

# Células dendríticas y melanoma

*Dendritic cells and melanoma*

Mónica Lorena Cárdenas<sup>1</sup>, Lucy García<sup>2</sup>.

1. Médica, residente de tercer año de Dermatología, Facultad de Medicina, Universidad del Valle, Cali, Colombia

2. Médica dermatóloga, M.Sc.; docente de Dermatología, Facultad de Medicina, Universidad del Valle, Cali, Colombia

## Resumen

La supervivencia de los pacientes con melanoma diseminado no ha aumentado a pesar de décadas de investigación. La erradicación de las células tumorales o la inducción de un estado de tolerancia depende de la interacción entre las células del melanoma y las células del sistema inmunitario, como las células dendríticas, los linfocitos T efectoros y los linfocitos T reguladores.

Las células dendríticas son las responsables de la generación de una respuesta inmunitaria antitumoral específica mediante la presentación y procesamiento de los antígenos tumorales. El número y la función de las células dendríticas se encuentran comprometidos en las neoplasias como el melanoma.

El entendimiento de la naturaleza y de las funciones de estas células ha permitido el desarrollo de vacunas basadas en células dendríticas para diferentes enfermedades, siendo el melanoma el más estudiado en este campo. La vacunación de células dendríticas con antígenos tumorales ha logrado conferir inmunidad protectora y regresión de tumores en modelos en ratón y en humanos con melanoma.

**PALABRAS CLAVE:** células dendríticas; vacunación; inmunoterapia; melanoma.

## Correspondencia:

Lucy García

Email: lucyga47@hotmail.com

*Recibido:* 21 de febrero de 2010.

*Aceptado:* 16 de agosto 2010.

No se reportan conflictos de intereses.

## Summary

The survival of patients with disseminated melanoma has not improved despite years of research. The immune eradication of tumor cells or inducing a state of tolerance depends on a complex interaction between melanoma cells and several cell types of the immune system including dendritic cells, effector T cells and regulatory T cells.

Dendritic cells are responsible for the generation of tumour-specific immunity through the processing and presentation of tumour-associated antigens. The number and function of dendritic cells can be altered in different neoplasias including melanoma.

Understanding the nature and functions of this cell population has allowed the development of vaccines based on dendritic cells for different diseases, and melanoma is the most studied entity in this field.

**KEY WORDS:** dendritic cells; vaccination; immunotherapy; melanoma.

## Introducción

El melanoma es la principal causa de muerte por enfermedades dermatológicas (40%), con tasas de mortalidad que varían de 1 a 3 por 100.000 pacientes; su pronóstico depende de la extensión de la enfermedad, con una supervivencia de 90% en los tumores localizados, la cual

se reduce a menos de 15% en los melanomas con metástasis. En el 2007, la *American Cancer Society* reportó 59.940 nuevos casos de melanoma (4% de todos los cánceres) con una mortalidad de 13% (1% a 2% de todas las muertes por cáncer)<sup>1</sup>.

El melanoma con metástasis es, generalmente, resistente a la radioterapia y a la quimioterapia, razón por la

cual se hace urgente la búsqueda de alternativas terapéuticas. La erradicación de las células tumorales requiere una interacción efectiva entre las células del melanoma y los diferentes integrantes del sistema inmunitario, como linfocitos T, linfocitos B, linfocitos T reguladores (LTreg), linfocitos Th17, células asesinas naturales, linfocitos T NK (*natural killer*, NK) y las células presentadoras de antígenos incluyendo las células dendríticas.

La densidad de células dendríticas en el tumor y alrededor de él y su estado funcional, se relacionan con el estadio de la enfermedad y la supervivencia de los pacientes<sup>2</sup>. Bajo condiciones estables, la incorporación de células en apoptosis (células que han sufrido muerte celular programada sin inflamación) por las células dendríticas inmaduras favorece un estado de tolerancia a los auto-antígenos, con producción de citocinas antiinflamatorias, como la Interleuquina 10 (IL-10), y el factor transformador de crecimiento beta (*Transforming Growth Factor beta*, TGF- $\beta$ ).

Por el contrario, los patógenos y las células necróticas interactúan con los receptores de patrones de reconocimiento, desencadenando vías de señalización que inducen la maduración de las células dendríticas que llevan a la producción de citocinas pro-inflamatorias<sup>3</sup>. Esas células dendríticas maduras son esenciales para el estímulo de la célula T y el subsiguiente desarrollo de una respuesta inmunitaria específica.

