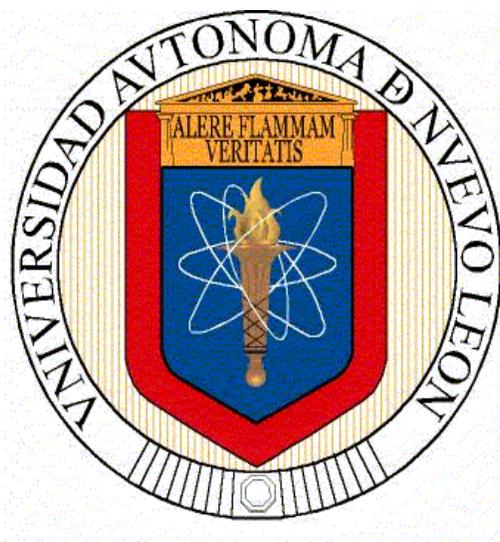


UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



**EFFECTO DE LA VACUNACIÓN BASADA EN WT1 Y ODN-CpG
ADMINISTRADOS EN AEROSOL CONTRA TUMORES
PULMONARES Y SUBCUTÁNEOS**

**POR
M.C. EDGAR MANILLA MUÑOZ**

**COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE
DOCTOR EN CIENCIAS CON ORIENTACIÓN EN INMUNOBIOLOGÍA**

MARZO 2017

EFFECTO DE LA VACUNACIÓN BASADA EN WT1 Y ODN-CpG
ADMINISTRADOS EN AEROSOL CONTRA TUMORES
PULMONARES Y SUBCUTÁNEOS

COMISIÓN DE TESIS

Dr. Pablo Zapata Benavides
Presidente

Dr. Edgar Mendoza Gamboa
Secretario

Dra. Lydia Guadalupe Rivera Morales
Vocal

Dra. Laura María Trejo Ávila
Vocal

Dr. Moisés Armides Franco Molina
Vocal

EFFECTO DE LA VACUNACIÓN BASADA EN WT1 Y ODN-CpG
ADMINISTRADOS EN AEROSOL CONTRA TUMORES
PULMONARES Y SUBCUTÁNEOS

DIRECCIÓN DE TESIS

Dr. Pablo Zapata Benavides
Director de Tesis

Dra. Diana Elisa Zamora Ávila
Asesora externa

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Cristina Rodríguez Padilla, a quien reconozco su liderazgo, visión y pasión por la ciencia, y muy especialmente por darme la oportunidad de desarrollarme en el área de la Inmunología.

Al Laboratorio de Inmunología y Virología de la FCB/UANL, por proveer el apoyo financiero y la infraestructura requeridos para la realización de este trabajo.

Al Dr. Pablo Zapata Benavides, por su amistad y apoyo incondicional en cada etapa de mi formación, tanto en lo personal como en lo académico. Muchas gracias por las comidas, pláticas, reflexiones y consejos, pero sobre todo por su gran ejemplo de superación, humildad, tolerancia y respeto al prójimo. Le estaré eternamente agradecido por todas sus enseñanzas.

A la Dra. Diana Reséndez Pérez, por su amistad, enseñanzas y consejos, así como por el enorme apoyo brindado para la conclusión de esta etapa de mi formación académica.

A los profesores integrantes de mi comisión de tesis: Dra. Laura Trejo Ávila, Dra. Lydia Rivera Morales, Dr. Edgar Mendoza Gamboa y Dr. Moisés Franco Molina; y a mi asesora externa, la Dra. Diana Zamora Ávila, por su enorme disposición y valiosos consejos para la mejora de este trabajo.

A mis hermanos del L5: Chago, Kary, Fer, Dani, Ramiro, Mariela, Felipe, Cesi, Jorge, Evelyn, José Luis, Hugo, Luisa María, Deby y a tantos amigos más que han pasado por el laboratorio y a quienes tengo una alta estima.

A la raza del LIV: Anita, Laura, Yarys, Alex, Erikita, Carmen, Silvia, Rilque, Ash, Manuel, Tavo, Talyha, Beto, Itza, Carito, Charlie, Daniel, Salomé, Citlali, Nancyta, Paquito, Humberto, David, Magda, Teo y también a otros compañeros con quienes conviví tiempo atrás: Faby, Crystel y Albert.

A la Mtra. Esther Treviño Holten, a quien agradezco su amistad sincera, y también el haberme aconsejado realizar mi servicio social en el L5, en mis años como estudiante de licenciatura.

Al Mtro. José Luis Méndez y al Dr. Feliciano Segovia, por su amistad desinteresada y confianza durante tantos años.

Y a todos aquellos a quienes involuntariamente omití incluir, y que formaron parte de este logro, muchas gracias.

DEDICATORIA

A Dios

A mi familia y amigos

A mis ángeles en el cielo

ÍNDICE

Sección	Página
AGRADECIMIENTOS	i
DEDICATORIA	ii
LISTA DE TABLAS	vii
LISTA DE FIGURAS	viii
NOMENCLATURA	x
RESUMEN	xv
ABSTRACT	xvi
1. INTRODUCCIÓN	1
2. ANTECEDENTES	3
2.1. Cáncer	3
2.2. Inmunovigilancia tumoral	4
2.3. Inmunidad innata contra cáncer	5
2.4. Inmunidad adaptativa contra cáncer	7
2.5. Inmunoedición tumoral	8
2.6. Mecanismos tumorales de evasión del sistema inmune	9
2.7. Inmunoterapia en cáncer	11
2.8. Vacunas terapéuticas en cáncer	12
2.8.1. Vacunas basadas en células tumorales	12
2.8.2. Vacunas basadas en células dendríticas	13
2.8.3. Vacunas basadas en proteínas/péptidos	14
2.8.4. Vacunas genéticas	15
2.8.5. Vacunas de ADN ..	15
2.9. Administración pulmonar de vacunas contra cáncer	17
2.10. Uso de adyuvantes en vacunación anti-cáncer	18
2.10.1. Oligodesoxinucleótidos CpG (ODN-CpG)	19

2.11. Proteína del Tumor de Wilm's (WT1)	20
2.11.1. WT1 como antígeno tumoral	22
2.11.2. Inmunoterapias en cáncer basadas en WT1.....	23
3. JUSTIFICACIÓN	28
4. HIPÓTESIS	30
5. OBJETIVOS	31
5.1. Objetivo general	31
5.2. Objetivos particulares	31
6. MATERIAL Y MÉTODOS	32
6.1. Líneas celulares	32
6.2. Animales	32
6.3. Oligodesoxinucleótidos CpG (ODN-CpG)	32
6.4. Plásmido y péptidos sintéticos de WT1	33
6.5. Transformación y producción del plásmido WT1 H+/-	33
6.6. Administración pulmonar de oligonucleótidos CpG 1826, 2395 y 2395-C en ratones C57BL/6	34
6.7. Obtención de suero y tejido pulmonar de ratones nebulizados con CpG 1826, 2395 y 2395-C	35
6.8. Análisis de infiltración de poblaciones celulares CD3+, CD19+, CD20+, CD80+ y CD69+ en tejido pulmonar de ratones nebulizados con CpG 1826, 2395 y 2395-C	35
6.9. Análisis histológico del tejido pulmonar de ratones nebulizados con CpG 1826, 2395 y 2395-C	36
6.10. Análisis de citocinas Th1/Th2/Th17 en suero de ratones nebulizados con CpG 1826, 2395 y 2395-C	37
6.11. Transfección de células B16F10 con el plásmido de WT1 (H+/-)	37
6.12. Extracción y cuantificación de proteínas	38
6.13. Western blot	38
6.13.1. Preparación de proteínas	38

6.13.2. Electroforesis en gel de poliacrilamida	39
6.13.3. Transferencia a membrana de nitrocelulosa	39
6.13.4. Inmunodetección	39
6.14. Análisis de la especificidad de los péptidos 9 mer y 16 mer	40
6.15. Medición de anticuerpos específicos para WT1 en suero	40
6.16. Modelo de tumor pulmonar y esquema de tratamientos	41
6.17. Modelo de linfoma subcutáneo y esquema de tratamientos	42
6.18. Modelo profiláctico de linfoma subcutáneo	42
6.19. Análisis estadístico	43
7. RESULTADOS	44
7.1. Infiltración de células del sistema inmune en tejido pulmonar de ratones nebulizados con ODN-CpG	44
7.2. Perfil de citocinas Th1/Th2/Th17 en suero de ratones nebulizados con ODN-CpG y controles	48
7.3. Análisis histológico de pulmones tras la administración en aerosol de ODN-CpG	48
7.4. Expresión de la proteína de WT1 en las líneas celulares B16F10 y L5178Y-R	51
7.5. Funcionalidad del plásmido WT1 (H+/-) y especificidad de los péptidos sintéticos de 9 mer y 16 mer derivados de WT1	52
7.6. Detección de anticuerpos contra WT1 en suero de ratones inmunizados con el plásmido WT1 (H+/-)	53
7.7. Efecto de la vacunación con DNA/péptidos de WT1 y CpG-2395, sobre tumores B16F10 implantados pulmonarmente	54
7.8. Efecto de la vacunación con péptidos de WT1 y CpG-2395, sobre tumores L5178Y-R implantados subcutáneamente	55
7.9. Efecto de la vacunación con WT1 (H+/-) y CpG-2395, en la prevención del desarrollo de tumores L5178Y-R subcutáneos	59
8. DISCUSIÓN	61

9. CONCLUSIONES	70
LITERATURA CITADA	72
RESUMEN BIOGRÁFICO	84

LISTA DE TABLAS

Tabla	Página
1. Clasificación de adyuvantes por modo de acción	18
2. Ensayos de fase clínica con WT1 como blanco de inmunoterapia	24
3. Concentración de citocinas en suero de ratones tratados con ODN-CpG y controles	48
4. Alteraciones histológicas en pulmones de ratones nebulizados con ODN- CpG y 2395-C	51

LISTA DE FIGURAS

Figura	Página
1. “Hallmarks” o sellos distintivos del cáncer.....	4
2. Mecanismo de inmunoección tumoral	9
3. Mecanismos tumorales de evasión del sistema inmune	10
4. Categorías de inmunoterapia en cáncer	11
5. Mecanismo de acción de las vacunas de ADN	16
6. Cascada inmunoestimuladora activada por la administración de antígeno y ODN-CpG	20
7. Estructura de WT1	21
8. Priorización de antígenos tumorales	23
9. Sistema empleado para la liberación controlada de los tratamientos por aerosol	34
10. Inmunofluorescencia de células CD19+ en tejido pulmonar a las 16 h post-nebulización de los grupos PBS, CpG-1826, CpG-2395 y 2395-C.....	45
11. Inmunofluorescencia de células CD69+ en tejido pulmonar a las 16 h post-nebulización de los grupos PBS, CpG-2395 y 2395-C	46
12. Poblaciones de células del sistema inmune infiltradas en pulmones de ratones a las 16 h post-nebulización con ODN-CpG y controles	47
13. Análisis histológico de los pulmones de ratones nebulizados con ODN- CpG y controles	50
14. Expresión basal de la proteína WT1 en las líneas celulares B16F10 y L5178Y-R	51
15. Western blot para WT1.....	52

16. Cuantificación de los niveles de IFN- γ en sobrenadantes	53
17. Ensayo de dot blot para la detección de anticuerpos anti-WT1	54
18. Metástasis pulmonares en ratones C57BL6	54
19. Fotografías representativas de los pulmones de los grupos de ratones aerosolizados con los diferentes tratamientos versus el grupo control	55
20. Cinética de peso corporal de ratones BALB/c con tumores L5178Y-R Subcutáneos	56
21. Cinética de volumen tumoral de ratones BALB/c con tumores L5178Y-R Subcutáneos	57
22. Fotografías de ratones con linfoma subcutáneo tratados con los péptidos 9 mer, 16 mer y CpG-2395	58
23. Cinética de crecimiento tumoral en ratones tratados con WT1 (H+/-) y CpG-2395	59
24. Gráfico de supervivencia de ratones tratados con WT1 (H+/-) y CpG-2395	60

NOMENCLATURA

aa	aminoácido
AAT	Antígeno asociado a tumor
ALR	Receptor tipo AIM-2
ANOVA	Análisis de varianza
BSA	Albúmina de suero bovino
CaCl ₂	Cloruro de calcio
°C	Grados Celsius
CCDA	Citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos
CD	Clúster de diferenciación
CLR	Receptor de lectina tipo C
CD40L	Ligando de CD40
CO ₂	Dióxido de carbono
CPA	Células presentadoras de antígeno
CTLA-4	Antígeno-4 de linfocitos T citotóxicos
DAMP	Patrón molecular asociado a daño
DCs	Células dendríticas
DMEM	Medio de cultivo Eagle modificado de Dulbecco
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
ELISA	Ensayo de inmunoabsorción ligado a enzima
FASL	Ligando de FAS

FDA	Food and Drug Administration
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
g	Gramo
GM-CSF	Factor estimulante de colonias de granulocitos y monocitos
h	Hora
HPLC	Cromatografía líquida de alta eficacia
HSP	Proteína de choque térmico
H ₂ O	Agua
H&E	Hematoxilina y eosina
iDCs	Células dendríticas inmaduras
IFN- γ	Interferón gamma
IgG	Inmunoglobulina G
IHQ	Inmunohistoquímica
IL	Interleucina
kb	Kilobases
kDa	Kilodalton
KTS	Lisina-treonina-serina
LTC	Linfocito T citotóxico
M	Molar
MAGE-1	Antígeno-1 asociado a melanoma
mg	Miligramo
μ g	Microgramo
MHC	Complejo mayor de histocompatibilidad

MICA/B	Polipéptidos relacionados con el MHCI (secuencia A/B)
min	Minuto
ml	Mililitro
μg	Microgramo
μl	Microlitro
μm	Micrómetro
mM	Milimolar
mm ³	Milímetro cúbico
mφ	macrófagos
NaCl	Cloruro de sodio
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato reducido
ng	Nanogramo
NK	Natural killer
NKG2D	Receptor de natural killer del grupo 2
NLR	Receptor tipo NOD
nm	Nanómetro
ODN-CpG	Oligodesoxinucleótidos desoxicitidil-dedoxiguanosina
OMS	Organización Mundial de la Salud
O ₂	Oxígeno
PAMP	Patrón molecular asociado a patógeno
PAP	Fosfatasa ácida prostática
PARP	Poli (ADP-ribosa) polimerasa
PBMC	Células mononucleares de sangre periférica

PBS	Amortiguador fosfato salino
pDCs	Células dendríticas plasmocitoides
PD-1	Muerte programada 1
PD-L1	Ligando de PD1
PE	Ficoeritrina
PEI	Polietilenimina
pg	Picogramos
pH	Potencial de hidrógeno
PRR	Receptor de reconocimiento de patrón
RNA _m	Ácido ribonucleico mensajero
ROS	Especies reactivas de oxígeno
rpm	Revoluciones por minuto
RPMI	Medio de cultivo Roswell Park Memorial Institute
SDS	Dodecil sulfato de sodio
SFB	Suero fetal bovino
TBS	Amortiguador tris salino
TCR	Receptor de células T
TGF- β	Factor de crecimiento transformante beta
Th	Linfocito T cooperador
TLR	Receptor tipo Toll
TRAIL	Ligando inductor de apoptosis relacionado a TNF
V	Volt
x g	gravedades

VIH	Virus de inmunodeficiencia humana
WT1	Proteína del tumor de Wilm's

RESUMEN

El cáncer se considera una enfermedad multifactorial de base genética, cuya incidencia y mortalidad van en aumento. Las terapias convencionales actuales son poco eficaces y tóxicas, por lo que la inmunoterapia representa una opción para el tratamiento de esta enfermedad. El objetivo de este trabajo fue evaluar la efectividad de la vacunación contra la proteína del tumor de Wilm's (WT1) más oligonucleótidos desoxicitidil-desoxiguanosina (ODN-CpG) administrados por aerosol, sobre el crecimiento de tumores pulmonares y subcutáneos. Primero fue evaluada la capacidad inmunomoduladora de los ODN-CpG, a través del análisis de células inmunológicas en pulmón y citocinas en suero de ratones, además por histología se evaluaron las alteraciones en pulmón, inducidas por los ODN-CpG. Por western blot se determinó la expresión de WT1 en las líneas celulares B16F10 y L5178Y-R (utilizadas para los modelos *in vivo*), y se evaluó la especificidad y funcionalidad del plásmido WT1 (H+/-) y los dos péptidos sintéticos de WT1 usados como vacunas. Posteriormente se evaluó la efectividad terapéutica de la vacunación contra WT1 más ODN-CpG en modelos murinos de: a) tumores B16F10 pulmonares, inducidos en ratones C57BL/6 y, b) tumores L5178Y-R subcutáneos, en ratones BALB/c; así como la capacidad profiláctica de la vacunación en tumores L5178Y-R subcutáneos. El análisis de inmunofluorescencia, en comparación al grupo control, mostró que los CpG-1826 y CpG-2395 causaron una reducción significativa de células CD3+, CD19+ y CD20+, sin presencia de células CD80+, mientras el CpG-2395 indujo un incremento de células CD69+ en el tejido pulmonar. El análisis de citocinas, reveló que, en comparación al grupo control, el CpG-1826 incrementó significativamente los niveles de IL-4 e IL-10, así como de IFN γ , mientras el CpG-2395 redujo IL-6 e IL-10. El análisis histológico evidenció alteraciones agudas en los pulmones, algunas significativas con respecto a los controles, incluyendo: para el CpG-1826 engrosamiento de sacos alveolares, congestión, enfisema e hiperplasia; para el CpG-2395 hiperplasia marcada, infiltrado inflamatorio y edema. En otros experimentos se detectó una alta expresión de WT1 en células B16F10 y L5178Y-R y se demostró la funcionalidad del plásmido WT1 (H+/-), a través de la expresión exógena de WT1 en células transfectadas y la producción de anticuerpos anti-WT1 en ratones inmunizados. La especificidad de los péptidos se comprobó por la producción de IFN- γ en co-cultivos de linfocitos y células B16F10. En el modelo de tumor B16F10 pulmonar, el número y tamaño de focos tumorales no mostró diferencias entre los diferentes grupos que recibieron vacunación contra WT1 y el CpG-2395, con respecto al grupo control, tampoco hubo diferencias en el peso de los pulmones ni en la supervivencia de los ratones. En el modelo de linfoma subcutáneo L5178Y-R, en comparación al control se observó una regresión tumoral y una mayor supervivencia en todos los grupos de tratamiento, excepto en el que recibió la combinación de los dos péptidos de WT1 más el CpG-2395. Finalmente, en el modelo profiláctico de linfoma, en los grupos que recibieron el plásmido WT1 H (+/-) solo o en combinación con el CpG-2395, la aparición del tumor se retrasó considerablemente y la supervivencia se vio incrementada para todos los grupos, excepto en los ratones tratados con CpG-2395. En conjunto, los datos sugieren la existencia de mecanismos de evasión inmunológica en tumores B16F10 pulmonares y respaldan la efectividad de la vacunación pulmonar contra WT1 y CpG en tumores L5178Y-R subcutáneos, aunque debe ponerse atención en la posible inducción de mecanismos de tolerancia inmunológica.

ABSTRACT

Cancer is considered a genetic multifactorial disease, whose incidence and mortality are increasing. Current conventional therapies are ineffective and toxic, so immunotherapy represents an option for the treatment of this disease. The aim of this work was to evaluate the effectiveness of the vaccination against the Wilm's tumor protein (WT1) plus deoxycytidyl-deoxyguanosine oligonucleotides (CpG-ODN) administered by aerosol, on the growth of pulmonary and subcutaneous tumors. First, the immunomodulatory capacity of CpG-ODN was evaluated, through the analysis of immunological cells in the lungs and cytokines in serum of mice. Histologically, lung alterations induced by CpG-ODN were also evaluated. Western blot expression of WT1 was determined on B16F10 and L5178Y-R cell lines (used for the *in vivo* models), and the specificity and functionality of the WT1 (H +/-) plasmid and the two synthetic WT1 synthetic peptides (used as vaccines) was evaluated. Later, was evaluated the therapeutic effectiveness of vaccination against WT1 plus CpG-ODN in murine models of: a) B16F10 lung tumors induced in C57BL/6 mice and, b) subcutaneous L5178Y-R tumors in BALB/c mice; as well as the prophylactic capacity of vaccination in subcutaneous L5178Y-R tumors. Immunofluorescence analysis, compared to the control group, showed that CpG-1826 and CpG-2395 caused a significant reduction of CD3+, CD19+ and CD20+ cells, without the presence of CD80+ cells, whereas CpG-2395 induced an increase of CD69+ in the lung tissue. Cytokine analysis revealed that, in comparison to the control group, CpG-1826 significantly increased levels of IL-4 and IL-10 as well as IFN γ , while CpG-2395 reduced IL-6 and IL-10 levels. The histological analysis revealed acute alterations in the lungs, some significant with respect to the controls, including: for CpG-1826 thickening of alveolar sacs, congestion, emphysema and hyperplasia; For CpG-2395 marked hyperplasia, inflammatory infiltrate and edema. In other experiments, high WT1 expression was detected in B16F10 and L5178Y-R cells and the functionality of the WT1 (H +/-) plasmid was demonstrated, through the exogenous expression of WT1 in transfected cells and the production of anti-WT1 antibodies in immunized mice. The specificity of the peptides was verified by the production of IFN- γ in co-cultures of lymphocytes and B16F10 cells. In the lung B16F10 tumor model, the number and size of tumor foci did not show differences between the different groups receiving vaccination against WT1 and CpG-2395, compared to the control group, with no differences in lung weight or survival of the mice. In the L5178Y-R subcutaneous lymphoma model, tumor regression and increased survival were observed in all treatment groups, except for the combination of the two WT1 peptides plus CpG-2395. Finally, in the prophylactic lymphoma model, in groups receiving the WT1 H (+/-) plasmid alone or in combination with CpG-2395, tumor onset was significantly delayed and survival was increased for all groups, except in mice treated with CpG-2395. Overall, the data suggest the existence of immune evasion mechanisms in lung B16F10 tumors and support the effectiveness of lung vaccination against WT1 and CpG in subcutaneous L5178Y-R tumors, although attention should be paid to the possible induction of immune tolerance mechanisms.

1. INTRODUCCIÓN

El cáncer es una enfermedad proliferativa, de origen multifactorial, caracterizada por un crecimiento descontrolado de células, cuya incidencia y mortalidad han ido a la alza, a pesar de los avances en el campo de la medicina y otras áreas del conocimiento. La detección temprana de formas localizadas del tumor y su escisión quirúrgica ha sido siempre la terapia más efectiva en cáncer; desafortunadamente muchos casos se diagnostican en forma tardía y los tratamientos convencionales (en particular la quimioterapia) han mostrado una efectividad limitada, con elevada toxicidad y sin beneficios en la supervivencia de los pacientes.

La proteína del tumor de Wilm's (WT1) es un factor de transcripción involucrado en proliferación y diferenciación celular y apoptosis, que modula la expresión de un gran número de genes asociados a estos procesos; se ha demostrado su sobreexpresión en distintas neoplasias, desde leucemias hasta tumores sólidos de mama, pulmón, ovario, útero, tiroides, melanoma etc., donde desempeña un papel oncogénico, por lo que recientemente WT1 fue reconocido como el antígeno tumoral universal más importante (en un listado de 75 antígenos), para el desarrollo de inmunoterapias contra el cáncer. Actualmente existe evidencia clínica de la vacunación contra WT1 en tumores hematológicos y sólidos, donde se ha demostrado que la vacunación es efectiva y segura.

Las vacunas en cáncer, constituyen una novedosa estrategia inmunoterapéutica y tienen como objetivo estimular o potenciar en el huésped una respuesta inmunitaria contra los antígenos del tumor, además inducen menos efectos secundarios y tienen el potencial de evitar metástasis y recurrencia, en comparación con las terapias estándar. Los oligodesoxinucleótidos CpG (ODN-CpG) son moléculas sintéticas que contienen dinucleótidos desoxicitidil-desoxiguanosina no metilados que simulan el ADN bacteriano, son reconocidos por el receptor tipo Toll 9 (TLR-9) e inducen la producción de citocinas, predominantemente Th1, que participan en la maduración, diferenciación y proliferación de linfocitos B y T, células NK y monocitos/macrófagos. Los ODN-CpG han mostrado un amplio potencial terapéutico en diversas enfermedades, incluyendo el cáncer, donde se ha demostrado su seguridad y eficacia como adyuvantes en vacunación.

