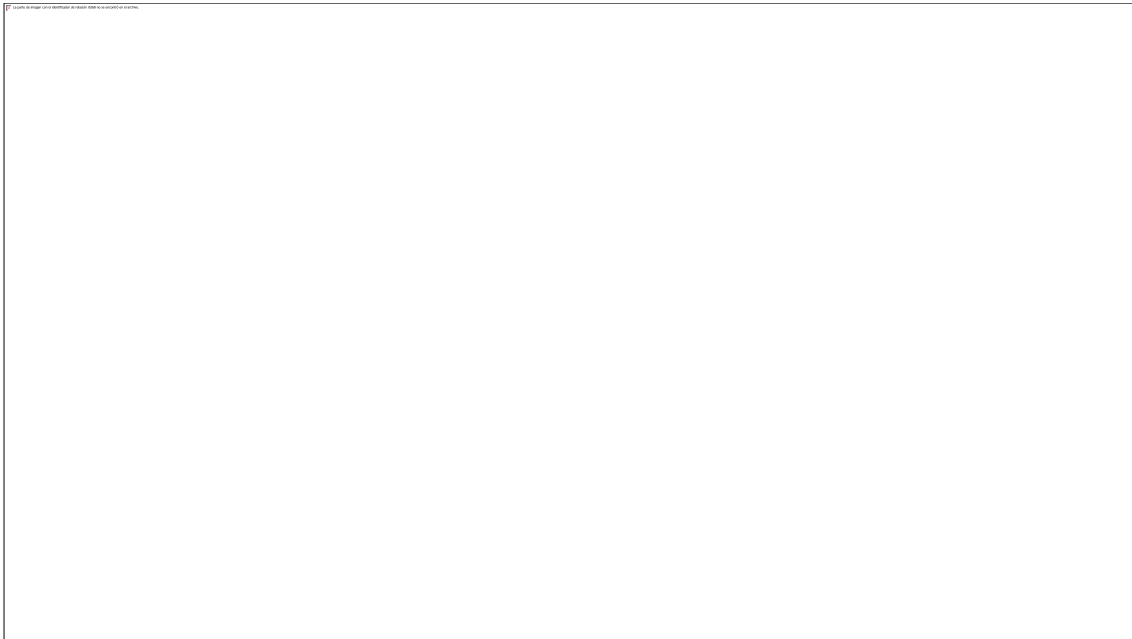
Para evaluar si el efecto de AH BPM sobre la migración de CD es mediado por CD44 generamos cultivos de CD derivadas de médula ósea de ratones CD44 knockout ($\text{CD}^{44-/-}$). El tratamiento con AH BPM no modificó la expresión de marcadores de maduración, sin embargo si redujo de manera significativa la síntesis de IL-10 ($24,5 \pm 1$ pg/ml vs $231 \pm 3,8$ pg/ml; $p \leq 0,01$) e indujo una mayor capacidad de estimulación linfocitaria *in vitro* (4.746 ± 626 d.p.m vs 2.976 ± 505 d.p.m; $p \leq 0,05$). Asimismo, las $\text{CD}^{44-/-}$ /LT fueron capaces de responder al estímulo con AH BPM incrementando un 50% su facultad de migrar hacia CCL21 ($38,6 \pm 1,5$ células/campo vs $25,4 \pm 2,8$ células/campo; $p \leq 0,001$) (figura 43).



AH BPM activa a las CD/LT e induce su migración hacia CCL21 en forma independiente de CD44. a. CD/LT con o sin pre-tratamiento con AH BPM proveniente de médula ósea de ratones $\text{CD}^{44-/-}$ fueron marcadas con anticuerpo anti-CD11c, CMH-II, y CD86. De la población CD^{11c+} , se evaluó la expresión de CMH-II y CD86. Los datos están expresados como media \pm DE. b. Medición de concentración de IL-10 en el sobrenadante del cultivo de CD/LT wt y $\text{CD}^{44-/-}$ tratadas o no con AH BPM mediante ELISA. Los resultados son expresados como la media \pm DE en pg/ml, y corresponde a tres experimentos independientes. c. CD/LT tratadas con mitomicina C y co-cultivadas con esplenocitos alogénico de ratones C57BL/6 durante 5 días. La

proliferación celular fue determinada por la incorporación de timidina[3H]. Los datos son expresados como la media \pm DE de d.p.m. (medido por triplicado). d. Se muestra la migración de CD/LT derivadas de ratones wt y CD44^{-/-} hacia CCL21. Los resultados son expresados como índice de migración respecto a CD/LT sin tratar con AH BPM (media \pm DE). Columna gris: CD/LT; columna negra: CD/LT/AH BPM. Wt: ratones wild type; CD44^{-/-}: ratones CD44 knockout. Mann Whitney t test; * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$.

Teniendo en cuenta que oAH tienen la capacidad de inducir la activación de CD a través de TLR4 (Termeer, Benedix et al. 2002), estudiamos el efecto de AH BPM en CD-mo derivadas de ratones knockout para TLR4 (CD^{TLR4^{-/-}}). Así comprobamos que este tratamiento no afectó los marcadores de maduración de las CD^{TLR4^{-/-}}, pero sí inhibe de manera significativa la secreción de IL-10 (59,1 \pm 14,3 pg/ml vs 301 \pm 34 pg/ml; $p \leq 0,05$), incrementa su capacidad de estimular linfocitos alogénicos (4408 \pm 776 d.p.m vs 1812 \pm 135 d.p.m; $p \leq 0,05$), y potencia la respuesta quimotáctica a CCL21 (67,9 \pm 6,4 células/campo vs 26,2 \pm 2,4 células/campo; $p \leq 0,001$) (figura 44).



AH BPM madura y activa a las CD/LT en forma independiente a TLR4. Representación gráfica del estado de maduración (a), secreción de IL-10 (b), MLR (c) y migración hacia CCL21 de CD/LT obtenidas de ratones TLR4^{-/-} y tratadas o no con AH BPM. Los experimentos fueron realizados de forma similar a los descritos en la figura anterior. Columna gris: CD/LT; columna negra: CD/LT/AH BPM. Wt: ratones wild type; CD44^{-/-}: ratones CD44 knockout. Mann Whitney t test; * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$.

7. AH BPM induce la expresión de CCR7

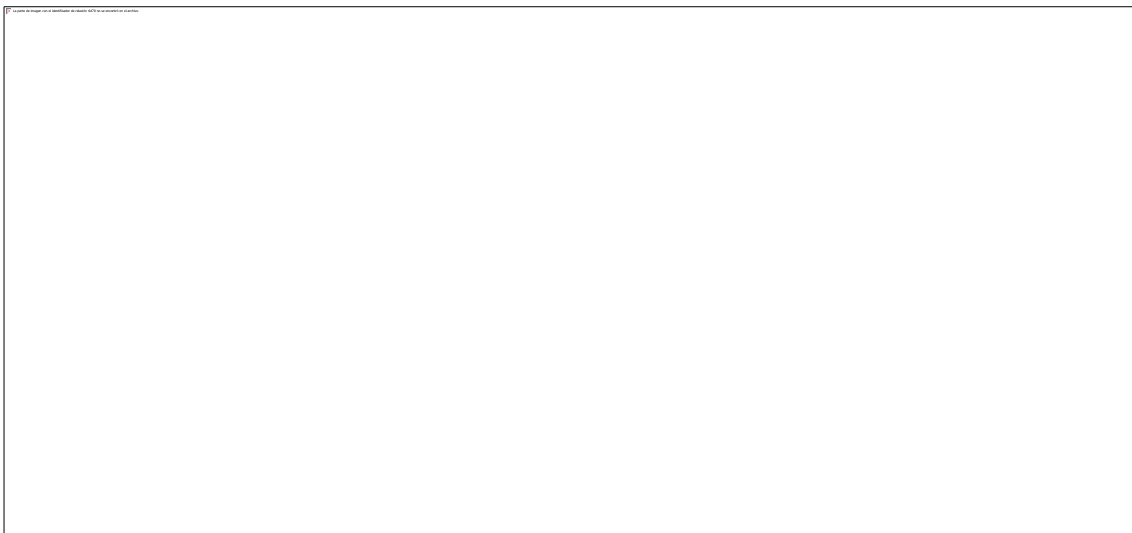
Posteriormente evaluamos si este aumento de la migración hacia CCL21 podría responder a un incremento en la expresión de CCR7, receptor de CCL19 y CCL21. Así observamos que las

CD/LT/AH BPM presentaron niveles de expresión de CCR7 significativamente mayores que CD/LT (44,8% vs. 35,6%; MFI 256 ± 36 vs. 195 ± 3.7 ; $p \leq 0,05$) (figura 45).



La incubación de CD/LT induce la expresión de CCR7. Superposición de histogramas que representan la expresión de CCR7 en CD/LT (sombra gris) y CD/LT/AH BPM (línea amarilla). Se muestra un experimento representativo de tres experimentos independientes (panel izquierdo). Intensidad media de fluorescencia (IMF) de tres experimentos independientes (media \pm DE) (panel derecho). Mann Whitney t test, * $p \leq 0,05$.

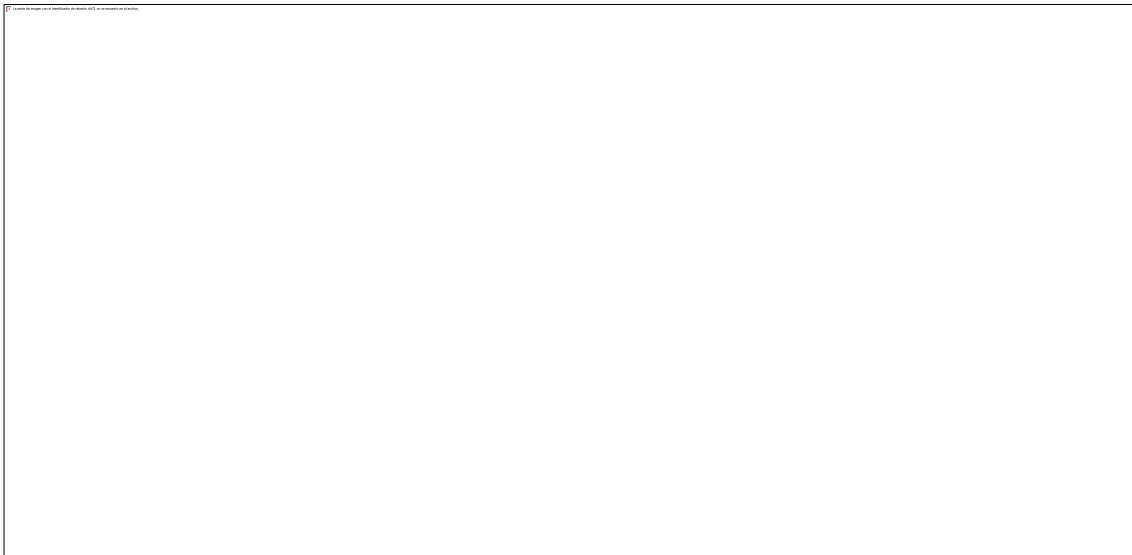
Luego estudiamos la expresión de CCR7 en $CD^{44-/-}$ y $CD^{TLR4-/-}$ tratadas o no con AH BPM. Observamos que este tratamiento indujo la expresión de CCR7 en las $CD^{TLR4-/-}$ (IMF: $110 \pm 5,6$ vs $56,2 \pm 10,1$; $p \leq 0,05$) (figura 46).



AH BPM incrementa la expresión de CCR7 en ratones TLR4-/-. Citometría de flujo de CD/LT proveniente de ratones $CD44-/-$ y $TLR4-/-$ tratadas con AH BPM. La columna representa intensidad media de fluorescencia \pm DE de tres experimentos independientes. $CD44-/-$: ratones knockout para CD44; $TLR4-/-$: ratones knockout para TLR4. Mann Whitney t test; CD/LT vs CD/LT/AH BPM; * $p \leq 0,05$.

8. AH BPM aumenta la capacidad de migrar de DC generadas *ex vivo* en un modelo de cáncer colorectal

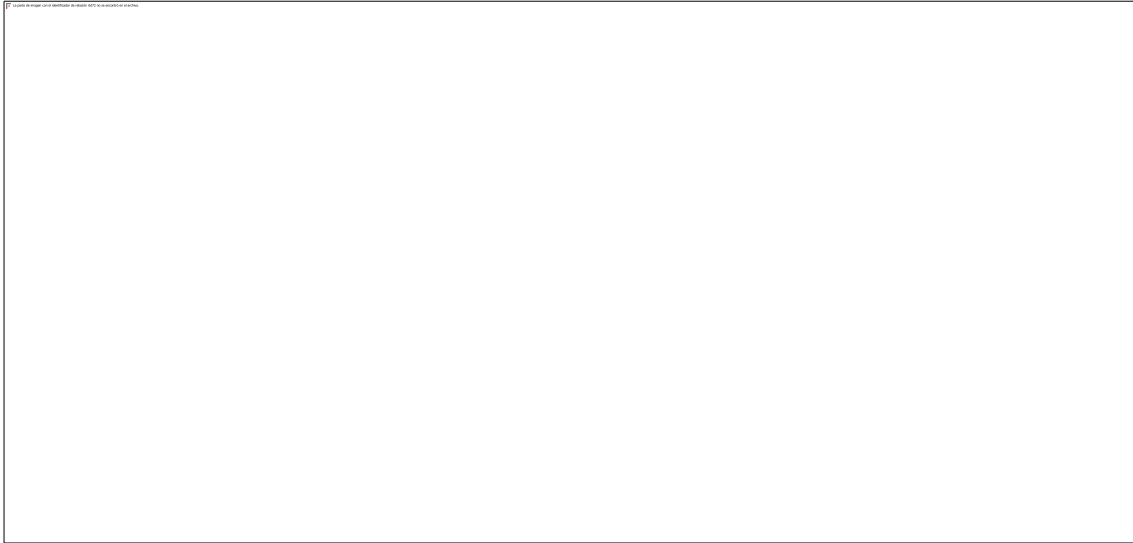
En función de los resultados antes descriptos nos preguntamos si el aumento de la capacidad migratoria de CD/LT tratadas con AH BPM vista *in vitro* puede ser reproducido en un modelo tumoral *in vivo*. Con este fin inoculamos en forma s.c., a una distancia media entre el tumor y ganglio linfático (GL) más cercano, CD marcadas con CM-Dil y DiR. Veinticuatro horas después analizamos *in vivo* la distribución de las células inoculadas mediante el uso de bioluminómetro (sistema de imágenes Xenógeno *in vivo*; IVIS; Caliper Life Sciences, Hopkinton, MA, USA) observando una mayor intensidad de señal en GL de ratones tratados con CD/LT/AH BPM respecto a los tratados con CD/LT ($3,8 \times 10^5$ promedio de fotones/segundo/cm² vs $1,23 \times 10^6$ promedio de fotones/segundo/cm²) (figura 47).



El tratamiento de CD/LT con AH BPM aumenta su capacidad de migrar hacia el ganglio linfático (GL) en animales portadores de tumor. Se muestra fotografía de ratones BALB/c a los que se les indujo un tumor, y se les inoculó vía s.c., entre el nódulo tumoral y el GL, CD/LT/AH BPM o CD/LT teñidas con DiR. Para la visualización de las DC-DiR en animales vivos se utilizó un bioluminómetro. En el panel izquierdo se puede observar el aumento de señal en aquellos animales que fueron tratados con CD/LT/AH BPM en comparación con los tratados con DC/TL. En el panel derecho se observaba la intensidad de señal en el ganglio y el tumor explantado.

En correlación con estos hallazgos, el número de CD-CM-Dil recuperadas del GL y medido por citometría de flujo fue significativamente mayor en el grupo tratado con AH BPM comparado con CD/LT sin tratar (4737 ± 998 vs 2312 ± 412 células CMDil⁺/1 x 10⁶ células; $p \leq 0,05$) (figura 48, panel izquierdo). Por el contrario, la cantidad de células CM-Dil positivas fue menor en la muestra proveniente de tumores a los que se les inoculó CD/LT/AH BPM, sin ser esta diferencia estadísticamente significativa (2409 ± 822 vs 3242 ± 1439 células CMDil⁺/1 x 10⁶ células; $p = 0,06$) (figura 48, panel derecho). De estos resultados pudimos concluir que el

tratamiento de CD/LT con AH BPM no solo aumenta su capacidad de migrar *in vitro* hacia CCL21 sino también *in vivo* hacia GL.



AH BPM aumenta la capacidad de migrar de CD/LT hacia el ganglio linfático en animales portadores de tumor. Citometría de flujo de una suspensión celular de ganglio linfático y tumor de ratones tratados con CD/LT con o sin pre-incubación con AH BPM y teñidas con CM-Dil. Los datos representan el número de células CM-Dil+ detectadas/ 10^6 células. Wilcoxon test; CD/LT vs CD/LT/AH BPM

Parte III

8. Efecto de AH BPM sobre CD humanas derivadas de mononucleares de sangre periférica

En esta sección estudiamos los efectos de AH BPM sobre CD/LT generadas a partir de células mononucleares de sangre periférica de donantes sanos (DS) y de pacientes con cáncer de colon. Analizamos el efecto de AH sobre su estado madurativo y, como principal objetivo, el impacto sobre su capacidad de migrar.

1. Característica de los pacientes y generación de las CD

Las CD fueron generadas a partir del aislamiento de células mononucleares de sangre periférica de 15 donantes sanos (DS) y 25 pacientes con cáncer de colon (CCR). Entre los pacientes, 19 tenían metástasis hepáticas y un 39% había recibido quimioterapia previamente.

Las células fueron cultivadas según lo descrito en materiales y métodos en presencia de GM-CSF e IL-4. Luego de 7 días de cultivo se seleccionó la población CD11⁺, correspondiente al 40-60% del total de las células, y pudimos comprobar que el tratamiento con AH BPM indujo un incremento significativo en la expresión de CMH-II y CD86 en las CD provenientes de DS ($p \leq 0,05$) (tabla 1).

	Donantes sanos				Pacientes			
	CD	CD/LT	CD/LT/AH BPM	CD/LT/Poly I:C	CD	CD/LT	CD/LT/AH BPM	CD/LT/Poly I:C
CMH II	220	224 ⁶	238*	217	135	174	192	180
CD86	265	225 ⁶	238*	218	109	171	170	148
CD83	164	157	160	157	101	93	112	133

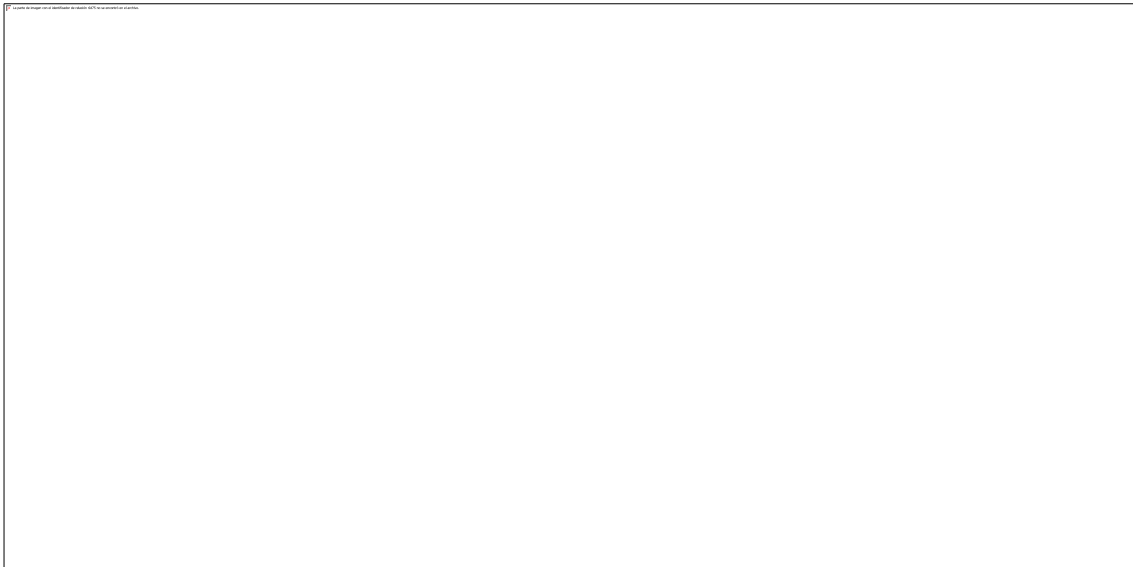
CD40 120 113 108 123 397 384 375 381

* $p \leq 0,05$; vs Donantes sanos CD/LT; ^δ $p \leq 0,05$; vs Paciente CD/LT

Marcadores de maduración de CD. Los valores expresan la media geométrica de fluorescencia.

2. CD preincubadas con AH BPM inducen la proliferación linfocitaria

Posteriormente, estudiamos si el pre-tratamiento de CD/LT con AH BPM impactaba sobre su capacidad de presentación antigénica. Para esto inoculamos en la cavidad peritoneal de ratones *nude* células mononucleares proveniente de DS enriquecida en linfocitos (LSP) y marcada con CFSE (Alfaro, Suarez et al. 2011). Al mismo tiempo inoculamos CD/LT pre-tratadas o no con AH BPM. Luego de 48 hs se realizó un lavado peritoneal y se recolectaron las células para su posterior análisis mediante citometría de flujo. Así pudimos observar que los LSP en presencia de CD/LT/AH BPM mostraron una mayor tasa de replicación en comparación con LSP expuestos a CD/LT sin tratar. Este efecto se dio tanto con las CD provenientes de DS ($94 \pm 20\%$ vs $22 \pm 17\%$, respectivamente; $p \leq 0,05$) como de pacientes ($109,9 \pm 31,8\%$ vs $18,9 \pm 1,1\%$, $p \leq 0,05$), siendo el incremento de un 70% y un 90% respectivamente (figura 49).

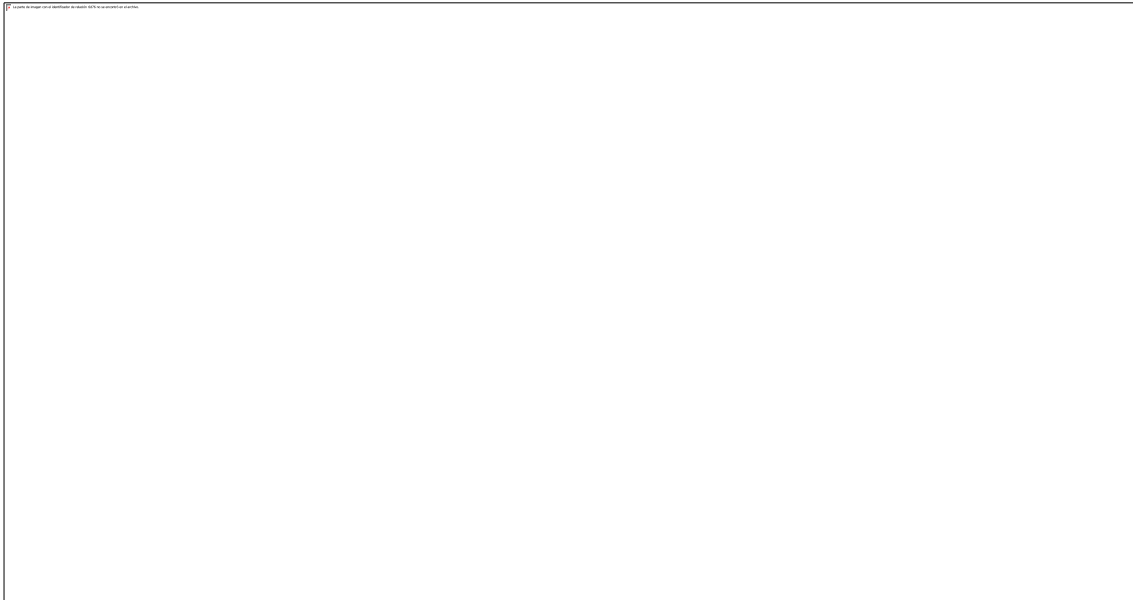


El pre-tratamiento de CD/LT con AH BPM incrementa su capacidad de presentación antigénica. Se inoculó en ratones *nude* por vía intraperitoneal linfocitos de origen humano teñidos con CFSE (5×10^6) y CD/LT o CD/LT/AH BPM alogénicas ($1,5 \times 10^6$). 48 h más tarde se recolectaron las células mediante lavado peritoneal. Se evaluó la proliferación celular mediante citometría de flujo por dilución del marcador fluorescente seleccionando la

población CD3+. a. Histogramas representativos de DS (3) y de pacientes (3). Línea gris: linfocitos solos; sombra gris: linfocitos + CD/LT; línea negra: linfocitos + CD/LT/AH BPM. b. Media de incremento porcentual \pm EEM de la proliferación de linfocitos en presencia de CD respecto a linfocitos solos (donante sano, n: 5; pacientes, n: 5). Barra blanca: linfocitos; barra gris: linfocitos \pm CD/LT; barra negra: linfocitos \pm CD/LT/AH BPM. * CD/LT vs CD/LT/AH BPM; t test pareado, $p \leq 0,05$.

3. AH BPM incrementa la capacidad de migrar de CD/LT hacia CCL21 e induce la expresión de CCR7

El proceso de migración de las CD es complejo y parcialmente comprendido (Adema, de Vries et al. 2005). Una vez que capturan el antígeno, adquieren propiedades que le permiten migrar a través del espacio extracelular y cruzar el endotelio alcanzado el tejido linfático, siendo CCR7 una molécula clave en este proceso (Bianchi, D'Amico et al. 2000, Sozzani, Allavena et al. 2000, Martín-Fontecha, Sebastiani et al. 2003, Verdijk, Aarntzen et al. 2008). Por esto decidimos estudiar los efectos de AH BPM sobre las CD analizando el eje quimiotáctico CCL21/CCR7. En CD/LT/AH BPM hallamos un incremento en su habilidad para migrar *in vitro* hacia CCL21 en comparación con CD/LT y CD/LT/poly I:C, tanto en las provenientes de DS (% de incremento vs CD/LT: $38 \pm 9\%$; $p \leq 0,01$) como de pacientes (% de incremento vs CD/LT $25,8 \pm 11\%$; $p \leq 0,01$) (figura 50, a). Luego comprobamos que el tratamiento con AH BPM indujo la síntesis de ARNm de CCR7 tanto en CD/LT proveniente de donantes sanos (incremento respecto a CD/LT: $2,7 \pm 0,9$; $p \leq 0,05$) como de pacientes (incremento respecto CD/LT: $3,6 \pm 1,4$; $p \leq 0,05$) (figura 50, b).

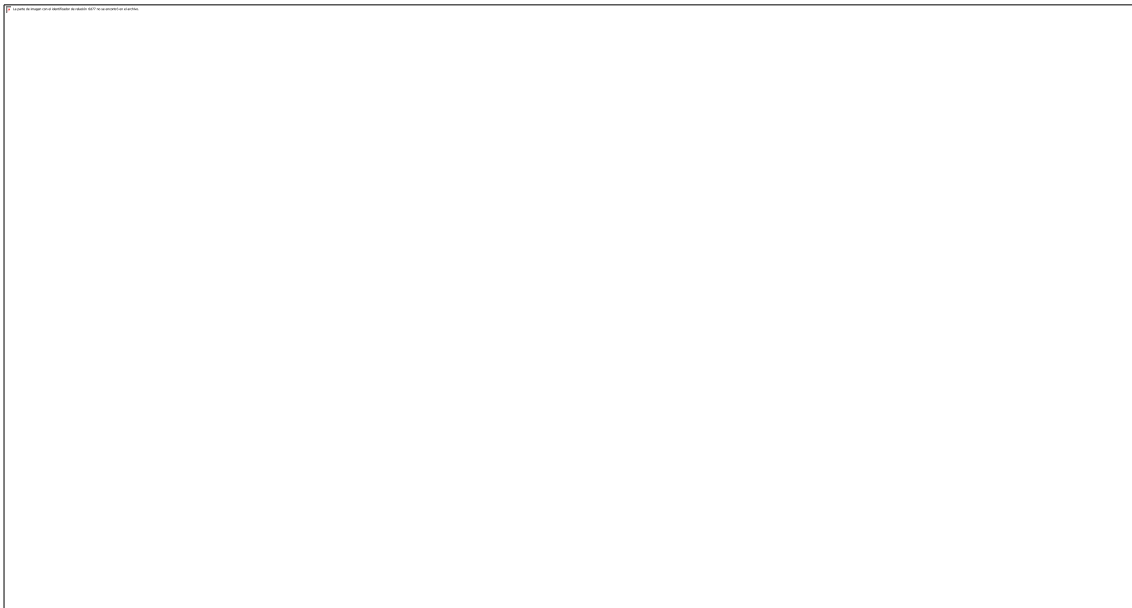


AH BPM incrementa la respuesta quimiotáctica hacia CCL21 e induce la expresión de CCR7. a. CD fueron colocadas en el pocillo superior de una cámara de microquimiotaxis y el quimioattractante CCL21 (200 ng/ml) en la cámara inferior. Las barras representan el índice de migración de CD en relación a la migración de CD/LT de cada grupo. Como control positivo fue

utilizado poly I:C. Barra gris: CD/LT; barra negra: CD/LT/AH BPM; barra blanca: CD/LT/poly I:C.
b. PCR tiempo real de la expresión de CCR7. Las barras representan el cambio de expresión de ARNm respecto a CD/LT. Mann Whitney t test; CD/LT vs CD/LT/AH BPM AH.* $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$.