La alteración de las funciones de las células dendríticas tiene un impacto negativo en el desarrollo de diversos trastornos, que incluyen enfermedades autoinmunitarias y cánceres<sup>4</sup>. La captura y posterior presentación de antígenos por las células dendríticas pueden derivar en el desarrollo de tolerancia o respuesta inmunitaria, dando lugar al desarrollo o a la prevención de tumores. Este conocimiento y los casos de pacientes con melanoma con metástasis con regresión completa relacionado con una respuesta inmunitaria específica antitumoral, la expresión de citocinas pro-inflamatorias y con la presencia de infiltrados de células T intratumorales<sup>5</sup>, han estimulado la investigación y el desarrollo de diversos ensayos terapéuticos en melanoma y otros tumores<sup>6</sup>. Desde 1998 se vienen desarrollando y probando clínicamente diferentes vacunas contra el melanoma<sup>7</sup>.

## Poblaciones de células dendríticas

Las células dendríticas se derivan de progenitores mieloides totipotenciales CD34+ de la médula ósea, a partir de los cuales se originan dos grandes líneas celulares: un progenitor linfático común y un progenitor mielode común, los cuales dan origen a las células del sistema inmunitario y de la sangre.

En presencia de la citocina FLT3 (*FMS-like tyrosin kinase-3*) cualquiera de estos dos progenitores comunes se va a diferenciar en las dos grandes poblaciones de células dendríticas que se han encontrado en humanos: las células dendríticas convencionales, también denominadas mieloides, y las células dendríticas “plasmocitoides”, conocidas como células dendríticas linfáticas<sup>8</sup>. Las células dendríticas convencionales expresan el marcador CD11c+, CD4+, y receptores tipo *toll* (*Toll-Like Receptor*, TLR) 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 y 10, interceptan los invasores en los tejidos periféricos, inician su proceso de maduración y migran a los tejidos linfáticos secundarios regionales, donde presentan los péptidos antigénicos derivados de los microorganismos o células tumorales a las células T vírgenes específicas para ese antígeno.

Las células dendríticas convencionales son consideradas como las mejores presentadoras de antígenos, producen citocinas pro-inflamatorias e inmunorreguladoras (IL-12), y están comprometidas en la inducción de una respuesta de tipo Th1<sup>9</sup>. Pueden ser residentes en tejidos linfáticos y no linfáticos, como también circulantes. Se subdividen según su localización tisular, en: células dendríticas de la piel, como las de Langerhans en la epidermis, las dérmicas y las asociadas a mucosas; células dendríticas asociadas al tejido linfático, como las de la zona marginal del bazo, las interdigitantes (*interdigitating DCs*) de la zona de células T, las del centro germinal y las del timo; y células dendríticas intersticiales, que incluyen las del pulmón y del hígado<sup>10,11</sup>.

Por otro lado, las células dendríticas “plasmocitoides” con fenotipo CD11-, CD4+, CD123+, expresan receptores tipo *toll* (TLR) 1, 6, 7, 9 y 10. Se encuentran de preferencia en la circulación, desde donde migran directamente a los órganos linfáticos secundarios para ser activadas y producir grandes cantidades de IFN- $\alpha$ ; cada célula dendrítica “plasmocitoide” produce hasta 1.000 veces más IFN- $\alpha$  que cualquier otra célula en el organismo. Tienen menor potencial como presentadoras de antígenos, un compromiso mayor en la inducción de la respuesta de tipo Th2 y juegan un papel importante en la protección contra las infecciones producidas por virus, gérmenes oportunistas y frente a ligandos de TLR7 y 9<sup>12</sup>.

## Funciones de las células dendríticas

Las células dendríticas son presentadoras de antígeno, reconocen la presencia de patógenos invasores mediante varios receptores de reconocimiento de patrones [*pattern recognition receptors* (PRRs)]; una vez activadas, secretan citocinas pro-inflamatorias involucradas en la defensa del huésped, uniendo, de esta manera, la inmu-

nidad innata con la adaptativa<sup>13</sup>. Proveen señales necesarias para la expansión de células T y su diferenciación, participan en la regulación de la respuesta inmunitaria mediada por células T, incluyendo células Th1, Th2 y Th17. Son fundamentales para el inicio de la respuesta inmunitaria adaptativa así como para el mantenimiento de la tolerancia periférica frente a autoantígenos<sup>14</sup>.