Los pulmones son órganos continuamente expuestos a partículas orgánicas e inorgánicas y numerosos microorganismos presentes en el medio ambiente, lo que obliga al despliegue de mecanismos inmunológicos rápida y eficientemente. La entrega de agentes terapéuticos directamente al pulmón representa una opción no invasiva y sencilla, ideal para aplicaciones repetidas con disminución de dosis, que garantiza una buena absorción y distribución homogénea en el epitelio pulmonar; además, la alta vascularización del pulmón y su interacción directa con la circulación sanguínea, permiten obtener efectos terapéuticos no solo locales, sino sistémicos. Por todo ello la administración pulmonar de vacunas, representa una estrategia recientemente abordada para la generación de respuestas inmunes antitumor.

La finalidad de este trabajo es evaluar la eficacia de vacunas de nueva generación basadas en WT1 (DNA y péptidos sintéticos) y en combinación con el adyuvante ODN-CpG, administradas por aerosol, para el tratamiento de tumores pulmonares y subcutáneos, derivados de líneas celulares con alta expresión de WT1.

2. ANTECEDENTES

2.1. Cáncer

El término cáncer engloba un conjunto de enfermedades de origen multifactorial que se caracterizan por el crecimiento descontrolado de células anormales y su diseminación en el organismo. A nivel molecular, el cáncer es resultado del daño en el material genético inducido por agentes físicos, químicos y/o biológicos, falla en los sistemas de reparación del ADN, anomalías en genes reguladores del ciclo celular y apoptosis, así como un desbalance de genes supresores de tumor y oncogenes (Binelfa y Salinas, 2005).

En la actualidad el cáncer es considerado un serio problema de salud pública, cuya incidencia y mortalidad han ido a la alza. Tan solo en el 2012, se registraron más de 14 millones de casos nuevos de cáncer a nivel mundial, con una mortalidad de 8.2 millones de personas (Ferlay et al., 2015). Para el año 2030, la Organización Mundial de la Salud estima que habrá en el mundo alrededor de 26 millones de nuevos casos y 17 millones de muertes al año (Boyle and Levin, 2008).

Recientemente, se ha postulado que las células cancerosas poseen 10 características biológicas comunes, que se conocen como “hallmarks” o sellos distintivos del cáncer (Hanahan y Weinberg, 2000, 2011) e incluyen: a) capacidad de división ilimitada (inmortalidad), b) auto-suficiencia en señales de crecimiento, c) insensibilidad a señales anti-crecimiento, d) evasión de la apoptosis, e) angiogénesis sostenida, f) invasión de tejidos/metástasis, g) metabolismo alterado, h) promoción de la inflamación, i) inestabilidad genética con acumulación de mutaciones y, j) evasión del sistema inmune (Figura 1).

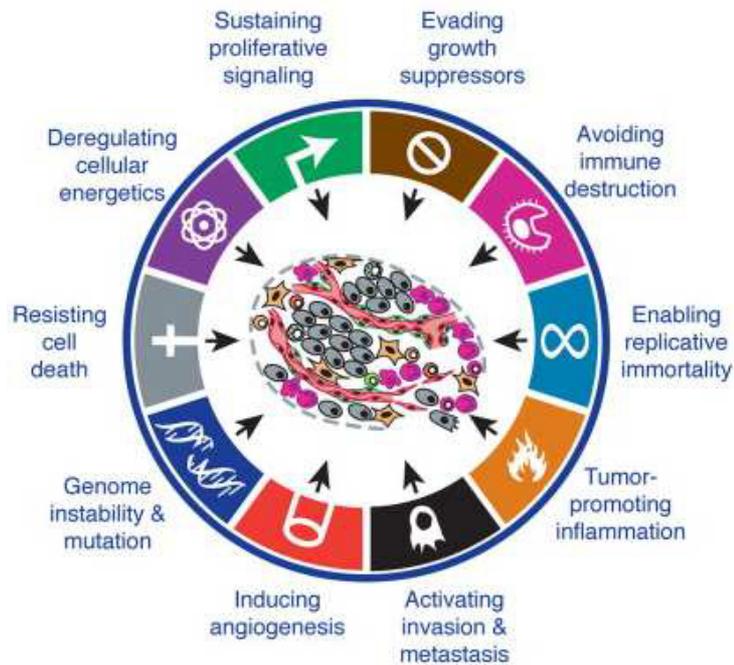


Figura 1. “Hallmarks” o sellos distintivos del cáncer. Modificado de Hanahan and Weinberg, 2011.

2.2. Inmunovigilancia tumoral

La importancia del sistema inmunológico en la protección contra diversos patógenos como virus, bacterias y parásitos está bien establecida. En cambio existe controversia sobre si la prevención del cáncer es o no una función primaria inherente al sistema inmune (Corthay, 2014). Hace más de 50 años, Lewis Thomas and Frank Macfarlane Burnet propusieron la hipótesis de la vigilancia inmunológica o inmunovigilancia, como la capacidad del sistema inmune para identificar y eliminar células tumorales (Burnet, 1957). No obstante, la hipótesis de la inmunovigilancia del cáncer fue aceptada hasta 1990, a partir de evidencia experimental obtenida en animales knock-out, en los que era factible inducir tumores usando agentes químicos y observar la aparición de tumores espontáneos (Dunn et al., 2002). Un enfoque opuesto a la hipótesis de la inmunovigilancia, sugiere que las células inmunológicas inflamatorias y las citocinas presentes en los tumores, actúan como promotoras del crecimiento tumoral, más que suprimirlo (Mantovani et al., 2008). Sin embargo, existe basta evidencia que

indica que una función primaria del sistema inmunológico es la prevención del cáncer, lo que se sustenta en 8 observaciones principales (Corthay, 2014):

- 1) Los pacientes con inmunodeficiencias primarias tienen un mayor riesgo de cáncer
- 2) Los pacientes receptores de órganos, que reciben tratamiento inmunosupresor, son más propensos a desarrollar cáncer
- 3) Los pacientes con VIH tienen un riesgo elevado de cáncer
- 4) La cantidad y calidad del infiltrado de células inmunológicas en tumores humanos primarios, tiene un importante valor pronóstico en la sobrevivencia de los pacientes
- 5) Las células tumorales presentan mutaciones en genes codificantes de proteínas que son reconocidas específicamente por el sistema inmune adaptativo
- 6) Las células tumorales acumulan mutaciones selectivamente, lo que les permite evadir la destrucción por el sistema inmune
- 7) Los linfocitos que expresan el receptor NKG2D son capaces de reconocer y eliminar células estresadas premalignas
- 8) Un enfoque prometedor actual para tratar el cáncer consiste en potenciar la respuesta inmune natural del paciente, a través del bloqueo de moléculas inmunológicas que regulan negativamente la activación de linfocitos T, como CTLA-4, PD-1, o PD-L1

2.3. Inmunidad innata contra cáncer

Durante la patogénesis del cáncer ocurre una interacción inicial con varios componentes del sistema inmune innato, que se activan para tratar de minimizar la inflamación propiciada por el tumor. Este proceso es crucial para el desarrollo de la respuesta inmune adaptativa. Las modificaciones genéticas y epigenéticas en las células tumorales, se correlacionan con los cambios en la composición de las proteínas de superficie, lo que resulta en la expresión de antígenos asociados a tumor (AAT) (Pinho et al., 2015). Se ha observado la participación de las proteínas del complemento en el

reconocimiento de TAA, iniciando una reacción inflamatoria, la opsonización y, en algunos casos, la muerte de la célula blanco. La activación del complemento ha sido reportada en fluidos biológicos de pacientes con cáncer, así como en tejidos de pacientes con tumores de pulmón, ovario, neuroblastoma, entre otros (Pio et al., 2014).

Por otro lado, la expresión aberrante o reducida de moléculas del MHC de clase I, conduce a la activación de células Natural killer (NK), esto a través de la unión del receptor NKG2D con glicoproteínas de superficie de la familia MICA/B, presentes en tumores (Waldhauer and Steinle, 2008). Los mecanismos de muerte de células tumorales por parte de células NK incluyen: a) liberación de gránulos citoplasmáticos (perforina y granzimas) que forman poros en la membrana celular, b) citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (CCDA), que requiere la expresión de CD16 (receptor Fc) en la superficie de células NK y, c) liberación de citocinas como el IFN- γ , que median la activación y presentación de células presentadoras de antígeno (CPA), como las células dendríticas (DCs) (Waldhauer and Steinle, 2008).

Otro mecanismo antitumoral de la inmunidad innata involucra neutrófilos, que poseen fagolisosomas equipados con enzimas del sistema NADPH oxidasa, que propician la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS), causando citotoxicidad en células tumorales, a través de la disrupción de la membrana celular (Gregory and Houghton, 2011).

Diversos tipos celulares, incluyendo células dendríticas, células T $\gamma\delta$, macrófagos y células NKT sirven como enlaces entre la inmunidad innata y la adaptativa. De hecho las células dendríticas y macrófagos, que funcionan como fagocitos en la inmunidad innata, también funcionan como CPA en la inmunidad adaptativa (Palucka and Banchereau, 2012). Un mecanismo común por el cual las células NKT contribuyen a la respuesta inmune antitumoral, ocurre a través de la secreción de IFN- γ , que activa las funciones efectoras de células NK y linfocitos T CD8⁺, que median la lisis tumoral vía granzimas y perforinas. Además la interacción de células NKT con células dendríticas vía CD40L y CD40, respectivamente, conduce a la activación y secreción de IL-12, que puede activar células NK o linfocitos T CD8⁺ para la lisis y supresión de la progresión del cáncer (Terabe and Berzofsky, 2008). CD40 se expresa en varios tipos de CPA y actúa como una señal coestimuladora cuando se une a CD40L en células NK, mastocitos,

macrófagos, células B, células epiteliales, células endoteliales y células T activadas (Sharpe, 2009).

Por otra parte, de forma similar a células NK y linfocitos CD8+, las células T $\gamma\delta$ expresan el receptor NKG2D, que interactúan con MICA/B en células tumorales, promoviendo su lisis. Otros mecanismos usados por las células T $\gamma\delta$ para controlar la progresión del cáncer involucran: la secreción de IFN- γ , que puede activar NK y células T CD8+ y provocar lisis tumoral; el reconocimiento de TAA por el receptor CD16, que media la CCDA; y la unión de receptores de células T $\gamma\delta$ a auto-antígenos, como son proteínas de choque térmico (HSPs), que se encuentran sobreexpresadas en el microambiente tumoral (Gogoi and Chiplunkar, 2013).

2.4. Inmunidad adaptativa contra cáncer

Al igual que en la inmunidad innata, el sistema inmune adaptativo está equipado con diversos componentes, incluyendo células T, B y CPA, que le brindan la capacidad de montar una respuesta antitumoral antígeno-específica. El dogma central detrás de la inmunidad contra el cáncer involucra la formación de neoantígenos durante el proceso de tumorigénesis, éstos antígenos son captados por fagocitosis por CPA o pinocitosis por DCs, para su procesamiento y presentación a través de moléculas del MHC de clase I y II (Chen and Mellman, 2013). Las moléculas de MHC clase I se encargan de la presentación de péptidos endógenos cortos (8-10 aa) derivados de antígenos tumorales, mientras las de clase II presentan péptidos exógenos más largos (15-24 aa) (Chen and Mellman, 2013). Esto lleva a la activación de células T con la expresión de moléculas co-estimuladoras y la secreción de quimiocinas y citocinas. El efecto conduce a la expansión clonal de las células T y al reclutamiento de otras células efectoras del sistema inmune, incluyendo componentes del sistema inmune innato. Las células T CD4+, conocidas como cooperadoras (Th), secretan citocinas y quimiocinas que regulan diferentes aspectos de la respuesta inmune. Las células T CD4+ Th1 propician la activación de linfocitos T CD8+, favoreciendo la inmunidad celular contra el tumor. Las células T CD4+ Th2 actúan sobre células B, lo que favorece la inmunidad humoral. Las células T CD8+, que son citotóxicas, son activadas por la presentación directa del

antígeno (vía MHC de clase I), o por células T CD4+. Finalmente, las células tumorales son destruidas por citotoxicidad celular o indirectamente a través de mecanismos de citotóxicos dependientes de anticuerpos (Spurrell and Lockley, 2014).

2.5. Inmunoedición tumoral

La demostración de que los tumores pueden desarrollarse aun cuando el sistema inmune es funcional, dio origen al concepto de inmunoedición tumoral, el cual consta de 3 fases fundamentales: eliminación, equilibrio y escape (Dunn et al., 2004). En la fase de eliminación, el sistema inmune detecta y elimina células tumorales que se han desarrollado a partir de fallas intrínsecas en los mecanismos supresores de tumor, la eliminación puede ser total o parcial, en el último caso se pasa a la fase de equilibrio. Durante este periodo, las células tumorales permanecen en latencia o bien continúan acumulando alteraciones genéticas, incluyendo mutaciones en el DNA o cambios en la expresión génica, que pueden modular antígenos tumorales específicos y antígenos inducidos por estrés en las células. Mientras este proceso continúa, el sistema inmune ejerce una presión selectiva, eliminando clones de células tumorales susceptibles, esto suele ser suficiente para controlar la progresión tumoral, pero si esto no ocurre, el proceso resulta en la selección de variantes de células capaces de resistir, evitar o suprimir la respuesta inmune antitumoral, conduciendo a la fase de escape. Durante esta fase el sistema inmune es incapaz de frenar el crecimiento del tumor, que eventualmente progresa (Dunn et al., 2004) (Figura 2).

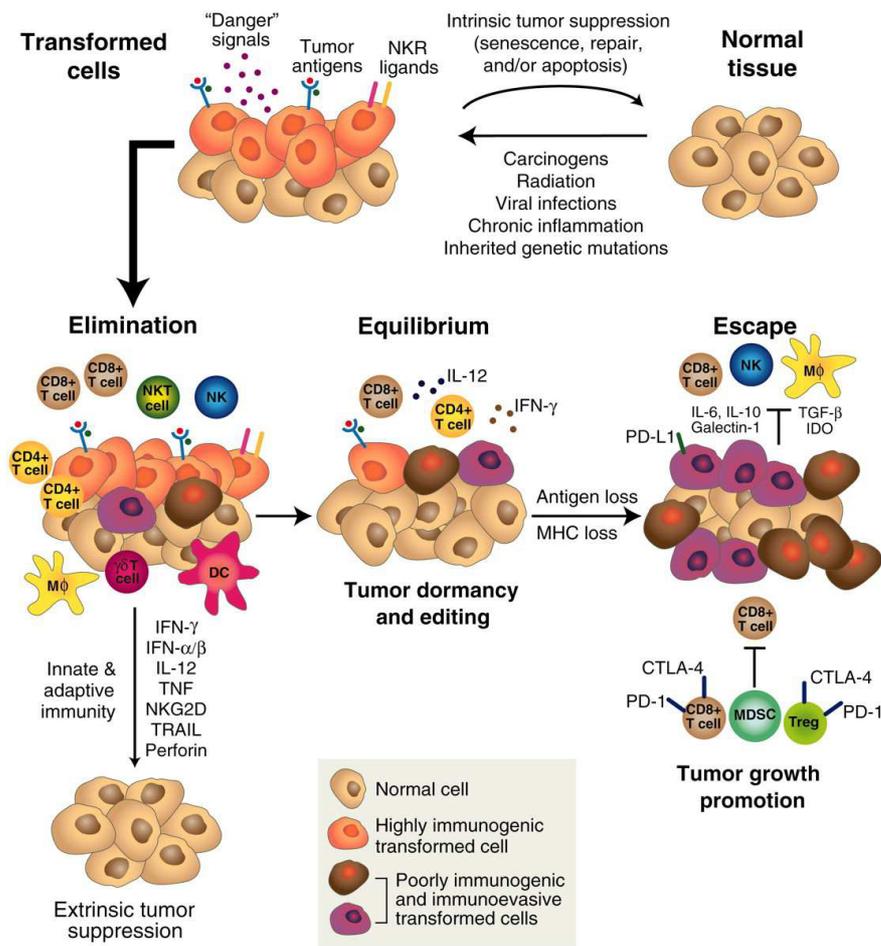


Figura 2. Mecanismo de inmunoección tumoral. (Tomado de: <http://science.sciencemag.org/content/331/6024/1565/F3>)

2.6. Mecanismos tumorales de evasión del sistema inmune

Los tumores no crecen de manera aislada, sino que coexisten dentro de una red compleja de estructuras, células y señales químicas provenientes de células epiteliales, estroma, sangre y vasculatura linfática, células inmunológicas, citocinas y quimiocinas. La inestabilidad genética inherente a las células tumorales, genera la formación de TAA, lo que posibilita al sistema inmune a discernir entre una célula tumoral y una normal, sin embargo las células tumorales han desarrollado un conjunto de mecanismos para evadir el ataque y destrucción por parte del sistema inmune (Spurrell and Lockley, 2014).

Los principales mecanismos de evasión del sistema inmune en el microambiente tumoral, incluyen (Panda et al., 2015) (Figura 3):

1. Baja expresión o inmunogenicidad de los TAA
2. Inducción de tolerancia, anergia y/o apoptosis de células T
3. Inducción de células T reguladoras
4. Generación de iDCs y pDCs no funcionales
5. Generación de células supresoras derivadas mieloides (MDSCs)
6. Depleción de células NK y NKT
7. Inducción de FASL y TRAIL
8. Secreción de factores inmunosupresivos, como TGF- β , IL-10, PGE-2,IDO, gangliósidos y galectinas
9. Promoción del fenotipo M2 en macrófagos
10. Inducción de señales co-estimuladoras negativas, como CTLA-4 y PD-1
11. Anormalidades en la presentación antigénica

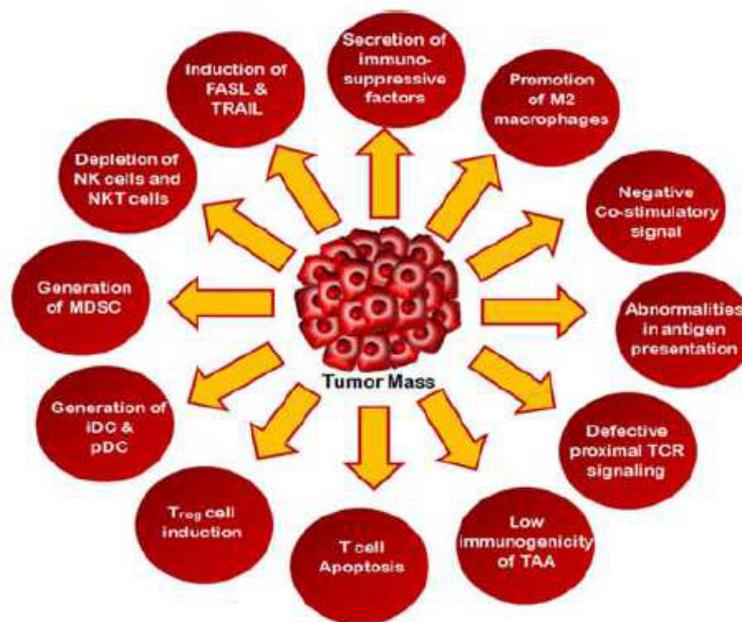


Figura 3. Mecanismos tumorales de evasión del sistema inmune. Tomado de: Panda et. al., 2015.

2.7. Inmunoterapia en cáncer

La caracterización de múltiples mecanismos de resistencia de los tumores al sistema inmunológico, ha conducido en las últimas dos décadas al desarrollo de estrategias para superar esos mecanismos, lo que ha llevado a un crecimiento acelerado de la investigación en torno a la inmunoterapia en cáncer. Aunque actualmente el número de tratamientos aprobados para su uso en humanos, basados en este régimen es limitado, se espera que en los próximos años sea parte del abanico de opciones de tratamiento, pudiendo usarse como monoterapia o en combinación con otros agentes de quimioterapia, radioterapia e incluso de inmunoterapia (Sathyanarayanan and Neelapu, 2015).

Actualmente hay dos amplias categorías para el desarrollo de inmunoterapias en cáncer (Sathyanarayanan and Neelapu, 2015) (Figura 4):

- a) Agentes dirigidos directamente contra las células tumorales
- b) Agentes que activan las células del sistema inmune, que son las encargadas de mediar la destrucción tumoral

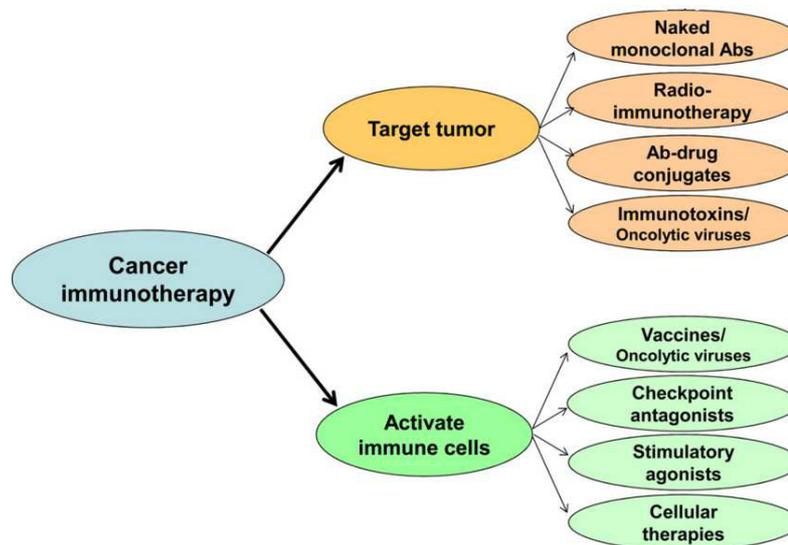


Figura 4. Categorías de inmunoterapia en cáncer. Tomado de: Sathyanarayanan and Neelapu, 2015.

2.8. Vacunas terapéuticas en cáncer

Las vacunas terapéuticas representan una opción viable en la inmunoterapia del cáncer. El propósito de las vacunas es inducir respuestas antitumorales mediadas por células T, a través de la inmunización contra antígenos asociados o específicos de tumor. Los resultados prometedores obtenidos en ensayos clínicos, llevaron en 2010 a la aprobación por la Food and Drug Administration (FDA) en Estados Unidos, de la primera vacuna terapéutica en cáncer, denominada Sipuleucel-T (Provenge), usada con éxito en cáncer de próstata (Kantoff et al., 2010).

Además de Sipuleucel-T, otras vacunas han demostrado beneficios terapéuticos en ensayos clínicos de fase III, incluyendo una vacuna con el péptido gp100 en melanoma (Schwartzentruber et. al, 2011) y otra con una proteína idiotipo en linfoma (Schuster et. al, 2011). Sin embargo el beneficio obtenido ha sido modesto en ambos casos. Algunos autores sugieren que esto podría deberse a que el material antigénico de estas vacunas se dirige contra antígenos asociados a tumor, lo que parece inducir células T de baja o moderada afinidad, debido en parte a mecanismos de auto-tolerancia (Sathyanarayanan and Neelapu, 2015).

Una clasificación general de las vacunas en desarrollo o investigación clínica para el tratamiento del cáncer (Guo et al., 2013), incluye las siguientes categorías:

- a) Vacunas basadas en células tumorales o inmunológicas
- b) Vacunas de proteínas/péptidos
- c) Vacunas genéticas (de DNA, RNA o virales)

2.8.1. Vacunas basadas en células tumorales

Las vacunas tumorales pueden ser autólogas o alogénicas. Las primeras se preparan a partir de célula tumorales derivadas del paciente y representan uno de los primeros tipos de vacunas en ser probadas. En éste tipo de vacunas, generalmente las células tumorales son irradiadas, combinadas con un adyuvante y luego administradas al paciente (Berger et al., 2007). Una de las ventajas principales de las vacunas de células tumorales completas es el potencial de presentar un amplio espectro de antígenos

asociados a tumor al sistema inmune, pero tienen la limitante de requerir una suficiente cantidad de tumor para su preparación, lo que limita su aplicación a ciertos tipos de cáncer, en estadios particulares (Guo et al., 2013).

Por otro lado, las vacunas tumorales alogénicas contienen 2 o más líneas celulares tumorales humanas establecidas, lo que permite superar muchas de las limitaciones de las vacunas autólogas, incluyendo la fuente de antígenos tumorales, la estandarización de protocolos de producción a gran escala, costos, etc. Un ejemplo es la vacuna Canvaxin, que consiste en 3 líneas celulares de melanoma más el adyuvante BCG. En un ensayo clínico fase 2, la supervivencia de los pacientes a 5 años, mostró una mejoría notable en pacientes con melanoma estadio III, que recibieron como terapia Canvaxin, en comparación al grupo control (Morton et al., 2002).

