



# **Activación de respuesta inmune innata a partir de la inducción de muerte tumoral inmunogénica**

**Alejandra del Pilar Infante Cruz**

Universidad Nacional de Colombia  
Facultad de Ciencias.  
Maestría en Microbiología  
Bogotá, Colombia  
2016



# **Activación de Respuesta inmune innata a partir de la inducción de Muerte Tumoral Inmunogénica**

**Alejandra del Pilar Infante Cruz**

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

Director de tesis, Profesor:

**CARLOS A. PARRA LÓPEZ M.D, PhD.**  
Universidad Nacional de Colombia, Facultad de Medicina,  
Departamento de Microbiología

Línea de Investigación:

Biología Celular

Grupo de Investigación:

Inmunología y Medicina Traslacional COL0100636

Universidad Nacional de Colombia Facultad de Ciencias.

Maestría en Microbiología

Bogotá, Colombia

2016

“No te rindas que la vida es eso,  
continuar el viaje,  
perseguir tus sueños,  
destrabar el tiempo,  
correr los escombros y destapar el cielo.”  
Mario Benedetti

## Agradecimientos

Quiero agradecer a Dios. Quien me carga en sus brazos, alienta mis pasos, me llena de paz y miel, “sale a jugar cuando me viene a ver y me deja ganar”.

A mis abuelos por darme mis padres a quienes agradezco infinitamente por su educación, AMOR y por su paciencia, quienes me dieron y me dan una vida de felicidad a pesar de la enfermedad. A mi madre por exigirme ser una persona con méritos académicos, por darme tanta ternura y risas. A mi padre por enseñarme la bondad por los animales, por enseñarme la felicidad de BAILAR y por qué no decirlo a cuidar de mi apariencia física.

A mi novio por recordarme en momentos difíciles que soy una persona capaz, inteligente y competente. Por hacerme sentir especial y amada, por acompañarme en mis decisiones, porque ama el arte de bailar como yo y me enseña la creatividad y la belleza al cocinar un plato.

A mi perrita Belén y mis gatitos Flora, Nube y Mocos por enseñarme que en esta vida hay algo más, porque los animales son alguien y no algo, por mostrarme que la felicidad esta en recibir una muestra de amor y gratitud de ellos y que una de mis funciones en este mundo es cuidarlos, ayudarlos y defenderlos de la horrible humanidad.

A la Universidad Nacional de Colombia y al Posgrado en Microbiología especialmente a Socorrito y a la profe Martha quienes con su paciencia me ayudaron en gran medida. A la facultad de Medicina donde pasé la mayor parte del tiempo de mi Maestría. Gracias a la coordinadora de Equipos Comunes Yolanda Cárdenas, quien permite con su excelente trabajo que todo funcione perfectamente.

A mis compañeros de laboratorio David Bernal quien me guió académicamente, me enseñó técnicas de laboratorio y me escuchó en momentos de angustia, Anamaria Morales (y sus anexos) quien con su valiosa amistad y hermosa energía me hizo sonreír y reír a carcajadas entre los análisis de laboratorio, a Dinais Lozano, Mauren Ortiz, Nicolás Lalinde y Manuela Llanos por sus sutiles ayudas tan valiosas mis “vecinas” de laboratorio en especial a la Doctora Ximena Bonilla (te quiero my doctor) y Paola Ortiz quienes me gufaron con algunos experimentos con una increíble paciencia.

A mi compañerito de maestría Edu del Pilar por apoyarme y estar pendiente; al Doctor Chaparro por su apoyo económico al brindarme un contrato y permitirme trabajar en los horarios que me permitía mi tesis y por ser mi apoyo emocional en algunas oportunidades.

A las entidades co-financiadoras de distintos proyectos que hicieron posible el desarrollo de mi trabajo de tesis: a la Universidad Nacional por la co-financiación de los proyectos HERMES: Códigos: 33290; 33317; 32181; 22944; 21275; 19058; 18458; 14976; 11748. A la Fundación Salud de los Andes por permitir incluir mi trabajo de tesis como parte de los proyectos desarrollados en el marco del proyecto TEBICA y por el apoyo financiero que me brindó en los meses previos a la sustentación de mi tesis.

Al INC (Dr Sanchez, Kenicita y Adri) por permitirme ausentarme temporalmente, apoyar mis tareas y culminar mi tesis. A Mile Hg por leerme, corregirme y levantarme con tanto amor y paciencia (Te quiero baby).

Al Doctor Carlos Parra quien con su paciencia me acogió en su grupo, confió en mí a pesar de mis momentos de crisis existencial. Es una excelente persona, un científico brillante e impecable, me enseñó a ser cuidadosa con mi trabajo, disciplinada, puntual, me motivó a su manera para mostrar siempre excelencia, es una persona íntegra, honesta quien me hizo muchos regaños que me hicieron valorar lo que me da la vida, en este caso la oportunidad de trabajar con uno de los mejores científicos inmunólogos del país, la oportunidad de pertenecer a un grupo de muy alto nivel y sobre todo la oportunidad de sentirme respaldada por un Maestro como lo es el Dr. Carlos Parra a quien aprecio mucho.

Y a todas las personas que ayudaron a culminar mi anhelada tesis. Muchas Gracias.

## Resumen

Ciertos regímenes de quimioterapia y radioterapia inducen en células tumorales Muerte Celular Inmunogénica (MCI) la cual contribuye al control de tumores vía activación de Linfocitos T CD8<sup>+</sup> anti-tumorales (CTLs). Marcadores característicos de MCI son la secreción de HMGB-1 y ATP, expresión de Anexina V (fosfatidil serina) y Calreticulina (CRT) en la superficie de células apoptóticas, lo cual promueve la maduración de células dendríticas (DCs) que estimulan la activación de CTLs. Este trabajo se orientó en parte a la implementación de un sistema de tamizaje in vitro de células tumorales tratadas con diferentes agentes anti-tumorales que permita identificar agentes que induzcan MCI en células tumorales con el fin de investigar en un futuro su posible uso para la inmuno-terapia del cáncer. Para este propósito, líneas tumorales (REH, CRL2338 (Her2/neu<sup>+++</sup>) y KATO III) fueron tratadas con distintos agentes comúnmente usados en terapia antitumoral (Carboplatino, Gemcitabina, Doxorubicina, Oxaliplatino, Ciclofosfamida y Paclitaxel). Luego de caracterizar a nivel celular el tipo de muerte inducido por estos agentes en condiciones de tiempo y concentración definidas, la capacidad de las células tumorales tratadas de promover las funciones de DCs humanas como APCs profesionales incluida su capacidad para estimular eficientemente la expansión de CTLs fue examinada. Los resultados obtenidos utilizando nuestro sistema de tamizaje in vitro de células tumorales tratadas con diferentes agentes muestran que células tumorales tratadas in vitro con distintos agentes anti-tumorales exhiben diferente grado de susceptibilidad a la muerte celular y experimentan en diferente grado: (i) activación de las Caspasas 3,7 y 8; (ii) alteración del estatus del potencial de membrana mitocondrial; (iii) afectación del ciclo celular; (iv) estrés de retículo endoplásmico; (v) expresión de marcadores de MCI como: Anexina V, CRT, HMGB-1 y ATP y otros probablemente asociados a este tipo de muerte como ROS, NF- $\kappa$ B, COX-2, PPAR- $\gamma$ . La evaluación del reconocimiento inmune de células tumorales tratadas mostro en general un importante papel de la MCI en la activación tanto del sistema inmune innato como adaptativo evidenciado por la capacidad de células tumorales tratadas de favorecer en DCs distintas funciones propias de APCs profesionales como co-estimulación, fagocitosis, “homing”, producción de citoquinas pro-inflamatorias y presentación cruzada de antígenos a los Linfocitos T CD8<sup>+</sup> además de estimular la activación y expansión de Linfocitos T CD8 específicos para antígenos tumorales. Por lo anterior, se concluye que la inducción de MCI in vitro en células tumorales emerge como una herramienta útil para la selección de células tumorales como posibles vacunas contra diferentes tumores que estimulen eficientemente las funciones como APCs de DCs y la activación de CTLs antitumorales.

# Tabla de Contenido

<b>Introducción</b> .....	<b>- 16 -</b>
<b>Objetivos</b> .....	<b>- 20 -</b>
<b>Objetivo General</b> .....	<b>- 20 -</b>
<b>Objetivos Específicos</b> .....	<b>- 20 -</b>
<b>1 MARCO TEORICO</b> .....	<b>- 21 -</b>
1.1 Respuesta inmune anti-tumoral.....	- 21 -
1.2 Muerte celular inmunogénica.....	- 21 -
1.2.1 Caracterización molecular.....	- 22 -
1.3 Papel de células presentadoras de antígeno en respuesta a MCI de las células tumorales. -	25 -
1.4 Células dendríticas y su rol en el desarrollo de vacunas. ....	- 27 -
1.5 Efecto de los quimioterapéuticos de uso común en la respuesta inmune.....	- 28 -
<b>2 MATERIALES Y METODOS.</b> .....	<b>- 31 -</b>
2.1 Materiales.....	- 33 -
2.1.1 Líneas celulares.....	- 33 -
2.1.2 Cultivos celulares.....	- 33 -
2.1.2.1 Medios de cultivo:.....	- 33 -
2.1.3 Fármacos de quimioterapia evaluados .....	- 34 -
2.1.4 Reactivos.....	- 34 -
2.1.5 Equipos y software.....	- 34 -
<b>3 ANÁLISIS ESTADÍSTICOS</b> .....	<b>- 35 -</b>
<b>4 RESULTADOS</b> .....	<b>- 36 -</b>
4.1 Inducción de muerte celular in vitro. ....	- 36 -
4.1.1 Evaluación de crecimiento de células tumorales en cultivo.....	- 36 -
4.1.2 Efecto de los fármacos evaluados en la viabilidad de las líneas tumorales. ....	- 37 -
4.1.2.1 Citotoxicidad de los agentes de quimioterapia sobre las células REH, CRL2338 y KATO III. ....	- 37 -
4.1.3 Las líneas tumorales experimentan diferente grado de alteración de la viabilidad celular luego del tratamiento con distintos fármacos anti-tumorales.....	- 38 -
4.1.3.1 Efecto sobre la viabilidad celular.....	- 38 -
4.1.3.2 Alteración del potencial de membrana mitocondrial. ....	- 40 -
4.1.3.3 Efectos sobre el ciclo celular en células REH.....	- 41 -
4.1.3.4 Efectos sobre la inducción de caspasas 3, 7 y 8 en células REH y CRL2338. -	43 -
4.1.3.5 El Paclitaxel modula la expresión de moléculas pro- y anti-apotóticas en células REH. -	44 -

4.1.3.6	Oxaliplatino y Paclitaxel inducen estrés de retículo endoplasmático en células REH. - 44 -
4.1.4	Agentes quimioterapéuticos inducen la expresión de DAMPs en células REH, CRL2338 y KATO III. .... - 45 -
4.1.4.1	Las células AQUA <sup>+</sup> muestran predominio de expresión de DAMPS..... - 48 -
4.1.4.2	Las células no viables provenientes de separación por gradiente de densidad exponen DAMPs en mayor proporción que las células viables. .... - 52 -
4.1.4.3	Rendimiento de la obtención por “Sorting Celular” de fracciones celulares CRT <sup>+</sup> /Anexina V <sup>+</sup> de células REH tratadas con Oxaliplatino..... - 54 -
4.2	Las células tumorales tratadas con diferentes agentes anti-tumorales favorecen el desempeño de las DCs como células presentadoras de antígeno profesionales. .... - 55 -
4.2.1	Las células REH tratadas con Oxaliplatino inducen la fagocitosis en iDCs. .... - 55 -
4.2.2.1	Células REH tratadas con fármacos inducen la maduración de iDCs..... - 58 -
4.2.2.2	El tratamiento con Oxaliplatino o Paclitaxel genera una fracción de células REH no viables que maduran eficientemente iDCs. .... - 60 -
4.2.2.3	Células positivas para AQUA, Anexina V y CRT inducen la maduración de iDCs. - 61 -
4.2.3	Las iDCs pulsadas con células REH tratadas con Oxaliplatino inducen la formación de conjugados de DCs+LTs y la activación de LT CD3 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup> durante una MLR ..... - 61 -
4.2.3.1	El tratamiento con Oxaliplatino genera una fracción de células REH no viables que favorecen la capacidad proliferativa de linfocitos..... - 63 -
4.2.3.2	Células tumorales muertas por la acción de agentes anti-tumorales inducen la presentación cruzada de antígenos en DCs de origen mielóide. .... - 64 -
<b>5</b>	<b>DISCUSIÓN ..... - 67 -</b>
<b>6</b>	<b>BIBLIOGRAFIA..... - 72 -</b>
<b>7</b>	<b>Anexos ..... - 79 -</b>
7.1	Anexo 1. Cultivos Celulares ..... - 79 -
7.1.1	Anticuerpos, enzimas y colorantes utilizados. .... - 79 -
7.1.2	Tasa de crecimiento..... - 81 -
7.1.2.1	Conteo celular y evaluación de viabilidad por exclusión del azul de tripán. .. - 81 -
7.1.2.2	Cálculo de tiempo de duplicación. .... - 82 -
7.2	Anexo 2. Determinación de la dosis letal 50 (IC50) de fármacos en células REH, CRL2338 y KATOIII. .... - 83 -
7.2.1	Aplicación de tratamientos..... - 83 -
7.2.2	Evaluación de viabilidad por MTT. .... - 83 -
7.3	Anexo 3. Evaluación de viabilidad por citometría de flujo..... - 85 -
7.4	Anexo 4. Caracterización molecular del tipo de muerte inducida por cada fármaco.. - 85 -

7.4.1	Detección de fosfatidilserina en la superficie celular mediante la unión a Anexina V.	- 86 -
7.4.2	Cuantificación de la activación de caspasas 3, 7 y 8.....	- 86 -
7.4.3	Análisis del efecto de los fármacos sobre las fases del ciclo celular. ....	- 86 -
7.4.4	Evaluación del potencial de membrana mitocondrial en células tratadas con fármacos.-	87 -
7.4.5	Evaluación de moléculas asociadas a muerte celular y estrés oxidativo.....	- 87 -
7.5	Anexo 5. Caracterización de la expresión de moléculas características de MCI (DAMPs).....	- 88 -
7.6	Anexo 6. Caracterización y purificación de la población celular con expresión de DAMPs.....	- 88 -
7.7	Anexo 7. Evaluación de inducción de fagocitosis por parte de células REH. ....	- 90 -
7.8	Anexo 8. Caracterización del fenotipo de maduración en DCs pulsadas con células tumorales.....	- 91 -
7.8.1	Evaluación de maduración de DCs pulsadas con células REH y CRL2338 tratadas con las IC50 de diferentes fármacos. ....	- 92 -
7.8.2	Evaluación de maduración con fracciones (viables y no viables) de células REH y CRL2338 tratadas. ....	- 92 -
7.8.3	Caracterización de marcadores de maduración en iDCs pulsadas con células REH con expresión de DAMPs purificadas por sorting celular.....	- 93 -
7.9	Anexo 9. Evaluación de activación, proliferación y respuesta de LT inducida por iDC maduras luego de fagocitar células tumorales tratadas con Oxaliplatino.....	- 94 -
7.9.1	Caracterización de formación de conjugados de DCs+LTs durante una reacción mixta de linfocitos (MLR). ....	- 94 -
7.9.2	Reacción Mixta de Linfocitos (MLR). Presentación alogénica de antígenos por DCs pulsadas con REH tratadas.....	- 95 -
7.10	Anexo 10. Evaluación de presentación cruzada de antígenos y estimulación de Linfocitos T CD8+ efectoros inducida por DCs co-cultivadas con células CRL2338 tratadas con Oxaliplatino.....	- 96 -
7.11	Anexo 11. Maduración de DCs Inducida por el Co-cultivo de iDCs con Células CRL2338 Tratadas con Diferentes Inductores de Muerte Celular.....	- 98 -

## Lista de Figuras

Figura 1: Vía de señalización para la exposición de CRT a la superficie de la célula en respuesta a inductores de MCI.....	- 23 -
Figura 2: Productos de la muerte celular inmunogénica..	- 25 -
Figura 3. Diseño experimental. ....	- 31 -
Figura 4. Dinámica de crecimiento de las líneas tumorales REH, CRL2338 y KATO III en cultivo.....	- 36 -
Figura 5. Diagrama de puntos representativo del efecto de los fármacos sobre la viabilidad en células REH.....	- 39 -
Figura 6. Evaluación de alteración del potencial de membrana mitocondrial por quimioterapéuticos.....	- 40 -
Figura 7. Distribución de células REH en diferentes fases del ciclo celular luego del tratamiento con diferentes fármacos.....	- 42 -
Figura 8. Diagrama explicativo del análisis por citometría de flujo de la activación de caspasas 3, 7 y 8 en células REH tratadas con Oxaliplatino.....	- 43 -
Figura 9. Expresión de moléculas asociadas a la inducción de apoptosis y a estrés celular en células REH tratadas con Paclitaxel y Oxaliplatino.....	- 45 -
Figura 10. . Expresión de DAMPs en células REH tratadas con diferentes fármacos..	- 47 -
Figura 11. Las células REH secretan ATP cuando son tratadas con agentes quimioterapéuticos.-	47 -
Figura 12. Análisis de la expresión de DAMPs (Anexina, CRT y HMGB-1) en las fracciones de células REH AQUA <sup>-</sup> y AQUA <sup>+</sup> generadas luego del tratamiento con Oxaliplatino.....	- 49 -
Figura 13. Los DAMPs se expresan predominantemente en células AQUA <sup>+</sup> .....	- 50 -
Figura 14. Las células no viables provenientes de separación por gradiente de densidad exponen DAMPs en mayor proporción que las células viables.....	- 52 -
Figura 15. Expresión de DAMPs en fracciones de células viables y no viables obtenidas por FH.-	53 -
Figura 16. Fracciones celulares CRT/Anexina V de células REH tratadas con Oxaliplatino.....	- 55 -
Figura 17. Inducción de fagocitosis en iDCs por células REH tratadas con Oxaliplatino..	- 56 -
Figura 18. Cinética de la capacidad fagocítica de iDCs y DCs co-cultivadas con células REH tratadas con Oxaliplatino.....	- 58 -
Figura 19. Inducción de maduración de iDCs por parte de células REH tratadas con diferentes fármacos.....	- 59 -
Figura 20. Evaluación de la maduración de iDCs por fracciones de células viables y no viables obtenidas por FH.....	- 60 -
Figura 21: Evaluación del fenotipo de maduración de iDCs pulsadas con células AQUA <sup>+</sup> , Anexina V <sup>+</sup> y CRT <sup>+</sup> y células AQUA <sup>+</sup> , Anexina V y CRT <sup>-</sup> .	- 61 -
Figura 22. Diagrama explicativo del análisis por FC de formación de conjugados (DCs +LT) y activación de LT durante una MLR..	- 62 -
Figura 23. Evaluación de inducción de proliferación de linfocitos por células REH tratadas con Oxaliplatino.....	- 64 -
Figura 24. Respuesta específica de LT CD8 a un péptido de Her2/neu inducida por iDCs pulsadas con células CRL2338 viables o no viables luego del tratamiento con Oxaliplatino..	- 65 -
Figura 25. Distribución de las células tetrámero-positivo específicas para el péptido KIFGSLAFL en cuatro sub-poblaciones de LT CD8 <sup>+</sup> obtenidas luego de co-cultivo de PBMCs y DCs-con fracciones de células CRL2338 tratadas con Oxaliplatino viables o no viables. ....	- 66 -
Figura 26. Diagrama resumen de resultados..	- 71 -

## Lista de tablas

Tabla 1. Fármacos evaluados. ....	- 34 -
Tabla 2. Actividad citotóxica de fármacos sobre las células REH y, CRL2338 y KATOIII, determinada por la técnica MTT después de tratamiento .....	- 37 -
Tabla 3. Los fármacos anti-tumorales evaluados disminuyen la viabilidad celular al alterar la integridad de la membrana celular en las tres líneas valoradas. ....	- 39 -
Tabla 4. Alteración del potencial de membrana mitocondrial en células REH, CRL2338 y KATO III tratadas con diferentes fármacos. ....	- 41 -
Tabla 5. Porcentaje de células REH en cada una de las fases del ciclo celular luego del ser tratadas con diferentes agentes quimioterapéuticos .....	- 42 -
Tabla 6. Porcentajes de activación de caspasas 3, 7 y 8 en células REH y CRL2338 sometidas a tratamiento con cuatro agentes quimioterapéuticos. ....	- 44 -
Tabla 7. Cuantificación de la expresión de DAMPs en células REH, CRL2338 y KATO III posterior al tratamiento con los diferentes agentes quimioterapéuticos.....	- 48 -
Tabla 8. Expresión de DAMPs en células tumorales AQUA- y AQUA +. ....	- 51 -
Tabla 9. Porcentajes de expresión de DAMPs en fracción de células viables y no viables provenientes de separación por FH.....	- 54 -
Tabla 10. Formación de conjugados y activación de LT a partir de co-cultivo de PBMCs+DCs previamente pulsadas con células REH tratadas y sin tratar con Oxaliplatino. ....	- 63 -

## Lista de tablas y figuras suplementarias

Tabla S 1. Especificaciones de anticuerpos, colorantes y enzimas usados en los procedimientos experimentales. ....	- 80 -
Tabla S 2. Cinética de concentración de células. ....	- 82 -
Tabla S 3. Concentraciones evaluadas para cada fármaco. ....	- 83 -
Tabla S 4. Marcadores fenotípicos de DCs pulsadas con células CRL 2338 tratadas. ....	- 98 -
Tabla S 5. Marcadores de fenotipo de maduración de DCs pulsadas con fracciones de CRL2338 tratadas con Oxaliplatino.....	- 99 -

Figura S 1. Diagrama explicativo de la determinación de la IC50 al tratar las líneas celulares con diferentes fármacos.. ....	- 84 -
Figura S 2. Diagrama explicativo de la caracterización molecular de la muerte inducida por cada fármaco en las tres líneas celulares. ....	- 85 -
Figura S 3. Diagrama de la caracterización de DAMPs asociados a Muerte Celular Inmunogénica (MCI). ....	- 89 -
Figura S 4. Obtención de fracciones celulares viables y no viables por gradiente de densidad. .-	89 -
Figura S 5. Diagrama del diseño experimental para el análisis de inducción de fagocitosis por parte de células REH.....	- 91 -
Figura S 6. Diagrama explicativo del análisis del fenotipo madurativo en DCs después de ser pulsadas con células tumorales tratadas.....	- 92 -
Figura S 7. Diagrama explicativo del diseño experimental para la caracterización de fenotipo madurativo de DCs a partir de co-cultivos con iDCs y fracciones de células tumorales viables y no viables.. ....	- 93 -
Figura S 8. Diagrama del diseño experimental de la caracterización de fenotipo madurativo de DCs pulsadas con células tumorales purificadas por sorting celular con expresión de DAMPs..-	94 -
Figura S 9. Diagrama del diseño experimental para la caracterización de conjugados DCs+LT...-	95 -
Figura S 10. Evaluación de proliferación de LT estimulados con DCs pulsadas con células tumorales tratadas.. ....	- 96 -
Figura S 11. Diagrama Explicativo: Subpoblaciones de Memoria y Respuesta Específica.....	- 97 -
Figura S 12. Fenotipo de DCs pulsadas con fracciones (viables o muertas) de CRL2338 tratadas con Oxaliplatino.....	- 99 -

## Lista de símbolos y abreviaturas

### A

**Ag:** Antígeno

**APCs:** Células presentadoras de antígeno.

**ATP:** Adenosin trifosfato

### C

**CARD:** dominio de reclutamiento de las caspasas

**CFSE:** carboxi-fluorescein-diacetato

**CPA:** células presentadoras de Antígeno

**CRT:** calreticulina

**CTLs:** Linfocitos T citotóxicos.

**CXCL10:** (C-X-C motif) ligand 10

### D

**DAMPs:** damage associated molecular patterns

**DCs:** Celulas Dendríticas

**DISC:** death inducing signalling complex

**DMSO:** Dimetil Sulfóxido

### E

**eIF2 $\alpha$ :** factor de iniciación de la traducción eucariota

**ER:** Retículo endoplasmático.

### F

**FAS:** proteína de membrana miembro de la familia del factor de necrosis tumoral

**FH:** Ficoll Histopaque.

**FC:** Citometría de Flujo

### G

**GM-CSF:** factor estimulador de colonias granulocíticas monocíticas

### H

**HLA:** Human Leukocyte Antigens (Antígenos Leucocitarios Humanos)

**HMGB-1:** High mobility group box-1

**HSP:** proteínas de choque térmico

### I

**IC50:** Concentración inhibitoria media.

**iDCs:** Células Dendríticas Inmaduras

**IFN:** Interferón

**IL:** Interleuquina

### L

**LRP:** receptor de lipoproteína de baja densidad

**LT-CD4+:** Linfocito T CD4+ ayudador o helper

**LT-CD8+:** Linfocito T CD8+ citotóxico

### M

**MCI:** muerte celular inmunogénica

**MHC:** Major Histocompatibility Complex (Moléculas del Complejo Mayor de Histocompatibilidad)

**MDSCs:** Células mieloides supresoras

**MTT:** 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl tetrazolium bromide

## **N**

**NF- $\kappa$ B:** factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas

**NO:** Óxido Nítrico

## **P**

**PDT:** terapia fotodinámica

**PKR:** quinasa

**PTPC:** poro mitocondrial de permeabilidad transitoria

**PS:** fosfatidilserina

**P2ET:** Fracción rica en galotaninos obtenida de *Caesalpinia spinosa*

## **R**

**RAGE:** Receptores de productos finales avanzados de la glicación)

**ROS:** especies de oxígeno reactivas

## **S**

**SFB:** Suero fetal bovino

**stDCs:** Células dendríticas maduras con coctél de maduración.

## **T**

**TRAIL:** Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand

**TLR:** Toll like receptors

**TNF:** factor de necrosis tumoral

# Introducción

El cáncer se ha posicionado como uno de los mayores problemas de salud pública de los últimos años y es responsable de millones de muertes [1]. Tradicionalmente, su historia natural se ha considerado como resultado de la acumulación de mutaciones somáticas en la progenie de una célula sana o la expresión de oncogenes que favorecen una ventaja selectiva del crecimiento de las células mutadas, traducida en una descontrolada proliferación. Dicha proliferación está acompañada de alteraciones del control del ciclo celular, resistencia a la apoptosis [2] y características del microambiente tumoral que contribuyen a la evasión de la respuesta inmune.

Día a día se intensifican no sólo las investigaciones de nuevos agentes anti-tumorales, sino modificaciones en los regímenes de administración con el objeto de lograr un mayor control de la enfermedad. Algunos regímenes persiguen el descenso del estadiaje tumoral [3] a expensas de la estimulación del sistema inmune por células tumorales muertas como consecuencia del efecto de fármacos anti-tumorales.

La evidencia experimental ha sugerido que la quimioterapia combinada con inmunoterapia podría ofrecer mayores ventajas terapéuticas en comparación con un régimen de quimioterapia como único tratamiento [4]. Lo anterior es en parte debido a que la apoptosis de células tumorales, inducida por ciertos regímenes de quimioterapia, aumenta la concentración circulante de antígenos tumorales, la capacidad fagocítica, la actividad de las células dendríticas (DCs) y el tráfico de estas células a órganos linfoides, factores que en conjunto contribuyen de manera favorable a la respuesta de Linfocitos T (LT) anti-tumorales [5, 6].

La apoptosis, en comparación con la necrosis, es un evento pobremente inmunogénico que induce tolerancia [7, 8]. Esta diferencia se debe en parte, a la capacidad intrínseca de células apoptóticas de inducir una respuesta anti-inflamatoria, mientras que la necrosis induce inflamación gracias a la liberación de señales de peligro intracelular y la maduración de células dendríticas [9, 10]. Adicionalmente, la necrosis se caracteriza por una ruptura de la membrana plasmática, mientras que la apoptosis está asociada a una serie de alteraciones sutiles en la membrana de células apoptóticas que son fagocitadas por macrófagos a través de receptores específicos que estimulan una respuesta anti-inflamatoria [11].

Algunos agentes de quimioterapia como la Doxorubicina, inducen en las células tumorales señales de translocación de moléculas como la fosfatidilserina (PS) y la calreticulina (CRT) desde adentro de la célula a la superficie y suprime los receptor CD47 [12-14], fenómenos que estimulan la fagocitosis de células apoptóticas [15]. La identificación de estos marcadores sumados a la liberación de HMGB-1 (High mobility group box-1) y ATP en células apoptóticas tumorales en respuesta a la quimioterapia, contribuyen a activar la respuesta inmune ha permitido la identificación de un nuevo concepto de muerte de tipo inmunogénica (MCI) [16, 17].

En la muerte celular inmunogénica MCI se destacan dos propiedades importantes: la exposición en la superficie celular o secreción de señales inmunogénicas de peligro DAMPs (del inglés Danger Associated Molecular Patterns) [18] y la capacidad de inducir respuesta inmune protectora mediada por linfocitos T anti-tumorales [15, 19-24]. Por lo anterior, el promover MCI en tumores se perfila como una estrategia adicional para optimizar la respuesta terapéutica al agente anti-tumoral que, concomitantemente con una reducción en la carga tumoral debido al efecto citolítico directo del fármaco sobre la célula tumoral, estimule de manera eficiente una respuesta inmune antitumoral.

Por otra parte, la inmunoterapia contra el cáncer ha ganado impulso considerable en los últimos años. El objetivo de la inmunoterapia del cáncer es activar el sistema inmunológico del paciente en contra del tumor lo cual requiere la inducción de linfocitos T anti-tumorales. Dentro de las distintas estrategias de inmunoterapia, el uso de células dendríticas (DCs) como células presentadoras de antígeno profesionales, que activan eficientemente a las células T específicas de tumores, ha sido ampliamente desarrollado.

En el contexto de la inmunoterapia del cáncer, las DCs autólogas representan el adyuvante natural más usado en ensayos clínicos de inmunoterapia [25]. Las vacunas con base en DCs se han aplicado a pacientes con diferentes tipos de cáncer. Aunque se ha observado tanto una respuesta objetiva prometedora como una respuesta de células T específicas de tumores en distintos tipos de cáncer, el éxito clínico de este tratamiento todavía se considera sub-óptimo[26]. Por esta razón el proceso de optimización de la producción de vacunas basadas en DCs continúa depurándose con miras a obtener DCs que estimulen respuestas anti-tumorales eficientes [27]

La inmunogenicidad de las células tumorales muertas usadas para suplir antígenos tumorales, es un factor de reciente atención en el uso de DCs como vacuna. Se ha demostrado en estudios preclínicos de cáncer que la metodología utilizada para preparar células tumorales que serán cargadas en DCs influye en el potencial inmunogénico in vivo de este de vacunas [28-30] Si bien es cierto que se han descritos diversas modalidades de tratamiento en este contexto, cada uno de estos tratamientos busca siempre el potenciar la inmunidad antitumoral induciendo respuestas inmunitarias contra los neo-antígenos tumorales y /o aumentando selectivamente la exposición / liberación de DAMPs que puedan madurar las DCs y otros componentes del sistema inmune innato [28, 31, 32].

La aparición del concepto de MCI podría mejorar aún más el potencial inmunogénico de las vacunas basadas en DC. Se ha señalado que las células cancerosas sometidas a MCI exhiben una excelente capacidad inmuno-estimuladora debido a la emisión de tres DAMPs que actúan como potentes señales de peligro sobre DCs [33, 34]. El primero de ellos, la calreticulina (ecto-CRT) – una señal "comerme" expuesta en superficie celular; el segundo, la señal ATP de "encuéntrame" y el tercero, la liberación de la núcleo-proteína HMGB1[34].

En modelos de cáncer en ratones, se ha comprobado que las células cancerígenas que experimentan MCI actúan como potentes vacunas inductoras de una respuesta celular Th1 contra el cáncer, en ausencia de otro adyuvante [34, 35], pues sumado a la firma molecular de los tres

DAMPs previamente mencionados, exhiben la capacidad de rechazar tumores en ratones singénicos (del mismo tipo) después de la vacunación con células cancerosas sometidas a MCI, lo cual es un sello característico de este tipo de muerte [34].

Así las cosas, este trabajo persigue implementar un sistema que permita caracterizar a nivel *in vitro* la inducción de MCI en líneas tumorales tratadas con distintos agentes quimioterapéuticos y, a su vez, evaluar la capacidad de MCI para promover la maduración y funciones propias de las células presentadoras de antígeno profesionales en DCs humanas. Esto con el fin de explorar en fases futuras del trabajo, empleando células tumorales primarias con características de MCI obtenidas de pacientes, el posible uso combinado con DCs como vacuna autóloga para la inmunoterapia del cáncer.

## Problema

La quimioterapia, es una herramienta muy útil en el manejo terapéutico del cáncer. Los efectos anti-tumorales de ciertos regímenes de quimioterapia se explican hoy como el producto de una doble función. Por un lado se encuentra su acción citolítica directa y por el otro, la inducción de un tipo especial de muerte conocida como MCI, la cual hace que la célula tratada sea visible para el sistema inmune gracias a la expresión de una serie de marcadores específicos. De esta manera, el uso de células tumorales tratadas con inductores de MCI a nivel *in vitro*, es una nueva alternativa terapéutica en contra del cáncer al ser una preciada fuente de antígenos tumorales [25].

Si bien las vacunas soportadas en DCs representan una alternativa de inmuno-terapia en pacientes con cáncer, el éxito clínico de este tratamiento todavía se considera sub-óptimo debido en parte a la limitada disponibilidad de antígenos tumorales bien caracterizados. Por esta razón, el proceso de optimización en la producción de vacunas basadas en DCs continúa perfeccionándose con miras a obtener DCs inmuno-competentes que mejoren su eficacia clínica. En este sentido, el uso de células tumorales muertas que produzcan DAMPs, estimulen eficientemente la maduración de DCs y mejoren su capacidad como células presentadoras de antígenos, es una importante alternativa para incrementar el desempeño de DCs como fuente de vacunas que merece ser explorada.

La posibilidad de utilizar células tumorales de pacientes con cáncer en las cuales se induce MCI, demanda la implementación de un sistema de tamizaje *in vitro* - no disponible hasta ahora - de células tumorales que permita identificar agentes de quimioterapia inductores de MCI que promuevan eficientemente la maduración de DCs. Así las cosas, en este trabajo se definen los pasos de un diseño experimental orientado al tamizaje *in vitro* de dicha capacidad, con el fin de explorar a futuro, la combinación de diferentes regímenes inductores de muerte celular que potencien el poder inmunogénico de las vacunas basadas en DC.

# **Objetivos**

## **Objetivo General**

Evaluar la inducción de muerte celular inmunogénica en líneas tumorales tratadas con distintos estímulos.

## **Objetivos Específicos**

1. Inducir muerte celular en líneas tumorales mediante diferentes tratamientos.
2. Caracterizar molecularmente el tipo de muerte inducida por cada tratamiento.
3. Evaluar la capacidad de células tumorales tratadas de inducir la maduración de células dendríticas.

# 1 MARCO TEORICO

## 1.1 Respuesta inmune anti-tumoral

Tanto la respuesta inmune innata como la adaptativa responden a estímulos causados por agentes externos o agresiones de índole interna, tales como infecciones virales; o en condiciones específicas, masas tumorales malignas. Este tipo de inmunidad involucra la participación de células con capacidad de reconocer dichas alteraciones, fagocitarlas y presentarlas a los linfocitos, induciendo de esta manera una respuesta inmune adaptativa [36].

Las células presentadoras de antígeno (APCs) dejan al descubierto péptidos antigénicos tumorales que son reconocidos por los Linfocitos T a través del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) clase I o clase II. Adicionalmente, las células T se activan conjuntamente por moléculas co-estimuladoras de las células presentadoras de antígeno y linfocitos T, lo cual resulta en la proliferación de células T y la consecuente eliminación de las células tumorales [37]. No obstante, la respuesta inmune en cáncer no está correctamente regulada dado que promueve la tolerancia y evasión inmunológica, contrario a la respuesta inmune regular [37].

En consecuencia, la ciencia moderna ha enfocado sus esfuerzos en la implementación de estrategias que permitan reconocer las células tumorales como un agente extraño eliminando así la tolerancia inmunológica. Un claro ejemplo, es el empleo de compuestos naturales y virus oncolíticos, al igual que la inducción de muerte celular inmunogénica por radioterapia y quimioterapéuticos [38-41].

## 1.2 Muerte celular inmunogénica

Atendiendo al estímulo inicial de muerte celular, apoptosis, esta puede ser catalogada como inmunogénica o no inmunogénica. La no inmunogénica se refiere a la apoptósisis como un evento programado, homeostático no inflamatorio y tolerogénico, que puede ser inducido por dos vías principales: la vía extrínseca y la intrínseca. La primera, se desencadena a través de los receptores de muerte clásicos Fas (CD95/APO1) TNRF1 y TRAIL[42].

Por su parte, la vía intrínseca es activada por señales como el estrés, que provocan la translocación a la mitocondria de los miembros pro-apoptóticos de la familia Bcl-2, por ejemplo, Bax que se asocia con el complejo de poro mitocondrial de permeabilidad transitoria (MPTPC), provocando la liberación de CITO CROMO C, Smac diablo y factor inductor de apoptosis al citosol. Adicionalmente, esta unión incentiva la formación del apoptosoma, responsable de la puesta en marcha de la procaspasa 9, toda vez se asocia al dominio de reclutamiento de las caspasas (CARD) del N terminal de Apaf1. De esta manera, se da la activación en cadena de las caspasas 3, 6 y 7 [43, 44].

Resalta aquí el papel de la vía de las caspasas como responsable de los cambios morfológicos característicos de la células en proceso de apoptosis, esto es, la condensación de la cromatina, la fragmentación del ADN nucleosomal, la ruptura de la membrana nuclear, la externalización de la fosfatidilserina y la formación de cuerpos apoptóticos [45].

La muerte celular inmunogénica (MCI) involucra una gran diversidad de señales que desencadenan una respuesta inmune particular en contra de los antígenos propios de las células tumorales que han muerto de manera inmunogénica [35]. La MCI incluye cambios composicionales de la superficie celular, como la liberación de mediadores solubles, los cuales son reconocidos por receptores expresados por las DCs para estimular la presentación de antígenos tumorales a las células T. Kroemer *et al* postularon este tipo de muerte como una estrategia efectiva en la activación de mecanismos inmunológicos frente al cáncer, así como una potencial fuente de terapias anti-cáncer [35].

Partiendo de este hecho, diversos autores han descrito que células muertas bajo regímenes de MCI podrían llegar a emplearse como principio activo de vacunas autólogas, cuyo objetivo final sea estimular una respuesta inmune protectora en contra de células tumorales vivas de la misma naturaleza [19]. Esto sumado al hecho que, si la MCI ocurre in vivo, desencadena una respuesta inmune local cerca al lecho del tumor [46], la cual inhibe el crecimiento del mismo [23, 47]. Por esta razón la MCI es un mecanismo prometedor para la activación del sistema inmune contra el cáncer [23, 35, 47].