4. El acondicionamiento de CD con AH BPM induce su migración al sobrenadante de ganglio linfático

La migración de las CD y su precisa localización dentro del ganglio linfático son pasos críticos a fin de inducir una respuesta inmunitaria antitumoral (Martín-Fontecha, Sebastiani et al. 2003). Por esto decidimos aproximar en un ensayo *in vitro* las condiciones que enfrentan las CD una vez inoculadas *in vivo* utilizando como quimioattractante medio condicionado generado a partir de ratones *nude* portadores de tumor humano (MCGL). Así encontramos un potente aumento en la migración de CD/LT hacia MCGL cuando estas fueron pre-estimuladas con AH BPM, pero no cuando fueron activadas con poly I:C, en comparación con CD/LT, independientemente de si provenían de DS ($127 \pm 8,6$ vs $69 \pm 6,5$ vs $78 \pm 0,6$ células/campo, respectivamente; $p \leq 0,01$) o de pacientes (294 ± 115 vs 257 ± 38 vs 202 ± 15 , respectivamente; $p \leq 0,01$) (figura 51).



AH BPM incrementa la respuesta quimiotáctica de CD/LT hacia medio condicionado proveniente de ganglio linfático. Migración de CD/LT, tratadas o no con AH BPM, hacia medio condicionado de ganglio linfático (MCGL) evaluado *in vitro*. Las CD fueron colocadas en el pocillo superior de una cámara de microquimiotaxis y el medio condicionado se colocó en el pocillo inferior. Las barras representan el índice de migración de CD de donantes sanos y de pacientes, en relación a la migración de CD/LT de cada grupo. Como control positivo fue utilizado poly I:C. Barra gris: CD/LT; barra negra: CD/LT/AH BPM; barra blanca: CD/LT/poly I:C. Mann Whitney t test; * vs CD/LT; $p \leq 0,05$.

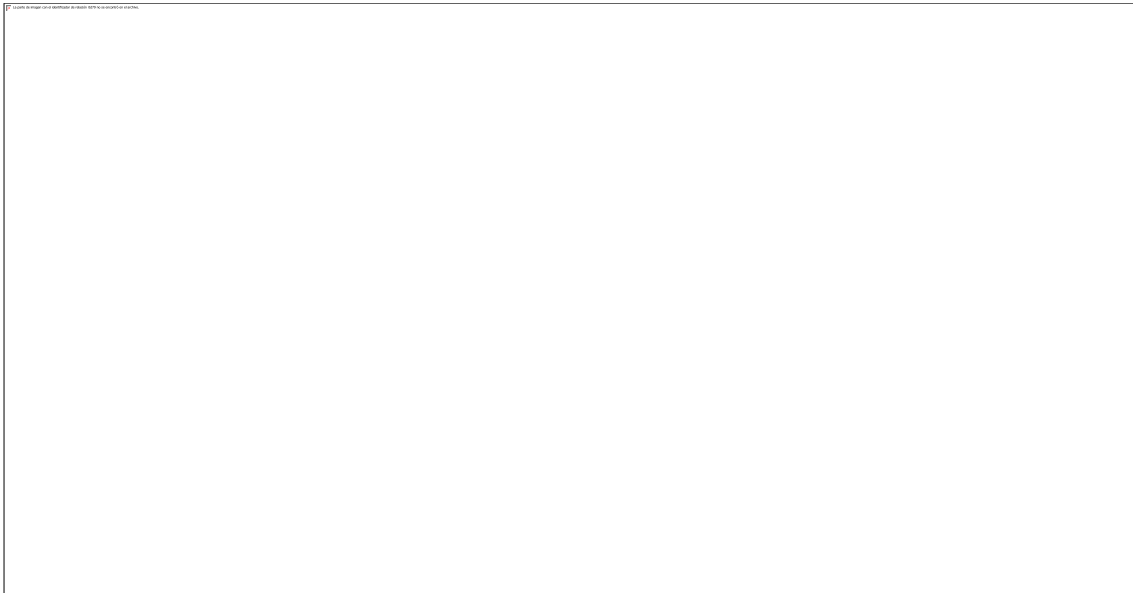
5. AH BPM reduce la capacidad de migrar de CD/LT hacia IL-8 e inhibe su atracción hacia medio condicionado tumoral

Realizamos, a modo de *screening*, un array de PCR para quimioquinas sobreARN proveniente de CD derivadas de un DS y de un paciente, pulsadas con antígeno tumoral, con y sin pre-tratar con AH BPM. El array incluyó 84 moléculas distintas implicadas en el proceso de quimiotaxis, de las que resultaron seleccionadas IL-8, FPR1 y CCRL2. Los criterios de selección fueron los siguientes: cambio en el nivel de expresión respecto a CD/LT mayor a 2 veces; relación con el grupo celular en estudio (CD); y que el cambio se de en ambos grupos, CD derivadas de DS y de pacientes con CCR. Luego confirmamos este resultado mediante qPCR de CD derivadas de 4 DS y 4 CCR. Evidenciamos que el tratamiento con AH BPM aumentó la expresión de IL-8 en ambos grupos de CD (DS: $2,6 \pm 1$, respecto CD/LT; $p \leq 0,05$; pacientes: $3,1 \pm 0,83$, respecto CD/LT; $p \leq 0,05$) (figura 52, a). Con estos datos, y teniendo en cuenta que la pre-exposición de CD a IL-8 disminuye su atracción hacia el tumor (Alfaro, Suarez et al. 2011), decidimos estudiar si este tratamiento induce cambios en el eje quimiotáctico IL-8/CXCR.



AH BPM induce la expresión de IL-8. qPCR de IL-8 de CD/LT con o sin tratar con AH BPM provenientes de donantes sanos (izquierda) y pacientes (derecha). Columna gris: CD/LT; columna negra: CD/LT/AH BPM. Mann Whitney t test; * $p \leq 0,05$. b. Array semicuantitativo de 38 quimioquinas, practicado sobre medio condicionado de tumor proveniente de un pacientes con CCR metastásico. Se nombran las citoquinas presentes en mayor concentración.

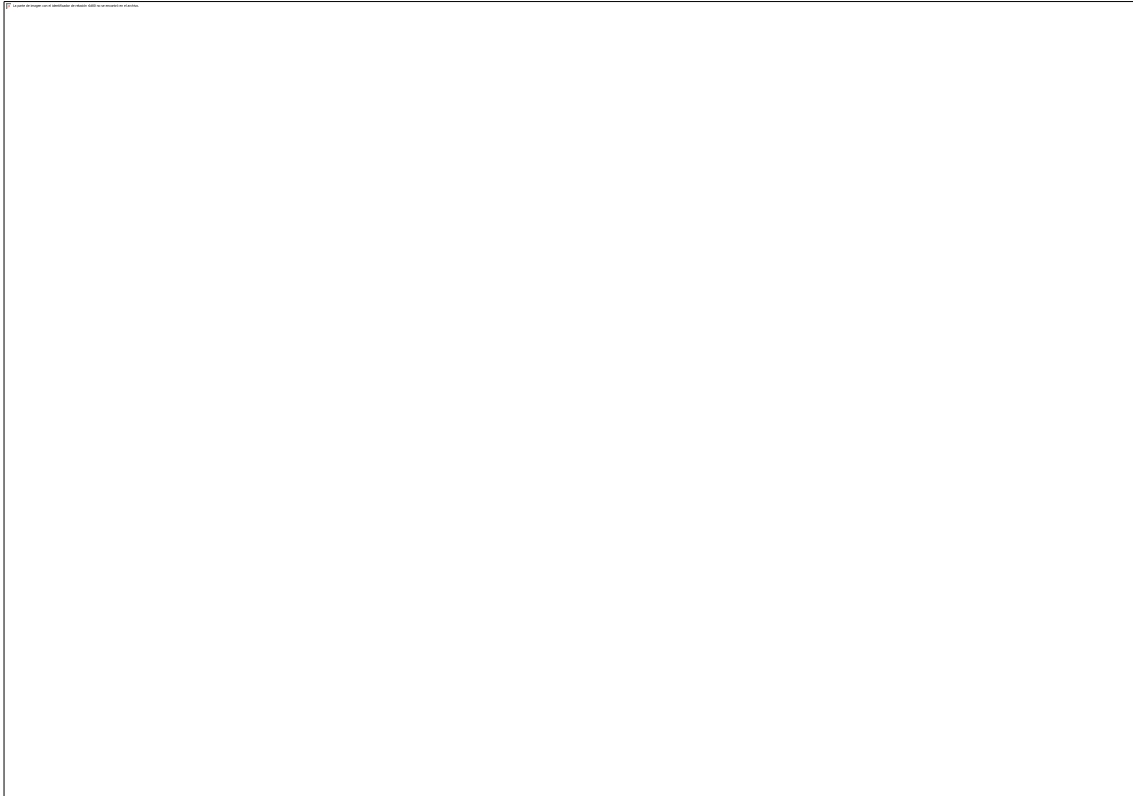
Observamos que CD/LT tratadas con AH BPM migraron en menor cantidad que CD/LT en respuesta a IL-8 humana recombinante ($15,4 \pm 2,29$ células/campo vs $33,8 \pm 3,8$ células/campo; $p \leq 0,001$). Este fenómeno no ocurrió en CD/LT/poly I:C ($42,6 \pm 4,7$ células/campo) (figura 53, a). Además, y luego de confirmar la expresión de IL-8 en el medio condicionado tumoral (MCT) generado (figura 53, b), el bloqueo de IL-8 en el MCT con un anticuerpo neutralizante redujo la capacidad de migrar de CD/LT un 50% y de CD/LT/poly I:C un 32%, mientras que no afectó la migración de CD/LT tratadas con AH BPM (figura 53, b). Estos resultados sugieren que IL-8 juega un papel importante en la atracción de las CD hacia el tumor, y que el pre-tratamiento con AH BPM interfiere o afecta este proceso.



AH BPM genera resistencia a la atracción de MCT mediada por IL8. a. Se realizó un ensayo de migración de CD/LT hacia IL8 recombinante. Ensayo representativo de 4 experimentos independientes. Se contó el número de células en 5 campos/pocillo. El resultado se expresa como índice de migración respecto CD/LT \pm EEM. Se comparó CD/LT vs CD/LT/AH BPM. Mann Whitney t test; *** $p \leq 0,01$. b. Ensayo similar en el que se utilizó medio condicionado tumoral con o sin anticuerpo neutralizante para IL8 (anti-IL8) ($20 \mu\text{g/ml}$) y su isotipo. Se grafica como índice de migración respecto a CD/LT hacia MCT. Barra gris: CD/LT; barra negra: CD/LT/AH BPM; barra blanca: CD/LT/poly I:C. Mann Whitney t test; * $p \leq 0,05$.

6. El tratamiento con AH BPM induce la actividad de la metaloproteasa-2

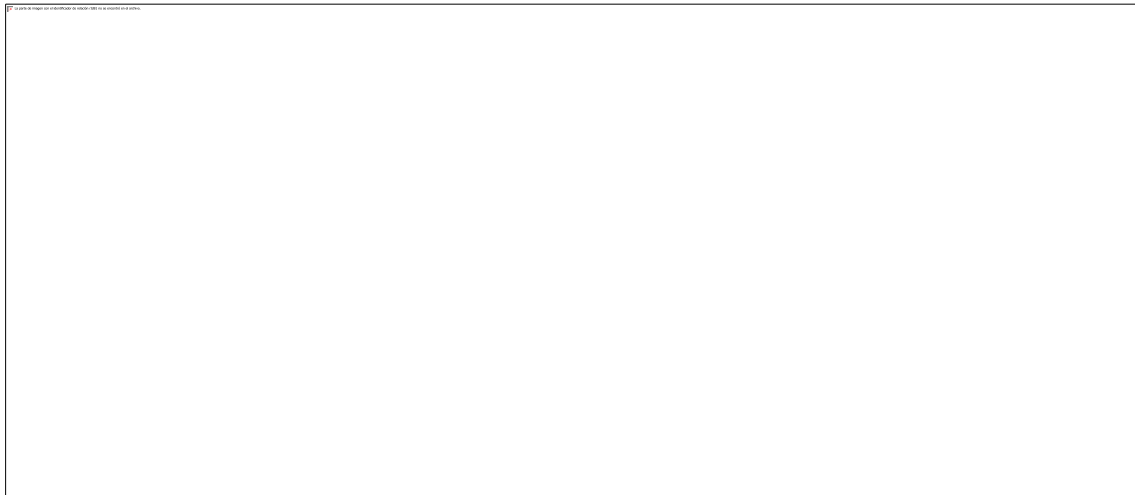
Considerando que las metaloproteasas (MMP) son enzimas que participan en la migración de CD a través de la MEC (Ratzinger, Stoitzner et al. 2002) decidimos evaluar si AH BPM afecta la actividad de estas enzimas. Así comprobamos que el pre-tratamiento con AH BPM incrementó un 32% la actividad de MMP-2 en el sobrenadante de CD/LT derivadas de donantes sanos (figura 54).



El acondicionamiento con AH BPM induce la actividad de MMP-2. Se muestra negativo del gel de un donante sano (panel superior) y cuantificación de la actividad gelatinasa por densitometría (DS n: 3; pacientes n: 3) (panel inferior). La actividad relativa de MMP se obtuvo normalizando los valores respecto a CD/LT. Las barras representan la actividad media de MMP \pm EEM en el sobrenadante de CD de donantes sanos y de pacientes. Barras gris: CD/LT; barras negras: CD/LT/AH BPM; barras blancas: CD/LT/poly I:C. UA: Unidad arbitraria. CD/LT vs CD/LT/AH BPM; t test pareado; * $p \leq 0,05$.

7. AH BPM modula la expresión de receptores de AH en CD

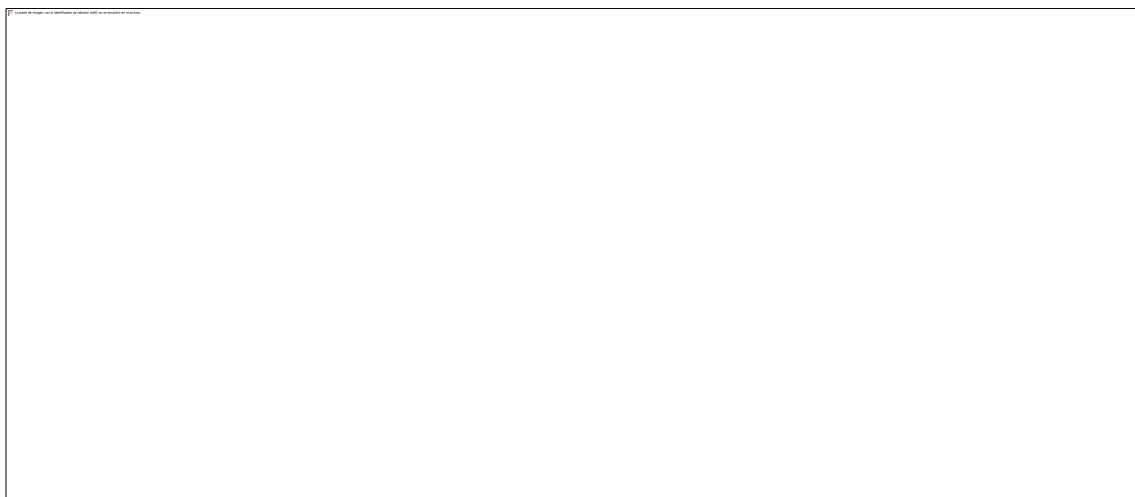
AH es capaz de actuar a través de diferentes receptores como CD44 (Lesley, Hascall et al. 2000), TLR-2 (Scheibner, Lutz et al. 2006), y TLR-4 (Taylor, Trowbridge et al. 2004). Estos receptores han sido implicados en procesos de maduración, adhesión y migración celular. Sorpresivamente encontramos que las CD/LT de donantes sanos como de pacientes tratadas con AH BPM, disminuyeron la expresión de CD44, TLR-2, TLR-4 y RHAMM (figura 55).



El acondicionamiento con AH BPM reduce la expresión de receptores de AH. qPCR de receptores de AH. Los resultados son expresados como cambio de la expresión respecto a CD/LT. Barras gris: CD/LT; barras negras: CD/LT/AH BPM. UA: Unidad arbitraria. CD/LT vs CD/LT/AH BPM; t test pareado; * $p \leq 0,05$; *** $p \leq 0,001$.

8. CXCR y otros receptores implicados en el proceso de migración celular

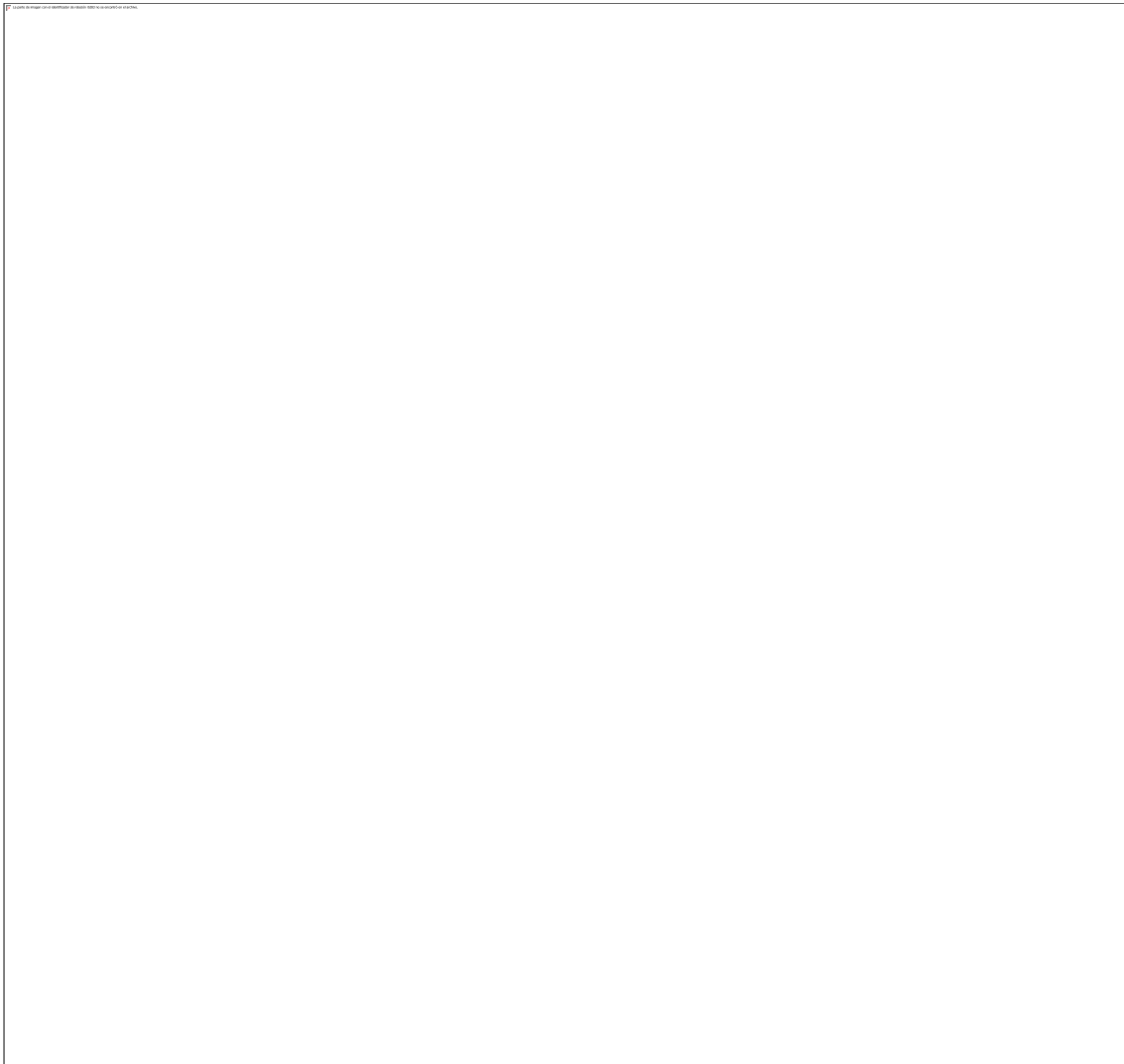
Luego investigamos otras moléculas relacionadas con la migración celular. Para esto realizamos un array de PCR para citoquinas que participan en este proceso en muestras derivadas de un DS y un paciente. Así seleccionamos FPR1, CD38, CCLR2, CXCR1 y CXCR2 para estudiarlas en un grupo de DS y pacientes. Pudimos observar que el tratamiento con este glicosaminoglicano no modificó de manera significativa la expresión de estas proteínas (figura 56).



El tratamiento con AH BPM induce la expresión de IL-8 en CD/LT sin modificar la expresión de sus receptores. Se muestra la expresión de ARNm medido por qPCR de proteínas relacionadas con la migración celular. Se grafica el resultado de CD/LT/AH BPM proveniente de donantes sano (izquierda) y de pacientes (derecha) en relación a CD/LT sin tratar. Mann Whitney t test; * $p \leq 0,05$.

9. AH BPM aumenta la migración de CD/LT hacia el ganglio linfático regional *in vivo*

Decidimos evaluar si AH BPM modifica la capacidad de migrar de CD/LT humanas. Con este fin diseñamos un modelo tumoral de CCR humano en ratones *nude*, a los que les inoculamos en forma s.c., en un sitio equidistante del tumor y del GL regional, CD/LT con o sin pre-tratar con AH BPM y teñidas con CM-Dil. Después de 48 hs, los animales fueron sacrificados, el tumor y el GL disecado y disgregado para su posterior análisis mediante citometría de flujo. Como se puede ver en la figura 58, las CD/LT/AH BPM provenientes de DS y de pacientes migraron más eficientemente hacia el GL regional en comparación con las CD/LT sin acondicionar, las que fueron atraídas preferentemente por el tumor (GL: DS 703 ± 229 vs 460 ± 253 células CMDil⁺/10⁵ células, pacientes 469 ± 120 vs 202 ± 32 células CMDil⁺/10⁵ células; tumor: DS 193 ± 12 vs 608 ± 81 células CMDil⁺/10⁵ células; pacientes 646 ± 105 vs 1162 ± 65 células CMDil⁺/10⁵ células) (figura 57, a y b, respectivamente). De esta forma pudimos correlacionar con muestras humanas, en un modelo tumoral *in vivo*, los resultados obtenidos *in vitro*.



El pretratamiento de CD/LT con AH BPM incrementa la migración hacia el ganglio linfático y la reduce hacia el tumor. CD/LT con o sin acondicionar con AH BPM y teñidas con CMDiI fueron inoculadas en forma s.c. entre el tumor y ganglio linfático más cercano en ratones nude con un fragmento de tumor humano. 24 hs después se obtuvo una suspensión celular a partir de la remoción quirúrgica del ganglio linfático (a) y del tumor (b). El número de células CMDiI + fue contabilizado mediante citometría de flujo. Las barras representan el número de CD que migraron. Barra gris: CD/LT; barra negra: CD/LT/AH BPM. * CD/LT vs CD/LT/AH BPM. 1-6: Donante sano; 1#-4#: Pacientes. Mann Whitney t test; $p \leq 0,05$.

Parte IV

9. Vacunación con CDpre tratadas con AH BPM en ratones con cáncer de colon

Teniendo en cuenta que el pre-tratamiento de CD/LT con AH BPM impacta positivamente sobre su estado madurativo, su capacidad migratoria *in vitro* e *in vivo*, y en su capacidad de estimular la proliferación de linfocitos, evaluamos si la inoculación de estas células tiene un efecto antitumoral *in vivo*, en un protocolo de vacunación con CD.

1. La vacunación con CDpre tratadas con AH BPM inhibe la velocidad de crecimiento tumoral e incrementa la sobrevida de ratones portadores de tumor

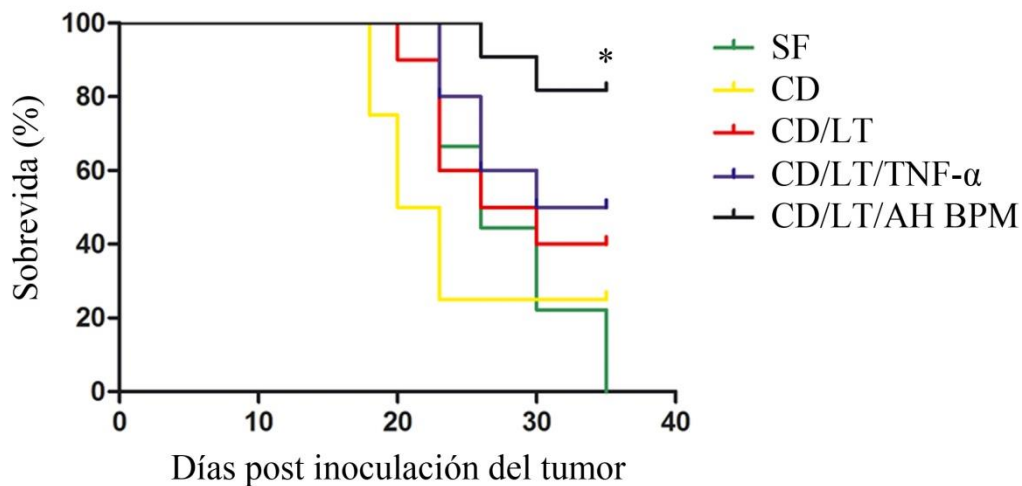
Con este propósito generamos un modelo murino de cáncer de colon e inoculamos dos dosis por vía s.c. de CD/LT, entre el nódulo tumoral y el GL más cercano. La primer dosis de tratamiento se dio al 7^{mo} día post inoculación del tumor, cuando el mismo era palpable, y la segunda dosis se aplicó al 9^{no} día post inoculación de las células tumorales. Como grupo control se utilizó CD sin pulsar, CD/LT y CD/LT activadas con TNF- α . Así pudimos apreciar que el tratamiento con CD/LT/AH BPM generó una tasa de respuesta tumoral completa del 20% y redujo de manera significativa la velocidad del crecimiento tumoral respecto al tratamiento con CD con o sin pulsar con lisado tumoral ($p \leq 0,05$) (figura 58).



CD/LT pre-tratadas con AH BPM induce una potente respuesta antitumoral in vivo. Ratones BALB/c inoculados en forma s.c. con 5×10^5 células CT26; al día 7mo y 9no se les inoculó por vía s.c. solución fisiológica, CD, CD/LT, CD/LT/AH BPM o DC/TL/TNF- α . El volumen tumoral fue medido tres veces/semana durante 30 días. Los resultados son representativos de tres experimentos independientes (media \pm DE, n = 10). a. Promedio general del volumen tumoral. * vs. CD; δ vs. CD/LT. * $p \leq 0,05$; $\delta p \leq 0,05$. b. Curva de crecimiento tumoral individual para los distintos grupos de tratamiento.

Además, el tratamiento con CD/LT/AH BPM o CD/LT/TNF- α , pero no CD/LT solo, aumentó significativamente la supervivencia de los animales comparada con la de ratones tratados con CD (supervivencia media en días, SF: 26; CD: 21; CD/LT: 28; CD/LT/TNF- α : 32; CD/LT/AH BPM: > 35; log rank test: $p < 0,01$) (figura 59). Posteriormente, desafiamos a los ratones libres de tumor al final del tratamiento con la inoculación de células CT26 por vía s.c. Así, evidenciamos que todos los ratones curados rechazaron el nuevo implante tumoral, demostrando de esta manera la generación de memoria inmunológica antitumoral específica. Es importante aclarar

que el tratamiento fue bien tolerado por todos los animales sin presentar signos clínicos de toxicidad.



El tratamiento con CD/LT/AH BPM incrementa la supervivencia de los ratones portadores de CCR. Curva de Kaplan-Meier de ratones con CCR tratados con solución fisiológica (SF), CD, CD/LT, CD/LT/ TNF- α y CD/LT/AH BPM. Log-rank test.