2.8.2. Vacunas basadas en células dendríticas

Inaba et al. cultivaron células dendríticas murinas *ex vivo*, a partir de precursores de médula ósea, proveyendo las bases del desarrollo de vacunas basadas en DCs, hace casi 25 años (Inaba et al., 1992). De forma similar, se han generado DCs humanas a partir del cultivo de progenitores hematopoyéticos CD34+ o a partir de monocitos derivados de sangre periférica (Banchereau and Palucka, 2005). La preparación de vacunas de DCs se realiza cargando TAA en las DCs autólogas, que son tratadas simultáneamente con adyuvantes. Las células cargadas con el antígeno, maduras *ex vivo*, son luego administradas en los pacientes para proveer inmunidad antitumoral (Guo et al., 2013).

La única vacuna anti-cáncer, aprobada por la FDA, se basa en este tipo de estrategia. El Sipuleucel-T (Provenge) fue aprobado en el año 2010 para el tratamiento de cáncer de próstata inoperable metastásico asintomático. Esta vacuna autóloga consiste básicamente en DCs derivadas de PBMC, que han sido incubadas con PA2024, el cual contiene el antígeno fosfatasa ácida prostática (PAP), fusionada a GM-CSF. Aunque no se observaron diferencias en el tiempo de progresión, sí hubo un beneficio significativo de 4.1 meses en la supervivencia de los pacientes que recibieron Sipuleucel-T, en comparación al grupo placebo (25.8 vs. 21.7 meses) (Longo, 2010).

También se ha trabajado con vacunas basadas en DCs desde otro enfoque, el cual tiene como principio que la activación de células T es finamente controlada por moléculas co-estimuladoras expresadas en DCs, por lo que se han realizado modificaciones genéticas a las DCs para modular los niveles de expresión de estas moléculas e incrementar la potencia de este tipo de terapias (Tcherepanova et al., 2008).

2.8.3. Vacunas de proteínas/péptidos

Las vacunas recombinantes se basan en el uso de péptidos derivados de TAAs particulares y suelen administrarse con un adyuvante (Guo et al., 2013). El primer gen que fue reportado por codificar un antígeno tumoral reconocido por células T, fue MAGE-1 (van der Bruggen et al., 1991). Desde entonces, la identificación de TAAs ha brindado mayores oportunidades para el diseño de vacunas terapéuticas.

Las vacunas contra cáncer basadas en proteínas/péptidos tienen ventajas de costo-beneficio sobre las vacunas autólogas de células tumorales completas o vacunas individualizadas, pero tienen la limitante del reducido número de epítopes de TAA contra los cuales se dirige la respuesta inmune antitumoral. Para superar esto, se han utilizado vacunas de péptidos que combinan varios epítopes, lo que ha permitido el despliegue de respuestas específicas tanto para epítopes CD8⁺ de LTC, como para linfocitos T CD4⁺; otra estrategia para potenciar la efectividad de este tipo de vacunas, consiste en alterar la secuencia original, por epítopes agonistas que permitan incrementar la afinidad del péptido a moléculas del MHC o al TCR, dando como resultado respuestas de células T robustas (Guo et al., 2013).

La efectividad de las vacunas de proteínas/péptidos sintéticos en cáncer ha sido demostrada en diversos estudios clínicos, en los que se ha observado su capacidad para inducir respuestas citotóxicas T CD8⁺ contra diversos antígenos, los resultados clínicos no han sido siempre satisfactorios (Buonaguro et al., 2011). Sin embargo el caso positivo del Sipuleucel-T, ha motivado una mayor investigación, conduciendo a resultados alentadores, en algunos casos. Por ejemplo, en un estudio reciente la vacunación contra el antígeno tumoral WT1 mostró eficacia en pacientes con cáncer de pulmón, páncreas, ovario, sarcoma y cáncer papilar (Ohno et al., 2012).

2.8.4. Vacunas genéticas

Otra estrategia de vacunación, con la que se busca el despliegue de respuestas inmunes eficaces en cáncer, consiste en la utilización de virus, vectores de DNA o RNAm que codifiquen antígenos tumorales. Una vez administradas, transfectan células somáticas (miocitos, queratinocitos) o DCs que infiltran los tejidos, como parte de la respuesta inflamatoria a la vacunación, lo que resulta en una presentación de antígenos de forma cruzada o directamente. La principal ventaja de las vacunas basadas en genes es la fácil entrega de múltiples antígenos en una sola inmunización, así como la capacidad de activar la inmunidad celular y humoral (Auricchio and Ciliberto, 2012; Kutzler and Weiner, 2008).

2.8.5. Vacunas de DNA

Consisten en plásmidos que codifican para el antígeno tumoral completo o péptidos cortos inmunodominantes, al actuar como vectores endógenos, proporcionan inmunidad celular y humoral (Liu, 2011) (Figura 5). Desde hace tiempo se han utilizado estrategias para incrementar la expresión del antígeno tumoral, a través de la optimización del uso de codones, con sustitución de codones raros por codones más frecuentes (Stratford et al., 2000). Un aspecto importante es que el esqueleto del plásmido actúa como PAMP, lo que estimula a las células del sistema inmune a través de los TLR u otras moléculas de reconocimiento de patrón, de la inmunidad innata (Barber, 2011).

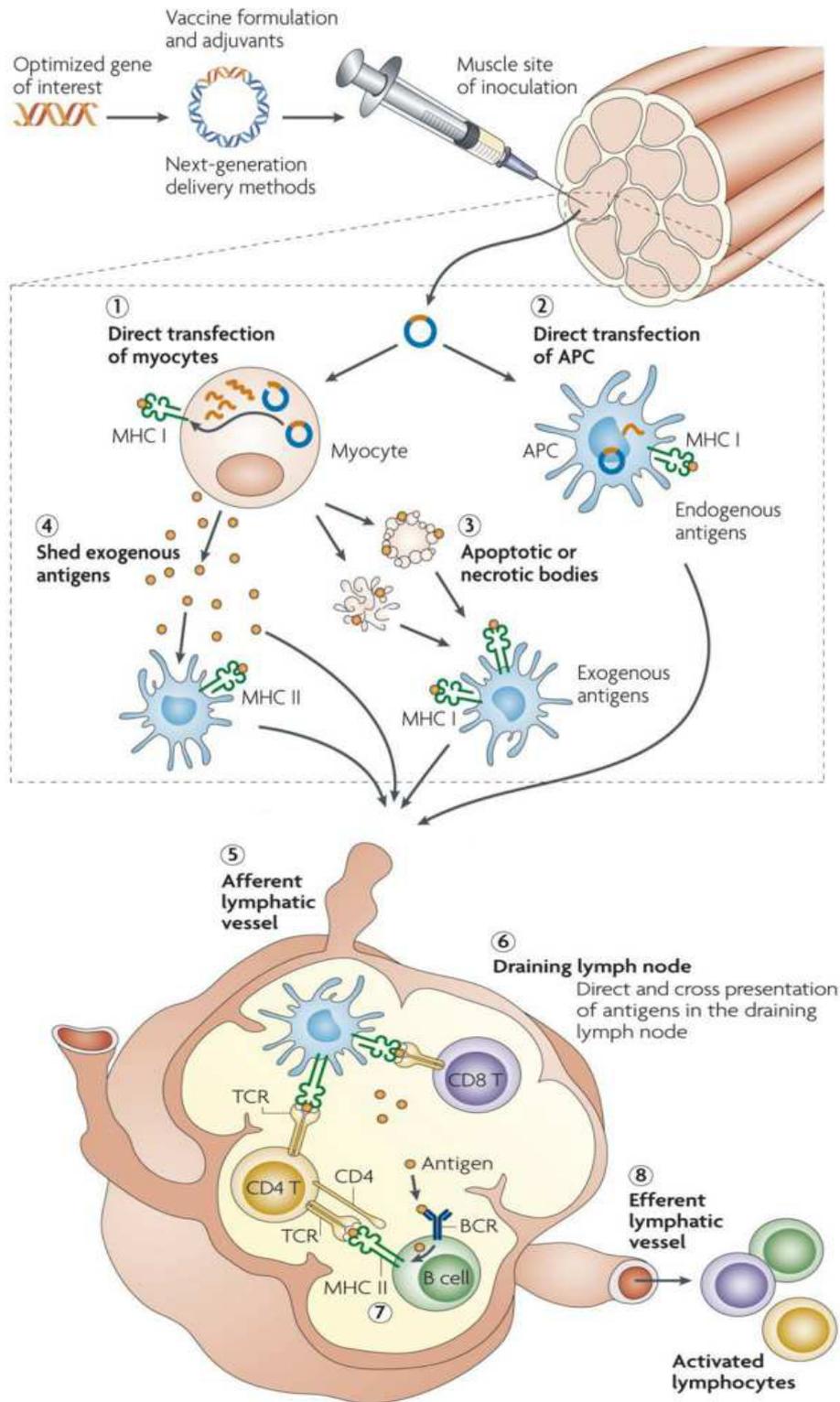


Figura 5. Mecanismo de acción de las vacunas de DNA. Tomado de: Kutzler and Weiner, 2008.

Aunque las vacunas de DNA han mostrado resultados alentadores en modelos preclínicos (Xiang et al., 2008), la efectividad antitumoral observada en ratones y ratas no se ve reflejada en primates y humanos (Liu and Ulmer, 2005). Sin embargo se han estudiado nuevos métodos y formas de administración para incrementar su eficacia. Además de la inyección subcutánea e intradérmica, en ensayos clínicos en melanoma, las vacunas de DNA han sido inyectadas directamente en los ganglios linfáticos, con ello se incrementa la captación del plásmido por CPA y se promueven señales inflamatorias localizadas (Ribas et al., 2011). Otros métodos de administración usados en vacunación con ADN, con el propósito de potenciar la expresión del antígeno y por ende la eficacia de la vacuna incluyen: pistola de genes, electroporación, ultrasonido, láser, liposomas, micropartículas y nanopartículas (Guo et al., 2013).

2.9. Administración pulmonar de vacunas contra cáncer

Los pulmones están continuamente expuestos a partículas orgánicas e inorgánicas y numerosos microorganismos presentes en el medio ambiente, el mantenimiento de la homeostasis depende en primera instancia de interacciones complejas entre los componentes efectores del sistema inmune innato (Martin and Frevert, 2005). Para responder con rapidez a la entrada de virus o bacterias, las células epiteliales y células del sistema inmune que residen en el pulmón poseen PRR, que se encargan de sensor diversos PAMP o DAMP e iniciar una respuesta inmune protectora (Mogensen, 2009). Los PRR más estudiados son los TLR, los cuales se ha demostrado juegan un papel importante en la activación del sistema inmune para la eliminación de patógenos de las vías aéreas (Duggan et al., 2011).

La entrega de agentes terapéuticos directamente al pulmón representa una opción no invasiva y sencilla, ideal para aplicaciones repetidas con disminución de dosis, que garantiza una buena absorción y distribución homogénea en el epitelio pulmonar; además, la alta vascularización del pulmón y su interacción directa con la circulación sanguínea, permiten obtener efectos terapéuticos no solo locales, sino sistémicos (Patton and Byron, 2007).

Recientemente se ha utilizado esta vía, para la administración de vacunas (Nicola et al., 2015), anticuerpos monoclonales (Hill et al., 2006), quimioterapéuticos (Koshkina and Kleinerman, 2005) y elementos antisentido (Zamora et al., 2009).

2.10. Uso de adyuvantes en vacunación anti-cáncer

Dado que los AAT son por lo general débilmente inmunogénicos, el empleo de adyuvantes en la vacunación en cáncer, resulta esencial para la generación de una respuesta inmune eficaz. El término adyuvante deriva del latín “adjuvare”, que significa ayuda. En efecto los adyuvantes mejoran la respuesta inmune antígeno-específica sirviendo como, o induciendo DAMP y/o PAMP, que activan varios PRR del sistema inmune innato, incluyendo TLR, NLR, ALR, RLR o CLR, para el despliegue de una potente respuesta inmune innata y adaptativa contra las células tumorales. Además, los adyuvantes pueden funcionar como sistemas de entrega eficiente de los antígenos a CPA (Temizoz et al., 2016). Una clasificación general de adyuvantes, en base a su mecanismo de acción sobre el sistema inmune, se muestra en la Tabla 1.

Tabla 1. Clasificación de adyuvantes por modo de acción. Tomado de: Temizoz et al., 2016.

Class	Adjuvant	Immune response
Delivery systems	Liposomes, virosomes	B, T _h 1, T _h 2, CTL
	Emulsions: MF59, Montanide	B, T _h 1, T _h 2, CTL
	Saponin based: ISCOMs, QS-21	B, T _h 1, CTL
	Mineral salts: alum, AS04	B, T _h 1, T _h 2
Immunostimulants	TLR ligands: Poly I:C, MPL, GLA, imiquimod, CpG ODN	B, T _h 1, T _h 2, NK, CTL
	Saponin based: ISCOMs, QS-21	B, T _h 1, CTL
	Polysaccharides: chitin, chitosan (16), β-glucan	B, T _h 1, T _h 2, NK, CTL
Combinations	TLR9 + STING ligands: K3 CpG + cGAMP	B, T _h 1, NK, CTL
	Adjuvant Systems: AS02, AS04, AS15	B, T _h 1, T _h 2

2.10.1. Oligodesoxinucleótidos CpG (ODN-CpG)

Los ODN-CpG con patrones de secuencia no metilados que simulan el DNA bacteriano, activan células NK para secretar IFN- γ y de esta manera participan en la generación de una respuesta inmune mediada por células, que es la más importante en la respuesta inmune en contra de tumores. Los motivos de secuencia específicos presentes en el DNA bacteriano son los responsables de activar esas respuestas inmunes en el dinucleótido CpG flanqueado por dos purinas 5' y dos pirimidinas 5' (Vollmer et al., 2004).

A la fecha se han descrito cinco clases de ODN-CpG, las tres clases principales (clase A, B y C) varían en la longitud, secuencia, base, enlace químico y formación de estructuras secundarias y terciarias, lo que resulta en diferentes propiedades inmunoestimuladoras (Vollmer et al., 2004). Los ODN-CpG clase A inducen una fuerte producción de interferones tipo I (IFN-I) por células DCs y la activación de células NK, los ODN-CpG clase B estimulan fuertemente la diferenciación de células B en células plasmáticas productoras de anticuerpos, con activación moderada de NK, mientras los ODN-CpG clase C combinan las propiedades de las clases A y B (Hartmann et al., 2003).

Los ODN-CpG son tomados por las células vía endocitosis adsorptiva y se unen al TLR-9 presente en células B y pDCs. Dicha unión activa las vías TLR-9/MyD88/NF- κ B o AP-1 y TLR-9/MyD88/IRF-7, que inducen la expresión génica y la secreción de citocinas. Los ODN-CpG activan una cascada inmunoestimuladora induciendo la maduración, diferenciación y proliferación de múltiples células del sistema inmunológico, incluyendo linfocitos B y T, macrófagos, células NK y monocitos/macrófagos que producen IL-1, 6, 12 y 18, IFN- γ , y factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) (Krieg, 2006). La co-administración de ODN-CpG con el antígeno, activa una cascada inmunológica que resulta en respuestas inmunológicas antígeno-específicas de larga duración (Figura 6).

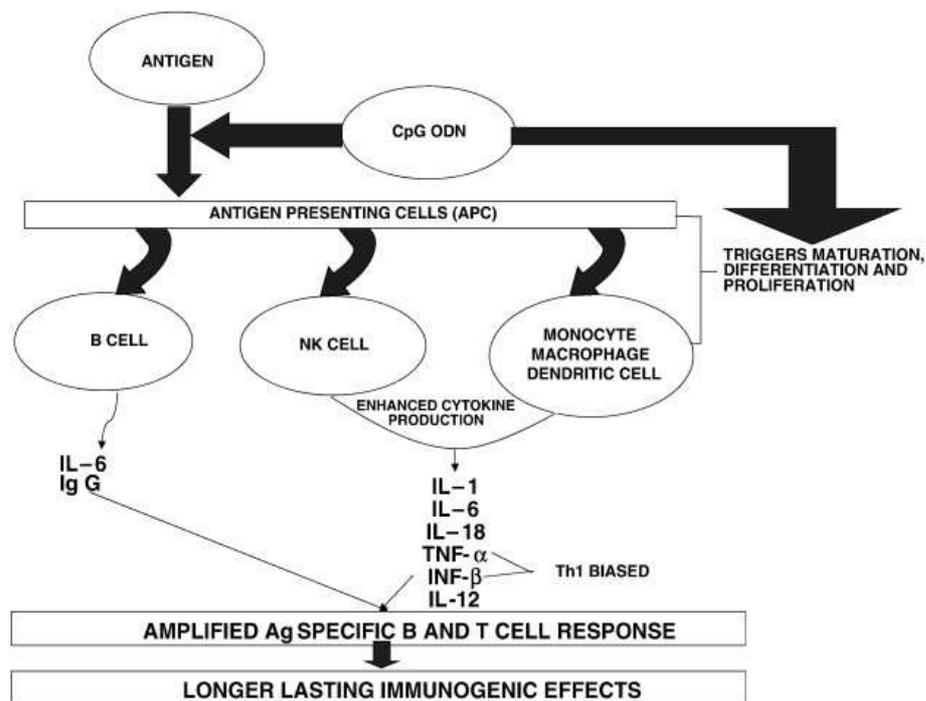


Figura 6. Cascada inmunoestimuladora activada por la administración de antígeno y ODN-CpG.

Uno de los aspectos más cruciales en el diseño de vacunas basadas en péptidos sintéticos o en ADN, además de la elección del adyuvante a emplear, es la elección de los antígenos apropiados, que proporcionen una respuesta antitumoral apropiada.

2.11. Proteína del Tumor de Wilm's (WT1)

La proteína WT1 es un factor de transcripción involucrado en proliferación, diferenciación celular y apoptosis. Un largo listado de genes son blanco de activación/represión transcripcional por parte de WT1, destacando varios importantes en crecimiento y metabolismo celular, como son componentes de matriz extracelular (CME), factores de crecimiento y factores de transcripción (incluido el mismo WT1) (Yang et al., 2007).

El gen de *WT1* está conformado por cerca de 50 kb, contiene 10 exones y produce un RNAm de 3.5 kb, el cual puede sufrir dos 'splicing' alternativos durante su maduración en los exones 5 y 9. En el primero se insertan o no 17 aa y en el segundo se incorporan o eliminan los aa lisina, treonina y serina (KTS), dando como resultado cuatro isoformas

designadas como (-,-), (+,-), (-,+) y (+,+), representando la presencia o ausencia de los insertos 17aa y KTS, respectivamente (Haber et al., 1991). El RNAm tiene tres sitios de inicio de la traducción, lo que resulta en tres isoformas con distinto peso molecular: 36-38, 52-54 y 62-64 kDa (Scharnhorst et al. 1999). La isoforma mediana representa la forma típica de WT1 y posee un extremo carboxilo terminal con cuatro dedos de zinc tipo Krüpel (codificados en los exones 7-10), que son los sitios de unión a secuencias de DNA ricas en G-C y algunas proteínas, así como un extremo amino terminal que presenta un sitio de transactivación rico en prolina y glutamina, un dominio de dimerización y otro de represión (Lee and Heaver, 2001). Motivos adicionales en la proteína WT1 son esenciales para auto-asociación, localización nuclear y reconocimiento de RNA (Scholz and Kirschner, 2005). La combinación de ‘splicing’ alternativos, edición de RNA y sitios de inicio de traducción, conducen a la existencia de al menos 24 diferentes variantes de WT1 en mamíferos (Wagner et al., 2003). La estructura del gen, RNAm y la proteína de WT1, se muestran en la Figura 7.

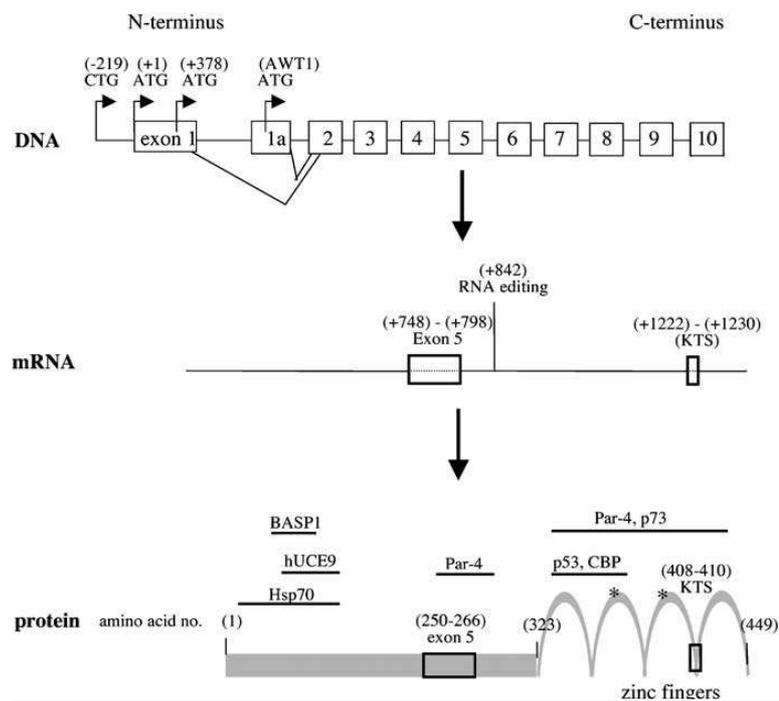


Figura 7. Estructura de WT1. Tomado de: Yang et al., 2007.

2.11.1. WT1 como antígeno tumoral

WT1 ampliamente aceptado como supresor de tumor en aproximadamente 15% de los tumores de Wilm's. No obstante en los últimos años se han reportado datos de la expresión de WT1 wild-type en tumores adultos de diferente origen, por lo que se ha propuesto su rol como oncogén en esas neoplasias. La sobreexpresión de WT1 ha sido descrita desde hace más de dos décadas en malignancias hematológicas, incluyendo leucemia linfoblástica aguda, leucemia mieloide aguda y crónica, así como en síndromes mielodisplásicos, asociándose a un pobre pronóstico (Rosenfeld et al., 2003). Más recientemente, Nakatsuka et al. examinaron 494 biopsias de tumores humanos por IHQ y hallaron positividad a WT1 en tumores de estómago, próstata, cérvix, endometrio, ovario, cerebro, esófago, páncreas, próstata, mama, riñón, pulmón, piel, entre otros (Nakatsuka et al., 2006).

En el 2009, el Instituto Nacional del Cáncer en los Estados Unidos, propuso un proyecto piloto de priorización de antígenos tumorales, con base de criterios objetivos predefinidos y preponderados (Cheever et al., 2009). El proyecto seleccionó 75 antígenos representativos para su comparación y puntaje. Los criterios ponderados, en orden descendiente, fueron: (a) función terapéutica, (b) inumogenicidad, (c) oncogenicidad (d) especificidad, (e) nivel de expresión y porcentaje de células positivas al antígeno, (f) expresión en células estaminales, (g) número de pacientes con tumores positivos al antígeno (h) número de epítopes antigénicos y (i) localización celular del antígeno (Cheever et al., 2009). Los resultados del proyecto ubicaron a WT1 en el primer lugar del listado, lo que lo propone como el antígeno tumoral más importante para el desarrollo de inmunoterapias en cáncer (Figura 8).

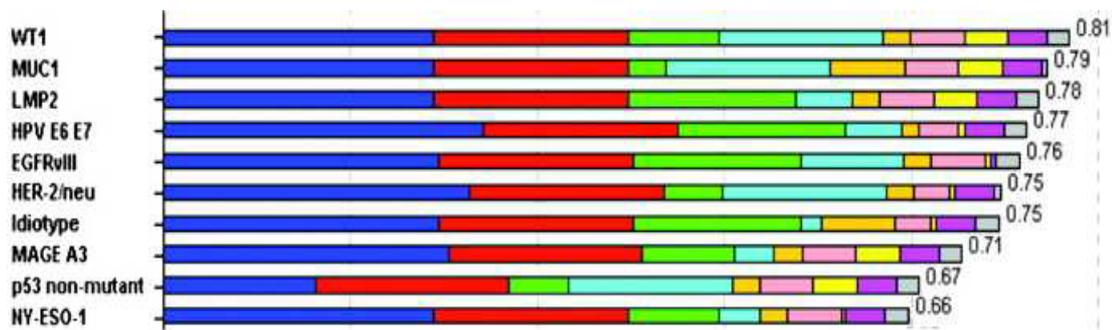


Figura 8. Priorización de antígenos tumorales. Proyecto del Instituto Nacional del Cáncer (EU), con base de criterios objetivos predefinidos y preponderados. Se muestran los diez primeros antígenos del listado reportado, al final de la barra se presenta el puntaje relativo para cada antígeno. Modificado de: Cheever et al., 2009.