## Proceso de maduración de la célula dendrítica

El fenotipo de la célula dendrítica cambia según el nivel de maduración, y sus funciones efectoras también son diferentes. Cuando la célula dendrítica inmadura es expuesta a estímulos exógenos o endógenos, se incrementa la expresión de MHC clase II (*Major Histocompatibility Complex*) y de las moléculas coestimuladoras CD80/CD86. En condiciones normales, a las 2-4 horas tras la exposición al antígeno producen quimiocinas, como CXCL1, CXCL2, CXCL3 y CXCL8, las cuales atraen células NK y neutrófilos<sup>15</sup>. CXCL9 y CCL 3-5 son producidas 4 a 8 horas después y atraen células T de memoria y monocitos.

Finalmente, en la etapa tardía, más de 12 horas, las células dendríticas inician su migración a los ganglios linfáticos e inician su proceso de maduración, con pérdida de receptores "endocíticos" y de fagocitosis, aumento de la expresión de complejos MHC-péptido, moléculas coestimuladoras (CD80, CD86, PDL-1 PDL2, CD40,) y marcadores restringidos a las células dendríticas (CD 83, p55); además, cambios en la morfología con pérdida de estructuras adhesivas, reorganización del citoesqueleto y adquisición de motilidad celular, activación de la maquinaria para el procesamiento antigénico, incluso el cambio en los compartimentos lisosómicos y el incremento de la proteína de membrana asociada a lisosomas (CD- PMAL)<sup>16</sup>.

Se produce secreción de citocinas, como la IL-12, que favorece la diferenciación de linfocitos T a células Th1 y, junto con la IL-23 y la IL-27, promueve la diferenciación de células T en Th17, secretora de IL-17 asociada a la inflamación. Poseen la capacidad de activar células de la inmunidad innata como las células asesinas naturales y las células NKT. Este proceso de activación y maduración de las células dendríticas es muy eficiente en las infecciones, pero no ocurre lo mismo en los tumores<sup>17</sup>. Los antígenos de las células tumorales logran evadir el sistema de detección de lo propio y lo no propio, e inducir tolerancia inmunológica, lo cual crea un microambiente inmunosupresor local y altera las funciones de las células dendríticas; esto permite el crecimiento de las células tumorales<sup>18</sup>.

## Células dendríticas en el melanoma

En los pacientes con melanoma, la densidad, la distribución de las células dendríticas y el estado de activación de los linfocitos T en el tejido tumoral, se relacionan con el grosor del tumor, las metástasis y la supervivencia del paciente, por lo cual adquieren valor para el pronóstico. Las células dendríticas inmaduras están distribuidas dentro de los nidos celulares del melanoma y en el estroma circundante, mientras que las células dendríticas que expresan marcadores de maduración, como DC-PAML (CD208) y CD83, están confinadas a las áreas alrededor del tumor.

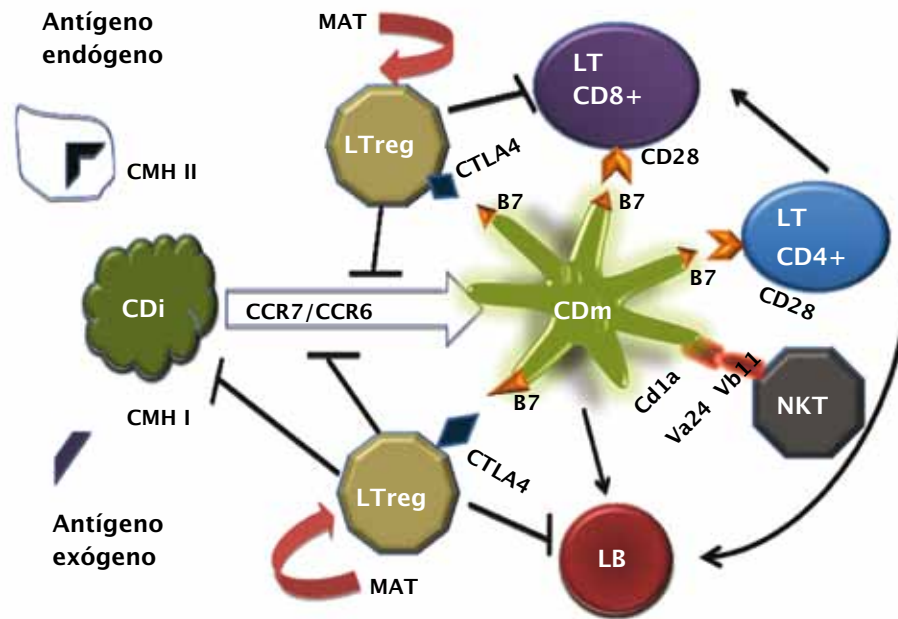
Los vasos sanguíneos relacionados con el tumor no expresan receptores de tipo E-selectina (CD62E), P-selectina (CD62P) ni la molécula de adhesión intercelular-1 (*Inter-Cellular Adhesion Molecule 1*, ICAM-1), lo que compromete el reclutamiento de células T efectoras en el sitio del tumor<sup>19</sup>. Estos hallazgos se utilizan para definir el pronóstico<sup>20</sup> y para medir la respuesta a los diferentes tratamientos en los ensayos clínicos.