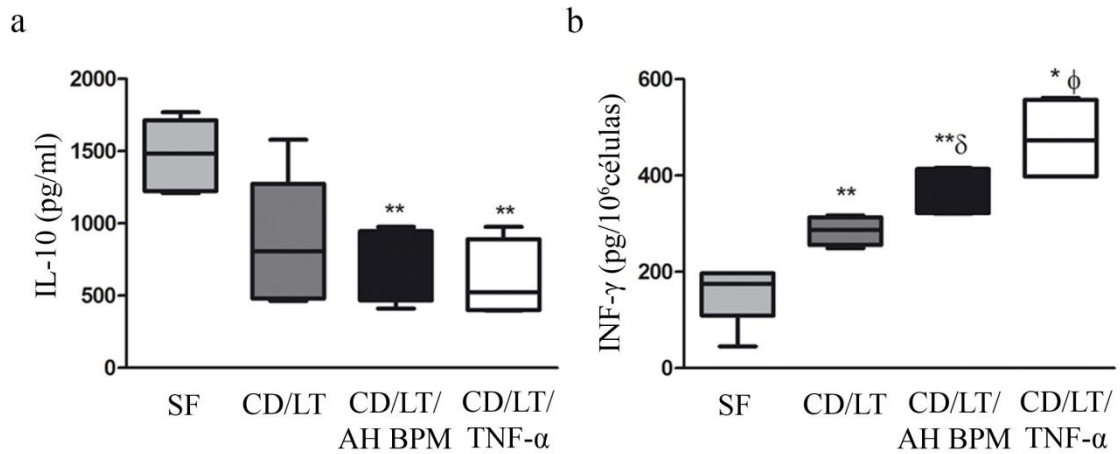
2. Esplenocitos derivados de animales con CCR tratados con CD/LT/AH BPM presentan un perfil inmunológico de tipo Th1 y una alta actividad citotóxica específica

Esplenocitos derivados de animales tratados con CD/LT/AH BPM o TNF- α , mostraron un mayor índice de proliferación *in vitro* cuando fueron estimulados con células CT26 (tratadas con mitomicina C, para bloquear su proliferación) (8.585 ± 750 y 7.541 ± 1.181 c.p.m. respectivamente), en comparación con esplenocitos derivados de animales tratados con SF (2.168 ± 427 c.p.m.) ($p \leq 0,01$) o CD/LT (5.048 ± 499 c.p.m.) ($p \leq 0,05$) (figura 61, a). Luego investigamos si el efecto antitumoral generado por AH era mediado por activación de células NK o linfocitos T citotóxicos. Por medio de un ensayo de citotoxicidad pudimos comprobar que esplenocitos provenientes de animales portadores de tumor y tratados con CD/LT/AH BPM o TNF- α , presentaron una mayor actividad lítica específica contra células CT26 (índice de citotoxicidad: $2,3 \pm 0,34$ y $3 \pm 0,5$, respectivamente) en comparación con los provenientes de animales tratados con SF (índice de citotoxicidad: $1 \pm 0,7$) ($p \leq 0,05$) o CD/LT (índice de citotoxicidad: $1,3 \pm 0,4$) ($p \leq 0,01$) (figura 60, b).



El tratamiento con CD/LT pre-incubadas con AH BPM induce una respuesta antitumoral citotóxica específica. a. Esplenocitos provenientes de ratones de los diferentes grupos de tratamiento estimulados durante 5 días con células CT26 tratadas con mitomicina-C. La proliferación celular fue evaluada por incorporación de timidina[3H]. Los datos representan la media \pm EEM de c.p.m.(triplicado). b. La actividad citolítica de esplenocitos derivados de los distintos grupos de animales y estimulados con células CT26 in vitro fue determinada mediante ensayo de liberación de LDH. Células blanco: CT26 (negro) o YAC-1 (blanco). Los resultados son representativos de dos experimentos independientes, están expresados como valor relativo de lisis respecto de la liberación basal de LDH de las células blanco. Mann Whitney t test; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

En el sobrenadante del cultivo de esplenocitos derivados de animales tratados con CD/LT/AH BPM y CD/LT/TNF- α encontramos una significativa reducción en la producción de IL-10 ($745 \pm 124,5$ pg/ml y $806 \pm 202,3$ pg/ml, respectivamente) comparado con el grupo sin tratar ($1.484 \pm 94,88$ pg/ml) ($p \leq 0,01$) (figura 61, a). Si bien hallamos una mayor concentración de INF- γ en aquellos sobrenadantes provenientes de esplenocitos de animales tratados con CD/LT ($284 + 16,9$ pg/ml) respecto a los provenientes de animales sin tratar ($157 \pm 28,5$ pg/ml) ($p \leq 0,05$), fue mayor aún el incremento de INF- γ en los sobrenadantes de CD/LT/AH BPM ($375 + 21,8$ pg/ml; vs SF: $p \leq 0,01$, vs CD/LT: $p \leq 0,05$) y CD/LT/TNF- α ($476 \pm 44,7$ pg/ml; vs SF: $p \leq 0,05$, vs CD/LT: $p \leq 0,05$) (figura 61, b). Con estos resultados pudimos concluir que la adición de AH BPM al cultivo de CD aumenta su eficacia en el tratamiento antitumoral con CD de un modo comparable con la incubación con TNF- α induciendo una respuesta antitumoral citotóxica específica.



CD/LT/AH BPM induce una respuesta antitumoral Th1. La expresión IL-10 (a) e INF- γ (b) fue determinada mediante la técnica de ELISA en el sobrenadante de cultivo de esplenocitos provenientes de animales tratados con solución fisiológica (SF), CD/LT, CD/LT/AH BPM y CD/LT/TNF- α . Mann Whitney t test; *, ϕ $p \leq 0,05$; **, δ $p < 0,01$. * vs SF; ϕ , δ vs CD/LT.

Discusión

En la última década, en Estados Unidos, la incidencia de cáncer en el hombre ha disminuido sutilmente (0,8%/año) y en la mujer se ha mantenido estable. A pesar de que esto se vea reflejado en una disminución en la mortalidad del 1,5%/año, el cáncer continúa siendo la segunda causa de muerte más frecuente. Esta disminución en la incidencia y mortalidad es el resultado de una mayor conciencia y profilaxis que se traduce en métodos de screening y tratamientos preventivos, métodos diagnósticos más sensibles y avances terapéuticos con impacto clínico. Muestra de esto es que en los últimos años se ha adoptado el uso del screening para cáncer de pulmón en pacientes de alto riesgo (Aberle, Adams et al. 2011) y la vacunación profiláctica para la infección por HPV y HBV (Chang, You et al. 2009, Kahn 2009). Según las estadísticas del Instituto Nacional del Cáncer, la Argentina posee una incidencia de cáncer media-alta, comparable con Chile y Brasil (240 casos/100000 habitantes), y es la segunda causa de muerte en el país. El cáncer de colon representa casi el 12% de las neoplasias en ambos sexos, y la primera causa de muerte por cáncer (<http://www.msal.gov.ar/inc/>).

Frente al cáncer de colon las posibilidades de tratamiento son variadas, y dependen principalmente del estadio en que se encuentre la enfermedad. Se considera a la cirugía como una opción curativa en los estadios I y II de bajo riesgo, situación en la que se encuentra el 40% de los pacientes al momento del diagnóstico (Benson, Bekaii-Saab et al. 2013). Sin embargo, un 20% de los pacientes tiene metástasis al momento del diagnóstico, por lo que, en ese mismo momento o durante la evolución de su enfermedad, no tendrán una opción terapéutica (Benson, Bekaii-Saab et al. 2013). Es en este contexto donde se sitúan las nuevas opciones de tratamiento.

El reconocimiento del sistema inmunitario como un mecanismo de defensa antitumoral ha revolucionado el tratamiento del cáncer dando mayor relieve a la inmunoterapia. Uno de los objetivos de la inmunoterapia del cáncer es sortear los mecanismos de evasión, celulares y/o humorales, contra antígenos propios del tumor. La primera molécula utilizada para estimular al sistema inmunitario fue INF- α que demostró actividad antitumoral en leucemias, melanoma, cáncer renal y otros tumores sólidos (Kirkwood and Ernstoff 1984). Luego siguió el uso de IL-2 administrado en forma exógena que también demostró tener actividad antitumoral. Fue aprobada por la FDA en 1998 para el tratamiento del melanoma, y es aún utilizada en forma sistémica en circunstancias particulares debido a la importante toxicidad que presenta y a su escasa eficacia terapéutica (Atkins, Kunkel et al. 2000). Es de remarcar que aquellos pacientes que respondieron a estos tratamientos permanecieron libres de enfermedad durante largos períodos de tiempo, lo que indica que tienen capacidad de generar memoria inmunológica antitumoral. En la actualidad las estrategias más exploradas en este sentido en ensayos pre-clínicos y clínicos son: la activación inespecífica del sistema inmunitario mediante citoquinas y otras moléculas (INF- γ , IL-2, etc) (Santegoets, Turksma et al. 2013), inmunoterapia específica con células tumorales autólogas o alogénicas modificadas para producir y secretar citoquinas, péptidos o proteínas (Nikitina, Clark et al. 2001, Park, Rosenberg et al. 2011, Liechtenstein, Perez-Janices et al. 2013), terapia celular adoptiva de linfocitos citotóxicos específicos (Zheng, Li et al. 2013, Ames and Murphy 2014), anticuerpos inmunoestimuladores (agonistas TLR, agonista CD40, anti CTLA-4, anti PD-1, etc) (Brahmer, Tykodi et al. 2012, Stier, Maletzki et al. 2013, Vonderheide, Bajor et al. 2013, Tse, Collins et al. 2014), y la activación *in vitro* o *in vivo* de CPA (Radford, Tullett et al. 2014). Recientemente, ha sido aprobado el uso de un anticuerpo

monoclonal activador del sistema inmunitario (ipilimumab) que actúa bloqueando CTLA-4 (*antígeno de linfocito T citotóxico*) siendo la única droga capaz de dar un beneficio claro en términos de supervivencia en pacientes con melanoma avanzado (Kaufman, Kirkwood et al. 2013). Otro hito en la historia de la inmunoterapia lo marcó la vacunación con CPA modificada. Esta vacuna (sipuleucel-T) fue aprobada por la FDA para su uso en pacientes con cáncer de próstata metastásico hormono-resistente por demostrar un beneficio en la supervivencia de los mismos (Kantoff, Higano et al. 2010).

El ácido hialurónico es un componente estructural de la matriz extracelular. Se lo reconoce como un importante regulador de procesos tan variados como la morfogénesis, el mantenimiento de la homeostasis y la inflamación crónica (Toole 2002, Toole 2004, Jiang, Liang et al. 2007, Itano and Kimata 2008). Su función depende de su peso molecular, su concentración, su relación con la célula y su asociación con proteínas del espacio extracelular. Se ha demostrado que AH APM tiene un efecto anti-inflamatorio actuando como agente anti-apoptótico en células epiteliales del pulmón y como agente protector de lesión hepática aguda reduciendo la liberación, por parte de linfocitos, de citoquinas pro-inflamatorias (Nakamura, Yokohama et al. 2004, Jiang, Liang et al. 2005). Por el contrario, AHBPM actúa sobre células del sistema inmunitario como CD y macrófagos, estimulando en ellas la expresión de genes pro-inflamatorios (Horton, Burdick et al. 1998, Horton, McKee et al. 1998, Horton, Olman et al. 1999, Horton, Shapiro et al. 1999, Termeer, Benedix et al. 2002, Taylor, Yamasaki et al. 2007). Su síntesis y degradación fisiológicas es finamente regulada por enzimas específicas. El modo de síntesis y degradación de AH para su posterior uso experimental y/o clínico es clave a fin de interpretar resultados. Se postula que, al menos en parte, la discrepancia que existe en la bibliografía respecto a la función de AH responde al diferente peso molecular en el que se utiliza, la presencia de contaminantes (ej: LPS), y/o a la pérdida de su estructura primaria producto de su degradación química (Stern, Kogan et al. 2007). Por esta razón, decidimos utilizar en nuestros experimentos AH sintético de un peso molecular de un rango definido ($1 - 3 \times 10^5$ Da).

CD44 es el principal receptor conocido de AH. Si bien no es específico para AH es su principal ligando. Es una glicoproteína transmembrana, de estructura simple, con un dominio corto intracitoplasmático, una porción transmembrana y un dominio extracitoplasmático. Si bien en su porción extracitoplasmática existe un sitio de unión específico para AH, es capaz de interactuar con otros glicosaminoglicanos, factores de crecimiento y receptores de factores de crecimiento (Yasuda, Nakano et al. 2002, Kim, Lee et al. 2008). Señaliza por su porción intracitoplasmática a través de la fosforilación de proteínas relacionadas con mecanismos de reorganización del citoesqueleto y migración celular, supervivencia celular y resistencia a la apoptosis (Bourguignon 2001, Ghatak, Misra et al. 2005). A pesar de ser sintetizado por un solo gen, se han descritos más de diez variantes producto de splicing alternativo y/o cambios post-transcripcionales, con variaciones en su dominio extracelular fundamentalmente lo que desencadena acciones, en algunos casos, opuestas (Ponta, Sherman et al. 2003). Es expresado por una gran variedad de células, pero su actividad se relaciona principalmente con su capacidad de ligar AH. Este proceso no es del todo entendido pero se postula que existen situaciones que facilitan la unión de CD44 a AH, es decir que lo "activan", como son cambios post-translacionales (ej: glicosilación), la interacción con proteínas del citoesqueleto, la localización en sitios específicos de la membrana celular, y el modo de organización espacial y

tamaño de AH(Ponta, Sherman et al. 2003). Existen otros receptores capaces de interactuar con AH como son RHAMM, LYVE, TLR2/4 (del inglés: *toll like receptor*).

Teniendo en cuenta que AH está presente en una gran variedad de tumores, estudiamos *in vitro* su relación con diferentes líneas celulares. Las células derivadas de adenocarcinoma murino y humano, CT26 y LOVO respectivamente, y las células HEPA129 derivadas de hepatocarcinoma murino, mostraron una alta expresión de CD44, con gran capacidad de unir AH. Al mismo tiempo demostramos que AH puede unirse también a la célula de un modo independiente de CD44, probablemente a través de los otros receptores descriptos para AH (Savani, Cao et al. 2001)(Termeer, Benedix et al. 2002, Xu, Edwards et al. 2004).

Se ha descrito que la señalización mediada por CD44 en la célula tumoral podría tener un efecto pro-apoptótico o anti-apoptótico según el isotipo de que se trate y las características del estímulo que lo active. AH APM unido de forma estable a CD44st lo activa señalizando a través de PI3K/Akt dando una señal de supervivencia celular(Toole 2009). En modelos tumorales se han ensayado distintas maneras de bloquear esta interacción a fin de disminuir la intensidad de esta señal. En una línea de carcinoma de mama modificada genéticamente para secretar CD44 soluble y así ligar AH presente en el medio extracelular, se observó que la interacción AH/CD44 de membrana y su posterior internalización son esenciales para el crecimiento tumoral *in vitro* e *in vivo*(Yu, Toole et al. 1997). En un modelo tumoral de melanoma *in vitro* e *in vivo* el uso de un péptido de 42 aminoácidos (BH-P) con tres sitios de unión a AH inhibe el desarrollo tumoral por inducción de apoptosis(Xu, Chen et al. 2003). Se ha postulado también que oligosacáridos de AH (peso molecular $2,5 \times 10^3$ Da), y no de peso molecular mayor a 8×10^4 Da, serían capaces de bloquear la interacción AH-receptor inhibiendo el crecimiento independiente de anclaje característico de las células malignas e induciendo apoptosis en células provenientes de cáncer de colon humano(Ghatak, Misra et al. 2002). Además, se han descrito mecanismos directos de apoptosis gatillados por la interacción AH/CD44, por ejemplo en una línea de linfocitos humanos inmortalizada que expresan constitutivamente FAS y no expresan CD44 (células Jurkat). Con estas células, luego de ser transfectadas con cADN codificante para CD44st y CD44v2-10, se demostró que la estimulación de CD44st induce la apoptosis celular mediada por FAS(Mielgo, Brondani et al. 2007), y que CD44v interactúa con FAS generando resistencia a la apoptosis celular(Mielgo, van Driel et al. 2006). Todo esto podría explicar la variabilidad en la inducción de la apoptosis que constatamos al incubar a las distintas líneas celulares con AH BPM. En el caso de las células CT26, la inducción de la apoptosis observada con el tratamiento con AH BPM a bajas concentraciones estaría mediado por la disminución de pAkt (fosforilado), y podría deberse a la interrupción de la interacción de CD44 con AH endógeno. En nuestros experimentos utilizamos oAH que mostraron un efecto similar pero a mayores concentraciones (100 µg/ml), fenómeno descrito también por otros autores en diferentes tipos celulares(Zeng, Toole et al. 1998, Ghatak, Misra et al. 2002, Hosono, Nishida et al. 2007, Cordo Russo, Garcia et al. 2008, Misra, Obeid et al. 2008). Es conocida la interacción entre AH-CD44 y receptores de tipo tirosina quinasa como son el receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR, del inglés: *epidermal grow factor receptor*), receptor para el factor de crecimiento insulínico tipo 1 (IGF-1 R, del inglés: *insulin growth factor receptor*), el receptor del factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGFR, del inglés: *platelet derived growth factor receptor*) y C-MET; todos ellos implicados en procesos de apoptosis y proliferación celular(Misra, Toole et al. 2006). El

bloqueo de esta interacción, ya sea mediante el uso de oligómeros de AH que compite con AH nativo, la presencia de proteínas en la MEC con capacidad de unir AH actuando como inhibidores competitivos, o la disminución de la expresión de CD44 de membrana, tiene un efecto anti-proliferativo (Ghatak, Misra et al. 2005). Nosotros observamos este efecto anti-proliferativo con el uso de AH BPM. Tanto el efecto pro-apoptótico como anti-proliferativo generado con AH BPM se produjo al incubar las células con bajas dosis de AH. El hecho de este efecto se observe a bajas dosis de AH podría explicarse por que AH BPM actúa como ligando monovalente de baja afinidad de unión a CD44, mientras que AH APM actúa como un ligando multivalente, con gran afinidad y con la posibilidad de generar unión cruzada con múltiples moléculas de CD44 (Lesley, Hascall et al. 2000). Sin embargo, si se incrementa la concentración de AH BPM puede competir con AH APM induciendo señalización del receptor.

Para estudiar el rol de CD44 en la inducción de apoptosis e inhibición de la proliferación inducidas por AH BPM, pre-tratamos las células con anti-CD44 (KM81, anticuerpo bloqueante de la unión a AH). Así observamos que el bloqueo de CD44 redujo el efecto pro-apoptótico y anti-proliferativo de AH BPM. Esto podría explicarse teniendo en cuenta que ya ha sido demostrado que, a diferencia de otros anti-CD44, el anticuerpo utilizado derivado del hibridoma KM81 no induce apoptosis *per se* (Zheng, Katoh et al. 1995, Ishiwatari-Hayasaka, Fujimoto et al. 1999). Otra explicación posible es que AH BPM señalice a través CD44 induciendo la apoptosis e inhibiendo la proliferación celular, y que KM81 bloquee esta señalización. En macrófagos fue demostrado que el tratamiento con AH BPM activa PKC α resultando en una inhibición de la síntesis del receptor de adenosina A2aR. Este receptor activado suprime la actividad de NF κ -B siendo un mecanismo de control negativo en un contexto pro-inflamatorio (Collins, Black et al. 2011). Matou-Nasri y col. han demostrado en células endoteliales que oAH actúa a través de CD44 y RHAMM, activando PKC α y señalizando a través de Cdc2 y γ -aducina (Matou-Nasri, Gaffney et al. 2009). De manera complementaria nuestros resultados muestran que AH APM no afectó la proliferación ni apoptosis celular en la mayoría de las líneas estudiadas, y en algunos casos disminuyó el índice de apoptosis. Además, las células que presentaban mayor expresión de CD44 (CT26 y HEPA129) fueron las que se vieron más afectadas por el tratamiento con AH BPM. De esta forma podemos sugerir que AH BPM exógeno a una baja dosis interacciona con la célula tumoral CT26 a través de CD44 disminuyendo su proliferación e induciendo la apoptosis celular (Alaniz, Rizzo et al. 2009).

Estudios *in vivo* han correlacionado la presencia de AH con la progresión tumoral. Sus niveles en suero puede ser utilizados como un marcador pronóstico y predictivo (Burchardt, Hein et al. 2003, Hotta, Taniguchi et al. 2004, Xing, Chang et al. 2008), pero sobre todo se lo reconoce en el entorno tumoral como un elemento clave para el desarrollo de esta enfermedad (Itano, Zhuo et al. 2008), donde su metabolismo está desregulado (Alaniz, Garcia et al. 2009). Puede ser secretado por las células del estroma o por las mismas células tumorales. El tipo y peso molecular que predomina no está del todo clarificado, y probablemente varíe según el estadio del tumor. De hecho, el grado histológico y de desdiferenciación celular se correlaciona con el número de células tumorales que sintetizan AH y con su intensidad de marca (Itano and Kimata 2008). Las metástasis en general tienen un alto contenido de AH estromal, y un alto nivel de AH en la célula tumoral se correlaciona con menor supervivencia y/o tiempo libre de enfermedad en cáncer de mama, gástrico y colon (Ropponen, Tammi et al. 1998, Suwiwat, Ricciardelli et al. 2004). Por otra parte, ha sido demostrado que el tratamiento sistémico con

oligómeros de AH inhibió el crecimiento tumoral logrando en algunos casos una respuesta completa, del tumor primario y sus metástasis, en ratones con distintos tipo de tumores como melanoma, carcinomas, osteosarcoma, y tumores del sistema nervioso periférico(Hosono, Nishida et al. 2007, Gilg, Tye et al. 2008, Toole and Slomiany 2008, Slomiany, Dai et al. 2009). También se ha demostrado que el uso de oAH a dosis subterapéuticas induce quimiosensibilización en tumores resistentes a doxorubicina(Slomiany, Dai et al. 2009). En nuestras manos, el tratamiento *in vivo* con AH BPM y oAH administrado en forma i.v, pero no AH APM, demostraron tener un efecto antitumoral reduciendo la velocidad de crecimiento e incrementando la supervivencia de los ratones tratados(Alaniz, Rizzo et al. 2009). Se ha publicado que AH APM administrado diariamente en forma intratumoral indujo un 25% de repuestas completas en un modelo murino de cáncer de mama(Herrera-Gayol and Jothy 2002). oAH inoculado en forma s.c. utilizando una bomba de infusión lenta inhibió el crecimiento tumoral en un modelo de melanoma(Zeng, Toole et al. 1998) e intratumoral en osteosarcoma(Hosono, Nishida et al. 2007). Por el contrario, otros autores han demostrado que la administración de AH APM incrementó el potencial metastásico en un modelo tumoral de CÁNCER DE COLON(Tan, Wang et al. 2001). Sin bien algunos de estos resultados pueden parecer contradictorios hay que tener en cuenta la complejidad del sistema con variaciones en los preparados de AH, las distintas formas de administración, la diversidad de tumores y de receptores de AH. En líneas generales, podría afirmarse que el empleo de AH BPM tiene un efecto antitumoral y que el AH de APM tiene efectos contrarios. En consonancia con esta observación, en nuestros experimentos observamos claramente que AH BPM a bajas concentraciones tiene un efecto antitumoral como consecuencia de su acción directa sobre la célula cancerígena pero sobre todo debido a su acción sobre el sistema inmunológico.

AH es un conocido modulador del sistema inmunitario, y su función varía según, entre otros factores, su peso molecular y la célula diana, como se mencionó anteriormente. Se ha demostrado que AH nativo interviene en procesos de reparación de tejidos(Noble 2002), inhibe la fagocitosis y polariza a los macrófagos hacia un perfil M2 caracterizado por la secreción de citoquinas inmunoreguladoras como IL-10 y TFG- β (Forrester and Balazs 1980), y promueve el efecto supresor de LTreg CD4⁺ CD25⁺(Bollyky, Lord et al. 2007). Por el contrario AH BPM es considerado un potente activador del sistema inmunitario(Termeer, Hennies et al. 2000, Termeer, Sleeman et al. 2003, Mummert 2005). Fragmentos de AH inducen en células macrófágicas la activación del factor de transcripción nuclear NF κ B implicado en la activación de genes pro-inflamatorios(Noble, McKee et al. 1996), activan a las CD vía TLR-2 y TLR-4(Termeer, Benedix et al. 2002), interviene en procesos de adhesión y migración de linfocitos(Evanko, Potter-Perigo et al. 2012), entre otros efectos biológicos. Se ha utilizado AH BPM *in vivo* como adyuvante incrementando la respuesta antígeno específica en un modelo de vacunación murino co-administrando el antígeno y AH BPM de manera sc(Scheibner, Lutz et al. 2006).

Administrado en forma i.v. AH se distribuye rápidamente siendo indetectable en sangre luego de 24 hs. Se acumula en hígado principalmente, y en mucha menor proporción en riñón y bazo(Laznicek, Laznickova et al. 2012). También se postula que parte de su metabolismo ocurre en ganglios linfáticos(Fraser and Laurent 1989). Ha sido demostrado el efecto de AH de más de 450 kDa administrado en forma i.v. como factor hepatoprotector disminuyendo la inflamación en un modelo de hepatitis aguda(Wolf, Schumann et al. 2001, Nakamura,

Yokohama et al. 2004). Nosotros observamos mediante la inoculación de AH-FitC que el AH exógeno llega al bazo, y que este tratamiento se asoció a un incremento en el porcentaje de células esplénicas CD11c⁺/CMH II⁺. Este fenómeno se correlacionó con una mayor tasa proliferativa y mayor secreción de IL-12 de esplenocitos expuestos a CD autólogas cargadas con proteínas tumorales derivadas de células CT26. Si bien estos datos son alentadores, hay que tener en cuenta que en los protocolos de inmunoterapia una respuesta inmunológica no necesariamente se correlaciona con una respuesta clínica eficiente. Esto depende de la calidad de los linfocitos citotóxicos y helper inducidos, la eliminación o inactivación de linfocitos Treg, y la capacidad de quebrar el estado inmunosupresor propio del microambiente tumoral. Es clara la importancia de los LT CD8⁺específicos para la eliminación de la célula tumoral, pero en muchas ocasiones su inducción no es suficiente. Esto es debido a que no migran a la lesión tumoral o poseen baja afinidad de unión al complejo CMH-I-péptido, lo que las inhabilita para actuar como células citotóxicas específicas (Appay, Douek et al. 2008), o es el mismo microambiente tumoral el responsable de inhibir su función (Gabrilovich and Nagaraj 2009). Sin embargo, Rosenberg y col. demostraron que la infusión i.v. de linfocitos intratumorales CD8⁺ induce una respuesta antitumoral importante y duradera en pacientes con melanoma avanzado (Rosenberg, Yang et al. 2011). Nosotros demostramos que el tratamiento con AH BPM indujo una respuesta antitumoral específica que se reflejó en un aumento del infiltrado inflamatorio linfocitario tumoral con predominio de células CD3/CD8⁺, lo cual puede correlacionarse con la evolución de la enfermedad y el incremento de la supervivencia media de los ratones y disminución de la velocidad de crecimiento tumoral. Es importante resaltar que el AH BPM utilizado y la dosis para estos experimentos no demostró ningún efecto tóxico y no modificó los niveles de IL-10 y VEGF en suero, ambas moléculas con estudiado efecto pro-tumoral (Berghella, Pellegrini et al. 1997, Hegde, Jubb et al. 2013).