2.11.2. Inmunoterapias en cáncer basadas en WT1

Desde hace casi dos décadas, se demostró que WT1 es un blanco inmunogénico, que exhibe una alta antigenicidad de células T (Ohminami et al., 2000; Oka et al., 2000). Además de la células T específicas de WT1, también ha sido reportada la producción natural de anticuerpos IgG anti-WT1, en pacientes con cáncer (Nicoli et al., 2008; Wu et al., 2005). A pesar de la expresión de WT1 en tejidos normales, no hay reportes en la literatura que indiquen una reacción autoinmune en ratones o en humanos, luego de recibir inmunoterapia específica. Asimismo se ha observado que la disminución o pérdida de la expresión de WT1 conduce al cese de la proliferación o a la muerte de células tumorales, lo que sugiere que la disminución de la expresión de WT1 como un mecanismo de evasión del sistema inmune es poco probable (Zapata et al., 2002; Yamagami et al., 1996).

En las últimas décadas, se han realizado decenas de ensayos clínicos que han mostrado beneficios inmunológicos y clínicos, en pacientes que recibieron inmunoterapia basada en WT1 (Van Driessche et al., 2012), lo que avala la continuidad en la investigación de nuevos protocolos de vacunación que involucren a WT1 (Tabla 2).

Tabla 2. Ensayos de fase clínica con WT1 como blanco de inmunoterapia. Modificado de Van Driessche et al., 2012

Reference	Tumor	n	Immunogenic agent	Adjuvant	Results	
					Clinical responses	Immunological responses
Oka et al.	Breast cancer	2	Natural peptide WT1 ₂₃₅₋₂₄₃ or modified peptide WT1 ₂₃₅₋₂₄₃ (M2Y substitution)	Montanide ISA-51	12/20	13/23 ↑ in tetramers or IFN- γ ⁺ T cells
	Lung cancer	10			↓ leukemic blasts	
	Leukemia (AML and MDS)	14			↓ tumor size	
					↓ tumor markers	
Morita et al.	Glioblastoma	5	Modified peptide WT1 ₂₃₅₋₂₄₃ (M2Y subst)	Montanide ISA-51	1 PR (glioblastoma), 5 SD	ND
	Breast cancer	2				
	Malignant fibrous histiocytoma	1				
	Primary neuroectodermal tumor	1				
	Rectal cancer	1				
	Renal cell carcinoma	2	Modified peptide WT1 ₂₃₅₋₂₄₃ (M2Y substitution)	Montanide ISA-51	2 SD	2/2 positive DTH
						1 tetramer ⁺ T cells at wk 8 but then ↓
Tsuboi et al.	MM	1	Modified peptide WT1 ₂₃₅₋₂₄₃ (M2Y substitution)	Montanide ISA-51	↓ % myeloma cells in BM	↑ WT1 tetramer ⁺ T cells
					↓ M protein	↑ CD107a/b ⁺ tetramer ⁺ T cells
						↑ CXCR4 ⁺ tetramer ⁺ T cells in BM, but ↓ in PB

Tabla 2. Ensayos de fase clínica con WT1 como blanco de inmuno terapia. Modificado de Van Driessche et al., 2012 (cont...)

Reference	Tumor	n	Immunogenic agent	Adjuvant	Results	
					Clinical responses	Immunological responses
Kawakami et al.	CMML	1	Modified peptide WT1 ₂₃₅₋₂₄₃ (M2Y substitution)	Montanide ISA-51	↓ WBC ↓ WT1 transcripts	↑ WT1 tetramer ⁺ T cells
Rezvani et al.	Myeloid leukemia (AML, CML, and MDS)	8	Peptide PR1 ₁₀₉₋₁₇₇ and peptide WT1 ₁₂₆₋₁₃₄	Montanide ISA-51 and GM-CSF	3/6 ↓ WT1 transcripts	8/8 ↑ tetramer ⁺ T cells; 7/8 ↑ PR1 tetramer ⁺ T cells and 5/8 ↑ WT1 tetramer ⁺ T cells Correlation with IC IFN-γ
Kitawaki et al.	AML	1	DCs pulsed with modified peptide WT1 ₂₃₅₋₂₄₃ (M2Y substitution) Response to WT1: no tetramer ⁺ or IFN-γ ⁺ T cells Response to KLH: IFN-γ ⁺ , perforin ⁺ , and granzyme B ⁺ T cells	KLH	No clinical response	1/1 positive DTH
Izumoto et al.	Glioblastoma multiforme	21	Modified peptide WT1 ₂₃₅₋₂₄₃ (M2Y substitution)	Montanide ISA-51	2 PR, 10 SD, 9 PD, of which 2 dropped from protocol (poor general condition)	No ↑ in CTL frequencies after vaccination
Yasukawa et al.	AML MDS	1 1	Peptide WT1 ₂₃₅₋₂₄₃ Peptide WT1 ₁₂₆₋₁₃₄	Montanide ISA-51 GM-CSF and KLH	↓ myeloblasts ↓ WT1 transcripts 10 SD, of which 4 had ↓ >50% blasts and 2 had hematologic improvement 1 CR and 3 SD after initial progression of	↑ WT1 tetramer ⁺ T cells 8/18 ↑ WT1 tetramer ⁺ T cells 50% showed IFN-γ and/or TNF-α producing T cells
Keilholz et al.	AML	17	Peptide WT1 ₁₂₆₋₁₃₄	Montanide ISA-51	↓ myeloblasts ↓ WT1 transcripts 10 SD, of which 4 had ↓ >50% blasts and 2 had hematologic improvement 1 CR and 3 SD after initial progression of	↑ WT1 tetramer ⁺ T cells 8/18 ↑ WT1 tetramer ⁺ T cells 50% showed IFN-γ and/or TNF-α producing T cells
Ohta et al.	Rhabdomyosarcoma	1	Modified peptide WT1 ₂₃₅₋₂₄₃	Montanide ISA-51	CR (>22 mos)	↑ WT1 tetramer ⁺ T cells

Tabla 2. Ensayos de fase clínica con WT1 como blanco de inmunoterapia. Modificado de Vé an Driessche et al, 2012 (cont...)

Results						
Reference	Tumor	n	Immunogenic agent	Adjuvant	Clinical responses	Immunological responses
Ohno et al.	Gynecological malignancy	12	Modified peptide WT1 ²³⁵⁻²⁴³ (M2Y substitution)	Montanide ISA-51	3 SD 9 PD	ND
Maslak et al.	AML	10	4 WT1 peptides, of which 3 were long peptides and one was a modified 9-AA peptide	Montanide ISA-51 and GM-CSF	5/9 continuous CR	7/8 ↑ CD4 ⁺ T-cell responses 3/3 CD8 ⁺ T-cell responses; ↑ tetramer ⁺ T cells and ↑ IFN-γ secretion 1/1 CTLs killed WT1 ⁺ target cells 3 showed positive DTH
Narita et al.	CML	1	Modified peptide WT1 ²³⁵⁻²⁴³ (M2Y substitution)	Montanide ISA-51	<i>BCR-ABL</i> transcripts ↓ and ↑ after 8th vaccine, ↓ after 13th vaccine	↑ WT1 tetramer ⁺ T cells ↑ Tregs, ↓ after cessation of vaccine T cells cytotoxic in MLPK
Van Tendeloo et al.	AML	10	DCs electroporated with WT1 mRNA	KLH	5/10 with normalization of <i>WT1</i> transcripts; 2 CR from PR (1 relapsed after 9 mos), 3 continuous CR (1 relapsed after 47 mos) 5/10 with no normalization of <i>WT1</i> transcripts and PD	↑ Plasma IL-2, DTH ⁺ , ↑ HLA-DR ⁺ CD4 ⁺ T cells ↑ WT1-specific IFN-γ ⁺ T cells ↑ HLA-DR ⁺ NK cells, tetramer ⁺ T cells
Krug et al.	Mesothelioma	9	4 WT1 peptides, of which 3 were long peptides and one was a modified 9-AA peptide	Montanide ISA-51 and GM-CSF	1 SD (mesothelioma)	6/9 CD4 ⁺ T-cell responses, 5/6 CD8 ⁺ T-cell responses; ↑ tetramer ⁺ T cells and ↑ IFN-γ secretion
	NSCLC	3			10 PD	3/6 CTLs killed WT1 ⁺ target cells

Tabla 2. Ensayos de fase clínica con WT1 como blanco de inmunoterapia. Modificado de Van Griessche et al., 2012 (cont...)

Reference	Tumor	n	Immunogenic agent	Adjuvant	Clinical responses	Results
						Immunological responses
Hashii et al.	Rhabdomyosarcoma	1	Modified peptide WT1 ₁₂₅₋₂₄₃ (M2Y substitution)	Montanide ISA-51	CR	3/5 ↑ WT1 tetramer ⁺ T cells
	Osteosarcoma	1			PD	
	Liposarcoma	1			SD	
	Synovial sarcoma	1			PD	
	ALL	1			PD	
Coosemans et al.	Endometrial carcinoma	1	DCs electroporated with WT1 mRNA	Imiquimod	Transient ↓ CA125 PD	↑ WT1 tetramer ⁺ T cells
Rezvani et al.	MDS	2	Peptide PRI ₁₆₉₋₁₇₇ and peptide WT1 ₁₂₆₋₁₃₄	Montanide ISA-51 and GM-CSF	1 SD, 1 PD, 2 CR 4 relapse, of which 1 before vaccine and 1 after first vaccine	7/7 ↑ WT1 and PRI tetramer ⁺ T cells, in 6/6 no tetramer ⁺ T cells after vaccine 6
	AML	6				
Kuball et al.	AML	4	Peptide PRI ₁₆₉₋₁₇₇ and peptide WT1 ₁₂₆₋₁₃₄	PADRE, CpG7909, Montanide ISA-51	2 SD 2 PD	No WT1 tetramer ⁺ T cells after vaccine in all patients No DTH responses
Kitawaki et al.	AML	3	DCs pulsed with modified peptide WT1 ₂₃₅₋₂₄₃ (M2Y substitution)	Zoledronate (one part of DCs) and KLH (other part of DCs)	1 SD 2 PD	2/3 showed positive DTH 2/3 detection of WT1 tetramer ⁺ T cells after in vitro stimulation

3. JUSTIFICACIÓN

El cáncer engloba un conjunto de enfermedades proliferativas con potencial metastásico, se considera que existen más de 200 tipos de cáncer, pudiendo afectar cualquier parte del cuerpo. Aunado a los avances en los métodos de diagnóstico, pero sobretudo al envejecimiento de la población, entre otros factores intrínsecos y extrínsecos, la OMS estima que para el año 2030, habrá en el mundo alrededor de 26 millones de nuevos casos y 17 millones de muertes al año. Tan solo en México, el cáncer es la tercera causa de muerte y cada año se suman más de 128 mil casos nuevos, de los cuales el 60% se diagnostican tardíamente.

Además de la remoción quirúrgica, las opciones terapéuticas convencionales incluyen radioterapia y quimioterapia, las cuales se caracterizan por su baja selectividad de células tumorales, por lo que son muy tóxicas. En los últimos años los esfuerzos se han enfocado en el desarrollo de terapias más específicas e inocuas, incluyendo estrategias de terapia génica e inmunoterapia.

A partir del concepto de vigilancia inmunológica y las múltiples evidencias que ubican a la destrucción tumoral como una función primaria del sistema inmune, se plantea la posibilidad de potenciar la respuesta inmunitaria del organismo, para la erradicación de tumores establecidos; las vacunas sintéticas y de DNA representan una opción prometedora para el despliegue de mecanismos inmunológicos en contra de tumores y diferencia de la radio o la quimioterapia, la vacunación contra antígenos tumorales específicos tendría menos efectos secundarios, con la posibilidad de generar memoria inmunológica y así evitar la metástasis y recurrencia del cáncer.

La proteína del tumor de Wilm's (WT1) se ha sido reconocido recientemente como un antígeno tumoral universal que se sobreexpresa en tumores hematológicos y sólidos; su eficiencia como blanco de inmunoterapia ha sido comprobada tanto en tumores hematológicos como sólidos, por lo que el uso y evaluación de estrategias que involucren la vacunación contra WT1, se considera de alta relevancia en investigación.

El empleo de adyuvantes en vacunación continúa siendo de especial interés para potenciar la inmunidad general del organismo. Los oligonucleótidos CpG (ODN-CpG) representan moléculas adyuvantes de nueva generación, que activan mecanismos de

inmunidad innata y conducen a respuestas inmunitarias de tipo Th1, y se ha demostrado su eficacia y seguridad en diversos modelos animales y en ensayos clínicos.

Por último, la exploración de nuevas y más eficientes formas de entrega de vacunas, representa un área de investigación extensa, en ese sentido, la administración pulmonar constituye una vía no invasiva, con una extensa área de superficie y propiedades inmunológicas privilegiadas, adicionalmente que ha demostrado la funcionalidad de esta vía de administración, en el tratamiento de patologías tanto pulmonares como sistémicas, lo que le convierte en una forma muy atractiva para la entrega de vacunas anti-cáncer.

4. HIPÓTESIS

La vacunación contra WT1 por vía aerosol es efectiva contra tumores pulmonares y subcutáneos, siendo la respuesta antitumoral más potente al utilizar ODN-CpG como adyuvantes

5. OBJETIVOS

5.1. Objetivo general

Evaluar la efectividad de la vacunación con DNA o péptidos sintéticos de WT1 más ODN-CpG administrados vía aerosol, contra tumores pulmonares y subcutáneos

5.2. Objetivos particulares

1. Analizar la infiltración de células del sistema inmune en el tejido pulmonar de ratones nebulizados con ODN-CpG
2. Evaluar el perfil de citocinas Th1, Th2 y Th17, en sueros de ratones nebulizados con ODN-CpG
3. Evaluar la seguridad de la administración vía aerosol de ODN-CpG, mediante el análisis histológico de los pulmones
4. Analizar la expresión de la proteína de WT1 en las líneas celulares B16F10 y L5178Y-R
5. Evaluar la especificidad y funcionalidad del plásmido WT1 (H+/-) y los péptidos sintéticos de WT1, para su empleo como vacunas
6. Evaluar el efecto de las vacunas de DNA/péptidos de WT1 y ODN-CpG, sobre tumores B16F10 implantados pulmonarmente
7. Evaluar el efecto de las vacunas de DNA/péptidos de WT1 y ODN-CpG, sobre tumores L5178Y-R implantados subcutáneamente
8. Evaluar la capacidad profiláctica de la vacuna de DNA contra WT1 y ODN-CpG, en tumores subcutáneos L5178Y-R

6. MATERIAL Y MÉTODOS

6.1. Líneas celulares

Se utilizaron las líneas celulares murinas B16F10 (melanoma) y L5178Y-R (linfoma), las cuales fueron obtenidas de la American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, Virginia, USA). Respectivamente, las células fueron cultivadas y mantenidas en medio DMEM-F12 o RPMI (Invitrogen, Life Technologies, Burlington, Ontario, Canadá), suplementados con 10% de SFB (Gibco, Grand Island, NY, USA), 100 U/ml de penicilina, y 100 µg/ml de estreptomocina (ambas de Invitrogen, Life Technologies). Las células fueron incubadas a 37 °C en una atmósfera a 95% de O₂ y 5% de CO₂.

6.2. Animales

Se emplearon ratones hembra de las cepas C57BL/6 y BALB/c, de 7 a 8 semanas de edad (Harlan México, S.A. de C.V.). Los animales fueron mantenidos en el bioterio institucional con agua y alimento *ad libitum*, bajo condiciones libres de patógenos. Todos los experimentos se llevaron a cabo bajo protocolos estandarizados, tomando en cuenta las recomendaciones de la guía internacional ARRIVE (Kilkenny et. al, 2010), con la aprobación previa del Comité de Ética Animal de la Facultad de Ciencias Biológicas de la UANL.

6.3. Oligodesoxinucleótidos CpG (ODN-CpG)

Para este trabajo fueron utilizados los ODN-CpG 1826 (5'-tccatgacgttcctgacgtt-3') y 2395 (5'-tcgtcgttttcggcgc:gcccg-3') y como control la secuencia 2395-C (5'-tgctgcttttggggggccccc-3') (Alpha DNA, Montreal, Quebec, Canadá). Todos los oligos fueron sintetizados en forma fosforotioato, como un liofilizado purificado mediante HPLC libre de endotoxinas. Posteriormente los ODN-CpG y el control fueron resuspendidos en agua miliQ estéril a una concentración de 100 µM, alicuotados y almacenados a -80°C.

6.4. Plásmido y péptidos sintéticos de WT1

El plásmido codificante para la isoforma grande (H+/-) de WT1 utilizado como vacuna fue proporcionado por la Dra. Ana Maria Tari. Los péptidos inmunodominantes de WT1 fueron sintetizados como un liofilizado libre de endotoxinas con una pureza >98% (Biopeptek, Malvern, PA, USA). El péptido 9 mer -restringido a MHC I- posee la secuencia de aminoácidos 126-134 (RMFPNAPYL) y el péptido 16 mer -restringido a MHC II- la secuencia aminoacídica 332-345 (KRYFKLSHLQMHSRKH). Para la reconstitución de los péptidos se añadieron 5 µl de DMSO y 95 µl de agua miliQ estéril por cada mg del liofilizado, posteriormente se hicieron alícuotas de ambos péptidos y se almacenaron a -20°C.

6.5. Transformación y producción del plásmido WT1 H+/-

Se utilizaron bacterias calcio competentes *Escherichia coli* de la cepa DH5- α para su transformación con el plásmido WT1 H+/- . Primeramente se activaron las cepas de *E. coli* DH5- α , sembrando 50 µl de la cepa en 5 ml de caldo Luria durante 4 h a 37°C. Se centrifugaron 10 min a 5000 rpm en una centrífuga “Spectrafuge” dentro de un tubo Eppendorf de 1.5 ml. Se decantó el sobrenadante, se resuspendió en 400 µl de CaCl₂ 0.1 M en frío y se incubó 20 min en hielo. Luego se centrifugó a 5000 rpm, decantando el sobrenadante y se añadió 1 µl del plásmido añadiendo 20 µL de CaCl₂ 0.1 M; se incubó en hielo por 1 h 40 min. Después se realizó un shock térmico a 40°C por un minuto e inmediatamente se incubó en hielo por 2 min. Se agregó 200 µl de caldo Luria, incubando 1 h en el shaker a 200 rpm y 37 °C. Se tomaron 50 µl del cultivo y se incubaron en 5 ml de caldo Luria por 24 h a 37°C con 50 µg/ ml de ampicilina.

Después el crecimiento se pasó a otro matraz con 500 ml de caldo Luria, añadiendo 50 µg/ ml de ampicilina y se incubó por 24 h a 37°C. Posteriormente, se obtuvieron los paquetes celulares centrifugando a 3,000 rpm por 10 min en tubos de 50 ml y concentrando los 500 ml.

Para la extracción y purificación del plásmido se usó un kit de purificación a gran escala (Pure Link Hi Pure Plasmid Midi Prep Kit, Invitrogen), siguiendo las instrucciones del

fabricante. Finalmente se cuantificó la concentración del plásmido en un nanodrop 2000 (ThermoScientific) y se almacenó a -20°C .

6.6. Administración pulmonar de oligonucleótidos CpG 1826, 2395 y 2395-C en ratones C57BL/6

Se utilizó un sistema de aerosol para la liberación controlada de los tratamientos, con exposición a nariz, acoplado a un compresor comercial Pulmo-Aide modelo 5650D, el cual incluye un nebulizador Micro-Mist Nebulizer (DeVilbiss Health Care Corp., Somerset, PA) (Figura 9). Se formaron grupos de 3 ratones hembra C57BL/6 y se nebulizaron por cada ratón $30\ \mu\text{g}$ de los CpG 1826, 2395 y el control 2395-C, que fueron diluidos en un volumen final de 1.5 ml de solución salina estéril. La nebulización de los tratamientos llevó alrededor de 10 min.



Figura 9. Sistema empleado para la liberación controlada de los tratamientos por aerosol. El dispositivo permite la exposición directa de la nariz de los animales, con la solución nebulizada por un aparato compresor comercial.

6.7. Obtención de suero y tejido pulmonar de ratones nebulizados con CpG 1826, 2395 y 2395-C

A las 16 h post-nebulización de los CpG 1826, 2395 y el control 2395-C, los ratones fueron anestesiados con una mezcla de ketamina (90 mg/kg) y xilacina (10 mg/kg) i.p., luego se realizó el sangrado del plexo retro-orbital de los ratones con el uso de capilares estériles, la sangre obtenida fue de inmediato transferida a tubos eppendorf de 0.6 ml, se dejó coagular durante 20-30 min a 25°C y se centrifugó durante 20 min a 300 x g a 4°C. Los sueros se recuperaron en tubos previamente etiquetados y se almacenaron a -20°C. Finalmente los ratones fueron eutanasiados y disectados para obtener los pulmones, que fueron transferidos a tubos con formalina tamponada neutra al 10% p/v, embebidos en parafina y se realizaron cortes de 4 µm de espesor en un microtomo, del pulmón completo (corte transversal) y de las regiones craneal, media y caudal.

6.8. Análisis de infiltración de poblaciones celulares CD3+, CD19+, CD20+, CD80+ y CD69+ en tejido pulmonar de ratones nebulizados con CpG 1826, 2395 y 2395-C

La infiltración de células del sistema inmune en tejido pulmonar se realizó mediante análisis de inmunofluorescencia, para ello se desparafinaron los cortes de pulmón completo por 18 h a 60°C en una incubadora (Lab-Line Instruments, Inc.), luego se sumergieron en xileno por 10 min., se rehidrataron en una serie de alcoholes en el siguiente orden: alcohol absoluto, 96%, 70% y 50%, después se lavaron en agua destilada y se calentaron por 1 min en microondas con buffer citrato (1.05 g de ácido cítrico monohidratado en 500 ml de agua destilada) para la recuperación antigénica; posteriormente los cortes se enfriaron con agua destilada, seguido de dos lavados con PBS 1X, se incubó a 4 °C por 8 min con Tritón X-100 (Tritón al 0.1% con citrato de sodio al 0.1% en PBS 1X) para permeabilizar el tejido, luego de los lavados los cortes se sumergieron por 30 min en (Tris-HCl 0.1M pH 7.5 BSA 3% y 20% de suero fetal bovino) para bloquear sitios inespecíficos, seguido de los lavados se incubó por 4 h a temperatura ambiente y en cámara húmeda con los anticuerpos monoclonales anti-CD3-Isotiocianato de fluoresceína (FITC), anti-CD19-PE (Sigma Immuno Chemicals F-

6902), anti-CD20 (2Q1271) (sc-70579, Santa Cruz Biotechnology, Inc.), anti-CD80 (N-20) (sc-1634, Santa Cruz Biotechnology, Inc.) y anti-CD69 (No. 310901 BioLegend), diluidos respectivamente a 1:20 y 1:50 en diluyente de anticuerpo (No. 00-3118 ZYMED), después de los lavados se incubó por 2 h el anti-CD20 con el anticuerpos anti-IgM de ratón-FITC (sc-358950, Santa Cruz Biotechnology, Inc.), el CD80 con el anti-IgG de cabra-FITC (sc-2024, Santa Cruz Biotechnology, Inc.), y el CD69 con el anti-IgG de ratón-FITC (No. 62-6611, ZYMED), diluido 1:100 en diluyente de anticuerpo, luego de los lavados se incubó por 30 min con DAPI (4',6-Diamidino-2-fenylindole dihydrochloride, Roche Diagnostics Corporation, Indianapolis, IN, USA), posterior al lavado con metanol y metanol-PBS se montaron en PBS/Glicerol (3/7) para ser fotografiadas a 20 y 40X con una cámara DP-71 en un microscopio (Olympus B-Max-40) y analizadas en el programa Image-Pro Plus Versión 7.0. Los marcadores CD3, CD20, CD80 y CD69 se identificaron por la emisión de fluorescencia en color verde y el CD19 en rojo La tinción con DAPI se utilizó como contraste, para corroborar que la marca fluorescente observada correspondía a células nucleadas.