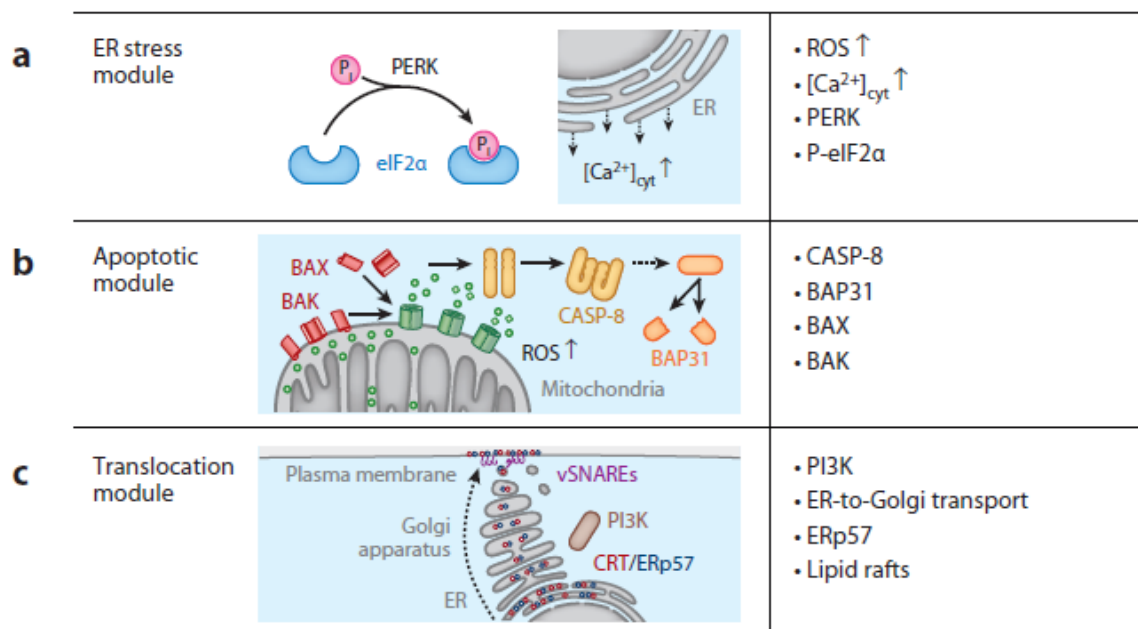
### 1.2.1 Caracterización molecular

A nivel molecular, la muerte celular inmunogénica se rige por señales bioquímicas sumamente importantes y descritas ampliamente en la literatura. Es posible nombrar aquí, los marcadores apoptóticos comúnmente conocidos, por ejemplo, la exposición de fosfatidilserina, la activación de caspasas y la despolarización mitocondrial. Adicionalmente, este tipo de muerte celular cuenta con la secreción de señales inmunogénicas clasificadas como: “**damage associated molecular patterns**” (DAMPs). A este grupo pertenecen conductas como:

- La exposición pre-apoptótica de calreticulina (CRT), HSP90 de superficie (ecto-HSP90) [35].
- La Secreción de ATP durante la fase de cuerpos apoptóticos [22].
- La liberación de la proteína no histona high-mobility group box 1 (HMGB-1) asociada a muerte celular tardía [35].
- Producción de IFN tipo I como resultado de la señalización vía TLR3[48].

En consecuencia, la MCI es obligatoriamente precedida de dos eventos. Uno de ellos, el estrés de retículo endoplasmático y el otro la autofagia. Dichos sucesos ponen en funcionamiento  $\text{NF}\kappa\beta$ , el cual induce la expresión de genes relacionados con el estrés oxidativo, obteniendo como producto final óxido nítrico sintetasa (iNOS) y ciclooxigenasa 2 (COX-2) [22, 47, 49, 50].

Al describir secuencialmente la exposición de DAMPs, se debe tener claridad que la expresión de CRT es estimulada por inductores de MCI, un ejemplo de estos, la antraciclinas u el Oxaliplatino. Su translocación, en respuesta al estrés de retículo endoplasmático, supone la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS), el aumento del Calcio citosolico, la activación de PKR-quinasa del retículo endoplasmático (ER) (PERK) y la fosforilación del factor de iniciación de la traducción eucariota (eIF2 $\alpha$ ) [35] Figura 1.



**Figura 1: Vía de señalización para la exposición de CRT a la superficie de la célula en respuesta a inductores de MCI.** Se describe el estrés de retículo donde hay un aumento de especies reactivas de oxígeno (ROS), aumento de Ca<sup>2+</sup> citosolico, activación de PERK y por ende la fosforilación de eIF2 $\alpha$  (a); seguido del clivaje de BAP31 por caspasa 8, activación de proteínas pro-apoptóticas de la familia BCL-2 (b) y la translocación de CRT (c). Tomado de [35].

Seguidamente sobreviene la proteólisis de la proteína BAP31 mediada por la caspasa 8, la activación de las proteínas pro-apoptóticas BAX y BAK; el transporte de la CRT del retículo endoplasmático al aparato de Golgi y la exocitosis de las vesículas que contienen la CRT. El proceso finaliza con la translocación a la superficie de la membrana celular de dichas sustancias [35]. Este evento depende netamente de las proteínas que integran el sistema de movilización de vesículas SNARE [49]. Este fenómeno se produce previo a que las células expongan fosfatidil serina (PS) en la cara externa de la membrana plasmática [15].

La liberación de ATP se ha identificado como una nueva señal requerida para la generación de la MCI. Se ha demostrado que esta señal actúa como signo de peligro proveniente de los tejidos dañados, convirtiéndose en uno de los más importantes quimiotractantes para monocitos [19, 51]. Otra de sus funciones incluye la maduración de DCs [52], secundaria al clivaje de las caspasas 3 y 7, al igual que la activación de la panexina 1 [53]. El ATP liberado por las células en el proceso de muerte y la autofagia, impulsa el receptor purinérgico P2XR en las DCs, estimulando no sólo la agregación del inflamosoma NLRP3-ASC-Casp1, si no, la maduración proteolítica de la caspasa 1

y la fragmentación de la pro-IL-1 $\beta$  con la consecuente liberación de la IL-1 $\beta$ . Esta es mandatorio para una eficiente movilización de LT CD8 $^+$  específicos y productores de IFN- $\gamma$  [54].

HMGB-1 es un ligando de TLR-4, liberado de manera pasiva por células muertas y activamente en los procesos pro-inflamatorios. HMGB-1 se une a su receptor RAGE (Receptores de productos finales avanzados de la glicación) [23]. Esto es una señal de peligro que promueve la toma y presentación cruzada de antígenos por parte de células dendríticas, consecuentemente activando la respuesta inmune [14]. Los niveles de expresión de HMGB-1 varían en función del tipo de tumor. Algunas células malignas expresan niveles de HMGB-1 incompatibles con la activación de TLR4 y RAGE en células inmunes [55, 56]. Yamazaki T *et al.* estudiaron células carentes de HMGB-1, utilizando siRNAs específicos, observando que la inmunogenicidad en estas células se encontraba comprometida [56].

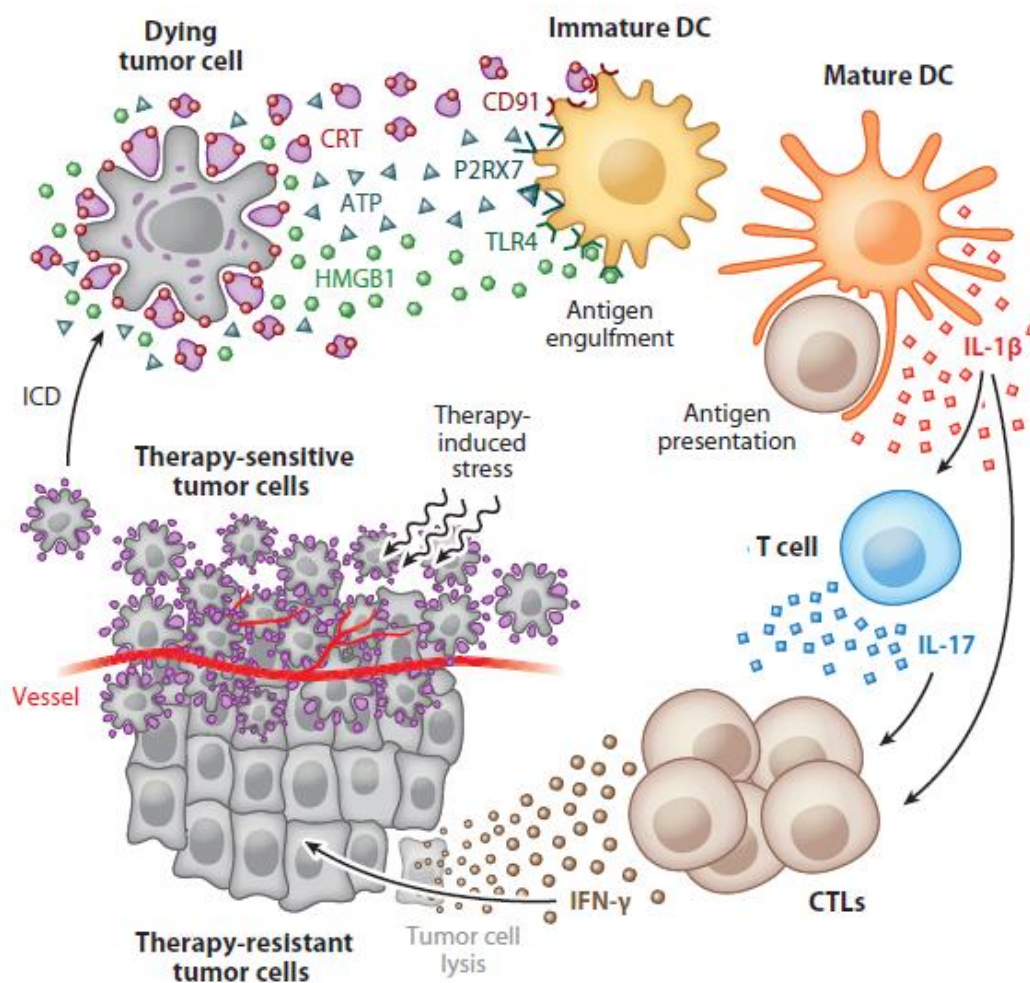
El rol de interferones tipo I en la regulación de la repuesta inmune innata y adaptativa, se ha identificado como un requerimiento en la inducción de MCI en tumores tratados con antraciclinas [48]. Sistigu A. *et al.* al indagar acerca del efecto antineoplásico de las antraciclinas en modelos animales, descubrieron que las antraciclinas estimulan la producción de interferón tipo I por parte de células malignas, una vez se da la activación del receptor Toll-like receptor 3 (TLR3). De manera tal que, al fusionarse con los receptores IFN- $\alpha$  e IFN- $\beta$  (IFNARs) de las células neoplásicas, estimulan la producción autocrina y paracrina de IFN I, resultando en la secreción de CXCL10 [48].

Es conocido que las células tumorales carentes de TLR3 o IFNARs exhiben falla quimioterapéutica a menos que el IFN I o CXCL10 se suplan artificialmente [48]. Por otra parte, la producción de INF I tiene valor predictivo en la respuesta a la quimioterapia con antraciclinas en pacientes con cáncer de seno. Esto advierte que las antraciclinas median una respuesta inmune similar a la inducida por patógenos virales [48]. Similarmente, un gran número de agonistas sintéticos de TLR3 son utilizados en combinación con agentes quimioterapéuticos, que naturalmente, no estimulan la producción de IFN I. Es el caso del polyIC12U, también conocido como rintatolimod y Ampligen<sup>TM</sup>, catalogados como inmunoestimulantes en pacientes con cáncer [57].

Es posible sugerir que la exposición de la CRT en la superficie de las células constituye una señal pre-apoptótica, que en conjunto con la movilización de HMGB-1, como una señal post-apoptótica y la secreción de ATP como señal de “encuéntrame” a la par con su función de activador de NLRP3 inflamosoma, así como la secreción de interferones tipo I por parte de células tumorales, son indispensables para la generación de respuesta inmune innata y de memoria específica [22, 58, 59]

### 1.3 Papel de células presentadoras de antígeno en respuesta a MCI de las células tumorales.

La emisión de señales inmunogénicas producto del estrés pre-mortem de retículo endoplasmático, como es la exposición de CRT y secreción de ATP, sumado a la liberación de HMGB-1, son señales reconocidas por los receptores de las DCs (CRT: CD91; HMGB-1: TLR-4 y ATP: P2RX7). Esto promueve la fagocitosis de las células tumorales que mueren vía MCI por parte de células dendríticas inmaduras (iDC), con la consecuente maduración de las mismas, la presentación de antígenos tumorales, la producción de IL-1 $\beta$  y la activación y proliferación de células T citotóxicas con la consecuente producción de IFN- $\gamma$  [35] Figura 2.



**Figura 2: Productos de la muerte celular inmunogénica.** La figura resume las características moleculares propias de la MCI, en que como resultado del estrés causado al retículo endoplasmático se exponen moléculas como CRT que van a ser captadas por el receptor CD91, además de la liberación de ATP (captado por receptores purinérgicos) y secreción de la HMGB-1 reconocido por TLR-4. Lo cual convierte a la célula que muere en una célula inmunogénica, capaz de madurar iDCs produciendo IL-1 $\beta$ , con la consecuente activación de CTLs gracias a la producción de citoquinas como IL-17 garantizando respuesta de tipo celular por CTLs. Tomado de [35].

La exposición de la CRT constituye uno de los principales puntos de control en la determinación de la inmunogenicidad de la muerte celular [35], dado que favorece la fagocitosis [60]. En condiciones homeostáticas la CRT se localiza en el retículo endoplasmático regulando la homeostasis del calcio. Sin embargo, bajo muerte celular inmunogénica, la CRT actúa como chaperona fijando la trombospondina e induciendo la adhesión focal con el receptor de lipoproteína de baja densidad (LRP) (CD91) en la célula fagocíticas. La LRP está involucrada en diferentes procesos celulares, incluyendo señales intracelulares, homeostasis de lípidos y remoción de células apoptóticas. De manera que CRT y LRP actúan como ligandos de células apoptóticas expresadas en células fagocíticas [14].

CRT estimula a las células presentadoras de antígeno, particularmente células dendríticas, a devorar eficientemente células apoptóticas, procesar sus antígenos y generar una respuesta celular en contra de los antígenos contenidos en los cuerpos apoptóticos [35]. En pacientes con leucemia mieloide aguda, la exposición de CRT se asocia con la supervivencia del paciente al ser un predictor de la respuesta de células T antitumorales [61]. En contraste, en cáncer colorrectal, la baja expresión de CRT es un factor de mal pronóstico asociado a un deficiente infiltrado de células T CD3<sup>+</sup> y T CD45RO<sup>+</sup> de memoria [62]. Esto sugiere que la expresión de CRT en la superficie de células tumorales determina la aparición de una respuesta inmune específica protectora [35].

La exposición de CRT por antraciclinas es un proceso rápido, detectable al cabo de una hora después de tratamiento. Las células tratadas con antraciclinas son fagocitadas rápidamente antes de cambios apoptóticos celulares apenas poco tiempo después del tratamiento e incitan rápidamente la inmunidad. CRT sin inductor de apoptosis no mejora la inhibición de crecimiento tumoral lo que quiere decir que determina la inmunogenicidad de muerte celular *in vivo* pero no la muerte celular *per se*. De esta manera la adición directa de Calreticulina exógena a células modificadas (CRT<sup>-/-</sup>) restaura los niveles de CRT en la superficie y restablece la habilidad de las células para ser fagocitadas por macrófagos murinos, monocitos humanos y fagocitos no profesionales [14].

Numerosa evidencia experimental propone que la terapia antitumoral no sólo tiene efecto citolítico directo en las células tumorales, sino que además tiene la capacidad de inducir respuesta inmune. Varias observaciones apoyan esta teoría. Una de ellas, es el hecho que la eficacia de la quimioterapia *in vivo* depende de la integridad funcional del receptor TLR-4 y Myd88 de las DCs, el cual reconoce moléculas de HMGB-1 provenientes de células tumorales tratadas con inductores de muerte [23]. Se ha demostrado que las células tumorales en proceso apoptótico pueden ser presentadas por las DCs a las células T *in vitro* e *in vivo* generando células T específicas de tumor. Esto ocurre únicamente cuando las DCs actúan por medio de la vía TLR-4- Myd88 [23]. Las células dendríticas son entonces, requeridas para una respuesta inmune contra las células tumorales muertas por apoptosis, debido a su capacidad para reconocer, fagocitar y procesar eficientemente células apoptóticas provenientes de tumor [35].

El reconocimiento de moléculas por las DCs es mediado por un complejo constituido por TLR-4 y CD14. TLR-4 juega un rol importante en el procesamiento y presentación de antígenos

intracelulares, así como en la activación de la vía NF- $\kappa$ B. En las DCs esta activación resulta en la liberación de citoquinas proinflamatorias como TNF, IL-1, IL-6, IL-12 y el factor estimulador de colonias granulocíticas monocíticas (GM-CSF) [23].

La expresión de proteínas de shock térmico (HSP) en la superficie de células tumorales muertas mejora el reconocimiento por parte de las células dendríticas [63], su maduración [64, 65] e incrementa la presentación cruzada eficiente de péptidos antigénicos derivados del tumor [66], ayudado por la IL-1 $\beta$  que establece una comunicación entre lo innato (inflamación) y lo adquirido (memoria) [54].

## **1.4 Células dendríticas y su rol en el desarrollo de vacunas.**

El eje de investigación en cáncer ha abordado diferentes estrategias de manejo frente a esta patología. Una de ellas, y que actualmente supone el top de tratamientos, es la inmunoterapia, enfocada a la activación de células T específicas con las células dendríticas como base inmunológica en pacientes afectados por malignidad tumoral. Las células dendríticas al ligar la inmunidad innata y la adaptativa se posiciona como el adjuvante celular predilecto en estudios de investigación en vacunas, los cuales soportan su uso gracias al aumento en el tiempo de supervivencia del individuo, además de su rara immuno-toxicidad, la no dependencia del tipo de HLA y el reducido riesgo de inducir evasión inmunológica. Prueba de esto, la aprobación de la FDA para el uso de Sipuleucel-T (Provenge) en pacientes con cáncer de próstata metastásico [67] [25].

Sin embargo, obtener resultados de este calibre exige concentrar los esfuerzos investigativos en la metodología que incentivará apropiada y efectivamente la inmunogenicidad de las células tumorales muertas que, finalmente activarán las células dendríticas presentes en una vacuna, hecho que propone la MCI como una potencial herramienta para mejorar el potencial inmunogénico de las vacunas, como ha sido demostrado en diversos estudios experimentales a nivel pre clínico [25].

En este sentido, el alcanzar fases exitosas de este tipo de vacunas involucra, adicionalmente, otros aspectos como la participación directa de DCs maduras, dado que estudios en fase experimental I y II realizados en pacientes con melanoma metastásico y cáncer de próstata, confirmaron la superioridad de DCs maduras cargadas con antígenos para provocar respuestas inmunológicas en comparación con las inmaduras, aumentando a la par la supervivencia libre de progresión, toda vez la aplicación de la vacuna se realice de manera intradérmica[25] [68].

Un estudio realizado en pacientes con melanoma comparó la vacunación intradérmica con la intranodal, encontrando que aunque el número de DCs que alcanza los nódulos linfáticos es mayor después de la vacunación intranodal, las células T específicas de melanoma son mucho más funcionales con la vacunación intradérmica [25] [68].

El tipo de tratamiento inmunogénico impacta la biología de las DCs debido a la inducción de DAMPs en las células muertas. La terapia fotodinámica y la alta presión hidrostática han

demostrado ser unos de los más prometedores mecanismos para obtener una célula tumoral de carga antigénica altamente inmunogénica para vacunas basadas en las DC [69, 70]. El primero, la PDT es un procedimiento mínimo invasivo, que conlleva a la producción de ROS en presencia de oxígeno y el segundo, aunque tradicionalmente se ha empleado como método de esterilización farmacéutica, induce la producción de ROS y ER. Para este último, el poder inmunogénico fue altamente comprobado *in vivo* en investigaciones pre clínicas de melanoma y cáncer de pulmón metastásico [25].

Por su parte, la radioterapia ha demostrado la expresión de CRT, HSP70 y HMGB1 en modelos animales. Cho *et al*, encontraron que las DCs cargadas con células cancerígenas irradiadas en pacientes con glioblastoma impactan el crecimiento del tumor y aumentan consecuentemente el promedio de supervivencia. Otros métodos tales como el shock térmico basan su poder inmunogénico en la habilidad de producir HSP60, HSP70 y HSP90, asociado además con regresión tumoral en estudios preclínicos de cáncer pancreáticos [71-73].

Es así como la MCI enfocada a vacunas de DCs aunado a otras estrategias como inhibidores de “checkpoints” u otros fármacos podría llegar a inhibir la inmunosupresión severa causada por el tumor, siendo clave para la eficacia de la inmunoterapia contra el cáncer basada en la combinación de MCI y vacunas de DCs [25].

## **1.5 Efecto de los quimioterapéuticos de uso común en la respuesta inmune.**

El manejo terapéutico anti cancerígeno incluye procedimientos quirúrgicos, así como diferentes esquemas de quimioterapia, radioterapia o inmunoterapia empleados como monoterapia o combinados entre sí. La decisión médica está sujeta tanto al tipo, grado y localización del tumor, como al estado de salud general del paciente. El uso de estos tratamientos no garantiza plenamente la eliminación de células tumorales, debido principalmente a que muchas de ellas son resistentes o bien, los tratamientos pueden ser inefectivos contra las micrometástasis o las células madre cancerígenas [60, 74].

Para que la muerte tumoral se medie inmunogénicamente, es necesario que al morir la célula emita señales que favorezcan la fagocitosis de células apoptóticas, generando una respuesta inflamatoria necesaria para activar la respuesta inmune antitumoral específica conservando tolerancia a lo propio [15]. Obeid y *et al* en 2007 sometieron células tumorales a 24 quimioterapéuticos con el objetivo de observar la habilidad de estos fármacos para estimular respuesta inmune anti cáncer *in vivo* [15], encontrando que solo unos pocos fármacos logran inducir muerte tumoral inmunogénica [34, 75-77]. Algunos de estos incluyen:

Uno de estos terapéuticos fue la Gemcitabina, usada para el tratamiento de carcinomas como Linfoma no Hodgkin, cáncer de ovario, cáncer de mama, pulmón no microcítico, páncreas y vesícula [78, 79]. Este nucleósido análogo aumenta la expresión de HLA tipo I en células cancerígenas [80, 81], optimizando la presentación cruzada de antígenos tumorales a células T CD8<sup>+</sup> [81, 82] y destruye selectivamente células mieloides supresoras (MDSCs) [83, 84].

El Oxaliplatino comúnmente usado en terapias para cáncer colorrectal y pancreático, induce aumento de moléculas HLA clase I e también inhibe STAT6, regulando la expresión de PDL2 (ligando de muerte programada), limitando así la inmunosupresión [85]. Es un agente alquilante que forma uniones con el DNA inhibiendo su replicación; su citotoxicidad no es específica de alguna fase del ciclo celular [86].

La Ciclofosfamida utilizado en tratamiento para linfoma, leucemia y tumores sólidos [80], actúa como un alquilante del DNA, que impiden la duplicación del mismo y provocan la muerte celular. Suprime las células mieloides supresoras y Tregs, e impide la producción de citoquinas inmunosupresoras como IL - 4, IL-10 e IL - 13 [87, 88], favoreciendo la producción IL - 17, promoviendo así, una respuesta antitumoral de predominio celular (células T y células NK) [89] y estimulando la expresión de Interferones tipo I, que permite la expansión de CD8 $\alpha^+$  DCs (modelo animal), que están implicadas en la presentación cruzada [90].

La Doxorubicina, usada en terapias para cáncer hematológico y cáncer sólido, estimula la proliferación de linfocitos T CD8 $^+$  específicos de tumor en nódulos linfáticos, gracias a la secreción de IL-17 e IFN $\gamma$  [46, 91]. Se trata de una antraciclina que afecta la acción de DNA y RNA polimerasas, pues inhibe la topoisomerasa II. Es usada para tratamiento de leucemia linfoblástica aguda, linfoma Hodkin y no Hodkin, cáncer de mama, neuroblastoma, sarcoma, cáncer de ovario, vejiga, tiroides y gástrico [92]

Los Taxanos como Paclitaxel, se unen a los microtubulos, interfiriendo con la mitosis, resultando en muerte celular por catástrofe mitótica [93], se ha reportado que afecta específicamente la producción de citoquinas y viabilidad en Tregs [94], además de potenciar la respuesta citotóxica por CTLs [95]. Es empleado para cáncer de ovario y pulmón [96].

Carboplatino es un agente alquilante que provoca uniones cruzadas entre las cadenas de DNA alterando la funcionalidad celular y por ende provocando muerte celular, no afecta alguna fase específica del ciclo celular. Es usado para cáncer de ovario y cáncer de pulmón no microcítico [97]

Además de quimioterapéuticos se ha reportado el uso de productos naturales como *Caesalpinia spinosa* (P2Et), la cual induce la activación de caspasas 3 y 9, movilización del CITOCROMO C, externalización de fosfatidil serina al exterior de la membrana celular, además de la expresión de marcadores característicos de MCI, como CRT y HMGB-1 y secreción de ATP en células tumorales, llevando a la generación de respuesta inmune específica [41, 98].

Diversos estudios revelaron que el uso de virus oncolíticos se basa en la administración de cepas virales no patógenas, que infectan y eliminan selectivamente las células malignas, mientras que inducen respuesta inmune específica de tumor [99-103], Esto gracias a esfuerzos dedicados al desarrollo de partículas virales con características como: i. Oncotropismo basado en la exposición de antígenos asociados a tumor (TAAs) en la superficie celular [104-108], ii. Citotoxicidad [109, 110], iii. Estimulación de respuesta inmune [111-113], iv. Inmunogenicidad limitada, basada en

estrategias para cambiar la superficie viral y de esa manera reducir el reconocimiento por el sistema inmune [114, 115], además de inducir expresión de moléculas de MCI como HMGB-1, estas características fueron demostradas en estudios realizados por Liikanen et al. en la Universidad de Helsinki, en los que se propuso que la secreción de HMGB-1 constituye un factor pronóstico así como indicador predictivo en la terapia con virus Oncolítico [116]. Hallazgos recientes demuestran que la eficacia terapéutica de la viroterapia oncolítica, es debida en cierta medida, a la producción de IFN de Tipo I, que tiene un papel central en procesos innatos de inmunidad antiviral [117, 118], además de ejercer un efecto importante en la eliminación de células malignas y la generación de respuesta adaptativa [119].

Referencia científicas sobre quimioterapéuticos de uso común y el rol que desempeñan como inductores de MCI, demuestran que la composición del infiltrado inmune tumoral cambia en respuesta a estos agentes, tal es el caso del aumento de la relación linfocitos T CD8+ sobre células T reguladoras FOXP3+, prediciendo respuestas terapéuticas favorables en cáncer de mama y cáncer colorrectal, en pacientes tratados con antraciclinas y Oxaliplatino respectivamente [120, 121]. Por su parte resultados previos han revelado que las antraciclinas son excelentes inductores de MCI en células tumorales tratadas [122]. Estas han sido usadas como vacuna terapéutica en pacientes con cáncer, obteniendo una buena respuesta clínica en los pacientes expuestos [123]. Los resultados sugieren que la respuesta clínica está relacionada con la exposición CRT, la cual es dependiente de la formación de especies de oxígeno reactivas (ROS) y el óxido nítrico [49, 124], además de la activación de la caspasa-8 [49, 125].

Otros inductores de MCI, han sido estudiados, Zappasodi *et al* [123], quienes afirman que el mecanismo de muerte inmunogénica es un prerrequisito para la eficacia de una inmunoterapia activa utilizando células tumorales muertas. Este grupo evaluó una estrategia de vacunación usando las DCs cargadas con los Ags tumorales de células muertas por apoptosis o necrosis, derivadas de tumores autólogos de pacientes con recidiva de linfoma no Hodgkin. El protocolo utilizado consistió en la exposición de las células a shock térmico y combinación de rayos  $\gamma$  y rayos ultravioleta. Como resultado, se evidenció una mayor efectividad, en comparación con la Doxorrubicina, en el proceso de translocación a la superficie de señales “eat me” (cómeme) como la Calreticulina (CRT), la liberación de HMGB-1 y ATP [123]. Dichas señales acompañaron la inducción de una respuesta clínica asociada con la activación de la respuesta inmune específica contra el tumor en 6 de los 18 participantes [126]. Este tipo de hallazgos proponen la utilidad los antígenos derivados de MCI en la construcción de vacunas anti-cáncer.

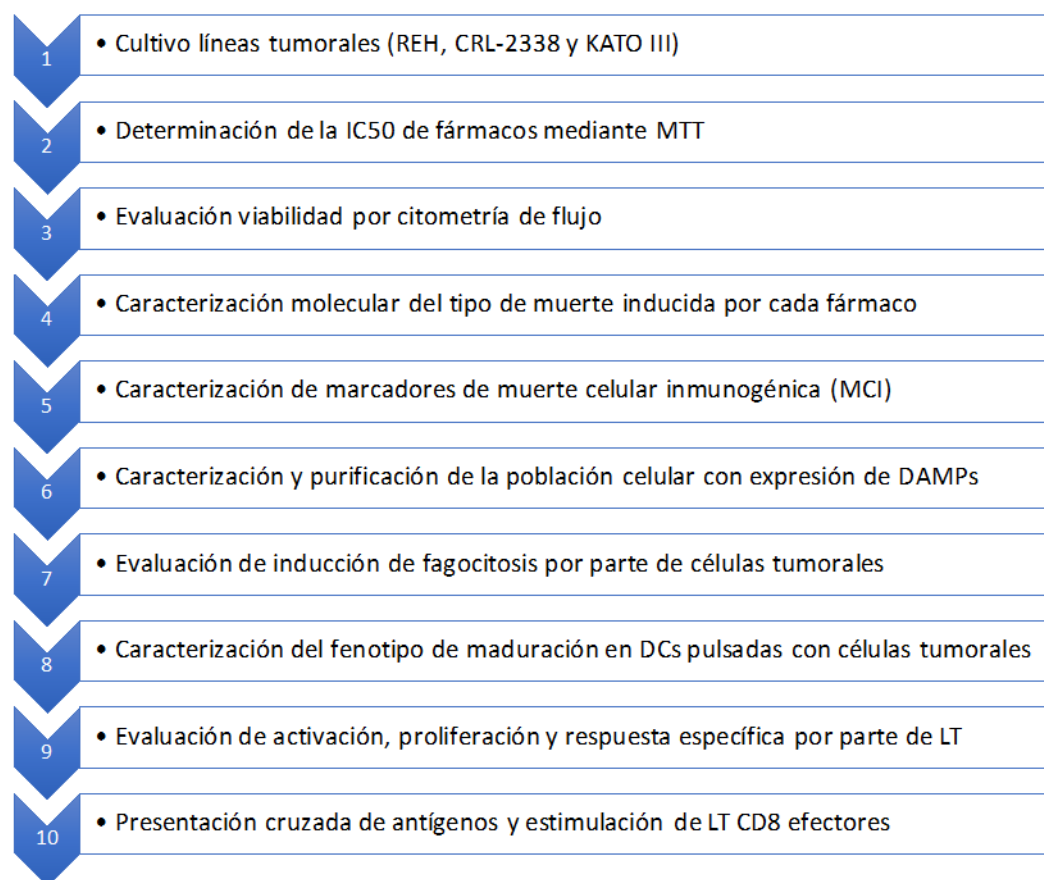
De igual forma, la eficiencia de la quimioterapia con antraciclinas y Oxaliplatino, disminuye cuando algunos componentes del sistema inmune como IFN $\gamma$ - y la IL-1 $\beta$  o sus receptores son bloqueados o eliminados en modelos KO [23, 54]. Estas observaciones sugieren que el efecto inmunogénico de algunos fármacos anticancerígenos es mediado por la interacción entre DCs y LT, donde una serie de señales inmunogénicas pueden ser liberadas durante la MCI que estimula a las DCs a capturar Ags derivados de las células tumorales que están muriendo, y estos eventualmente podrían ser presentados a LT CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> para generar una respuesta inmune específica de tumor [74]. Este efecto no se observa en ratones inmunodeficientes NU/NU, en ratones en los que los LT CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> son bloqueados con anticuerpos neutralizantes o cuando

hay una depleción temporal de DCs [16, 23]. Sugiriendo que se requiere un sistema inmune competente para que este tipo de terapia tenga éxito. Finalmente, la MCI se muestra como uno de los mecanismos mediante el cual quimioterapéuticos citotóxicos pueden provocar una respuesta inmune focalizada al tumor. Resultados preclínicos prometedores sugieren que agentes que promueven la exposición de Calreticulina, secreción de ATP, producción de IFN I, liberación de HMGB-1, mejoran considerablemente el perfil de regímenes terapéuticos convencionales [24].

## 2 MATERIALES Y METODOS.

En el presente trabajo se realizó una serie de experimentos que involucran desde cultivos de las líneas celulares, su evaluación en respuesta a diferentes tratamientos y su efecto sobre el sistema inmune. A continuación se relaciona la lista de la metodología utilizada de manera secuencial, las especificaciones de cada paso se pueden encontrar en los respectivos anexos (Figura 3).

### ANEXO



**Figura 3. Diseño experimental.** Se describen los pasos del diseño experimental en el proyecto; se nombran los anexos donde se encuentra la información detallada.

A continuación, se resumen cada uno de los pasos detallados en los anexos correspondientes.

1. **Cultivo líneas tumorales (REH, CRL-2338 y KATO III):** Las líneas tumorales fueron cultivadas en medio RPMI o IMDM suplementado con 10% SFB, en frascos T75, con recambio de medio cada 48 a 72 horas, hasta obtener confluencias entre 70 a 90%. La viabilidad y recuento se realizó con tinción con azul de tripán en cámara de Neubauer.
2. **Determinación de la IC<sub>50</sub> de fármacos mediante MTT:** Las células fueron sometidas a diferentes concentraciones para cada uno de los fármacos empleados en rangos que cubren las concentraciones descritas en la literatura. Posterior a los tratamientos se calculó el IC<sub>50</sub> con relación a los análisis de viabilidad realizados mediante la técnica de MTT (dependiente de la función mitocondrial).
3. **Evaluación viabilidad por citometría de flujo:** Una vez establecido las condiciones y la sensibilidad de las células a los diferentes tratamientos se procedió a caracterizar mediante la tinción por AQUA mediante citometría de flujo.
4. **Caracterización molecular del tipo de muerte inducida por cada fármaco:** La caracterización molecular incluye la funcional de mitocondria con DIOC<sub>6</sub>(3), evaluación de las diferentes fases del ciclo celular, activación de caspasas (3, 7 y 8) y expresión de moléculas asociadas a procesos de muerte y estrés oxidativo.
5. **Caracterización de marcadores de muerte celular inmunogénica (MCI):** La expresión de DAMPs en células tumorales se evaluó por citometría de flujo empleando anticuerpos conjugados contra CRT, HMGB-1 y medición de ATP (luminiscencia).
6. **Caracterización y purificación de la población celular con expresión de DAMPs:** Se explica la metodología para enriquecer las células tumorales que expresan DAMPs mediante separación por gradiente de densidad y separación celular por citometría (Sorting).
7. **Evaluación de inducción de fagocitosis por parte de células tumorales:** Células tumorales tratadas fueron marcadas con CFSE y expuestas a células dendríticas (DCs) inmaduras con el fin de determinar poblaciones doble positivas (CD11c y CFSE) para caracterizar la capacidad de fagocitosis en diferentes condiciones.
8. **Caracterización del fenotipo de maduración en DCs pulsadas con células tumorales:** La maduración de DCs en respuesta a la presencia de células tumorales tratadas que expresan DAMPs (viables y no viables) fue evaluada mediante la cuantificación de CCR7, CD83, CD80 y CD209, en células CD11c<sup>+</sup> por citometría de flujo.
9. **Evaluación de activación, proliferación y respuesta específica por parte de Linfocitos:** La respuesta inmune a las células tumorales tratadas fue evaluada mediante el análisis de formación de conjugados de DCs con LT, el grado de activación de LT

expuestos a DCs co-cultivadas con células tumorales tratadas, por reacción mixta de linfocitos (MLR) y ensayos de proliferación cuantificando Ki67.

10. **Presentación cruzada de antígenos y estimulación de LT CD8 efectores:** Células dendríticas de una paciente HLA-A2 con cáncer de mama (Her2/neu<sup>+++</sup>) fueron cultivadas con CRL2338 tratadas con Oxaliplatino. Estas células fueron posteriormente cultivadas con LT autólogos para evaluar mediante tinción con tetrámero específico para Her2/neu la expansión y fenotipo de memoria de LT específicos para Her2/neu. Se comparó con DCs pulsadas con péptidos de Her2/neu o péptidos virales como control.

## 2.1 Materiales

### 2.1.1 Líneas celulares

Las líneas celulares ATCC® empleadas en este trabajo se describen a continuación:

- **Leucemia:** Línea celular REH (CRL8286™), proveniente de células obtenidas en 1973 de una paciente de 15 años de edad con diagnóstico de leucemia linfoblástica aguda de precursores B en su primera recaída.
- **Cáncer de mama:** Línea celular CRL2338, derivada de un cáncer de mama ductal grado 3 con sobre expresión del oncogén Her2/neu, obtenida en 1995 de una mujer de 61 años de edad.
- **Cáncer gástrico:** Línea celular KATO III, procede de un hombre asiático de 55 años diagnosticado con cáncer gástrico metastásico.

### 2.1.2 Cultivos celulares

Las líneas celulares previamente descritas fueron cultivadas como se describe a continuación:

#### 2.1.2.1 Medios de cultivo:

- El cultivo de células REH y CRL2338 empleó RPMI 1640 con glutaMAX (Gibco®) suplementado con 10% (vol/vol) de suero fetal bovino (SFB) más 20 U/mL de Penicilina y 40 U/mL de estreptomycin (Invitrogen®), enriquecido con aminoácidos esenciales y piruvato de sodio.
- Para el cultivo de células KATO III. se recurrió al uso de IMDM de Gibco® suplementado con 10% de SFB más 20 U/ml de Penicilina y 40 U/ml de estreptomycin (Invitrogen®).
- Co-cultivos de DCs y LT se hizo en AIM-V de Gibco®.

### 2.1.3 Fármacos de quimioterapia evaluados

Tabla 1. Fármacos evaluados.

FARMACO	CONCENTRACION COMERCIAL (mg/mL)	PROVEEDOR
Carboplatino	10	Fresenius Kabi.
Gemcitabina	20	Fresenius Kabi.
Doxorrubicina	2	Pfizer
Oxaliplatino	5	Sanofi
Paclitaxel	6	Corden Pharma Latina S.p.A.
Ciclofosfamida	20	Baxter Oncology GmbH

### 2.1.4 Reactivos

A continuación se nombran reactivos utilizados, en los anexos mencionados en el diseño experimental se especifican el uso y la metodología para los que fueron usados:

Solución de azul tripán (0.25%) (Sigma, T8154), MTT (Tetrazolium dye MTT 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide ), 5mg/mL, se usó a una concentración de 0.1mg/mL (Molecular probes), tripsina 0.25% (Gibco), EDTA 0.53 mM (Invitrogen 0.5M EDTA, pH 8), DMSO (Dimethyl sulfoxide) MP Biomedicals; coctel de citoquinas standard: IL- $\beta$  (Cellgenix, 10ng/mL), IL-6 (Cellgenix, 10ng/mL), TNF- $\alpha$  (Cellgenix, 10ng/mL), PGE2 (Prostaglandina E2 20mg/mL SIGMA), coctel de diferenciación de monocitos a iDCs: IL-4 (Cellgenix 750 UI/mL), GMC-SF (Cellgenix 1000 UI/mL), activación y proliferación de linfocitos T: Perlas  $\alpha$ -CD3-CD2-CD28 (Miltenyi Biotec 100 $\mu$ g/mL) e IL-2 (100UI/mL), Invitrogen), poli-L-lisina (0.01%), Glicerol al 70% (MERCK).

### 2.1.5 Equipos y software

Durante el desarrollo del proyecto se utilizaron los siguientes equipos:

Equipo de agua Marca Marca Millipore, Balanza analítica (Balanza Analítica electrónica marca Satorius modelo 224.S), cabina de flujo laminar (Labconco), incubadora de CO<sub>2</sub> (Thermo Scientific, series 800 WT), bomba de vacío ( Bomba de vacio No 1 Marca GAST Modelo 1HAB-25B-M100X), ultracentrifuga (Thermo scientific sorvall ST 16r), baño serológico (Marca Memmert Modelo WB14), microscopio invertido (Olympus), microscopio óptico (Olympus), cámara de Neubauer, lector de Elisa Marca BIORAD Modelo ultramark, fluorometro marca BIOTEK Modelo FLX-800, citómetro de flujo FACSaria II, software Flowjo para análisis de citometría de flujo y para el análisis estadístico y gráficos se usó el software Graph Pad Prism 6.

### 3 ANÁLISIS ESTADÍSTICOS

Todos los análisis estadísticos y las gráficas de distribución fueron realizados en el software Graph Pad Prism 6.