En un estudio reciente se encontró que las células dendríticas "plasmocitoides" en casos de melanoma expresan grandes cantidades de la quimiocina CCR6 si se comparan con los controles sanos y son capaces de migrar hacia su ligando CCL20 en las células tumorales; esto sugiere que la molécula CCL20 puede participar en el reclutamiento de las células dendríticas de la sangre al tejido tumoral<sup>21</sup>.

## Evación inmunitaria de las células de melanoma

Las células de melanoma son capaces de evadir la respuesta antitumoral específica por diferentes mecanismos: disminuyendo la expresión de moléculas del MHC de clase I y II; favoreciendo la apoptosis de los linfocitos T de infiltración, por medio de su expresión de moléculas apoptóticas, como B7-H1 y Fas-L, y de moléculas inhibitorias, como B7-H3 y B7-H4; aumentando su secreción de citocinas inhibitorias, como el factor transformador de crecimiento beta ( $TGF-\beta$ ), el cual se une al péptido asociado a la latencia expresado por la célula dendrítica inmadura, lo cual limita la activación de las células T<sup>22</sup>.

La presencia de  $TGF-\beta$  precede las metástasis de células tumorales al ganglio linfático e induce apoptosis de linfocitos TCD4+ y células dendríticas en el ganglio centinela. Las células malignas producen cantidades masivas de  $TGF-\beta$ . En los modelos experimentales de melanoma, éste promueve el desarrollo de metástasis óseas osteolíticas, por la expresión de factores pro-metastásicos, como la proteína relacionada con la hormona



**Figura 1.** Papel de las CD y mecanismos de inmunosupresión mediados por el tumor. La vía del procesamiento de antígenos exógenos por las CD (células cancerígenas apoptóticas) y la activación de LTC comprende presentación cruzada de los antígenos tumorales por CDs, migración de las CD a los nodos linfáticos por CCR7. Las CD maduras inducen respuestas efectoras contra las células tumorales por activación de LT CD4+, LTC CD8+, células NK resultando en muerte tumoral. La activación inmune puede ser interferida por la inducción de la tolerancia inmune por el tumor o por las CDs inmaduras por estimulación antigénica inadecuada o débil, y los LTreg pueden interferir con la interacción del linfocito T efector con las CDs e inhibir la activación de la CD resultando en anergia inmune. Los LTreg son activados por macrófagos asociados a tumor (MATs) e interfieren con el proceso de polarización de la CD. La inmunosupresión ejercida por los LTreg es mediada a través de la interacción de CTLA4 con su ligando B7<sup>43</sup>

**Convenciones:** CMH I y II : complejo mayor de histocompatibilidad I Y II; Vα24 Vβ11 receptor de célula NKT; LTreg: linfocito T regulador; CD1a: molécula implicada en la presentación de antígenos glicolipídicos a las células NKT; CTLA-4: Antígeno de linfocitos T citotóxico 4 del inglés Cytotoxic T-Lymphocyte Antigen 4.

paratiroidea, la IL-11, el receptor quimiotáctico CXCR4 y la osteopontina. El melanoma metastásico también secreta grandes cantidades de IL-10; esta citocina polariza las células T hacia Th2, regula la expresión de moléculas CD1α sobre las células dendríticas, interfiriendo con su capacidad de presentación de antígenos, e induce la secreción dominante de IL-4 e IL-13, las que favorecen el crecimiento de las células tumorales<sup>23</sup>.