6.9. Análisis histológico del tejido pulmonar de ratones nebulizados con CpG 1826, 2395 y 2395-C

Los cortes de tejido pulmonar de 4 µm de espesor correspondientes a las regiones craneal, media y caudal se extendieron y adhirieron a portaobjetos y se tiñeron con hematoxilina y eosina (H&E). Las laminillas fueron analizadas bajo el microscopio compuesto por el M.C. Armando Trejo Chávez, patólogo veterinario de la Facultad de Medicina, Veterinaria y Zootecnia de la UANL y por el Dr. José Isaías Badillo Almaraz, especialista en neumología adscrito a la Universidad Autónoma de Zacatecas. Todas las observaciones fueron incluidas, con énfasis en los signos de daño agudo o alteraciones estructurales en los pulmones. Para el análisis de los datos, a cada característica histopatológica le fue asignado un valor en escala del 0 al 3, dependiendo de la intensidad del daño observado: ausencia (0), leve (1), moderado (2) y severo (3).

6.10. Análisis de citocinas Th1/Th2/Th17 en suero de ratones nebulizados con CpG 1826, 2395 y 2395-C

La medición de citocinas se realizó por citometría de flujo usando el kit comercial BD Cytometric bead array (CBA) mouse Th1/Th2/Th17 kit (catálogo no. 560485, BD Biosciences, San Jose, CA, USA), siguiendo las instrucciones del fabricante. La adquisición de las muestras se realizó en un citómetro de flujo Accuri C6 (BD Biosciences, San Jose, CA, USA) y el análisis de datos se hizo en el programa CFlow plus, proporcionado por la misma compañía. La concentración individual de cada citocina se estimó a partir de la intensidad media de fluorescencia para cada muestra. El valor obtenido corresponde al promedio de tres experimentos independientes \pm la desviación estándar.

6.11. Transfección de células B16F10 con el plásmido de WT1 (H+/-)

En una placa de 6 pozos, fueron sembradas 200, 000 células B16F10 en un volumen de 2 ml de medio de cultivo por pozo. La placa fue incubada en condiciones estándar hasta que el crecimiento celular alcanzó una confluencia del 70-80%. En ese momento se inició el protocolo de transfección, utilizando el polímero policationico Polietilenimina (PEI) (ramificado, peso molecular= 25 kDa) como agente acarreador. Para ello se preparó una solución madre de PEI a una concentración final de 4.3 mg/ml en H₂O miliQ estéril. La relación de grupos amino de la PEI/ fosfatos del DNA plasmídico (radio N/P) calculada fue de 5.

En tubos eppendorf individuales, por cada pozo a transfectar se diluyeron 4 μ g del plásmido de WT1 (H⁺,⁻) y 0.4 μ l de PEI, cada uno en 100 μ l de NaCl 150 mM. Se dio vortex y spin a cada tubo. Posteriormente se adicionó la dilución de la PEI a la dilución del plásmido, nuevamente se dio vortex/spin. La mezcla se incubó por 30 min. a temperatura ambiente, se colocaron 200 μ l de los complejos por pozo y se incubó la placa por 48 h.

6.12. Extracción y cuantificación de proteínas

Con ayuda de un gendarme, se desprendieron y colectaron células B16F10 y L5178Y-R, para el posterior western blot y análisis de expresión basal de la proteína de WT1, de igual manera fueron colectadas las células B16F10 transfectadas con el plásmido de WT1 (H⁺, -), esto último para evaluar la funcionalidad del plásmido, es decir la capacidad de expresar la proteína de WT1, para su posterior uso como vacuna. Las suspensiones celulares fueron colocadas en tubos eppendorf y lavadas con PBS 1X. Posteriormente los paquetes celulares fueron resuspendidos en buffer de lisis (Tritón 1%, NaCl 150 mM, Tris 25 mM pH 7.6) e incubados en hielo por 30 min. Transcurrido ese tiempo se centrifugaron los tubos por 5 min. a 10,000 rpm y los sobrenadantes conteniendo las proteínas fueron transferidos a tubos nuevos y almacenados a -70 °C.

La cuantificación de las proteínas se realizó con el kit colorimétrico comercial Bio-Rad DC Protein Assay, usando estándares de albúmina bovina a concentraciones de 0.125, 0.25, 0.5, 0.75, 1.0, 1.5 y 2.0 mg/ml, que sirvieron para realizar la curva de calibración. Para cada muestra de proteínas se prepararon diluciones 1:5, utilizando como diluyente buffer de lisis; después se preparó un mix 1:20 con los reactivos S y A; posteriormente se agregaron 175µL de reactivo B y se incubó por 10 min a temperatura ambiente en la oscuridad, tiempo en el cual se desarrolló un cromógeno azul, directamente proporcional a la concentración de proteínas. Finalmente se leyó la densidad óptica de los estándares y muestras de proteínas en un lector de placas de ELISA, a una longitud de onda de 595 nm y se calculó la concentración de proteínas para cada muestra.

6.13. Western blot

6.13.1. Preparación de proteínas

Cincuenta microgramos de proteínas totales fueron desnaturalizados en buffer de carga 6X (β-mercaptoetanol, SDS, Glicerol, Azul de bromofenol), para lo cual fueron hervidas durante 5 min.

6.13.2. Electroforesis en gel de poliacrilamida

Se preparó un gel de poliacrilamida al 12%, se colocó en la cámara de electroforesis con buffer de corrida (Tris Base 25 mM, Glicina 250 mM pH 8.3, SDS 1%) y se cargaron las muestras en los carriles, incluido el marcador de peso molecular. Inicialmente el corrimiento electroforético se realizó a 46 V por 20min y posteriormente se aumentó a 100 V, por alrededor de 1 h 40 min.

6.13.3. Transferencia a membrana de nitrocelulosa

Para este paso, fue preparado el mismo día el buffer de transferencia (100 ml solución stock Tris Base + Glicina, 200 ml de metanol y 700 ml de H₂O). Una vez concluida la electroforesis, se sacó el gel con mucho cuidado y se formó un “sandwich”, para lo cual se colocaron de cátodo a ánodo: esponjas, papel filtro, gel de poliacrilamida, membrana de nitrocelulosa, papel filtro y esponjas. Se corrió en la cámara húmeda con buffer de transferencia por 2 h a 26 V.

6.13.4. Inmunodetección

Previamente fue preparada una solución stock de TBS 10X, pH 7.6 (Para un litro: 31.5 g Tris-HCl + 80 g NaCl y ajustar al pH indicado). Terminada la transferencia se colocó cuidadosamente la membrana en una solución de bloqueo (TBS-tween 1% + 5% leche) por 1 h. Luego se incubó por 2 h la membrana con el anticuerpo primario de WT1 monoclonal diluido 1:200 en TBS-tween + leche 2.5%. Enseguida se lavó la membrana con TBS-Tween 1% por 10 min en 3 ocasiones y después se realizó la incubación de la membrana con el anticuerpo secundario (conjugado) anti-ratón diluido a 1:5000, también en TBS-tween + leche al 2.5%, por 2 h. Se retiró el anticuerpo secundario y de nuevo se hicieron tres lavados a la membrana. Posteriormente se agregó a la membrana el sustrato de quimioluminiscencia Lumi-Light plus (Roche Diagnostics Corporation, Indianapolis, IN, USA) en partes iguales por 5 min, se eliminó el exceso de reactivo y se

fijó la membrana en un cassette para ser expuesto a un film y revelado en el cuarto oscuro.

Para la normalización de las muestras se empleó un anticuerpo monoclonal para β -actina (diluido 1:500 en TBS-tween + leche 2.5%) y se incubó por 2.5 h; el anticuerpo secundario fue anti-ratón diluido a 1:5000 en TBS-Tween + leche al 2.5% y se incubó por 2 h. La inmunodetección para β -actina se realizó de igual manera con quimioluminiscencia, como se describió en el párrafo anterior.

El análisis de densitometría de las bandas se realizó en el programa Image Studio Lite, versión 5.2 (LI-COR Biosciences, Nebraska, USA).

6.14. Análisis de la especificidad de los péptidos 9 mer y 16 mer

Se nebulizaron dos grupos de 3 ratones C57BL/6 con 50 μ g y 100 μ g de los péptidos 9 mer y 16 mer, respectivamente, que fueron sacrificados seis días después para extraer los bazo y obtener las células mononucleares, empleando lymphoprep (Gibco, Grand Island, NY, USA). Para ello se realizó la perfusión de los bazo hasta obtener toda la pulpa, enseguida se depositó la suspensión celular cuidadosamente sobre un volumen de lymphoprep, seguido de una centrifugación a 400g por 30 min. Las células de la interfase opaca (células mononucleares) fueron transferidas a un tubo de 15 ml, lavadas con PBS 1X y centrifugadas a 250 g por 10 min. Luego se desechó el sobrenadante, el paquete celular fue resuspendido en 5 ml de PBS 1X y centrifugado a 250 g por 10 min., seguido de otro lavado. Posteriormente la suspensión celular fue colocada en una placa para separar los linfocitos (células no adherentes), que fueron co-cultivados con células B16F10 durante 4 h. Finalmente se tomaron los sobrenadantes, se realizó otra centrifugación para separar el remanente de linfocitos y se analizó la concentración de IFN- γ , empleando un kit comercial de ELISA.

6.15. Medición de anticuerpos específicos para WT1 en suero

Para determinar la producción de anticuerpos específicos contra WT1 (IgG), se nebulizaron 3 ratones BALB/c con una dosis única de 10 μ g de plásmido WT1 (H+/-)

acomplejado con PEI. Veintiún días después se obtuvieron los sueros de los animales y se analizaron por dot blot. De un extracto proteico de células B16F10 se tomaron 50µg y se llevaron a un volumen de 200µl en buffer TBS 1X, por muestra. Posteriormente con ayuda de una bomba de vacío se cargaron en el aparato de dot blot. Luego se añadieron 200 µl de solución de bloqueo (TBS 1X, 2% BSA y H₂O₂) y se incubó 1 h. Enseguida se hicieron dos lavados con buffer TBS-tween al 0.05% y en uno de los pozos se agregaron 100µl de anticuerpo primario anti WT1 monoclonal 1:500 (Sigma Aldrich), dejando incubarse por 45 min (control positivo). Se diluyeron 10 µl de cada suero en 500 µl de TBS 1X y se añadieron 200 µl a los otros pozos. Posteriormente se realizaron tres lavados con buffer TBS-tween al 0.05%. Después se añadió el anticuerpo secundario anti ratón 1:5000 (Sigma Aldrich) y se incubó la membrana por 45 min. Finalmente se realizaron tres lavados con buffer TBS-tween al 0.05% y se añadieron diaminobencidina y H₂O₂ para observar la reacción.

6.16. Modelo de tumor pulmonar y esquema de tratamientos

Para inducir un modelo de metástasis a pulmón, se inocularon 5×10^5 células B16F10 diluidas en 150 µl de medio DMEM/F12 sin suero, en la vena caudal de ratones C57BL/6. Al tercer día post-inoculación de las células se formaron aleatoriamente grupos de 5 ratones c/u, que recibieron los siguientes tratamientos en aerosol: a) PBS (control), b) CpG-2395, c) Péptido 9 mer, d) Péptido 16 mer, e) Péptido 9 mer + CpG-2395, f) Péptido 9 mer + 16 mer, g) Péptido 9 mer + péptido 16 mer + CpG-2395 y, h) plásmido WT1 (H+/-). Los tratamientos fueron diluidos en PBS 1X a razón de 500 µl por ratón. Las dosis empleadas para los tratamientos fueron: CpG-2395 (25µg), péptido 9 mer= 50 µg, péptido 16 mer= 100 µg y plásmido= 40 µg. La nebulización de cada grupo tomó alrededor de 10 min. Los ratones tratados con los péptidos de WT1 y CpG recibieron 3 inmunizaciones en total, con espacio de 5 días entre cada tratamiento, el grupo del plásmido recibió un solo tratamiento. Desde el inicio del experimento los ratones fueron pesados cada tercer día y se monitoreó diariamente la supervivencia de los animales, una vez que iniciaron los decesos los ratones fueron diseccionados, se extrajeron y lavaron los pulmones en solución salina estéril, posteriormente fueron

analizados en un microscopio estereoscópico para registrar el número y tamaño de focos tumorales, por último se pesaron los pulmones. El conjunto de datos fue analizado para determinar las diferencias entre los grupos tratados, con respecto al grupo control.

6.17. Modelo de linfoma subcutáneo y esquema de tratamientos

Para inducir un modelo de linfoma implantado subcutáneamente, fueron inoculadas 2×10^6 células L5178Y-R en el flanco posterior derecho de ratones BALB/c. Al tercer día post-inoculación de las células se formaron aleatoriamente grupos de 5 ratones c/u, que recibieron los siguientes tratamientos en aerosol: a) PBS (control), b) CpG-2395, c) Péptido 9 mer, d) Péptido 16 mer, e) Péptido 9 mer + CpG-2395, f) Péptido 9 mer + 16 mer y, g) Péptido 9 mer + péptido 16 mer + CpG-2395. Las dosis individuales de los tratamientos, así como la forma de entrega en aerosol, fueron iguales que en el modelo de tumor pulmonar descrito previamente. Los ratones recibieron 3 inmunizaciones en total, con espacio de 3 días entre cada una. El peso de los ratones fue registrado cada tercer día desde el inicio del experimento. Asimismo, con ayuda de un vernier digital se midió el tamaño de los tumores, el volumen tumoral fue calculado con la fórmula $\pi/6 \times \text{largo} \times \text{ancho}^2$. La supervivencia de los animales fue monitoreada diariamente.

6.18. Modelo profiláctico de linfoma subcutáneo

Para evaluar la capacidad de la vacunación contra WT1, para prevenir la formación del linfoma, se formaron grupos de 5 ratones c/u, los cuales recibieron una única nebulización con: a) PBS (control), b) Plásmido WT1 (H+/-) (10 μg + PEI), c) CpG-2395 (25 μg), d) plásmido WT1 + CpG (co-administrados) y e) plásmido WT1 + CpG (CpG 48 h después del plásmido). Siete días después, fueron inoculadas 4×10^6 células L5178Y-R en el flanco posterior derecho de ratones BALB/c. El peso de los ratones y el tamaño de los tumores desde su aparición fueron registrados diariamente. Para el cálculo del volumen tumoral se utilizó la fórmula descrita anteriormente. Se llevó un registro detallado de la supervivencia de los ratones de todos los grupos.

6.19. Análisis estadístico

Para el análisis estadístico de los datos se utilizó el programa SPSS Statistics, version 20 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA). Para analizar las diferencias histológicas inducidas por cada ODN-CpG, en comparación al control se usó la prueba U de Mann-Whitney. Las diferencias en poblaciones del sistema inmune infiltradas en tejido pulmonar, concentración de citocinas, peso de ratones, peso de pulmones y volumen tumoral, se analizaron mediante ANOVA; en los casos en los que se hallaron diferencias, se procedió a realizar la prueba de Tukey. Finalmente el análisis de supervivencia se realizó mediante el estimador no paramétrico de Kaplan-Meier. Los valores p menores a 0.05 fueron considerados como indicativos de una diferencia estadísticamente significativa.

7. RESULTADOS

7.1. Infiltración de células del sistema inmune en tejido pulmonar de ratones nebulizados con ODN-CpG

La capacidad de los ODN-CpG para inducir la infiltración de células de la inmunidad innata y adaptativa en el tejido pulmonar fue determinada por inmunofluorescencia, mediante el conteo de células positivas para los marcadores celulares analizados.

Para el marcador CD3, presente en células T, se identificaron 3 células positivas por campo, en pulmones de ratones del grupo PBS (control), mientras que en el resto de los tratamientos no se encontraron células que expresaran dicho marcador ($p < 0.01$). Respecto a los marcadores de células B, CD19 y CD20, en el caso de CD19 fueron detectadas 26 células positivas por campo, en pulmones de ratones tratados con PBS, observándose una disminución en el número de células en los tratamientos con CpG-1826, CpG-2395 y 2395-C, donde fueron contadas 17, 9 y 14 células, respectivamente (Figura 10); solo en el tratamiento con el CpG-2395 la diferencia observada para el marcador CD19 fue estadísticamente significativa, en comparación con el grupo PBS ($p < 0.05$). Para el marcador CD20, se observaron un promedio de 7 y 6 células CD20+ por campo en pulmones de ratones nebulizados con PBS y 2395-C, respectivamente, con ausencia de células marcadas en pulmones tratados con ambos ODN-CpG.

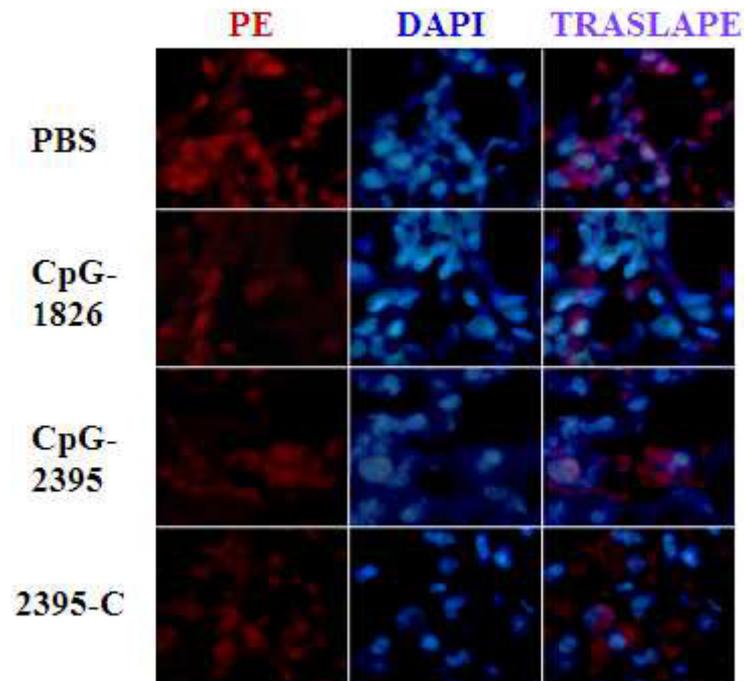


Figura 10. Inmunofluorescencia de células CD19+ en tejido pulmonar a las 16 h post-nebulización de los grupos PBS, CpG-1826, CpG-2395 y 2395-C (40x). La positividad del marcador CD19 se observa en color rojo (ficoeritrina). Las laminillas fueron contrastadas con la tinción DAPI (azul).

Para los marcadores de inmunidad innata CD69 y CD80, considerados indicadores de la activación de células NK y macrófagos/células dendríticas, respectivamente, se observó una ausencia de células CD69+ infiltradas en pulmones de ratones tratados con PBS y CpG-1826, mientras que en los tratamientos con CpG-2395 y 2395-C se contaron un promedio de 4 y 7 células positivas por campo, respectivamente (Figura 11), lo que representa, en ambos casos, una diferencia significativa con respecto a los grupos PBS y CpG-1826 ($p < 0.01$). Finalmente, el marcador CD80 fue negativo en pulmones de los grupos tratados con PBS, CpG-1826 y CpG-2395; interesantemente, solo para el tratamiento con 2395-C se hallaron células CD80+, en un promedio de 5 células marcadas por campo.

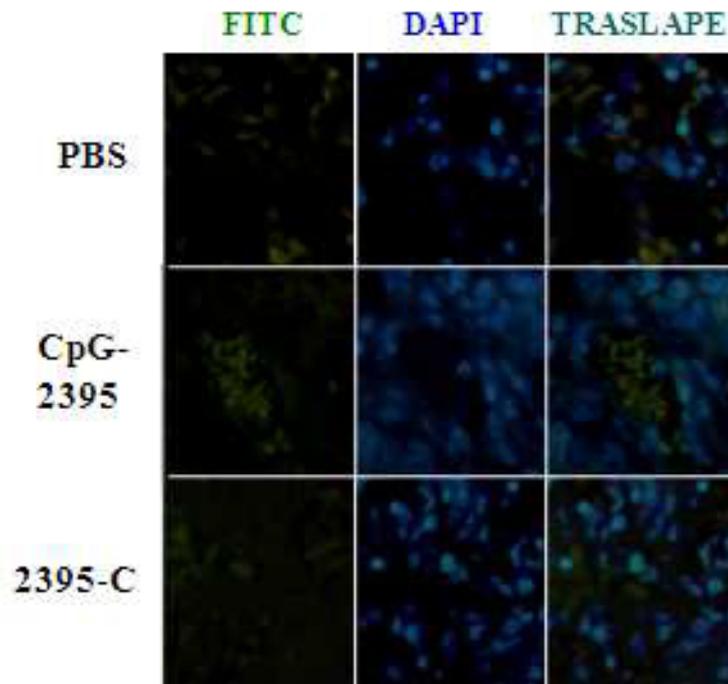
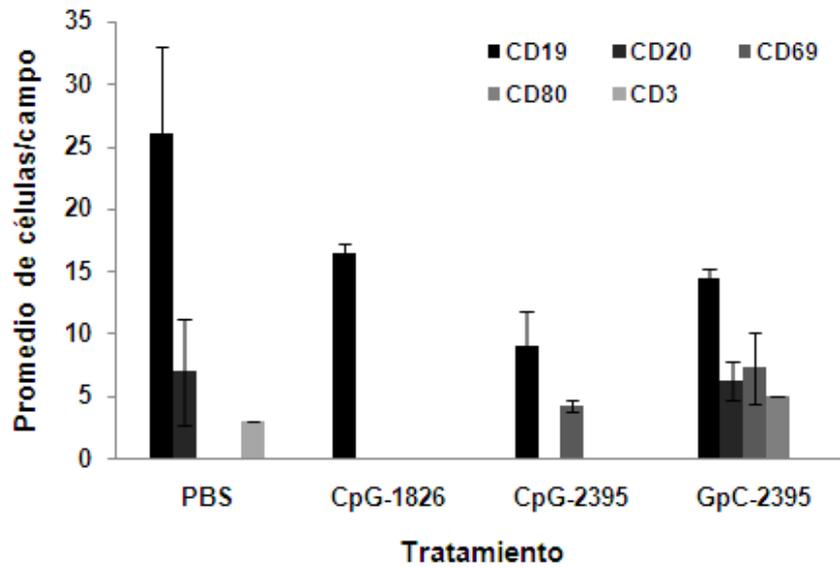


Figura 11. Inmunofluorescencia de células CD69+ en tejido pulmonar a las 16 h post-nebulización de los grupos PBS, CpG-2395 y 2395-C (40x). La positividad del marcador CD69 se observa en color verde (FITC). Las laminillas fueron contrastadas con la tinción DAPI (azul).

En conjunto, los resultados demuestran la capacidad del CpG-1826, CpG-2395 y 2395-C, para modular la infiltración y, en ciertos casos, la activación de poblaciones celulares inmunológicas en el tejido pulmonar (Figura 12).

A)



B)

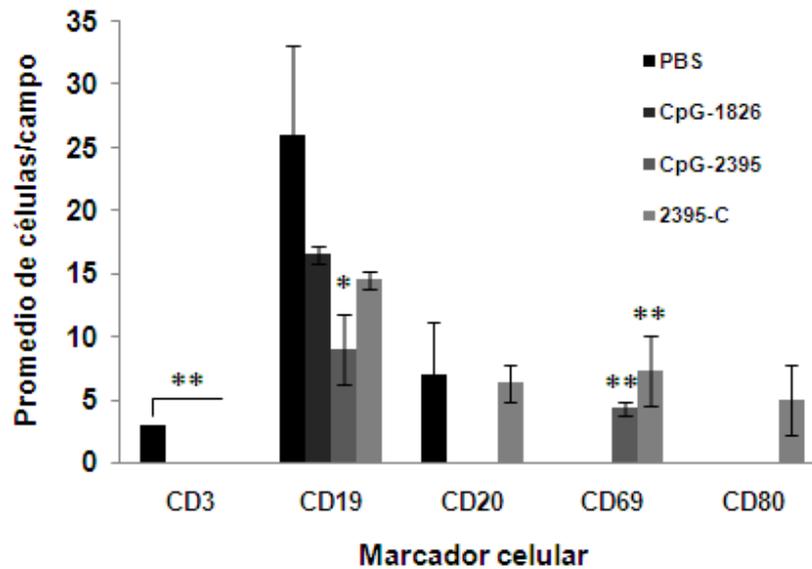


Figura 12. Poblaciones de células del sistema inmune infiltradas en pulmones de ratones a las 16 h post-nebulización con ODN-CpG y controles. El valor promedio de células contabilizadas en un total de 10 campos (\pm desviación estándar) durante el análisis de inmunofluorescencia: A) Por tratamiento y B) Por marcador celular. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$, en comparación con el grupo PBS.