Los datos obtenidos de la evaluación de citotoxicidad de los medicamentos se sometieron a un análisis de regresión lineal, dosis vs respuesta, a partir del porcentaje de inhibición del crecimiento de las líneas celulares en relación con las concentraciones evaluadas de cada fármaco.

Cada uno de los ensayos realizados fue evaluado con el test de D'Agostino, con el objetivo de establecer si la muestra dada posee un comportamiento de una población con distribución normal. Se evaluó las diferencias entre el efecto de la  $IC_{50}$  cada uno de los fármacos y el control de viabilidad, aplicando la prueba no paramétrica ANOVA (Kruskal-Wallis) con post-test de Dunn's, de una vía.

Con el fin de comparar los niveles de un factor seleccionado (AQUA<sup>+</sup> vs AQUA<sup>-</sup>, viables vs no viables para cada fármaco) se aplicó la prueba t de Mann-Whitney (datos no paramétricos). Se consideró como valores significativos aquellos cuyo valor p fuera menor o igual a 0.05.

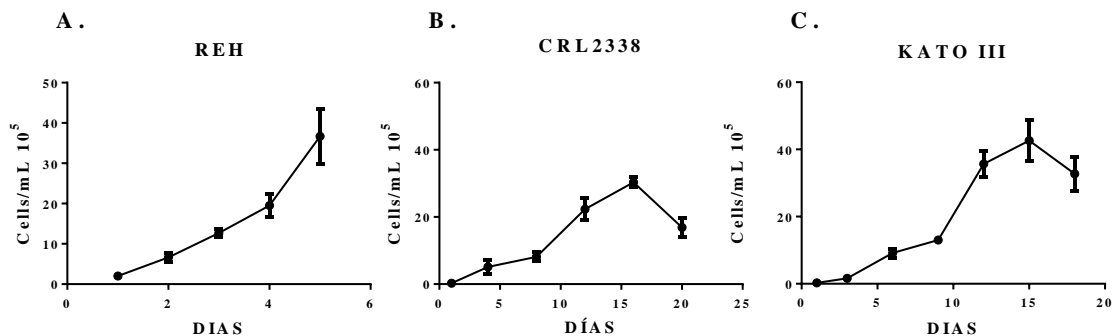
## 4 RESULTADOS

### 4.1 Inducción de muerte celular in vitro.

#### 4.1.1 Evaluación de crecimiento de células tumorales en cultivo.

Las líneas tumorales REH (Leucemia), CRL2338 (Cáncer de Seno) y KATO III (Cáncer Gástrico) fueron cultivadas y durante su tiempo en cultivo se monitoreó su replicación con el fin de establecer la dinámica de crecimiento de cada línea. Los resultados obtenidos están consignados en la gráfica de la Figura 4:

- La línea celular REH se cultivó a partir de una densidad inicial de  $2 \times 10^5$  células/mL. Durante las primeras 24 horas se obtuvieron 2.1 generaciones con un tiempo de generación de la fase exponencial de 11.4 horas. Al quinto día de monitoreo el cultivo alcanzó una densidad 12 veces mayor a la inicial (Figura 4A), con una viabilidad del 97%. (tiempo escogido para realizar experimentos).
- La línea celular CRL2338 se cultivó a partir de una densidad inicial de  $2.5 \times 10^4$  células/mL. Durante las primeras 96 horas se obtuvieron 14.6 generaciones con un tiempo de generación de la fase exponencial de 6.57 horas. A los 12 días de monitoreo se obtuvo una densidad 44 veces mayor respecto a la inicial con una viabilidad del 97% (Figura 4B). A partir del día 16 la viabilidad disminuyó debido a la alta confluencia celular, tomando como momento para la ejecución de experimentos el día 12.
- La línea celular KATO III se cultivó a partir de una densidad inicial de  $2.5 \times 10^4$  células/mL. Durante las primeras 72 horas se obtuvieron 2.7 generaciones con un tiempo de generación durante la fase exponencial de 26.49 horas. Al sexto día de monitoreo del crecimiento de esta línea (Figura 4C) se obtuvo una densidad 36 veces mayor respecto a la inicial con un 95% de viabilidad.



**Figura 4. Dinámica de crecimiento de las líneas tumorales REH, CRL2338 y KATO III en cultivo.** Expansión en cultivo de las líneas tumorales REH (A), CRL2338 (B) y KATO III (C). Las gráficas resumen la dinámica de expansión de las células (células/mL) en días. Actividad realizada con recuento en cámara de Neubauer por exclusión del azul de tripán. Se presentan los valores promedio de tres experimentos diferentes realizados.

## 4.1.2 Efecto de los fármacos evaluados en la viabilidad de las líneas tumorales.

### 4.1.2.1 Citotoxicidad de los agentes de quimioterapia sobre las células REH, CRL2338 y KATO III.

Empleando la técnica MTT para evaluar la viabilidad celular, se estableció el porcentaje de inhibición del crecimiento celular inducido en las tres líneas celulares por diversos agentes de quimioterapia presentes en el medio de cultivo a diferentes concentraciones durante un periodo de tiempo determinado. A partir de este dato, se calculó la concentración de medicamento que reducía al 50% la viabilidad de las células en un tiempo determinado ( $IC_{50}$ ). Este valor refleja la magnitud de la inhibición del crecimiento celular en función de la concentración del fármaco medida en tiempos específicos. La Tabla 2 se muestra los valores de  $IC_{50}$  de cada uno de los fármacos en las tres líneas celulares.

**Tabla 2. Actividad citotóxica de fármacos sobre las células REH y, CRL2338 y KATOIII, determinada por la técnica MTT después de tratamiento**

Fármaco	REH		CRL2338		KATO III	
	IC <sub>50</sub> (μM)± DS	Horas	IC <sub>50</sub> (μM)± DS	Horas	IC <sub>50</sub> (μM)± DS	Horas
<b>Carboplatino</b>	82 ± 18.3	48	56.6 ± 0.9	48	80.4 ± 21.8	48
<b>Gemcitabina</b>	120.4± 6.4	48	36.4 ± 2.7	48	58 ± 2.3	48
<b>Doxorrubicina</b>	3.9 ± 0.80	24	3.2 ± 1.5	24	12 ± 0,3	48
<b>Oxaliplatino</b>	21.6 ± 1.8	48	99 ± 4,7	24	63 ± 4	48
<b>Paclitaxel</b>	11 ± 2.5	6	19 ± 1,09	24	20.4 ± 3.4	24
<b>Ciclofosfamida</b>	176,3 ± 23,5	48	107 ± 4	48	87.3 ± 15	48

IC<sub>50</sub> = concentración inhibitoria 50 (media geométrica); DS = desviación estándar de tres ensayos independientes realizados por duplicado.

El análisis de regresión lineal de las curvas de dosis-respuesta obtenidas a partir del porcentaje de inhibición del crecimiento de las líneas celulares en relación a las concentraciones y tiempos evaluados en cada fármaco, permitió establecer que el efecto de los mismos es diferente en cada línea celular:

- En la línea celular REH se determinó la actividad citotóxica a las 48 horas para los fármacos Carboplatino ( $IC_{50}$ = 82μM), Gemcitabina ( $IC_{50}$ = 120.4μM), Oxaliplatino ( $IC_{50}$ = 21.6 μM) y Ciclofosfamida ( $IC_{50}$ = 176.3 μM). Doxorrubicina alcanzó la dosis letal 50 a las 24 horas ( $IC_{50}$ = 4μM) y Paclitaxel a las 6 horas ( $IC_{50}$ = 11 μM).
- En la línea celular CRL2338 se registró la actividad citotóxica a las 24 horas para los fármacos Doxorrubicina ( $IC_{50}$ = 3.2μM), Oxaliplatino ( $IC_{50}$ = 99μM) y Paclitaxel ( $IC_{50}$ = 19μM), en los otros tres tratamientos se estableció la dosis letal 50 a las 48 horas

(Carboplatino ( $IC_{50}= 56.6\mu M$ ), Gemcitabina ( $IC_{50}= 36.4\mu M$ ) y Ciclofosfamida ( $IC_{50}= 107\mu M$ )).

- En la línea celular KATO III se registró la disminución en la viabilidad a las 48 horas luego del tratamiento con Carboplatino ( $IC_{50}= 80.4\mu M$ ), Gemcitabina ( $IC_{50}= 58\mu M$ ), Doxorubicina ( $IC_{50}= 12\mu M$ ) y Oxaliplatino ( $IC_{50}= 63\mu M$ ). Finalmente, la actividad citotóxica de Paclitaxel ( $IC_{50}= 20.4\mu M$ ) fue registrada a las 24 horas.

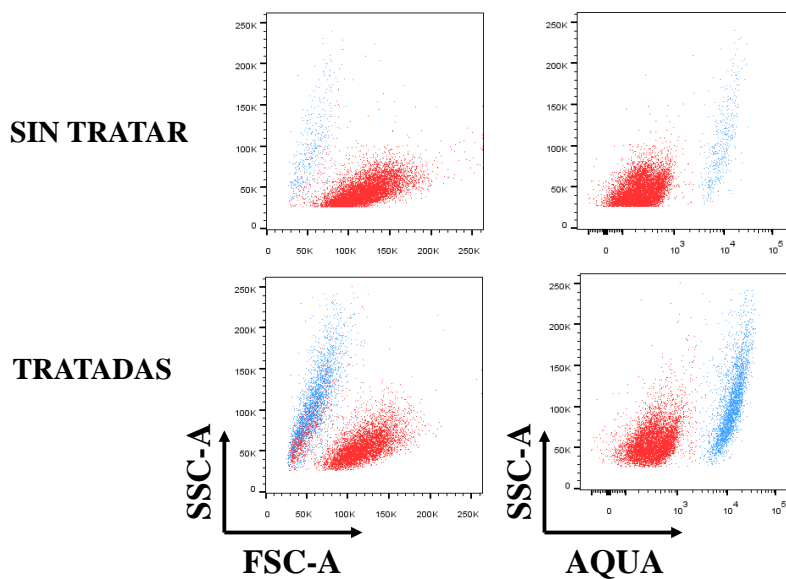
Una vez establecida los  $IC_{50}$  en las tres líneas celulares, utilizando las condiciones de  $IC_{50}$  descritas en la Tabla 2 se realizaron una serie de experimentos con el fin de evaluar si el efecto citotóxico de cada fármaco se correlacionaba con eventos moleculares clásicamente asociados a la muerte celular.

### **4.1.3 Las líneas tumorales experimentan diferente grado de alteración de la viabilidad celular luego del tratamiento con distintos fármacos anti-tumorales.**

#### **4.1.3.1 Efecto sobre la viabilidad celular.**

Se evaluó por citometría de flujo la viabilidad celular, empleando FSC y SSC seguido del análisis del patrón de marcación con AQUA. El análisis de tamaño y complejidad (FSC y SSC) de las células tratadas mostró, posterior al tratamiento, cambios en la morfología celular y se hizo evidente una población de bajo tamaño y complejidad, que respondió a la marcación con AQUA, lo cual es sugestivo de baja viabilidad celular asociada a daño en la integridad de la membrana de células o restos celulares (Figura 5).

Estos indicios de compromiso en la viabilidad celular inducida por los fármacos, varió ampliamente según el tipo de célula tratada, la naturaleza del fármaco evaluado e incluso un mismo fármaco tuvo diferente efecto en las células expuestas (Tabla 3). Mientras que las células REH luego del tratamiento con Oxaliplatino, Gemcitabina y Ciclofosfamida captaron de manera significativa AQUA, solo hubo tendencia al aumento en la marcación con AQUA, sin diferencias significativas con respecto al control, en células REH tratadas con Carboplatino, Doxorubicina y Paclitaxel. Por su parte, en las células CRL2338 se evidenció una tendencia al aumento no significativa en la población AQUA<sup>+</sup> luego del tratamiento con Paclitaxel y Ciclofosfamida. Las células KATO III, en contraste, experimentaron un aumento no significativo de la población AQUA positiva posterior del tratamiento con Paclitaxel (Tabla 3).



**Figura 5. Diagrama de puntos representativo del efecto de los fármacos sobre la viabilidad en células REH.** Análisis en diagrama de puntos de la distribución por tamaño y complejidad (FSC-A y SSC-A respectivamente) y marcación con AQUA (en azul) de células REH sin tratar como control y tratadas con Oxaliplatino (21  $\mu$ M por 48 horas). Se grafica un experimento representativo de tres realizados en días distintos.

**Tabla 3. Los fármacos anti-tumorales evaluados disminuyen la viabilidad celular al alterar la integridad de la membrana celular en las tres líneas valoradas.**

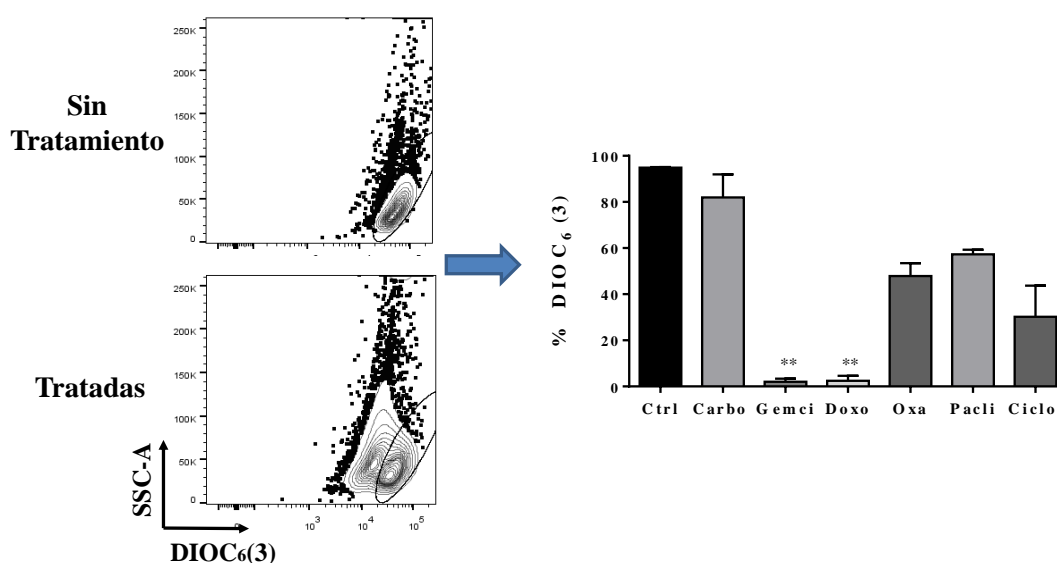
TRATAMIENTO	%AQUA <sup>+</sup> $\pm$ DS		
	REH	CRL2338	KATO III
<b>Sin tratar</b>	5 $\pm$ 2.7 <sup>(a)</sup>	6.5 $\pm$ 2.1	9,6 $\pm$ 2.8
<b>Carboplatino</b>	30 $\pm$ 7.5	N.D.	N.D.
<b>Gemcitabina</b>	76.5 $\pm$ 7 ***	N.D.	42,3 $\pm$ 4
<b>Doxorrubicina</b>	12 $\pm$ 4,3	43.4 $\pm$ 1.4	44,8 $\pm$ 4
<b>Oxaliplatino</b>	44 $\pm$ 9,8 *	37.7 $\pm$ 5.7	33 $\pm$ 6.5
<b>Paclitaxel</b>	38 $\pm$ 12	50 $\pm$ 9.4	48.5 $\pm$ 7
<b>Ciclofosfamida</b>	65 $\pm$ 23 **	53 $\pm$ 5.3	N.D

<sup>(a)</sup> Valores de la media con la desviación estándar de los porcentajes de células REH, CRL2338 y KATO III positivas para AQUA obtenido por citometría de flujo de células sin tratar y tratadas con diferentes fármacos. Los datos obtenidos fueron analizados con un test de Kruskal-Wallis y un post-test de comparación múltiple de Dunn donde se obtuvieron diferencias significativas con valores de p: \* (< 0.05), \*\* (<0.01), \*\*\* (<0.001). Se realizaron tres repeticiones en días distintos para la línea celular REH y dos repeticiones en días distintos para las células CRL2338 y KATO III. N.D. = No determinado.

#### 4.1.3.2 Alteración del potencial de membrana mitocondrial.

El grado de citotoxicidad inducida por los agentes de quimioterapia sobre las células tumorales fue analizado evaluando el estatus del potencial de membrana mitocondrial mediante la cuantificación del porcentaje de células positivas para DIOC<sub>6</sub>(3). En la Figura 6 panel izquierdo se muestra a manera de ejemplo, un diagrama de contornos del grado de marcación con DIOC<sub>6</sub>(3) de células REH sin tratar (diagrama superior) y tratadas con Oxaliplatino (diagrama inferior).

En estos experimentos, la disminución del porcentaje de células positivas para DIOC<sub>6</sub>(3), en células tratadas, se consideró sugestivo de alteración del potencial de membrana mitocondrial inducido por el fármaco. En la Figura 6 panel derecho, se presentan los porcentajes de células REH positivas para DIOC<sub>6</sub>(3) posterior al tratamiento con los diferentes fármacos a concentraciones y tiempos estipulados previamente en la Tabla 2. Estos resultados evidenciaron una disminución significativa en el porcentaje de células REH positivas para DIOC<sub>6</sub>(3) especialmente en células tratadas con Doxorubicina y Gemcitabina, para células CRL2338 en células tratadas con todos los medicamentos evaluados (Doxorrubicina, Paclitaxel y Ciclofosfamida) y finalmente para células KATO III se evidenció alteración de membrana para células tratadas con Doxorubicina, Paclitaxel y Oxaliplatino. (Figura 6, Tabla 4).



**Figura 6. Evaluación de alteración del potencial de membrana mitocondrial por quimioterapéuticos.** Las células REH se sometieron a tratamiento con los diferentes agentes: Carboplatino (Carbo), Gemcitabina (Gemci), Doxorubicina (Doxo), Oxaliplatino (Oxa), Paclitaxel (Pacli) y Ciclofosfamida (Ciclo) en las condiciones descritas en la tabla 3. Después del tiempo de incubación las células se tiñeron con DIOC<sub>6</sub>(3) con el objeto de evaluar el potencial de membrana mitocondrial. El panel izquierdo corresponde a dos plots de contornos típicos que muestran la distribución de células marcadas con DIOC<sub>6</sub>(3) sin tratar (superior) y tratadas (inferior). El panel derecho presenta los porcentajes de células REH DIOC<sub>6</sub>(3) positivas luego del ser tratadas con diferentes fármacos. La comparación entre los tratamientos y el control sin tratamiento fue analizada mediante un (Kruskal-Wallis) con post-test de Dunn. \*p ≤ 0,05; \*\*p ≤ 0,01; \*\*\*p ≤ 0,001; \*\*\*\*p ≤ 0,0001. Se realizaron cuatro experimentos en días distintos y se muestran las DS.

**Tabla 4. Alteración del potencial de membrana mitocondrial en células REH, CRL2338 y KATO III tratadas con diferentes fármacos.**

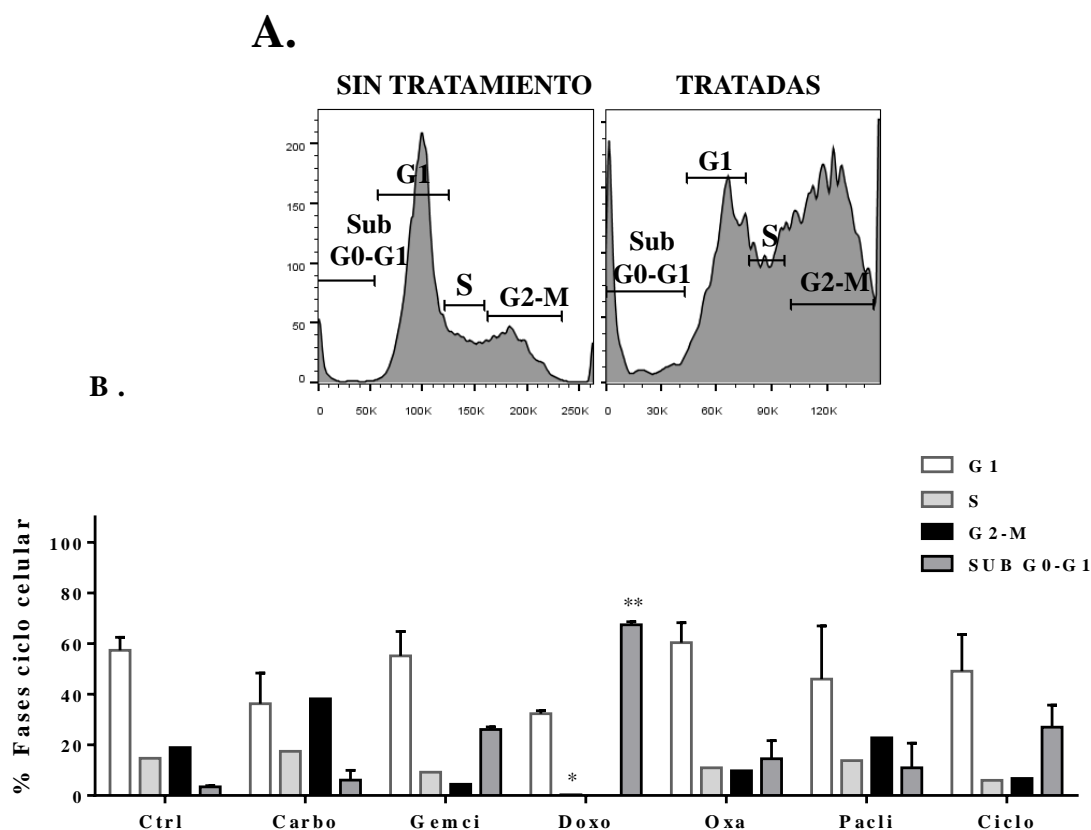
Fármaco	% células $\text{DIOC}_6(3) \pm \text{DS}$		
	REH	CRL2338	KATO III
<b>Control ( células sin tratar)</b>	$95 \pm 0.2^{(a)}$	$77.2 \pm 8.2$	$92.3 \pm 3.4$
<b>Carboplatino</b>	$82 \pm 10$	N.D.	$72.4 \pm 6$
<b>Gemcitabina</b>	$2 \pm 1.3^{**}$	N.D.	$89.6 \pm 4.5$
<b>Doxorrubicina</b>	$2.4 \pm 2.1^{**}$	$44 \pm 4.2$	$48 \pm 5^*$
<b>Oxaliplatino</b>	$48 \pm 5.5$	$48.5 \pm 4.9$	$69 \pm 8$
<b>Paclitaxel</b>	$57.3 \pm 2$	$51 \pm 11$	$45 \pm 7^{**}$
<b>Ciclofosfamida</b>	$30.2 \pm 13$	$40.5 \pm 10$	$90 \pm 3$

<sup>(a)</sup> Media y desviación estándar de los porcentajes obtenidos del análisis por citometría de flujo para la marcación con  $\text{DIOC}_6(3)$ . Los datos obtenidos fueron analizados con el test de Kruskal-Wallis y un post-test de comparación múltiple de Dunn donde se obtuvieron diferencias significativas con valores de p: \* (< 0.05), \*\* (<0.01), \*\*\* (<0.001). Se realizaron tres repeticiones en días distintos por duplicado para la línea celular REH, dos repeticiones en días distintos para las células CRL2338 y tres repeticiones en días distintos para las células KATO III. Control: células sin tratamiento. N.D.: No Determinado

#### 4.1.3.3 Efectos sobre el ciclo celular en células REH.

Para determinar el efecto de los fármacos sobre las diferentes fases del ciclo celular se trataron las células con las concentraciones de cada fármaco establecidas con el  $\text{IC}_{50}$ . Los resultados de la distribución de las células en las distintas fases del ciclo celular se analizaron teniendo en cuenta el modelo de integración del ciclo celular de Watson. En el panel A de la Figura 7 se presenta a manera de ejemplo, la distribución de las fases del ciclo celular en células REH sin tratamiento y tratadas con Carboplatino. Mientras en las células sin tratamiento, se observó un comportamiento típico de células “normoploides” ( $\text{DNA} \geq 2\text{N}$ ) (Figura 7A, izquierda), en las células tratadas con Carboplatino se evidenció una detención de ciclo celular en la fase G2-M y la aparición de hipoploidía (G0-G1) (Figura 7A, derecho).

En el panel B, se presenta la distribución de las distintas fases del ciclo generada con cada tratamiento, los porcentajes de distribución son registrados en la Tabla 5. Los resultados mostraron que la Doxorrubicina induce de manera significativa hipoploidía (fase sub G0/G1,  $\text{DNA} < 2\text{N}$ ) acompañado de una disminución de la fase S (Figura 7, Tabla 5). Por su parte, los resultados sugieren que las células REH tratadas con Carboplatino experimentaron detención en la fase G2/M, mientras las células tratadas con Gemcitabina y Ciclofosfamida tuvieron una tendencia a la aparición de células hipoploides, claro está que estas diferencias no fueron estadísticamente significativas.



**Figura 7. Distribución de células REH en diferentes fases del ciclo celular luego del tratamiento con diferentes fármacos.** Las células REH fueron tratadas con Carboplatino (Carbo); (Gemci), Doxorubicina (Doxo), Oxaliplatino (Oxa), Paclitaxel (Pacli) y Ciclofosfamida (Ciclo). El análisis del ciclo celular se realizó mediante citometría de flujo utilizando el modelo de integración de Watson y el software Flow Jo v 10. **A.** Diagrama explicativo del análisis que se evidencia las fases del ciclo celular de células sin tratamiento (control de viabilidad) y células tratadas con Carboplatino. Los datos graficados corresponden a un experimento representativo de seis realizados. **B.** Porcentaje de distribución de las células tratadas con los diferentes fármacos luego de la marcación con Hoechst de células sin tratamiento y tratadas. La comparación entre los tratamientos y el control sin tratamiento fue analizada mediante un test de Kruskal-Wallis con post-test de Dunn. \* $p \leq 0,05$ ; \*\* $p \leq 0,01$ ; \*\*\* $p \leq 0,001$ ; \*\*\*\* $p \leq 0,0001$ . Se realizaron seis experimentos en días distintos y se grafica la magnitud de la desviación estándar en cada caso.

**Tabla 5. Porcentaje de células REH en cada una de las fases del ciclo celular luego del ser tratadas con diferentes agentes quimioterapéuticos**

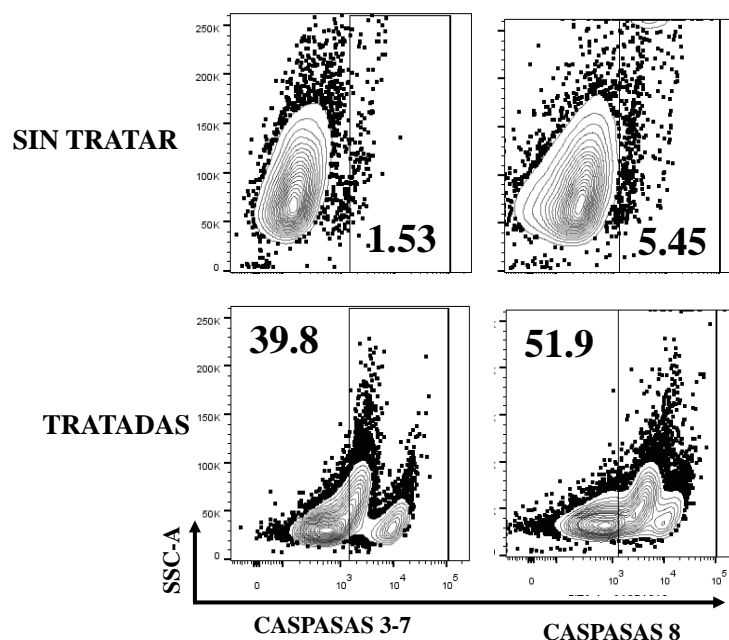
Tratamiento	Sub G0/G1	G1	S	G2/M
Sin tratamiento	$3.3 \pm 0.3^{(a)}$	$57 \pm 2.9$	$14 \pm 1$	$19 \pm 0.5$
Carboplatino	$6.0 \pm 2.2$	$36 \pm 7$	$17 \pm 6.8$	$38 \pm 9$
Ciclofosfamida	$27 \pm 5$	$49 \pm 8.3$	$6 \pm 1.2$	$6.7 \pm 2.6$
Doxorrubicina	$67 \pm 0.6^{**}$	$32 \pm 0.6$	$0.4 \pm 0.1^*$	$0.06 \pm 0.01$
Gemcitabina	$26 \pm 0.5$	$55 \pm 5.5$	$9.3 \pm 2.0$	$4.4 \pm 2.5$
Oxaliplatino	$14 \pm 4.1$	$60 \pm 4.5$	$11 \pm 2.1$	$9.7 \pm 2.7$
Paclitaxel	$10 \pm 5.6$	$46 \pm 12$	$13 \pm 0.4$	$22 \pm 5.4$

<sup>(a)</sup> Media y DS de 6 ensayos diferentes. La comparación entre los tratamientos y el control sin tratamiento fue analizado mediante el test de Kruskal-Wallis con post-test de Dunn. Los valores  $p$  corresponden a diferencias estadísticamente significativas en comparación con el control sin tratamiento así: \*\* $p \leq 0,01$  y \* $p \leq 0,05$ .

#### 4.1.3.4 Efectos sobre la inducción de caspasas 3, 7 y 8 en células REH y CRL2338.

Como parte de la caracterización molecular de la muerte inducida por agentes comúnmente utilizados en quimioterapia, se examinó el grado de activación de las caspasas 3, 7 y 8 inducido por el tratamiento con Doxorubicina, Oxaliplatino, Paclitaxel y Ciclofosfamida. En la Figura 8 se muestra un plot de contornos representativo del análisis por citometría de flujo de la activación de las caspasas 3 y 7 (izquierda) y la caspasa 8 (derecha) realizado en células REH sin tratar (paneles superiores) y tratadas con Oxaliplatino (paneles inferiores).

En la Tabla 6, se centralizan los porcentajes de activación de las caspasas 3, 7 y 8 en las células REH y CRL2338 tratadas con los fármacos. Se evidencia que las células REH al ser tratadas con Oxaliplatino y Ciclofosfamida exhiben un mayor grado de activación de las caspasas efectoras 3 y 7 (72.4% y 71.7% respectivamente) en comparación con los demás fármacos. El Oxaliplatino y la Doxorubicina activan la caspasa 8 en mayor proporción (94.5% y 51.9% respectivamente) que el resto de los fármacos. Por su parte, en las células CRL2338 se evidenció que el tratamiento con Paclitaxel induce en mayor proporción la activación de las caspasas 3, 7 y 8 (57.6% y 31% respectivamente) en comparación con los demás tratamientos (Figura 8).



**Figura 8. Diagrama explicativo del análisis por citometría de flujo de la activación de caspasas 3, 7 y 8 en células REH tratadas con Oxaliplatino.** Tras el tratamiento con el fármaco, se evaluó la activación de caspasas 3-7 y 8. En los diagramas de contorno se evidencia el grado de activación basal de las caspasas 3, 7 (arriba y a la izquierda) y 8 (arriba a la derecha) en células sin tratar (paneles superiores) y tratadas con Oxaliplatino (paneles inferiores). Los datos de citometría de flujo fueron analizados con el software FlowJo v 10.

**Tabla 6. Porcentajes de activación de caspasas 3, 7 y 8 en células REH y CRL2338 sometidas a tratamiento con cuatro agentes quimioterapéuticos.**

Tratamiento	REH		CRL2338	
	Caspasas 3 y 7	Caspasa 8	Caspasas 3 y 7	Caspasa 8
Control	1.5 <sup>(a)</sup>	5.4 <sup>(b)</sup>	13.4 <sup>(a)</sup>	5.8 <sup>(b)</sup>
Doxorrubicina	40	52	37	22
Oxaliplatino	72.4	94.5	33.7	19
Paclitaxel	2.7	6.9	57.6	31
Ciclofosfamida	71.7	45.6	32.6	6.4

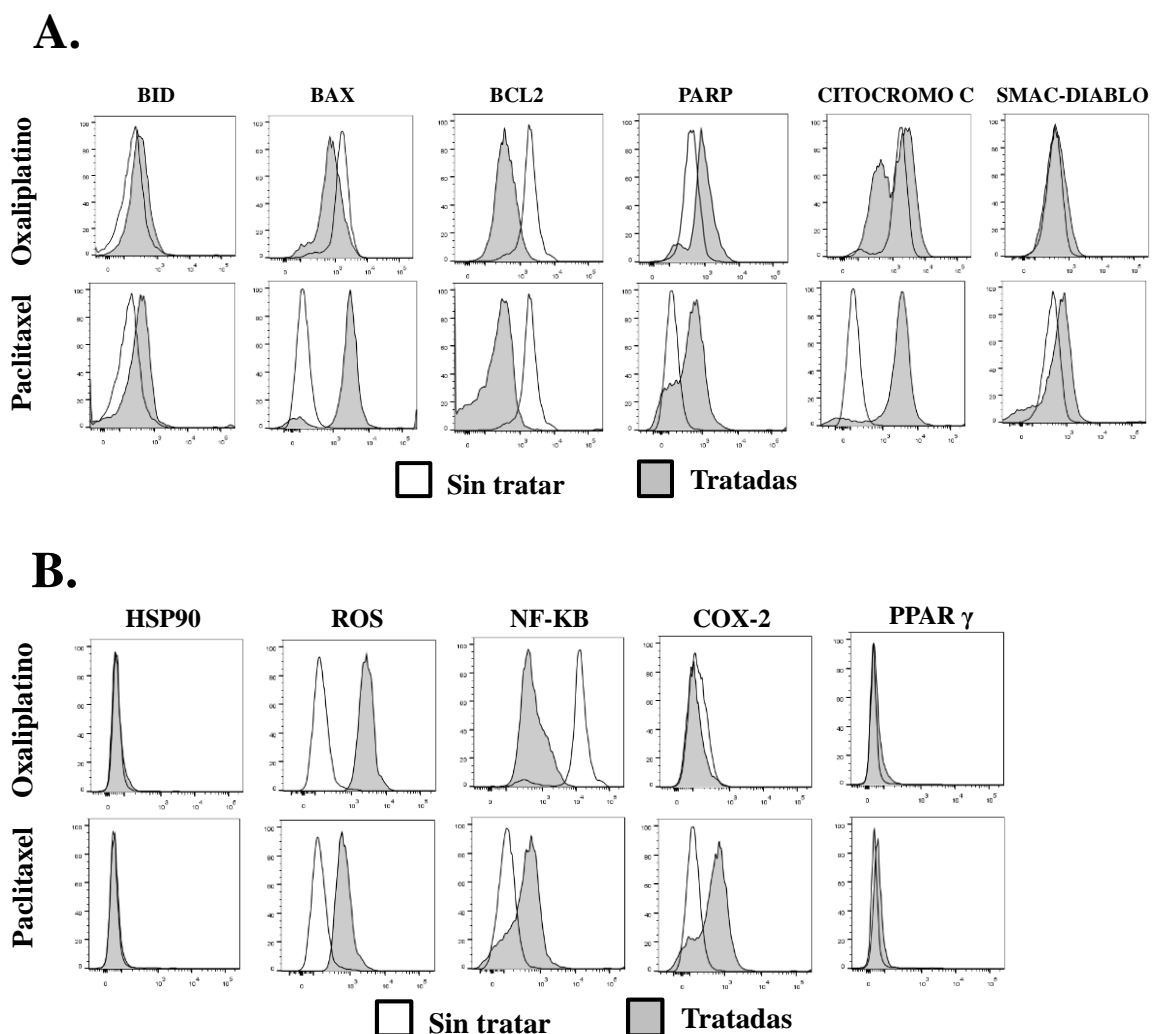
<sup>(a)</sup> Porcentajes de activación de las caspasas 3 y 7 y <sup>(b)</sup> Porcentajes de activación de la caspasa 8 evaluadas por citometría de flujo. Los datos corresponden a un ensayo representativo de dos realizados. Control: células sin tratamiento.

#### **4.1.3.5 El Paclitaxel modula la expresion de moléculas pro- y anti-apotóticas en células REH.**

La modulación con Paclitaxel y Oxaliplatino en la expresión de proteínas diferentes a las caspasas involucradas en apoptosis como BID, BAX, BCL2, PARP, CITOCROMO C y SMAC-DIABLO fue evaluada por citometría de flujo en células REH tratadas con Oxaliplatino y Paclitaxel. Los resultados mostraron que Paclitaxel induce de manera más eficiente que Oxaliplatino, la activación de moléculas pro-apoptóticas evidenciado por el aumento en la expresión de BAX y BID y la disminución en la expresión de la proteína anti-apoptótica BCL-2 (evidenciado también en células tratadas con Oxaliplatino). El tratamiento con Paclitaxel aumentó además la expresión de PARP (Poli (ADP-ribosa) polimerasa (sustrato de caspasa 3 y 7) y la liberación de CITOCROMO C en las células tratadas. (Paneles A y B de la Figura 9).

#### **4.1.3.6 Oxaliplatino y Paclitaxel inducen estrés de retículo endoplasmático en células REH.**

Además de evaluar en células REH tratadas con Paclitaxel y Oxaliplatino la expresión de moléculas involucradas en apoptosis, se exploró por citometría de flujo la tasa de exposición de HSP90, ROS (especies reactivas de oxígeno), NF- $\kappa$  $\beta$ ; COX-2 y PPAR $\gamma$  asociadas a estrés celular (Figura 9B). Los resultados indican que la expresión de HSP-90 en las células tratadas con los dos fármacos no cambia con respecto a las células control. Sin embargo, la producción de ROS aumenta especialmente en las células tratadas con Oxaliplatino. También se observó un aumento en la expresión de NF- $\kappa$  $\beta$  fosforilado en las células tratadas con Paclitaxel y su disminución en células tratadas con Oxaliplatino. De manera interesante, un aumento en la expresión de COX-2 en células tratadas con Paclitaxel estuvo asociado a la expresión de NF- $\kappa$  $\beta$  fosforilado. No fue detectado ningún cambio en la expresión de PPAR $\gamma$  en respuesta a alguno de los dos tratamientos (Figura 9B).



**Figura 9. Expresión de moléculas asociadas a la inducción de apoptosis y a estrés celular en células REH tratadas con Paclitaxel y Oxaliplatino.** Los histogramas muestran el grado de inducción de la expresión de moléculas que modulan la inducción de apoptosis (BCL-2, BID, BAX, SMAC-DIABLO, CITOCHROMO C y PARP) (A.) y la expresión de HSP90 y ROS, COX-2, NF- $\kappa$ B, PPAR $\gamma$  (respuesta a estrés celular) (B.), en células REH no tratadas (histogramas vacíos) y tratadas (histogramas grises) con Oxaliplatino 20 $\mu$ M-48 horas y Paclitaxel 11  $\mu$ M-6 horas. Las muestras fueron procesadas por citometría de flujo en el equipo FACSaria II (BD) y los datos analizados con el software FlowJo. Se grafica un experimento representativo de dos realizados.

#### 4.1.4 Agentes quimioterapéuticos inducen la expresión de DAMPs en células REH, CRL2338 y KATO III.

Para evaluar la inducción de MCI por agentes quimioterapéuticos se midió la expresión de Anexina V, CRT, HMGB-1 en las células por FC y la liberación de ATP al medio de cultivo por Elisa. La Figura 10 panel superior muestra los histogramas de células REH tratadas con Oxaliplatino, comparando el grado de expresión de moléculas características de MCI en células

con y sin tratamiento. Las células REH expresaron Anexina V y CRT en la superficie en respuesta al tratamiento. No obstante, no hubo diferencia en el patrón de tinción para el marcador HMGB-1 de células tratadas y sin tratar. El panel inferior de la misma figura, representa un gráfico de barras con el resumen los resultados del porcentaje de expresión de DAMPs en células REH tratadas con los diferentes fármacos.

Al analizar la expresión de Anexina V en células REH se evidenció que Carboplatino, la Gemcitabina, la Doxorubicina y el Oxaliplatino indujeron un aumento significativo en la expresión de este marcador respecto al control (Figura 10).