Luego decidimos estudiar los efectos de esta molécula sobre CD *in vitro* con la intención de incluirla posteriormente en un protocolo de vacunación basada en CD pulsadas con antígeno tumoral. En la actualidad las terapias inmunoestimuladoras son una herramienta de uso cada vez más frecuente en el tratamiento del cáncer (Radford, Tullett et al. 2014). Particularmente para el cáncer de colon existen numerosos estudios de estas características en etapas pre-clínica y clínica, con limitado éxito clínico (Dalerba, Maccalli et al. 2003, Steinman and Banchereau 2007, Dauer, Schnurr et al. 2008, Pascual, Allantaz et al. 2008). Una de las aproximaciones más prometedoras consiste en la estimulación del sistema inmunitario con vacuna celular basadas en CD (Dauer, Schnurr et al. 2008, Palucka, Ueno et al. 2008). Para esto la mayoría de los protocolos utilizan CD generadas a partir de células progenitoras de médula ósea de ratón y de mononucleares de sangre periférica en humanos. Una vez obtenidas las células mononucleares el proceso de diferenciación puede realizarse por diversos métodos. El más extendido por su sencillez y reproducibilidad consiste en la selección de células por adherencia al plástico durante el cultivo *ex vivo*. Este proceso tiene alto rendimiento con una pureza menor comparada con la selección positiva de células CD14⁺. Sin embargo, fenotípicamente se obtiene una población de CD inmadura con capacidad de activarse de similares características entre sí (Felzmann, Witt et al. 2003). En nuestras manos, del total de mononucleares extraídos obtuvimos un rédito al finalizar el cultivo de entre un 10 y un 20% aproximadamente de la población inicial extraída de SP. De esta población, al menos un 60% correspondían fenotípicamente a CD. En este sentido es importante remarcar que el

costo y la posibilidad de estandarizar el método son dos puntos claves en este tipo de terapias. De hecho, el único protocolo de vacunación de este tipo aprobado por la FDA para su uso clínico utiliza una población heterogénea de células presentadoras de antígeno enriquecida en CD (CD54⁺) pero que incluye linfocitos T (CD3⁺), monocitos (CD14⁺), células NK (CD56⁺) y linfocitos B (CD19⁺)(Kantoff, Higano et al. 2010).

La activación y la capacidad de migrar de las células utilizadas juega un papel clave en la inducción de una respuesta antitumoral potente y específica mediada por células T(Banchereau, Briere et al. 2000, Palucka, Ueno et al. 2008). De hecho la expresión de CMH-II y otras moléculas de co-estímulo (señal 1 y 2 de activación linfocitaria, respectivamente) han demostrado ser de capital importancia(Trombetta and Mellman 2005, Chen, Man et al. 2007). Con este fin se han utilizado diversas moléculas por separado o en “cocktails” que han demostrado ser eficaces para activar a las CD induciendo la expresión de proteínas de co-estímulo tales como CD40, CD80 y CD86. Las moléculas más utilizadas son IL-1 β , IL-6, TNF, IFN- α , IFN- γ , PGE2 y poly I:C(Banchereau, Schuler-Thurner et al. 2001, Giermasz, Urban et al. 2009). A pesar de su poder de activación, existen reportes que demuestran que PGE2 y poly I:C inducen la expresión deIDO (indoleamina-2.3-dioxigenasa) con actividad inmunosupresora en las CD afectando la respuesta de linfocitos T por privación de triptófano(Moller, Michel et al. 2008). Además la estimulación con poly I:C o LPS estimula la activación de otra serie de genes con efecto inmunosupresor como son SOCS-1 (proteína inhibidora de señalización de citoquinas)(Bartz, Avalos et al. 2006, Yoshimura, Naka et al. 2007). Ha sido reportado de diversas maneras que oAH, pero no AH APM, es una molécula estimulante del sistema inmunitario (Mummert 2005). En este sentido, se ha descrito a estos pequeños fragmentos de AH como potente activador de CD derivadas de humanos y ratón(Termeer, Benedix et al. 2002, Do, Nagarkatti et al. 2004, Scheibner, Lutz et al. 2006). En sintonía con lo antes mencionado, demostramos que tanto en CD derivadas de médula ósea de ratón (CD-mo) como de células mononucleares de sangre periférica humanas (CD-cmsp) y pulsadas con antígeno tumoral, el uso de AH BPM incrementó la expresión de CMH-II y CD86 (Termeer, Benedix et al. 2002, Do, Nagarkatti et al. 2004, Scheibner, Lutz et al. 2006). Este incremento en la expresión de estos marcadores de activación se correlacionó con un aumento en la secreción de IL-12p70, citoquina clave para el desvío la respuesta inmunológica hacia un tipo de respuesta Th1 antitumoral (Steinman and Dhodapkar 2001). Por el contrario, la incubación con AH APM no solo no modificó sus marcadores de activación, sino que además disminuyó su capacidad de endocitosis. Asimismo, CD/LT/AH BPM mostraron un incremento en su capacidad de estimular linfocitos T alogénicos y una menor secreción de la citoquina inmunoreguladora IL-10. Estos resultados apoyan la hipótesis de que AH BPM es una señal de activación para estas células.

Más allá del estímulo madurativo utilizado, otro elemento importante que afecta la funcionalidad de las CD es el modo en el que se carga el antígeno. En relación a esto se presentan dos desafíos para la inmunoterapia basada en CD: 1. que el antígeno sea el adecuado para desarrollar una respuesta antitumoral efectiva; 2. que el antígeno sea presentado por medio del CMH-I y CMH-II a fin de generar una respuesta inmunitaria citotóxica específica y efectiva. En cuanto al antígeno utilizado, se han ensayado distintas alternativas como el cargado de proteínas, péptidos, lisado tumoral, ADN o ARN tumoral, técnicas de fusión celular y la infección con vectores virales capaces de expresar antígenos(Kyte, Kvalheim et al. 2005, Lee, Wang et al. 2005, Hatfield, Merrick et al. 2008, Win,

McMillan et al. 2012). En nuestros experimentos decidimos realizar pulsado antigénico con lisado tumoral completo, por su potencialidad de activar la respuesta inmunitaria frente a múltiples antígenos asociados al tumor no tipificados y por la disponibilidad del método (Rizzo, Alaniz et al. 2014). Esta opción es plausible teniendo en cuenta la capacidad de las CD de realizar presentación antigénica cruzada (cross priming), es decir el procesamiento de un antígeno exógeno por vía endógena para su posterior presentación en el contexto de CMH-I (Heath, Belz et al. 2004). Algunos autores han desarrollado sistemas de cargado antigénico específicos facilitando esta vía de procesamiento como la utilización de liposomas (Machy, Serre et al. 2000, Okada, Saito et al. 2001), poly-(g-glutamic acid) nanopartículas (Yoshikawa, Okada et al. 2008) o electroporación (Kim, Kim et al. 2004, Weiss, Allen et al. 2005). Sin embargo, Faure y col. han demostrado que cuando el antígeno requiere un procesamiento previo a la presentación antigénica, esta es menos eficaz aunque se mantiene por mayor tiempo (Faure, Mantegazza et al. 2009).

El uso de antígenos generados a partir del lisado tumoral podría exponer a las CD a una gran variedad de moléculas inmunosupresoras propias del microambiente tumoral y del estrés celular. Para evitar esto existen protocolos que incluyen la incubación del extracto a 100°C o su irradiación (Alfaro, Perez-Gracia et al. 2011). Otro efecto no deseado consiste en la inducción de una respuesta autoinmunitaria por la presentación de antígenos de células no tumorales. Si bien esta es una posibilidad cierta, la incidencia de reacciones autoinmunitarias severas reportadas en protocolos de vacunación con CD es muy bajo. En nuestros experimentos observamos que el pulsado con antígeno tumoral tanto en CD-mo como CD humanas no afectó negativamente el estado madurativo de las células, contrariamente, en algún caso incrementó su estado madurativo. En esta misma línea, las CD/LT utilizadas en un modelo tumoral murino *in vivo* al menos no afectaron negativamente la evolución de los tumores respecto a ratones no tratados (dato no mostrado). Es probable que en parte esta sea una explicación a lo que observamos en nuestros ensayos. En concordancia con estos datos, Shumizo y col., quienes compararon diferentes métodos de cargado antigénico, demostraron que la fusión celular y el pulsado con lisado tumoral fueron capaces de inducir CD con efecto terapéutico en un modelo de cáncer murino (Shimizu, Kuriyama et al. 2004). Este método ha sido utilizado también en múltiples ensayos clínicos con una eficacia variable (Iwashita, Tahara et al. 2003, Lee, Wang et al. 2005, Hussain, Palmer et al. 2008, Kandalaft, Powell et al. 2013).

Las CD una vez acondicionadas *ex vivo* deben ser re-infundidas en el organismo y migrar a la zona T del ganglio linfático, sitio donde harán la presentación antigénica (Allavena, Sica et al. 2000, Palucka, Ueno et al. 2008). Este es un paso clave para la inducción de una respuesta inmunitaria específica antitumoral (Martín-Fontecha, Sebastiani et al. 2003, Randolph, Ochando et al. 2008). Para esto se han ensayado diversas vías de administración que incluyen la inoculación i.v, intradérmica e intra/periganglionar (Eggert, Schreurs et al. 1999, Morse, Coleman et al. 1999). Luego de la inoculación i.v. las CD son detectadas en hígado, bazo y pulmón, pero no en ganglio linfático. La inoculación intranodal implica la potencial lesión del ganglio con la consiguientes desestructuración de las zonas T en el que ocurre la presentación antigénica, sin embargo hay datos que postulan a esta vía como una posibilidad eficaz para inducir una respuesta inmunitaria, especialmente si se inyecta la zona periganglionar (Verdijk, Aarntzen et al. 2009). La administración s.c, que de alguna manera reproduce el proceso

fisiológico de migración celular cuando el antígeno ingresa luego de atravesar la piel, es una de las opciones más difundidas en la actualidad (Lesterhuis, de Vries et al. 2011).

Luego de su administración, la inducción de su migración hacia el ganglio linfático se ha abordado desde dos perspectivas complementarias. Por un lado a través de su sensibilización a quimioattractantes, y por otro mediante el estímulo de la secreción de estas moléculas desde los vasos y órganos linfáticos. En este proceso el eje principal de quimioatracción lo conforman CCR7 y sus ligandos, CCL19 y CCL21 (Dieu, Vanbervliet et al. 1998, Ahamed, Haribabu et al. 2001). Se utilizan diferentes estrategias para inducir la expresión de CCR7 en las CD como su estimulación con moléculas específicas tales como PGE2 y poly I:C, o la transfección con vectores virales que expresan este receptor (Okada, Mori et al. 2005). De manera complementaria se ha demostrado que el pre-tratamiento del sitio de inoculación con citoquinas pro-inflamatorias como TNF- α o agonistas TLR facilitan también su migración hacia el ganglio linfático (Martín-Fontecha, Sebastiani et al. 2003, Nair, McLaughlin et al. 2003). El uso de AH BPM demostró que además de ser un estímulo para la maduración, incrementa la expresión de CCR7 en CD/LT derivadas de humano y de ratón (Alaniz, Rizzo et al. 2011). Sin embargo, está bien establecido que la expresión por sí sola de CCR7 no es suficiente para incrementar la migración celular. En este proceso se ponen en juego otros mecanismos como por ejemplo la expresión de moléculas asociadas a proteínas G como TREM-2/DAP12 o CD38, las cuales hacen que esta expresión sea funcional (Randolph, Ochoa et al. 2008). En nuestros ensayos el incremento de CCR7 se correlaciona con una mayor capacidad de migrar *in vitro* hacia sobrenadante de esplenocitos, CCL19 y CCL21, efecto más potente que el generado por otras moléculas comúnmente utilizadas con esta finalidad como son TNF- α , poly I:C y LPS. Sin bien este efecto lo observamos en CD sin pulsar y en CD pulsadas con antígeno tumoral, las CD/LT migraron en mayor proporción, dato que se correlaciona con el efecto madurativo observado luego de pulsar a las células con lisado tumoral. Luego decidimos estudiar la migración de CD/LT/AH BPM humanas hacia sobrenadante generado a partir de ganglio linfático proveniente de ratones *nude* con tumor humano implantado. Basados en la alta probabilidad de reacción y funcionalidad cruzada entre las moléculas murinas y las células humanas objeto de estudio (homología del 86%) pudimos comprobar que las CD pre-tratadas con AH BPM fueron atraídas con mayor intensidad hacia este sobrenadante. Consideramos que este modelo experimental es relevante ya que por un lado nos confirmó la hipótesis sobre la posibilidad de reacción entre las células humanas y el quimioattractante murino, y por otro lado observamos que AH BPM en este contexto afecta la migración de las CD/LT de un modo similar a como lo hace hacia CCL21. La utilización de ganglio linfático de ratones con tumor fue importante ya que la presencia de un estímulo inflamatorio, como puede ser una enfermedad neoplásica, genera un estado de activación en vasos y órganos linfáticos con la consiguiente expresión de moléculas y secreción de citoquinas tales como CCL5, CCL20 y CXCL5, lo que aproxima este ensayo a lo que podría pasar *in vivo* (Johnson, Clasper et al. 2006).

Las células del sistema inmunitario, como monocitos y CD, expresan una serie de receptores que las capacita para cumplir su función específica. Entre ellos se pueden mencionar CD44, TLR2 y TLR4 que, como se describió previamente, poseen como uno de sus ligandos a AH (Taylor, Trowbridge et al. 2004, Yamawaki, Hirohata et al. 2009). Es conocida la importancia de CD44 en procesos de adhesión celular y nosotros comprobamos en ratones *knockout* para CD44, que la incubación de CD/LT^{44-/-} con AH BPM no modificó sus marcadores de maduración

pero indujo un fenotipo funcional de activación medido por la inhibición de la secreción de IL-10 y por una mayor capacidad de estimulación linfocitaria alogénica. Asimismo incrementó su capacidad de migrar hacia CCL21 sin modificar la expresión de CCR7 (Alaniz, Rizzo et al. 2011). Si bien se describe a CD44 como una molécula implicada en procesos de adhesión celular y migración, su participación es compleja (Isacke and Yarwood 2002). Ha sido demostrado que su inhibición no solo no afecta la capacidad de migrar de las CD hacia el ganglio linfático sino que facilita su migración a través del espacio intersticial rico en AH (Miaw, Chen et al. 2010). Además, se demostró que células epidérmicas de Langerhans en ratón CD44^{-/-} tienen mayor capacidad de migrar y de estimulación linfocitaria luego de una estimulación antigénica epicutánea (Miaw, Chen et al. 2010). El impacto sobre la capacidad de migrar sin afectar la expresión de CCR7 que observamos puede ser explicado teniendo en cuenta que, como se mencionó anteriormente, además de la expresión de CCR7 se ponen en juego otros mecanismos complementarios que facilitan la migración celular y que puede modificar el tratamiento con AH.

El tratamiento con AH BPM generó cambios similares en CD/LT^{TLR4^{-/-}}, con la particularidad de que en este caso incrementó la expresión de CCR7. Si bien está descrita la actividad de oAH como estimulante de CD a través de TLR-4 y TLR-2 (Termeer, Benedix et al. 2002, Scheibner, Lutz et al. 2006, Tesar, Jiang et al. 2006), no están claramente establecidos los mecanismos y, en algunos, publicaciones se presentan datos contradictorios. Es probable que esto sea reflejo de la heterogeneidad en el tipo de AH utilizado, ya sea por su distinto peso molecular o por su modo de obtención. Sin embargo, no hay datos previos que demuestren los efectos de AH BPM sobre la capacidad migratoria de CD/LT hacia señales provenientes de los ganglios linfáticos ni del mecanismo implicado. En nuestros experimentos con ratones knockout para TLR-4 comprobamos que AH BPM sobre las CD/LT induce un fenotipo activado e incrementa su capacidad de migrar, por lo que concluimos que su efecto es independiente de este receptor.

Posteriormente, estudiamos la expresión de receptores de AH en CD/LT humanas. Observamos que CD/LT pre-tratadas con AH BPM disminuyeron la expresión de CD44, TLR-2, TLR-4 y RHAMM. La inhibición en la expresión de CD44 podría ser explicada por un fenómeno de *feedback* negativo similar al descrito en células mononucleares expuestas a AH BPM al ser diferenciados a fibrocitos (Maharjan, Pilling et al. 2011). La inhibición de la expresión de los receptores TLR podría responder a un estado de maduración de las CD. De hecho, Segal y col. caracterizaron la expresión de estos receptores en el proceso de diferenciación de monocito a CD activadas. Así demostraron que durante la maduración de CD con LPS estas disminuyen la expresión de ARNm de todos los TLR excepto TLR-1 y TLR-6 (Visintin, Mazzoni et al. 2001). Este fenómeno podría explicarse desde un punto de vista funcional teniendo en cuenta el rol de TLR2 y TLR4 principalmente como mediadores de la activación de CD luego del reconocimiento de PAMP.

El incremento en la capacidad de migrar observado *in vitro*, fue corroborado por ensayos *in vivo* con CD derivadas tanto de médula ósea de ratón como de sangre periférica de humanos. Así pudimos demostrar que efectivamente AH BPM aumentó su migración hacia el ganglio linfático regional en ratones portadores de tumor. Es importante remarcar que en este ensayo *in vivo* se ponen en juego mecanismos complementarios para la migración celular. Está ampliamente documentado que las células requieren de la degradación de la MEC mediante

MMP para la migración en el espacio intersticial. Estas facilitan la migración a través del tejido conectivo y la membrana basal de los vasos (Ratzinger, Stoitzner et al. 2002), actúan clivando receptores de membrana o sus ligandos, promoviendo la migración celular por la liberación o la activación de receptores que controlan la motilidad celular, o inhibiendo la migración por la inactivación de quimioquinas (Parks, Wilson et al. 2004). Ratzinger y col. han demostrado la relevancia de MMP-2 y MMP-9 para la migración de CD de la epidermis y de la dermis (Ratzinger, Stoitzner et al. 2002). Ha sido publicado que oAH estimula la actividad de MMP a través de TLR-4, y promueve la interacción CD44-EGFR incrementando la señalización de Akt y otros eventos implicados en la migración celular (Kim, Lee et al. 2008). Este fenómeno se ha descrito tanto en células del sistema inmunitario como son las CD (Termeer, Benedix et al. 2002) y los macrófagos (Noble, McKee et al. 1996), como en células tumorales (Fieber, Baumann et al. 2004). Nosotros demostramos que AH BPM incrementó la actividad de MMP-2 en CD/LT derivadas de donantes sanos.

Otro hallazgo clave en el ensayo de migración *in vivo* fue que el incremento en la migración hacia el ganglio linfático se asoció a una menor migración de CD/LT/AH BPM hacia el tumor. Esto suscitó la pregunta de si este fenómeno era resultado de una resistencia generada por AH BPM en las CD/LT hacia quimioattractantes del tumor, o si respondía a una mayor atracción hacia las quimioquinas liberadas por el ganglio linfático. Para responder esto en primer lugar realizamos un array de quimioquinas del medio condicionado tumoral derivado de pacientes con cáncer de colon el cual evidenció que las citoquinas presentes allí en mayor concentración eran IL-8, GRO, MCP-1, NAP2 e IP-10. Teniendo en cuenta que IL-8 es una citoquina pro-inflamatoria presente en el microambiente tumoral de muchos tumores y relacionada con la migración celular (Xie 2001), decidimos estudiar la relación entre CD/LT/AH BPM y el eje quimiotáctico IL-8/CXCR1-CXCR2. Está descrito el incremento de la expresión de IL-8 en respuesta a fragmentos de AH en muy variados tipos celulares como son células endoteliales (Taylor, Trowbridge et al. 2004), epiteliales (Mascarenhas, Day et al. 2004) y neoplásicas (Voelcker, Gebhardt et al. 2008). Este fenómeno se relaciona en muchos casos con una mayor capacidad migratoria de estas células. De hecho la transcripción de IL-8 y MMP-2 se encuentra regulada por NF κ B (Kim and Koh 2000), factor de transcripción activado por AH (Voelcker, Gebhardt et al. 2008). Pudimos comprobar en nuestros ensayos que AH BPM induce la expresión de IL-8 y la actividad de MMP-2 en CD/LT. Esta observación es interesante teniendo en cuenta que ya fue descrita por Luca y col. en células tumorales de melanoma que IL-8 incrementa la actividad de MMP-2 induciendo la migración celular (Luca, Huang et al. 1997). En este sentido ha sido publicado también un efecto autócrino y parácrino en células provenientes de melanoma por el cual IL-8 incrementa su capacidad de migrar (Gebhardt, Averbek et al. 2007). Fue publicado por el grupo de Melero y col. que la pre-exposición a IL-8 genera una desensibilización a los efectos quimiotácticos de esta quimioquina sin afectar la expresión de los receptores CXCR1 y CXCR2 ni el estado de maduración de las CD (Feijoo, Alfaro et al. 2005, Alfaro, Suarez et al. 2011). Todos estos datos adquieren relevancia en el contexto de nuestros ensayos ya que nos permitieron postular la hipótesis de que AH BPM a través de la inducción de la secreción de IL-8 generaría una desensibilización a esta quimioquina inhibiendo su migración hacia el microambiente tumoral. Por esto realizamos ensayos en los que observamos que las CD/LT/AH BPM migraron en menor proporción tanto hacia IL-8 como hacia sobrenadante tumoral humano. Luego del bloqueo de IL-8 en el MCT se

disminuyó un 40% la migración de CD/LT sin tratar con AH, y no se modificó la migración de CD/LT/AH BPM. De esta manera quedó en evidencia la importancia relativa de IL-8 como quimioattractante para cada grupo de tratamiento. Así demostramos que la mayor sensibilización a CCL21, y por ende al medio condicionado de ganglio linfático, asociado a una menor sensibilización a IL-8 liberada por el tumor, pueden explicar el efecto observado sobre la migración de las CD/LT/AH BPM *in vitro* e *in vivo*.

Luego de haber migrado al ganglio linfático y para desencadenar una respuesta inmunitaria antitumoral, las CD deben realizar una presentación antigénica eficaz. Para esto es necesario que estas células expresen una serie de moléculas que participan en la presentación antigénica propiamente y en la estimulación linfocitaria. Teniendo en cuenta que AH incrementa la expresión de CMH-II y CD86, decidimos evaluar la capacidad de estimular la proliferación linfocitaria de estas células. Así comprobamos que CD-mo de ratones wt, CD44^{-/-} y TLR-4^{-/-} incrementaron su capacidad estimulante *in vitro* al ser incubadas con AH BPM (Alaniz, Rizzo et al. 2011). A fin de aproximarnos aún más al contexto de un paciente, y teniendo en cuenta publicaciones análogas y nuestros resultados previos de migración *in vivo*, diseñamos un modelo de proliferación mixta linfocitaria utilizando células humanas inoculadas en un ratón *nude* (Alfaro, Suarez et al. 2011). Pudimos demostrar también de esta manera que AH BPM incrementa en las CD su capacidad de estimulación linfocitaria. Es importante aclarar que en este ensayo los ratones *nude* fueron utilizados como medio para permitir la interacción entre CD/LT y linfocitos ya que, probablemente, la cavidad peritoneal murina genere un entorno propicio que facilite la interacción entre estas células.

Todos estos resultados adquieren mayor relevancia si se tiene en cuenta que los ensayos fueron realizados, al menos en parte, con muestras humanas de donantes sanos y de pacientes. Este hecho agrega impacto clínico a los resultados y podría explicar la heterogeneidad en alguno de ellos (Munoz, Carlet et al. 1991, Lang, Lauffer et al. 2003). En estos ensayos se ponen en juego una gran cantidad de variables como son el sexo, la edad, la diversidad genética, el estado nutricional, pero sobre todo la situación de la enfermedad en cada paciente. Los tratamientos de inmunoterapia en parte fracasan por la imposibilidad de revertir el estado de inmunosupresión propio de los pacientes que los hace incapaces de montar una respuesta inmunitaria adecuada. En pacientes con cáncer de colon se ha demostrado el sesgo de su respuesta inmunitaria hacia un perfil de tipo Th2 y una menor respuesta proliferativa de células mononucleares de sangre periférica con mayor secreción de IL-4, IL-6, IL-10 y menor secreción de IL-2 e INF- γ (Berghella, Contasta et al. 2006, Pellegrini, Berghella et al. 2006). Particularmente se ha propuesto que las CD derivadas de mononucleares de sangre periférica de pacientes con cáncer de ovario tienen un funcionamiento aberrante lo que las hace menos eficaces al ser utilizadas como vacunas en un esquema de inmunoterapia (Roy, Goswami et al. 2011). Se han probado alternativas para revertir esta situación pero aún no está claro el mejor modo de hacerlo (Lang, Lauffer et al. 2003). Nosotros observamos que CD/LT de pacientes presentan un fenotipo más inmaduro respecto a las provenientes de donantes sanos. Sin embargo, luego de ser incubadas con AH BPM incrementan su capacidad de estimulación linfocitaria de forma similar a como lo hacen los sanos. Además incrementan su capacidad de migrar hacia CCL21 y generan resistencia a la quimioatracción ejercida por IL-8. *In vivo*, a pesar de no incrementar su capacidad de actividad

de MMP-2, migran más eficientemente hacia el ganglio linfático y menos hacia el tumor de forma análoga a como lo hacen CD/LT de sanos luego del pre-tratamiento con AH BPM.

Por último, demostramos que estos resultados eran reproducibles en un modelo tumoral murino *in vivo*. Ratones Balb/c con tumor CT26 s.c fueron tratados con CD, CD/LT, CD/LT/TNF- α o CD/LT/AH BPM, en un esquema de vacunación terapéutica al día 7^{mo} y 9^{no} luego de haber inoculado el tumor. Los esplenocitos provenientes de los ratones tratados con CD/LT/AH BPM evidenciaron una mayor capacidad proliferativa al ser estimulados con CD/LT, un aumento en la producción de INF- γ , una disminución en la secreción de IL-10 y una mayor actividad citolítica específica para CT26. Agregado a esto, el tratamiento con CD/LT/AH BPM indujo memoria inmunológica demostrada con el rechazo de tumores implantados en ratones que presentaron respuesta tumoral completa. Sin embargo, el dato más relevante es que esta potenciación *in vivo* de la respuesta inmunitario antitumoral tuvo un impacto en la velocidad del crecimiento tumoral con una eficacia curativa del 16% y un incremento significativo en la supervivencia de los ratones, mayor incluso que CD/LT/TNF- α . El incremento de la capacidad migratoria de las CD/LT probablemente explique al menos en parte el incremento de su eficacia antitumoral cuando son pre-tratadas con AH BPM u oAH, y utilizadas como vacuna celular (Zeng, Toole et al. 1998, Alaniz, Rizzo et al. 2009).

En resumen, estos resultados muestran que AH BPM posee actividad antitumoral directa, disminuyendo la proliferación e induciendo la apoptosis de la célula tumoral *in vitro*. Así también podemos afirmar que administrado en forma sistémica tiene la capacidad de potenciar la respuesta inmunitaria antitumoral retrasando la velocidad del crecimiento tumoral y favoreciendo la supervivencia media de los ratones. También es de remarcar que la adición de AH BPM en la preparación de vacunas basadas en CD para el tratamiento del cáncer puede ser un elemento importante potenciando la respuesta antitumoral inducida. Este efecto sería secundario a su capacidad de estimular la maduración y activación de las CD pero, principalmente, por su facultad de hacerlas más sensibles a estímulos quimiotácticos presentes en ganglio linfático y más resistentes a IL-8, resultando en una estimulación linfocitaria más eficaz con perfil Th1. Por todo esto sugerimos que AH BPM podría ser considerado para su uso en protocolos de vacunación con CD.

Conclusiones

Los resultados obtenidos y que presentamos en este trabajo de tesis doctoral demuestran que la administración sistémica de ácido hialurónico de bajo peso molecular posee un efecto antitumoral actuando no solo directamente sobre la célula tumoral sino también a través de la estimulación del sistema inmunitario. Esta molécula posee un efecto estimulante directo sobre las células dendríticas *in vitro*, y su utilización podría incrementar la eficacia terapéutica en un protocolo de vacunación al incrementar su estado de activación y maduración pero, principalmente, favoreciendo su capacidad de migrar hacia el ganglio linfático y resistiendo a la quimioatracción del tumor, que podría facilitar la inducción de tolerancia inmunológica.

A continuación se enumeran las conclusiones principales obtenidas:

1. Las líneas CT26 y HEPA129 expresan altos niveles CD44, y poseen gran capacidad de unir AH.
2. La unión de AH a CT26 se da, en parte, a través de CD44.
3. La línea CT26 expresa AH en su membrana citoplasmática.
4. AH BPM a baja concentración inhibió la proliferación de CT26, LOVO y PANC02.
5. AH BPM a baja concentración indujo la apoptosis de CT26, HEPA 129 y PANC02.
6. En células CT26 el efecto anti-proliferativo y pro-apoptótico es mediado por CD44.
7. En un modelo de cáncer de colon murino heterotópico AH BPM i.v.:
 1. disminuyó la velocidad de crecimiento tumoral e incrementó la supervivencia de los ratones.
 2. incrementó el infiltrado inflamatorio intratumoral CD3⁺/CD8⁺.
 3. aumentó el porcentaje de células esplénicas CD11c⁺/CMH-II⁺.
 4. incrementó la proliferación de esplenocitos estimulados con CD/LT.
 5. aumentó la síntesis de IL-12p70 en sobrenadante de esplenocitos estimulados con CD/LT.
8. AH BPM exógeno en el cultivo de células dendríticas derivadas de médula ósea de ratón y pulsadas con antígeno tumoral (CD/LT):
 1. indujo la expresión de CMH-II y CD86, de manera similar a TNF- α .
 2. incrementó la secreción de IL-12 de forma más potente que TNF- α .
 3. inhibió la secreción de IL-10 de forma similar a TNF- α , de manera independiente de CD44 o TLR4.
 4. estimuló su capacidad de inducir proliferación linfocitaria de manera similar a TNF- α , de manera independiente de CD44 o TLR4.