7.2. Perfil de citocinas Th1/Th2/Th17 en suero de ratones nebulizados con ODN-CpG y controles

Para determinar la capacidad de los ODN-CpG administrados en aerosol, para modular la respuesta inmune no solo a nivel pulmonar sino sistémico, se cuantificaron los niveles de citocinas Th1/Th2/Th17 en el suero de los ratones. Los resultados obtenidos, con respecto al grupo PBS, muestran que el CpG-1826 indujo un incremento significativo en los niveles de IL-4 e IL-10 ($p < 0.01$), e IFN- γ ($p < 0.05$). El CpG-2395 causó una disminución en los niveles de IL-6 e IL-10. Mientras que el tratamiento con 2395-C provocó una reducción en la concentración de IL-6 e IL-17 (Tabla 3).

Tabla 3. Concentración de citocinas en suero de ratones tratados con ODN-CpG y controles. Los sueros para la cuantificación de los niveles de IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-17, TNF- α e IFN- γ fueron colectados a las 16 h post-nebulización de los tratamientos y analizados por citometría de flujo. Los datos corresponden al valor promedio \pm la desviación estándar de tres experimentos independientes. * $p < 0.05$ versus grupo control, ** $p < 0.01$ versus grupo control, N.D.= No detectable.

Tratamiento	Concentración de citocina (pg/ml)						
	IL-2	IL-4	IL-6	IL-10	IL-17	TNF- α	IFN- γ
PBS	1.10 \pm 0.14	7.15 \pm 1.55	19.95 \pm 11.59	20.55 \pm 5.72	18.25 \pm 8.98	10.55 \pm 3.95	4.47 \pm 0.95
CpG-1826	1.57 \pm 0.11	22.72\pm0.81**	24.55 \pm 1.76	119.22\pm15.23**	13.82 \pm 7.24	26.37 \pm 9.65	8.35\pm0.98*
CpG-2395	1.25 \pm 0.14	8.07 \pm 0.74	4.42 \pm 1.02	7.07 \pm 1.02	N.D.	N.D.	4.5 \pm 0.13
2395-C	1.32 \pm 0.20	9.7 \pm 0.70	8.17 \pm 1.09	N.D.	0.55 \pm 0.07	9.4 \pm 2.33	4.95 \pm 0.24

7.3. Análisis histológico de pulmones tras la administración en aerosol de ODN-CpG

El análisis histológico del efecto del CpG-1826, CpG-2395 y 2395-C, nebulizados en los pulmones 16 h después del tratamiento de los ratones, evidenció la presencia de diversas alteraciones estructurales agudas en el tejido pulmonar, incluyendo signos de: a) congestión, b) edema, c) enfisema, d) hiperplasia epitelial y submucosa, e) presencia de infiltrado inflamatorio, y f) engrosamiento de sacos alveolares. Esas características fueron consideradas para determinar las diferencias entre los tratamientos, con respecto

al grupo control. Los hallazgos histológicos más importantes se describen a continuación.

Los pulmones de los ratones tratados con PBS, mostraron alteraciones histológicas mínimas, incluyendo un engrosamiento leve de sacos alveolares (Figura 13-a y b) y estructura epitelial conservada (Figura 13-c). El tratamiento con el CpG-1826 indujo un engrosamiento severo de sacos alveolares ($p=0.022$) (Figura 13-d y -e), con congestión severa (Figura 13-e) ($p=0.029$), hiperplasia bronquial y submucosa severas ($p=0.042$) (Figura 13-f), y signos de enfisema ($p=0.029$).

El CpG-2395 produjo alteraciones histológicas más evidentes, indicadas por una congestión leve (Figura 13-g), infiltrado inflamatorio peribronquiolar severo ($p=0.004$), con pérdida del epitelio cilíndrico ciliado (Figura 13-h), edema ($p=0.014$), hiperplasia epitelial ($p=0.001$) y engrosamiento moderado de sacos alveolares (Figura 13-i).

La nebulización de los ratones con la secuencia 2395-C, también provocó cambios agudos en el tejido pulmonar. Incluyendo congestión y engrosamiento de sacos alveolares leves (Figura 13-j), una severa hiperplasia epitelial y submucosa ($p=0.000$) acompañada de pérdida del epitelio cilíndrico ciliado (Figura 13-k) y edema perivascular moderado ($p=0.018$) (Figura 13-l)

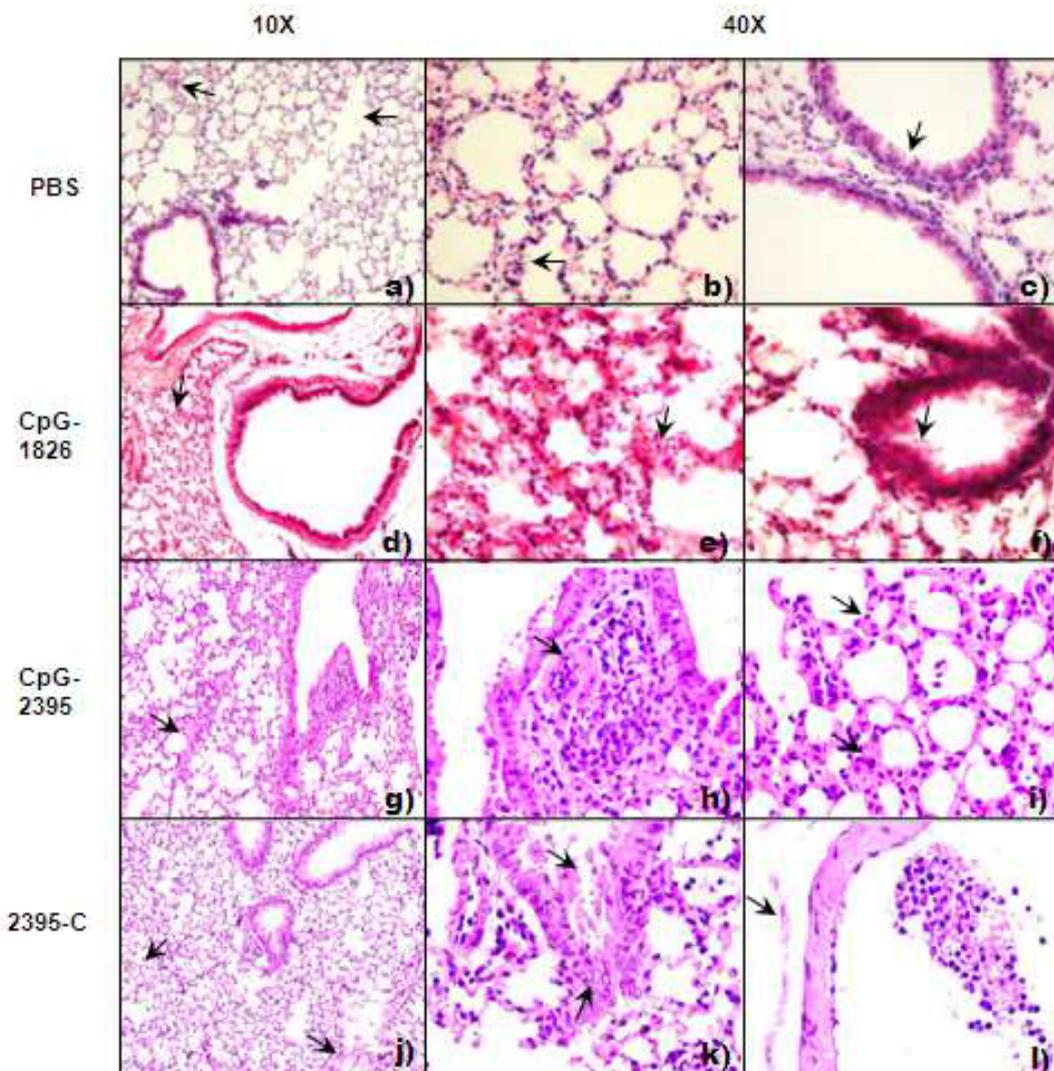


Figura 13. Análisis histológico de los pulmones de ratones nebulizados con ODN-CpG y controles. Las imágenes son representativas de cortes de pulmón colectados 16 h después de la administración de los tratamientos, teñidos con hematoxilina y eosina (H&E). Grupos: a-c (PBS), d-f (CpG-1826), g-i (CpG-2395), y j-l (2395-C). Las flechas indican los hallazgos histológicos observados, descritos a detalle en el texto.

Las alteraciones histológicas fueron observadas en todos los segmentos analizados (craneal, medial y caudal), indicando una distribución pulmonar homogénea de los tratamientos aerosolizados. Por esa razón, los datos del score se realizaron considerando pulmones completos, en lugar de segmentos. Los resultados del análisis estadístico se resumen en la Tabla 4.

Tabla 4. Alteraciones histológicas en pulmones de ratones nebulizados con ODN-CpG y 2395-C. Los valores mostrados representan la comparación de cada tratamiento versus el grupo control (PBS), obtenidos con la prueba estadística U de Mann-Whitney. *p<0.05, **p≤0.001, ***p<0.0005

Grupo de tratamiento	Prueba U Mann-Whitney (valor U, valor p) n=9					
	Congestión	Edema	Enfisema	Hiperplasia	Infiltrado inflamatorio	Engrosamiento de sacos alveolares
CpG-1826	18.5(0.029)*	29.5(0.243)	21.0(0.029)*	19.0(0.042)*	26.5(0.165)	16.5(0.022)*
CpG-2395	22.5(0.082)	15.0(0.014)*	37.0(0.693)	6.0(0.001)**	9.5(0.004)*	24.0(0.113)
2395-C	28.5(0.241)	16.5(0.018)*	24.5(0.052)	0.0(0.000)***	37.5(0.772)	22.5(0.069)

7.4. Expresión de la proteína de WT1 en las líneas celulares B16F10 y L5178Y-R

Para poder implementar modelos experimentales que permitieran evaluar la efectividad de la vacunación contra WT1, se determinó la factibilidad del empleo de las células B16F10 y L5178Y-R, para ello se analizó la expresión de la proteína de WT1 por un ensayo de Western blot. Los resultados obtenidos mostraron una alta expresión de WT1 en ambas líneas celulares, al comparar con el nivel de expresión de la línea celular leucémica humana K562, ampliamente utilizada como referencia de la expresión de WT1 (Figura 14).

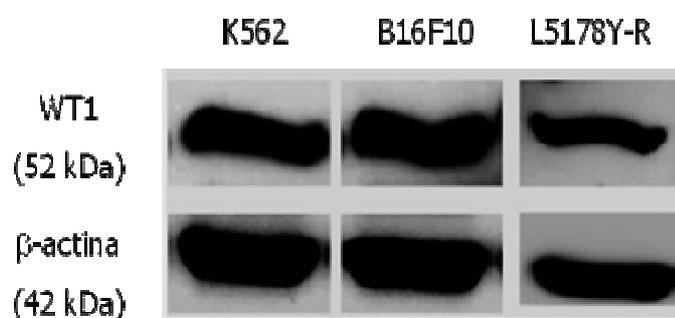


Figura 14. Expresión basal de la proteína WT1 en las líneas celulares B16F10 y L5178Y-R. La detección fue realizada por Western blot, usando un anticuerpo anti-WT1 monoclonal. La línea celular de leucemia humana K562 fue usada como control positivo de la expresión de WT1. Como control endógeno fue detectada la proteína β-actina.

7.5. Funcionalidad del plásmido WT1 (H+/-) y especificidad de los péptidos sintéticos de 9 mer y 16 mer derivados de WT1

Para evaluar la funcionalidad del plásmido WT1 (H+/-), es decir la capacidad de expresar la proteína de WT1, para su posterior uso como vacuna, se analizó mediante Western blot la expresión exógena de WT1, en células B16F10 transfectadas con el plásmido. Se observó una expresión 7 veces mayor nivel de la proteína WT1, en comparación con células control sin transfectar (Figura 15). Lo anterior confirma la factibilidad del uso del plásmido como vacuna de DNA, al codificar correctamente para el antígeno tumoral.

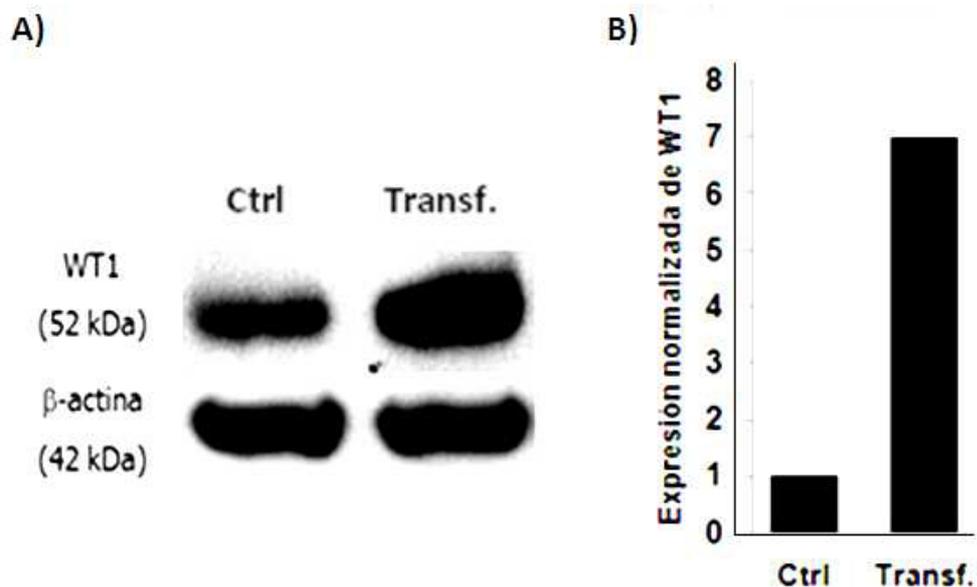


Figura 15. Western blot para WT1. A) Expresión de WT1 en células B16F10 sin transfectar (control) y transfectadas con 4 µg del plásmido WT1 (H+/-). Como control de carga se utilizó la proteína β-actina; B) Análisis densitométrico de la expresión de WT1 en células control y transfectadas, normalizada en relación a la β-actina.

Para determinar la especificidad de los péptidos sintéticos de WT1, primeramente se inmunizaron ratones C57BL/6 con los péptidos 9 mer y 16 mer, posteriormente se extrajo el bazo de los animales y se separaron los linfocitos, que fueron luego co-cultivados con células B16F10 y finalmente se cuantificó el nivel de IFN-γ secretado por los linfocitos en el medio de cultivo. La concentración de IFN-γ en el sobrenadante

control fue de 53.9 ± 18.2 pg/ml, mostrando un incremento a 101.5 ± 17.0 pg/ml para el péptido 9 mer y una disminución a 4.3 ± 1.1 pg/ml para el péptido 16 mer (Figura 16). La diferencia en la producción de IFN- γ fue estadísticamente significativa entre los péptidos ($p < 0.05$).

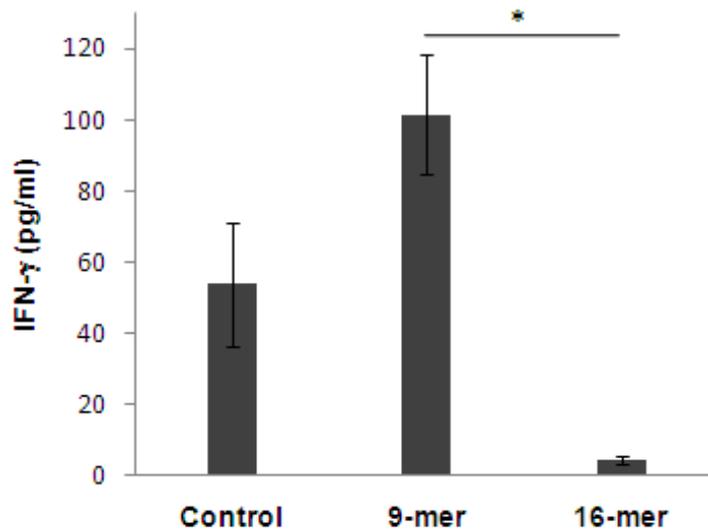


Figura 16. Cuantificación de los niveles de IFN- γ en sobrenadantes. Se co-cultivaron células B16F10 con linfocitos provenientes del bazo de ratones inmunizados 6 días antes con los péptidos sintéticos de WT1: 9 mer y 16 mer. La determinación fue realizada mediante un kit de ELISA comercial. * $p < 0.05$.

7.6. Detección de anticuerpos contra WT1 en suero de ratones inmunizados con el plásmido WT1 (H+/-)

Para evaluar *in vivo* la capacidad del plásmido WT1 (H+/-) para funcionar como vacuna de DNA e inducir una respuesta inmune, se analizó la presencia de anticuerpos específicos contra WT1 mediante un dot blot. Para ello fueron inmunizados por vía aerosol 3 ratones con una dosis única de 10 μ g de plásmido y los sueros fueron colectados a los 21 días post-nebulización. Los resultados mostraron que en el suero de ratones tratados el plásmido hubo una producción de anticuerpos anti-WT1 (Figura 17). Con ello se confirmó la factibilidad del uso del plásmido como vacuna de ADN en los ensayos de modelos tumorales posteriores.

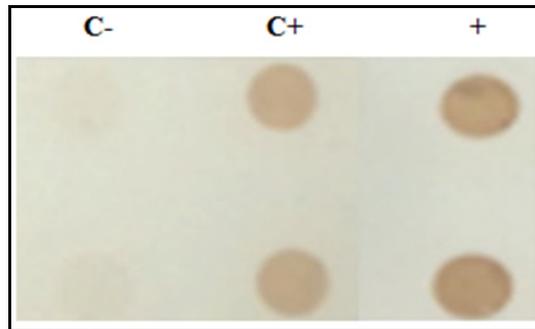


Figura 17. Ensayo de dot blot para la detección de anticuerpos anti-WT1. C-: Control de la técnica sin anticuerpo primario; C+: Control positivo con anticuerpo primario monoclonal de ratón contra WT1, 1:500; +: Suero de ratón inmunizado con 10 μ g de plásmido en aerosol.

7.7. Efecto de la vacunación con DNA/péptidos de WT1 y CpG-2395, sobre tumores B16F10 implantados pulmonarmente

El modelo de cáncer pulmonar fue establecido satisfactoriamente, los focos tumorales fueron visibles durante el análisis de los pulmones al octavo día de la inoculación de las células B16F10, el número de focos tumorales aumentó para el día 13 (Figura 18).

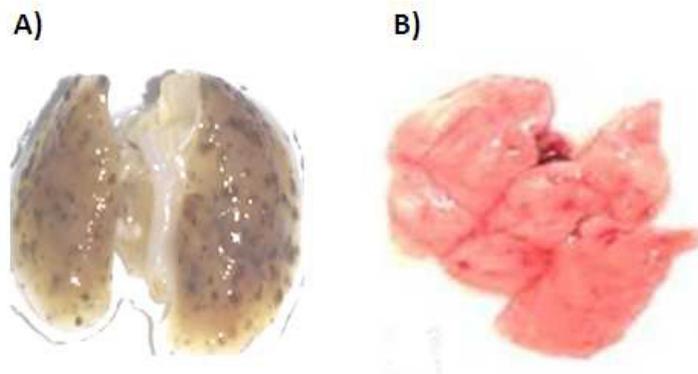


Figura 18. Metástasis pulmonares en ratones C57BL/6. A) La imagen es representativa de los focos tumorales observables bajo el estereoscopio, a los 13 días posteriores a la inoculación de las células B16F10. B) Control, pulmón de ratón no inoculado con las células tumorales

A continuación se llevó a cabo la inducción de tumores pulmonares y al tercer día de formaron aleatoriamente grupos de 5 ratones y se iniciaron las nebulizaciones, hasta completar los tratamientos programados. A partir del día 20 del experimento, iniciaron los decesos de los ratones, que fueron diseccionados para obtener los pulmones. Al finalizar el ensayo, el análisis número y tamaño de focos tumorales no mostró diferencias entre los diferentes grupos, con respecto al grupo control (Figura 19). Tampoco se observaron diferencias en el peso de los pulmones ni en la sobrevivencia de los ratones.

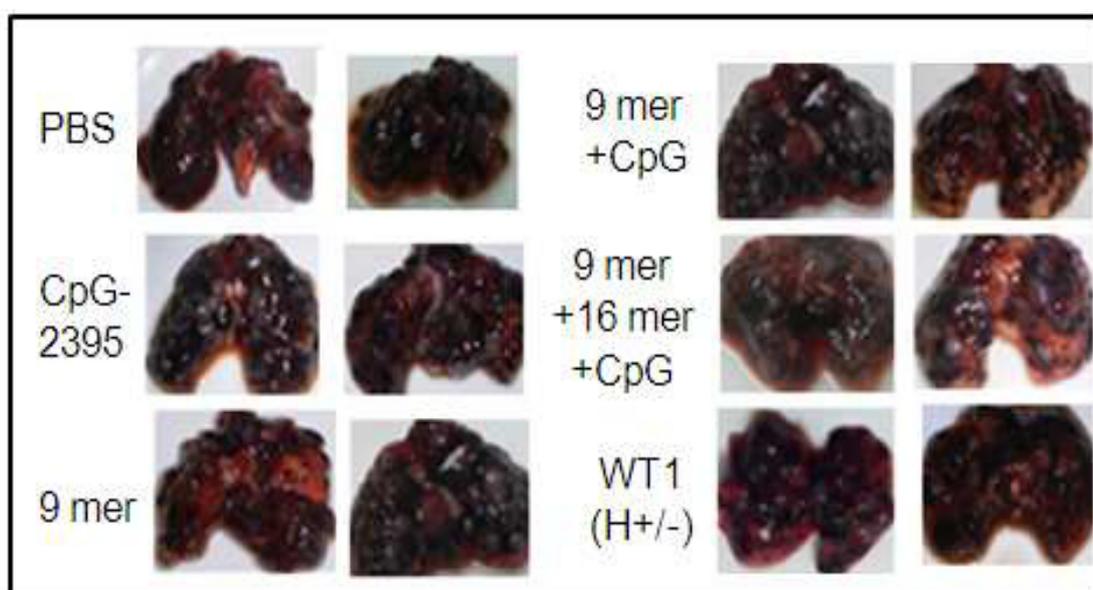


Figura 19. Fotografías representativas de los pulmones de los grupos de ratones aerosolizados con los diferentes tratamientos versus el grupo control. Al registrarse el deceso de los animales, se realizó la disección y obtención de los pulmones para determinar diversos parámetros y evaluar la eficacia de los tratamientos.

7.8. Efecto de la vacunación con péptidos de WT1 y CpG-2395, sobre tumores L5178Y-R implantados subcutáneamente

El monitoreo del peso de los ratones, a partir del tercer día de la inoculación subcutánea de 2×10^6 células L5178Y-R, mostró para todos los grupos un incremento del peso a partir del sexto día, cuando los tumores fueron evidentes en los ratones. El día 24 se alcanzó el peso máximo para la mayoría de los grupos experimentales, con excepción

del grupos CpG-2395 (día 15) y los grupos PBS y 9 mer+16 mer+CpG, en los que los ratones siguieron aumentando de peso, en una clara correlación con el incremento de la masa tumoral, hasta el deceso de los animales.

Para el día 24, en todos los grupos hubo un incremento del peso de los ratones, con respecto al peso inicial: PBS (18.7%), grupo CpG-2395 (1.3%), 9 mer (11.8%), 16 mer (7.7%), 9 mer+CpG (14.3%), 9 mer+16mer (11%), 9 mer+16 mer+CpG (31%) (Figura 20).