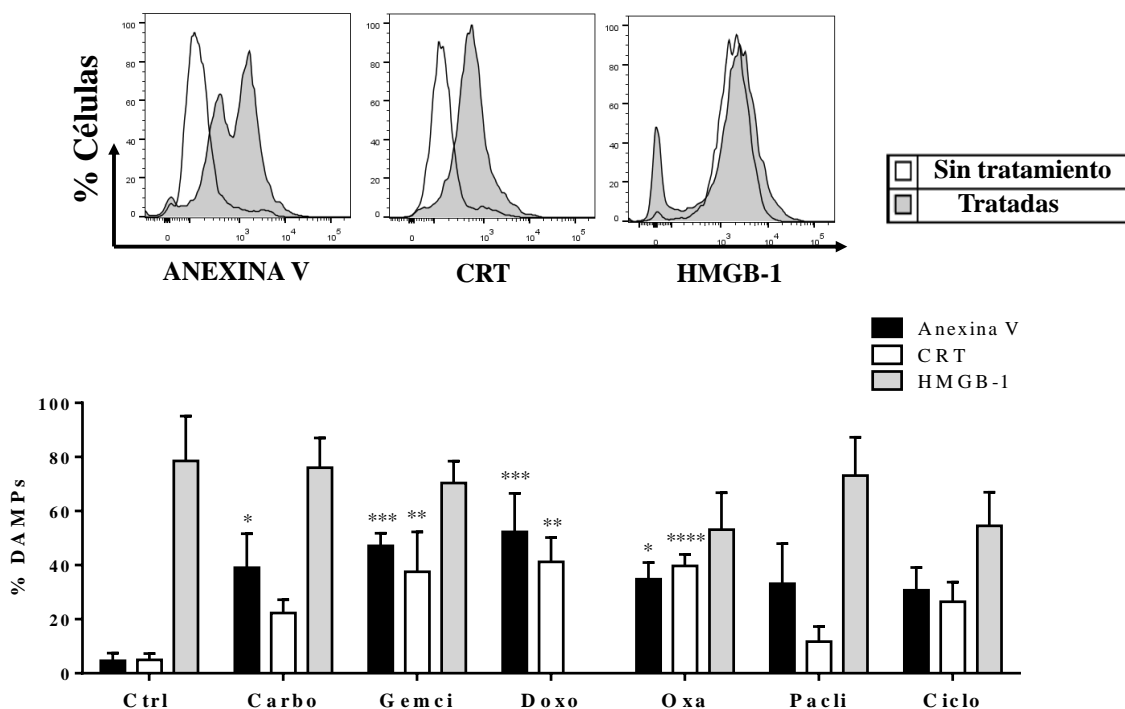
De manera similar, la translocación de CRT a la superficie de la membrana celular se vio inducida por el tratamiento con Gemcitabina, Doxorubicina y Oxaliplatino de manera significativa respecto al control sin tratamiento.

La Tabla 7 concentra los hallazgos relacionados con el grado de expresión de DAMPs en células REH, CRL2338 y KATOIII con y sin tratamiento en respuesta a los fármacos evaluados. Las células CRL2338 tratadas con Doxorubicina mostraron una alta expresión de Anexina V ( $65.7 \pm 13\%$ ), significativamente mayor que el nivel expresado por células no tratadas ( $11.8 \pm 0.8\%$ ). Aunque hubo tendencia al aumento en la expresión de Anexina V en la superficie de células CRL2338 tratadas con Oxaliplatino, Paclitaxel y Ciclofosfamida este aumento no fue estadísticamente significativo.

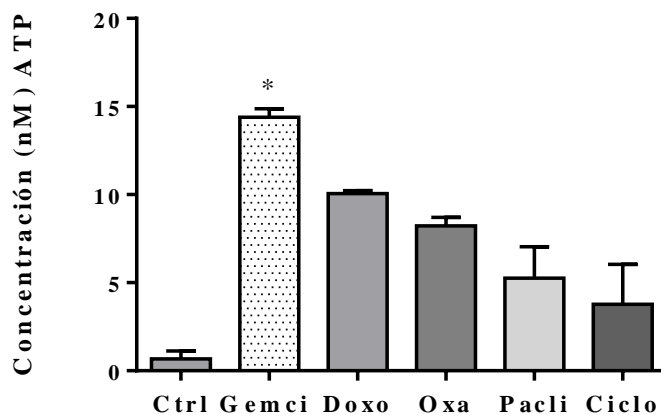
La expresión de CRT en estas células mostró una tendencia al aumentó en respuesta al tratamiento con Doxorubicina, Oxaliplatino, Paclitaxel y Ciclofosfamida. Por su parte, las células CRL2338 no experimentaron cambios en la expresión de HMGB-1 luego del tratamiento con Oxaliplatino y Ciclofosfamida; sin embargo, una disminución en la expresión de esta molécula fue detectada en estas células luego del tratamiento con Paclitaxel (Tabla 7).

En las células KATO III, se evidenció un aumento en la expresión de Anexina V cuando las células fueron tratadas con Doxorubicina, Oxaliplatino (35% y 23.8% respectivamente) respecto al control (11%). Por otra parte, todos los fármacos indujeron expresión de CRT, siendo Paclitaxel y Ciclofosfamida (42.2% y 58% respectivamente) los que indujeron una mayor expresión. Respecto a la expresión de HMGB-1 se observó una tendencia a la disminución de este marcador respecto al control sin tratamiento (26%) en células tratadas con Ciclofosfamida (8.5%) (Tabla 7).

Finalmente, la concentración de ATP liberado al medio por células REH tratadas con Gemcitabina, Doxorubicina, Oxaliplatino, Paclitaxel y Ciclofosfamida mostró que las células tratadas con Gemcitabina secretaron una cantidad de ATP (14.3 nM) significativamente mayor comparado con las células no tratadas (0.68 nM) (\* $p \leq 0,05$ ). Una tendencia al aumento de ATP en los sobrenadantes de los cultivos de REH tratadas con los demás fármacos fue observada (Figura 11).



**Figura 10. . Expresión de DAMPs en células REH tratadas con diferentes fármacos.** En el panel superior se presenta a manera de ejemplo un diagrama de histogramas comparativos de expresión de DAMPs medidos por FC en células REH tratadas con Oxaliplatino (histograma gris) y sin tratar (histograma vacío). En el panel inferior se graficaron los porcentajes de expresión de DAMPs en células REH tratadas con las  $IC_{50}$  de Carboplatino (Carbo), Gemcitabina (Gemci), Doxorubicina (Doxo), Oxaliplatino (Oxa), Paclitaxel (Pacli) y Ciclofosfamida (Ciclo) y se muestran los  $p$  del análisis de comparación respecto al control sin tratamiento realizado con un Kruskal-Wallis con post-test de Dunn. Se realizaron tres repeticiones del experimento en días distintos. \* $p \leq 0,05$ ; \*\* $p \leq 0,01$ ; \*\*\* $p \leq 0,001$ ; \*\*\*\* $p \leq 0,0001$ .



**Figura 11. Las células REH secretan ATP cuando son tratadas con agentes quimioterapéuticos.** Grafica de barras donde se evidencia la concentración en nM de ATP en sobrenadantes de células REH tratadas con las  $IC_{50}$  de Carboplatino (Carbo); Gemcitabina (Gemci), Doxorubicina (Doxo), Oxaliplatino (Oxa), Paclitaxel (Pacli) y Ciclofosfamida (Ciclo). Las concentraciones de ATP se establecieron a partir de una curva standard con  $R^2=0.989$  de una regresión lineal. Se realizó un ANOVA de una vía (Kruskal-Wallis) con post-test de Dunn. \* $p \leq 0,05$ . Se grafica la media y DS de dos experimentos realizados.

**Tabla 7. Cuantificación de la expresión de DAMPs en células REH, CRL2338 y KATO III posterior al tratamiento con los diferentes agentes quimioterapéuticos.**

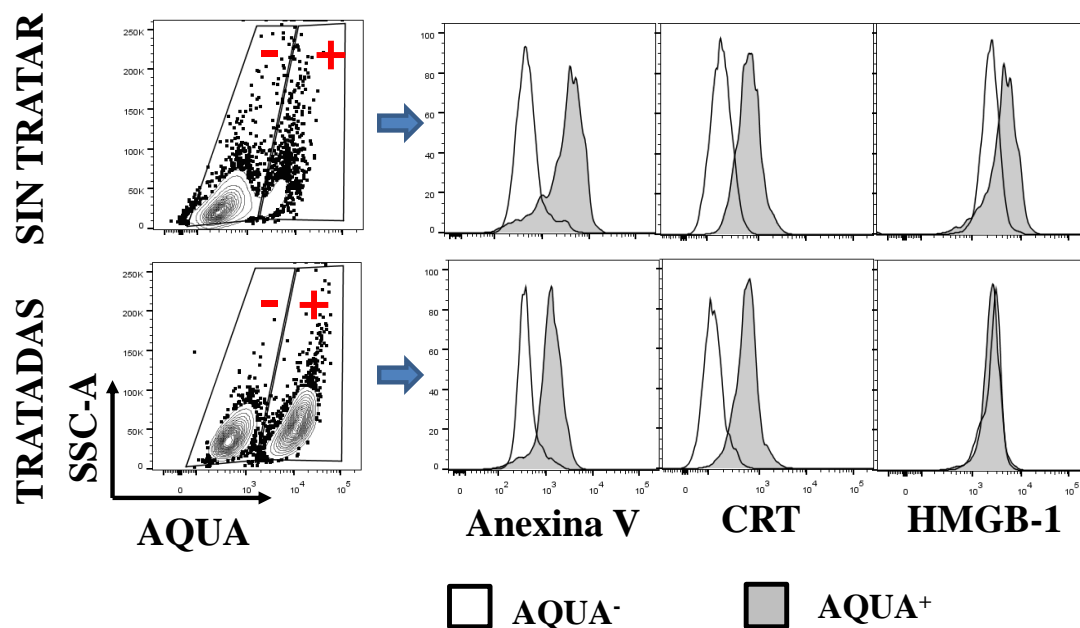
TTO	Línea celular REH			Línea celular CRL2338			Línea celular KATO III		
	AnexinaV%	CRT%	HMGB-1%	AnexinaV%	CRT%	HMGB-1%	AnexinaV%	CRT%	HMGB-1%
Control	4.6 ± 2.8 <sup>(a)</sup>	5 ± 2.3	78.5 ± 16	11.8 ± 0.8	14.7 ± 3.8	20.2 ± 8	11	0.4	26
Carbo	39 ± 12*	22 ± 5	60.8 ± 11	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D
Gemci	47 ± 4.6***	38 ± 14**	70 ± 8	N.D	N.D	N.D	13.3	27.3	24.3
Doxo	52 ± 14***	41 ± 9**	N.D	65.7 ± 13*	46.3 ± 5	N.D	35	24.5	N.D
Oxa	35 ± 6*	40 ± 4****	63 ± 13	30.2 ± 9	46.6 ± 9	23.2 ± 6	23.8	25.2	17.6
Pacli	33 ± 14	11.7 ± 5.5	46 ± 11	28 ± 6	44.5 ± 7	4 ± 2	18.1	42.2	25.9
Ciclo	30 ± 8	26.4 ± 7.2	54.5 ± 12	42 ± 4	37.4 ± 12	28.5 ± 7	20	58.1	8.5

(a) Media y DS de expresión de cada DAMPs obtenidos en 4 ensayos diferentes para las células REH, 2 ensayos para las células CRL2338 y 1 ensayo para las células KATO III. La comparación entre los tratamientos y el control sin tratamiento fue analizada mediante el test de Kruskal-Wallis con post-test de Dunn. Se presentan los valores *p*: \**p* ≤ 0,05, \*\**p* ≤ 0,01, \*\*\**p* ≤ 0,001 y \*\*\*\**p* ≤ 0,0001. Carbo: Carboplatino, Gemci: Gemcitabina, Doxo: Doxorubicina, Oxa: Oxaliplatino, Pacli: Paclitaxel y Ciclo: Ciclofosfamida. N.D: No determinado; la expresión de HMGB-1 en células tratadas con Doxorubicina no fue determinada debido a la autofluorescencia emitida por el fármaco detectada por el láser azul, siendo el mismo canal del Fluorocromo acoplado al anticuerpo anti-HMGB-1. TTO: Tratamiento.

#### 4.1.4.1 Las células AQUA<sup>+</sup> muestran predominio de expresión de DAMPS.

Teniendo en cuenta los resultados descritos anteriormente, en los que se evidenció que las células de las tres líneas celulares (REH, CRL2338 y KATO III) tratadas con diferentes quimioterapéuticos exponen DAMPs, se evaluó la expresión de estos en células AQUA<sup>-</sup> y AQUA<sup>+</sup> (viables y no viables respectivamente) por FC, con el objeto de precisar cuál de estas dos fracciones expresan en mayor proporción marcadores DAMPs característicos de MCI. En la Figura 12 se presenta un diagrama ejemplo del análisis realizado en células REH tratadas con Oxaliplatino, el cual muestra en histogramas, la expresión de Anexina V, CRT y HMGB-1 en células AQUA<sup>-</sup> y AQUA<sup>+</sup>.

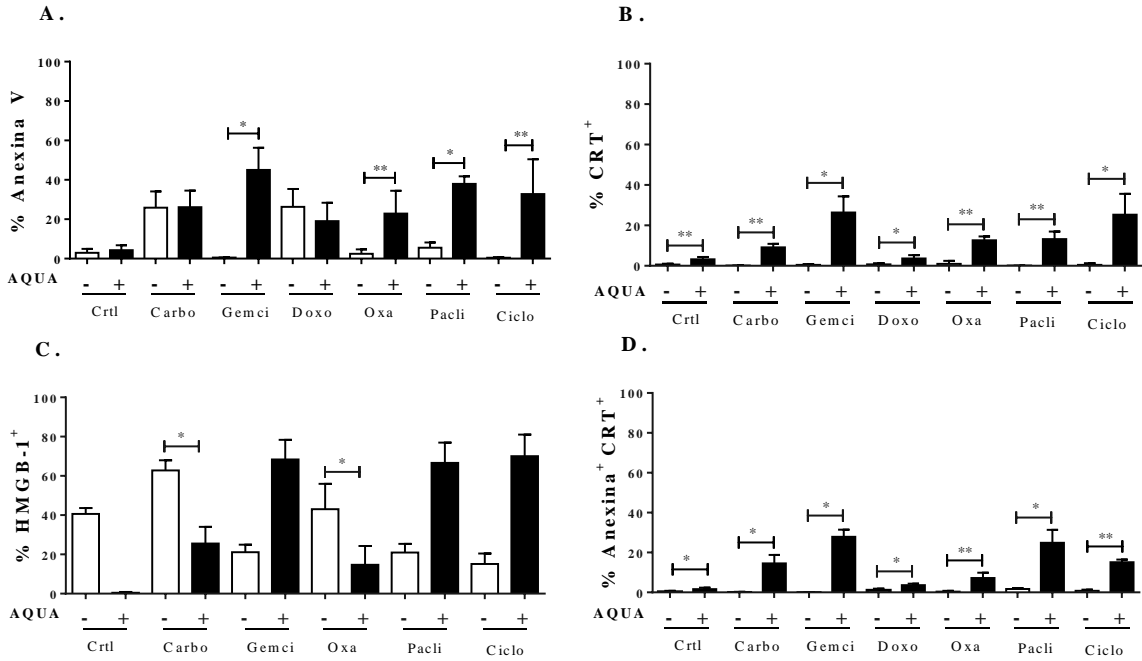
Este análisis permitió concluir que los marcadores de MCI son expresados principalmente por células presentes en la fracción del cultivo que se tiñe con AQUA luego del tratamiento con Oxaliplatino. La expresión de DAMPs en las células AQUA<sup>-</sup> y AQUA<sup>+</sup> provenientes de los cultivos de células REH, CRL2338 y KATO III tratadas con Carboplatino, Gemcitabina, Doxorubicina, Oxaliplatino, Paclitaxel y Ciclofosfamida; son presentados en la Tabla 8. Para calcular los valores mostrados en esta tabla se normalizó el porcentaje de expresión de cada uno de los DAMPs con respecto al porcentaje de células AQUA<sup>-</sup> y AQUA<sup>+</sup>.



**Figura 12.** Análisis de la expresión de DAMPs (Anexina, CRT y HMGB-1) en las fracciones de células REH AQUA<sup>-</sup> y AQUA<sup>+</sup> generadas luego del tratamiento con Oxaliplatino. Grafica de contorno que señala las poblaciones AQUA<sup>-</sup> y AQUA<sup>+</sup> (izquierda) a partir de las cuales se analizó el grado de expresión de DAMPs en células REH sin tratar (parte superior) y tratadas con Oxaliplatino (parte inferior). En cada caso, los histogramas muestran la expresión de DAMPs en células viables AQUA<sup>-</sup> (histogramas vacíos) y células no viables AQUA<sup>+</sup> (histogramas grises).

Los resultados presentados en la Figura 13 muestran en general que, luego del tratamiento con diferentes fármacos, la fracción de células REH AQUA<sup>+</sup> exhibe una expresión de DAMPs significativamente mayor que la fracción de células AQUA<sup>-</sup> (Figura 13A, B, C y D y Tabla 8). Sin embargo, la expresión de HMGB-1 mostró que las células AQUA<sup>-</sup> del control, al igual que las tratadas con Carboplatino y Oxaliplatino, presentaron una expresión significativamente mayor de esta proteína que las células AQUA<sup>+</sup>. Por otra parte, las células tratadas con Gemcitana, Paclitaxel y Ciclofosfamida no mostraron diferencias significativas en la expresión de HMGB-1 entre las células AQUA<sup>-</sup> y AQUA<sup>+</sup>. No obstante esto último, la expresión de HMGB-1 en células tratadas con estos fármacos tiende a estar aumentada en células AQUA<sup>+</sup> con respecto a las células AQUA<sup>-</sup> (Figura 13C y Tabla 8). Finalmente, en la Figura 13D se evidencia que la presencia de células doble positivas para Anexina V y CRT se encuentra predominantemente en la población AQUA<sup>+</sup>.

En conjunto, estos resultados y los presentados en la Tabla 8, permiten concluir que en células REH y KATO III los mejores inductores de expresión de moléculas de MCI son Gemcitabina, Oxaliplatino, Paclitaxel y Ciclofosfamida y para la línea celular CRL2338 son Oxaliplatino, Paclitaxel y Ciclofosfamida y que estos DAMPs se expresan principalmente en células que perdieron su viabilidad (células AQUA<sup>+</sup>) (Tabla 8 y Figura 13).



**Figura 13. Los DAMPs se expresan predominantemente en células AQUA+.** Grafica de barras donde se grafica la expresión de DAMPs en células REH; Anexina V (A), CRT (B), HMGB-1 (C) y células doble positivas para Anexina V y CRT (D). Las células REH fueron tratadas con la IC<sub>50</sub> de Carboplatino (Carbo); Gemcitabina (Gemci), Doxorubicina (Doxo), Oxaliplatino (Oxa), Paclitaxel (Pacli) y Ciclofosfamida (Ciclo). Se realizó un test de Mann-Whitney entre células AQUA+ y AQUA- para cada tratamiento. \*p ≤ 0,05; \*\*p ≤ 0,01. Se realizaron cuatro experimentos en días distintos y se muestran las DS.

Tabla 8. Expresión de DAMPs en células tumorales AQUA<sup>-</sup> y AQUA<sup>+</sup>.

REH	TRATAMIENTO	AQUA <sup>+</sup>				AQUA <sup>-</sup>			
		Anex %	CRT %	HMGB-1 %	ANEX-CRT	Anex %	CRT %	HMGB-1 %	ANEX-CRT
	Sin Tratamiento	4.2 ± 2.5	3.5 ± 2	0.007 ± 0.01	1.6 ± 1	3 ± 2	0.5 ± 0.3	16.2 ± 4.2	0.3 ± 0.01
	Carboplatino	20.8 ± 8	6.7 ± 0.6	20.4 ± 8.4	11.6 ± 8	20 ± 8	0.08 ± 0.06	50 ± 5.2	0.7 ± 0.1
	Gemcitabina	45 ± 13	17 ± 4	68.3 ± 14.2	21.2 ± 8	0.5 ± 0.01	0.47 ± 0.2	14 ± 5.4	0.1 ± 0.02
	Doxorrubicina	19 ± 9	7.2 ± 4	N.D	6.7 ± 1	26 ± 9	0.7 ± 0.5	N.D	4.2 ± 1
	Oxaliplatino	23 ± 11	15.3 ± 5.6	14.6 ± 9.6	7.2 ± 5	2.4 ± 2.1	1.5 ± 0.6	43 ± 12	0.4 ± 0.2
	Paclitaxel	38 ± 4	37 ± 9	44 ± 14	24.7 ± 2.5	5.5 ± 3	0.3 ± 0.2	14 ± 6	0.2 ± 0.03
	Ciclofosfamida	32.7 ± 17	27 ± 9.7	42 ± 11	15 ± 2.8	0.4 ± 0.3	0.2 ± 0.1	13 ± 5.3	1 ± 0.3

CRL2338	TRATAMIENTO	AQUA <sup>+</sup>				AQUA <sup>-</sup>			
		Anex %	CRT %	HMGB-1 %	ANEX-CRT	Anex %	CRT %	HMGB-1 %	ANEX-CRT
	Sin Tratamiento	3 ± 1.3	4 ± 1.3	1 ± 0.2	3 ± 1.2	5 ± 2	3 ± 1.6	35.7 ± 14	2.1 ± 1
	Doxorrubicina	21.6 ± 0.9	5 ± 1.6	N.D	4 ± 0.1	50.6 ± 3.8	1 ± 0.4	N.D	0.45 ± 0.005
	Oxaliplatino	18 ± 3.7	9.7 ± 1.4	6.4 ± 3.1	10 ± 2.6	9.8 ± 1.4	1.2 ± 0.2	30.5 ± 6.8	1.6 ± 1
	Paclitaxel	22.4 ± 3.6	20 ± 13	4.2 ± 2	19 ± 6	5.7 ± 6	7.9 ± 4	18.6 ± 3.5	7.8 ± 1.6
	Ciclofosfamida	12 ± 6	12 ± 3	5 ± 1.4	9 ± 4.5	7.6 ± 2	1.9 ± 1	21.5 ± 12	1.5 ± 0.1

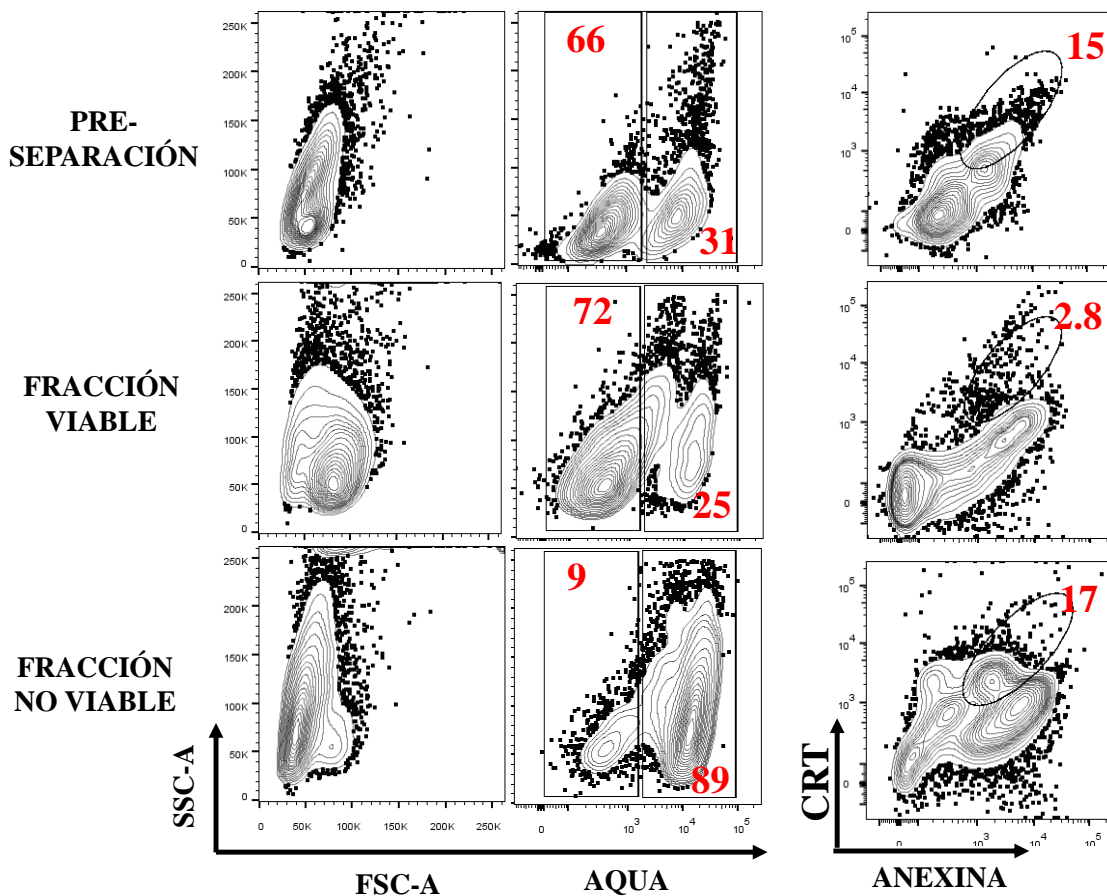
  

KATO III	TRATAMIENTO	AQUA <sup>+</sup>				AQUA <sup>-</sup>			
		Anex %	CRT %	HMGB-1 %	ANEX-CRT	Anex %	CRT %	HMGB-1 %	ANEX-CRT
	Sin Tratamiento	11.5	5	12	1.3	6	2	62.3	2.5
	Gemcitabina	31.4	40	32.3	5.3	2.7	13	40	0.7
	Doxorrubicina	14.5	7	N.D	8.8	3.7	3.7	N.D	1.2
	Oxaliplatino	21.3	20.3	9.6	6.1	6.7	5.6	51	3
	Paclitaxel	31.6	43.4	33.5	5.3	3.5	9	35.5	1.17
	Ciclofosfamida	20.6	32.7	12.5	7.6	3	50	39.2	1.2

(a) Tabla resumen de la expresión de DAMPs en las tres líneas celulares, en células AQUA<sup>-</sup> y AQUA<sup>+</sup> tratadas con diferentes fármacos, se muestra la media y DS de 3 ensayos diferentes para las células REH, 2 ensayos para las células CRL2338 y 1 ensayo para las células KATO III

**4.1.4.2 Las células no viables provenientes de separación por gradiente de densidad (FH) exponen DAMPs en mayor proporción que las células viables.**

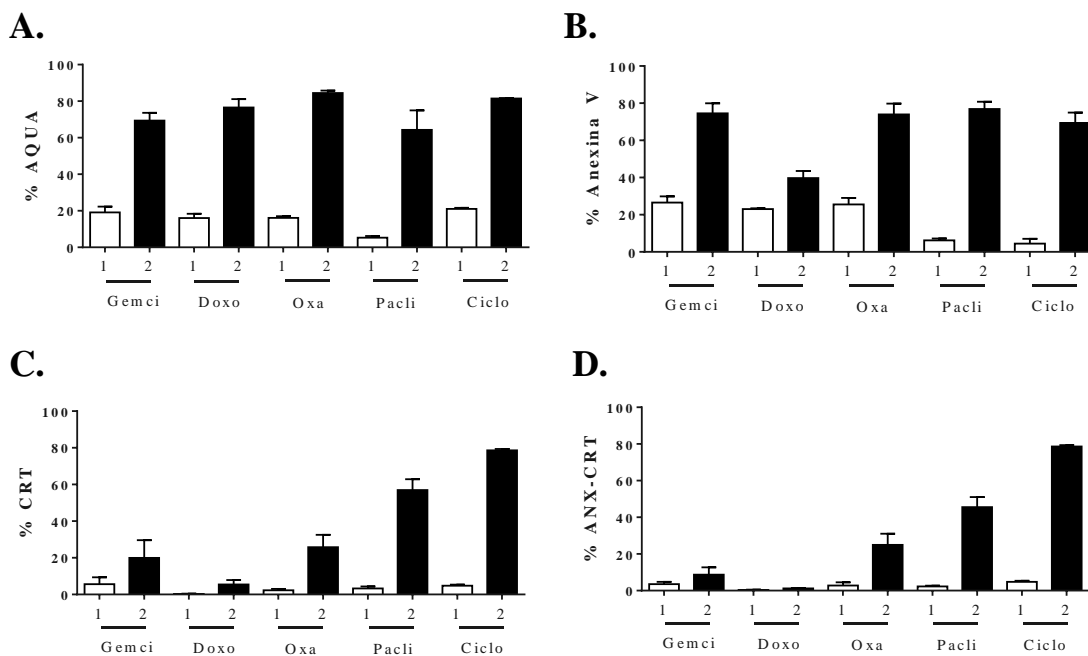
Con base en lo observado en la Figura 13, donde las células AQUA<sup>+</sup> expresaron de manera más eficiente moléculas de MCI luego de tratamiento, las células tratadas se sometieron a separación celular por la técnica gradiente de densidad mediante FH con el objeto de precisar la población celular con mayor expresión de DAMPs. En la Figura 14 se presenta un ejemplo del diseño de la obtención de células tumorales con predominio de expresión de DAMPs.



**Figura 14. Las células no viables provenientes de separación por gradiente de densidad exponen DAMPs en mayor proporción que las células viables.** Se muestra un diagrama del diseño experimental de la obtención de células con predominio de expresión de DAMPs. Las células fueron tratadas con la IC<sub>50</sub> de Oxaliplatino, pasado el tiempo de incubación las fueron caracterizadas molecularmente, evaluando marcadores como AQUA, Anexina V y CRT. Se muestran plots de contorno y puntos en los que evidencia la morfología de células REH por los parámetros FSC / SSC y marcación con AQUA (panel izquierdo), expresión de marcadores de MCI (Anexina V y Calreticulina CRT) (panel derecho).

Las células REH tratadas con Oxaliplatino fueron caracterizadas molecularmente antes y después de la separación por gradiente de densidad, para obtener las fracciones viables y no viables. Estas células se caracterizaron molecularmente mostrando en primera medida el rendimiento de la separación, observado por: (i) características morfológicas por FSC-A y SSC-A donde se evidenció que la fracción proveniente del anillo del Ficoll mostró morfología de células viables y la fracción proveniente del pellet mostró características morfológicas de células no viables (Figura 14, región izquierda), (ii) las células de la fracción no viable captaron en mayor proporción AQUA en comparación con la fracción de células viables (89% y 25% respectivamente), (iii) de la misma manera, las células de la fracción no viable, mostraron mayor expresión de Anexina V y CRT en comparación con las células viables (17% y 2.8% respectivamente). Los datos obtenidos corroboran lo visto en los resultados de la Figura 13.

En la Figura 15 se presenta la expresión de Anexina V y CRT en las fracciones de células provenientes de la separación celular por gradiente de densidad en respuesta a los tratamientos, los resultados muestran que la separación celular hay un enriquecimiento al obtener en una de las fracciones (no viables) predominio de expresión de marcadores de manera no significativa en comparación con la fracción de células viables que mostró una expresión baja. En la tabla 9 se presenta un resumen del efecto de los diferentes tratamientos en relación a la inducción de DAMPs después de la separación celular mostrando que Oxaliplatino, Paclitaxel y Ciclofosfamida son los mayores inductores en la fracción no viable de las células REH.



**Figura 15. Expresión de DAMPs en fracciones de células viables y no viables obtenidas por FH.** Figura de barras donde se evidencia la expresión de AQUA (A), Anexina V (B), CRT (C) y dobles positivas Anexina CRT (D) en células REH tratadas con Carboplatino (Carbo); Gemcitabina (Gemci), Doxorubicina (Doxo), Oxaliplatino (Oxa), Paclitaxel (Pacli) y Ciclofosfamida (Ciclo), sometidas a separación celular por gradiente de densidad a partir de la cual se obtuvieron dos fracciones celulares: Viables (Viabilidad + Barras blancas) y no viables (Viabilidad - Barras negras). Se realizó un test de Mann-Whitney entre células viables y no viables para cada tratamiento. Se realizaron tres experimentos distintos y se muestran las medias y DS.

**Tabla 9. Porcentajes de expresión de DAMPs en fracción de células viables y no viables provenientes de separación por FH.**

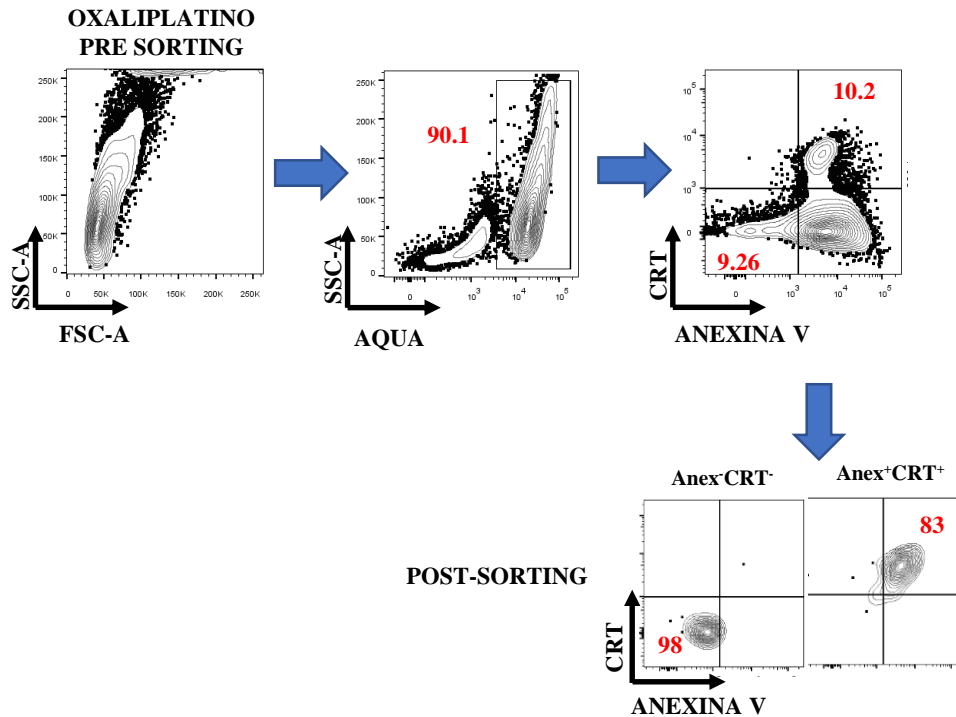
TTO	Fracción células viables				Fracción células no viables			
	AQUA%	Anex %	CRT %	Anex-CRT %	AQUA%	Anex %	CRT %	Anex-CRT %
<b>Gemcitabina</b>	19.1 ± 5.5 (a)	26.5 ± 5.8	5.6 ± 6.4	3.5 ± 2.2	69.3 ± 7.4	74.5 ± 9.4	20 ± 16,7	8.7 ± 7
<b>Doxorrubicina</b>	16 ± 4.1	23 ± 0.6	0.3 ± 0.2	0.4 ± 0,2	76.5 ± 7.9	39.7 ± 6.6	5.4 ± 4.2	1.2 ± 0.4
<b>Oxaliplatino</b>	16.1 ± 1.5	25.5 ± 6	2.2 ± 1.3	2.8 ± 3	84.4 ± 2.3	73.9 ± 10.1	25.7 ± 11.6	25 ± 10.5
<b>Paclitaxel</b>	5.3 ± 1.5	6.1 ± 1.7	3.3 ± 1.8	2.3 ± 0.7	64.2 ± 18.5	76.8 ± 6.8	56.9 ± 10.3	45.5 ± 9.4
<b>Ciclofosfamida</b>	21 ± 0.9	4.4 ± 4.5	4.8 ± 0.9	4.8 ± 0.9	81.4 ± 0.4	69.4 ± 9.6	78.6 ± 1.2	78.6 ± 12

(a) Tabla resumen de la expresión de DAMPs en fracciones de células REH provenientes de separación por FH, se muestra la media y DS de 3 ensayos diferentes para las células.

#### **4.1.4.3 Rendimiento de la obtención por “Sorting Celular” de fracciones celulares CRT<sup>+</sup>/Anexina V<sup>+</sup> de células REH tratadas con Oxaliplatino.**

Con el objeto de evaluar el papel en la activación de DCs de restos celulares de células tratadas que expresan los marcadores CRT<sup>+</sup>/Anexina V<sup>+</sup> se decidió obtener una fracción enriquecida en restos celulares positivos para estos dos marcadores y luego analizar la respuesta de iDCs luego del co-cultivo con estas “vesículas” purificadas. Para esto se tomó la fracción de células REH muertas luego de tratamiento con Oxaliplatino (obtenida a partir de separación por gradiente de densidad) que contenía claramente células distribuidas en cuatro sub-poblaciones celulares (Figura 16 panel inferior) y se procedió a la separación mediante “sorting celular” a partir de células AQUA<sup>+</sup> de las cuatro sub-poblaciones celulares así: CRT<sup>+</sup>/Anexina V<sup>-</sup>, CRT<sup>+</sup>/Anexina V<sup>+</sup>, CRT<sup>-</sup>/Anexina V<sup>-</sup> y CRT<sup>-</sup>/Anexina V<sup>+</sup>.

El monitoreo del rendimiento por FC de cada una de las fracciones obtenidas luego de la separación celular (Figura 16), evidenció que las fracciones separadas: CRT<sup>+</sup>/Anexina V<sup>+</sup> y CRT<sup>-</sup>/Anexina V<sup>-</sup> tuvieron una pureza del 83% y 98% respectivamente. El efecto en el fenotipo de iDCs del co-cultivo de células REH tratadas con distintos medicamentos; de fracciones vivas y muertas obtenidas por FH y vesículas purificadas por “sorting celular” serán presentados en la figura 21.

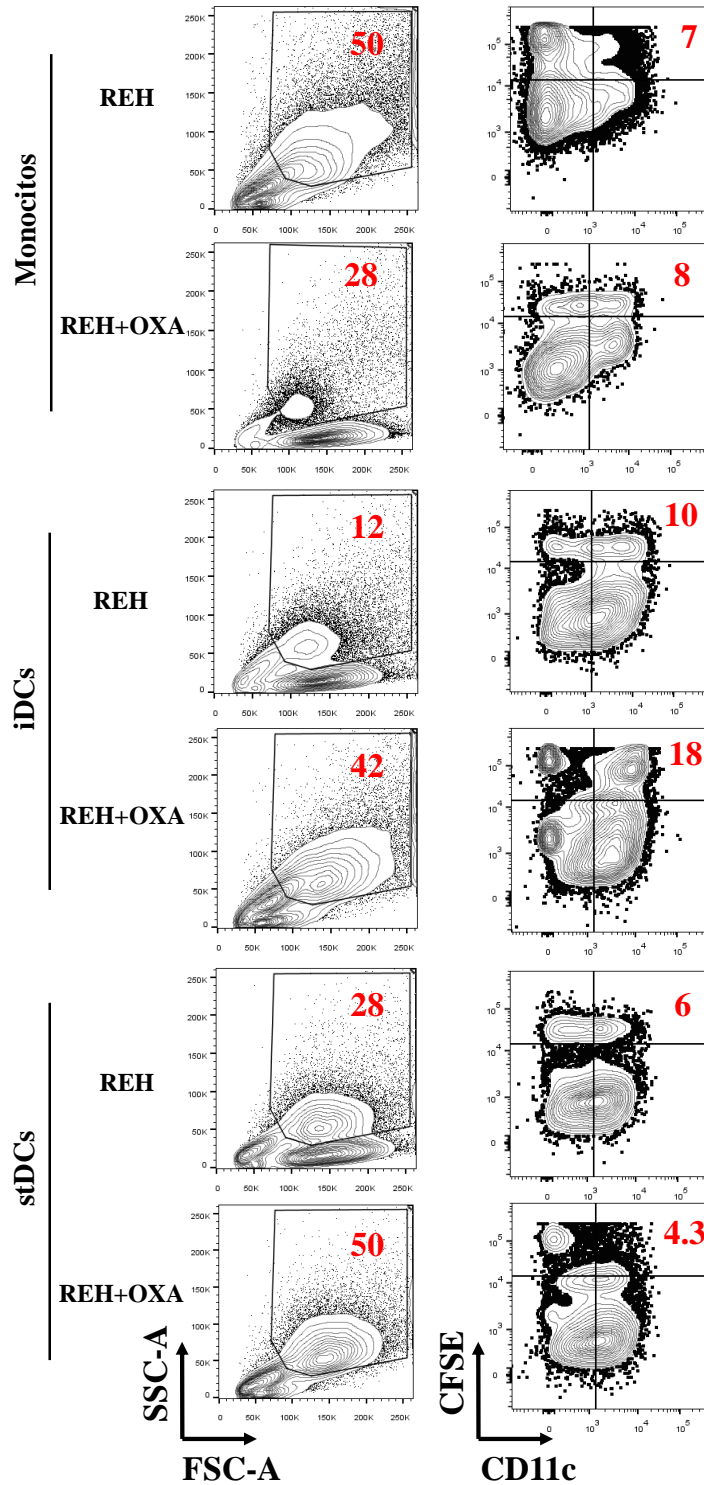


**Figura 16. Fracciones celulares CRT/Anexina V de células REH tratadas con Oxaliplatino.** La fracción de células no viables AQUA<sup>+</sup> obtenidas después del gradiente de densidad se sometió a “sorting celular” por citometría de flujo y se purificaron cuatro sub-poblaciones celulares: CRT<sup>+</sup>/Anexina V<sup>-</sup>; CRT<sup>+</sup>/Anexina V<sup>+</sup>; CRT<sup>-</sup>/Anexina V<sup>-</sup>; CRT<sup>-</sup>/Anexina V<sup>+</sup>. Se observa la morfología celular por SSC-A y FSC-A, a partir de la región AQUA<sup>+</sup> se tomaron las células para la obtención de las cuatro sub-poblaciones. Se evidencia la pureza de cada una de las poblaciones obtenidas en el sorting celular. Se presenta un experimento representativo de tres realizados.