La producción de ácido láctico durante el proceso de glucólisis de las células de melanoma, participa en los mecanismos de evasión mediante la modulación del fenotipo de la célula dendrítica y la inhibición de los linfocitos T citotóxicos. La presencia de enzimas metabólicas, como la indolamina dioxigenasa (IDO) y la óxido nítrico inducible sintetasa, contribuyen a la evasión inmunitaria por sus efectos sobre la función de las células T. Las grandes

concentraciones de factor de crecimiento endotelial vascular (*Vascular Endothelial Growth Factor*, VEGF) en el melanoma, presentan una asociación negativa con la diferenciación de las células dendríticas, impidiendo su maduración, debido a la inducción de la expresión de genes antiapoptóticos<sup>24</sup>. Finalmente, si la presentación cruzada de los antígenos tumorales a células T CD8+ ocurre por las células dendríticas inmaduras, la respuesta de los linfocitos T citotóxicos da origen a un crecimiento tumoral incontrolado<sup>25</sup> (FIGURA 1).

## Vacunas de células dendríticas en melanoma

El objetivo de vacunar con células dendríticas es inducir una respuesta inmunitaria Th1 y activar los linfocitos T

citotóxicos para facilitar la eliminación del tumor. Las células dendríticas son generadas a partir de monocitos autólogos extraídos del huésped, y su maduración *in vitro* es inducida utilizando factores como el estimulante de colonias de granulocitos y monocitos (*Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor*, GM-CSF), IL-4, factor de necrosis tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ), IL-6, prostaglandina E2 (PGE2), IL-1, o utilizando una combinación denominada cóctel de maduración con TNF- $\alpha$ , poli-C e interferón gamma (IFN- $\gamma$ ).

Posteriormente, estas células dendríticas son pulsadas<sup>26</sup> con proteínas<sup>27</sup>, lisados de tumor<sup>28</sup>, péptidos, cuerpos apoptóticos o necróticos, ARN mensajero, epítomos específicos (MART-1, MAGE-1, 2 o 3, gp100), HLA-epítomos sintéticos, o secuencias de ADN o ARN en vectores virales, componentes microbianos como hemocianina, toxoide tetánico, antígeno de superficie para hepatitis B o amastigotes de leishmania<sup>29</sup> y, finalmente, se administran al huésped por diferentes vías, como intradérmica<sup>30</sup>, intravenosa, subcutánea, intralinfática o intraganglionar.

La naturaleza de la respuesta inmunitaria varía con la ruta de la administración; por ejemplo, las células dendríticas administradas por vía intravenosa se acumulan en los pulmones y luego se distribuyen a hígado, bazo y médula ósea. Por vía intradérmica o subcutánea, migran al ganglio linfático regional<sup>31</sup>. La inyección intradérmica o intravenosa induce a la célula T a producir IFN- $\gamma$ , y la vía intravenosa resulta en una respuesta humoral. La administración intraganglionar se considera superior a la inyección periférica<sup>32</sup>. Generalmente, como adyuvante se utiliza la IL-2<sup>33</sup>, capaz de inducir la proliferación y la diferenciación de los linfocitos T en células efectoras, y expandir las células T reguladoras CD4+CD25+ *in vivo* en pacientes con cáncer<sup>34,35</sup>.

Se han reportado más de 150 investigaciones en cáncer, en las que se utilizan vacunas basadas en células dendríticas<sup>36,37</sup>. El melanoma es el tipo de cáncer más estudiado<sup>38</sup>, seguido del cáncer de próstata, el cáncer renal, el cáncer de mama, el mieloma múltiple, la leucemia, el cáncer colorrectal y los gliomas<sup>39,40,41</sup>.

Sobre melanoma se han desarrollado, aproximadamente, 40 ensayos clínicos controlados, de vacunas basadas en células dendríticas en pacientes con melanoma metastásico<sup>42</sup>, 626 pacientes en total, sólo 1 en fase III; ninguno ha reportado efectos secundarios ni toxicidad, hasta el momento, con una tasa objetiva de respuesta de 5% a 10%. La mayor dificultad al analizar estos estudios es que no son comparables, dado que los antígenos utilizados y la técnica de cultivo de las células no son los mismos en todos los estudios<sup>43,44</sup>.

A pesar de lograrse la activación de las células T con células dendríticas maduras y antígenos tumorales espe-

cíficos, la respuesta es usualmente transitoria y rara vez produce regresión de las metástasis tumorales o estabilización del tumor<sup>45</sup>. La falta de éxito de esta terapia no sólo depende de la vacuna<sup>46</sup>, los tumores tienen la habilidad de liberar citocinas que inhiben la función de los linfocitos T efectores (IL-10, VEGF), inducen la formación de linfocitos Treg y disminuyen la expresión del MHC I<sup>47</sup>.