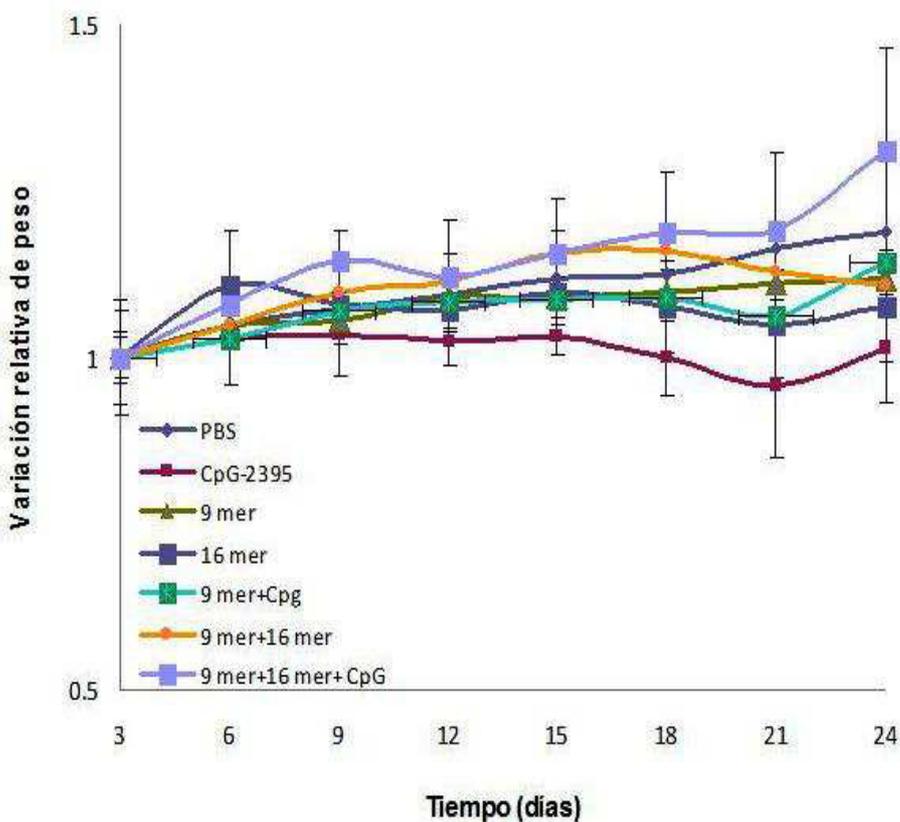


Figura 20. Cinética de peso corporal de ratones BALB/c con tumores L5178Y-R subcutáneos. Se inocularon 2×10^6 células en el flanco posterior derecho de los animales. Al tercer día se formaron aleatoriamente grupos de 5 ratones y fueron pesados cada tercer día. Se incluye la desviación estándar para cada medición.

El análisis del crecimiento tumoral mostró un aumento gradual del volumen de los tumores del grupo PBS, que para el día 18 tuvieron un volumen promedio de 1778 mm^3 , alcanzando un volumen máximo de 6745 mm^3 el día 27; lo mismo ocurrió con los tumores del grupo 9 mer+16 mer+CpG, sin embargo en este último el crecimiento

tumoral fue mayor, con un volumen promedio de 3976 y 8076 mm³, para los días 18 y 27, respectivamente. En el resto de los tratamientos se observó una tendencia similar, con un aumento de la masa tumoral y una regresión posterior. El volumen tumoral máximo se registró el día 9 para el grupo 9 mer (307.5 mm³); y el día 12 para los grupos CpG-2395 (463 mm³), 9 mer+CpG (772mm³), 16 mer (281 mm³) y 9 mer+16 mer (436 mm³) (Figura 21).

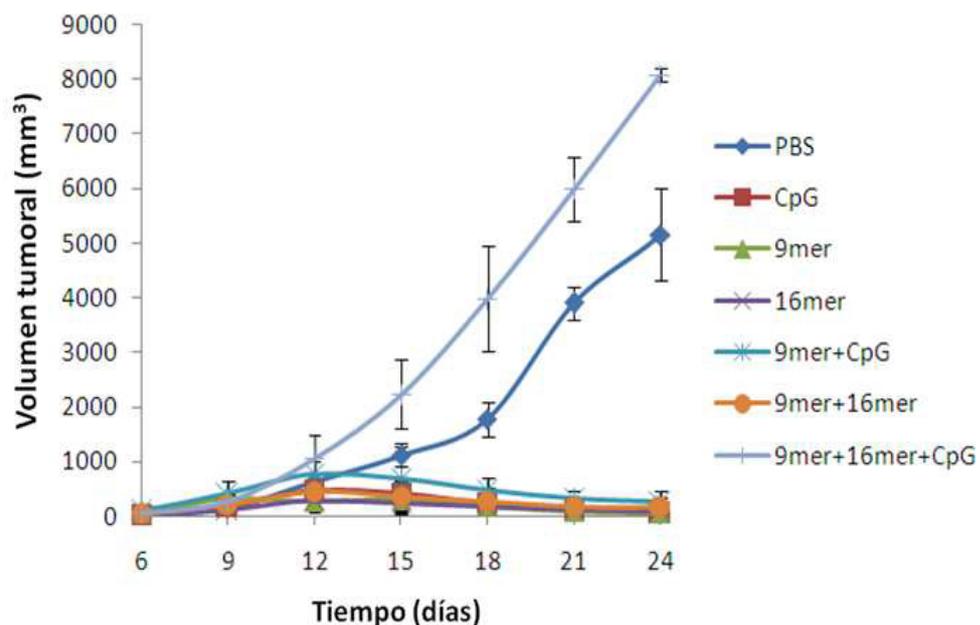


Figura 21. Cinética de volumen tumoral de ratones BALB/c con tumores L5178Y-R subcutáneos. Se inocularon 2×10^6 células en el flanco posterior derecho de los animales (día 0). Al tercer día se formaron aleatoriamente grupos de 5 ratones. Los tumores fueron medidos cada tercer día, desde su aparición el día 6. El volumen tumoral fue calculado con la fórmula $\pi \cdot \text{largo} \cdot \text{ancho}^2$. Se incluye la desviación estándar para cada medición.

En todos los grupos en los que se observó regresión tumoral, para el día 24 era evidente una avanzada reabsorción de los tumores (Figura 22), los valores promedio del volumen tumoral fueron los siguientes: CpG-2395 (110 mm³), 9 mer (76 mm³), 16 mer (68 mm³), 9 mer+CpG (269 mm³) y 9 mer+16 mer (280 mm³).



Figura 22. Fotografías de ratones con linfoma subcutáneo tratados con los péptidos 9 mer, 16 mer y CpG-2395. Las fotografías representativas de los grupos experimentales fueron tomadas a los 24 días del inicio del experimento.

También se analizó el impacto de los tratamientos en la sobrevivencia de los animales, se encontró que los grupos PBS y 9 mer+16 mer+CpG tuvieron la menor sobrevivencia, lo que estuvo estrechamente ligado al volumen tumoral observado. En el grupo PBS, ocurrieron decesos los días 21, 24 y 27; en el grupo 9 mer+16 mer+CpG los días 18 (2 ratones), 29, y 40; en el resto de los grupos, todos los ratones sobrevivieron hasta el día 43, cuando se decidió finalizar el experimento.

7.9. Efecto de la vacunación con WT1 (H+/-) y CpG-2395, en la prevención del desarrollo de tumores L5178Y-R subcutáneos

Para el modelo profiláctico de linfoma, se realizó una sola inmunización en aerosol y posteriormente la inoculación de 4×10^6 células L5178Y-R. Luego de 7 días, los tumores se hicieron evidentes en los grupos nebulizados con PBS y CpG-2395; para el día 21, los tumores alcanzaron un tamaño promedio de 7720 y 3142 mm^3 , respectivamente. En los grupos que recibieron el plásmido WT1 H (+/-) solo o en combinación con el CpG-2395, la aparición del tumor se retrasó hasta el día 14 y para el día 21 el volumen tumoral promedio fue el siguiente: WT1 (H+/-)= 456 mm^3 , WT1+CpG (103 mm^3) y WT1+CpG (48h)= 386 mm^3 (Figura 23).

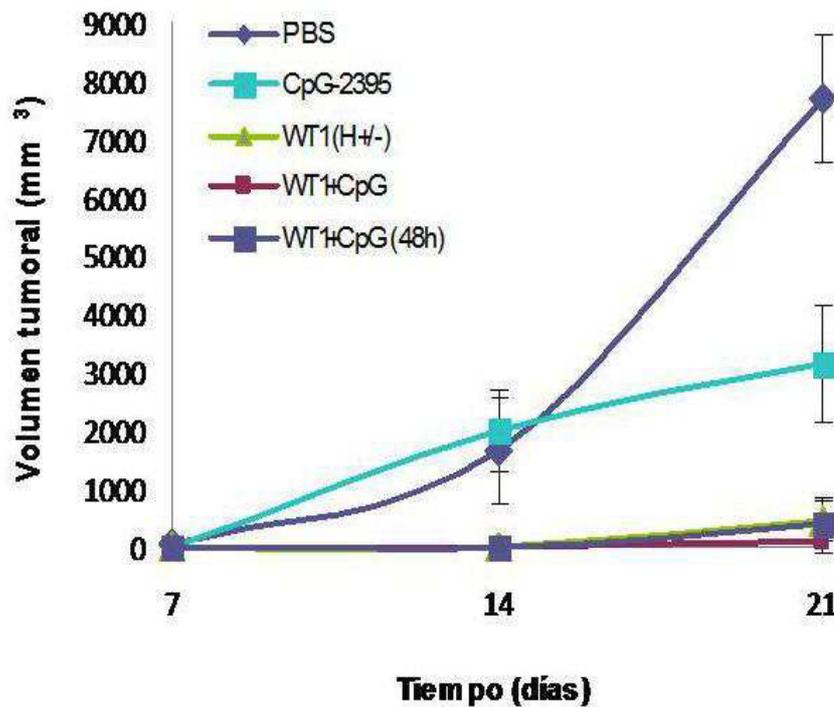


Figura 23. Cinética de crecimiento tumoral en ratones tratados con WT1 (H+/-) y CpG-2395. Grupos de 5 ratones fueron nebulizados por única ocasión con los diferentes tratamientos. Siete días después se inocularon 4×10^6 células L5178Y-R en el flanco posterior derecho de los animales y se monitoreó el tamaño de los tumores, desde que fueron visibles. El volumen tumoral fue calculado con la fórmula $\pi \cdot \text{largo} \cdot \text{ancho}^2$. Se incluye la desviación estándar para cada medición.

El análisis de supervivencia para este experimento mostró que la menor supervivencia ocurrió en el grupo PBS, en el que todos los ratones murieron, en los días 21, 24 (dos decesos), 25 y 30. En el grupo tratado únicamente con el CpG-2395 se registraron 4 decesos, en los días 22, 25, 26 y 30. En los grupos restantes que recibieron el plásmido, la supervivencia de los animales fue alta, mostrando correlación con el bajo desarrollo tumoral observado. El grupo nebulizado con el plásmido y el CpG-2395 a las 48 h tuvo una supervivencia del 100% a los 45 días, cuando finalizó el experimento (Figura 24).

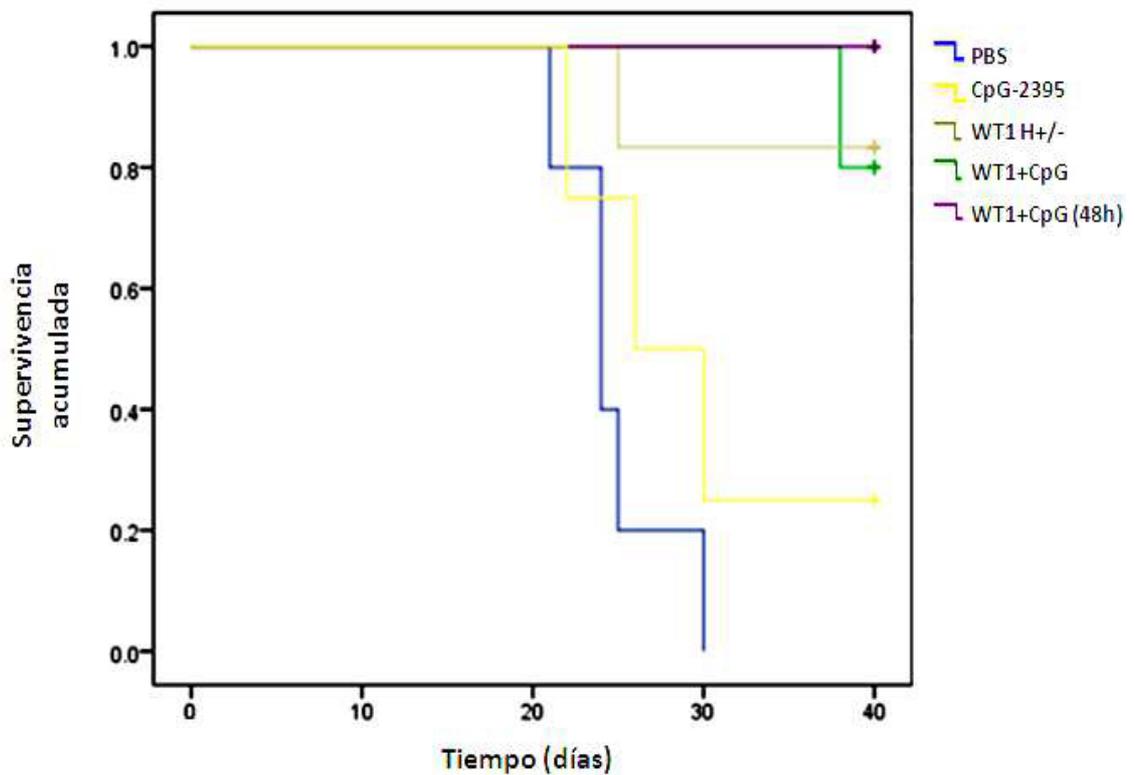


Figura 24. Gráfico de supervivencia de ratones tratados con WT1 (H+/-) y CpG-2395. El análisis de los datos se realizó mediante el estimador no paramétrico de Kaplan-Meier, en el programa SPSS Statistics versión 20.

8. DISCUSIÓN

El cáncer representa un serio problema de salud pública, la Organización Mundial de la Salud estima que para el año 2030, habrá en el mundo 26 millones de nuevos casos y 17 millones de muertes por año (Boyle and Levin, 2008). Las modalidades actuales de tratamiento, incluyendo la radio y la quimioterapia, aunque en algunos casos muestran efectividad en la clínica, no tienen un impacto significativo en la sobrevivencia y debido a su inespecificidad, resultan muy tóxicas para los pacientes. Aunado a ello, muchos tumores poseen una resistencia intrínseca a estas terapias convencionales. Es por ello que los nuevos enfoques terapéuticos, incluyendo a la vacunación contra antígenos tumorales, representan una opción prometedora para el tratamiento del cáncer. Además de ser una terapia más específica y menos tóxica, que ha demostrado su efectividad en diversos modelos preclínicos y en estudios clínicos, la vacunación en cáncer presenta la ventaja de inducir memoria inmunológica, lo que puede evitar la recurrencia de la enfermedad (Magee et al., 2013). Para el diseño de protocolos de vacunación exitosos, se requiere la elección de los mejores antígenos y adyuvantes, con especial atención en la dosis y el número de inmunizaciones, así como la vía de administración a utilizar (Guo et al., 2013).

El propósito de este trabajo fue evaluar la efectividad de la vacunación contra WT1 más ODN-CpG administrados por aerosol, sobre el crecimiento de tumores pulmonares y subcutáneos. La proteína WT1 es un factor de transcripción tipo dedos de zinc, que ha sido blanco de una extensa investigación en cáncer, donde se ha observado que tiene un importante rol oncogénico. Además se ha demostrado la presencia de anticuerpos específicos para WT1 en pacientes con cáncer, lo que demuestra su inmunogenicidad (Nicolì et al., 2008; Wu et al., 2005). En el 2009, el Instituto Nacional del Cáncer en los Estados Unidos, propuso un proyecto piloto de priorización de antígenos tumorales, con base de criterios objetivos predefinidos y preponderados; los resultados del proyecto colocaron a WT1 en el primer lugar del listado, convirtiéndolo en el antígeno tumoral más importante para el desarrollo de inmunoterapias en cáncer (Cheever et al., 2009). La efectividad de la vacunación contra WT1 ha sido comprobada en varias decenas de ensayos clínicos, mediante la administración de péptidos sintéticos cortos, que

corresponden a epítopes inmunogénicos de WT1, los resultados obtenidos han permitido determinar la seguridad y tolerabilidad de la terapia, con respuestas clínicas e inmunológicas significativas (Stasi et al., 2015; Kawakami et al., 2007). Un hecho relevante es que a pesar de la expresión de WT1 en tejidos normales, no hay reportes que indiquen la presencia de reacciones autoinmunes en ratones o en humanos, luego de recibir inmunoterapia específica (Van Driessche et al., 2012).

Los ODN-CpG fueron seleccionados como adyuvantes en este trabajo, debido a que han sido evaluados en diversas enfermedades inmunológicas e infecciosas, así como en cáncer, donde se ha demostrado su eficacia en combinación con quimioterapia (Manegold et. al, 2008) y otras terapias incluyendo anticuerpos, agentes antiangiogénicos, radioterapia y crioterapia (Vollmer et. al, 2009). Además, un estudio clínico reciente mostró la efectividad y seguridad de ODN-CpG como adyuvantes en la vacunación contra WT1 en pacientes con cáncer de pulmón, páncreas, ovario, sarcoma y papilar (Ohno et. al, 2012). En modelos preclínicos, se ha demostrado la eficacia antitumoral de ODN-CpG usados como monoterapia (Yao et al., 2009).

La vía de administración de las vacunas representa un aspecto crítico para la inducción de una buena respuesta inmune. En este trabajo se propuso la administración pulmonar, la cual ha sido poco explorada para la entrega de vacunas en cáncer, sin embargo su eficacia es fuertemente respaldada por estudios clínicos previos, donde se ha demostrado que la administración pulmonar de antígenos inmunogénicos, propicia el desarrollo de una respuesta inmune celular específica (Tavel, J. et al., 2007), además se ha observado que la inmunidad provista no solo es loco-regional, sino sistémica (Bivas-Benita et al., 2010).

La primera parte de este trabajo se centró en la evaluación de la capacidad adyuvante de los ODN-CpG. El análisis de las poblaciones de células inmunológicas infiltradas en los pulmones en respuesta a la nebulización con ambos ODN-CpG, en comparación con el control, mostraron una disminución en el número de linfocitos B (CD19+ o CD20+) y T (CD3+) infiltrados en el tejido pulmonar, además una falta de activación de macrófagos o células dendríticas, indicado por la ausencia del marcador CD80+. Norton et. al evaluaron la capacidad inmunomoduladora de los ODN-CpG via intranasal, y en 24h observaron un aumento en el número de linfocitos, neutrófilos y macrófagos en

fluido BAL (Norton et al., 2010), esto podría explicar la disminución en el número de linfocitos B y T en el tejido pulmonar observada en nuestros resultados, mientras que la maduración de CPA podría requerir de la administración repetida de ODN-CpG (Sfondrini et al., 2013). Sin embargo el mecanismo por el cual los ODN-CpG conducen a la activación de macrófagos alveolares y DCs en el pulmón no está claro, desde que se ha reportado la baja o nula expresión de TLR9 en esas poblaciones celulares en murinos (Suzuki et al., 2005; Chen et al., 2006). Interesantemente el CpG-2395 indujo el reclutamiento de células NK activadas (CD69+), esto en concordancia con Pesce et al., quienes reportaron que los ODN-CpG promueven el reclutamiento selectivo de pDCs en tejido pulmonar y de DCs convencionales y NK en tejido pulmonar como en el espacio bronquioalveolar y además inducen la activación de células NK, DCs y células T en el tejido pulmonar (Pesce et al., 2010). La capacidad del CpG-2395 para inducir la activación significativa de células NK, podría ser de especial interés en la terapia del cáncer pulmonar, donde la eliminación de células en las fases iniciales depende en gran medida de los mecanismos de la inmunidad innata.

Los resultados de la concentración de citocinas en suero, en comparación al control, mostraron que el CpG-1826 indujo un aumento significativo en IL-4, IL-10 e IFN- γ , mientras el CpG-2395 disminuyó los niveles de IL-6 e IL-10. Estos resultados son difíciles de extrapolar a otros estudios, dado que el análisis de las citocinas por la administración pulmonar de ODN-CpG es realizado en fluido BAL más que en plasma o suero. No obstante, los resultados obtenidos con el ampliamente usado CpG-1826, son similares a lo reportado por Norton et al. en fluido BAL, con un incremento en la concentración de IL-4, IL-10 e INF- γ , sin cambios en los niveles de IL-17, además observaron un aumento en los niveles de IL-6, IL-1 α , KC, MCP-1 y RANTES (Norton et al., 2010). En plasma de ratones, se ha reportado un aumento significativo en la concentración de IL-1 β , IL-6 e IL-12p40 y otras citocinas, a las 24h de la administración intratraqueal de ODN-CpG (clase B) (Tasaka et al., 2009). En general, nuestros resultados sugieren un patrón diferencial de modulación de citocinas para los CpG-1826 y el CpG-2395, lo cual sugiere que la elección del ODN-CpG para su administración pulmonar, deberá depender del contexto de su aplicación. Por ejemplo, la modulación diferencial de IL-10 podría plantear un escenario, en el cual la generación de células T

reguladoras podría ser inducida por el CpG-1826, con el efecto opuesto del CpG-2395, lo que tendría un gran impacto en las terapias anti-cáncer. Se requieren estudios adicionales para elucidar si las citocinas presentes en muestras de suero o plasma son un reflejo de la producción de citocinas en el pulmón o si en cambio los ODN-CpG son capaces de alcanzar la circulación, como ha sido demostrado para múltiples drogas y moléculas (Patton and Byron, 2007), afectando diferencialmente la producción de citocinas. En todo caso, la mayor comprensión del efecto de la administración pulmonar de dosis seguras de ODN-CpG, en el patrón y nivel de citocinas producidas local y sistémicamente, permitirá una mejor elección de la terapia, en patologías loco-regionales y sistémicas.

Posteriormente se evaluó la toxicidad de los ODN-CpG administrados a nivel pulmonar, mediante el análisis histológico de los pulmones de ratones nebulizados con una dosis terapéutica de 30 μg de los ODN-CpG (Cerkovnik et al., 2013). Los resultados mostraron diversas alteraciones en el tejido pulmonar, incluyendo hiperplasia epitelial y submucosa, engrosamiento de sacos alveolares, e infiltrado inflamatorio. Este resultado concuerda parcialmente con el estudio de Tasaka et. al, quienes observaron que los ODN-CpG administrados intratraquealmente inducen daño en los pulmones, con engrosamiento de sacos alveolares, además de áreas de hemorragia e incremento en la permeabilidad pulmonar (Tasaka et al., 2009). En contraparte, otros estudios reportan cambios histológicos mínimos en el tejido pulmonar tras 24h de la administración intranasal de ODN-CpG (Norton et al., 2010) y ausencia de cambios en la estructura pulmonar, luego de la administración repetida de ODN-CpG (Sfondrini et al., 2013). A pesar de que el tratamiento con ODN-CpG provocó alteraciones histológicas en los pulmones, los animales mostraron una apariencia saludable hasta el momento del sacrificio, en contraste con otros, donde se ha reportado una rápida aparición de síntomas asociados a sepsis, incluyendo erizamiento de pelo, exudado ocular y letargia (Knuefermann et al., 2007). Los cambios histopatológicos observados en este trabajo podrían estar relacionados con la dosis de ODN-CpG y con la eficiencia del sistema de administración utilizado. Es necesario realizar estudios de dosis-respuesta para evaluar la dosis mínima inmunomodulatoria de los ODN-CpG y la posibilidad de minimizar las alteraciones en el tejido pulmonar.

Con los datos de la infiltración de células del sistema inmune en tejido pulmonar, la modulación de citocinas en suero y el análisis histológico de los pulmones de ratones nebulizados, los resultados sugieren que los ODN-CpG tienen la capacidad de modular la respuesta inmune local y sistémicamente. Esto brinda un mayor panorama para el entendimiento del potencial inmunomodulador de los CpG-ODN administrados por vía pulmonar, así como los posibles riesgos asociados a su uso terapéutico.

En otros experimentos, se analizó la expresión de WT1 en células B16F10 y L5178Y-R. Se encontró una alta expresión de WT1 en ambas líneas celulares, tomando como referencia a la línea leucémica humana K562. La expresión de WT1 en células de melanoma B16F10 fue reportada previamente en nuestro laboratorio, demostrando que la expresión de WT1 es esencial para la viabilidad de esta línea celular (Zamora et al., 2007). Aunque la expresión de WT1 en células L5178Y-R no ha sido reportada previamente en la literatura, creemos que su expresión podría ser esencial para la viabilidad, al igual que ha sido demostrado para otras líneas celulares tumorales de origen hematopoyético (Glienke et al., 2007). Con los resultados indicando una alta expresión de WT1 en células B16F10 y L5178Y-R, y los antecedentes del rol esencial que tiene en muchas líneas celulares, se asumió que la disminución de WT1 como un mecanismo de evasión del sistema inmune es poco probable y por lo tanto ambas líneas celulares fueron usadas para establecer los modelos tumorales y probar la efectividad de la vacunación contra WT1 *in vivo*.