## 4.2 Las células tumorales tratadas con diferentes agentes anti-tumorales favorecen el desempeño de las DCs como células presentadoras de antígeno profesionales.

### 4.2.1 Las células REH tratadas con Oxaliplatino inducen la fagocitosis en iDCs.

La capacidad fagocítica de APCs, en diferentes niveles de diferenciación (Monocitos, iDCs y stDCs) para fagocitar células REH tratadas con Oxaliplatino se analizó por citometría de flujo a fin de determinar el efecto de las células tumorales tratadas sobre el fenotipo funcional característico de células iDCs. Así, al cabo de un co-cultivo de iDCs y células REH tratadas (CFSE<sup>+</sup>) por 48 horas, se seleccionó por SSC y FSC la región correspondiente a DCs (panel izquierdo Figura 17) y en esta zona se analizó el porcentaje de células doble positivas CD11c<sup>+</sup> CFSE<sup>+</sup> con el fin de evidenciar el grado de fagocitosis por iDCs de células REH tratadas con Oxaliplatino (panel derecho Figura 17).



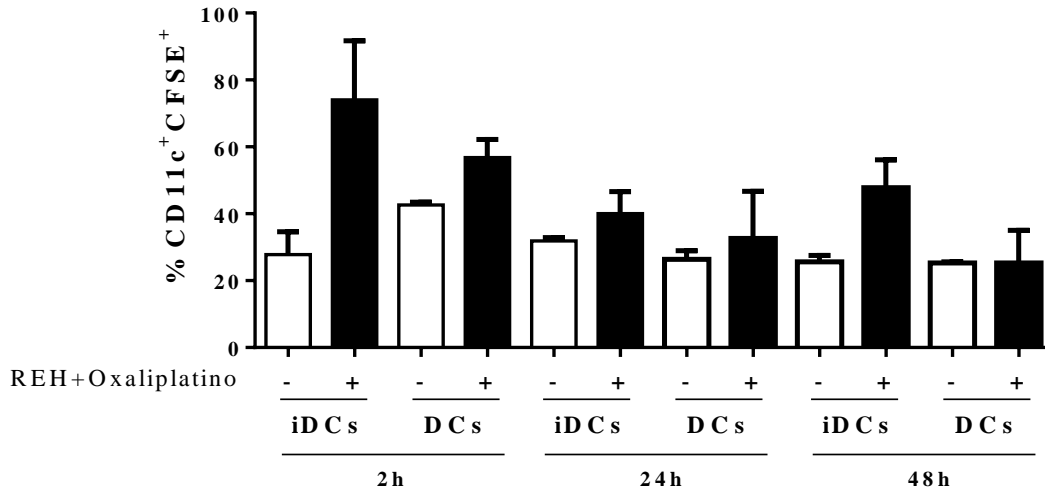
**Figura 17. Inducción de fagocitosis en iDCs por células REH tratadas con Oxaliplatino.** Diagrama de contornos y puntos en el que se analiza por FC la capacidad de monocitos, DCs (CD11c) inmaduras (iDCs) y maduras (stDCs) maduras con coctel de citoquinas: IL-1 $\beta$ , TNF $\alpha$ , IL-6 y Prostaglandina E2) de fagocitar células REH con y sin tratamiento de Oxaliplatino marcadas con CFSE. En la región izquierda se muestra el análisis por FSC-A y SSC-A para tomar la población monocitoide, a partir de la cual se caracteriza el grado de fagocitosis evaluando la formación de poblaciones doble positivas para CD11c y CFSE.

La capacidad fagocítica de APCs, en diferentes niveles de diferenciación (Monocitos, iDCs y stDCs) para fagocitar células REH tratadas con Oxaliplatino se analizó por citometría de flujo a fin de determinar el efecto de las células tumorales tratadas sobre el fenotipo funcional característico de células iDCs. Así, al cabo de un co-cultivo de iDCs y células REH tratadas (CFSE<sup>+</sup>) por 48 horas, se seleccionó por SSC y FSC la región correspondiente a DCs (panel izquierdo Figura 17) y en esta zona se analizó el porcentaje de células doble positivas CD11c<sup>+</sup> CFSE<sup>+</sup> con el fin de evidenciar el grado de fagocitosis por iDCs de células REH tratadas con Oxaliplatino (panel derecho Figura 17).

Los resultados presentados en el panel derecho de la Figura 17 muestran que los porcentajes de células CD11c<sup>+</sup> CFSE<sup>+</sup> fueron los más bajos (7%-8% en los paneles superiores: monocitos y 4.3%-6% en paneles inferiores: DCs maduras). En contraste, los porcentajes de células CD11c<sup>+</sup> CFSE<sup>+</sup> fueron más altos en aquellos cultivos en los cuales se co-cultivaron iDCs con células sin tratar y expuestas a Oxaliplatino (10% y 18%, respectivamente).

Estos resultados sugieren que los monocitos y DCs maduras (stDCs) no manifestaron una capacidad fagocítica importante de células REH tratadas o no con Oxaliplatino y por su parte, las iDCs fagocitaron de manera más eficiente células REH tratadas que no tratadas con Oxaliplatino. (10% y 18% respectivamente). Estas observaciones permiten concluir: (i) que las iDCs utilizadas en este experimento tienen una alta capacidad fagocítica; (ii) que el tratamiento con Oxaliplatino favorece la fagocitosis de células tratadas y (iii) que al cabo de 48 horas de co-incubación con células tratadas, las iDCs conservan su capacidad fagocítica.

La capacidad fagocítica de iDCs se monitoreó durante un tiempo determinado. La Figura 18 refleja que iDCs fagocitaron de manera eficiente células REH tratadas con Oxaliplatino (74%) en comparación con las células REH sin tratamiento (28%) después de las dos horas de co-cultivo. Al completar 24 horas de cultivo, la fagocitosis de las células REH tratadas disminuyó hasta el 40%, mientras que la actividad en el grupo de las células no tratadas se mantuvo con un 31%. Este patrón de comportamiento fue similar al cabo de 48 horas. Dichos resultados sugieren que, de acuerdo a lo esperado, a medida que pasa el tiempo la capacidad fagocítica de las iDCs decrece. Sin embargo, las DCs maduras (stDCs) fagocitan las células REH, bien sea tratadas o no con Oxaliplatino, sin experimentar mayores cambios durante el tiempo y en menor porcentaje al observado en iDCs.



**Figura 18. Cinética de la capacidad fagocítica de iDCs y DCs co-cultivadas con células REH tratadas con Oxaliplatino.** Grafica de barras que muestra el porcentaje de fagocitosis (células CD11c<sup>+</sup> CFSE<sup>+</sup>) por parte de iDCs y DCs co-cultivadas por 2, 24 y 48 horas con células REH tratadas y sin tratar con Oxaliplatino. Se muestra la media y DS. Las barras vacías representan células REH sin tratar (-) y las barras negras representan las células REH tratadas (+).

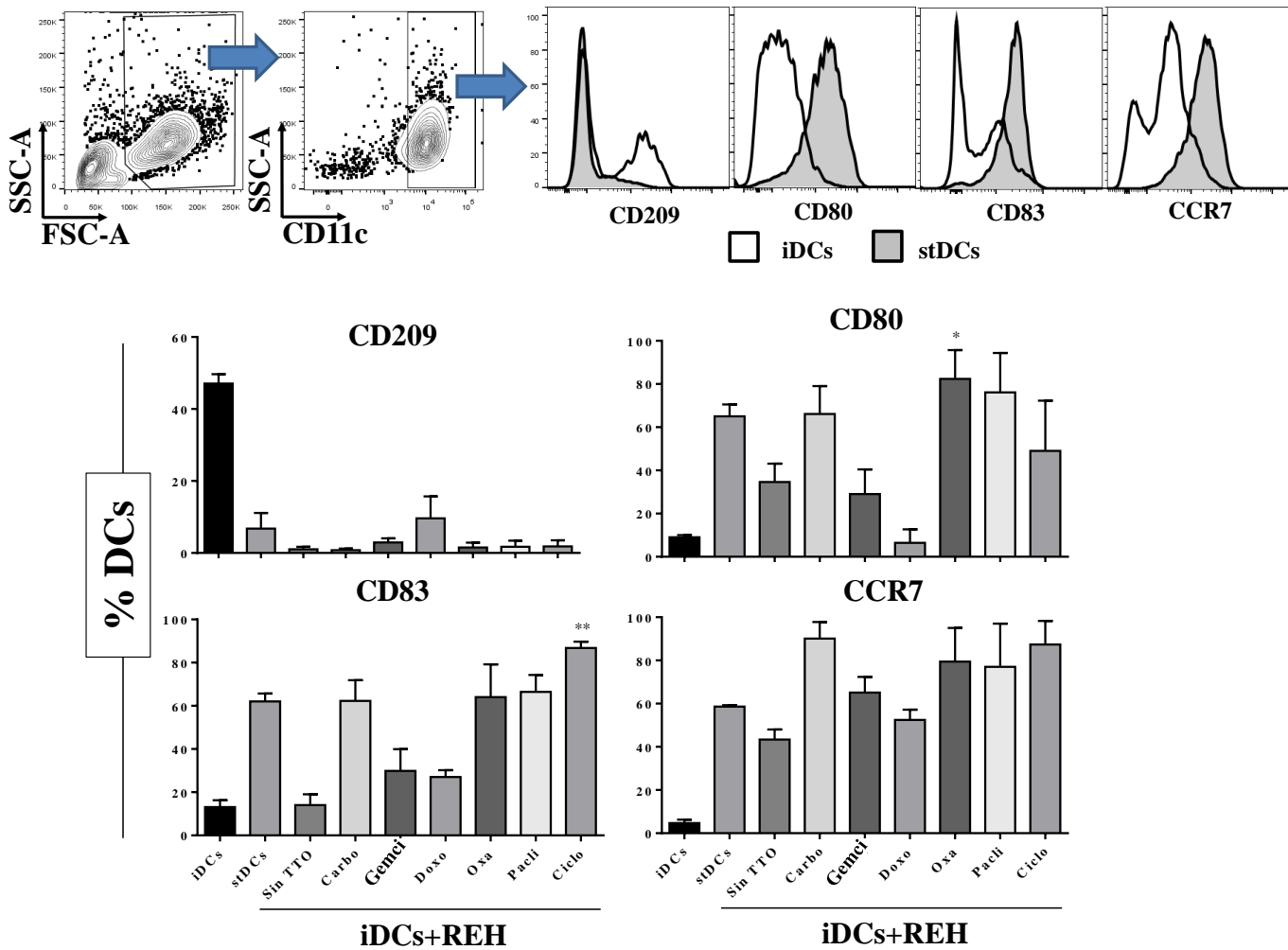
## 4.2.2 Las células tumorales tratadas con diferentes fármacos, inducen maduración de iDCs.

Para evaluar la capacidad de las células tratadas de inducir la maduración de iDCs, se midió la expresión de los marcadores de maduración CD209, CCR7, CD80 y CD83 y se comparó su expresión en iDCs antes y después de su co-cultivo con: (i) Células REH tratadas completas; (ii) fracciones de células REH viables y no viables obtenidas por FH después de tratamiento; y (iii) Poblaciones celulares REH (AQUA<sup>+</sup>, Anexina<sup>+/-</sup>, CRT<sup>+/-</sup>) obtenidas mediante separación por “sorting” celular luego del tratamiento con Oxaliplatino.

### 4.2.2.1 Células REH tratadas con fármacos inducen la maduración de iDCs.

Se evaluó la expresión *in vitro* de marcadores de maduración expresados por iDCs en respuesta a un estímulo pro-inflamatorio (coctel de citoquinas estándar). El panel superior de la Figura 19 muestra que, en respuesta al estímulo con el coctel de citoquinas (stDCs), las iDCs modulan la expresión de los marcadores según lo esperado. En el panel inferior de esta figura, se puede observar en general que las células REH tratadas con diferentes fármacos inducen la maduración de iDCs, evidenciada por la pérdida del marcador CD209 y la sobre-expresión en superficie de los marcadores CD80, CD83 y CCR7.

Cabe resaltar que las células REH sin tratamiento, inducen una disminución en la expresión de CD209 y un discreto aumento en la expresión de CD80 y CCR7 respecto a las células tratadas. Particularmente, se evidenció una elevación estadísticamente significativa, respecto al control de iDCs ( $*p \leq 0.05$ ), en la expresión del marcador CD80 en DCs pulsadas con células REH tratadas con Oxaliplatino. Además, se evidenció una tendencia al aumento de este marcador en iDCs co-cultivadas con REH tratadas con Carboplatino, Paclitaxel y Ciclofosfamida (Figura 19).



**Figura 19. Inducción de maduración de iDCs por parte de células REH tratadas con diferentes fármacos.** Se grafica el análisis realizado para la caracterización del fenotipo de maduración de iDCs. El panel superior evidencia un análisis por FSC-A y SSC-A en el cual se toma la población monocitoide a partir de la cual se caracteriza la población CD11c positiva, dentro de esta población se caracterizan marcadores de maduración de DCs como son CD209, CD80, CD83 y CCR7. Los histogramas vacíos corresponden a iDCs (control negativo) y los histogramas grises corresponden a stDCs (control positivo). En el panel inferior se presenta la comparación de expresión de CD209, CD80, CD83 y CCR7 en células REH tratadas con diferentes fármacos. Se realizó un análisis comparativo por Kruskal-Wallis. \* $p \leq 0.05$ , \*\* $p \leq 0.01$ .

La expresión de CD83 incrementó significativamente en iDCs co-cultivadas con células REH tratadas con Ciclofosfamida y en células REH tratadas con Carboplatino, Paclitaxel y Oxaliplatino se observó un aumento de manera no significativa. Figura 19. Finalmente, en las iDCs co-cultivadas con REH tratadas con todos los fármacos, aumentó la expresión de CCR7, siendo más evidente en iDCs co-cultivadas con Carboplatino, Oxaliplatino, Paclitaxel y Ciclofosfamida. En general, los datos obtenidos muestran que las células REH tratadas con Carboplatino, Oxaliplatino, Paclitaxel y Ciclofosfamida fueron los mejores inductores de maduración de iDCs, razón por lo cual estos tratamientos se emplearon en el resto de las evaluaciones.

#### 4.2.2.2 El tratamiento con Oxaliplatino o Paclitaxel genera una fracción de células REH no viables que maduran eficientemente iDCs.

Con el fin de precisar en el grupo de células REH tratadas el tipo de población responsable de la capacidad de maduración de iDCs, se caracterizaron los marcadores de maduración CD80 y CD83 en iDCs cultivadas con fracciones de células REH viables y no viables obtenidas por FH. Los resultados presentados en la Figura 20 muestran que, en general, la maduración de iDCs fue favorecida por el co-cultivo de iDCs con la fracción de células inviables, en comparación con el co-cultivo de iDCs con la fracción de células viables (Figura 20). Los agentes que indujeron más eficiente la maduración de iDCs fue el Oxaliplatino y Paclitaxel, evidenciado por una desviación a la derecha de los histogramas de las iDCs pulsadas con REH tratadas con estos dos fármacos, respecto al control negativo y positivo (iDCs y stDCs respectivamente) (Figura 20).

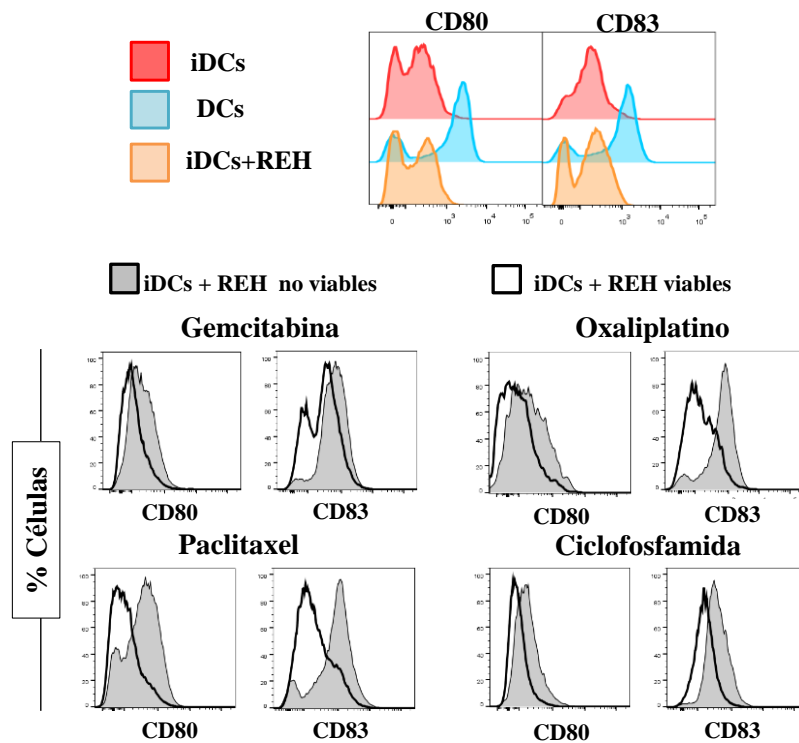
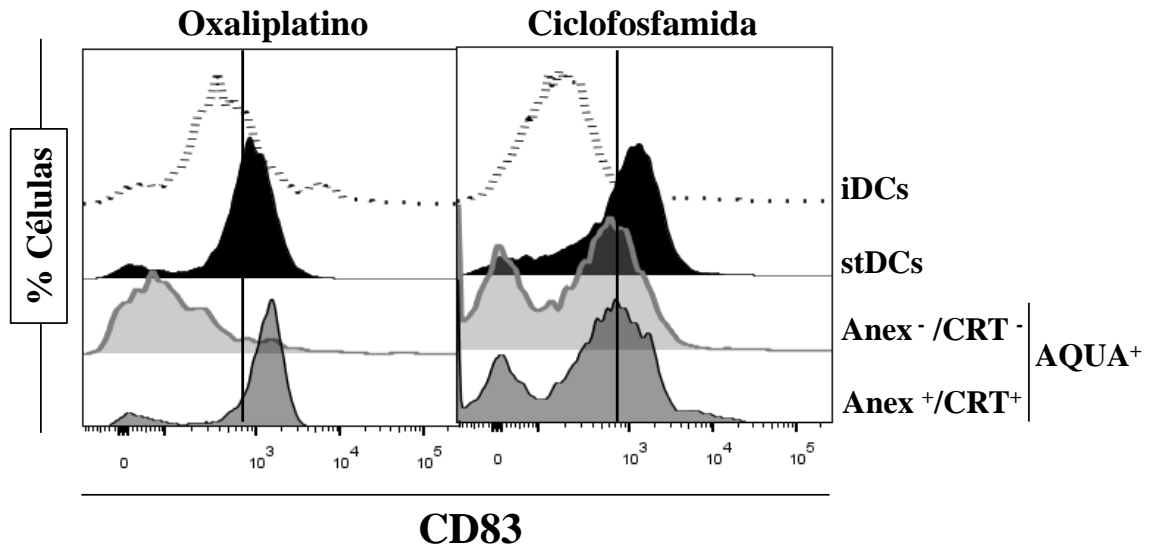


Figura 20. Evaluación de la maduración de iDCs por fracciones de células viables y no viables obtenidas por FH. Los histogramas muestran la expresión de un fenotipo de maduración en el co-cultivo de DCs inmaduras con las fracciones de células

viables y no viables de células REH tratadas y separadas por FH. Se muestra el desplazamiento del histograma con los marcadores de maduración CD80 y CD83 en iDCs pulsadas con REH tratadas con Ciclofosfamida, Gencitabina, Paclitaxel y Oxaliplatino. En el panel superior se muestran los controles usados en el diseño experimental (iDCs (histograma rojo), DCs (histograma azul), iDCs co-cultivadas con células REH sin tratamiento (histograma naranja). En el panel inferior se muestran los histogramas comparativos de expresión de los marcadores de maduración CD80 y CD83; los histogramas vacíos corresponden a iDCs co-cultivadas con células REH viables y los histogramas grises corresponden a células REH no viables.

#### 4.2.2.3 Células positivas para AQUA, Anexina V y CRT inducen la maduración de iDCs.

Después de evidenciar que la fracción de células no viables obtenida por FH estimula de manera eficiente la maduración de iDCs, fue necesario precisar si células triple positivas (AQUA, Anexina V y CRT) obtenidas por “sorting celular” inducen en algún grado la maduración de iDCs. Los resultados recopilados en la figura 21 sugieren que la fracción AQUA<sup>+</sup>, CRT<sup>+</sup> y Anexina V<sup>+</sup>, en comparación con la fracción AQUA<sup>+</sup>, CRT<sup>-</sup> y Anexina V<sup>-</sup> de células REH tratadas con Oxaliplatino y Ciclofosfamida, estimulan eficientemente la maduración de iDCs. Esto corresponde al desplazamiento a la derecha de los histogramas, observando un comportamiento similar al control positivo (stDCs) (Oxaliplatino (85% vs 17% Ciclofosfamida (60% vs 40%)).

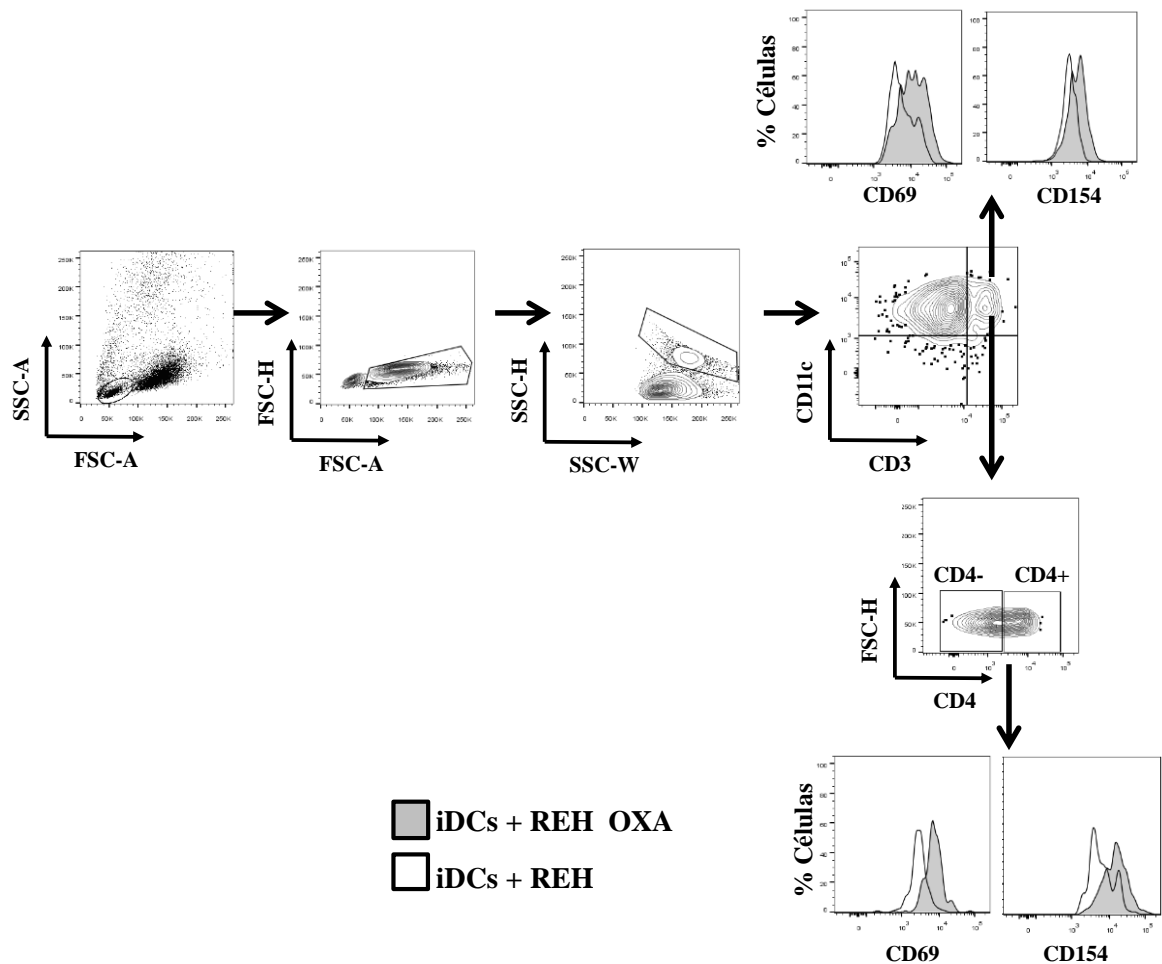


**Figura 21: Evaluación del fenotipo de maduración de iDCs pulsadas con células AQUA<sup>+</sup>, Anexina V<sup>+</sup> y CRT<sup>+</sup> y células AQUA<sup>+</sup>, Anexina V<sup>-</sup> y CRT<sup>-</sup>.** Se cuantificó la expresión del marcador de maduración CD83 en iDCs co-cultivadas con células AQUA<sup>+</sup>, Anexina V<sup>+</sup> y CRT<sup>+</sup> y células AQUA<sup>+</sup>, Anexina V<sup>-</sup> y CRT<sup>-</sup> obtenidas por “sorting” celular. Como control negativo se utilizaron iDCs y como control positivo se utilizaron stDCs. El grado de maduración inducida en iDCs por cada uno de los co-cultivos se monitoreó por FC midiendo la expresión de CD83<sup>+</sup>, en la superficie de las DCs después de 48h de cultivo. Los experimentos fueron realizados con células REH tratadas con Oxaliplatino y Ciclofosfamida. Se muestra un experimento representativo de dos realizados.

#### 4.2.3 Las iDCs pulsadas con células REH tratadas con Oxaliplatino inducen la formación de conjugados de DCs+LTs y la activación de LT CD3<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> durante una MLR

Adicionalmente a la evaluación de la capacidad de células REH tratadas con Oxaliplatino de inducir la maduración de iDCs (medida por la inducción de la expresión de los marcadores CD80, CD83 y CCR7 y la disminución de la expresión de CD209, como se mostró en la Figura 19), se

examinó la eficiencia de iDCs luego de su co-cultivo con células REH tratadas con Oxaliplatino para inducir la formación de conjugados de DCs+LTs (conjugados de células dobles CD11c<sup>+</sup>CD3<sup>+</sup>) [127] durante el reconocimiento de alo-antígenos en MLR. La metodología para la generación de conjugados se describe en el Anexo 9 (Figura S 9) y en la Figura 22, se describe la estrategia para la selección por FC de conjugados formados por DCs (células CD11c<sup>+</sup>) pulsadas con células REH tratadas o sin tratar con Oxaliplatino y LT heterólogos (células CD3<sup>+</sup>) en una reacción mixta de linfocitos. Además de evaluar la formación de conjugados se exploró el grado la activación temprana de LT inducida por la formación de estos conjugados midiendo la expresión de CD69 y CD154 en los LT conjugados a DCs. En breve la metodología fue la siguiente: de un co-cultivo de iDCs del donante 1 con la población linfoide del donante 2 se seleccionó la población linfoide y se seleccionaron los “doublets” por SSC-H y SSC-W, en los cuales se delimitó la población de células doble positivas para CD11c<sup>+</sup> y CD3<sup>+</sup> dentro de la cual se caracterizó el nivel de expresión de los marcadores de activación (CD69 y CD154) en LT CD4<sup>+</sup> y CD4<sup>-</sup> (Figura 22).



**Figura 22. Diagrama explicativo del análisis por FC de formación de conjugados (DCs +LT) y activación de LT durante una MLR.** Análisis de formación de conjugados (CD11c + CD3) a partir del co-cultivo de iDCs (donante 1) pulsadas con células REH tratadas y sin tratar con Oxaliplatino + PBMCs (donante 2). A partir de la población linfoide (definida por FSC-A y SSC-A) luego de excluir los “singlets” (seleccionados por FSA-A y FSC-H) se delimitaron los “doublets” (seleccionados por SSC-H y SSC-W) y dentro

de estos se caracterizó la población doble positiva para CD11c + CD3 (conjugados). Finalmente se evaluó el nivel de expresión de los marcadores de activación CD69 y CD154 en LT presentes en los conjugados, evaluando la expresión de estos dos marcadores en la población de LT CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> y LT CD3<sup>+</sup>CD4<sup>-</sup>. Los histogramas muestran la expresión de un fenotipo de activación de LT en los co-cultivos de PBMCs + iDCs pulsadas con células REH tratadas (Histogramas grises) y sin tratar (histogramas vacíos).

En la Tabla 10 se resumen los resultados del análisis de la formación de “doublets” (conjugados CD11c<sup>+</sup>CD3<sup>+</sup>) y el grado de activación de LT presentes en estos conjugados. Los resultados muestran que los conjugados se formaron mas eficientemente en los co-cultivos de PBMCs con iDCs que fagocitaron REH tratadas con Oxaliplatino (54.1%) vs. el 7.36% promovidos por iDCs que fagocitaron REH sin tratar con Oxaliplatino. Igualmente este porcentaje de formación de conjugados fue mayor al promovido por monocitos co-cultivados con células REH sin tratar (-) o tratadas (+) con Oxaliplatino (MO REH- o MO REH+) o iDCs (21%) y fue cercano al inducido por stDCs (58,6%). De manera interesante el aumento de las intensidades de fluorescencia media (MFI) de los marcadores de activación CD69 y CD154 en los conjugados fue más eficientemente inducida por iDCs + REH tratadas con Oxaliplatino (1704 y 1617 respectivamente) en comparación con los demás co-cultivos teniendo en cuenta los controles (iDCs, stDCs y co-cultivo con monocitos pulsados con REH tratadas o no con Oxaliplatino). Finalmente se evidenció una activación de LT CD4<sup>+</sup> inducida por iDCs + REH tratadas en comparación con el co-cultivo con iDCs + REH sin tratar. Por su parte, los LT CD4<sup>-</sup> no mostraron diferencia entre los co-cultivos con iDCs + REH tratadas y sin tratar con Oxaliplatino.

**Tabla 10. Formación de conjugados y activación de LT a partir de co-cultivo de PBMCs+DCs previamente pulsadas con células REH tratadas y sin tratar con Oxaliplatino.**

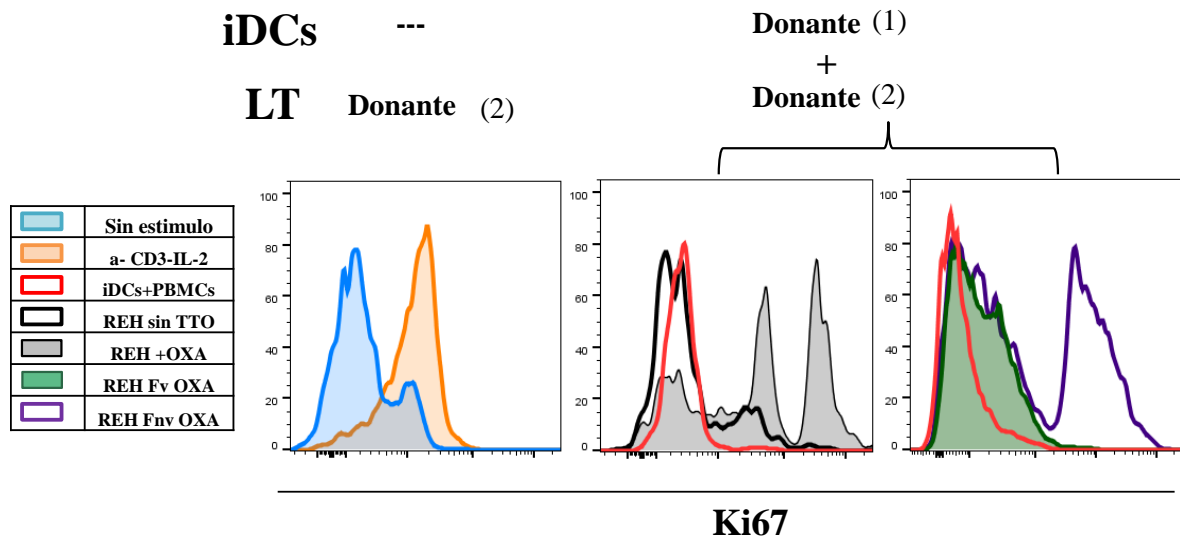
Condición	Doublets %	CD11c/CD3 %	Doublets,CD11c <sup>+</sup> /CD3 <sup>+</sup>		Doublets,CD11c <sup>+</sup> /CD3 <sup>+</sup> /CD4 <sup>+</sup>		Doublets,CD11c <sup>+</sup> /CD3 <sup>+</sup> CD4 <sup>-</sup>	
			MFI CD154	MFI CD69	MFI CD154	MFI CD69	MFI CD154	MFI CD69
MO REH -	3,76	11,1	1182	1070	1260	1231	1026	839
MO REH +	46,3	19,1	933	1011	1155	1147	571	810
iDCs REH -	7,36	10,7	1258	1434	1924	1642	1213	1180
iDCs REH +	54,1	21,5	1704	1617	2008	1912	1290	1116
iDCs	21,3	8,04	1649	1310	1518	1664	1649	1131
stDCs	58,6	15	2044	1475	2195	1712	1942	1307

REH - : Células REH sin tratamiento. REH +: Células REH tratadas con Oxaliplatino. MO: monocitos. iDCs: dendríticas inmaduras. stDCs : dendríticas maduras con coctel estándar.

#### **4.2.3.1 El tratamiento con Oxaliplatino genera una fracción de células REH no viables que favorecen la capacidad proliferativa de linfocitos.**

En la figura 23, se observa que la proliferación de linfocitos (evidenciada como células Ki67<sup>+</sup>) fue negativa en PBMCs no estimulados y en el co-cultivo de PBMCs con iDCs sin estímulo; por el contrario los PBMCs estimulados con perlas anti-CD3/CD28/CD2 + IL-2 mostraron positividad para Ki67<sup>+</sup> evidenciado por un desplazamiento del histograma a la derecha (panel de la izquierda).

Por su parte, iDCs pulsadas con células REH tratadas con Oxaliplatino indujeron proliferación de linfocitos al comparar con el co-cultivo con iDCs pulsadas con células REH no tratadas (panel de la mitad); de acuerdo a lo esperado, las iDCs pulsadas con la fracción de células REH no viables, mostraron inducir proliferación marcada de linfocitos al comparar con el co-cultivo con la fracción de células viables (Panel de la derecha). Los resultados sugieren una mayor eficacia de iDCs pulsadas con células REH tratadas y con la fracción de células REH no viables, para promover una reacción mixta de linfocitos.

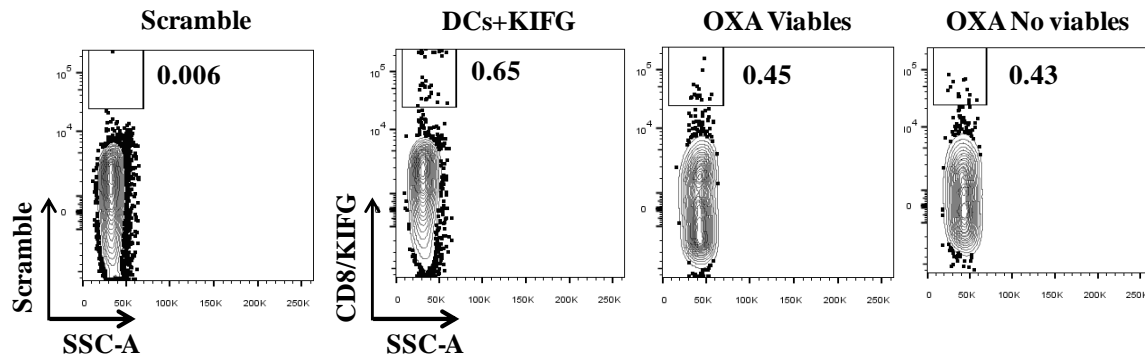


**Figura 23. Evaluación de inducción de proliferación de linfocitos por células REH tratadas con Oxaliplatino.** La gráfica muestra la respuesta de proliferación de linfocitos evaluado por Ki67, después de co-cultivar por 6 días PBMCs con iDCs (relación 1 DC: 5 PBMCs) pulsadas con células REH tratadas (REH+OXA), sin tratar (REH) con Oxaliplatino (OXA) y con las fracciones de células REH viables (Fv OXA) y no viables (Fvn OXA). Como control negativo se usaron PBMCs sin estímulo (Curva azul) y como control positivo PBMCs estimulados con perlas anti CD3/CD2/CD28 + IL-2 (curva naranja.) (Plot izquierdo), en el plot del centro se muestra el análisis de proliferación de linfocitos a partir del co-cultivo con iDCs pulsadas con células REH tratadas y sin tratar con Oxaliplatino. Curva roja: co-cultivo de iDCs + PBMCs; en plot derecho se muestra el análisis de proliferación de linfocitos a partir del co-cultivo con iDCs pulsadas con fracciones de células REH viables (histograma verde) y no viables (curva morada). Se muestra un experimento representativo de dos realizados.

#### 4.2.3.2 Células tumorales muertas por la acción de agentes anti-tumorales inducen la presentación cruzada de antígenos en DCs de origen mielóide.