5. incrementó su migración hacia sobrenadante de cultivo de esplenocitos provenientes de ratones portadores de tumor.
6. incrementó su migración hacia CCL21 de manera independiente de CD44 o TLR4.
7. indujo la expresión de membrana de CCR7 de manera independiente de TLR4.
9. AH BPM exógeno en el cultivo de CD/LT derivadas de mononucleares de sangre periférica humana:
 1. indujo la expresión de CMH-II y CD86 en CD/LT de donantes sanos (DS).
 2. estimuló la capacidad de inducir proliferación linfocitaria en CD/LT de DS y pacientes.
 3. incrementó la migración hacia CCL21 en CD/LT de DS y pacientes, de forma más potente que polyI:C.
 4. incrementó su migración hacia medio condicionado de sobrenadante de células de ganglio linfático (GL) provenientes de ratones *nude* portadores de tumor, de forma más potente que polyI:C.
 5. indujo la expresión de ARNm de CCR7 de CD/LT de DS y pacientes.
 6. indujo la migración hacia GL *in vivo* en un modelo de cáncer de colon humano en ratón *nude*, de CD/LT de DS y pacientes.
 7. inhibió la migración hacia IL-8 de CD/LT de DS.
 8. inhibió la migración hacia sobrenadante de tumor humano de CD/LT de DS.
 9. indujo la síntesis de ARNm de IL-8 de CD/LT de DS y pacientes, sin modificar la expresión de CXCR1 ni CXCR2.
 10. inhibió la migración hacia el tumor *in vivo* en un modelo de cáncer de colon humano en ratón *nude*, de CD/LT de DS y pacientes.
 11. indujo actividad de MMP-2 en sobrenadante de CD/LT de DS.
10. La vacunación con CD/LT pretratadas con AH BPM en un modelo de cáncer de colon heterotópico murino:
 1. disminuyó la velocidad del crecimiento tumoral e incrementó la supervivencia de los ratones.
 2. indujo una respuesta inmunitaria tipo Th1 con disminución de IL-10 y aumento de INF- γ , de manera similar a TNF- α .
 3. indujo una respuesta inmunitaria antitumoral con LTc específicos, de manera similar a TNF- α .

Bibliografía

Aberle, D. R., A. M. Adams, C. D. Berg, W. C. Black, J. D. Clapp, R. M. Fagerstrom, I. F. Gareen, C. Gatsonis, P. M. Marcus and J. D. Sicks (2011). "Reduced lung-cancer mortality with low-dose computed tomographic screening." N Engl J Med**365**(5): 395-409.

Acuto, O. and F. Michel (2003). "CD28-mediated co-stimulation: a quantitative support for TCR signalling." Nat Rev Immunol**3**(12): 939-951.

Adema, G. J., I. J. de Vries, C. J. Punt and C. G. Figdor (2005). "Migration of dendritic cell based cancer vaccines: in vivo veritas?" Curr Opin Immunol**17**(2): 170-174.

Ahamed, J., B. Haribabu and H. Ali (2001). "Cutting edge: Differential regulation of chemoattractant receptor-induced degranulation and chemokine production by receptor phosphorylation." J Immunol**167**(7): 3559-3563.

Al-Assaf, S., J. Meadows, G. O. Phillips, P. A. Williams and B. J. Parsons (2000). "The effect of hydroxyl radicals on the rheological performance of hylan and hyaluronan." Int J Biol Macromol**27**(5): 337-348.

Al-Lazikani, B., A. M. Lesk and C. Chothia (2000). "Canonical structures for the hypervariable regions of T cell alphabeta receptors." J Mol Biol**295**(4): 979-995.

Alaniz, L., P. V. Cabrera, G. Blanco, G. Ernst, G. Rimoldi, E. Alvarez and S. E. Hajos (2002). "Interaction of CD44 with different forms of hyaluronic acid. Its role in adhesion and migration of tumor cells." Cell Commun Adhes**9**(3): 117-130.

Alaniz, L., M. Garcia, M. Rizzo, F. Piccioni and G. Mazzolini (2009). "Altered hyaluronan biosynthesis and cancer progression: an immunological perspective." Mini Rev Med Chem**9**(13): 1538-1546.

Alaniz, L., M. G. Garcia, C. Gallo-Rodriguez, R. Agusti, N. Sterin-Speziale, S. E. Hajos and E. Alvarez (2006). "Hyaluronan oligosaccharides induce cell death through PI3-K/Akt pathway independently of NF-kappaB transcription factor." Glycobiology**16**(5): 359-367.

Alaniz, L., M. Rizzo, M. G. Garcia, F. Piccioni, J. B. Aquino, M. Malvicini, C. Atorrasagasti, J. Bayo, I. Echeverria, P. Sarobe and G. Mazzolini (2011). "Low molecular weight hyaluronan preconditioning of tumor-pulsed dendritic cells increases their migratory ability and induces immunity against murine colorectal carcinoma." Cancer Immunol Immunother**60**(10): 1383-1395.

Alaniz, L., M. Rizzo, M. Malvicini, J. Jaunarena, D. Avella, C. Atorrasagasti, J. B. Aquino, M. Garcia, P. Matar, M. Silva and G. Mazzolini (2009). "Low molecular weight hyaluronan inhibits colorectal carcinoma growth by decreasing tumor cell proliferation and stimulating immune response." Cancer Lett**278**(1): 9-16.

Alfaro, C., J. L. Perez-Gracia, N. Suarez, J. Rodriguez, M. Fernandez de Sanmamed, B. Sangro, S. Martin-Algarra, A. Calvo, M. Redrado, A. Agliano, A. Gonzalez, I. Rodriguez, E. Bolanos, S. Hervas-Stubbs, J. Perez-Calvo, A. Benito, I. Penuelas, C. Vigil, J. Richter, I. Martinez-Forero and I. Melero (2011). "Pilot clinical trial of type 1 dendritic cells loaded with autologous tumor

lysates combined with GM-CSF, pegylated IFN, and cyclophosphamide for metastatic cancer patients." J Immunol**187**(11): 6130-6142.

Alfaro, C., N. Suarez, I. Martinez-Forero, A. Palazon, A. Rouzaut, S. Solano, E. Feijoo, A. Gurpide, E. Bolanos, L. Erro, J. Dubrot, S. Hervas-Stubbs, A. Gonzalez, J. L. Perez-Gracia and I. Melero (2011). "Carcinoma-derived interleukin-8 disorients dendritic cell migration without impairing T-cell stimulation." PLoS One**6**(3): e17922.

Algarra, I., T. Cabrera and F. Garrido (2000). "The HLA crossroad in tumor immunology." Hum Immunol**61**(1): 65-73.

Alphonso, A. and S. K. Alahari (2009). "Stromal cells and integrins: conforming to the needs of the tumor microenvironment." Neoplasia**11**(12): 1264-1271.

Allavena, P., A. Sica, A. Vecchi, M. Locati, S. Sozzani and A. Mantovani (2000). "The chemokine receptor switch paradigm and dendritic cell migration: its significance in tumor tissues." Immunol Rev**177**: 141-149.

Ames, E. and W. J. Murphy (2014). "Advantages and clinical applications of natural killer cells in cancer immunotherapy." Cancer Immunol Immunother**63**(1): 21-28.

Anderson, A. R., A. M. Weaver, P. T. Cummings and V. Quaranta (2006). "Tumor morphology and phenotypic evolution driven by selective pressure from the microenvironment." Cell**127**(5): 905-915.

Anguille, S., E. L. Smits, E. Lion, V. F. van Tendeloo and Z. N. Berneman (2014). "Clinical use of dendritic cells for cancer therapy." Lancet Oncol**15**(7): e257-267.

Appay, V., D. C. Douek and D. A. Price (2008). "CD8+ T cell efficacy in vaccination and disease." Nat Med**14**(6): 623-628.

Atkins, M. B., L. Kunkel, M. Sznol and S. A. Rosenberg (2000). "High-dose recombinant interleukin-2 therapy in patients with metastatic melanoma: long-term survival update." Cancer J Sci Am**6 Suppl 1**: S11-14.

Banchereau, J., F. Briere, C. Caux, J. Davoust, S. Lebecque, Y. J. Liu, B. Pulendran and K. Palucka (2000). "Immunobiology of dendritic cells." Annu Rev Immunol**18**: 767-811.

Banchereau, J., B. Schuler-Thurner, A. K. Palucka and G. Schuler (2001). "Dendritic cells as vectors for therapy." Cell**106**(3): 271-274.

Banchereau, J. and R. M. Steinman (1998). "Dendritic cells and the control of immunity." Nature**392**(6673): 245-252.

Bartz, H., N. M. Avalos, A. Baetz, K. Heeg and A. H. Dalpke (2006). "Involvement of suppressors of cytokine signaling in toll-like receptor-mediated block of dendritic cell differentiation." Blood**108**(13): 4102-4108.

Bedrosian, I., R. Mick, S. Xu, H. Nisenbaum, M. Faries, P. Zhang, P. A. Cohen, G. Koski and B. J. Czerniecki (2003). "Intranodal administration of peptide-pulsed mature dendritic cell vaccines results in superior CD8+ T-cell function in melanoma patients." J Clin Oncol**21**(20): 3826-3835.

Bennett, S. R., F. R. Carbone, F. Karamalis, R. A. Flavell, J. F. Miller and W. R. Heath (1998). "Help for cytotoxic-T-cell responses is mediated by CD40 signalling." Nature**393**(6684): 478-480.

Benson, A. B., 3rd, T. Bekaii-Saab, E. Chan, Y. J. Chen, M. A. Choti, H. S. Cooper, P. F. Engstrom, P. C. Enzinger, M. G. Fakih, M. J. Fenton, C. S. Fuchs, J. L. Grem, S. Hunt, A. Kamel, L. A. Leong, E. Lin, K. S. May, M. F. Mulcahy, K. Murphy, E. Rohren, D. P. Ryan, L. Saltz, S. Sharma, D. Shibata, J. M. Skibber, W. Small, Jr., C. T. Sofocleous, A. P. Venook, C. G. Willett, K. M. Gregory and D. A. Freedman-Cass (2013). "Localized colon cancer, version 3.2013: featured updates to the NCCN Guidelines." J Natl Compr Canc Netw**11**(5): 519-528.

Benson, A. B., 3rd, T. Bekaii-Saab, E. Chan, Y. J. Chen, M. A. Choti, H. S. Cooper, P. F. Engstrom, P. C. Enzinger, M. G. Fakih, M. J. Fenton, C. S. Fuchs, J. L. Grem, S. Hunt, A. Kamel, L. A. Leong, E. Lin, K. S. May, M. F. Mulcahy, K. Murphy, E. Rohren, D. P. Ryan, L. Saltz, S. Sharma, D. Shibata, J. M. Skibber, W. Small, Jr., C. T. Sofocleous, A. P. Venook, C. G. Willett, K. M. Gregory and D. A. Freedman-Cass (2013). "Metastatic colon cancer, version 3.2013: featured updates to the NCCN Guidelines." J Natl Compr Canc Netw**11**(2): 141-152; quiz 152.

Berger, A. C., E. R. Sigurdson, T. LeVoyer, A. Hanlon, R. J. Mayer, J. S. Macdonald, P. J. Catalano and D. G. Haller (2005). "Colon cancer survival is associated with decreasing ratio of metastatic to examined lymph nodes." J Clin Oncol**23**(34): 8706-8712.

Berghella, A. M., I. Contasta, P. Pellegrini, T. Del Beato and D. Adorno (2006). "Are immunological mechanisms involved in colon cancer and are they possible markers for biotherapy improvement?" Cancer Biother Radiopharm**21**(5): 468-487.

Berghella, A. M., P. Pellegrini, T. Del Beato, D. Adorno and C. U. Casciani (1997). "IL-10 and sIL-2R serum levels as possible peripheral blood prognostic markers in the passage from adenoma to colorectal cancer." Cancer Biother Radiopharm**12**(4): 265-272.

Bergmann, C., L. Strauss, R. Zeidler, S. Lang and T. L. Whiteside (2007). "Expansion and characteristics of human T regulatory type 1 cells in co-cultures simulating tumor microenvironment." Cancer Immunol Immunother**56**(9): 1429-1442.

Berke, G. (1995). "Unlocking the secrets of CTL and NK cells." Immunol Today**16**(7): 343-346.

Beutler, B. and E. T. Rietschel (2003). "Innate immune sensing and its roots: the story of endotoxin." Nat Rev Immunol**3**(2): 169-176.

Bharadwaj, A. G., K. Rector and M. A. Simpson (2007). "Inducible hyaluronan production reveals differential effects on prostate tumor cell growth and tumor angiogenesis." J Biol Chem**282**(28): 20561-20572.

Bianchi, G., G. D'Amico, L. Varone, S. Sozzani, A. Mantovani and P. Allavena (2000). "In vitro studies on the trafficking of dendritic cells through endothelial cells and extra-cellular matrix." Dev Immunol**7**(2-4): 143-153.

Bierie, B. and H. L. Moses (2010). "Transforming growth factor beta (TGF-beta) and inflammation in cancer." Cytokine Growth Factor Rev**21**(1): 49-59.

Biragyn, A., P. A. Ruffini, C. A. Leifer, E. Klyushnenkova, A. Shakhov, O. Chertov, A. K. Shirakawa, J. M. Farber, D. M. Segal, J. J. Oppenheim and L. W. Kwak (2002). "Toll-like receptor 4-dependent activation of dendritic cells by beta-defensin 2." Science**298**(5595): 1025-1029.

Bollyky, P. L., B. A. Falk, S. A. Long, A. Preisinger, K. R. Braun, R. P. Wu, S. P. Evanko, J. H. Buckner, T. N. Wight and G. T. Nepom (2009). "CD44 costimulation promotes FoxP3+ regulatory T cell persistence and function via production of IL-2, IL-10, and TGF-beta." J Immunol**183**(4): 2232-2241.

Bollyky, P. L., J. D. Lord, S. A. Masewicz, S. P. Evanko, J. H. Buckner, T. N. Wight and G. T. Nepom (2007). "Cutting edge: high molecular weight hyaluronan promotes the suppressive effects of CD4+CD25+ regulatory T cells." J Immunol**179**(2): 744-747.

Boregowda, R. K., H. N. Appaiah, M. Siddaiah, S. B. Kumarswamy, S. Sunila, K. N. Thimmaiah, K. Mortha, B. Toole and S. Banerjee (2006). "Expression of hyaluronan in human tumor progression." J Carcinog**5**: 2.

Bouchon, A., C. Hernandez-Munain, M. Cella and M. Colonna (2001). "A DAP12-mediated pathway regulates expression of CC chemokine receptor 7 and maturation of human dendritic cells." J Exp Med**194**(8): 1111-1122.

Bourguignon, L. Y. (2001). "CD44-mediated oncogenic signaling and cytoskeleton activation during mammary tumor progression." J Mammary Gland Biol Neoplasia**6**(3): 287-297.

Bourguignon, L. Y., P. A. Singleton, H. Zhu and F. Diedrich (2003). "Hyaluronan-mediated CD44 interaction with RhoGEF and Rho kinase promotes Grb2-associated binder-1 phosphorylation and phosphatidylinositol 3-kinase signaling leading to cytokine (macrophage-colony stimulating factor) production and breast tumor progression." J Biol Chem**278**(32): 29420-29434.

Bourguignon, L. Y., G. Wong, C. A. Earle and W. Xia (2011). "Interaction of low molecular weight hyaluronan with CD44 and toll-like receptors promotes the actin filament-associated protein 110-actin binding and MyD88-NFkappaB signaling leading to proinflammatory cytokine/chemokine production and breast tumor invasion." Cytoskeleton (Hoboken)**68**(12): 671-693.

Bouvier, M. (2003). "Accessory proteins and the assembly of human class I MHC molecules: a molecular and structural perspective." Mol Immunol**39**(12): 697-706.

Brahmer, J. R., S. S. Tykodi, L. Q. Chow, W. J. Hwu, S. L. Topalian, P. Hwu, C. G. Drake, L. H. Camacho, J. Kauh, K. Odunsi, H. C. Pitot, O. Hamid, S. Bhatia, R. Martins, K. Eaton, S. Chen, T. M. Salay, S. Alaparthi, J. F. Grosso, A. J. Korman, S. M. Parker, S. Agrawal, S. M. Goldberg, D. M.

- Pardoll, A. Gupta and J. M. Wigginton (2012). "Safety and activity of anti-PD-L1 antibody in patients with advanced cancer." N Engl J Med**366**(26): 2455-2465.
- Brattain, M. G., J. Strobel-Stevens, D. Fine, M. Webb and A. M. Sarrif (1980). "Establishment of mouse colonic carcinoma cell lines with different metastatic properties." Cancer Res**40**(7): 2142-2146.
- Brecht, M., U. Mayer, E. Schlosser and P. Prehm (1986). "Increased hyaluronate synthesis is required for fibroblast detachment and mitosis." Biochem J**239**(2): 445-450.
- Brenner, H., C. Stock and M. Hoffmeister (2014). "Effect of screening sigmoidoscopy and screening colonoscopy on colorectal cancer incidence and mortality: systematic review and meta-analysis of randomised controlled trials and observational studies." BMJ**348**: g2467.
- Burchardt, E. R., R. Hein and A. K. Bosserhoff (2003). "Laminin, hyaluronan, tenascin-C and type VI collagen levels in sera from patients with malignant melanoma." Clin Exp Dermatol**28**(5): 515-520.
- Burnet, F. M. (1970). "The concept of immunological surveillance." Prog Exp Tumor Res**13**: 1-27.
- Callahan, M. K. and J. D. Wolchok (2013). "At the bedside: CTLA-4- and PD-1-blocking antibodies in cancer immunotherapy." J Leukoc Biol**94**(1): 41-53.
- Cambi, A. and C. G. Figdor (2005). "Levels of complexity in pathogen recognition by C-type lectins." Curr Opin Immunol**17**(4): 345-351.
- Carmeliet, P. and R. K. Jain (2011). "Molecular mechanisms and clinical applications of angiogenesis." Nature**473**(7347): 298-307.
- Carraro, P. G., M. Segala, B. M. Cesana and G. Tiberio (2001). "Obstructing colonic cancer: failure and survival patterns over a ten-year follow-up after one-stage curative surgery." Dis Colon Rectum**44**(2): 243-250.
- Collins, S. L., K. E. Black, Y. Chan-Li, Y. H. Ahn, P. A. Cole, J. D. Powell and M. R. Horton (2011). "Hyaluronan fragments promote inflammation by down-regulating the anti-inflammatory A2a receptor." Am J Respir Cell Mol Biol**45**(4): 675-683.
- Cordo Russo, R. I., M. G. Garcia, L. Alaniz, G. Blanco, E. Alvarez and S. E. Hajos (2008). "Hyaluronan oligosaccharides sensitize lymphoma resistant cell lines to vincristine by modulating P-glycoprotein activity and PI3K/Akt pathway." Int J Cancer**122**(5): 1012-1018.
- Critchley-Thorne, R. J., D. L. Simons, N. Yan, A. K. Miyahira, F. M. Dirbas, D. L. Johnson, S. M. Swetter, R. W. Carlson, G. A. Fisher, A. Koong, S. Holmes and P. P. Lee (2009). "Impaired interferon signaling is a common immune defect in human cancer." Proc Natl Acad Sci U S A**106**(22): 9010-9015.
- Critchley-Thorne, R. J., N. Yan, S. Nacu, J. Weber, S. P. Holmes and P. P. Lee (2007). "Down-regulation of the interferon signaling pathway in T lymphocytes from patients with metastatic melanoma." PLoS Med**4**(5): e176.

- Curtsinger, J. M. and M. F. Mescher (2010). "Inflammatory cytokines as a third signal for T cell activation." Curr Opin Immunol**22**(3): 333-340.
- Chang, D. H., K. Osman, J. Connolly, A. Kukreja, J. Krasovsky, M. Pack, A. Hutchinson, M. Geller, N. Liu, R. Annable, J. Shay, K. Kirchhoff, N. Nishi, Y. Ando, K. Hayashi, H. Hassoun, R. M. Steinman and M. V. Dhodapkar (2005). "Sustained expansion of NKT cells and antigen-specific T cells after injection of alpha-galactosyl-ceramide loaded mature dendritic cells in cancer patients." J Exp Med**201**(9): 1503-1517.
- Chang, M. H., S. L. You, C. J. Chen, C. J. Liu, C. M. Lee, S. M. Lin, H. C. Chu, T. C. Wu, S. S. Yang, H. S. Kuo and D. S. Chen (2009). "Decreased incidence of hepatocellular carcinoma in hepatitis B vaccinees: a 20-year follow-up study." J Natl Cancer Inst**101**(19): 1348-1355.
- Chen, Y. X., K. Man, G. S. Ling, Y. Chen, B. S. Sun, Q. Cheng, O. H. Wong, C. K. Lo, I. O. Ng, L. C. Chan, G. K. Lau, C. L. Lin, F. Huang and F. P. Huang (2007). "A crucial role for dendritic cell (DC) IL-10 in inhibiting successful DC-based immunotherapy: superior antitumor immunity against hepatocellular carcinoma evoked by DC devoid of IL-10." J Immunol**179**(9): 6009-6015.
- Chiang, C. L., F. Benencia and G. Coukos (2010). "Whole tumor antigen vaccines." Semin Immunol**22**(3): 132-143.
- Chikamatsu, K., K. Sakakura, T. L. Whiteside and N. Furuya (2007). "Relationships between regulatory T cells and CD8+ effector populations in patients with squamous cell carcinoma of the head and neck." Head Neck**29**(2): 120-127.
- Dalerba, P., C. MacCalli, C. Casati, C. Castelli and G. Parmiani (2003). "Immunology and immunotherapy of colorectal cancer." Crit Rev Oncol Hematol**46**(1): 33-57.
- Dalod, M., R. Chelbi, B. Malissen and T. Lawrence (2014). "Dendritic cell maturation: functional specialization through signaling specificity and transcriptional programming." EMBO J**33**(10): 1104-1116.
- Dauer, M., M. Schnurr and A. Eigler (2008). "Dendritic cell-based cancer vaccination: quo vadis?" Expert Rev Vaccines**7**(7): 1041-1053.
- Davis, D. M., J. E. Marcet, J. C. Frattini, A. D. Prather, J. J. Mateka and V. N. Nfonam (2011). "Is it time to lower the recommended screening age for colorectal cancer?" J Am Coll Surg**213**(3): 352-361.
- Day, A. J. and C. A. de la Motte (2005). "Hyaluronan cross-linking: a protective mechanism in inflammation?" Trends Immunol**26**(12): 637-643.
- Day, A. J. and G. D. Prestwich (2002). "Hyaluronan-binding proteins: tying up the giant." J Biol Chem**277**(7): 4585-4588.
- de Vries, I. J., W. J. Lesterhuis, J. O. Barentsz, P. Verdijk, J. H. van Krieken, O. C. Boerman, W. J. Oyen, J. J. Bonenkamp, J. B. Boezeman, G. J. Adema, J. W. Bulte, T. W. Scheenen, C. J. Punt, A. Heerschap and C. G. Figdor (2005). "Magnetic resonance tracking of dendritic cells in melanoma patients for monitoring of cellular therapy." Nat Biotechnol**23**(11): 1407-1413.

- Deed, R., P. Rooney, P. Kumar, J. D. Norton, J. Smith, A. J. Freemont and S. Kumar (1997). "Early-response gene signalling is induced by angiogenic oligosaccharides of hyaluronan in endothelial cells. Inhibition by non-angiogenic, high-molecular-weight hyaluronan." Int J Cancer**71**(2): 251-256.
- Delbridge, L. M. and M. X. O'Riordan (2007). "Innate recognition of intracellular bacteria." Curr Opin Immunol**19**(1): 10-16.
- Des Guetz, G., B. Uzzan, P. Nicolas, M. Cucherat, J. F. Morere, R. Benamouzig, J. L. Breau and G. Y. Perret (2006). "Microvessel density and VEGF expression are prognostic factors in colorectal cancer. Meta-analysis of the literature." Br J Cancer**94**(12): 1823-1832.
- Dhodapkar, M. V., R. M. Steinman, J. Krasovsky, C. Munz and N. Bhardwaj (2001). "Antigen-specific inhibition of effector T cell function in humans after injection of immature dendritic cells." J Exp Med**193**(2): 233-238.
- Dieu, M. C., B. Vanbervliet, A. Vicari, J. M. Bridon, E. Oldham, S. Ait-Yahia, F. Briere, A. Zlotnik, S. Lebecque and C. Caux (1998). "Selective recruitment of immature and mature dendritic cells by distinct chemokines expressed in different anatomic sites." J Exp Med**188**(2): 373-386.
- Do, Y., P. S. Nagarkatti and M. Nagarkatti (2004). "Role of CD44 and hyaluronic acid (HA) in activation of alloreactive and antigen-specific T cells by bone marrow-derived dendritic cells." J Immunother**27**(1): 1-12.
- Dotto, G. P., R. A. Weinberg and A. Ariza (1988). "Malignant transformation of mouse primary keratinocytes by Harvey sarcoma virus and its modulation by surrounding normal cells." Proc Natl Acad Sci U S A**85**(17): 6389-6393.
- Dunn, G. P., L. J. Old and R. D. Schreiber (2004). "The immunobiology of cancer immunosurveillance and immunoediting." Immunity**21**(2): 137-148.
- Eggert, A. A., M. W. Schreurs, O. C. Boerman, W. J. Oyen, A. J. de Boer, C. J. Punt, C. G. Figdor and G. J. Adema (1999). "Biodistribution and vaccine efficiency of murine dendritic cells are dependent on the route of administration." Cancer Res**59**(14): 3340-3345.
- Ehrlich, P. (1909). "Ueber den jetzigen stand der Karzinomforschung. ." Ned.Tijdschr. Geneesk. **5**: 273-290.
- English, N. M., J. F. Lesley and R. Hyman (1998). "Site-specific de-N-glycosylation of CD44 can activate hyaluronan binding, and CD44 activation states show distinct threshold densities for hyaluronan binding." Cancer Res**58**(16): 3736-3742.
- Evanko, S. P., S. Potter-Perigo, P. L. Bollyky, G. T. Nepom and T. N. Wight (2012). "Hyaluronan and versican in the control of human T-lymphocyte adhesion and migration." Matrix Biol**31**(2): 90-100.
- Evanko, S. P. and T. N. Wight (1999). "Intracellular localization of hyaluronan in proliferating cells." J Histochem Cytochem**47**(10): 1331-1342.

Faure, F., A. Mantegazza, C. Sadaka, C. Sedlik, F. Jotereau and S. Amigorena (2009). "Long-lasting cross-presentation of tumor antigen in human DC." Eur J Immunol**39**(2): 380-390.

Fearon, D. T. and R. M. Locksley (1996). "The instructive role of innate immunity in the acquired immune response." Science**272**(5258): 50-53.

Fecci, P. E., D. A. Mitchell, J. F. Whitesides, W. Xie, A. H. Friedman, G. E. Archer, J. E. Herndon, 2nd, D. D. Bigner, G. Dranoff and J. H. Sampson (2006). "Increased regulatory T-cell fraction amidst a diminished CD4 compartment explains cellular immune defects in patients with malignant glioma." Cancer Res**66**(6): 3294-3302.

Feijoo, E., C. Alfaro, G. Mazzolini, P. Serra, I. Penuelas, A. Arina, E. Huarte, I. Tirapu, B. Palencia, O. Murillo, J. Ruiz, B. Sangro, J. A. Richter, J. Prieto and I. Melero (2005). "Dendritic cells delivered inside human carcinomas are sequestered by interleukin-8." Int J Cancer**116**(2): 275-281.

Felzmann, T., V. Witt, D. Wimmer, G. Ressmann, D. Wagner, P. Paul, K. Huttner and G. Fritsch (2003). "Monocyte enrichment from leukapheresis products for the generation of DCs by plastic adherence, or by positive or negative selection." Cytotherapy**5**(5): 391-398.

Ferrara, N. and R. S. Kerbel (2005). "Angiogenesis as a therapeutic target." Nature**438**(7070): 967-974.