Se están desarrollando diferentes estrategias para controlar estas variables antes descritas, utilizando citocinas estimuladoras o bloqueando señales inhibitorias, como el CTLA<sup>48</sup>, o mejorando los métodos de maduración utilizando células autólogas de melanoma<sup>49</sup> e, incluso, inmunoglobulinas<sup>50</sup>.

## Conclusiones

Las células dendríticas son una población celular heterogénea fundamental en el desarrollo y el mantenimiento de la inmunidad adquirida. Las investigaciones adelantadas en los últimos 40 años han hecho posible el entendimiento de su naturaleza y función, lo que ha permitido el desarrollo de vacunas basadas en células dendríticas para diferentes enfermedades, como el melanoma. Las investigaciones en este campo son continuas y prometedoras<sup>51</sup>, y su uso se propone como terapia asociada a la quimioterapia para esta letal enfermedad; de ser satisfactorio, se convertirá en una herramienta terapéutica para el dermatólogo.

## Referencias

1. Zbytek B, Carlson JA, Granese J, Ross J, Mihm MC Jr, Slominski A. Current concepts of metastasis in melanoma. *Expert Rev Dermatol*. 2008;3:569-85.
2. Elliott B, Scolyer RA, Suci S, Lebecque S, Rimoldi D, Gugerli O, *et al*. Long-term protective effect of mature DC-LAMP+ dendritic cell accumulation in sentinel lymph nodes containing micrometastatic melanoma. *Clin Cancer Res*. 2007;13:3825-30.
3. Li YP, Latger-Canard V, Marchal L, Li N, Ou-Yang JP, Stoltz JF. The regulatory role of dendritic cells in the immune tolerance. *Biomed Mater Eng*. 2006;16:S163-70.
4. Blanco P, Palucka A, Pascual V, Banchereau J. Dendritic cells and cytokines in human inflammatory and autoimmune diseases. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2008;19:41-52.
5. McGovern VJ. Spontaneous regression of melanoma. *Pathology*. 1975;7:91-9.
6. Tuettenberg A, Schmitt E, Knop J, Jonuleit H. Dendritic cell-based immunotherapy of malignant melanoma: success and limitations. *J Dtsch Dermatol Ges*. 2007;5:190-6.
7. Nestle FO, Alijagic S, Gilliet M, Sun Y, Grabbe S, Dummer R, *et al*. Vaccination of melanoma patients with peptide- or tumor lysate-pulsed dendritic cells. *Nat Med*. 1998;4:328-32.