Para demostrar la capacidad de DCs de hacer presentación cruzada de antígenos a LT CD8 luego de ser cargadas con células tumorales muertas, PBMCs fueron obtenidos de una paciente HLA-A\*02:01 con cáncer de mama ductal Her2/neu (+++) en remisión completa luego de 10 años de tratamiento con cirugía y quimioterapia en quien recientemente hemos podido demostrar que la expansión en PBMCs de LT CD8 específicos para la epítpe HLA-A\*02:01 (KIFGSLAFL) de la proteína Her2/neu fue favorecida por el tratamiento anti-tumoral[128]. iDCs derivadas de monocitos de la paciente que maduraron luego de fagocitar fracciones de células CRL2338 (Her2/neu<sup>+++</sup>) viables y no viables obtenidas por FH luego del tratamiento con Oxaliplatino

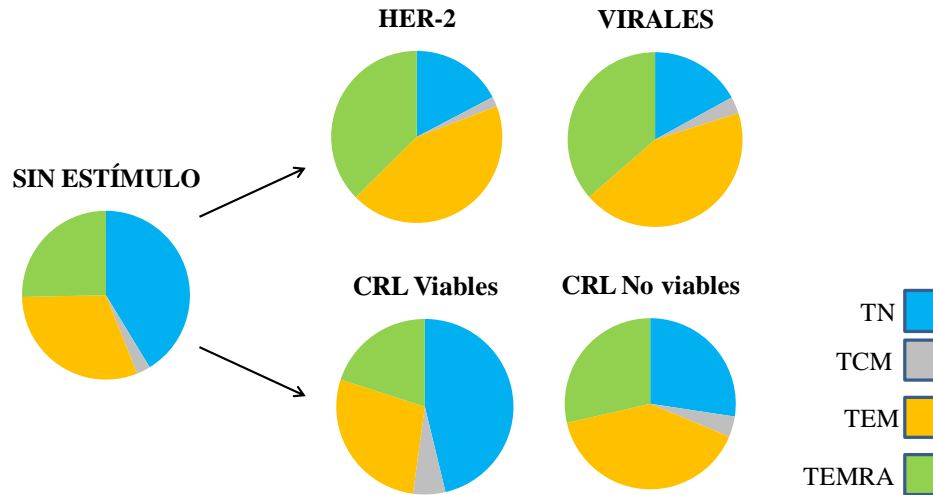
(Figura S 12), fueron utilizadas como APCs para estimular PBMCs de la paciente por 6 días luego de lo cual se analizó el grado de expansión de LT CD8<sup>+</sup> tetrámero positivas para la epítotope KIFGSLAFL. La especificidad de la tinción de LT CD8<sup>+</sup> tetrámero positivo en PBMCs de la paciente estimulados con el péptido KIFGSLAFL y teñidas con tetrámero HLA-A\*02:01 específico para este péptido se muestra en la Figura 24. Los resultados mostrados en la Figura 24 en cuanto a la expansión de LT CD8<sup>+</sup> específicos para el péptido KIFGSLAFL presentes en PBMCs luego del estímulo con: (i) standard DCs pulsadas con el péptido KIFGSLAFL (control positivo); (ii) iDCs pulsadas con CRL2338 viables y no viables, sugieren que tanto células CRL2338 viables como no viables producto del tratamiento con Oxaliplatino tuvieron la capacidad de inducir presentación cruzada de la epítotope KIFGSLAFL a LT CD8.



**Figura 24. Respuesta específica de LT CD8 a un péptido de Her2/neu inducida por iDCs pulsadas con células CRL2338 viables o no viables luego del tratamiento con Oxaliplatino.** Evaluación de respuesta específica por parte de LT CD8 a Her2/neu. Como fuente de antígeno se usaron células CRL2338 tratadas con Oxaliplatino que posteriormente se separaron por FH en fracciones viables y no viables, las cuales fueron co-cultivadas con iDCs de la paciente por 48 horas. Luego del tiempo de incubación se adicionaron a las DCs PBMCs de una paciente HLA-A\*02:01 con cáncer (Her2/neu +++ ) y el co-cultivo se incubó por 6 días (ver métodos). Como control positivo se usaron stDCs pulsadas con péptido KIFGSLAFL, pool de las epítotope virales HLA-A\*02:01: CMV (NLPMVATV), FLU (GILGFVFTL) y EBV (GLCTLVAML). Como control negativo se usaron PBMCs sin estímulo.

El fenotipo efector o de memoria de células tetrámero-positivas específicas para la epítotope KIFGSLAFL fue determinada por la marcación del cultivo con anticuerpos anti-CD45RA y anti-CCR7. La distribución de las células tetrámero-positivas específicas para el péptido KIFGSLAFL en las cuatro sub-poblaciones de LT CD8<sup>+</sup> en las células ex vivo (sin estímulo) y estimuladas con el péptido KIFGSLAFL se muestran en la Figura 25. Como controles positivos, en este experimento se muestra la distribución de LT CD8<sup>+</sup> tetrámero positivos específicos para: (i) el péptido KIFGSLAFL de Her2/neu logrado luego de la estimulación de los PBMCs de la paciente con stDCs pulsadas con este péptido KIFGSLAFL; y (ii) tres péptidos virales HLA-A\*02:01 restringidos establecida con un pool de tres tetrámeros HLA-A\*02:01 específicos para los mismos péptidos en PBMCs luego del estímulo in vitro con estas epítotope (virales). Finalmente, el análisis de la distribución en las cuatro sub-poblaciones de LT CD8 de células tetrámero positivas para el péptido KIFGSLAFL alcanzada luego del co-cultivo de PBMCs con DCs pulsadas con la fracción de células CRL2238 viables fue similar al de las células ex vivo, en contraste, los LT CD8<sup>+</sup> estimulados con iDCs pulsadas con la fracción de células CRL2338 no viable experimentaron una expansión de TEM y una disminución de TN. De manera interesante esta distribución fue similar a la obtenida en los cultivos control positivo inducido bien sea por la estimulación de PBMCs con

stDCs pulsadas con el péptido KIFGSLAFL o de éstos con DCs pulsadas con el pool de tres péptidos virales (influenza, CMV y Epstein Barr) (Figura 25)



**Figura 25. Distribución de las células tetrámero-positivo específicas para el péptido KIFGSLAFL en cuatro sub-poblaciones de LT CD8+ obtenidas luego de co-cultivo de PBMCs y DCs-con fracciones de células CRL2338 tratadas con Oxaliplatino viables o no viables.** Expansión de LT CD8+ efectoras y de memoria a partir de co-cultivo de iDCs pulsadas con fracciones de células CRL2338 viables (CRL viables) o no viables (CRL no viables) por 6 días con PBMCs de una paciente con cáncer de mama (Her2/neu<sup>+++</sup>) HLA-A\*02:01. Pasado el tiempo de incubación, se marcaron las células con CD8, CD45RA, CCR7 y Tetrámero específico para KIFGSLAFL en LT CD8+. Como control positivo se cultivaron stDCs pulsadas con: (i) péptido KIFGSLAFL y (ii) pool de péptidos virales CMV (NLPMVATV), FLU (GILGFVFTL) y EBV (GLCTLVAML). Como control negativo se usaron PBMCs sin estímulo y marcación con tetrámero “scramble”.

## 5 DISCUSIÓN

Algunos regímenes de quimioterapia inducen en células tumorales muerte celular inmunogénica (MCI), la cual contribuye al control tumoral como consecuencia de la activación del sistema inmune innato y adaptativo. Marcadores característicos de MCI conocidos como DAMPs son la secreción de HMGB-1 y ATP, la exposición de fosfatidilserina y CRT en la superficie celular y la generación de cuerpos apoptóticos que favorecen la maduración y activación de DCs las cuales activan eficientemente LT anti-tumorales [35]. Existen diferentes tipos de inductores de MCI, tales como la quimioterapia, radioterapia, la terapia fotodinámica y los virus oncolíticos, entre otros [25]. Diversos estudios han demostrado en modelos animales con ratones inmunocompetentes y pacientes con cáncer que fármacos como la Ciclofosfamida, la Doxorrubicina, la Epirubicina, el Oxaliplatino y la Mitoxantrona [119] cumplen apropiadamente esta función dado su capacidad para (i) estimular las funciones del sistema inmune, (ii) inhibir la inmunosupresión característica del cáncer, (iii) estimular la antigenicidad de las células cancerígenas y (iv) inducir MCI, favoreciendo la respuesta específica a antígenos tumorales [38, 129-131]. En este estudio se evaluó *in vitro* la expresión de DAMPs en tres diferentes líneas celulares en respuesta al tratamiento con quimioterapéuticos de uso común, caracterizando además, su potencial en la activación de DCs como células presentadoras de antígeno con el objeto de crear un sistema eficiente de obtención de células tumorales como fuente potencial de antígeno para el posterior desarrollo de vacunas autólogas basadas en DCs.

El implementar un sistema *in vitro* de selección de células tumorales que han muerto vía MCI como fuente potencial de antígenos para el desarrollo de vacunas contra el cáncer, abre la posibilidad de implementar nuevas terapias antitumorales que restablezcan la inmuno-vigilancia tumoral [129]. En este sentido, se han reportado resultados prometedores como los señalados por *Chiang et al*, quienes estudiaron la inmunogenicidad de antígenos tumorales provenientes de células tumorales tratadas con diferentes inductores de muerte, resaltando el posible uso de estas células como herramienta en el desarrollo de vacunas contra el cáncer [132, 133]. Estos trabajos resaltan la función combinada de DCs cargadas con células tumorales en vacunas personalizadas como escenario ideal gracias a la baja toxicidad, alta inmunogenicidad, la independencia del tipo de HLA y el reducido riesgo de inducir evasión inmunológica [25]. La aprobación de la FDA de Sipuleucel-T (Provenge) en pacientes con cáncer de próstata metastásico, es un buen preámbulo para el uso de DCs pulsadas con células tumorales autólogas como vacuna [67].

Es importante destacar que aunque la medición de DAMPs es útil para identificar células que experimentan MCI, el estándar de oro para evaluar la inmunogenicidad de estas células es la vacunación [39]. Sin embargo, el elevado costo y la alta complejidad de estudios pre-clínicos y clínicos acerca del desarrollo de inmunogenicidad de células tratadas con fármacos *in vivo*, demanda la implementación de ensayos *in-vitro* orientados a explorar inicialmente su papel en la activación de la respuesta inmune. Es importante además, examinar la naturaleza del fenotipo de MCI expresado en las células tumorales tratadas dado que puede estar relacionado con su capacidad para madurar DCs o por la facultad de las DCs pulsadas con células tumorales tratadas para estimular linfocitos T anti-tumorales *in vitro*. En este estudio se obtuvieron células tumorales

con una marcada expresión de DAMPs (Anexina V (Fosfatidilserina) y CRT) luego del tratamiento con fármacos comúnmente utilizados en la quimioterapia de cáncer, implementando adicionalmente un sistema de purificación que permitió aprovechar dichas células para activar iDCs y estimular su capacidad para presentar antígenos a linfocitos T anti-tumorales.

Nosotros evaluamos en tres líneas celulares: REH (Leucemia Linfoblástica de precursores B), CRL2338 (Cáncer de mama Her2/neu<sup>+++</sup>) y KATO III (Cáncer gástrico), la capacidad del Carboplatino, Gemcitabina, Doxorubicina, Oxaliplatino, Paclitaxel y Ciclofosfamida, que ha sido demostrado previamente por otros autores tienen un efecto inmunogénico importante en la inducción de MCI [15, 90, 134]. Consideramos que los resultados obtenidos señalan hacia la utilidad del uso de sistemas de tamizaje *in vitro* de la actividad anti-tumoral de agentes quimioterapéuticos como herramienta para evaluar el posible efecto citotóxico de los fármacos en células tumorales *in vivo*. Se evidenciaron efectos diferentes de cada quimioterapéutico sobre la viabilidad de las tres líneas celulares evaluadas, en concordancia con los resultados de Obeid *et al* [15], quien caracterizó el efecto citotóxico de varios inductores de muerte en células CT26.

Se evidenció que en las células REH al igual que en células CRL2338 y KATO III, la Doxorubicina incremento substancialmente la expresión de Anexina V en comparación con los otros tratamientos. Estas células se caracterizaron por ser células hipoploides (Sub-G0-G1), exhibir pérdida del potencial de membrana mitocondrial y activar las caspasas 3-7 y 8, confirmando en el caso de células REH lo reportado por Fucikova y *et al*, en células REH tratadas con antraciclinas (Doxorubicina e Idarrubicina) [122]. Por su parte, la Ciclofosfamida y la Gemcitabina en células REH, indujeron un tipo de apoptosis tardía detectada en el análisis por FC como células AQUA<sup>+</sup>Anexina V<sup>+</sup>. Otro de los efectos de estos agentes fue la disminución del potencial de membrana mitocondrial y la aparición de células hipoploides (Sub-G0-G1). Lo anterior, se correlacionan con los resultados publicados por Schiavoni *et al.*, y Angelova *et al.*, [90, 135] quienes corroboraron el efecto apoptótico de la Ciclofosfamida y la Gemcitabina respectivamente.

El análisis del papel de los fármacos utilizados en la expresión de marcadores de MCI, reveló que las células REH tratadas con Gemcitabina, Doxorubicina y Oxaliplatino exhibieron una mayor expresión de Anexina V y CRT. Por su parte, en la línea celular CRL2338 se evidencio una fuerte expresión de estos marcadores al exponerse a tratamiento con Doxorubicina y Oxaliplatino. En la línea KATO III, los mejores inductores de marcadores de MCI fueron Doxorubicina, Oxaliplatino, Paclitaxel y Ciclofosfamida. Estos resultados se corroboran con lo descrito por Vacchelli *et al.*, y Poly *et al.*, quienes han revisado las bondades de varios inductores de MCI [39]. Cabe anotar que al evaluar por FC en células completas la expresión de HMGB-1, no se evidenció cambios significativos entre las células tratadas y sin tratar con los diferentes fármacos. A partir de una primera aproximación de la expresión de DAMPs luego del tratamiento en células completas discriminando su expresión entre células AQUA<sup>+</sup> y AQUA<sup>-</sup>, se observó que Anexina V y CRT se expresan predominante en células que han perdido su viabilidad (AQUA<sup>+</sup>). Así mismo, la expresión de HMGB-1 en células sin tratamiento y las tratadas con Oxaliplatino y Carboplatino mostraron una mayor expresión de dicho marcador en células AQUA<sup>-</sup> comparado con las AQUA<sup>+</sup>. Esto sugiere la secreción de esta proteína al medio de cultivo por parte de las células AQUA<sup>+</sup>, lo cual coincide con los hallazgos de Yang *et al.*, quienes describieron que las células tratadas con

Antraciclinas y Oxaliplatino inducen un tipo especial de muerte llamada necroptosis (necrosis programada) y las células que experimentan este tipo de muerte expresan proteínas como RIP3 y MLKL, las cuales son indispensables para la liberación de HMGB-1 [136]. La muerte inducida por Antraciclinas y Oxaliplatino se asocia con el estrés del retículo causado por este tipo de agentes quimioterapéuticos [137-139], acompañado de la producción de ROS, la alteración del potencial de membrana mitocondrial e inhibición de NF- $\kappa$ B. Lo anterior, se correlaciona con nuestros resultados en el sentido que al tratar las células REH con Oxaliplatino se evidenció una disminución del potencial de membrana mitocondrial, producción de ROS e inhibición la vía NF- $\kappa$ B medido por la baja expresión de este marcador y de COX-2 un fenotipo similar al observado por Ma *et al.*, luego de evaluar un inductor de necroptosis *in vitro* en células de cáncer de pulmón [140].

De otra parte, las células tratadas con Gemcitabina, Paclitaxel y Ciclofosfamida mostraron mayor expresión de DAMPs en células AQUA<sup>+</sup> lo que concuerda con el estudio hecho por Angelova *et al.*, [135] quien estudiando células tumorales diferentes a las utilizadas por nosotros describió que debido a su naturaleza pro-apoptótica la Gemcitabina interfiere con la secreción de HMGB-1 debido a la desacetilación de histonas causada por el fármaco lo cual promueve la retención de esta proteína en el núcleo y acumulación en cuerpos apoptóticos [135].

Es conocido que ROS induce mecanismos de escisión de bases en el DNA que generan rupturas y la consecuente activación de PARP por parte de la célula para su reparación [141]. ROS (generado en el lumen del ER) genera estrés oxidativo favorecido por la fuga de calcio del ER a la mitocondria, aumentando la carga de calcio mitocondrial [142], promoviendo la generación de ROS desde la mitocondria [143]. Diversos autores han sugerido que el ROS mitocondrial junto con el ROS generado en el lumen del ER favorecen la generación de MCI [144]. Adicionalmente, activan la calpaina (proteasa dependiente de calcio), la cual probablemente impulsa el clivaje de BAP31 en el retículo endoplásmico por la caspasa 8 [145], generando p20 que es un fragmento pro-apoptótico que interactúa con BCL-2 para liberar BAX y BAK [49, 145, 146], alterando así la permeabilidad mitocondrial con la consecuente liberación de CITOCROMO C [147].

Esta secuencia de eventos se correlaciona con los resultados obtenidos en este estudio puesto que al tratar las células con Oxaliplatino y Paclitaxel se evidenció un aumento en la tasa de producción de ROS, inhibición de la proteína anti-apoptótica BCL-2, aumento de expresión de PARP y CITOCROMO C. No obstante, el aumento en la expresión de NF $\kappa$ B y COX-2 inducido por Paclitaxel podría ser explicado como consecuencia de una limitada expresión de PPAR $\gamma$ , factor importante de inhibición de proteínas pro-inflamatorias [148].

Una vez se presenta estrés de ER y se activa la apoptosis, la CRT es traslocada a la superficie celular [144]. Investigaciones realizadas por Panaretakis, señalan que la inhibición de la caspasa 8 o BAP31 impide la translocación de CRT en la superficie de células expuestas a tratamiento con antraciclinas u Oxaliplatino, lo cual sugiere un importante papel de la caspasa 8 en la generación de MCI [49, 144]. Es importante resaltar que en respuesta al tratamiento con Oxaliplatino, las células REH aumentaron la producción de ROS, la expresión de CRT, se indujo la activación de la caspasa 8 (, la disminución de BCL-2, se estimuló la producción de CITOCROMO C y una

disminución significativa del potencial de membrana mitocondrial, confirmando que Oxaliplatino genera MCI atribuible al estrés de ER.

Los resultados obtenidos sugieren que las células que han perdido su viabilidad expresan DAMPs de manera más eficiente que las células viables lo cual fue demostrado con las fracciones obtenidas por FH y por “sorting” celular. La fracción no viable estimuló la fagocitosis de células tumorales por iDCs, su maduración y el procesamiento de antígenos tumorales probablemente gracias al reconocimiento de CRT por parte de CD91, del ATP por receptores purinérgicos y la nucleoproteína HMGB-1 por TLR-4 [35]. El reconocimiento de HMGB-1 por el TLR-4 ha sido sugerido Apetoh et al., está involucrado en el procesamiento y presentación cruzada de antígenos provenientes de células tumorales [23]. Un su estudio él evidenció que la señalización vía TLR-4 con su adaptador MyD88 es necesaria para la obtención de una respuesta específica y duradera contra del tumor y muestra que la estimulación de HMGB-1 vía TLR4 en la célula presentadora previene la degradación prematura de epítopes y promueve la presentación cruzada de antígenos para la activación de CTLs [23].

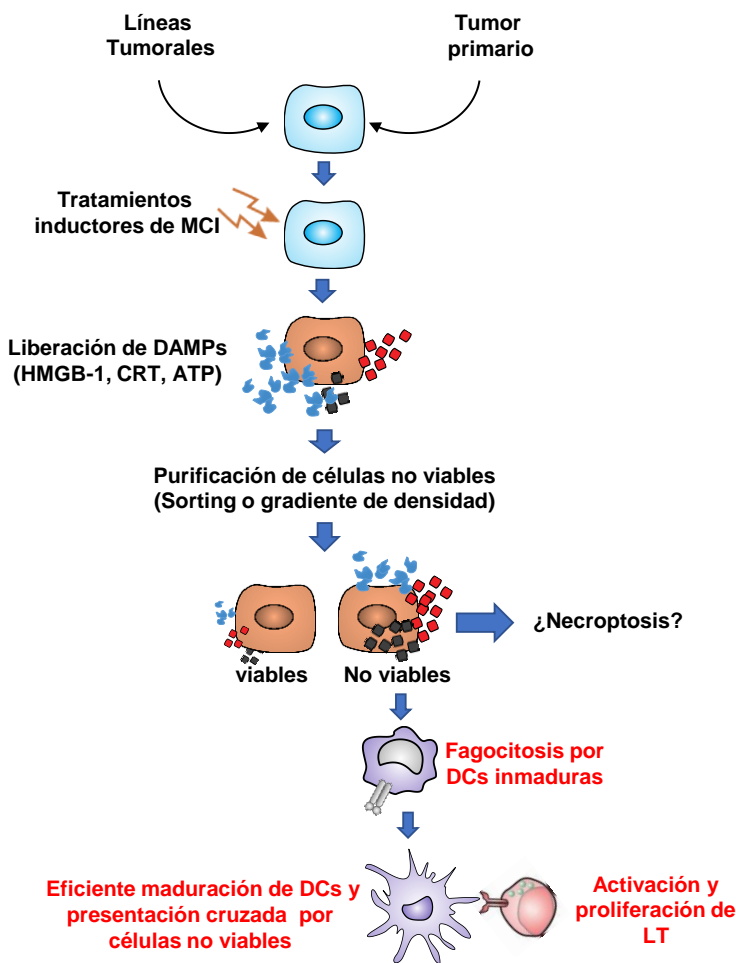
La habilidad de células AQUA<sup>+</sup> que expresan marcadores de MCI en la activación de DCs fue evidente al inducir DCs maduras caracterizadas por un inmuno-fenotipo específico (CD11c<sup>+</sup>, CD83<sup>+</sup>, CD80<sup>+</sup>, CCR7<sup>+</sup>, CD209<sup>-</sup>) y el aumento en la secreción de citoquinas como IL-1 $\beta$  (dato no mostrado). La interleuquina 1 $\beta$  es indispensable para desencadenar una cascada de eventos que culmina con el reclutamiento y la maduración funcional de LT [54]. Liu y et al. demostraron en células tumorales tratadas con Oxaliplatino y Gemcitabina que debido al aumento de la expresión de moléculas HLA tipo I en células tumorales humanas (Cáncer de Colon, Pulmón y seno) tratadas y la secreción de citoquinas pro-inflamatorias que estimulan la maduración de iDCs, se favorece una respuesta adaptativa contra estos tipos de cáncer [80].

La formación de conjugados inmunes (DCs-LT (CD11c+CD3) favorecida mayoritariamente por iDCs pulsadas con REH tratadas con Oxaliplatino - específicamente por iDCs cargadas con la fracción no viable, estuvo asociada a la activación de LT-CD4<sup>+</sup> comprendidos en los conjugados (medida por la sobre-expresión de CD69 y CD154) durante las primeras seis horas del ensayo MLR y en fases tardías del MLR de la proliferación de LT medida por Ki67. Estas observaciones esbozan que el efecto inmunogénico de algunos fármacos como Oxaliplatino, es mediado por la interacción de iDCs y LT, favorecido por una serie de señales inmunogénicas que estimulan a las iDCs a capturar Ags derivados de las células tumorales muertas, los cuales eventualmente podrían ser presentados por presentación cruzada a CD8<sup>+</sup>, generando una respuesta inmune específica contra el tumor [74].

La presentación cruzada de antígenos tumorales inducida por células tumorales tratadas es sugerida en nuestro trabajo por los experimentos realizados con iDCs derivadas de monocitos de una paciente con cáncer de mama Her2/neu<sup>+++</sup>, las cuales luego de ser pulsadas con la línea celular de cáncer de mama CRL2338 (Her2/neu<sup>+++</sup>) tratada con Oxaliplatino estimularon LT-CD8<sup>+</sup> pre-existentes en PBMCs de esta paciente [128]. Al incubar iDCs autólogas pulsadas con CRL2338 tratadas con Oxaliplatino se produjo un cambio en el fenotipo de iDCs a DCs maduras. La presentación cruzada de la epítope KIFGSLAFL es sugerida por el cambio en la distribución de

las diferentes sub-poblaciones de LT de memoria observada que fue similar a la inducida en PBMCs por iDCs pulsadas con la epítoto sintética (péptido KIFGSLAFL) y la expansión de LT-CD8+ efectoras tetrámero positivas específicos de Her2/neu (Figuras) [16].

En resumen, los datos obtenidos permiten establecer que las células tumorales tratadas con Oxaliplatino que expresan DAMPs, activan eficientemente el sistema inmune innato y adaptativo. Soporte de esto, la maduración de iDCs, la inducción de fagocitosis, la formación de conjugados, la activación mixta de LT y la inducción de LT CD8 efectoras específicas. Así pues, la estrategia de trabajo presentada aquí posibilitaría un tamizaje de cáncer primarios, donde la MCI de células tumorales in vitro serían una herramienta útil para la selección de vacunas contra diferentes tipos de tumor dado que estimularían eficientemente la maduración de DCs y la activación de CTLs antitumorales ver diagrama de resumen de resultados (Figura 26).



**Figura 26. Diagrama resumen de resultados.** Células tumorales (línea celular o células primarias) tratadas con fármacos comúnmente utilizados en quimioterapia pueden expresar DAMPs, que eficientemente activan el sistema inmune innato y adaptativo. En este estudio lo anterior pudo ser evidenciado por la eficiente maduración de iDCs luego de que estas fagocitan cuerpos apoptóticos producto de la actividad citolítica del fármaco sobre la célula tumoral. El efecto sobre los linfocitos T pudo ser evidenciado por la formación de conjugados, la activación y la proliferación de LT promovidas por iDCs maduras por células tumorales en ensayos de MLR y por la capacidad de estas iDCs para hacer presentación cruzada de antígenos a LT CD8 específicos para un antígeno tumoral.

## 6 BIBLIOGRAFIA

1. Ferlay, J., et al., *Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008*. Int J Cancer, 2010. **127**(12): p. 2893-917.
2. Willingham, A.T., et al., *RNAi and HTS: exploring cancer by systematic loss-of-function*. Oncogene, 2004. **23**(51): p. 8392-400.
3. Loibl, S., et al., *Clinical feasibility of (neo)adjuvant taxane-based chemotherapy in older patients: analysis of >4,500 patients from four German randomized breast cancer trials*. Breast Cancer Res, 2008. **10**(5): p. R77.
4. Ramakrishnan, R., S. Antonia, and D.I. Gabrilovich, *Combined modality immunotherapy and chemotherapy: a new perspective*. Cancer Immunol Immunother, 2008. **57**(10): p. 1523-9.
5. Menard, C., et al., *Cancer chemotherapy: not only a direct cytotoxic effect, but also an adjuvant for antitumor immunity*. Cancer Immunol Immunother, 2008. **57**(11): p. 1579-87.
6. Andersen, M.H., et al., *Cancer treatment: the combination of vaccination with other therapies*. Cancer Immunol Immunother, 2008. **57**(11): p. 1735-43.
7. Bellamy, C.O., et al., *Cell death in health and disease: the biology and regulation of apoptosis*. Semin Cancer Biol, 1995. **6**(1): p. 3-16.
8. Igney, F.H. and P.H. Krammer, *Death and anti-death: tumour resistance to apoptosis*. Nat Rev Cancer, 2002. **2**(4): p. 277-88.
9. Steinman, R.M., et al., *The induction of tolerance by dendritic cells that have captured apoptotic cells*. J Exp Med, 2000. **191**(3): p. 411-6.
10. Liu, K., et al., *Immune tolerance after delivery of dying cells to dendritic cells in situ*. J Exp Med, 2002. **196**(8): p. 1091-7.
11. Kroemer, G., et al., *Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death*. Cell Death Differ, 2005. **12 Suppl 2**: p. 1463-7.
12. Savill, J. and V. Fadok, *Corpse clearance defines the meaning of cell death*. Nature, 2000. **407**(6805): p. 784-8.
13. Henson, P.M. and D.A. Hume, *Apoptotic cell removal in development and tissue homeostasis*. Trends Immunol, 2006. **27**(5): p. 244-50.
14. Gardai, S.J., et al., *Cell-surface calreticulin initiates clearance of viable or apoptotic cells through trans-activation of LRP on the phagocyte*. Cell, 2005. **123**(2): p. 321-34.
15. Obeid, M., et al., *Calreticulin exposure dictates the immunogenicity of cancer cell death*. Nat Med, 2007. **13**(1): p. 54-61.
16. Casares, N., et al., *Caspase-dependent immunogenicity of doxorubicin-induced tumor cell death*. J Exp Med, 2005. **202**(12): p. 1691-701.
17. Blachere, N.E., R.B. Darnell, and M.L. Albert, *Apoptotic cells deliver processed antigen to dendritic cells for cross-presentation*. PLoS Biol, 2005. **3**(6): p. e185.
18. Zitvogel, L., O. Kepp, and G. Kroemer, *Decoding cell death signals in inflammation and immunity*. Cell, 2010. **140**(6): p. 798-804.
19. Green, D.R., et al., *Immunogenic and tolerogenic cell death*. Nat Rev Immunol, 2009. **9**(5): p. 353-63.
20. Garg, A.D., et al., *Immunogenic cell death, DAMPs and anticancer therapeutics: an emerging amalgamation*. Biochim Biophys Acta, 2010. **1805**(1): p. 53-71.
21. Zitvogel, L., et al., *Immunogenic tumor cell death for optimal anticancer therapy: the calreticulin exposure pathway*. Clin Cancer Res, 2010. **16**(12): p. 3100-4.
22. Garg, A.D., et al., *A novel pathway combining calreticulin exposure and ATP secretion in immunogenic cancer cell death*. EMBO J, 2012. **31**(5): p. 1062-79.
23. Apetoh, L., et al., *Toll-like receptor 4-dependent contribution of the immune system to anticancer chemotherapy and radiotherapy*. Nat Med, 2007. **13**(9): p. 1050-9.
24. Bezu, L., et al., *Combinatorial strategies for the induction of immunogenic cell death*. Front Immunol, 2015. **6**: p. 187.

25. Vandenberk, L., et al., *Exploiting the Immunogenic Potential of Cancer Cells for Improved Dendritic Cell Vaccines*. Front Immunol, 2015. **6**: p. 663.
26. Anguille, S., et al., *Clinical use of dendritic cells for cancer therapy*. Lancet Oncol, 2014. **15**(7): p. e257-67.
27. Sabado, R.L. and N. Bhardwaj, *Directing dendritic cell immunotherapy towards successful cancer treatment*. Immunotherapy, 2010. **2**(1): p. 37-56.
28. Chiang, C.L., et al., *A dendritic cell vaccine pulsed with autologous hypochlorous acid-oxidized ovarian cancer lysate primes effective broad antitumor immunity: from bench to bedside*. Clin Cancer Res, 2013. **19**(17): p. 4801-15.
29. Goldszmid, R.S., et al., *Dendritic cells charged with apoptotic tumor cells induce long-lived protective CD4+ and CD8+ T cell immunity against B16 melanoma*. J Immunol, 2003. **171**(11): p. 5940-7.
30. Hatfield, P., et al., *Optimization of dendritic cell loading with tumor cell lysates for cancer immunotherapy*. J Immunother, 2008. **31**(7): p. 620-32.
31. Kim, H.S., et al., *Enhancement of antitumor immunity of dendritic cells pulsed with heat-treated tumor lysate in murine pancreatic cancer*. Immunol Lett, 2006. **103**(2): p. 142-8.
32. Vandenberk, L., et al., *Irradiation of necrotic cancer cells, employed for pulsing dendritic cells (DCs), potentiates DC vaccine-induced antitumor immunity against high-grade glioma*. Oncoimmunology, 2016. **5**(2): p. e1083669.
33. Garg, A.D., et al., *Danger signalling during cancer cell death: origins, plasticity and regulation*. Cell Death Differ, 2014. **21**(1): p. 26-38.
34. Kepp, O., et al., *Consensus guidelines for the detection of immunogenic cell death*. Oncoimmunology, 2014. **3**(9): p. e955691.
35. Kroemer, G., et al., *Immunogenic cell death in cancer therapy*. Annu Rev Immunol, 2013. **31**: p. 51-72.
36. William Rojas M., J.M.A.C., Luis Miguel Gomez O., *Inmunología de Rojas*. 2013.
37. Thomas, A. and G. Giaccone, *Why has active immunotherapy not worked in lung cancer?* Ann Oncol, 2015. **26**(11): p. 2213-20.
38. Vacchelli, E., et al., *Trial Watch: Chemotherapy with immunogenic cell death inducers*. Oncoimmunology, 2014. **3**(1): p. e27878.
39. Pol, J., et al., *Trial Watch: Immunogenic cell death inducers for anticancer chemotherapy*. Oncoimmunology, 2015. **4**(4): p. e1008866.
40. Vacchelli, E., et al., *Trial watch: Oncolytic viruses for cancer therapy*. Oncoimmunology, 2013. **2**(6): p. e24612.
41. Gomez-Cadena, A., et al., *Immune-system-dependent anti-tumor activity of a plant-derived polyphenol rich fraction in a melanoma mouse model*. Cell Death Dis, 2016. **7**(6): p. e2243.
42. Kroemer, G., B. Dallaporta, and M. Resche-Rigon, *The mitochondrial death/life regulator in apoptosis and necrosis*. Annu Rev Physiol, 1998. **60**: p. 619-42.
43. Yang, L.L., C.Y. Lee, and K.Y. Yen, *Induction of apoptosis by hydrolyzable tannins from Eugenia jambos L. on human leukemia cells*. Cancer Lett, 2000. **157**(1): p. 65-75.
44. Gross, A., J.M. McDonnell, and S.J. Korsmeyer, *BCL-2 family members and the mitochondria in apoptosis*. Genes Dev, 1999. **13**(15): p. 1899-911.
45. Wang, X., *The expanding role of mitochondria in apoptosis*. Genes Dev, 2001. **15**(22): p. 2922-33.
46. Ma, Y., et al., *Contribution of IL-17-producing gamma delta T cells to the efficacy of anticancer chemotherapy*. J Exp Med, 2011. **208**(3): p. 491-503.
47. Michaud, M., et al., *Autophagy-dependent anticancer immune responses induced by chemotherapeutic agents in mice*. Science, 2011. **334**(6062): p. 1573-7.
48. Sistigu, A., et al., *Cancer cell-autonomous contribution of type I interferon signaling to the efficacy of chemotherapy*. Nat Med, 2014. **20**(11): p. 1301-9.
49. Panaretakis, T., et al., *Mechanisms of pre-apoptotic calreticulin exposure in immunogenic cell death*. EMBO J, 2009. **28**(5): p. 578-90.
50. Pahl, H.L., *Activators and target genes of Rel/NF-kappaB transcription factors*. Oncogene, 1999. **18**(49): p. 6853-66.

51. Elliott, M.R., et al., *Nucleotides released by apoptotic cells act as a find-me signal to promote phagocytic clearance*. Nature, 2009. **461**(7261): p. 282-6.
52. Idzko, M., et al., *Extracellular ATP triggers and maintains asthmatic airway inflammation by activating dendritic cells*. Nat Med, 2007. **13**(8): p. 913-9.
53. Chekeni, F.B., et al., *Pannexin 1 channels mediate 'find-me' signal release and membrane permeability during apoptosis*. Nature, 2010. **467**(7317): p. 863-7.
54. Ghiringhelli, F., et al., *Activation of the NLRP3 inflammasome in dendritic cells induces IL-1beta-dependent adaptive immunity against tumors*. Nat Med, 2009. **15**(10): p. 1170-8.
55. Pang, X., et al., *Expression and effects of high-mobility group box 1 in cervical cancer*. Int J Mol Sci, 2014. **15**(5): p. 8699-712.
56. Yamazaki, T., et al., *Defective immunogenic cell death of HMGB1-deficient tumors: compensatory therapy with TLR4 agonists*. Cell Death Differ, 2014. **21**(1): p. 69-78.
57. Vacchelli, E., et al., *Trial Watch: Toll-like receptor agonists for cancer therapy*. Oncoimmunology, 2013. **2**(8): p. e25238.
58. Galluzzi, L., O. Kepp, and G. Kroemer, *Enlightening the impact of immunogenic cell death in photodynamic cancer therapy*. EMBO J, 2012. **31**(5): p. 1055-7.
59. Garg, A.D., A.M. Dudek, and P. Agostinis, *Autophagy-dependent suppression of cancer immunogenicity and effector mechanisms of innate and adaptive immunity*. Oncoimmunology, 2013. **2**(10): p. e26260.
60. Zitvogel, L., et al., *[Immunological aspects of anticancer chemotherapy]*. Bull Acad Natl Med, 2008. **192**(7): p. 1469-87; discussion 1487-9.
61. Wemeau, M., et al., *Calreticulin exposure on malignant blasts predicts a cellular anticancer immune response in patients with acute myeloid leukemia*. Cell Death Dis, 2010. **1**: p. e104.
62. Peng, R.Q., et al., *Expression of calreticulin is associated with infiltration of T-cells in stage IIIB colon cancer*. World J Gastroenterol, 2010. **16**(19): p. 2428-34.
63. Saito, K., Y. Dai, and K. Ohtsuka, *Enhanced expression of heat shock proteins in gradually dying cells and their release from necrotically dead cells*. Exp Cell Res, 2005. **310**(1): p. 229-36.
64. Somersan, S., et al., *Primary tumor tissue lysates are enriched in heat shock proteins and induce the maturation of human dendritic cells*. J Immunol, 2001. **167**(9): p. 4844-52.
65. Spisek, R., et al., *Bortezomib enhances dendritic cell (DC)-mediated induction of immunity to human myeloma via exposure of cell surface heat shock protein 90 on dying tumor cells: therapeutic implications*. Blood, 2007. **109**(11): p. 4839-45.
66. Srivastava, P.K., *Immunotherapy for human cancer using heat shock protein-peptide complexes*. Curr Oncol Rep, 2005. **7**(2): p. 104-8.
67. Kantoff, P.W., et al., *Sipuleucel-T immunotherapy for castration-resistant prostate cancer*. N Engl J Med, 2010. **363**(5): p. 411-22.
68. Lesterhuis, W.J., et al., *Route of administration modulates the induction of dendritic cell vaccine-induced antigen-specific T cells in advanced melanoma patients*. Clin Cancer Res, 2011. **17**(17): p. 5725-35.
69. Fucikova, J., et al., *High hydrostatic pressure induces immunogenic cell death in human tumor cells*. Int J Cancer, 2014. **135**(5): p. 1165-77.
70. Korbelik, M., W. Zhang, and S. Merchant, *Involvement of damage-associated molecular patterns in tumor response to photodynamic therapy: surface expression of calreticulin and high-mobility group box-1 release*. Cancer Immunol Immunother, 2011. **60**(10): p. 1431-7.
71. Obeid, M., et al., *Calreticulin exposure is required for the immunogenicity of gamma-irradiation and UVC light-induced apoptosis*. Cell Death Differ, 2007. **14**(10): p. 1848-50.
72. Brusa, D., et al., *Immunogenicity of 56 degrees C and UVC-treated prostate cancer is associated with release of HSP70 and HMGB1 from necrotic cells*. Prostate, 2009. **69**(12): p. 1343-52.
73. Stangl, S., et al., *Detection of irradiation-induced, membrane heat shock protein 70 (Hsp70) in mouse tumors using Hsp70 Fab fragment*. Radiother Oncol, 2011. **99**(3): p. 313-6.

74. Kepp, O., et al., *Molecular determinants of immunogenic cell death elicited by anticancer chemotherapy*. *Cancer Metastasis Rev*, 2011. **30**(1): p. 61-9.
75. Dudek, A.M., et al., *Inducers of immunogenic cancer cell death*. *Cytokine Growth Factor Rev*, 2013. **24**(4): p. 319-33.
76. Vacchelli, E., et al., *Trial watch: Chemotherapy with immunogenic cell death inducers*. *Oncoimmunology*, 2013. **2**(3): p. e23510.
77. Kepp, O., L. Senovilla, and G. Kroemer, *Immunogenic cell death inducers as anticancer agents*. *Oncotarget*, 2014. **5**(14): p. 5190-1.
78. Meriggi, F. and A. Zaniboni, *Gemox: a widely useful therapy against solid tumors-review and personal experience*. *J Chemother*, 2010. **22**(5): p. 298-303.
79. Li, C., et al., *Gemcitabine plus paclitaxel versus carboplatin plus either gemcitabine or paclitaxel in advanced non-small-cell lung cancer: a literature-based meta-analysis*. *Lung*, 2010. **188**(5): p. 359-64.
80. Liu, W.M., et al., *Pre-treatment with chemotherapy can enhance the antigenicity and immunogenicity of tumours by promoting adaptive immune responses*. *Br J Cancer*, 2010. **102**(1): p. 115-23.
81. Nowak, A.K., et al., *Induction of tumor cell apoptosis in vivo increases tumor antigen cross-presentation, cross-priming rather than cross-tolerizing host tumor-specific CD8 T cells*. *J Immunol*, 2003. **170**(10): p. 4905-13.
82. Nowak, A.K., B.W. Robinson, and R.A. Lake, *Synergy between chemotherapy and immunotherapy in the treatment of established murine solid tumors*. *Cancer Res*, 2003. **63**(15): p. 4490-6.
83. Mundy-Bosse, B.L., et al., *Myeloid-derived suppressor cell inhibition of the IFN response in tumor-bearing mice*. *Cancer Res*, 2011. **71**(15): p. 5101-10.
84. Vincent, J., et al., *5-Fluorouracil selectively kills tumor-associated myeloid-derived suppressor cells resulting in enhanced T cell-dependent antitumor immunity*. *Cancer Res*, 2010. **70**(8): p. 3052-61.
85. Lesterhuis, W.J., et al., *Platinum-based drugs disrupt STAT6-mediated suppression of immune responses against cancer in humans and mice*. *J Clin Invest*, 2011. **121**(8): p. 3100-8.
86. U.S. s.-a., *ELOXATIN®, Prescribing Information*. 2015.
87. Medina-Echeverz, J., et al., *Successful colon cancer eradication after chemoimmunotherapy is associated with profound phenotypic change of intratumoral myeloid cells*. *J Immunol*, 2011. **186**(2): p. 807-15.
88. Ghiringhelli, F., et al., *Metronomic cyclophosphamide regimen selectively depletes CD4+CD25+ regulatory T cells and restores T and NK effector functions in end stage cancer patients*. *Cancer Immunol Immunother*, 2007. **56**(5): p. 641-8.
89. Viaud, S., et al., *Cyclophosphamide induces differentiation of Th17 cells in cancer patients*. *Cancer Res*, 2011. **71**(3): p. 661-5.
90. Schiavoni, G., et al., *Cyclophosphamide synergizes with type I interferons through systemic dendritic cell reactivation and induction of immunogenic tumor apoptosis*. *Cancer Res*, 2011. **71**(3): p. 768-78.
91. Mattarollo, S.R., et al., *Pivotal role of innate and adaptive immunity in anthracycline chemotherapy of established tumors*. *Cancer Res*, 2011. **71**(14): p. 4809-20.
92. Inc, P.L.D.P., *DOXORUBICIN HYDROCHLORIDE- doxorubicin hydrochloride injection, solution* 2014.
93. Vitale, I., et al., *Mitotic catastrophe: a mechanism for avoiding genomic instability*. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2011. **12**(6): p. 385-92.
94. Zhu, Y., et al., *CD4+Foxp3+ regulatory T-cell impairment by paclitaxel is independent of toll-like receptor 4*. *Scand J Immunol*, 2011. **73**(4): p. 301-8.
95. Ramakrishnan, R., et al., *Chemotherapy enhances tumor cell susceptibility to CTL-mediated killing during cancer immunotherapy in mice*. *J Clin Invest*, 2010. **120**(4): p. 1111-24.
96. S.p.A, C.P.L., *TAXOL® Injection (Paclitaxel)* 2012.
97. Kabi, F., *Folleto de información al profesional*. 2007.