Fieber, C., P. Baumann, R. Vallon, C. Termeer, J. C. Simon, M. Hofmann, P. Angel, P. Herrlich and J. P. Sleeman (2004). "Hyaluronan-oligosaccharide-induced transcription of metalloproteases." J Cell Sci**117**(Pt 2): 359-367.

Figdor, C. G., I. J. de Vries, W. J. Lesterhuis and C. J. Melief (2004). "Dendritic cell immunotherapy: mapping the way." Nat Med**10**(5): 475-480.

Finkelman, F. D., T. Shea-Donohue, J. Goldhill, C. A. Sullivan, S. C. Morris, K. B. Madden, W. C. Gause and J. F. Urban, Jr. (1997). "Cytokine regulation of host defense against parasitic gastrointestinal nematodes: lessons from studies with rodent models." Annu Rev Immunol**15**: 505-533.

Fong, L., D. Brockstedt, C. Benike, L. Wu and E. G. Engleman (2001). "Dendritic cells injected via different routes induce immunity in cancer patients." J Immunol**166**(6): 4254-4259.

Fong, L., Y. Hou, A. Rivas, C. Benike, A. Yuen, G. A. Fisher, M. M. Davis and E. G. Engleman (2001). "Altered peptide ligand vaccination with Flt3 ligand expanded dendritic cells for tumor immunotherapy." Proc Natl Acad Sci U S A**98**(15): 8809-8814.

Forrester, J. V. and E. A. Balazs (1980). "Inhibition of phagocytosis by high molecular weight hyaluronate." Immunology**40**(3): 435-446.

Forster, R., A. C. Davalos-Misslitz and A. Rot (2008). "CCR7 and its ligands: balancing immunity and tolerance." Nat Rev Immunol**8**(5): 362-371.

- Fox, S. B., J. Fawcett, D. G. Jackson, I. Collins, K. C. Gatter, A. L. Harris, A. Gearing and D. L. Simmons (1994). "Normal human tissues, in addition to some tumors, express multiple different CD44 isoforms." Cancer Res**54**(16): 4539-4546.
- Franzmann, E. J., G. L. Schroeder, W. J. Goodwin, D. T. Weed, P. Fisher and V. B. Lokeshwar (2003). "Expression of tumor markers hyaluronic acid and hyaluronidase (HYAL1) in head and neck tumors." Int J Cancer**106**(3): 438-445.
- Frasca, L., G. Fedele, S. Deaglio, C. Capuano, R. Palazzo, T. Vaisitti, F. Malavasi and C. M. Ausiello (2006). "CD38 orchestrates migration, survival, and Th1 immune response of human mature dendritic cells." Blood**107**(6): 2392-2399.
- Fraser, J. R. and T. C. Laurent (1989). "Turnover and metabolism of hyaluronan." Ciba Found Symp**143**: 41-53; discussion 53-49, 281-285.
- Fraser, J. R., T. C. Laurent and U. B. Laurent (1997). "Hyaluronan: its nature, distribution, functions and turnover." J Intern Med**242**(1): 27-33.
- Fremont, D. H., W. A. Hendrickson, P. Marrack and J. Kappler (1996). "Structures of an MHC class II molecule with covalently bound single peptides." Science**272**(5264): 1001-1004.
- Fujita, H., K. Ohuchida, K. Mizumoto, K. Nakata, J. Yu, T. Kayashima, L. Cui, T. Manabe, T. Ohtsuka and M. Tanaka (2010). "alpha-Smooth Muscle Actin Expressing Stroma Promotes an Aggressive Tumor Biology in Pancreatic Ductal Adenocarcinoma." Pancreas.
- Fujita, Y., M. Kitagawa, S. Nakamura, K. Azuma, G. Ishii, M. Higashi, H. Kishi, T. Hiwasa, K. Koda, N. Nakajima and K. Harigaya (2002). "CD44 signaling through focal adhesion kinase and its anti-apoptotic effect." FEBS Lett**528**(1-3): 101-108.
- Gabrilovich, D. I. and S. Nagaraj (2009). "Myeloid-derived suppressor cells as regulators of the immune system." Nat Rev Immunol**9**(3): 162-174.
- Gabrilovich, D. I., M. P. Velders, E. M. Sotomayor and W. M. Kast (2001). "Mechanism of immune dysfunction in cancer mediated by immature Gr-1+ myeloid cells." J Immunol**166**(9): 5398-5406.
- Gajewski, T. F., H. Schreiber and Y. X. Fu (2013). "Innate and adaptive immune cells in the tumor microenvironment." Nat Immunol**14**(10): 1014-1022.
- Gallucci, S., M. Lolkema and P. Matzinger (1999). "Natural adjuvants: endogenous activators of dendritic cells." Nat Med**5**(11): 1249-1255.
- Gao, D., L. T. Vahdat, S. Wong, J. C. Chang and V. Mittal (2012). "Microenvironmental regulation of epithelial-mesenchymal transitions in cancer." Cancer Res**72**(19): 4883-4889.
- Garcia, K. C. and E. J. Adams (2005). "How the T cell receptor sees antigen--a structural view." Cell**122**(3): 333-336.

- Gebhardt, C., M. Averbeck, A. Viertel, F. Kauer, A. Saalbach, U. Anderegg and J. C. Simon (2007). "Ultraviolet-B irradiation enhances melanoma cell motility via induction of autocrine interleukin 8 secretion." Exp Dermatol**16**(8): 636-643.
- Germain, R. N. (1994). "MHC-dependent antigen processing and peptide presentation: providing ligands for T lymphocyte activation." Cell**76**(2): 287-299.
- Germain, R. N. and L. R. Hendrix (1991). "MHC class II structure, occupancy and surface expression determined by post-endoplasmic reticulum antigen binding." Nature**353**(6340): 134-139.
- Ghatak, S., S. Misra and B. P. Toole (2002). "Hyaluronan oligosaccharides inhibit anchorage-independent growth of tumor cells by suppressing the phosphoinositide 3-kinase/Akt cell survival pathway." J Biol Chem**277**(41): 38013-38020.
- Ghatak, S., S. Misra and B. P. Toole (2005). "Hyaluronan constitutively regulates ErbB2 phosphorylation and signaling complex formation in carcinoma cells." J Biol Chem**280**(10): 8875-8883.
- Giermasz, A. S., J. A. Urban, Y. Nakamura, P. Watchmaker, R. L. Cumberland, W. Gooding and P. Kalinski (2009). "Type-1 polarized dendritic cells primed for high IL-12 production show enhanced activity as cancer vaccines." Cancer Immunol Immunother**58**(8): 1329-1336.
- Gilboa, E. (1999). "The makings of a tumor rejection antigen." Immunity**11**(3): 263-270.
- Gilg, A. G., S. L. Tye, L. B. Tolliver, W. G. Wheeler, R. P. Visconti, J. D. Duncan, F. V. Kostova, L. N. Bolds, B. P. Toole and B. L. Maria (2008). "Targeting hyaluronan interactions in malignant gliomas and their drug-resistant multipotent progenitors." Clin Cancer Res**14**(6): 1804-1813.
- Gilliet, M., M. Kleinhans, E. Lantelme, D. Schadendorf, G. Burg and F. O. Nestle (2003). "Intranodal injection of semimature monocyte-derived dendritic cells induces T helper type 1 responses to protein neoantigen." Blood**102**(1): 36-42.
- Goff, S. L., F. O. Smith, J. A. Klapper, R. Sherry, J. R. Wunderlich, S. M. Steinberg, D. White, S. A. Rosenberg, M. E. Dudley and J. C. Yang (2010). "Tumor infiltrating lymphocyte therapy for metastatic melanoma: analysis of tumors resected for TIL." J Immunother**33**(8): 840-847.
- Greaves, M. and C. C. Maley (2012). "Clonal evolution in cancer." Nature**481**(7381): 306-313.
- Hascall, V. C., A. K. Majors, C. A. De La Motte, S. P. Evanko, A. Wang, J. A. Drazba, S. A. Strong and T. N. Wight (2004). "Intracellular hyaluronan: a new frontier for inflammation?" Biochim Biophys Acta**1673**(1-2): 3-12.
- Hatfield, P., A. E. Merrick, E. West, D. O'Donnell, P. Selby, R. Vile and A. A. Melcher (2008). "Optimization of dendritic cell loading with tumor cell lysates for cancer immunotherapy." J Immunother**31**(7): 620-632.
- Hawkins, C. L. and M. J. Davies (1996). "Direct detection and identification of radicals generated during the hydroxyl radical-induced degradation of hyaluronic acid and related materials." Free Radic Biol Med**21**(3): 275-290.

- He, H., S. Zhang, S. Tighe, J. Son and S. C. Tseng (2013). "Immobilized heavy chain-hyaluronic acid polarizes lipopolysaccharide-activated macrophages toward M2 phenotype." J Biol Chem**288**(36): 25792-25803.
- Heath, W. R., G. T. Belz, G. M. Behrens, C. M. Smith, S. P. Forehan, I. A. Parish, G. M. Davey, N. S. Wilson, F. R. Carbone and J. A. Villadangos (2004). "Cross-presentation, dendritic cell subsets, and the generation of immunity to cellular antigens." Immunol Rev**199**: 9-26.
- Hegde, P. S., A. M. Jubb, D. Chen, N. F. Li, Y. G. Meng, C. Bernaards, R. Elliott, S. J. Scherer and D. S. Chen (2013). "Predictive impact of circulating vascular endothelial growth factor in four phase III trials evaluating bevacizumab." Clin Cancer Res**19**(4): 929-937.
- Hernando, J. J., T. W. Park, K. Kubler, R. Offergeld, H. Schlebusch and T. Bauknecht (2002). "Vaccination with autologous tumour antigen-pulsed dendritic cells in advanced gynaecological malignancies: clinical and immunological evaluation of a phase I trial." Cancer Immunol Immunother**51**(1): 45-52.
- Herrera-Gayol, A. and S. Jothy (2002). "Effect of hyaluronan on xenotransplanted breast cancer." Exp Mol Pathol**72**(3): 179-185.
- Hivroz, C., K. Chemin, M. Turret and A. Bohineust (2012). "Crosstalk between T lymphocytes and dendritic cells." Crit Rev Immunol**32**(2): 139-155.
- Hodi, F. S., S. J. O'Day, D. F. McDermott, R. W. Weber, J. A. Sosman, J. B. Haanen, R. Gonzalez, C. Robert, D. Schadendorf, J. C. Hassel, W. Akerley, A. J. van den Eertwegh, J. Lutzky, P. Lorigan, J. M. Vaubel, G. P. Linette, D. Hogg, C. H. Ottensmeier, C. Lebbe, C. Peschel, I. Quirt, J. I. Clark, J. D. Wolchok, J. S. Weber, J. Tian, M. J. Yellin, G. M. Nichol, A. Hoos and W. J. Urba (2010). "Improved survival with ipilimumab in patients with metastatic melanoma." N Engl J Med**363**(8): 711-723.
- Holko, P. and P. Kawalec (2014). "Economic evaluation of sipuleucel-T immunotherapy in castration-resistant prostate cancer." Expert Rev Anticancer Ther**14**(1): 63-73.
- Horton, M. R., M. D. Burdick, R. M. Strieter, C. Bao and P. W. Noble (1998). "Regulation of hyaluronan-induced chemokine gene expression by IL-10 and IFN-gamma in mouse macrophages." J Immunol**160**(6): 3023-3030.
- Horton, M. R., C. M. McKee, C. Bao, F. Liao, J. M. Farber, J. Hodge-DuFour, E. Pure, B. L. Oliver, T. M. Wright and P. W. Noble (1998). "Hyaluronan fragments synergize with interferon-gamma to induce the C-X-C chemokines mig and interferon-inducible protein-10 in mouse macrophages." J Biol Chem**273**(52): 35088-35094.
- Horton, M. R., M. A. Olman and P. W. Noble (1999). "Hyaluronan fragments induce plasminogen activator inhibitor-1 and inhibit urokinase activity in mouse alveolar macrophages: a potential mechanism for impaired fibrinolytic activity in acute lung injury." Chest**116**(1 Suppl): 17S.

Horton, M. R., S. Shapiro, C. Bao, C. J. Lowenstein and P. W. Noble (1999). "Induction and regulation of macrophage metalloelastase by hyaluronan fragments in mouse macrophages." J Immunol**162**(7): 4171-4176.

Hosono, K., Y. Nishida, W. Knudson, C. B. Knudson, T. Naruse, Y. Suzuki and N. Ishiguro (2007). "Hyaluronan oligosaccharides inhibit tumorigenicity of osteosarcoma cell lines MG-63 and LM-8 in vitro and in vivo via perturbation of hyaluronan-rich pericellular matrix of the cells." Am J Pathol**171**(1): 274-286.

Hotta, T., K. Taniguchi, Y. Kobayashi, K. Johata, M. Sahara, T. Naka, H. Tanimura and Y. T. Tsubota (2004). "Chemotherapy and serum hyaluronic acid levels in malignant peritoneal mesothelioma." Hepatogastroenterology**51**(58): 1073-1083.

Hsieh, C. S., S. E. Macatonia, C. S. Tripp, S. F. Wolf, A. O'Garra and K. M. Murphy (1993). "Development of TH1 CD4+ T cells through IL-12 produced by Listeria-induced macrophages." Science**260**(5107): 547-549.

Hsu, F. J., C. Benike, F. Fagnoni, T. M. Liles, D. Czerwinski, B. Taidi, E. G. Engleman and R. Levy (1996). "Vaccination of patients with B-cell lymphoma using autologous antigen-pulsed dendritic cells." Nat Med**2**(1): 52-58.

Huang, B., P. Y. Pan, Q. Li, A. I. Sato, D. E. Levy, J. Bromberg, C. M. Divino and S. H. Chen (2006). "Gr-1+CD115+ immature myeloid suppressor cells mediate the development of tumor-induced T regulatory cells and T-cell anergy in tumor-bearing host." Cancer Res**66**(2): 1123-1131.

Hung, K., R. Hayashi, A. Lafond-Walker, C. Lowenstein, D. Pardoll and H. Levitsky (1998). "The central role of CD4(+) T cells in the antitumor immune response." J Exp Med**188**(12): 2357-2368.

Hussain, S. A., D. H. Palmer, D. E. Swinson, P. Riley, A. Wills, C. Brown, C. Draycott, A. El-Modir, D. R. Peake, D. W. Rea, A. D. Chetiyawardana and M. H. Cullen (2008). "A phase II clinical trial of gemcitabine and split dose cisplatin in advanced non-small cell lung cancer in an outpatient setting." Oncol Rep**20**(1): 233-237.

Imhof, B. A. and M. Aurrand-Lions (2004). "Adhesion mechanisms regulating the migration of monocytes." Nat Rev Immunol**4**(6): 432-444.

Isacke, C. M. and H. Yarwood (2002). "The hyaluronan receptor, CD44." Int J Biochem Cell Biol**34**(7): 718-721.

Ishiwatari-Hayasaka, H., T. Fujimoto, T. Osawa, T. Hiramata, N. Toyama-Sorimachi and M. Miyasaka (1999). "Requirements for signal delivery through CD44: analysis using CD44-Fas chimeric proteins." J Immunol**163**(3): 1258-1264.

Itano, A. A. and M. K. Jenkins (2003). "Antigen presentation to naive CD4 T cells in the lymph node." Nat Immunol**4**(8): 733-739.

Itano, N. (2008). "Simple primary structure, complex turnover regulation and multiple roles of hyaluronan." J Biochem**144**(2): 131-137.

Itano, N. and K. Kimata (2008). "Altered hyaluronan biosynthesis in cancer progression." Semin Cancer Biol**18**(4): 268-274.

Itano, N., T. Sawai, O. Miyaishi and K. Kimata (1999). "Relationship between hyaluronan production and metastatic potential of mouse mammary carcinoma cells." Cancer Res**59**(10): 2499-2504.

Itano, N., L. Zhuo and K. Kimata (2008). "Impact of the hyaluronan-rich tumor microenvironment on cancer initiation and progression." Cancer Sci**99**(9): 1720-1725.

Itsumi, M. and K. Tatsugami (2010). "Immunotherapy for renal cell carcinoma." Clin Dev Immunol**2010**: 284581.

Iwashita, Y., K. Tahara, S. Goto, A. Sasaki, S. Kai, M. Seike, C. L. Chen, K. Kawano and S. Kitano (2003). "A phase I study of autologous dendritic cell-based immunotherapy for patients with unresectable primary liver cancer." Cancer Immunol Immunother**52**(3): 155-161.

Janssen, E. M., E. E. Lemmens, T. Wolfe, U. Christen, M. G. von Herrath and S. P. Schoenberger (2003). "CD4+ T cells are required for secondary expansion and memory in CD8+ T lymphocytes." Nature**421**(6925): 852-856.

Jemal, A., M. M. Center, C. DeSantis and E. M. Ward (2010). "Global patterns of cancer incidence and mortality rates and trends." Cancer Epidemiol Biomarkers Prev**19**(8): 1893-1907.

Jiang, D., J. Liang, J. Fan, S. Yu, S. Chen, Y. Luo, G. D. Prestwich, M. M. Mascarenhas, H. G. Garg, D. A. Quinn, R. J. Homer, D. R. Goldstein, R. Bucala, P. J. Lee, R. Medzhitov and P. W. Noble (2005). "Regulation of lung injury and repair by Toll-like receptors and hyaluronan." Nat Med**11**(11): 1173-1179.

Jiang, D., J. Liang and P. W. Noble (2007). "Hyaluronan in tissue injury and repair." Annu Rev Cell Dev Biol**23**: 435-461.

Johnson, L. A., S. Clasper, A. P. Holt, P. F. Lalor, D. Baban and D. G. Jackson (2006). "An inflammation-induced mechanism for leukocyte transmigration across lymphatic vessel endothelium." J Exp Med**203**(12): 2763-2777.

Jokela, T. A., M. Jauhiainen, S. Auriola, M. Kauhanen, R. Tiihonen, M. I. Tammi and R. H. Tammi (2008). "Mannose inhibits hyaluronan synthesis by down-regulation of the cellular pool of UDP-N-acetylhexosamines." J Biol Chem**283**(12): 7666-7673.

Jongbloed, S. L., A. J. Kassianos, K. J. McDonald, G. J. Clark, X. Ju, C. E. Angel, C. J. Chen, P. R. Dunbar, R. B. Wadley, V. Jeet, A. J. Vulink, D. N. Hart and K. J. Radford (2010). "Human CD141+ (BDCA-3)+ dendritic cells (DCs) represent a unique myeloid DC subset that cross-presents necrotic cell antigens." J Exp Med**207**(6): 1247-1260.

Jonuleit, H., A. Giesecke-Tuettenberg, T. Tuting, B. Thurner-Schuler, T. B. Stuge, L. Paragnik, A. Kandemir, P. P. Lee, G. Schuler, J. Knop and A. H. Enk (2001). "A comparison of two types of dendritic cell as adjuvants for the induction of melanoma-specific T-cell responses in humans following intranodal injection." Int J Cancer**93**(2): 243-251.

- Junttila, M. R. and F. J. de Sauvage (2013). "Influence of tumour micro-environment heterogeneity on therapeutic response." Nature**501**(7467): 346-354.
- Kabashima, K., N. Shiraishi, K. Sugita, T. Mori, A. Onoue, M. Kobayashi, J. Sakabe, R. Yoshiki, H. Tamamura, N. Fujii, K. Inaba and Y. Tokura (2007). "CXCL12-CXCR4 engagement is required for migration of cutaneous dendritic cells." Am J Pathol**171**(4): 1249-1257.
- Kahn, J. A. (2009). "HPV vaccination for the prevention of cervical intraepithelial neoplasia." N Engl J Med**361**(3): 271-278.
- Kandalajt, L. E., D. J. Powell, Jr., C. L. Chiang, J. Tanyi, S. Kim, M. Bosch, K. Montone, R. Mick, B. L. Levine, D. A. Torigian, C. H. June and G. Coukos (2013). "Autologous lysate-pulsed dendritic cell vaccination followed by adoptive transfer of vaccine-primed ex vivo co-stimulated T cells in recurrent ovarian cancer." Oncoimmunology**2**(1): e22664.
- Kantoff, P. W., C. S. Higano, N. D. Shore, E. R. Berger, E. J. Small, D. F. Penson, C. H. Redfern, A. C. Ferrari, R. Dreicer, R. B. Sims, Y. Xu, M. W. Frohlich and P. F. Schellhammer (2010). "Sipuleucel-T immunotherapy for castration-resistant prostate cancer." N Engl J Med**363**(5): 411-422.
- Kaplan, D. H., V. Shankaran, A. S. Dighe, E. Stockert, M. Aguet, L. J. Old and R. D. Schreiber (1998). "Demonstration of an interferon gamma-dependent tumor surveillance system in immunocompetent mice." Proc Natl Acad Sci U S A**95**(13): 7556-7561.
- Katoh, H., K. Yamashita, G. Wang, T. Sato, T. Nakamura and M. Watanabe (2011). "Prognostic significance of preoperative bowel obstruction in stage III colorectal cancer." Ann Surg Oncol**18**(9): 2432-2441.
- Katoh, S., T. Miyagi, H. Taniguchi, Y. Matsubara, J. Kadota, A. Tominaga, P. W. Kincade, S. Matsukura and S. Kohno (1999). "Cutting edge: an inducible sialidase regulates the hyaluronic acid binding ability of CD44-bearing human monocytes." J Immunol**162**(9): 5058-5061.
- Kaufman, H. L., J. M. Kirkwood, F. S. Hodi, S. Agarwala, T. Amatruda, S. D. Bines, J. I. Clark, B. Curti, M. S. Ernstoff, T. Gajewski, R. Gonzalez, L. J. Hyde, D. Lawson, M. Lotze, J. Lutzky, K. Margolin, D. F. McDermott, D. Morton, A. Pavlick, J. M. Richards, W. Sharfman, V. K. Sondak, J. Sosman, S. Steel, A. Tarhini, J. A. Thompson, J. Titze, W. Urba, R. White and M. B. Atkins (2013). "The Society for Immunotherapy of Cancer consensus statement on tumour immunotherapy for the treatment of cutaneous melanoma." Nat Rev Clin Oncol**10**(10): 588-598.
- Kessenbrock, K., V. Plaks and Z. Werb (2010). "Matrix metalloproteinases: regulators of the tumor microenvironment." Cell**141**(1): 52-67.
- Khan, S. A., A. C. Cook, M. Kappil, U. Gunthert, A. F. Chambers, A. B. Tuck and D. T. Denhardt (2005). "Enhanced cell surface CD44 variant (v6, v9) expression by osteopontin in breast cancer epithelial cells facilitates tumor cell migration: novel post-transcriptional, post-translational regulation." Clin Exp Metastasis**22**(8): 663-673.
- Khong, H. T. and N. P. Restifo (2002). "Natural selection of tumor variants in the generation of "tumor escape" phenotypes." Nat Immunol**3**(11): 999-1005.

Kielty, C. M., M. J. Sherratt and C. A. Shuttleworth (2002). "Elastic fibres." J Cell Sci**115**(Pt 14): 2817-2828.

Kim, H. and G. Koh (2000). "Lipopolysaccharide activates matrix metalloproteinase-2 in endothelial cells through an NF-kappaB-dependent pathway." Biochem Biophys Res Commun**269**(2): 401-405.

Kim, J. Y., Y. J. Kim, J. S. Kim, H. S. Ryu, H. K. Lee, J. S. Kang, H. M. Kim, J. T. Hong, Y. Kim and S. B. Han (2011). "Adjuvant effect of a natural TLR4 ligand on dendritic cell-based cancer immunotherapy." Cancer Lett**313**(2): 226-234.

Kim, K. W., S. H. Kim, J. H. Jang, E. Y. Lee, S. W. Park, J. H. Um, Y. J. Lee, C. H. Lee, S. Yoon, S. Y. Seo, M. H. Jeong, S. T. Lee, B. S. Chung and C. D. Kang (2004). "Dendritic cells loaded with exogenous antigen by electroporation can enhance MHC class I-mediated antitumor immunity." Cancer Immunol Immunother**53**(4): 315-322.

Kim, Y., Y. S. Lee, J. Choe, H. Lee, Y. M. Kim and D. Jeoung (2008). "CD44-epidermal growth factor receptor interaction mediates hyaluronic acid-promoted cell motility by activating protein kinase C signaling involving Akt, Rac1, Phox, reactive oxygen species, focal adhesion kinase, and MMP-2." J Biol Chem**283**(33): 22513-22528.

Kirkwood, J. M., L. H. Butterfield, A. A. Tarhini, H. Zarour, P. Kalinski and S. Ferrone (2012). "Immunotherapy of cancer in 2012." CA Cancer J Clin**62**(5): 309-335.

Kirkwood, J. M. and M. S. Ernstoff (1984). "Interferons in the treatment of human cancer." J Clin Oncol**2**(4): 336-352.

Klein, G., E. Vellenga, M. W. Fraaije, W. A. Kamps and E. S. de Bont (2004). "The possible role of matrix metalloproteinase (MMP)-2 and MMP-9 in cancer, e.g. acute leukemia." Crit Rev Oncol Hematol**50**(2): 87-100.

Kobayashi, H., T. Nagato, N. Aoki, K. Sato, S. Kimura, M. Tateno and E. Celis (2006). "Defining MHC class II T helper epitopes for WT1 tumor antigen." Cancer Immunol Immunother**55**(7): 850-860.

Kobayashi, N., S. Miyoshi, T. Mikami, H. Koyama, M. Kitazawa, M. Takeoka, K. Sano, J. Amano, Z. Isogai, S. Niida, K. Oguri, M. Okayama, J. A. McDonald, K. Kimata, S. Taniguchi and N. Itano (2010). "Hyaluronan deficiency in tumor stroma impairs macrophage trafficking and tumor neovascularization." Cancer Res**70**(18): 7073-7083.

Kontny, H. U., K. Hammerle, R. Klein, P. Shayan, C. L. Mackall and C. M. Niemeyer (2001). "Sensitivity of Ewing's sarcoma to TRAIL-induced apoptosis." Cell Death Differ**8**(5): 506-514.

Kushner, E. J. and V. L. Bautch (2013). "Building blood vessels in development and disease." Curr Opin Hematol**20**(3): 231-236.

Kusmartsev, S., S. Nagaraj and D. I. Gabrilovich (2005). "Tumor-associated CD8+ T cell tolerance induced by bone marrow-derived immature myeloid cells." J Immunol**175**(7): 4583-4592.

Kyte, J. A., G. Kvalheim, S. Aamdal, S. Saeboe-Larssen and G. Gaudernack (2005). "Preclinical full-scale evaluation of dendritic cells transfected with autologous tumor-mRNA for melanoma vaccination." Cancer Gene Ther**12**(6): 579-591.

Laconi, E., S. Doratiotto and P. Vineis (2008). "The microenvironments of multistage carcinogenesis." Semin Cancer Biol**18**(5): 322-329.

Landis, S. H., T. Murray, S. Bolden and P. A. Wingo (1998). "Cancer statistics, 1998." CA Cancer J Clin**48**(1): 6-29.

Lang, S., L. Lauffer, C. Clausen, I. Lohr, B. Schmitt, D. Holzel, B. Wollenberg, O. Gires, E. Kastenbauer and R. Zeidler (2003). "Impaired monocyte function in cancer patients: restoration with a cyclooxygenase-2 inhibitor." FASEB J**17**(2): 286-288.

Lanier, L. L. (2008). "Evolutionary struggles between NK cells and viruses." Nat Rev Immunol**8**(4): 259-268.

Lasky, J. L., 3rd, E. H. Panosyan, A. Plant, T. Davidson, W. H. Yong, R. M. Prins, L. M. Liau and T. B. Moore (2013). "Autologous tumor lysate-pulsed dendritic cell immunotherapy for pediatric patients with newly diagnosed or recurrent high-grade gliomas." Anticancer Res**33**(5): 2047-2056.

Laurent, T. C., U. B. Laurent and J. R. Fraser (1996). "The structure and function of hyaluronan: An overview." Immunol Cell Biol**74**(2): A1-7.

Laznickek, M., A. Laznickova, D. Cozikova and V. Velebny (2012). "Preclinical pharmacokinetics of radiolabelled hyaluronan." Pharmacol Rep**64**(2): 428-437.

Lee, D. W., S. W. Han, H. J. Lee, Y. Y. Rhee, J. M. Bae, N. Y. Cho, K. H. Lee, T. Y. Kim, D. Y. Oh, S. A. Im, Y. J. Bang, S. Y. Jeong, K. J. Park, J. G. Park and G. H. Kang (2013). "Prognostic implication of mucinous histology in colorectal cancer patients treated with adjuvant FOLFOX chemotherapy." Br J Cancer**108**(10): 1978-1984.