8. Wu L, Liu YJ. Development of dendritic-cell lineages. *Immunity*. 2007;26:741-50.
9. Sato K, Fujita S. Dendritic cells-nature and classification. *Allergol Int*. 2007;56:183-91.
10. Ueno H, Klechevsky E, Morita R, Asford C, Cao T, Matsui T, *et al*. Dendritic cell subsets in health and disease. *Immunol Rev*. 2007;219:118-42.
11. Ishikawa F, Niino H, Iino H, Yoshida S, Saito N, Onohara S, *et al*. The developmental program of human dendritic cells is operated independently of conventional myeloid and lymphoid pathways. *Blood*. 2007;110:3591-660.
12. Lebre MC, Tak PP. Dendritic cell subsets: their roles in rheumatoid arthritis. *Acta Reumatol Port*. 2008;33:35-45.
13. Steinman R. Dendritic cells: Understanding immunogenicity. *Eur J Immunol*. 2007;37:5360.
14. Huang Q, Liu D, Majewski P, Schulte LC, Korn JM, Young RA, *et al*. The plasticity of dendritic cell responses to pathogens and their components. *Science*. 2001;294:870-5.
15. Barral DC, Brenner MB. CD1 antigen presentation: how it works. *Nat Rev Immunol*. 2007;7:929-41.
16. Joffre O, Nolte MA, Sporri R, Reis e Sousa C. Inflammatory signals in dendritic cell activation and the induction of adaptive immunity. *Immunol Rev*. 2009;227:234-47.
17. Sada-Ovalle I, Torre L, Jiménez M, Martínez S, Zenteno E, Lascrain R. La vía de CD1 y la activación de células T NK hacia los antígenos glicolípidicos de *Mycobacterium tuberculosis*. *Gac Méd Méx*. 2005;141:35-41.
18. Polak MA, Borthwick NJ, Jager MJ, Cree IA. Melanoma vaccines: The problems of local immune suppression. *Human Immunol*. 2009;70:331-9.
19. Elliot B, Scolyer RA, Suci Stefan, Lebecque S, Rimoldi D, Gugerli O, *et al*. Long-term protective effect of mature DC-LAMP+ dendritic cell accumulation in sentinel lymph nodes containing micrometastatic melanoma. *Clin Cancer Res*. 2007;13:3825-30.
20. Lanadyl A, Kiss J, Somlal B, Fejos Z, Mohos A, Gaudi I, *et al*. Density of DC-LAMP(+) mature dendritic cells in combination with activated T lymphocytes infiltrating primary cutaneous melanoma is a Strong independent prognostic factor. *Cancer Immunol Immunother*. 2007;58:1459-89.
21. Charles J, Di Domizio J, Salameire D, Bendriss-Vermare N, Asford C, Muhammad R, *et al*. Characterization of circulating dendritic cells in melanoma: role of CCR6 in plasmacytoid dendritic cell recruitment to the tumor. *J Invest Dermatol*. 2010;130:1646-56.
22. Llopiz D, Dotor J, Casares N, Bezunartea J, Díaz-Valdés N, Ruiz M, *et al*. Peptide inhibitors of transforming growth factor-beta enhance the efficacy of antitumor immunotherapy. *Int J Cancer*. 2009;125:2614-23.
23. Jarnicki AG, Lysaght J, Todryk S, Mills KH. Suppression of antitumor immunity by IL-10 and TGF-beta-producing T cells infiltrating the growing tumor: influence of tumor environment on the induction of CD4+ and CD8+ regulatory T cells. *J Immunol*. 2006;177:896-904.
24. Polak ME, Borthwick NJ, Gabriel PG, Johnson P, Higgins B, Hurren J, *et al*. Mechanisms of local immunosuppression in cutaneous melanoma. *Br J Cancer*. 2007;96:1879-87.
25. Polak ME, Johnson P, Di Palma S, Higgins B, Hurren J, Borthwick NJ, *et al*. Presence and maturity of dendritic cells in melanoma lymph node metastases. *J Pathol*. 2005;207:83-90.
26. Lesterhuis WJ, Aarntzen E, De Vries I, Schuurhuis D, Figdor C, Adema G, *et al*. Dendritic cell vaccines in melanoma: From promise to proof? *Crit Rev Oncol Hematol*. 2008;66:118-34.
27. Palucka AK, Dhodapkar MV, Pacesny S, Burkeholder S, Wittkowski KM, Steinman RM, *et al*. Single injection of CD34+ progenitor-derived dendritic cell vaccine can lead to induction of T-cell immunity in patients with stage IV melanoma. *J Immunother*. 2003;26:432-9.
28. Vilella R, Benítez D, Mila J, Lozano M, Vilana R, Pomes J, *et al*. Pilot study of treatment of biochemotherapy-refractory stage IV melanoma patients with autologous dendritic cells pulsed with a heterologous melanoma cell line lysate. *Cancer Immunol Immunother*. 2004;53:651-8.
29. Bertholet S, Goldszmid R, Morrot A, Debrabant A, Afrin F, Collazo-Custodio C. Leishmania antigens are presented to CD8+ T cells by a transporter associated with antigen processing-independent pathway *in vitro* and *in vivo*. *J Immunol*. 2006;177:3525-33.
30. Nasi ML, Lieberman P, Busam KJ, Prieto V, Panageas KS, Lewis JJ, *et al*. Intradermal injection of Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor (GM-CSF) in patients with metastatic melanoma recruits dendritic cells. *Cytokines Cell Mol Ther*. 1999;5:139-44.
31. Fong L, Brockstedt D, Benike C, Wu L, Engleman EG. Dendritic cells injected via different routes induce immunity in cancer patients. *J Immunol*. 2001;166:4254-9.
32. Jonuleit H, Giesecke-Tuettenberg A, Tuting T, Thurner-Schuler B, Stuge TB, Paragnik L, *et al*. A comparison of two types of dendritic cell as adjuvants for the induction of melanoma-specific T-cell responses in humans following intranodal injection. *Int J Cancer*. 2001;93:243-51.
33. Escobar A, López M, Serrano A, Ramírez M, Pérez C, Aguirre A, González R, *et al*. Dendritic cell immunizations alone or combined with low doses of interleukin-2 induce specific immune responses in melanoma patients. *Clin Exp Immunol*. 2005;142:555-68.
34. Tuyaerts S, Aerts JL, Corthals J, Neyns B, Heirman C, Breckpot K, *et al*. Current approaches in dendritic cell generation and future implications for cancer immunotherapy. *Cancer Immunol Immunother*. 2007;56:1513-37.
35. Figdor CG, de Vries IJ, Lesterhuis WJ, Melief CJ. Dendritic cell immunotherapy: mapping the way. *Nat Med*. 2004;10:475-80.
36. Ballestrero A, Boy D, Moran E, Cirmena G, Brossart P, Nenci A. Immunotherapy with dendritic cells for cancer. *Adv Drug Deliv Rev*. 2008; 60:173-83.
37. De Gruijl T, van den Eertwegh A, Pinedo H, Scheper R. Whole-cell cancer vaccination: from autologous to allogeneic-tumor- and dendritic cell-based vaccines. *Cancer Immunol Immunother*. 2008;57:1569-77.