98. Uruena, C., et al., *Multifunctional T Lymphocytes Generated After Therapy With an Antitumor Gallotannin-Rich Normalized Fraction Are Related to Primary Tumor Size Reduction in a Breast Cancer Model*. *Integr Cancer Ther*, 2015. **14**(5): p. 468-83.
99. Kim, M.K., et al., *Oncolytic and immunotherapeutic vaccinia induces antibody-mediated complement-dependent cancer cell lysis in humans*. *Sci Transl Med*, 2013. **5**(185): p. 185ra63.
100. Liikanen, I., et al., *Oncolytic adenovirus with temozolomide induces autophagy and antitumor immune responses in cancer patients*. *Mol Ther*, 2013. **21**(6): p. 1212-23.
101. Batenchuk, C., et al., *Non-replicating rhabdovirus-derived particles (NRRPs) eradicate acute leukemia by direct cytolysis and induction of antitumor immunity*. *Blood Cancer J*, 2014. **4**: p. e201.
102. Kleijn, A., et al., *The in vivo therapeutic efficacy of the oncolytic adenovirus Delta24-RGD is mediated by tumor-specific immunity*. *PLoS One*, 2014. **9**(5): p. e97495.
103. Jiang, H. and J. Fueyo, *Healing after death: antitumor immunity induced by oncolytic adenoviral therapy*. *Oncoimmunology*, 2014. **3**(7): p. e947872.
104. Bach, P., et al., *Specific elimination of CD133+ tumor cells with targeted oncolytic measles virus*. *Cancer Res*, 2013. **73**(2): p. 865-74.
105. Nanni, P., et al., *Preclinical therapy of disseminated HER-2(+) ovarian and breast carcinomas with a HER-2-retargeted oncolytic herpesvirus*. *PLoS Pathog*, 2013. **9**(1): p. e1003155.
106. Li, J.M., et al., *MicroRNA-145 regulates oncolytic herpes simplex virus-1 for selective killing of human non-small cell lung cancer cells*. *Virology*, 2013. **10**: p. 241.
107. Yang, X., et al., *Evaluation of IRES-mediated, cell-type-specific cytotoxicity of poliovirus using a colorimetric cell proliferation assay*. *J Virol Methods*, 2009. **155**(1): p. 44-54.
108. Goetz, C. and M. Gromeier, *Preparing an oncolytic poliovirus recombinant for clinical application against glioblastoma multiforme*. *Cytokine Growth Factor Rev*, 2010. **21**(2-3): p. 197-203.
109. Wildner, O., R.M. Blaese, and J.C. Morris, *Therapy of colon cancer with oncolytic adenovirus is enhanced by the addition of herpes simplex virus-thymidine kinase*. *Cancer Res*, 1999. **59**(2): p. 410-3.
110. Lampe, J., et al., *An armed oncolytic measles vaccine virus eliminates human hepatoma cells independently of apoptosis*. *Gene Ther*, 2013. **20**(11): p. 1033-41.
111. Bridle, B.W., et al., *Oncolytic vesicular stomatitis virus quantitatively and qualitatively improves primary CD8+ T-cell responses to anticancer vaccines*. *Oncoimmunology*, 2013. **2**(8): p. e26013.
112. Bridle, B.W., et al., *Potentiating cancer immunotherapy using an oncolytic virus*. *Mol Ther*, 2010. **18**(8): p. 1430-9.
113. Woller, N., et al., *Oncolytic viruses as anticancer vaccines*. *Front Oncol*, 2014. **4**: p. 188.
114. Shikano, T., et al., *High therapeutic potential for systemic delivery of a liposome-conjugated herpes simplex virus*. *Curr Cancer Drug Targets*, 2011. **11**(1): p. 111-22.
115. Green, N.K., et al., *Tropism ablation and stealthing of oncolytic adenovirus enhances systemic delivery to tumors and improves virotherapy of cancer*. *Nanomedicine (Lond)*, 2012. **7**(11): p. 1683-95.
116. Liikanen, I., et al., *Serum HMGB1 is a predictive and prognostic biomarker for oncolytic immunotherapy*. *Oncoimmunology*, 2015. **4**(3): p. e989771.
117. Crouse, J., U. Kalinke, and A. Oxenius, *Regulation of antiviral T cell responses by type I interferons*. *Nat Rev Immunol*, 2015. **15**(4): p. 231-42.
118. McNab, F., et al., *Type I interferons in infectious disease*. *Nat Rev Immunol*, 2015. **15**(2): p. 87-103.
119. Pol, J., et al., *Trial Watch-Oncolytic viruses and cancer therapy*. *Oncoimmunology*, 2016. **5**(2): p. e1117740.
120. DeNardo, D.G., et al., *Leukocyte complexity predicts breast cancer survival and functionally regulates response to chemotherapy*. *Cancer Discov*, 2011. **1**(1): p. 54-67.
121. West, N.R., et al., *Tumor-infiltrating lymphocytes predict response to anthracycline-based chemotherapy in estrogen receptor-negative breast cancer*. *Breast Cancer Res*, 2011. **13**(6): p. R126.

122. Fucikova, J., et al., *Human tumor cells killed by anthracyclines induce a tumor-specific immune response*. *Cancer Res*, 2011. **71**(14): p. 4821-33.
123. Zappasodi, R., et al., *Improved clinical outcome in indolent B-cell lymphoma patients vaccinated with autologous tumor cells experiencing immunogenic death*. *Cancer Res*, 2010. **70**(22): p. 9062-72.
124. De Boo, S., et al., *iNOS activity is necessary for the cytotoxic and immunogenic effects of doxorubicin in human colon cancer cells*. *Mol Cancer*, 2009. **8**: p. 108.
125. Molinari, R., et al., *The n3-polyunsaturated fatty acid docosahexaenoic acid induces immunogenic cell death in human cancer cell lines via pre-apoptotic calreticulin exposure*. *Cancer Immunol Immunother*, 2011. **60**(10): p. 1503-7.
126. Di Nicola, M., et al., *Vaccination with autologous tumor-loaded dendritic cells induces clinical and immunologic responses in indolent B-cell lymphoma patients with relapsed and measurable disease: a pilot study*. *Blood*, 2009. **113**(1): p. 18-27.
127. Valitutti, S., et al., *Serial triggering of many T-cell receptors by a few peptide-MHC complexes*. *Nature*, 1995. **375**(6527): p. 148-51.
128. Bernal-Estevez, D., et al., *Chemotherapy and radiation therapy elicits tumor specific T cell responses in a breast cancer patient*. *BMC Cancer*, 2016. **16**: p. 591.
129. Zitvogel, L., et al., *Mechanism of action of conventional and targeted anticancer therapies: reinstating immunosurveillance*. *Immunity*, 2013. **39**(1): p. 74-88.
130. Galluzzi, L., et al., *The secret ally: immunostimulation by anticancer drugs*. *Nat Rev Drug Discov*, 2012. **11**(3): p. 215-33.
131. Ma, Y., et al., *Chemotherapy and radiotherapy: cryptic anticancer vaccines*. *Semin Immunol*, 2010. **22**(3): p. 113-24.
132. Chiang, C.L., G. Coukos, and L.E. Kandalaft, *Whole Tumor Antigen Vaccines: Where Are We?* *Vaccines (Basel)*, 2015. **3**(2): p. 344-72.
133. Chiang, C.L., L.E. Kandalaft, and G. Coukos, *Adjuvants for enhancing the immunogenicity of whole tumor cell vaccines*. *Int Rev Immunol*, 2011. **30**(2-3): p. 150-82.
134. Tesniere, A., et al., *Immunogenic death of colon cancer cells treated with oxaliplatin*. *Oncogene*, 2010. **29**(4): p. 482-91.
135. Angelova, A.L., et al., *Complementary induction of immunogenic cell death by oncolytic parvovirus H-1PV and gemcitabine in pancreatic cancer*. *J Virol*, 2014. **88**(10): p. 5263-76.
136. Yang, H., et al., *Contribution of RIP3 and MLKL to immunogenic cell death signaling in cancer chemotherapy*. *Oncoimmunology*, 2016. **5**(6): p. e1149673.
137. Santoro, V., et al., *Role of Reactive Oxygen Species in the Abrogation of Oxaliplatin Activity by Cetuximab in Colorectal Cancer*. *J Natl Cancer Inst*, 2016. **108**(6): p. djv394.
138. Wang, X., et al., *E platinum, a newly synthesized platinum compound, induces apoptosis through ROS-triggered ER stress in gastric carcinoma cells*. *Mol Carcinog*, 2016.
139. Guo, J.J., et al., *Alginate Oligosaccharide Prevents Acute Doxorubicin Cardiotoxicity by Suppressing Oxidative Stress and Endoplasmic Reticulum-Mediated Apoptosis*. *Mar Drugs*, 2016. **14**(12).
140. Ma, Y.M., et al., *Novel CHOP activator LGH00168 induces necroptosis in A549 human lung cancer cells via ROS-mediated ER stress and NF-kappaB inhibition*. *Acta Pharmacol Sin*, 2016. **37**(10): p. 1381-1390.
141. Oka, S., et al., *Two distinct pathways of cell death triggered by oxidative damage to nuclear and mitochondrial DNAs*. *EMBO J*, 2008. **27**(2): p. 421-32.
142. Filippin, L., et al., *Stable interactions between mitochondria and endoplasmic reticulum allow rapid accumulation of calcium in a subpopulation of mitochondria*. *J Biol Chem*, 2003. **278**(40): p. 39224-34.
143. Hansson, M.J., et al., *Calcium-induced generation of reactive oxygen species in brain mitochondria is mediated by permeability transition*. *Free Radic Biol Med*, 2008. **45**(3): p. 284-94.
144. Gebremeskel, S. and B. Johnston, *Concepts and mechanisms underlying chemotherapy induced immunogenic cell death: impact on clinical studies and considerations for combined therapies*. *Oncotarget*, 2015. **6**(39): p. 41600-19.

145. Breckenridge, D.G., et al., *Caspase cleavage product of BAP31 induces mitochondrial fission through endoplasmic reticulum calcium signals, enhancing cytochrome c release to the cytosol*. J Cell Biol, 2003. **160**(7): p. 1115-27.
146. Namba, T., et al., *CDIP1-BAP31 complex transduces apoptotic signals from endoplasmic reticulum to mitochondria under endoplasmic reticulum stress*. Cell Rep, 2013. **5**(2): p. 331-9.
147. Ruth Sanchez, G.A., *Mitocondria y Muerte Celular*. 2008.
148. Yang, W.L. and H. Frucht, *Activation of the PPAR pathway induces apoptosis and COX-2 inhibition in HT-29 human colon cancer cells*. Carcinogenesis, 2001. **22**(9): p. 1379-83.
149. Arias, J.L., *Cultivo de condrocitos humanos para la implantación de lesiones articulares*. 2006: p. 27.
150. Bhalla, K., et al., *Characterization of a human myeloid leukemia cell line highly resistant to taxol*. Leukemia, 1994. **8**(3): p. 465-75.
151. Su, W.C., et al., *Comparison of in vitro growth-inhibitory activity of carboplatin and cisplatin on leukemic cells and hematopoietic progenitors: the myelosuppressive activity of carboplatin may be greater than its antileukemic effect*. Jpn J Clin Oncol, 2000. **30**(12): p. 562-7.
152. Bellosillo, B., et al., *In vitro evaluation of fludarabine in combination with cyclophosphamide and/or mitoxantrone in B-cell chronic lymphocytic leukemia*. Blood, 1999. **94**(8): p. 2836-43.
153. Leon, C.J., et al., *[Sensitivity profile of a panel of cell lines designed for the evaluation of in vitro cytotoxicity]*. Biomedica, 2006. **26**(1): p. 161-8.
154. Raymond, E., et al., *Antitumor activity of oxaliplatin in combination with 5-fluorouracil and the thymidylate synthase inhibitor AG337 in human colon, breast and ovarian cancers*. Anticancer Drugs, 1997. **8**(9): p. 876-85.
155. Teixido, C., et al., *ErbB3 expression predicts sensitivity to elisidepsin treatment: in vitro synergism with cisplatin, paclitaxel and gemcitabine in lung, breast and colon cancer cell lines*. Int J Oncol, 2012. **41**(1): p. 317-24.
156. Zhang, X., et al., *Cytotoxicity evaluation of three pairs of hexabromocyclododecane (HBCD) enantiomers on Hep G2 cell*. Toxicol In Vitro, 2008. **22**(6): p. 1520-7.
157. ThermoFisher, *LIVE/DEAD™ Fixable Dead Cell Stain Kits*. 2016.
158. Biolegend, *Ficha técnica Anexina V*. 2016.
159. ThermoFisher, *Vybrant® FAM Caspase-3 and -7 Assay Kit (V35118)*. 2004.
160. B.P., *Technical Data Sheet Hoechst 33342 Solution*. 2014.
161. Shapiro, H.M., *Estimation of membrane potential by flow cytometry*. Curr Protoc Cytom, 2004. **Chapter 9**: p. Unit 9 6.
162. Hurrell, J.G., et al., *A rapid and efficient procedure for the removal of nonviable cells from suspension culture of lymphoid cell lines*. Aust J Exp Biol Med Sci, 1980. **58**(4): p. 373-6.
163. INVITROGEN, *CellTrace™ Cell Proliferation Kits*. 2016.

## 7 Anexos

### 7.1 Anexo 1. Cultivos Celulares

Las líneas celulares se cultivaron en frascos T75 (75cm<sup>2</sup>) a 37°C en atmósfera CO<sub>2</sub> al 5%. Las células REH y CRL2238 se cultivaron en medio RPMI-1640 con GlutaMAX complementado con aminoácidos esenciales (10Mm Gibco) y piruvato de sodio (100Mm Gibco), suplementado con 10% de SFB previamente inactivado a 60°C durante 45 minutos. Adicionalmente se agregó antibiótico-antimicótico (100U/mL de penicilina, 100µg/mL de estreptomina y 25 µg/mL de anfotericina B - Gibco). Por su parte, la línea celular KATO III se cultivó en medio IMDM suplementado con 10% de SFB, inactivado suplementado con antibiótico-antimicótico de igual forma a la descrita para el caso de las células REH y CRL2338.

La expansión de los cultivos y la medición los doblajes poblacionales se realizaron en cabina de flujo laminar, bajo estrictas condiciones de esterilidad. El medio de cultivo se cambió cada dos a tres días, teniendo en cuenta el viraje del mismo y la confluencia de las células en el frasco (70-90%). La medición de los doblajes poblacionales se determinó una vez la densidad celular fue de  $7.5 \times 10^5$  células/mL para células CRL2338 y KATO III y  $1 \times 10^6$  células/ml para las células REH.

Los cultivos de células no adherentes se mantuvieron mediante la adición o sustitución de medio fresco luego de centrifugación del cultivo. Las células adherentes se despegaron usando 1mL de tripsina 0.25% con EDTA 0.53mM incubando de cinco a 10 minutos dependiendo de la confluencia del frasco, monitoreando en microscopio invertido. Una vez se completó el tiempo de incubación, la acción de la tripsina se detuvo adicionando 8mL de medio sin SFB. Las células se transfirieron a tubos falcon de 15mL y se centrifugaron por 7min a 500g para posterior conteo. Una parte de las células se emplearon en los experimentos y la otra se crio-preservó en crioviales con 70% de medio RPMI, 20% de SFB y 10% de DMSO.

#### 7.1.1 Anticuerpos, enzimas y colorantes utilizados.

En la Tabla S 1, se indican los anticuerpos, enzimas y colorantes empleados para la detección de marcadores celulares mediante citometría de flujo (FC).

**Tabla S 1. Especificaciones de anticuerpos, colorantes y enzimas usados en los procedimientos experimentales.**

<b>ANTICUERPO, COLORANTE O ENZIMA</b>	<b>CASA COMERCIAL</b>	<b>TÉCNICA</b>	<b>PROCEDIMIENTO</b>
Aqua dead cell stain	Molecular probes	FC	Viabilidad celular
DiOC <sub>6</sub> (3) is a cell-permeant dye	Molecular probes	FC	Potencial de membrana mitocondrial
Hoechst 33342 nucleic acid stain	Molecular probes	FC	Ciclo celular
Propidium iodide (PI) red-fluorescent nuclear and chromosome counterstain.	Molecular probes	FC	
Caspasas 3, 7 y 8: Fluorescent inhibitor of caspases (FLICA™)	Molecular probes	FC	Activación de caspasas
Anti-BID- AC primario	Santa cruz Biotechnology ®	FC	Moléculas asociadas a muerte celular
Anti-BAX- AC primario	Santa cruz Biotechnology ®	FC	
Anti-BCL-2- AC primario	Santa cruz Biotechnology ®	FC	
PARP (Poli-ADP-Ribosa polimerasa)- AC primario	Roche®	FC	
CITOCROMO C- AC primario	Santa cruz Biotechnology ®	FC	
SMAC-DIABLO- AC primario	Santa cruz Biotechnology ®	FC	
Anti-HSP90- AC primario	Santa cruz Biotechnology ®	FC	Moléculas asociadas a estrés oxidativo
Dihydroethidiu (DHE)	Thermo scientific®	FC	
Anti-Nf-kB-p- AC primario	Santa cruz Biotechnology ®	FC	
Anti Cox-2- AC primario	Santa cruz Biotechnology ®	FC	
Anti-PPAR gama- AC primario	Santa cruz Biotechnology ®	FC	
Anticuerpo secundario	Santa cruz Biotechnology ®	FC	Moléculas asociadas a estrés y muerte celular
Anexina-V	Biolegend	FC	Muerte celular inmunogénica
Anti-Calreticulina	R&D	FC	
Anti-HMGB-1	Biolegend	FC	
ATP (Luciferina-Luciferasa)	Molecular probes	Luminiscencia	
Anti-CD11c	Biolegend	FC	Maduración de DCs
Anti-CD209	Biolegend	FC	
Anti-CD80	Biolegend	FC	
Anti-CD83	Biolegend	FC	
Anti-CCR7	Biolegend	FC	

CFSE (Carboxyfluorescein succinimidyl ester)	Invitrogen	FC	Fagocitosis
Anti-CD69	Biolegend	FC	Activación de LT
Anti-CD154	Biolegend	FC	
Anti-Ki67	Biolegend	FC	
Anti-CD4	Biolegend	FC	
Anti-CD3	Biolegend	FC	
Anti-CD45RA	Biolegend	FC	Poblaciones de memoria LT
Anti-CCR7	Biolegend	FC	
Anti-CD8	Biolegend	FC	
Tetrámeros HLA-A2 (Her2/neu) conjugados a PE	Fabricado por Carlos Parra en el laboratorio de Lawrence Stern en la Universidad de Massachusetts	FC	Respuesta específica

## 7.1.2 Tasa de crecimiento

- **REH:** El cultivo inició con una densidad de  $2 \times 10^5$  células/mL y se monitoreó diariamente por conteo en cámara de Neubauer con azul de tripán por cinco días sin cambiar el medio de cultivo con el objetivo de determinar la tasa de crecimiento.
- **CRL2338:** El cultivo inició con una densidad de  $5 \times 10^4$  células/mL en un plato de 6 pozos cada pozo con la misma cantidad de células y se monitoreó cada 4 días por 24 días. En cada monitoreo las células se tripsinizaron y se realizó conteo en cámara de Neubauer con azul de tripán.
- **KATOIII:** El cultivo inició con  $5 \times 10^4$  células/mL en un plato de 6 pozos, cada pozo con la misma cantidad de células. Se monitoreó cada 3 días por 18 días. Las células se tripsinizaron en los días de monitoreo y se realizó conteo en cámara de Neubauer con azul de tripán.

### 7.1.2.1 Conteo celular y evaluación de viabilidad por exclusión del azul de tripán.

Las células no viables adoptan una tonalidad azul debido a la alteración en la permeabilidad de la membrana, en contraste con las células viables que se mantienen incoloras y refringentes. Las células usadas para experimentos deben estar sobre el 94% de la viabilidad para garantizar la calidad de los resultados, de manera que el conteo se realizó en cámara de Neubauer acorde a la siguiente fórmula:

**# de células totales** = # de células contadas x factor de dilución  $\times 10^4$  x volumen.

### 7.1.2.2 Cálculo de tiempo de duplicación.

La determinación del tiempo de duplicación celular se hizo con las siguientes formulas [149]:

$$n = \frac{\log_{10} N - \log_{10} N_0}{\log_{10} 2}$$

Donde

$n$  = número de generaciones que han ocurrido durante la fase exponencial.

$N$  = número final de células

$N_0$  = número inicial de células

Teniendo el número de generaciones que transcurrieron durante la fase exponencial, se calcula el tiempo de generación de la fase exponencial, es decir el tiempo que tarda la población en duplicarse con la siguiente formula:

$$g = t/n$$

Donde  $t$  es el tiempo total del cultivo y  $n$  el número de generaciones.

Teniendo en cuenta el tiempo de duplicación de cada línea celular, las células se cultivaron en platos de 96 pozos bajo condiciones normales de cultivo, evaluando la viabilidad celular por MTT (Anexo 2) a las 24 y 48 horas. Se emplearon concentraciones celulares diferentes, esto con el fin de determinar la cantidad de células a cultivar en subsecuentes experimentos. En la Tabla S 2 se observa el número de células evaluadas para cada línea. Las casillas resaltadas corresponden a la concentración celular empleada para posteriores ensayos.

**Tabla S 2. Cinética de concentración de células.**

Línea celular	Cultivo 1	Cultivo 2	Cultivo 3	Cultivo 4
<b>REH</b>	$5 \times 10^4$	$1 \times 10^5$	$2 \times 10^5$	$1 \times 10^6$
<b>CRL2338</b>	$2 \times 10^4$	$5 \times 10^4$	$1 \times 10^5$	$2 \times 10^5$
<b>KATOIII</b>	$2 \times 10^4$	$5 \times 10^4$	$1 \times 10^5$	$2 \times 10^5$

## 7.2 Anexo 2. Determinación de la dosis letal 50 (IC<sub>50</sub>) de fármacos en células REH, CRL2338 y KATO III.

### 7.2.1 Aplicación de tratamientos

Con el fin de evaluar el grado de muerte celular inducida por agentes de quimioterapia, se cultivaron  $2 \times 10^5$  células REH y  $5 \times 10^4$  de células CRL2338 y KATO III en platos de 96 pozos fondo plano con 200  $\mu$ L de medio RPMI 1640 GlutaMAX, suplementado con 10% de SFB, aminoácidos y piruvato de sodio, en el caso de células REH y CRL2338. Para las células KATO III, se empleó IMDM suplementado con 10% de SFB.

La determinación de la dosis letal 50 se hizo evaluando diferentes dosis y tiempos de exposición, teniendo en cuenta lo descrito en la literatura [137, 150-155] Las dosis y tiempos evaluados se presentan en la **Tabla S 3**.

**Tabla S 3. Concentraciones evaluadas para cada fármaco.**

<b>Carboplatino</b>	<b>Gemcitabina</b>	<b>Doxorrubicina</b>	<b>Oxaliplatino</b>	<b>Paclitaxel</b>	<b>Ciclofosfamida</b>
*26936	*66742	*3679	*125688	*7026	*76604
13468	33341	1839.5	62844	3513	38302
6734	16685	919.7	31422	1756.5	19151
3367	8342.7	459.87	15711	878.2	9575.5
1683.5	4172.3	229.9	7855.5	439.1	4787.7
841.75	2085.6	114.9	3927.7	219.5	2393.8
420.87	1042.8	57.47	1963.8	109.78	1196.9
210.4	521.4	28.73	981.9	54.89	598.4
105.2	260.7	14.36	490.9	27.44	299.2
52.6	130.3	7.18	245.4	13.7	149.6
26.3	66.17	3.5	122.7	6.86	74.8
13.1	32.5	1.7	61.3	3.43	37.4

Nota: Cada una de estas concentraciones se evaluó por duplicado en 24 y 48 horas y en días diferentes. Paclitaxel fue evaluado en 6, 24, y 48 horas en células REH debido a la sensibilidad de la línea. Las otras dos líneas se evaluaron a las 24 y 48 horas.

\* C.C: Concentración comercial del fármaco.

\*\* Las concentraciones están dadas en  $\mu$ M

### 7.2.2 Evaluación de viabilidad por MTT.

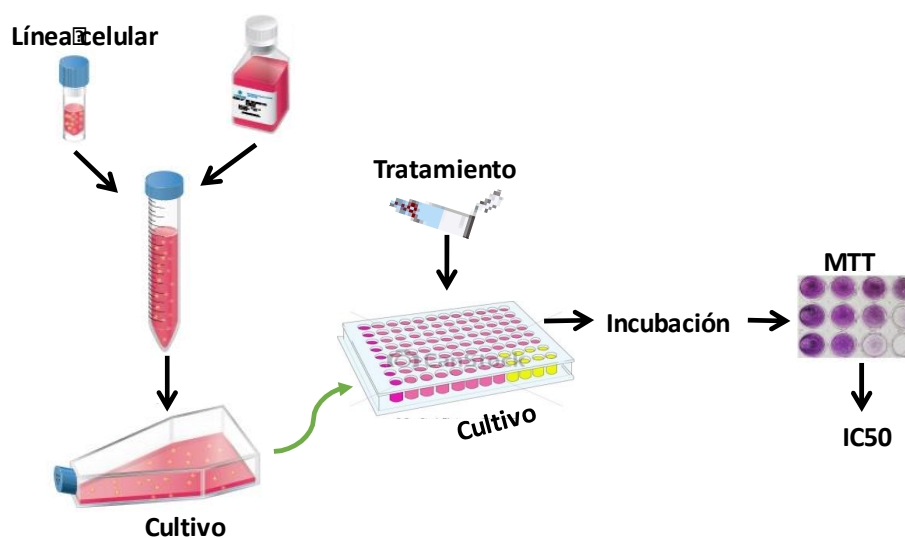
El ensayo de MTT, permite evaluar la viabilidad celular mediante la reducción del Bromuro de 3-(4,5- dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol por la enzima mitocondrial succinato-deshidrogenasa.

El producto de esta reacción se denomina formazan, medible colorimétricamente, el cual es metabolizado por células viables mientras que las células afectadas no lo hacen.

La viabilidad celular se monitoreó mediante MTT (0.1mg/mL). Para ello, a cada cultivo celular, al finalizar el tiempo de incubación, fue adicionado 20µL de MTT (10µL de MTT por cada 100µL de medio) y se incubaron por 4 horas a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub> en oscuridad. Al completar el tiempo necesario para la reacción, se observó el viraje del cultivo a un color azul-violeta (formazan) corroborando la acción de la enzima succinato-deshidrogenasa y la correspondiente viabilidad celular.

Seguidamente, los platos de cultivo se centrifugaron por 7 minutos a 500g. El sobrenadante se descartó y se adicionaron 100µL de DMSO con el fin de disolver los cristales de formazan, sustancia insoluble en medio acuoso. Posteriormente, se realizó la lectura de las absorbancias en espectrofotómetro a 490 nm, la cual es directamente proporcional a la cantidad de formazán formado por células metabólicamente activas.

Los datos obtenidos se extrapolaron en curvas de dosis-respuesta expresados en porcentajes de viabilidad, según la fórmula: **% de viabilidad** = ((Muestra-blanco)/(control-blanco)\*100). La concentración inhibitoria media (IC<sub>50</sub>) vs el tiempo evaluado, se analizó en el software Graphpad Prism 6, teniendo en cuenta el control de viabilidad (100% viables) para analizar el efecto de cada uno de los inductores de muerte [156].



**Figura S 1. Diagrama explicativo de la determinación de la IC<sub>50</sub> al tratar las líneas celulares con diferentes fármacos.** Las células de las tres líneas celulares se expanden, posteriormente se siembran en cajas de 96 pozos a una densidad de 2x10<sup>5</sup> células REH y 5x10<sup>4</sup> células CRL2338 y KATO III en 200µL del medio correspondiente para cada línea celular, seguido las células son tratadas con diferentes concentraciones de fármacos, transcurrido el tiempo de incubación se realiza el ensayo de viabilidad celular por MTT y se calcula la IC<sub>50</sub> para cada fármaco.

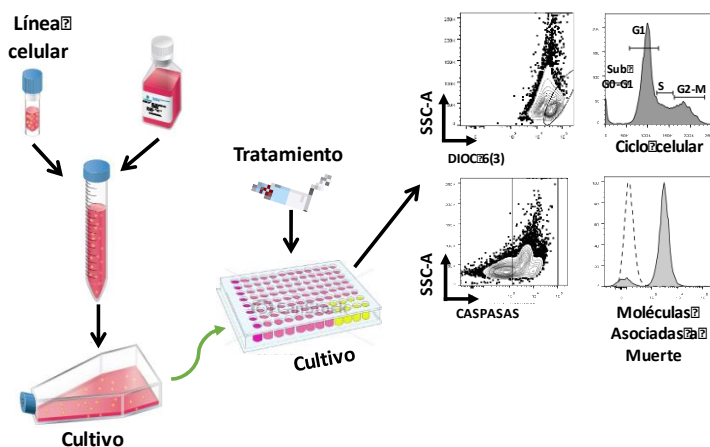
### 7.3 Anexo 3. Evaluación de viabilidad por citometría de flujo.

La viabilidad celular fue evaluada por citometría de flujo comparando FSC-A vs SSC-A, en el cual las células muertas o restos celulares se ubican a la izquierda del plot. Se empleó además AQUA, un colorante que reacciona con aminos libres en el interior de la célula y en la superficie celular. En el caso de células viables, la fluorescencia es menos intensa debido a que la reactividad del colorante se limita a las aminos ubicadas en la superficie celular. Las células muertas presentan una intensidad de fluorescencia 50 veces mayor en comparación con células vivas permitiendo una fácil discriminación [157].

Con el fin de determinar la viabilidad de cada línea celular, se emplearon  $2 \times 10^5$  células REH y  $5 \times 10^4$  células CRL2338 y KATO III por pozo en platos de 96 pozos fondo plano con 200 $\mu$ L del medio óptimo para cada línea. Cada grupo celular se trató con las IC<sub>50</sub> de cada fármaco tal como se muestra en la tabla 2, pasado el tiempo de incubación para cada uno de los tratamientos en las diferentes líneas tumorales, las células del cultivo se cosecharon, se centrifugaron a 500g por 7 minutos y se tiñeron con AQUA siguiendo el protocolo de la casa comercial.

Finalizando esto, las células fueron analizadas en el citómetro de flujo FACSAria II.

### 7.4 Anexo 4. Caracterización molecular del tipo de muerte inducida por cada fármaco.



**Figura S 2. Diagrama explicativo de la caracterización molecular de la muerte inducida por cada fármaco en las tres líneas celulares.** Las líneas celulares fueron cultivadas para su expansión, posteriormente fueron tratadas con las IC<sub>50</sub> de cada fármaco, después del tiempo de incubación fueron teñidas con marcadores típicos de apoptosis y estrés oxidativo como son: DIOCB(β) (Potencial de membrana), Hoechst (Ciclo celular), Caspasas 3,7 y 8, BID, BAX, BCL-2, PARP, CITOCROMO C, SMAC DIABLO; HSP90, ROS, NF-κβ, COX-2 y PPAR-γ. Se realizaron dos experimentos en días distintos por triplicado.

#### **7.4.1 Detección de fosfatidilserina en la superficie celular mediante la unión a Anexina V.**

La Anexina V es una proteína que se une a la fosfatidilserina en presencia de calcio. En condiciones normales la fosfatidilserina se encuentra en la cara interna de la membrana celular; sin embargo, durante la apoptosis temprana este fosfolípido se transloca a la cara externa [158]. Las células tratadas fueron recolectadas en tubos de citometría, se lavaron y se re-suspendieron con el buffer de Anexina, posteriormente se marcaron las células con Anexina V conjugada con FITC durante 20 minutos a 4°C. Al cabo de este tiempo, las células fueron centrifugadas y re-suspendidas en el buffer de Anexina para ser analizadas en el citómetro de flujo FACSaria II.

#### **7.4.2 Cuantificación de la activación de caspasas 3, 7 y 8.**

Esta técnica se basa en la afinidad del inhibidor fluorescente de caspasas (FLICA™) por las cisteínas específicas de caspasas. En el caso de las caspasas 3 y 7, esta secuencia de reconocimiento es el ácido aspártico-valina-ácido aspártico-ácido glutámico (DEVD) y para la caspasa 8 la secuencia es leucina-acido glutámico-treonina –ácido aspártico (LETD). FLICA interactúa con el centro enzimático de cada una de las caspasas activas a través de la secuencia de reconocimiento y se une covalentemente gracias al motivo de cetona fluorometilo (FMK) [159]. Las células tratadas se marcaron con el reactivo de detección de caspasas 3,7 y 8 activas. Posterior a la reacción, las células fueron analizadas por citometría de flujo.

#### **7.4.3 Análisis del efecto de los fármacos sobre las fases del ciclo celular.**

Las células fueron sometidas a un periodo de sincronización cultivándolas en medio ausente de SFB con el objeto de garantizar que el cultivo quedara en fase G1 al carecer de factores de crecimiento presentes en el suero. Las células REH al someterlas a periodo de sincronización por 12 y 24 horas perdieron viabilidad por tal razón se decide no sincronizar dicha línea por la sensibilidad presentada y tratar las células directamente. Las células tratadas se recolectaron, lavaron con PBS y se fijaron con el kit CITOPIX-CITOPERM. Seguidamente se tiñeron con el colorante Hoechst 33342 durante 20 minutos, el cual se une al DNA en células vivas o fijadas debido a su gran especificidad por los pares de bases A-T del DNA [160]. Las células marcadas se incubaron por una hora a 37°C, posteriormente las células fueron centrifugadas y analizadas en el citómetro de flujo FACSaria II.

Los resultados fueron analizados en el programa FlowJo V10, empleando el modelo de integración del ciclo celular de Watson en las células normoploides, es decir, con un contenido de DNA mayor o igual a 2N y células hipoploides, esto es, contenido de DNA menor a 2N. Atendiendo a este principio, se calculó el porcentaje de células en cada una de las fases del ciclo celular.

#### 7.4.4 Evaluación del potencial de membrana mitocondrial en células tratadas con fármacos.

La alteración en el potencial de membrana se evaluó utilizando DIOC<sub>6</sub>(3). Este es un compuesto fluorescente (carbocianina) que ingresa a la célula gracias a su propiedad lipofílica y al ser un catión, se acumula en las mitocondrias de células viables con carga negativa y potencial de membrana alto. Las células con bajo potencial de membrana (característico de células en apoptosis) captan el compuesto de manera deficiente [161]. Posterior al tiempo de incubación del tratamiento con diferentes fármacos, las células se marcaron con DIOC<sub>6</sub>(3) (100 nM) durante 20 minutos a 37°C, CO<sub>2</sub> (5%) en ausencia de SFB. Los resultados se evaluaron con el citómetro de flujo FACSaria II. Los datos fueron graficados en porcentaje del DIOC<sub>6</sub>(3) con el software de citometría FlowJo V10 y GraphPad Prism.

#### 7.4.5 Evaluación de moléculas asociadas a muerte celular y estrés oxidativo.

Se emplearon  $2 \times 10^5$  células REH, cultivadas en 10 pozos, cinco de ellos fueron sometidos a tratamiento con la IC<sub>50</sub> Oxaliplatino y los otros cinco para ser tratados con la IC<sub>50</sub> de Paclitaxel. Pasado el tiempo de incubación se recolectaron las células y se valoró por citometría de flujo la expresión de:

- **Moléculas involucradas en apoptosis:** La expresión de BID, BAX, BCL-2, SMAC-DIABLO y CITOCROMO C, como moléculas participantes en la apoptosis, se cuantificaron con el objeto de determinar el tipo de vía de muerte inducida por los quimioterapéuticos. Por su parte PARP: Poli (ADP-ribosa)- polimerasa es una enzima que reconoce cadenas de DNA con rupturas producidas por agentes genotóxicos permitiendo la reparación del DNA nuclear. Para la evaluación de expresión de estos marcadores, se recolectaron las células, se fijaron con CITOFIX (BD) durante 20 min a 4°C y se adicionaron los anticuerpos (Ac) primarios, se incubó por 60min a 37°C, se lavó y se adicionó el Ac secundario conjugado con fluorocromo, se incubó por 60min a 37°C y se lavó para posterior lectura en citómetro de flujo.
- **Evaluación de la expresión de las proteínas asociadas a estrés oxidativo e inflamación:** Posterior a la administración de los fármacos de quimioterapia, las células se fijaron con CITOFIX (BD) a 4°C durante 20 min. Se adicionaron Ac primarios para NF- $\kappa$ B fosforilado, PPAR $\gamma$ , COX-2 y HSP-90. Esto se incubó por 60min a 37°C, seguidamente se lavó y se adicionó el Ac secundario conjugado con fluorocromo, se incubó por 60min a 37°C. Posteriormente, se lavó y leyó con citómetro de flujo.

La detección de especies reactivas de oxígeno se realizó empleando el kit Cellomics® Oxidative Stress I, el cual detecta y cuantifica especies reactivas de oxígeno (ROS) en células vivas. El reactivo es permeable a la célula y en presencia de ROS, el

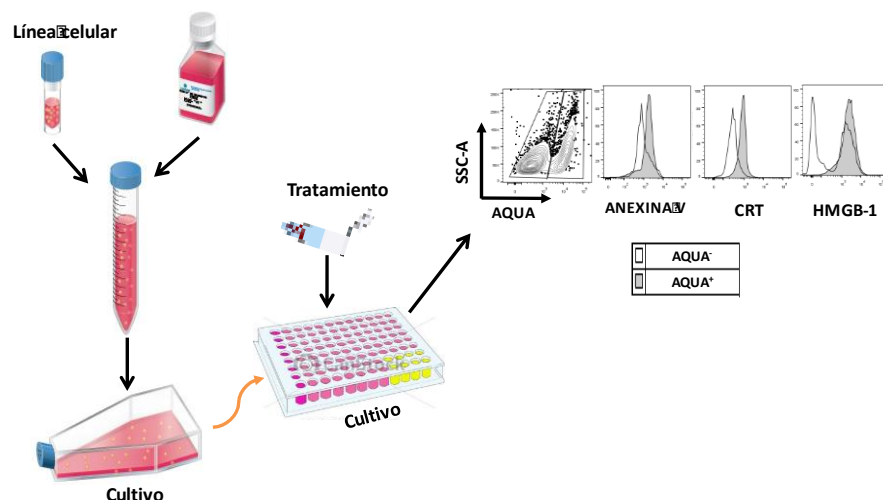
Dihydroethidium (DHE - no fluorescente en estado reducido) se convierte en ethidium, caracterizado por ser altamente fluorescente (Oxidado) y permanece al interior de la célula. Posterior cada tratamiento de quimioterapia, las células se recolectaron y se adicionó DHE, preparación incubada por 30 minutos a 37°C. Posteriormente las muestras se lavaron y finalmente se analizaron en citómetro de flujo.