Lee, P. P., C. Yee, P. A. Savage, L. Fong, D. Brockstedt, J. S. Weber, D. Johnson, S. Swetter, J. Thompson, P. D. Greenberg, M. Roederer and M. M. Davis (1999). "Characterization of circulating T cells specific for tumor-associated antigens in melanoma patients." Nat Med**5**(6): 677-685.

Lee, P. Y., W. S. Fletcher, E. S. Sullivan and J. T. Vetto (1994). "Colorectal cancer in young patients: characteristics and outcome." Am Surg**60**(8): 607-612.

Lee, W. C., H. C. Wang, C. F. Hung, P. F. Huang, C. R. Lia and M. F. Chen (2005). "Vaccination of advanced hepatocellular carcinoma patients with tumor lysate-pulsed dendritic cells: a clinical trial." J Immunother**28**(5): 496-504.

Leek, R. D. and A. L. Harris (2002). "Tumor-associated macrophages in breast cancer." J Mammary Gland Biol Neoplasia**7**(2): 177-189.

Lesley, J., V. C. Hascall, M. Tammi and R. Hyman (2000). "Hyaluronan binding by cell surface CD44." J Biol Chem**275**(35): 26967-26975.

Lesterhuis, W. J., I. J. de Vries, G. Schreibelt, A. J. Lambeck, E. H. Aarntzen, J. F. Jacobs, N. M. Scharenborg, M. W. van de Rakt, A. J. de Boer, S. Croockewit, M. M. van Rossum, R. Mus, W. J. Oyen, O. C. Boerman, S. Lucas, G. J. Adema, C. J. Punt and C. G. Figdor (2011). "Route of administration modulates the induction of dendritic cell vaccine-induced antigen-specific T cells in advanced melanoma patients." Clin Cancer Res**17**(17): 5725-5735.

Letourneur, F. and R. D. Klausner (1992). "Activation of T cells by a tyrosine kinase activation domain in the cytoplasmic tail of CD3 epsilon." Science**255**(5040): 79-82.

Levesque, M. C. and B. F. Haynes (2001). "Activated T lymphocytes regulate hyaluronan binding to monocyte CD44 via production of IL-2 and IFN-gamma." J Immunol**166**(1): 188-196.

Levin, B., D. A. Lieberman, B. McFarland, K. S. Andrews, D. Brooks, J. Bond, C. Dash, F. M. Giardiello, S. Glick, D. Johnson, C. D. Johnson, T. R. Levin, P. J. Pickhardt, D. K. Rex, R. A. Smith, A. Thorson and S. J. Winawer (2008). "Screening and surveillance for the early detection of colorectal cancer and adenomatous polyps, 2008: a joint guideline from the American Cancer Society, the US Multi-Society Task Force on Colorectal Cancer, and the American College of Radiology." Gastroenterology**134**(5): 1570-1595.

Li, C., A. M. Egloff, M. Sen, J. R. Grandis and D. E. Johnson (2014). "Caspase-8 mutations in head and neck cancer confer resistance to death receptor-mediated apoptosis and enhance migration, invasion, and tumor growth." Mol Oncol**8**(7): 1220-1230.

Lichtenstein, T., N. Perez-Janices and D. Escors (2013). "Lentiviral vectors for cancer immunotherapy and clinical applications." Cancers (Basel)**5**(3): 815-837.

Lokeshwar, V. B., B. L. Lokeshwar, H. T. Pham and N. L. Block (1996). "Association of elevated levels of hyaluronidase, a matrix-degrading enzyme, with prostate cancer progression." Cancer Res**56**(3): 651-657.

Long, H. M., G. Parsonage, C. P. Fox and S. P. Lee (2010). "Immunotherapy for Epstein-Barr virus-associated malignancies." Drug News Perspect**23**(4): 221-228.

Lotze, M. T. and K. J. Tracey (2005). "High-mobility group box 1 protein (HMGB1): nuclear weapon in the immune arsenal." Nat Rev Immunol**5**(4): 331-342.

Luca, M., S. Huang, J. E. Gershenwald, R. K. Singh, R. Reich and M. Bar-Eli (1997). "Expression of interleukin-8 by human melanoma cells up-regulates MMP-2 activity and increases tumor growth and metastasis." Am J Pathol**151**(4): 1105-1113.

Luster, A. D. (2002). "The role of chemokines in linking innate and adaptive immunity." Curr Opin Immunol**14**(1): 129-135.

Machy, P., K. Serre and L. Leserman (2000). "Class I-restricted presentation of exogenous antigen acquired by Fc-gamma receptor-mediated endocytosis is regulated in dendritic cells." Eur J Immunol**30**(3): 848-857.

Mahaffey, C. L. and M. E. Mummert (2007). "Hyaluronan synthesis is required for IL-2-mediated T cell proliferation." J Immunol**179**(12): 8191-8199.

- Maharjan, A. S., D. Pilling and R. H. Gomer (2011). "High and low molecular weight hyaluronic acid differentially regulate human fibrocyte differentiation." PLoS One**6**(10): e26078.
- Malvicini, M., M. Rizzo, L. Alaniz, F. Pinero, M. Garcia, C. Atorrasagasti, J. B. Aquino, V. Rozados, O. G. Scharovsky, P. Matar and G. Mazzolini (2009). "A novel synergistic combination of cyclophosphamide and gene transfer of interleukin-12 eradicates colorectal carcinoma in mice." Clin Cancer Res**15**(23): 7256-7265.
- Mandrzzato, S., F. Brasseur, G. Andry, T. Boon and P. van der Bruggen (1997). "A CASP-8 mutation recognized by cytolytic T lymphocytes on a human head and neck carcinoma." J Exp Med**186**(5): 785-793.
- Mariathasan, S. and D. M. Monack (2007). "Inflammasome adaptors and sensors: intracellular regulators of infection and inflammation." Nat Rev Immunol**7**(1): 31-40.
- Martin-Fontecha, A., S. Sebastiani, U. E. Hopken, M. Ugucioni, M. Lipp, A. Lanzavecchia and F. Sallusto (2003). "Regulation of dendritic cell migration to the draining lymph node: impact on T lymphocyte traffic and priming." J Exp Med**198**(4): 615-621.
- Martinon, F. and J. Tschopp (2005). "NLRs join TLRs as innate sensors of pathogens." Trends Immunol**26**(8): 447-454.
- Mascarenhas, M. M., R. M. Day, C. D. Ochoa, W. I. Choi, L. Yu, B. Ouyang, H. G. Garg, C. A. Hales and D. A. Quinn (2004). "Low molecular weight hyaluronan from stretched lung enhances interleukin-8 expression." Am J Respir Cell Mol Biol**30**(1): 51-60.
- Matou-Nasri, S., J. Gaffney, S. Kumar and M. Slevin (2009). "Oligosaccharides of hyaluronan induce angiogenesis through distinct CD44 and RHAMM-mediated signalling pathways involving Cdc2 and gamma-adducin." Int J Oncol**35**(4): 761-773.
- Maxwell, C. A., J. J. Keats, M. Crainie, X. Sun, T. Yen, E. Shibuya, M. Hendzel, G. Chan and L. M. Pilarski (2003). "RHAMM is a centrosomal protein that interacts with dynein and maintains spindle pole stability." Mol Biol Cell**14**(6): 2262-2276.
- Mazzolini, G., C. Alfaro, B. Sangro, E. Feijoo, J. Ruiz, A. Benito, I. Tirapu, A. Arina, J. Sola, M. Herraiz, F. Lucena, C. Olague, J. Subtil, J. Quiroga, I. Herrero, B. Sadaba, M. Bendandi, C. Qian, J. Prieto and I. Melero (2005). "Intratumoral injection of dendritic cells engineered to secrete interleukin-12 by recombinant adenovirus in patients with metastatic gastrointestinal carcinomas." J Clin Oncol**23**(5): 999-1010.
- McKee, C. M., M. B. Penno, M. Cowman, M. D. Burdick, R. M. Strieter, C. Bao and P. W. Noble (1996). "Hyaluronan (HA) fragments induce chemokine gene expression in alveolar macrophages. The role of HA size and CD44." J Clin Invest**98**(10): 2403-2413.
- Meert, A. P., M. Paesmans, B. Martin, P. Delmotte, T. Berghmans, J. M. Verdebout, J. J. Lafitte, C. Mascaux and J. P. Sculier (2002). "The role of microvessel density on the survival of patients with lung cancer: a systematic review of the literature with meta-analysis." Br J Cancer**87**(7): 694-701.

Miaw, S. C., J. S. Chen, P. C. Hsieh, C. Y. Liu, M. H. Chung, P. C. Chen, M. L. Chang, F. L. Chen, J. T. Kung and L. F. Wang (2010). "CD44-deficient mice do not exhibit impairment of epidermal Langerhans cell migration to lymph nodes after epicutaneous sensitization with protein." J Invest Dermatol**130**(11): 2674-2677.

Mielgo, A., V. Brondani, L. Landmann, A. Glaser-Ruhm, P. Erb, D. Stupack and U. Gunthert (2007). "The CD44 standard/ezrin complex regulates Fas-mediated apoptosis in Jurkat cells." Apoptosis**12**(11): 2051-2061.

Mielgo, A., M. van Driel, A. Bloem, L. Landmann and U. Gunthert (2006). "A novel antiapoptotic mechanism based on interference of Fas signaling by CD44 variant isoforms." Cell Death Differ**13**(3): 465-477.

Mikecz, K., F. R. Brennan, J. H. Kim and T. T. Glant (1995). "Anti-CD44 treatment abrogates tissue oedema and leukocyte infiltration in murine arthritis." Nat Med**1**(6): 558-563.

Misra, S., S. Ghatak, A. Zoltan-Jones and B. P. Toole (2003). "Regulation of multidrug resistance in cancer cells by hyaluronan." J Biol Chem**278**(28): 25285-25288.

Misra, S., L. M. Obeid, Y. A. Hannun, S. Minamisawa, F. G. Berger, R. R. Markwald, B. P. Toole and S. Ghatak (2008). "Hyaluronan constitutively regulates activation of COX-2-mediated cell survival activity in intestinal epithelial and colon carcinoma cells." J Biol Chem**283**(21): 14335-14344.

Misra, S., B. P. Toole and S. Ghatak (2006). "Hyaluronan constitutively regulates activation of multiple receptor tyrosine kinases in epithelial and carcinoma cells." J Biol Chem**281**(46): 34936-34941.

Moller, I., K. Michel, N. Frech, M. Burger, D. Pfeifer, P. Frommolt, H. Veelken and A. K. Thomas-Kaskel (2008). "Dendritic cell maturation with poly(I:C)-based versus PGE2-based cytokine combinations results in differential functional characteristics relevant to clinical application." J Immunother**31**(5): 506-519.

Morse, M. A., R. E. Coleman, G. Akabani, N. Niehaus, D. Coleman and H. K. Lyerly (1999). "Migration of human dendritic cells after injection in patients with metastatic malignancies." Cancer Res**59**(1): 56-58.

Morse, M. A., A. C. Hobeika, T. Osada, D. Serra, D. Niedzwiecki, H. K. Lyerly and T. M. Clay (2008). "Depletion of human regulatory T cells specifically enhances antigen-specific immune responses to cancer vaccines." Blood**112**(3): 610-618.

Mortarini, R., C. Vegetti, A. Molla, F. Arienti, F. Ravagnani, A. Maurichi, R. Patuzzo, M. Santinami and A. Anichini (2009). "Impaired STAT phosphorylation in T cells from melanoma patients in response to IL-2: association with clinical stage." Clin Cancer Res**15**(12): 4085-4094.

Mummert, M. E. (2005). "Immunologic roles of hyaluronan." Immunol Res**31**(3): 189-206.

- Mummert, M. E., D. Mummert, D. Edelbaum, F. Hui, H. Matsue and A. Takashima (2002). "Synthesis and surface expression of hyaluronan by dendritic cells and its potential role in antigen presentation." J Immunol**169**(8): 4322-4331.
- Munoz, C., J. Carlet, C. Fitting, B. Misset, J. P. Bleriot and J. M. Cavaillon (1991). "Dysregulation of in vitro cytokine production by monocytes during sepsis." J Clin Invest**88**(5): 1747-1754.
- Munz, C., R. M. Steinman and S. Fujii (2005). "Dendritic cell maturation by innate lymphocytes: coordinated stimulation of innate and adaptive immunity." J Exp Med**202**(2): 203-207.
- Murphy, K. (2012). "Janeway's Immuno Biology."
- Nagaraj, S. and D. I. Gabrilovich (2007). "Myeloid-derived suppressor cells." Adv Exp Med Biol**601**: 213-223.
- Nair, S., C. McLaughlin, A. Weizer, Z. Su, D. Boczkowski, J. Dannull, J. Vieweg and E. Gilboa (2003). "Injection of immature dendritic cells into adjuvant-treated skin obviates the need for ex vivo maturation." J Immunol**171**(11): 6275-6282.
- Naito, Y., K. Saito, K. Shiiba, A. Ohuchi, K. Saigenji, H. Nagura and H. Ohtani (1998). "CD8+ T cells infiltrated within cancer cell nests as a prognostic factor in human colorectal cancer." Cancer Res**58**(16): 3491-3494.
- Nakamura, K., S. Yokohama, M. Yoneda, S. Okamoto, Y. Tamaki, T. Ito, M. Okada, K. Aso and I. Makino (2004). "High, but not low, molecular weight hyaluronan prevents T-cell-mediated liver injury by reducing proinflammatory cytokines in mice." J Gastroenterol**39**(4): 346-354.
- Nakano, O., M. Sato, Y. Naito, K. Suzuki, S. Orikasa, M. Aizawa, Y. Suzuki, I. Shintaku, H. Nagura and H. Ohtani (2001). "Proliferative activity of intratumoral CD8(+) T-lymphocytes as a prognostic factor in human renal cell carcinoma: clinicopathologic demonstration of antitumor immunity." Cancer Res**61**(13): 5132-5136.
- Nardin, A. and J. P. Abastado (2008). "Macrophages and cancer." Front Biosci**13**: 3494-3505.
- Nestle, F. O., S. Alijagic, M. Gilliet, Y. Sun, S. Grabbe, R. Dummer, G. Burg and D. Schadendorf (1998). "Vaccination of melanoma patients with peptide- or tumor lysate-pulsed dendritic cells." Nat Med**4**(3): 328-332.
- Nikitina, E. Y., J. I. Clark, J. Van Beynen, S. Chada, A. K. Virmani, D. P. Carbone and D. I. Gabrilovich (2001). "Dendritic cells transduced with full-length wild-type p53 generate antitumor cytotoxic T lymphocytes from peripheral blood of cancer patients." Clin Cancer Res**7**(1): 127-135.
- Noble, P. W. (2002). "Hyaluronan and its catabolic products in tissue injury and repair." Matrix Biol**21**(1): 25-29.
- Noble, P. W., F. R. Lake, P. M. Henson and D. W. Riches (1993). "Hyaluronate activation of CD44 induces insulin-like growth factor-1 expression by a tumor necrosis factor-alpha-dependent mechanism in murine macrophages." J Clin Invest**91**(6): 2368-2377.

Noble, P. W., C. M. McKee, M. Cowman and H. S. Shin (1996). "Hyaluronan fragments activate an NF-kappa B/I-kappa B alpha autoregulatory loop in murine macrophages." J Exp Med**183**(5): 2373-2378.

Novellino, L., C. Castelli and G. Parmiani (2005). "A listing of human tumor antigens recognized by T cells: March 2004 update." Cancer Immunol Immunother**54**(3): 187-207.

Obayashi, Y., H. Yabushita, K. Kanyama, M. Noguchi, L. Zhuo, K. Kimata and A. Wakatsuki (2008). "Role of serum-derived hyaluronan-associated protein-hyaluronan complex in ovarian cancer." Oncol Rep**19**(5): 1245-1251.

Ochsenbein, A. F., S. Sierro, B. Odermatt, M. Pericin, U. Karrer, J. Hermans, S. Hemmi, H. Hengartner and R. M. Zinkernagel (2001). "Roles of tumour localization, second signals and cross priming in cytotoxic T-cell induction." Nature**411**(6841): 1058-1064.

Okada, N., N. Mori, R. Koretomo, Y. Okada, T. Nakayama, O. Yoshie, H. Mizuguchi, T. Hayakawa, S. Nakagawa, T. Mayumi, T. Fujita and A. Yamamoto (2005). "Augmentation of the migratory ability of DC-based vaccine into regional lymph nodes by efficient CCR7 gene transduction." Gene Ther**12**(2): 129-139.

Okada, N., T. Saito, K. Mori, Y. Masunaga, Y. Fujii, J. Fujita, K. Fujimoto, T. Nakanishi, K. Tanaka, S. Nakagawa, T. Mayumi, T. Fujita and A. Yamamoto (2001). "Effects of lipofectin-antigen complexes on major histocompatibility complex class I-restricted antigen presentation pathway in murine dendritic cells and on dendritic cell maturation." Biochim Biophys Acta**1527**(3): 97-101.

Orimo, A., P. B. Gupta, D. C. Sgroi, F. Arenzana-Seisdedos, T. Delaunay, R. Naeem, V. J. Carey, A. L. Richardson and R. A. Weinberg (2005). "Stromal fibroblasts present in invasive human breast carcinomas promote tumor growth and angiogenesis through elevated SDF-1/CXCL12 secretion." Cell**121**(3): 335-348.

Palucka, A. K., H. Ueno, J. Fay and J. Banchereau (2008). "Dendritic cells: a critical player in cancer therapy?" J Immunother**31**(9): 793-805.

Palucka, K. and J. Banchereau (2012). "Cancer immunotherapy via dendritic cells." Nat Rev Cancer**12**(4): 265-277.

Palucka, K. and J. Banchereau (2013). "Human dendritic cell subsets in vaccination." Curr Opin Immunol**25**(3): 396-402.

Park, T. S., S. A. Rosenberg and R. A. Morgan (2011). "Treating cancer with genetically engineered T cells." Trends Biotechnol**29**(11): 550-557.

Parks, W. C., C. L. Wilson and Y. S. Lopez-Boado (2004). "Matrix metalloproteinases as modulators of inflammation and innate immunity." Nat Rev Immunol**4**(8): 617-629.

Pascual, V., F. Allantaz, P. Patel, A. K. Palucka, D. Chaussabel and J. Banchereau (2008). "How the study of children with rheumatic diseases identified interferon-alpha and interleukin-1 as novel therapeutic targets." Immunol Rev**223**: 39-59.

- Pellegrini, P., A. M. Berghella, I. Contasta, T. Del Beato and D. Adorno (2006). "The study of a patient's immune system may prove to be a useful noninvasive tool for stage classification in colon cancer." Cancer Biother Radiopharm**21**(5): 443-467.
- Pellegrini, P., A. M. Berghella, T. Del Beato, S. Cicia, D. Adorno and C. U. Casciani (1996). "Disregulation in TH1 and TH2 subsets of CD4+ T cells in peripheral blood of colorectal cancer patients and involvement in cancer establishment and progression." Cancer Immunol Immunother**42**(1): 1-8.
- Pellegrini, P., A. M. Berghella, T. Del Beato, D. Maccarone, S. Cencioni, D. Adorno and C. U. Casciani (1997). "The sCEA molecule suppressive role in NK and TH1 cell functions in colorectal cancer." Cancer Biother Radiopharm**12**(4): 257-264.
- Perez-Gracia, J. L., S. Labiano, M. E. Rodriguez-Ruiz, M. F. Sanmamed and I. Melero (2014). "Orchestrating immune check-point blockade for cancer immunotherapy in combinations." Curr Opin Immunol**27**: 89-97.
- Pham, H. T., N. L. Block and V. B. Lokeshwar (1997). "Tumor-derived hyaluronidase: a diagnostic urine marker for high-grade bladder cancer." Cancer Res**57**(4): 778-783.
- Polanska, U. M. and A. Orimo (2013). "Carcinoma-associated fibroblasts: non-neoplastic tumour-promoting mesenchymal cells." J Cell Physiol**228**(8): 1651-1657.
- Ponta, H., L. Sherman and P. A. Herrlich (2003). "CD44: from adhesion molecules to signalling regulators." Nat Rev Mol Cell Biol**4**(1): 33-45.
- Prevo, R., S. Banerji, D. J. Ferguson, S. Clasper and D. G. Jackson (2001). "Mouse LYVE-1 is an endocytic receptor for hyaluronan in lymphatic endothelium." J Biol Chem**276**(22): 19420-19430.
- Prins, R. M., X. Wang, H. Soto, E. Young, D. N. Lisiero, B. Fong, R. Everson, W. H. Yong, A. Lai, G. Li, T. F. Cloughesy and L. M. Liao (2013). "Comparison of glioma-associated antigen peptide-loaded versus autologous tumor lysate-loaded dendritic cell vaccination in malignant glioma patients." J Immunother**36**(2): 152-157.
- Pupa, S. M., S. Menard, S. Forti and E. Tagliabue (2002). "New insights into the role of extracellular matrix during tumor onset and progression." J Cell Physiol**192**(3): 259-267.
- Rabinovich, G. A., D. Gabrilovich and E. M. Sotomayor (2007). "Immunosuppressive strategies that are mediated by tumor cells." Annu Rev Immunol**25**: 267-296.
- Radford, K. J., K. M. Tullett and M. H. Lahoud (2014). "Dendritic cells and cancer immunotherapy." Curr Opin Immunol**27**: 26-32.
- Randolph, G. J., J. Ochando and S. Partida-Sanchez (2008). "Migration of dendritic cell subsets and their precursors." Annu Rev Immunol**26**: 293-316.
- Ratzinger, G., P. Stoitzner, S. Ebner, M. B. Lutz, G. T. Layton, C. Rainer, R. M. Senior, J. M. Shipley, P. Fritsch, G. Schuler and N. Romani (2002). "Matrix metalloproteinases 9 and 2 are

necessary for the migration of Langerhans cells and dermal dendritic cells from human and murine skin." J Immunol**168**(9): 4361-4371.

Redman, B. G., A. E. Chang, J. Whitfield, P. Esper, G. Jiang, T. Braun, B. Roessler and J. J. Mule (2008). "Phase Ib trial assessing autologous, tumor-pulsed dendritic cells as a vaccine administered with or without IL-2 in patients with metastatic melanoma." J Immunother**31**(6): 591-598.

Rees, M. D., C. L. Hawkins and M. J. Davies (2004). "Hypochlorite and superoxide radicals can act synergistically to induce fragmentation of hyaluronan and chondroitin sulphates." Biochem J**381**(Pt 1): 175-184.

Reyes, D., L. Salazar, E. Espinoza, C. Pereda, E. Castellon, R. Valdevenito, C. Huidobro, M. Ines Becker, A. Lladser, M. N. Lopez and F. Salazar-Onfray (2013). "Tumour cell lysate-loaded dendritic cell vaccine induces biochemical and memory immune response in castration-resistant prostate cancer patients." Br J Cancer**109**(6): 1488-1497.

Rizzo, M. M., L. Alaniz and G. Mazzolini (2014). "Ex vivo loading of autologous dendritic cells with tumor antigens." Methods Mol Biol**1139**: 41-44.

Rock, K. L., A. Hearn, C. J. Chen and Y. Shi (2005). "Natural endogenous adjuvants." Springer Semin Immunopathol**26**(3): 231-246.

Rodriguez-Salvador, J., C. Armas-Pineda, M. Perezpena-Diazconti, F. Chico-Ponce de Leon, G. Sosa-Sainz, P. Lezama, F. Recillas-Targa and F. Arenas-Huertero (2005). "Effect of sodium butyrate on pro-matrix metalloproteinase-9 and -2 differential secretion in pediatric tumors and cell lines." J Exp Clin Cancer Res**24**(3): 463-473.

Ropponen, K., M. Tammi, J. Parkkinen, M. Eskelinen, R. Tammi, P. Lipponen, U. Agren, E. Alhava and V. M. Kosma (1998). "Tumor cell-associated hyaluronan as an unfavorable prognostic factor in colorectal cancer." Cancer Res**58**(2): 342-347.

Rosenberg, R. D. and W. C. Aird (1999). "Vascular-bed--specific hemostasis and hypercoagulable states." N Engl J Med**340**(20): 1555-1564.

Rosenberg, S. A. (2011). "Cell transfer immunotherapy for metastatic solid cancer--what clinicians need to know." Nat Rev Clin Oncol**8**(10): 577-585.

Rosenberg, S. A., J. C. Yang, R. M. Sherry, U. S. Kammula, M. S. Hughes, G. Q. Phan, D. E. Citrin, N. P. Restifo, P. F. Robbins, J. R. Wunderlich, K. E. Morton, C. M. Laurencot, S. M. Steinberg, D. E. White and M. E. Dudley (2011). "Durable complete responses in heavily pretreated patients with metastatic melanoma using T-cell transfer immunotherapy." Clin Cancer Res**17**(13): 4550-4557.

Roy, S., S. Goswami, A. Bose, K. K. Goswami, K. Sarkar, K. Chakraborty, T. Chakraborty, S. Pal, A. Haldar, P. Basu, J. Biswas and R. Baral (2011). "Defective dendritic cell generation from monocytes is a potential reason for poor therapeutic efficacy of interferon alpha2b (IFNalpha2b) in cervical cancer." Transl Res**158**(4): 200-213.

Rubinstein, N., M. Alvarez, N. W. Zwirner, M. A. Toscano, J. M. Ilarregui, A. Bravo, J. Mordoh, L. Fainboim, O. L. Podhajcer and G. A. Rabinovich (2004). "Targeted inhibition of galectin-1 gene expression in tumor cells results in heightened T cell-mediated rejection; A potential mechanism of tumor-immune privilege." Cancer Cell**5**(3): 241-251.

Ruffell, B. and P. Johnson (2008). "Hyaluronan induces cell death in activated T cells through CD44." J Immunol**181**(10): 7044-7054.

Salama, A. K. and F. S. Hodi (2011). "Cytotoxic T-lymphocyte-associated antigen-4." Clin Cancer Res**17**(14): 4622-4628.

Sallusto, F. and A. Lanzavecchia (1994). "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**179**(4): 1109-1118.

Santegoets, S. J., A. W. Turksma, D. J. Powell Jr, E. Hooijberg and T. D. de Gruijl (2013). "IL-21 in cancer immunotherapy: At the right place at the right time." Oncoimmunology**2**(6): e24522.

Santin, A. D., S. Bellone, J. J. Roman, A. Burnett, M. J. Cannon and S. Pecorelli (2005). "Therapeutic vaccines for cervical cancer: dendritic cell-based immunotherapy." Curr Pharm Des**11**(27): 3485-3500.

Saraiva, M. and A. O'Garra (2010). "The regulation of IL-10 production by immune cells." Nat Rev Immunol**10**(3): 170-181.

Sargent, D. J., C. H. Kohne, H. K. Sanoff, B. M. Bot, M. T. Seymour, A. de Gramont, R. Porschen, L. B. Saltz, P. Rougier, C. Tournigand, J. Y. Douillard, R. J. Stephens, A. Grothey and R. M. Goldberg (2009). "Pooled safety and efficacy analysis examining the effect of performance status on outcomes in nine first-line treatment trials using individual data from patients with metastatic colorectal cancer." J Clin Oncol**27**(12): 1948-1955.

Sato, E., S. H. Olson, J. Ahn, B. Bundy, H. Nishikawa, F. Qian, A. A. Jungbluth, D. Frosina, S. Gnjjatic, C. Ambrosone, J. Kepner, T. Odunsi, G. Ritter, S. Lele, Y. T. Chen, H. Ohtani, L. J. Old and K. Odunsi (2005). "Intraepithelial CD8+ tumor-infiltrating lymphocytes and a high CD8+/regulatory T cell ratio are associated with favorable prognosis in ovarian cancer." Proc Natl Acad Sci U S A**102**(51): 18538-18543.

Sauter, B., M. L. Albert, L. Francisco, M. Larsson, S. Somersan and N. Bhardwaj (2000). "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**191**(3): 423-434.

Savani, R. C., G. Cao, P. M. Pooler, A. Zaman, Z. Zhou and H. M. DeLisser (2001). "Differential involvement of the hyaluronan (HA) receptors CD44 and receptor for HA-mediated motility in endothelial cell function and angiogenesis." J Biol Chem**276**(39): 36770-36778.