38. El Marsafy S, Bagot M, Bensussan A, Mauviel A. Dendritic cells in the skin potential use for melanoma treatment. *Pigment Cell Melanoma Res.* 2009;22:30-41. Dendritic cells in the skin potential use for melanoma treatment. *Pigment Cell Melanoma Res.* 2009;22:30-41.
39. Aamtzen EH, Figdor CG, Adema GJ, Punt CJ, de Vries IJ. Dendritic cell vaccination and immune monitoring. *Cancer Immunol Immunother.* 2008;57:1559-68.
40. Banchereau J, Palucka AK. Dendritic cells as therapeutic vaccines against cancer. *Nat Rev Immunol.* 2005;5:296-306.
41. Koski GK, Cohen PA, Roses RE, Xu S, Czerniecki BJ. Reengineering dendritic cell-based anti-cancer vaccines. *Immunol Rev.* 2008;222:256-76.
42. Alexandrescu DT, Ichim TE, Riordan NH, Marincola FM, Di Nardo A, Kabigting FD, *et al.* Immunotherapy for melanoma: current status and perspectives. *J Immunother.* 2010;33:570-90.
43. Engell-Noerregaard L, Hansen TH, Andersen MH, Thor Straten P, Svane IM. Review of clinical studies on dendritic cell-based vaccination of patients with malignant melanoma: assessment of correlation between clinical response and vaccine parameters. *Cancer Immunol Immunother.* 2009;58:1-14.
44. Poehlein C, Rüttinger D, Ma J, Hu H, Urba W, Fox B. Immunotherapy for melanoma: the good, the bad, and the future. *Curr Oncol Rep.* 2005;7:383-92.
45. Schadendorf D, Ugurel S, Schuler-Thurner B, Nestle FO, Enk A, Bröcker EB, *et al.* Dacarbazine (DTIC) versus vaccination with autologous peptide pulsed dendritic cells (DC) in first-line treatment of patients with metastatic melanoma: a randomized phase III trial of the DC study group of the DeCOG. *Ann Oncol.* 2006;17:563-70.
46. Banchereau J, Palucka AK, Dhodapkar M, Burkeholder S, Taquet N, Rolland A, *et al.* Immune and clinical responses in patients with metastatic melanoma to CD34(+) progenitor-derived dendritic cell vaccine. *Cancer Res.* 2001;61:6451-8.
47. Rosenberg SA, Sherry RM, Morton KE, Scharfman WJ, Yang JC, Topalian SL, *et al.* Tumor progression can occur despite the induction of very high levels of self/tumor antigen-specific CD8+ T cells in patients with melanoma. *J Immunol.* 2005;175:6169-76.
48. Met O, Wang M, Pedersen AE, Nissen MH, Buus S, Claesson MH. The effect of a therapeutic dendritic cell-based cancer vaccination depends on the blockage of CTLA-4 signaling. *Cancer Lett.* 2006;231:247-56.
49. O'Rourke MG, Johnson M, Lanagan C, See J, Yang J, Bell JR, *et al.* Durable complete clinical responses in a phase I/II trial using an autologous melanoma cell/dendritic cell vaccine. *Cancer Immunol Immunother.* 2003;52:387-95.
50. O'Rourke MG, Johnson MK, Lanagan CM, See JL, O'Connor LE, Slater GJ, *et al.* Dendritic cell immunotherapy for stage IV melanoma. *Melanoma Res.* 2007;17:316-22.
51. Jandus C, Speiser D, Romero P. Recent advances and hurdles in melanoma immunotherapy. *Pigment Cell Melanoma Res.* 2009;22:711-23.