## **7.5 Anexo 5. Caracterización de la expresión de moléculas características de MCI (DAMPs).**

Las células de las tres líneas celulares fueron tratadas con las  $IC_{50}$  de cada fármaco, pasado el tiempo de incubación del tratamiento se cosecharon las células, se centrifugaron a 500g por 7 minutos. Posteriormente se marcaron las células con Anexina V, AQUA y anti-CRT-FITC (según protocolo de la casa comercial) y se incubaron por 20 minutos a 4°C, pasado el tiempo de incubación las células se fijaron y permeabilizaron con el kit CITOPIX-CITOPERM de BD para continuar con la marcación de HMGB-1-PE según el protocolo de la casa comercial. Terminado el tiempo de incubación las células fueron lavadas y analizadas por citometría de flujo. Los sobrenadantes de cada cultivo fueron recogidos para evaluar la secreción de HMGB-1 por ELISA y liberación de ATP por luminometría [14, 22]. Los datos obtenidos fueron graficados. Se realizaron tres experimentos en días distintos.

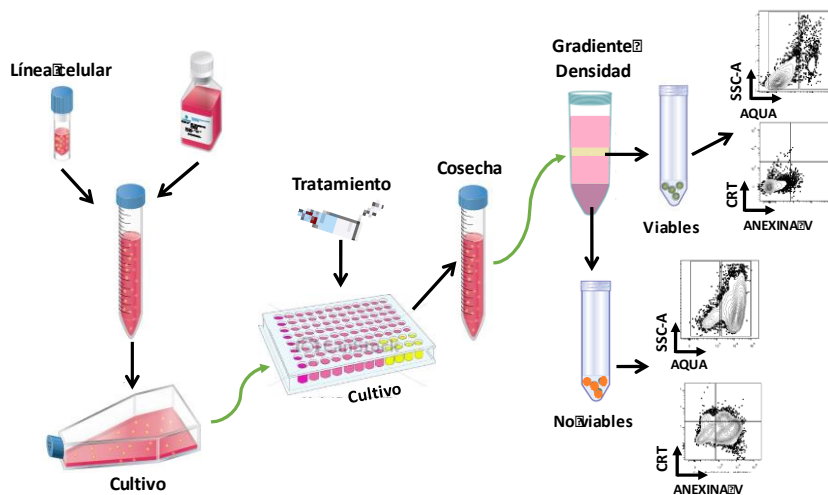
## **7.6 Anexo 6. Caracterización y purificación de la población celular con expresión de DAMPs.**

Se caracterizó la expresión de los DAMPs en las poblaciones AQUA<sup>-</sup> y AQUA<sup>+</sup> donde se evidenció que en la población de células AQUA<sup>+</sup> predominó una expresión mayor de DAMPs. Teniendo en cuenta lo anterior, las células fueron tratadas con las  $IC_{50}$  de los fármacos ( $2 \times 10^6$  células por cada tratamiento), seguido fueron sometidas a separación celular por gradiente de densidad (FH), con el fin de separar las células viables de las no viables [162]. Los datos obtenidos de la caracterización DAMPs, fueron analizados por el software FlowJo V10.



**Figura S 3. Diagrama de la caracterización de DAMPs asociados a Muerte Celular Inmunogénica (MCI).** Las células de las tres líneas celulares fueron tratadas con las IC<sub>50</sub> de los fármacos, posteriormente fueron analizadas por citometría de flujo para la caracterización de DAMPs en células AQUA<sup>-</sup> y AQUA<sup>+</sup>.

Las fracciones obtenidas (Viables: anillo y no viables: pellet) fueron lavadas y marcadas con AQUA, Anexina V y CRT, con el objeto de caracterizar de manera más específica las células que exponen de manera predominante DAMPs. Posteriormente las células no viables fueron sometidas a “sorting” celular por citometría de flujo con el equipo FACSAria II (BD) para purificar poblaciones doble positivas para Anexina V y CRT a partir de una población de células AQUA<sup>+</sup>.

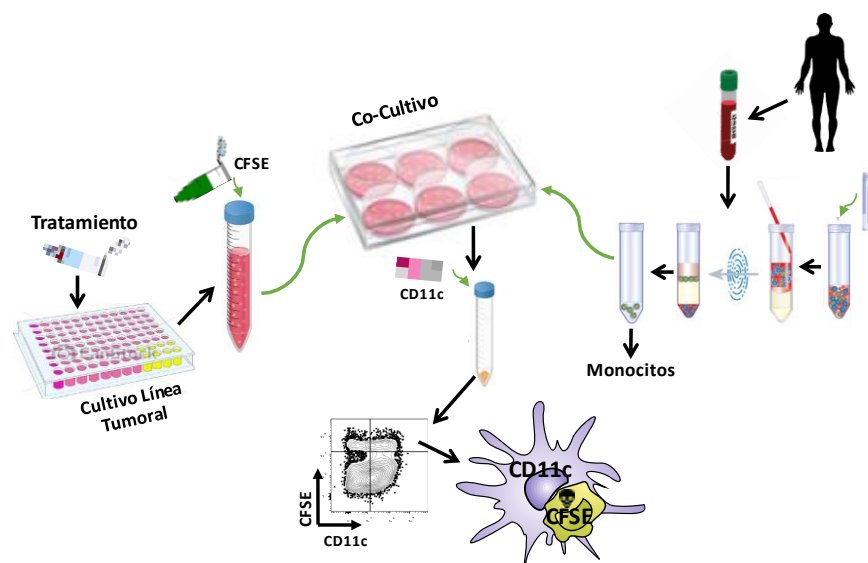


**Figura S 4. Obtención de fracciones celulares viables y no viables por gradiente de densidad.** Las células fueron tratadas con las IC<sub>50</sub> de cada fármaco, seguido del tiempo de incubación, las células fueron cosechadas y separadas por gradiente de densidad (FH); las fracciones obtenidas fueron analizadas por citometría de flujo para la caracterización de DAMPs.

## **7.7 Anexo 7. Evaluación de inducción de fagocitosis por parte de células REH.**

Se obtuvieron iDCs a partir de monocitos purificados por RosetteSep Human monocyte Cells, (Stem cell Technologies), a partir de sangre periférica de individuos sanos tomada en presencia de Heparina como anti-coagulante, mediante la técnica de gradiente de densidad (FH) basada en el principio de separación de sub-poblaciones celulares utilizando gradientes de densidad. Las células fueron lavadas tres veces con RPMI-1640. La viabilidad celular se determinó utilizando la tinción con azul de tripán y conteo en cámara de Neubauer. Posteriormente los monocitos fueron cultivados en presencia de IL-4 y GM-CSF durante 24 horas para su diferenciación a iDCs. Además, para la obtención de células maduras (DCs), a algunos cultivos se les adicionó un coctel de citoquinas pro-inflamatorias (IL- $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-6 y PGE-2 – coctel estándar) durante 24 horas. Por otra parte, las células REH fueron tratadas con la IC<sub>50</sub> de Oxaliplatino durante 48 horas, después del tiempo de incubación las células fueron teñidas con CFSE que es un colorante permeable que entra por difusión a la célula a través de la membrana plasmática y se une covalentemente al grupo amino de las proteínas, resultando en un colorante de largo “plazo”. Se tiñeron las células teniendo en cuenta el protocolo de la casa comercial [163]. Seguido se realizaron co-cultivos con las siguientes condiciones: (i) iDCs + REH tratadas con Oxaliplatino, (ii) iDCs+ REH sin tratamiento, (iii) stDCs + REH tratadas con Oxaliplatino, (iv) stDCs+ REH sin tratamiento, (v) iDCs + Fracción viable de células REH tratadas con Oxaliplatino, (vi) iDCs + Fracción no viable de células REH tratadas con Oxaliplatino y (vii) como control se cultivaron iDCs y stDCs sin la presencia de células REH.

Los co-cultivos se realizaron en una relación una APC ( $3.5 \times 10^5$ ) por tres células REH, los cultivos se incubaron por 2, 24 y 48 horas en 500 $\mu$ L de medio-RPMI completo en platos de 48 pozos fondo plano. Pasado el tiempo de incubación, se cosecharon las células y se tiñeron con CD11c con el objeto de discriminar las células dendríticas, los experimentos fueron analizados por citometría de flujo en el citómetro FACSaria II (BD). La eficiencia de la fagocitosis fue evidenciada por las células doble positivas para CD11c y CFSE en el co-cultivo. Se realizaron dos experimentos en días distintos por duplicado.



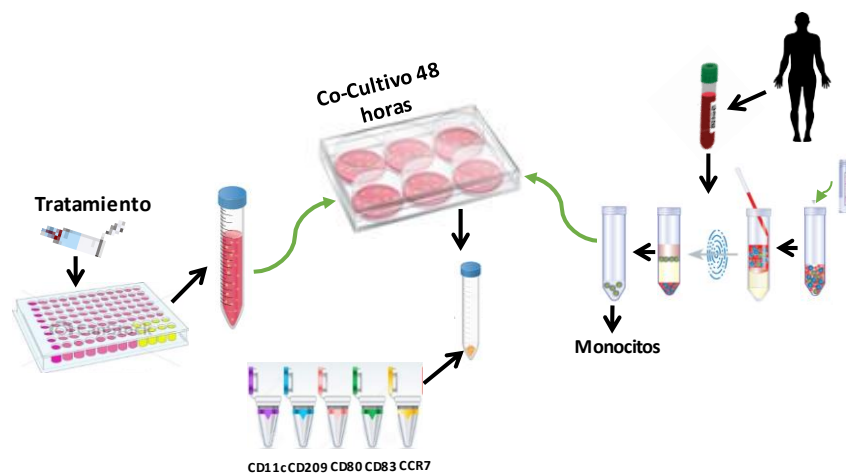
**Figura S 5. Diagrama del diseño experimental para el análisis de inducción de fagocitosis por parte de células REH.** Las células REH fueron tratadas con la IC<sub>50</sub> de Oxaliplatino por 48 horas. A las 24 horas de cultivo se tomó sangre periférica de un individuo sano y se aislaron monocitos los cuales estuvieron cultivados por 24 horas con IL-4 y GMC-SF. Pasadas las 24 horas de diferenciación, las células REH tratadas y marcadas con CFSE fueron co-cultivadas por 2, 24 y 48 horas. Pasado el tiempo de incubación las células fueron analizadas por citometría de flujo para evaluar poblaciones doble positivas.

## 7.8 Anexo 8. Caracterización del fenotipo de maduración en DCs pulsadas con células tumorales.

Luego del tiempo de incubación con la IC<sub>50</sub> de cada inductor de muerte, las células REH y CRL2338 tratadas fueron lavadas con el objeto de retirar el fármaco antes de ser co-cultivadas con iDCs las cuales habían sido previamente cultivadas en platos de 48 pozos a una densidad celular de  $3.5 \times 10^5$  células por 500μL de medio de cultivo. Las iDCs provenían de monocitos humanos de donantes sanos para los ensayos con células REH, para los ensayos con CRL2338 las iDCs provenían de una paciente con cáncer de mama ductal. Los monocitos fueron purificados por RosetteSep Human monocyte Cells, Stem cell Technologies, cultivados por 24 h en medio suplementado con IL-4 y GM-CSF. En cada ensayo se incluyó un control negativo de maduración (iDCs) y un control positivo de maduración que se obtuvo luego de tratar por 48 h el cultivo de iDCs con un coctel de citoquinas de maduración estándar. Los co-cultivos de iDCs con células tumorales tratadas fueron cultivados por 48h en medio RPMI completo, transcurrido este tiempo de incubación los co-cultivos de iDCs y células tumorales tratadas fueron cosechados y se evaluó por citometría de flujo la expresión de los siguientes marcadores de maduración en la superficie de DCs (CD11c<sup>+</sup>): CCR7, CD83, CD80 y CD209. A continuación, se describe cada uno de los cultivos realizados:

### 7.8.1 Evaluación de maduración de DCs pulsadas con células REH y tratadas con las IC<sub>50</sub> de diferentes fármacos.

Las células tumorales fueron tratadas con la IC<sub>50</sub> de cada fármaco, pasado el tiempo, las células fueron lavadas, posteriormente se contaron en cámara de Neubauer y se co-cultivaron con iDCs en platos de 48 pozos, en una relación una célula dendrítica por tres células tumorales tratadas. En cada experimento se incluyeron cultivos de control positivo (stDCs) y negativo (iDCs). Transcurridas 48 horas de incubación los co-cultivos se cosecharon y se caracterizó el fenotipo madurativo midiendo la expresión de CD80, CD83, CD209 y CCR7 en células CD11c.



**Figura S 6. Diagrama explicativo del análisis del fenotipo madurativo en DCs después de ser pulsadas con células tumorales tratadas.** Las células tumorales tratadas con la IC<sub>50</sub> de cada fármaco, fueron co-cultivadas por 48 horas con monocitos purificados de sangre periférica de un individuo sano. Pasado el tiempo de incubación el cultivo es cosechado y teñido con marcadores de fenotipo maduro de DCs.

### 7.8.2 Evaluación de maduración con fracciones (viables y no viables) de células REH y CRL2338 tratadas.

Posterior a los resultados obtenidos en el análisis de inducción de respuesta inmune innata, utilizando células tumorales completas, se decidió caracterizar inducción de respuesta inmune innata de manera más específica, tomando las siguientes condiciones.

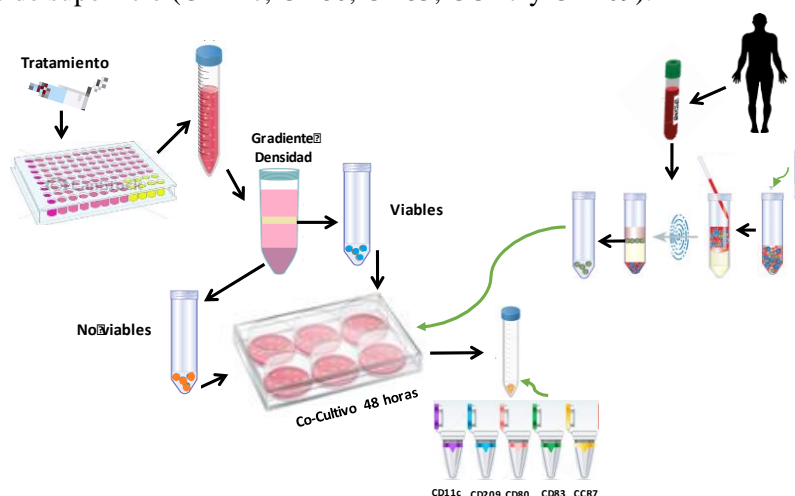
#### REH

- Gemcitabina 120µM por 48 horas.
- Oxaliplatino 21.6µM por 48 horas.
- Paclitaxel 11µM por 6 horas.
- Ciclofosfamida 176µM por 48 horas.

**CRL2338**

- Oxaliplatino 99 $\mu$ M por 24 horas.

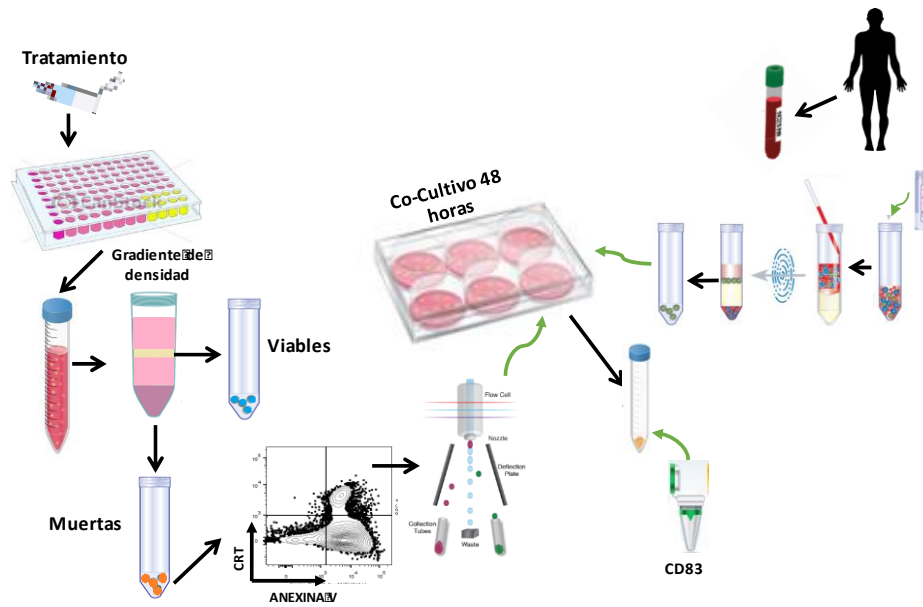
Pasado el tiempo de incubación se cosecharon las células y se sometieron a separación por gradiente de densidad, con el objeto de separar las células no viables (pellet) de las viables (anillo). Se tomó cada de una de las fracciones (viables y no viables) y se co-cultivaron con iDCs en platos de 48 pozos, en una relación una célula dendrítica ( $3 \times 10^5$ ) por tres células tumorales, teniendo en cuenta el control positivo y negativo de maduración. Transcurridas 48 horas de incubación se cosecharon las DCs y posteriormente se caracterizó el fenotipo de maduración de DCs por citometría de flujo evaluando marcadores de superficie (CD11c, CD80, CD83, CCR7 y CD209).



**Figura S 7. Diagrama explicativo del diseño experimental para la caracterización de fenotipo madurativo de DCs a partir de co-cultivos con iDCs y fracciones de células tumorales viables y no viables.** Las células tumorales fueron tratadas con el  $IC_{50}$  de diferentes medicamentos, posteriormente las células fueron separadas por gradiente de densidad para la obtención de células viables y no viables que fueron co-cultivadas con iDCs provenientes de personas sanas mediante purificación de monocitos por rosetas. Terminado el tiempo de incubación del co-cultivo, las células fueron teñidas con marcadores de fenotipo madurativo de DCs.

### 7.8.3 Caracterización de marcadores de maduración en iDCs pulsadas con células REH con expresión de DAMPs purificadas por sorting celular.

A partir de células REH tratadas con con la  $IC_{50}$  para Oxaliplatino o Ciclofosfamida ( $2 \times 10^6$  células para cada tratamiento, distribuidas en pozos de 96 en las condiciones descritas previamente) en un experimento de sorting celular con un equipo FACSAria II se separaron fragmentos celulares Anexina  $V^+/CRT^+$ ; Anexina  $V^-/CRT^+$ ; Anexina  $V^+/CRT^-$  y Anexina  $V^-/CRT^-$ ; todos ellos  $AQUA^+$  a partir de células REH previamente marcadas con AQUA (Provenientes de la fracción no viable de la separación por gradiente de densidad). Una vez obtenidas las fracciones ellas se co-incubaron por 48 horas con iDCs en una relación 1:1. Transcurrido el tiempo, se cosecharon las DCs, se tomaron sobrenadantes y se marcaron con anti-CD83 para caracterizar el fenotipo de maduración por citometría de flujo.



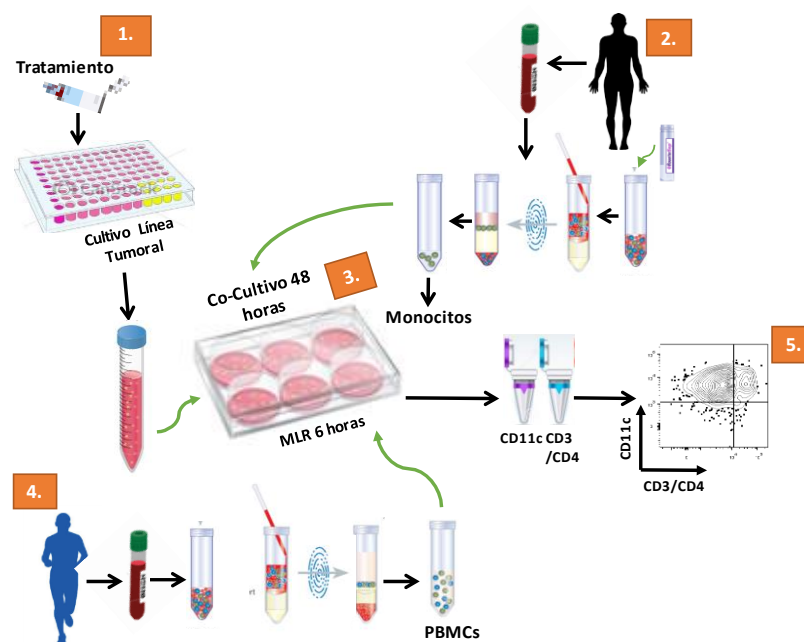
**Figura S 8. Diagrama del diseño experimental de la caracterización de fenotipo madurativo de DCs pulsadas con células tumorales purificadas por sorting celular con expresión de DAMPs.** Las células REH fueron tratadas con la IC<sub>50</sub> de Oxaliplatino y Ciclofosfamida, al pasar el tiempo de incubación las células fueron separadas por gradiente de densidad y purificadas por sorting celular en el citómetro de flujo FACSaria II. Las células Anexina V<sup>+</sup>/CRT<sup>+</sup>; Anexina V<sup>+</sup>/CRT<sup>-</sup>; Anexina V<sup>-</sup>/CRT<sup>+</sup> y Anexina V<sup>-</sup>/CRT<sup>-</sup>; todos ellos AQUA<sup>+</sup> fueron co-cultivadas con iDCs provenientes de personas sanas durante 48 horas. Al terminar el tiempo de incubación las células fueron marcadas con CD83.

## 7.9 Anexo 9. Evaluación de activación, proliferación y respuesta de LT inducida por iDC maduras luego de fagocitar células tumorales tratadas con Oxaliplatino.

### 7.9.1 Caracterización de formación de conjugados de DCs+LTs durante una reacción mixta de linfocitos (MLR).

Para analizar la formación de conjugados inducida por iDCs que han fagocitado células tratadas con Oxaliplatino durante una MLR, se obtuvieron iDCs a partir de monocitos purificados de donante 1 (d-1) las cuales fueron pulsadas con células REH tratadas o sin tratar con Oxaliplatino y éstas se co-cultivaron por 6 horas con PBMCs de un donante (d-2). Como controles se utilizaron co-cultivos de: (i) iDCs (d-1) + LT (d-2); (ii) standard DCs (d-1) + LT (d-2); (iii) monocitos (d-1) pulsados con REH con o sin tratamiento con Oxaliplatino. Luego de 6 horas se analizó por citometría la formación de conjugados inmunes como se explica en el diagrama de la Figura 22 (en resultados). Brevemente, la identificación por SSC-A y FSC-A de los linfocitos fue seguida de la selección de “dupletas” por SSC-H y SSC-W, luego, para evaluar el grado de activación de LT inducido por la formación de conjugados, en las células seleccionadas de esta manera se

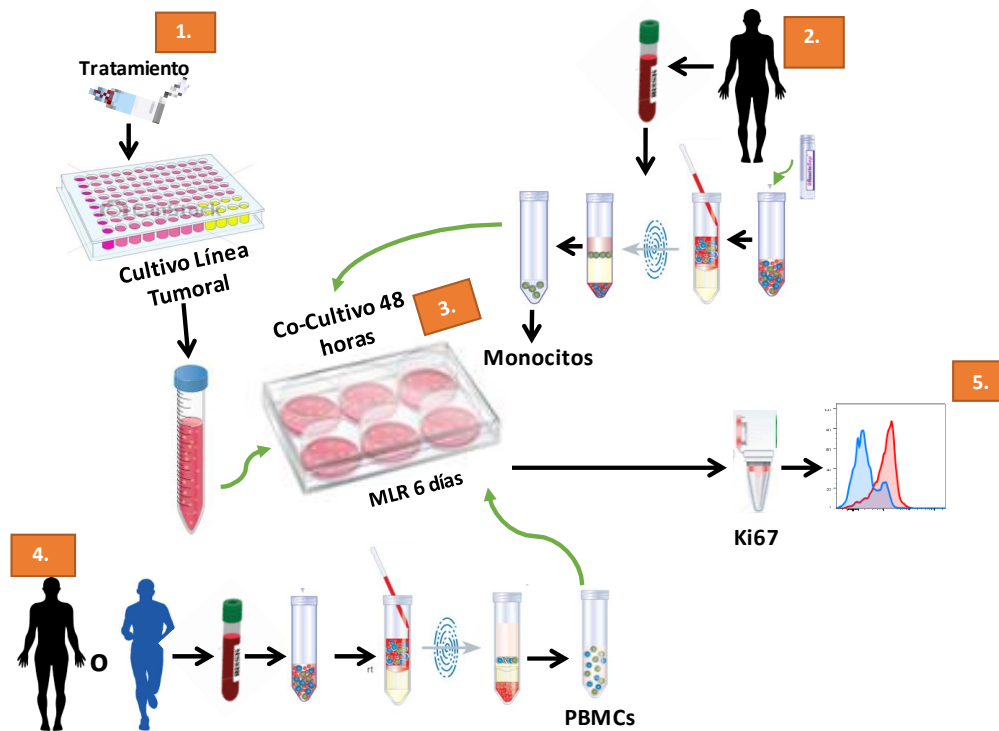
analizó en poblaciones doble positivas para CD11c y CD3 el grado de expresión de CD69 y CD154 (CD40L) tanto en linfocitos T CD4+ como CD4-.



**Figura S 9. Diagrama del diseño experimental para la caracterización de conjugados DCs+LT.** Las células REH fueron tratadas con la  $IC_{50}$  de Oxaliplatino (1), por su parte se obtuvieron monocitos provenientes de individuos sanos, realizando purificación por rosetas (2), cumplido el tiempo de incubación del tratamiento en células REH se realizó un co-cultivo por 48 horas (3). Cumplido el tiempo de incubación se retiraron las células y se co-cultivaron PBMCs totales provenientes de un donante 2 sano durante seis horas (4). Cumplido el tiempo de incubación se tomaron las células, se lavaron y se marcaron con anti-CD11c, anti-CD3 y anti-CD4, anti-CD69 y anti-CD154. El análisis por FC de formación de conjugados y activación de LT es presentado en la figura 22.

## 7.9.2 Reacción Mixta de Linfocitos (MLR). Presentación allogénica de antígenos por DCs pulsadas con REH tratadas.

Ki67 que es una proteína nuclear que interactúa con Hklp2, hNIFK y chromobox protein homolog 1, 3, y 5. Ki-67 es requerido para la proliferación celular y su expresión está en las fases G1, S, G2, y M del ciclo celular; se evaluó en una MLR la capacidad de iDCs obtenidas de un donante 1 (d-1) (previamente pulsadas con células REH tratadas con Oxaliplatino), para inducir la proliferación de LT de un donante 2 (d-2) luego del co-cultivo. Para esto se prepararon los siguientes cultivos: (i) PBMCs (d-2) cultivados sin APCs (Control Negativo, sin estímulo) o estimulados con perlas anti-CD3/CD28/CD2 + IL-2 (control positivo); (ii) PBMCs (d-1) + iDCs del mismo individuo las cuales habían sido co-cultivadas con células REH tratadas y sin tratar; (iii) PBMCs (d-2) co cultivadas con monocitos (d-1) pulsados con células REH tratadas y sin tratar y (iv) PBMCs (d-2) + iDCs (d-1) pulsadas con células REH tratadas y sin tratar. Al sexto día se cosecharon los cultivos, se marcaron con Ki67 y se realizó un análisis por FC.



**Figura S 10. Evaluación de proliferación de LT estimulados con DCs pulsadas con células tumorales tratadas.** Las células REH fueron tratadas con la IC<sub>50</sub> de Oxaliplatino (1), por su parte se obtuvieron monocitos provenientes de donantes sanos, realizando purificación por rosetas (2), cumplido el tiempo de incubación del tratamiento en células REH se realizó un co-cultivo por 48 horas (3). Cumplido el tiempo de incubación se retiraron las células y se co-cultivaron PBMCs totales provenientes de un d-2 sano o del mismo donante (cultivo autólogo) durante seis días (4). Cumplido el tiempo de incubación se tomaron las células, se lavaron y se marcaron con Ki67.

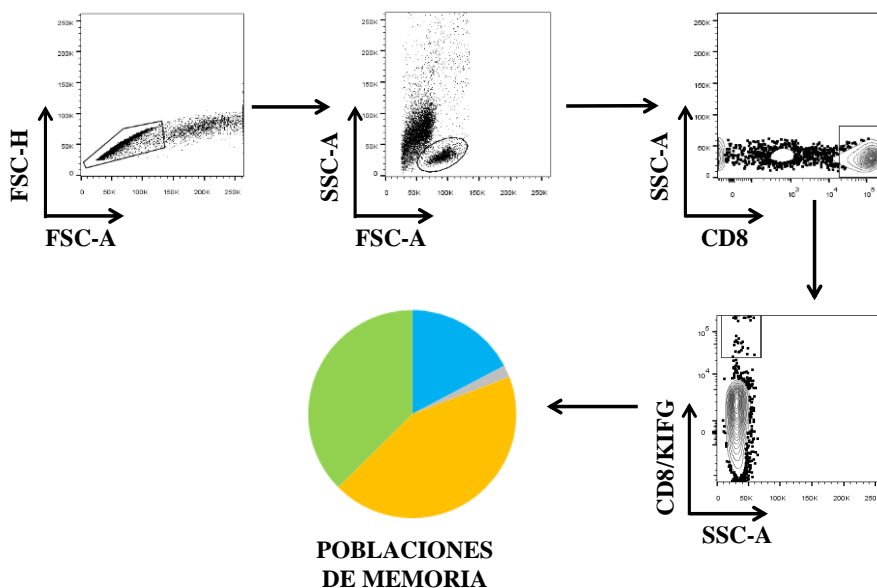
## 7.10 Anexo 10. Evaluación de presentación cruzada de antígenos y estimulación de Linfocitos T CD8<sup>+</sup> efectoras inducida por DCs co-cultivadas con células CRL2338 tratadas con Oxaliplatino.

Se caracterizó la capacidad de DCs co-cultivadas con células tumorales CRL2338 (Her2/neu<sup>+</sup>) tratadas con Oxaliplatino para estimular la expansión de linfocitos T CD8 específicos para una epítipo de esta proteína cuya presentación es restringida al alelo HLA-A\*02:01. Los linfocitos T CD8 fueron obtenidos de una paciente con cáncer de mama ductal que expresa el alelo HLA-A\*02:01 y cuyo tumor expresa altos niveles del oncogen Her2/neu. Para demostrar la capacidad de DCs co-cultivadas con células CRL2338 tratadas con Oxaliplatino de presentar cruzadamente antígenos se analizó el grado de expansión de LT CD8<sup>+</sup> tetrámero positivas para la epítipo (KIFGSLAFL) HLA-A\*02:01 restringida derivada de la proteína Her2/neu. Se tomaron 2.5x10<sup>5</sup> monocitos de la paciente los cuales fueron cultivados en plato de 96 pozos con IL-4 y GM-CSF

durante 24 horas para inducir DC inmaduras, seguido del co-cultivo de iDCs durante 48 horas con células CRL2338 previamente tratadas por 24 horas con Oxaliplatino y sometidas a separación por FH con el fin de obtener fracciones enriquecidas en células viables y no viables. Una vez preparadas las DCs pulsadas con células tumorales muertas o vivas se adicionaron PBMCs de la paciente en una relación 1 DCs: 3 PBMCs; el cultivo se prolongó durante 6 días en incubadora a 37°C y 5%CO<sub>2</sub>, teniendo en cuenta las siguientes condiciones e incluyendo los siguientes cultivos control:

- iDCs+CRL2338 Fracción viables + PBMCs
- iDCs+CRL2338 Fracción no viable + PBMCs
- stDCs pulsadas con péptido KIFGSLAFL de la proteína Her2/neu + PBMCs
- stDCs pulsadas con péptidos virales HLA-A\*02:01 restringidos de FLU (GILGFVFTL) , CMV (NLVPMVATV) y Epstein Barr (GLCTLVAL) + PBMCs
- PBMCs sin estímulo

Terminado el tiempo de incubación se recogieron las células y se marcaron con Tetrámero específico para Her2/neu (KIFGSLAFL), Tetrámero para antígenos virales (FLU (GILGFVFTL), CMV (NLVPMVATV) y Epstein Barr (GLCTLVAL), y marcadores de memoria CD45RA, CCR7 y CD8. El experimento se analizó en el citómetro de flujo FACS Aria II (BD).



**Figura S 11. Diagrama Explicativo: Subpoblaciones de Memoria y Respuesta Específica.** Las células CRL2338 se trataron por 24 horas con Oxaliplatino, se co-cultivaron con iDCs provenientes monocitos purificados de una paciente con cáncer mama ductal Her 2+, se incubó por 48 horas a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub>. Se adicionaron PBMCs totales de la misma paciente, el co-cultivo se incubó por 6 días, finalmente evaluando CD8, CD45RA, CCR7 y Tetrámero específico para KIFGSLAFL en LT CD8. Como control positivo se cultivaron stDCs pulsadas con: (i) péptido KIFGSLAFL y (ii) pool de péptidos virales CMV (NLVPMVATV), FLU (GILGFVFTL) y EBV (GLCTLVAML). Como control negativo se usaron PBMCs sin estímulo.

## 7.11 Anexo 11. Maduración de DCs inducida por el co-cultivo de iDCs con células CRL2338 tratadas con diferentes inductores de muerte celular.

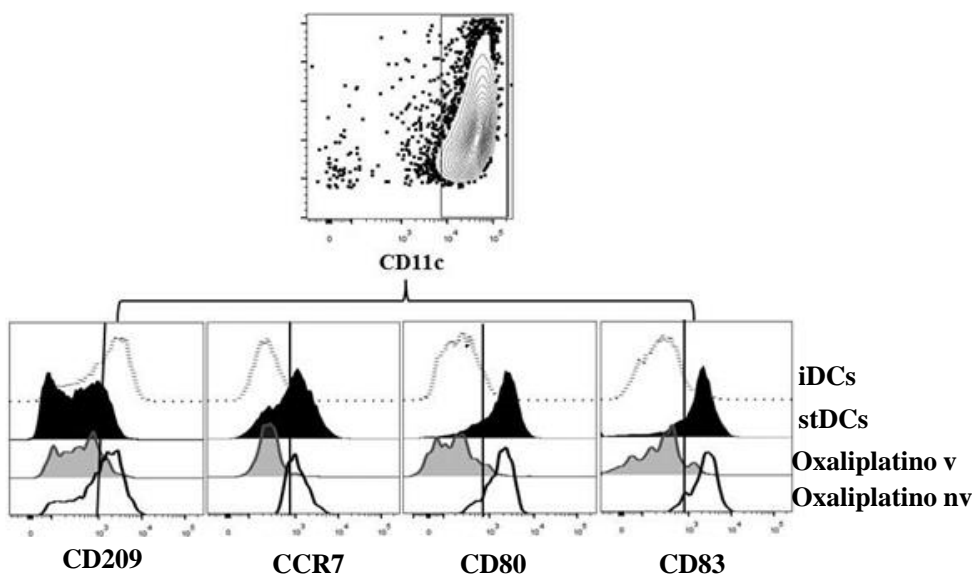
Una vez demostrada la capacidad de células tumorales REH tratadas con agentes de quimioterapia para madurar DCs se decidió examinar la capacidad de DCs maduras luego de la exposición a células tumorales tratadas para inducir la expansión de LT antígeno específicos. Para este efecto se usó la línea tumoral de cáncer de mama ductal CRL2338 (He/2neu<sup>+++</sup>) luego de ser tratada con agentes de quimioterapia como posible fuente de antígeno para estimular LT de memoria específicos contra la proteína He/2neu de una paciente con cáncer de mama ductal estadio IIb (He/2neu<sup>+++</sup>) en remisión completa luego de 10 años de haber sido tratada con quimioterapia y cirugía.

Los resultados presentados previamente (Tabla 7) mostraron el grado de expresión de moléculas características de MCI en células CRL2338 luego del tratamiento con diferentes fármacos. Al igual que lo hecho con células REH nosotros caracterizamos la inmunogenicidad para iDCs de células CRL2338 tratadas analizando el fenotipo de iDCs después de co-cultivo por 48 horas con CRL2338 tratadas. Pasado el tiempo de incubación las células fueron cosechadas y marcadas con anti-CD11c y anti-CD83 con el fin de caracterizar el grado de maduración. Los resultados presentados en la Tabla S 4 indican que mientras las células sin tratamiento no estimulan la maduración de iDCs, las células tratadas con Doxorrubicina estimulan eficientemente su maduración con un 35.6% de expresión de CD83 comparado con un 5% en iDCs. De la misma forma iDCs maduras con células CRL2338 tratadas con Paclitaxel y Oxaliplatino indujeron un aumento substancial de la expresión de CD83 (25.6% y 25.4% respectivamente, lo cual está acorde con los resultados obtenidos en el análisis de inducción de marcadores de MCI en el cual Oxaliplatino y Paclitaxel los cuales mostraron la mayor expresión de Anexina V, CRT y HMGB1.

**Tabla S 4. Marcadores fenotípicos de DCs pulsadas con células CRL 2338 tratadas.**

<b>Cultivo</b>		<b>CD83 %</b>
	<b>iDCs</b>	5
	<b>stDCs</b>	69
	<b>Sin tratamiento</b>	10.5
	<b>Paclitaxel</b>	25.6
iDCs+CRL	<b>Oxaliplatino</b>	25.4
	<b>Ciclofosfamida</b>	6.5
	<b>Doxorrubicina</b>	35.6

Atendiendo a los resultados obtenidos con las células CRL2338 tratadas con Oxaliplatino luego del tratamiento con este fármaco las células vivas y muertas fueron separadas por FH y la capacidad de cada fracción para madurar DCs fue evaluada. Como se muestra en la Figura S 12 y en la Tabla S 5, se observó una pérdida discreta del marcador CD209 en las iDCs pulsadas con CRL2338 fracción viable pero no se observó ningún cambio en la expresión de este marcador inducido por la fracción de células muertas 78% (Vivas), 84% (muertas) vs. 84% y 53% de expresión de CD83 observado en iDCs y stDCs respectivamente). No obstante el resultado negativo obtenido con la medición de CD209 utilizando células muertas, este tipo de estímulo si promovió la expresión de los marcadores de maduración CD83, CCR7 y CD80 en respuesta a este estímulo (40%, 29% y 26% respectivamente vs. 7%, 8.2% y 6% expresado por iDCs).



Figura

S 12.

**Fenotipo de DCs pulsadas con fracciones (viables o muertas) de CRL2338 tratadas con Oxaliplatino.** Se cuantificó la expresión de marcadores de maduración en DCs después de 48h de cultivo con células fracciones de células CRL2338 (viables y muertas) tratadas con Oxaliplatino obtenidas por FH. Como controles negativos se utilizaron DCs inmaduras y como control positivo DCs maduras con coctel de citoquinas (IL-1 $\beta$ , TNF $\alpha$ , IL-6 y Prostaglandina E2), El grado de maduración inducida en DCs inmaduras por las fracciones celulares se monitoreó por FC midiendo la expresión de los marcadores de maduración CD11c, CCR7, CD80 y CD83

**Tabla S 5. Marcadores de fenotipo de maduración de DCs pulsadas con fracciones de CRL2338 tratadas con Oxaliplatino.**

APC		CD209 %	CD83 %	CCR7%	CD80%
iDCs		84	7	8.2	6
DCs Standard		53	78	72	79
iDCs+CRL	Viables	78	9	2.5	6.1
	Muertas	84	40	26	39