- Scandella, E., Y. Men, S. Gillessen, R. Forster and M. Groettrup (2002). "Prostaglandin E2 is a key factor for CCR7 surface expression and migration of monocyte-derived dendritic cells." Blood**100**(4): 1354-1361.
- Scott, J. E. (1995). "Extracellular matrix, supramolecular organisation and shape." J Anat**187** (Pt 2): 259-269.
- Schattner, E. J., J. Mascarenhas, J. Bishop, D. H. Yoo, A. Chadburn, M. K. Crow and S. M. Friedman (1996). "CD4+ T-cell induction of Fas-mediated apoptosis in Burkitt's lymphoma B cells." Blood**88**(4): 1375-1382.
- Scheibner, K. A., M. A. Lutz, S. Boodoo, M. J. Fenton, J. D. Powell and M. R. Horton (2006). "Hyaluronan fragments act as an endogenous danger signal by engaging TLR2." J Immunol**177**(2): 1272-1281.
- Schmielau, J. and O. J. Finn (2001). "Activated granulocytes and granulocyte-derived hydrogen peroxide are the underlying mechanism of suppression of t-cell function in advanced cancer patients." Cancer Res**61**(12): 4756-4760.
- Schoenberger, S. P., R. E. Toes, E. I. van der Voort, R. Offringa and C. J. Melief (1998). "T-cell help for cytotoxic T lymphocytes is mediated by CD40-CD40L interactions." Nature**393**(6684): 480-483.
- Schuler-Thurner, B., E. S. Schultz, T. G. Berger, G. Weinlich, S. Ebner, P. Woerl, A. Bender, B. Feuerstein, P. O. Fritsch, N. Romani and G. Schuler (2002). "Rapid induction of tumor-specific type 1 T helper cells in metastatic melanoma patients by vaccination with mature, cryopreserved, peptide-loaded monocyte-derived dendritic cells." J Exp Med**195**(10): 1279-1288.
- Segura, E., A. L. Albiston, I. P. Wicks, S. Y. Chai and J. A. Villadangos (2009). "Different cross-presentation pathways in steady-state and inflammatory dendritic cells." Proc Natl Acad Sci U S A**106**(48): 20377-20381.
- Setton-Avruj, C. P., J. B. Aquino, C. J. Goedelman, E. F. Soto and M. J. Villar (2002). "P0 and myelin basic protein-like immunoreactivities following ligation of the sciatic nerve in the rat." Neurochem Res**27**(11): 1293-1303.
- Shankaran, V., H. Ikeda, A. T. Bruce, J. M. White, P. E. Swanson, L. J. Old and R. D. Schreiber (2001). "IFN γ and lymphocytes prevent primary tumour development and shape tumour immunogenicity." Nature**410**(6832): 1107-1111.
- Shedlock, D. J. and H. Shen (2003). "Requirement for CD4 T cell help in generating functional CD8 T cell memory." Science**300**(5617): 337-339.
- Shimizu, K., H. Kuriyama, J. Kjaergaard, W. Lee, H. Tanaka and S. Shu (2004). "Comparative analysis of antigen loading strategies of dendritic cells for tumor immunotherapy." J Immunother**27**(4): 265-272.

Shin, U. S., C. S. Yu, J. H. Kim, T. W. Kim, S. B. Lim, S. N. Yoon, Y. S. Yoon, C. W. Kim and J. C. Kim (2011). "Mucinous rectal cancer: effectiveness of preoperative chemoradiotherapy and prognosis." Ann Surg Oncol**18**(8): 2232-2239.

Shishido, S. N., S. Varahan, K. Yuan, X. Li and S. D. Fleming (2012). "Humoral innate immune response and disease." Clin Immunol**144**(2): 142-158.

Siegelman, M. H., H. C. DeGrendele and P. Estess (1999). "Activation and interaction of CD44 and hyaluronan in immunological systems." J Leukoc Biol**66**(2): 315-321.

Sinha, P., V. K. Clements, S. K. Bunt, S. M. Albelda and S. Ostrand-Rosenberg (2007). "Cross-talk between myeloid-derived suppressor cells and macrophages subverts tumor immunity toward a type 2 response." J Immunol**179**(2): 977-983.

Skalova, K., K. Mollova and J. Michalek (2010). "Human myeloid dendritic cells for cancer therapy: Does maturation matter?" Vaccine.

Slevin, M., J. Krupinski, J. Gaffney, S. Matou, D. West, H. Delisser, R. C. Savani and S. Kumar (2007). "Hyaluronan-mediated angiogenesis in vascular disease: uncovering RHAMM and CD44 receptor signaling pathways." Matrix Biol**26**(1): 58-68.

Slevin, M., S. Kumar and J. Gaffney (2002). "Angiogenic oligosaccharides of hyaluronan induce multiple signaling pathways affecting vascular endothelial cell mitogenic and wound healing responses." J Biol Chem**277**(43): 41046-41059.

Slomiany, M. G., L. Dai, P. A. Bomar, T. J. Knackstedt, D. A. Kranc, L. Tolliver, B. L. Maria and B. P. Toole (2009). "Abrogating drug resistance in malignant peripheral nerve sheath tumors by disrupting hyaluronan-CD44 interactions with small hyaluronan oligosaccharides." Cancer Res**69**(12): 4992-4998.

Sohara, Y., N. Ishiguro, K. Machida, H. Kurata, A. A. Thant, T. Senga, S. Matsuda, K. Kimata, H. Iwata and M. Hamaguchi (2001). "Hyaluronan activates cell motility of v-Src-transformed cells via Ras-mitogen-activated protein kinase and phosphoinositide 3-kinase-Akt in a tumor-specific manner." Mol Biol Cell**12**(6): 1859-1868.

Sozzani, S., P. Allavena, A. Vecchi and A. Mantovani (2000). "Chemokines and dendritic cell traffic." J Clin Immunol**20**(3): 151-160.

Spicer, A. P. and J. A. McDonald (1998). "Characterization and molecular evolution of a vertebrate hyaluronan synthase gene family." J Biol Chem**273**(4): 1923-1932.

Srivastava, P. K. and R. G. Maki (1991). "Stress-induced proteins in immune response to cancer." Curr Top Microbiol Immunol**167**: 109-123.

Steinman, R. M. and J. Banchereau (2007). "Taking dendritic cells into medicine." Nature**449**(7161): 419-426.

Steinman, R. M. and M. Dhodapkar (2001). "Active immunization against cancer with dendritic cells: the near future." Int J Cancer**94**(4): 459-473.

- Stern, R. (2008). "Hyaluronidases in cancer biology." Semin Cancer Biol**18**(4): 275-280.
- Stern, R. and M. J. Jedrzejewski (2006). "Hyaluronidases: their genomics, structures, and mechanisms of action." Chem Rev**106**(3): 818-839.
- Stern, R., G. Kogan, M. J. Jedrzejewski and L. Soltes (2007). "The many ways to cleave hyaluronan." Biotechnol Adv**25**(6): 537-557.
- Stier, S., C. Maletzki, U. Klier and M. Linnebacher (2013). "Combinations of TLR ligands: a promising approach in cancer immunotherapy." Clin Dev Immunol**2013**: 271246.
- Stiff, P. J., C. Czerlanis and M. L. Drake (2013). "Dendritic cell immunotherapy in ovarian cancer." Expert Rev Anticancer Ther**13**(1): 43-53.
- Sun, J. C., J. N. Beilke and L. L. Lanier (2009). "Adaptive immune features of natural killer cells." Nature**457**(7229): 557-561.
- Suwiat, S., C. Ricciardelli, R. Tammi, M. Tammi, P. Auvinen, V. M. Kosma, R. G. LeBaron, W. A. Raymond, W. D. Tilley and D. J. Horsfall (2004). "Expression of extracellular matrix components versican, chondroitin sulfate, tenascin, and hyaluronan, and their association with disease outcome in node-negative breast cancer." Clin Cancer Res**10**(7): 2491-2498.
- Talmor, M., A. Mirza, S. Turley, I. Mellman, L. A. Hoffman and R. M. Steinman (1998). "Generation of large numbers of immature and mature dendritic cells from rat bone marrow cultures." Eur J Immunol**28**(3): 811-817.
- Tammi, M. I., A. J. Day and E. A. Turley (2002). "Hyaluronan and homeostasis: a balancing act." J Biol Chem**277**(7): 4581-4584.
- Tammi, R. H., A. G. Passi, K. Rilla, E. Karousou, D. Vigetti, K. Makkonen and M. I. Tammi (2011). "Transcriptional and post-translational regulation of hyaluronan synthesis." FEBS J**278**(9): 1419-1428.
- Tan, B., J. H. Wang, Q. D. Wu, W. O. Kirwan and H. P. Redmond (2001). "Sodium hyaluronate enhances colorectal tumour cell metastatic potential in vitro and in vivo." Br J Surg**88**(2): 246-250.
- Taylor, K. R., J. M. Trowbridge, J. A. Rudisill, C. C. Termeer, J. C. Simon and R. L. Gallo (2004). "Hyaluronan fragments stimulate endothelial recognition of injury through TLR4." J Biol Chem**279**(17): 17079-17084.
- Taylor, K. R., K. Yamasaki, K. A. Radek, A. Di Nardo, H. Goodarzi, D. Golenbock, B. Beutler and R. L. Gallo (2007). "Recognition of hyaluronan released in sterile injury involves a unique receptor complex dependent on Toll-like receptor 4, CD44, and MD-2." J Biol Chem**282**(25): 18265-18275.
- Termeer, C., F. Benedix, J. Sleeman, C. Fieber, U. Voith, T. Ahrens, K. Miyake, M. Freudenberg, C. Galanos and J. C. Simon (2002). "Oligosaccharides of Hyaluronan activate dendritic cells via toll-like receptor 4." J Exp Med**195**(1): 99-111.

Termeer, C., J. P. Sleeman and J. C. Simon (2003). "Hyaluronan--magic glue for the regulation of the immune response?" Trends Immunol**24**(3): 112-114.

Termeer, C. C., J. Hennies, U. Voith, T. Ahrens, J. M. Weiss, P. Prehm and J. C. Simon (2000). "Oligosaccharides of hyaluronan are potent activators of dendritic cells." J Immunol**165**(4): 1863-1870.

Tesar, B. M., D. Jiang, J. Liang, S. M. Palmer, P. W. Noble and D. R. Goldstein (2006). "The role of hyaluronan degradation products as innate alloimmune agonists." Am J Transplant**6**(11): 2622-2635.

Thurner, B., I. Haendle, C. Roder, D. Dieckmann, P. Keikavoussi, H. Jonuleit, A. Bender, C. Maczek, D. Schreiner, P. von den Driesch, E. B. Brocker, R. M. Steinman, A. Enk, E. Kampgen and G. Schuler (1999). "Vaccination with mage-3A1 peptide-pulsed mature, monocyte-derived dendritic cells expands specific cytotoxic T cells and induces regression of some metastases in advanced stage IV melanoma." J Exp Med**190**(11): 1669-1678.

Timmerman, J. M., D. K. Czerwinski, T. A. Davis, F. J. Hsu, C. Benike, Z. M. Hao, B. Taidi, R. Rajapaksa, C. B. Caspar, C. Y. Okada, A. van Beckhoven, T. M. Liles, E. G. Engleman and R. Levy (2002). "Idiotypic-pulsed dendritic cell vaccination for B-cell lymphoma: clinical and immune responses in 35 patients." Blood**99**(5): 1517-1526.

Timmerman, J. M. and R. Levy (1999). "Dendritic cell vaccines for cancer immunotherapy." Annu Rev Med**50**: 507-529.

Ting, J. P. and B. K. Davis (2005). "CATERPILLER: a novel gene family important in immunity, cell death, and diseases." Annu Rev Immunol**23**: 387-414.

Toes, R. E., S. P. Schoenberger, E. I. van der Voort, R. Offringa and C. J. Melief (1998). "CD40-CD40Ligand interactions and their role in cytotoxic T lymphocyte priming and anti-tumor immunity." Semin Immunol**10**(6): 443-448.

Tomasetti, C. and B. Vogelstein (2015). "Cancer etiology. Variation in cancer risk among tissues can be explained by the number of stem cell divisions." Science**347**(6217): 78-81.

Tomura, M., N. Yoshida, J. Tanaka, S. Karasawa, Y. Miwa, A. Miyawaki and O. Kanagawa (2008). "Monitoring cellular movement in vivo with photoconvertible fluorescence protein "Kaede" transgenic mice." Proc Natl Acad Sci U S A**105**(31): 10871-10876.

Toole, B. P. (2001). "Hyaluronan in morphogenesis." Semin Cell Dev Biol**12**(2): 79-87.

Toole, B. P. (2002). "Hyaluronan promotes the malignant phenotype." Glycobiology**12**(3): 37R-42R.

Toole, B. P. (2004). "Hyaluronan: from extracellular glue to pericellular cue." Nat Rev Cancer**4**(7): 528-539.

Toole, B. P. (2009). "Hyaluronan-CD44 Interactions in Cancer: Paradoxes and Possibilities." Clin Cancer Res**15**(24): 7462-7468.

- Toole, B. P., S. Ghatak and S. Misra (2008). "Hyaluronan oligosaccharides as a potential anticancer therapeutic." Curr Pharm Biotechnol**9**(4): 249-252.
- Toole, B. P. and V. C. Hascall (2002). "Hyaluronan and tumor growth." Am J Pathol**161**(3): 745-747.
- Toole, B. P. and M. G. Slomiany (2008). "Hyaluronan, CD44 and Emmprin: partners in cancer cell chemoresistance." Drug Resist Updat**11**(3): 110-121.
- Topalian, S. L., F. S. Hodi, J. R. Brahmer, S. N. Gettinger, D. C. Smith, D. F. McDermott, J. D. Powderly, R. D. Carvajal, J. A. Sosman, M. B. Atkins, P. D. Leming, D. R. Spigel, S. J. Antonia, L. Horn, C. G. Drake, D. M. Pardoll, L. Chen, W. H. Sharfman, R. A. Anders, J. M. Taube, T. L. McMiller, H. Xu, A. J. Korman, M. Jure-Kunkel, S. Agrawal, D. McDonald, G. D. Kollia, A. Gupta, J. M. Wigginton and M. Sznol (2012). "Safety, activity, and immune correlates of anti-PD-1 antibody in cancer." N Engl J Med**366**(26): 2443-2454.
- Torre, C., S. J. Wang, W. Xia and L. Y. Bourguignon (2010). "Reduction of hyaluronan-CD44-mediated growth, migration, and cisplatin resistance in head and neck cancer due to inhibition of Rho kinase and PI-3 kinase signaling." Arch Otolaryngol Head Neck Surg**136**(5): 493-501.
- Trombetta, E. S. and I. Mellman (2005). "Cell biology of antigen processing in vitro and in vivo." Annu Rev Immunol**23**: 975-1028.
- Tse, B. W., A. Collins, M. K. Oehler, A. Zippelius and V. A. Heinzelmann-Schwarz (2014). "Antibody-based immunotherapy for ovarian cancer: where are we at?" Ann Oncol**25**(2): 322-331.
- Tureci, O., U. Sahin, I. Schobert, M. Koslowski, H. Scmitt, H. J. Schild, F. Stenner, G. Seitz, H. G. Rammensee and M. Pfreundschuh (1996). "The SSX-2 gene, which is involved in the t(X;18) translocation of synovial sarcomas, codes for the human tumor antigen HOM-MEL-40." Cancer Res**56**(20): 4766-4772.
- Tuyaerts, S., J. L. Aerts, J. Corthals, B. Neyns, C. Heirman, K. Breckpot, K. Thielemans and A. Bonehill (2007). "Current approaches in dendritic cell generation and future implications for cancer immunotherapy." Cancer Immunol Immunother**56**(10): 1513-1537.
- Uyttenhove, C., L. Pilotte, I. Theate, V. Stroobant, D. Colau, N. Parmentier, T. Boon and B. J. Van den Eynde (2003). "Evidence for a tumoral immune resistance mechanism based on tryptophan degradation by indoleamine 2,3-dioxygenase." Nat Med**9**(10): 1269-1274.
- Uzzan, B., P. Nicolas, M. Cucherat and G. Y. Perret (2004). "Microvessel density as a prognostic factor in women with breast cancer: a systematic review of the literature and meta-analysis." Cancer Res**64**(9): 2941-2955.
- van den Berg, T. K., J. A. Yoder and G. W. Litman (2004). "On the origins of adaptive immunity: innate immune receptors join the tale." Trends Immunol**25**(1): 11-16.

Van Der Bruggen, P., Y. Zhang, P. Chaux, V. Stroobant, C. Panichelli, E. S. Schultz, J. Chapiro, B. J. Van Den Eynde, F. Brasseur and T. Boon (2002). "Tumor-specific shared antigenic peptides recognized by human T cells." Immunol Rev**188**: 51-64.

van der Burg, S. H. and C. J. Melief (2011). "Therapeutic vaccination against human papilloma virus induced malignancies." Curr Opin Immunol**23**(2): 252-257.

van Kasteren, S. I., H. Overkleeft, H. Ovaa and J. Neefjes (2014). "Chemical biology of antigen presentation by MHC molecules." Curr Opin Immunol**26**: 21-31.

Verdijk, P., E. H. Aarntzen, W. J. Lesterhuis, A. C. Boullart, E. Kok, M. M. van Rossum, S. Strijk, F. Eijckeler, J. J. Bonenkamp, J. F. Jacobs, W. Blokx, J. H. Vankrieken, I. Joosten, O. C. Boerman, W. J. Oyen, G. Adema, C. J. Punt, C. G. Figdor and I. J. de Vries (2009). "Limited amounts of dendritic cells migrate into the T-cell area of lymph nodes but have high immune activating potential in melanoma patients." Clin Cancer Res**15**(7): 2531-2540.

Verdijk, P., E. H. Aarntzen, C. J. Punt, I. J. de Vries and C. G. Figdor (2008). "Maximizing dendritic cell migration in cancer immunotherapy." Expert Opin Biol Ther**8**(7): 865-874.

Vigetti, D., M. Ori, M. Viola, A. Genasetti, E. Karousou, M. Rizzi, F. Pallotti, I. Nardi, V. C. Hascall, G. De Luca and A. Passi (2006). "Molecular cloning and characterization of UDP-glucose dehydrogenase from the amphibian *Xenopus laevis* and its involvement in hyaluronan synthesis." J Biol Chem**281**(12): 8254-8263.

Vilar, R. E., D. Ghael, M. Li, D. D. Bhagat, L. M. Arrigo, M. K. Cowman, H. S. Dweck and L. Rosenfeld (1997). "Nitric oxide degradation of heparin and heparan sulphate." Biochem J**324** (Pt 2): 473-479.

Villadangos, J. A. (2001). "Presentation of antigens by MHC class II molecules: getting the most out of them." Mol Immunol**38**(5): 329-346.

Visintin, A., A. Mazzoni, J. H. Spitzer, D. H. Wyllie, S. K. Dower and D. M. Segal (2001). "Regulation of Toll-like receptors in human monocytes and dendritic cells." J Immunol**166**(1): 249-255.

Voelcker, V., C. Gebhardt, M. Aeverbeck, A. Saalbach, V. Wolf, F. Weih, J. Sleeman, U. Anderegg and J. Simon (2008). "Hyaluronan fragments induce cytokine and metalloprotease upregulation in human melanoma cells in part by signalling via TLR4." Exp Dermatol**17**(2): 100-107.

Volpi, N., J. Schiller, R. Stern and L. Soltes (2009). "Role, metabolism, chemical modifications and applications of hyaluronan." Curr Med Chem**16**(14): 1718-1745.

Vonderheide, R. H., D. L. Bajor, R. Winograd, R. A. Evans, L. J. Bayne and G. L. Beatty (2013). "CD40 immunotherapy for pancreatic cancer." Cancer Immunol Immunother**62**(5): 949-954.

Vonderheide, R. H. and K. L. Nathanson (2013). "Immunotherapy at large: the road to personalized cancer vaccines." Nat Med**19**(9): 1098-1100.

- Weigel, P. H. and P. L. DeAngelis (2007). "Hyaluronan synthases: a decade-plus of novel glycosyltransferases." J Biol Chem**282**(51): 36777-36781.
- Weiss, J. M., C. Allen, R. Shivakumar, S. Feller, L. H. Li and L. N. Liu (2005). "Efficient responses in a murine renal tumor model by electroloading dendritic cells with whole-tumor lysate." J Immunother**28**(6): 542-550.
- Weiss, J. M., P. R. Pfau, E. S. O'Connor, J. King, N. LoConte, G. Kennedy and M. A. Smith (2011). "Mortality by stage for right- versus left-sided colon cancer: analysis of surveillance, epidemiology, and end results--Medicare data." J Clin Oncol**29**(33): 4401-4409.
- Wielenga, V. J., K. H. Heider, G. J. Offerhaus, G. R. Adolf, F. M. van den Berg, H. Ponta, P. Herrlich and S. T. Pals (1993). "Expression of CD44 variant proteins in human colorectal cancer is related to tumor progression." Cancer Res**53**(20): 4754-4756.
- Williams, A., C. A. Peh and T. Elliott (2002). "The cell biology of MHC class I antigen presentation." Tissue Antigens**59**(1): 3-17.
- Win, S. J., D. G. McMillan, F. Errington-Mais, V. K. Ward, S. L. Young, M. A. Baird and A. A. Melcher (2012). "Enhancing the immunogenicity of tumour lysate-loaded dendritic cell vaccines by conjugation to virus-like particles." Br J Cancer**106**(1): 92-98.
- Wolf, D., J. Schumann, K. Koerber, A. K. Kiemer, A. M. Vollmar, G. Sass, T. Papadopoulos, R. Bang, S. D. Klein, B. Brune and G. Tiegs (2001). "Low-molecular-weight hyaluronic acid induces nuclear factor-kappaB-dependent resistance against tumor necrosis factor alpha-mediated liver injury in mice." Hepatology**34**(3): 535-547.
- Wolfel, T., M. Hauer, J. Schneider, M. Serrano, C. Wolfel, E. Klehmann-Hieb, E. De Plaen, T. Hankeln, K. H. Meyer zum Buschenfelde and D. Beach (1995). "A p16INK4a-insensitive CDK4 mutant targeted by cytolytic T lymphocytes in a human melanoma." Science**269**(5228): 1281-1284.
- Wong, G. S. and A. K. Rustgi (2013). "Matricellular proteins: priming the tumour microenvironment for cancer development and metastasis." Br J Cancer**108**(4): 755-761.
- Xie, K. (2001). "Interleukin-8 and human cancer biology." Cytokine Growth Factor Rev**12**(4): 375-391.
- Xing, R. D., S. M. Chang, J. H. Li, H. Li and Z. X. Han (2008). "Serum hyaluronan levels in oral cancer patients." Chin Med J (Engl)**121**(4): 327-330.
- Xu, H., J. R. Edwards, O. Espinosa, S. Banerji, D. G. Jackson and N. A. Athanasou (2004). "Expression of a lymphatic endothelial cell marker in benign and malignant vascular tumors." Hum Pathol**35**(7): 857-861.
- Xu, X. M., Y. Chen, J. Chen, S. Yang, F. Gao, C. B. Underhill, K. Creswell and L. Zhang (2003). "A peptide with three hyaluronan binding motifs inhibits tumor growth and induces apoptosis." Cancer Res**63**(18): 5685-5690.

Yamada, Y., N. Itano, H. Narimatsu, T. Kudo, K. Morozumi, S. Hirohashi, A. Ochiai, M. Ueda and K. Kimata (2004). "Elevated transcript level of hyaluronan synthase1 gene correlates with poor prognosis of human colon cancer." Clin Exp Metastasis**21**(1): 57-63.

Yamashita, M., T. Ogawa, X. Zhang, N. Hanamura, Y. Kashikura, M. Takamura, M. Yoneda and T. Shiraishi (2012). "Role of stromal myofibroblasts in invasive breast cancer: stromal expression of alpha-smooth muscle actin correlates with worse clinical outcome." Breast Cancer**19**(2): 170-176.

Yamawaki, H., S. Hirohata, T. Miyoshi, K. Takahashi, H. Ogawa, R. Shinohata, K. Demircan, S. Kusachi, K. Yamamoto and Y. Ninomiya (2009). "Hyaluronan receptors involved in cytokine induction in monocytes." Glycobiology**19**(1): 83-92.

Yanofsky, V. R., H. Mitsui, D. Felsen and J. A. Carucci (2013). "Understanding dendritic cells and their role in cutaneous carcinoma and cancer immunotherapy." Clin Dev Immunol**2013**: 624123.

Yasuda, M., K. Nakano, K. Yasumoto and Y. Tanaka (2002). "CD44: functional relevance to inflammation and malignancy." Histol Histopathol**17**(3): 945-950.

Ye, P., F. H. Rodriguez, S. Kanaly, K. L. Stocking, J. Schurr, P. Schwarzenberger, P. Oliver, W. Huang, P. Zhang, J. Zhang, J. E. Shellito, G. J. Bagby, S. Nelson, K. Charrier, J. J. Peschon and J. K. Kolls (2001). "Requirement of interleukin 17 receptor signaling for lung CXC chemokine and granulocyte colony-stimulating factor expression, neutrophil recruitment, and host defense." J Exp Med**194**(4): 519-527.

Yoshikawa, T., N. Okada, A. Oda, K. Matsuo, Y. Mukai, Y. Yoshioka, T. Akagi, M. Akashi and S. Nakagawa (2008). "Development of amphiphilic gamma-PGA-nanoparticle based tumor vaccine: potential of the nanoparticulate cytosolic protein delivery carrier." Biochem Biophys Res Commun**366**(2): 408-413.

Yoshimura, A., T. Naka and M. Kubo (2007). "SOCS proteins, cytokine signalling and immune regulation." Nat Rev Immunol**7**(6): 454-465.

Yotnda, P., H. Firat, F. Garcia-Pons, Z. Garcia, G. Gourru, J. P. Vernant, F. A. Lemonnier, V. Leblond and P. Langlade-Demoyen (1998). "Cytotoxic T cell response against the chimeric p210 BCR-ABL protein in patients with chronic myelogenous leukemia." J Clin Invest**101**(10): 2290-2296.

Yotnda, P., F. Garcia, M. Peuchmaur, B. Grandchamp, M. Duval, F. Lemonnier, E. Vilmer and P. Langlade-Demoyen (1998). "Cytotoxic T cell response against the chimeric ETV6-AML1 protein in childhood acute lymphoblastic leukemia." J Clin Invest**102**(2): 455-462.

Yu, Q., B. P. Toole and I. Stamenkovic (1997). "Induction of apoptosis of metastatic mammary carcinoma cells in vivo by disruption of tumor cell surface CD44 function." J Exp Med**186**(12): 1985-1996.

Zeng, C., B. P. Toole, S. D. Kinney, J. W. Kuo and I. Stamenkovic (1998). "Inhibition of tumor growth in vivo by hyaluronan oligomers." Int J Cancer**77**(3): 396-401.

Zhang, B. C., J. Gao, J. Wang, Z. G. Rao, B. C. Wang and J. F. Gao (2011). "Tumor-associated macrophages infiltration is associated with peritumoral lymphangiogenesis and poor prognosis in lung adenocarcinoma." Med Oncol**28**(4): 1447-1452.

Zhang, W., L. Wang, D. Zhou, Q. Cui, D. Zhao and Y. Wu (2011). "Expression of tumor-associated macrophages and vascular endothelial growth factor correlates with poor prognosis of peripheral T-cell lymphoma, not otherwise specified." Leuk Lymphoma**52**(1): 46-52.

Zhang, Y., A. A. Thant, K. Machida, Y. Ichigotani, Y. Naito, Y. Hiraiwa, T. Senga, Y. Sohara, S. Matsuda and M. Hamaguchi (2002). "Hyaluronan-CD44s signaling regulates matrix metalloproteinase-2 secretion in a human lung carcinoma cell line QG90." Cancer Res**62**(14): 3962-3965.

Zheng, Y. W., R. M. Li, X. W. Zhang and X. B. Ren (2013). "Current adoptive immunotherapy in non-small cell lung cancer and potential influence of therapy outcome." Cancer Invest**31**(3): 197-205.

Zheng, Z., S. Katoh, Q. He, K. Oritani, K. Miyake, J. Lesley, R. Hyman, A. Hamik, R. M. Parkhouse, A. G. Farr and et al. (1995). "Monoclonal antibodies to CD44 and their influence on hyaluronan recognition." J Cell Biol**130**(2): 485-495.

Zhou, B., J. A. Weigel, A. Saxena and P. H. Weigel (2002). "Molecular cloning and functional expression of the rat 175-kDa hyaluronan receptor for endocytosis." Mol Biol Cell**13**(8): 2853-2868.

Zou, G. M. and Y. K. Tam (2002). "Cytokines in the generation and maturation of dendritic cells: recent advances." Eur Cytokine Netw**13**(2): 186-199.

Zou, W. (2005). "Immunosuppressive networks in the tumour environment and their therapeutic relevance." Nat Rev Cancer**5**(4): 263-274.