También se evaluó la funcionalidad y especificidad del plásmido codificante de WT1 y los péptidos sintéticos de 9 mer y 16 mer, para validar su uso como vacunas en este trabajo. Se observó una expresión exógena de WT1 7 veces mayor en células B16F10 transfectadas con el plásmido, con respecto a células sin transfectar; además se detectó la presencia de anticuerpos anti-WT1 en suero ratones BALB/c inmunizados con el plásmido. En trabajos previos, se ha demostrado la capacidad del plásmido para producir la proteína antigénica, como un paso obligatorio para su administración como vacuna de DNA (Ren et al., 2004), también se ha demostrado que una sola inmunización con plásmido puede inducir la producción de anticuerpos específicos en ratones (Kasinrerk et al., 2002). Por otro lado, la especificidad de los péptidos fue demostrada a través de la producción de IFN- γ en co-cultivos de linfocitos de bazo (de ratones previamente

inmunizados) y células B16F10. En un estudio previo, usando el péptido 9 mer en combinación con IL-2, IL-15, IL-21, e IL-15/21, se generaron linfocitos T CD8+ específicos para WT1, con efecto citotóxico contra la línea MCF-7 (Olguín, 2012). En conjunto, nuestros resultados que demuestran la capacidad del plásmido para expresar altos niveles de WT1 y su capacidad inmunogénica *in vivo*, así como con las evidencias sobre la inmunogenicidad y especificidad de los péptidos derivados de WT1, validan su uso como vacunas en esta investigación.

Una vez que se confirmó la capacidad inmunomoduladora de los ODN-CpG y la factibilidad del empleo del plásmido y los péptidos sintéticos como vacunas de WT1, se inició con los modelos de vacunación *in vivo*. Primeramente se trabajó con el modelo de cáncer pulmonar en ratones C57BL/6 (Zamora-Avila et al., 2009), para ello se realizó la inoculación de las células B16F10 y al tercer día se inició con el esquema de inmunizaciones, hasta completar 3 tratamientos con espacio de 5 días; el análisis número y tamaño de focos tumorales no mostró diferencias entre los grupos nebulizados con DNA o péptidos de WT1, ODN-CpG o su combinación, con respecto al grupo control, y tampoco se observaron diferencias en el peso de los pulmones ni en la sobrevivencia de los ratones. Nuestros resultados concuerdan con las observaciones de Sfondrini et al., quienes usaron el mismo modelo de cáncer pulmonar para probar la efectividad antitumoral del CpG-1826, administrado como monoterapia en aerosol. El CpG tuvo la capacidad de activar una respuesta inmune local, indicada por la producción de IL-12p40, IFN- γ e IL-1 β y el reclutamiento y maduración de células dendríticas en lavado BAL (Sfondrini et al, 2013). Sin embargo no hubo una reducción en el número de metástasis pulmonares, lo cual fue atribuido a la presencia de macrófagos M2 inmunosupresores en los tumores B16F10 implantados en el pulmón. Interesantemente, la administración intraperitoneal del CpG si tuvo efecto sobre las metástasis pulmonares, lo que mostró correlación con la expansión de células NK, no observado con la nebulización (Sfondrini et al, 2013). Adicionalmente ha sido observada una disminución en la expresión de las proteínas transportadoras asociados al procesamiento de antígeno TAP1 y TAP2 en células B16F10, lo que se ha asociado a una ausencia de procesamiento de antígenos asociados a tumor, baja expresión de moléculas de MHC clase I en la superficie celular y por ende una baja inmunogenicidad (Zhang et al., 2007).

En conclusión, la ausencia de un efecto antitumoral por la vacunación, el adyuvante o la combinación en el modelo pulmonar observado en nuestro trabajo, podría deberse a la baja inmunogenicidad de la línea celular B16F10, en conjunto con el ambiente inmunosupresivo inducido por el tumor. Por esa razón, se decidió no continuar con el modelo de tumor B16F10 subcutáneo.

Para cumplir con el siguiente objetivo del proyecto, se implementó el modelo de linfoma subcutáneo, con células L5178Y-R. Al igual que en el modelo de tumor pulmonar, el esquema de inmunizaciones inició tres días después de la inoculación de las células, en total se realizaron 3 nebulizaciones de los péptidos 9 mer/16 mer, ODN-CpG y la combinación, con espacio de 3 días. A partir del día 6 post-inoculación de las células, los tumores fueron evidentes en la mayoría de los grupos. En todos los grupos inmunizados con los péptidos y/o ODN-CpG, se observó un incremento mínimo del volumen tumoral y una regresión tumoral posterior, mientras que en el grupo control (PBS) el crecimiento tumoral fue paulatino, hasta alcanzar el máximo alrededor del día 27. Paradójicamente el grupo que recibió la combinación de los dos péptidos más el ODN-CpG tuvo un comportamiento similar al grupo control, con un volumen tumoral significativamente mayor al resto de los grupos. Los datos del volumen tumoral tuvieron correlación con la supervivencia, al registrarse decesos de animales únicamente en el grupo control y en el que recibió la combinación de los péptidos más el ODN-CpG, a partir del día 18, mientras que en el resto de los grupos los ratones sobrevivieron hasta el día 43, cuando se decidió concluir el experimento. El efecto antitumoral observado en la mayoría de los grupos, se respalda con el éxito obtenido con el tratamiento único con ODN-CpG en modelos preclínicos (Yao et al., 2009), así como en estudios clínicos con vacunas basadas en péptidos sintéticos de WT1 (Stasi et al., 2015; Kawakami et al., 2007), y más aun con los resultados que confirman la efectividad de la combinación de péptidos de WT1 y ODN-CpG, en pacientes con cáncer de pulmón, páncreas, ovario, sarcoma y papilar (Ohno et. al, 2012). Por otra parte, se ha observado un escape inmunológico en algunos pacientes con leucemia mieloide aguda tratados con vacunas de péptidos de WT1, ni de la disminución en la expresión de moléculas del MHC de clase I se ha demostrado que este resultado no depende de mutaciones específicas o pérdida de expresión de WT1 (Busse et al., 2011). Para explicar esto, se han propuesto

varias hipótesis, incluyendo la inducción de tolerancia de células T provocada por la inmunización con péptidos cortos (Toes et al., 1996). Más recientemente se ha demostrado que ciertas combinaciones y dosis de adyuvantes podrían tener efectos detrimentales en la activación de células T específicas, al grado de inducir eventos de delección o anergia (Kuball et al., 2011). Una manera sencilla y eficaz de demostrar la inducción de una respuesta inmune celular específica de antígeno se basa en la realización de pruebas de hipersensibilidad retardada, en ensayos clínicos de remisiones tumorales por vacunación contra WT1, en muchos casos se han observado reacciones positivas en la piel, asociadas a la activación del sistema inmune post-vacunación (Van Tendeloo et al., 2010; Maslak et al., 2010). En nuestro trabajo, realizamos pruebas de hipersensibilidad en dos ratones del grupo que recibió la combinación de los péptidos más el ODN-CpG y que sobrevivieron casi al final del experimento, en ambos casos se obtuvo una reactividad negativa, lo que sugiere la posible inducción de mecanismos de delección, anergia o tolerancia inmunológica en ese grupo.

Finalmente y tomando en consideración la efectividad antitumoral observada en el modelo terapéutico de linfoma subcutáneo, así como el efecto inesperado de la vacunación con los péptidos, se optó por evaluar si la vacunación con DNA contra WT1 era capaz de evitar la implantación de células L5178Y-R, para ello se formaron varios grupos que recibieron por única ocasión el plásmido, el ODN-CpG y la combinación. Siete días después se inocularon 4×10^6 células (el doble que en el modelo terapéutico). Luego de 7 días post-inoculación de las células, los tumores fueron evidentes en los grupos nebulizados con PBS (control) y ODN-CpG, mientras que en los grupos que recibieron el plásmido solo o en combinación con ODN-CpG, la aparición del tumor se retrasó hasta el día 14. Al día 21, el volumen tumoral de los grupos inmunizados fue significativamente menor, en comparación al grupo control. En el grupo ODN-CpG el volumen tumoral fue 60% menor, mientras que en los grupos que recibieron el plásmido solo o en combinación con el ODN-CpG, el volumen tumoral fue menor al control, en más de un 90%. Los resultados mostraron correlación con la sobrevivencia de los animales, excepto para el grupo tratado con el ODN-CpG, en el cual no hubo un impacto en este indicador. Los datos obtenidos en este trabajo coinciden con los obtenidos por Ren et al., quienes reportaron un efecto antitumoral en un modelo murino, a través de la

administración intramuscular de 50 µg de una vacuna de DNA y el posterior reto con células que expresaban un antígeno específico de cáncer de próstata (Ren et al., 2004). Destaca que la dosis empleada en este trabajo fue 5 veces menor, con una efectividad antitumoral superior a la observada en ese estudio, lo que podría explicarse en parte por el uso del polímero policationico PEI, como acarreador del plásmido. Estudios previos han demostrado que la PEI, que protege al DNA de la degradación durante la inmunización, proporciona mejores tasas de transfección (Densmore, 2000), lo que le confiere un efecto potenciador del efecto antitumoral de las vacunas de DNA en cáncer (Coll et al., 1999).

En su conjunto, los resultados de la vacunación contra WT1 usando ODN-CpG como adyuvantes, sugieren diferencias en la inmunogenicidad de los tumores B16F10 y L5178Y-R, y refuerzan las evidencias sobre la existencia de mecanismos de inmunosupresión inducidos por las células B16F10 en pulmón.

9. CONCLUSIONES

1. Los CpG 1826 y 2395 mostraron una disminución en el número de linfocitos B (CD19+ o CD20+) y T (CD3+) infiltrados en el tejido pulmonar, además una falta de activación de macrófagos o células dendríticas, indicado por la ausencia del marcador CD80+ (versus el grupo control).
2. El CpG-2395 indujo el reclutamiento de células NK activadas (CD69+) en tejido pulmonar, con respecto al grupo control.
3. El CpG-1826 indujo un aumento significativo en IL-4, IL-10 e IFN- γ , mientras el CpG-2395 disminuyó los niveles de IL-6 e IL-10 (en comparación al grupo control).
4. El análisis histológico de los pulmones evidenció alteraciones agudas significativas, con respecto al grupo control: para el CpG-1826 engrosamiento de sacos alveolares, congestión, enfisema e hiperplasia; para el CpG-2395 hiperplasia marcada, infiltrado inflamatorio y edema.
5. Se detectó una alta expresión de la proteína de WT1 en células B16F10 y L5178Y-R, con respecto a la línea celular leucémica humana K562.
6. Se observó una expresión exógena de WT1 siete veces mayor en células B16F10 transfectadas con el plásmido, con respecto a células sin transfectar; además se detectó la presencia de anticuerpos anti-WT1 en suero ratones BALB/c inmunizados con el plásmido.
7. Se demostró la especificidad de los péptidos 9 mer y 16 mer, a través de la producción de IFN- γ .
8. En el modelo de tumor pulmonar con células B16F10: no hubo diferencias en el número y tamaño de focos tumorales, en el peso de los pulmones ni en la sobrevivencia de los ratones, entre los grupos control y nebulizados con DNA o péptidos de WT1, ODN-CpG o su combinación.

9. En el modelo de linfoma subcutáneo:

- en los grupos CpG-2395, 9 mer, 16 mer, 9 mer+CpG y 9 mer+16 mer, se observó un incremento mínimo del volumen tumoral y una regresión tumoral posterior
- en los grupos control y 9 mer+16 mer+CpG el crecimiento tumoral fue significativamente mayor y tuvo correlación con la baja supervivencia observada.

10. En el modelo profiláctico de linfoma subcutáneo:

- en los grupos control y CpG-2395 la aparición del tumor ocurrió al día 7 y se retrasó hasta el día 14 para los grupos que recibieron el plásmido solo y en combinación con el CpG
- el volumen tumoral de los grupos inmunizados fue significativamente menor, en comparación al grupo control: CpG (60%), plásmido+CpG (> 90%)
- hubo una correlación entre el volumen tumoral y supervivencia de los animales, excepto para el grupo tratado con el CpG

LITERATURA CITADA

Aurisicchio L, Ciliberto G. 2012. Genetic cancer vaccines: current status and perspectives. *Expert opinion on biological therapy* 12: 1043-1058.

Banchereau J, Palucka AK. 2005. Dendritic cells as therapeutic vaccines against cancer. *Nature reviews. Immunology* 5: 296-306.

Barber GN. 2011. Cytoplasmic DNA innate immune pathways. *Immunological Reviews* 243: 99-108.

Berger M, Kreutz FT, Horst JL, Baldi AC, Koff WJ. 2007. Phase I study with an autologous tumor cell vaccine for locally advanced or metastatic prostate cancer. *Journal of Pharmacy & Pharmaceutical Sciences* 10: 144-152.

Binelfa LF, Salinas JC. 2005. Bases genéticas y moleculares del cáncer /1a. parte. *Gaceta Médica de Oncología* 4: 32-39.

Bivas-Benita M, Bar L, Gillard GO, Kaufman DR, Simmons NL, Hovav A, Letvin NL. 2010. Efficient generation of mucosal and systemic antigen-specific CD8+ T-cell responses following pulmonary DNA immunization. *Journal of Virology* 84: 5764-5774.

Boyle P, Levin BE (eds). 2008. *World Cancer Report, 2008* (World, Health Organization, International Agency for research on Cancer). Lyon: IARC Press. Disponible en: http://www.iarc.fr/en/publications/pdfs-online/wcr/2008/wcr_2008.pdf

Buonaguro L, Petrizzo A, Tornesello ML, Buonaguro FM. 2011. Translating tumor antigens into cancer vaccines. *Clinical and Vaccine Immunology* 18: 23-34.

Burnet M. 1957. Cancer: a biological approach. III. Viruses associated with neoplastic conditions. IV. Practical applications. *British Medical Journal* 1:841-847.

Busse A, Letsch A, Scheibenbogen C, Nonnenmacher A, Ochsenreither S, Thiel E, Keilholz U. 2010. Mutation or loss of Wilms' tumor gene 1 (WT1) are not major reasons for immune escape in patients with AML receiving WT1 peptide vaccination. *Journal of Translational Medicine* 8: 5.

Cerkovnik P, Novakovic BJ, Stegel V, Novakovic S. 2010. Tumor vaccine composed of C-class CpG oligodeoxynucleotides and irradiated tumor cells induces long-term antitumor immunity. *BMC Immunology* 11: 45.

Cheever MA, Allison JP, Ferris AS, Finn OJ, Hastings BM, Hecht TT, Mellman I, Prindiville SA, Viner JL, Weiner LM, Matrisian LM. 2009. The prioritization of cancer antigens: a national cancer institute pilot project for the acceleration of translational research. *Clinical Cancer Research* 15: 5323-5237.

Chen DS, Mellman I. 2013. Oncology meets immunology: the cancer-immunity cycle. *Immunity* 39: 1-10.

Chen L, Arora M, Yarlagadda M, Oriss TB, Krishnamoorthy N, Ray A, Ray P. 2006. Distinct responses of lung and spleen dendritic cells to the TLR9 agonist CpG oligodeoxynucleotide. *Journal of Immunology* 177: 2373-2383.

Coll J, Chollet P., Brambilla E, Desplanques D, Behr JP, Favrot M. 1999. In vivo delivery to tumors of DNA complexed with linear polyethyleneimine. *Human Gene Therapy* 10: 1659-1666.

Corthay A. 2014. Does the Immune System Naturally Protect Against Cancer?. *Frontiers in Immunology* 5: 197.

Densmore CL. 2000. Aerosol delivery of robust polyethyleneimine-DNA complexes for gene therapy and genetic immunization. *Molecular Therapy* 1: 180-188.

Duggan JM, You D, Cleaver JO, Larson DT, Garza RJ, Guzmán Pruneda FA, Tuvim MJ, Zhang J, Dickey BF, Evans SE. 2011. Synergistic Interactions of TLR2/6 and TLR9 Induce a High Level of Resistance to Lung Infection in Mice. *The Journal of Immunology* 186: 5916-5926.

Dunn GP, Bruce AT, Ikeda H, Old LJ, Schreiber RD. 2002. Cancer immunoediting: from immunosurveillance to tumor escape. *Nature Immunology* 3: 991-998.

Dunn GP, Old LJ, Schreiber RD. 2004. The three Es of cancer immunoediting. *Annual Review of Immunology* 22:329-360.

Ferlay J, Soerjomataram I, Ervik M, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M, Parkin DM, Forman D, Bray F. 2015. Cancer incidence and mortality worldwide: Sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *International Journal of Cancer* 136:E359-E386.

Glienke W, Maute L, Koehl U, Esser R, Milz E and Bergmann L. 2007. Effective treatment of leukemic cell lines with wt1 siRNA. *Leukemia* 21: 2164-2170.

Gogoi D, Chiplunkar SV. 2013. Targeting gamma delta T cells for cancer immunotherapy: bench to bedside. *The Indian Journal of Medical Research* 138: 755-761.

Gregory AD, Houghton AM. 2011. Tumor-associated neutrophils: new targets for cancer therapy. *Cancer Research* 71: 2411-2416.

Guo C, Manjili MH, Subjeck JR, Sarkar D, Fisher PB, Wang XY. 2013. Therapeutic Cancer Vaccines: Past, Present and Future. *Advances in Cancer Research* 119: 421-475.

Haber DA, Sohn RL, Buckler AJ, Pelletier J, Call KM, Housman DE. 1991. Alternative splicing and genomic structure of the Wilms tumor gene WT1. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 88: 9618-9622.

Hanahan D, Weinberg RA. 2000. The hallmarks of cancer. *Cell* 100: 57-70.

Hanahan D, Weinberg RA. 2011. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 144: 646-674.

Hartmann G, Battiany J, Poeck H, Wagner M, Kerkmann M, Lubenow N, Rothenfusser S, Endres S. 2003. Rational design of new CpG oligonucleotides that combine B cell activation with high IFN- α induction in plasmacytoid dendritic cells. *J Clin Invest* 113: 1633-1641.

Hill J, Eyles JE, Elvin SJ, Healey GD, Lukaszewski RA, Titball RW. 2006. Administration of antibody to the lung protects mice against pneumonic plague. *Infection and Immunity* 74: 3068-3070.

Kantoff PW, Higano CS, Shore ND, Berger ER, Small EJ, Penson DF, Redfern CH, Ferrari AC, Dreicer R, Sims RB, Xu Y, Frohlich MW, Schellhammer PF. 2010. Sipuleucel-T immunotherapy for castration-resistant prostate cancer. *The New England journal of medicine* 363: 411-422.

Kasinrek W, Moonsom S, Chawansuntati K. Production of antibodies by single DNA immunization: comparison of various immunization routes. *Hybrid Hybridomics* 21: 287-293.

Kawakami M, Oka Y, Tsuboi A, Harada Y, Elisseeva OA, Furukawa Y, Tsukaguchi M, Shirakata T, Nishida S, Nakajima H, Morita S, Sakamoto J, Kawase I, Oji Y, Sugiyama H. 2007. Clinical and immunologic responses to very low-dose vaccination with WT1 peptide (5 microg/body) in a patient with chronic myelomonocytic leukemia. *International Journal of Hematology* 85: 426-429.

Kilkenny C, Browne WJ, Cuthill IC, Emerson M, Altman DG. 2010. Improving Bioscience Research Reporting: The ARRIVE Guidelines for Reporting Animal Research. *PLoS Biology* 8: e1000412.

Knuefermann P, Baumgarten G, Koch A, Schwederski M, Velten M, Ehrentraut H, Mersmann J, Meyer R, Hoefft A, Zacharowski K, Grohé C. 2007. CpG oligonucleotide activates Toll-like receptor 9 and causes lung inflammation in vivo. *Respiratory Research* 8: 72.

Koshkina NV, Kleinerman ES. 2005. Aerosol gemcitabine inhibits the growth of primary osteosarcoma and osteosarcoma lung metastases. *International Journal of Cancer*. 116: 458-463.

Krieg AM. 2006. Therapeutic potential of Toll-like receptor 9 activation. *Nature Reviews Drug Discovery* 5: 471.

Kuball J, de Boer K, Wagner E, Wattad M, Antunes E, Weeratna RD, Vicari AP, Lotz C, van Dorp S, Hol S, Greenberg PD, Heit W, Davis HL, Theobald M. 2011. Pitfalls of vaccinations with WT1-, Proteinase3- and MUC1-derived peptides in combination with MontanideISA51 and CpG7909. *Cancer Immunology, Immunotherapy* 60: 161-171.

- Kutzler MA, Weiner DB. 2008. DNA vaccines: ready for prime time?. *Nature Reviews. Genetics* 9: 776-788.
- Lee SB, Heaver DA. 2001. Wilms tumor and the wt1 gene. *Experimental Cell Research* 264: 74-99.
- Liu MA, Ulmer JB. 2005. Human clinical trials of plasmid DNA vaccines. *Advances in Genetics* 55: 25-40.
- Liu MA. 2011. DNA vaccines: an historical perspective and view to the future. *Immunological Reviews* 239: 62-84.
- Longo DL. 2010. New therapies for castration-resistant prostate cancer. *The New England journal of medicine* 363: 479-481.
- Low N, Bavdekar A, Jeyaseelan L, Hirve S, Ramanathan K, Andrews NJ, Shaikh N, Jadi RS, Rajagopal A, Brown KE, Brown D, Fink JB, John O, Scott P, Riveros-Balta AX, Greco M, Dhare R, Kulkarni PS, Henao Restrepo AM. 2015. A randomized, controlled trial of an aerosolized vaccine against measles. *The New England Journal of Medicine* 372: 1519-1529.
- Magee MS, Snook AE, Marszalowicz GP, Waldman SA. 2013. Immunotherapeutic strategies to target prognostic and predictive markers of cancer. *Biomarkers in Medicine* 7: 23-35.
- Manegold C, Gravenor D, Woytowicz D, Mezger J, Hirsh V, Albert G, Al-Adhami M, Readett D, Krieg AM, Leichman CG. 2008. Randomized phase II trial of a toll-like receptor 9 agonist oligodeoxynucleotide, PF-3512676, in combination with first-line taxane plus platinum chemotherapy for advanced-stage non-small-cell lung cancer. *Journal of Clinical Oncology* 26: 3979-3986.
- Mantovani A, Allavena P, Sica A, Balkwill F. 2008. Cancer-related inflammation. *Nature* 454: 436-444.
- Martin TR, Frevert CW. 2005. Innate Immunity in the Lungs. *Proceedings of the American Thoracic Society* 2: 403-411.

Maslak PG, Dao T, Krug LM, Chanel S, Korontsvit T, Zakhaleva V, Zhang R, Wolchok JD, Yuan J, Pinilla-Ibarz J, Berman E, Weiss M, Jurcic J, Frattini MG, Scheinberg DA. 2010. Vaccination with synthetic analog peptides derived from WT1 oncoprotein induces T-cell responses in patients with complete remission from acute myeloid leukemia. *Blood* 116:171-179.

Mogensen TH. 2009. Pathogen Recognition and Inflammatory Signaling in Innate Immune Defenses. *Clinical Microbiology Reviews* 22: 240-273.

Morton DL, Hsueh EC, Essner R, Foshag LJ, O'Day SJ, Bilchik A, Gupta RK, Hoon DS, Ravindranath M, Nizze JA, Gammon G, Wanek LA, Wang HJ, Elashoff RM. 2002. Prolonged survival of patients receiving active immunotherapy with Canvaxin therapeutic polyvalent vaccine after complete resection of melanoma metastatic to regional lymph nodes. *Annals of Surgery* 236: 438-448.

Nakatsuka S, Oji Y, Horiuchi T, Kanda T, Kitagawa M, Takeuchi T, Kawano K, Kuwae Y, Yamauchi A, Okumura M, Kitamura Y, Oka Y, Kawase I, Sugiyama H, Aozasa K. 2006. Immunohistochemical detection of WT1 protein in a variety of cancer cells. *Modern Pathology* 19: 804-814.

Nicoli P, Defilippi I, Carturan S, Roetto A, Messa F, Arruga F, Messa E, Rotolo A, Iacobucci I, Bracco E, Saglio G, Cilloni D. 2008. Detection of humoral immune responses against WT1 antigen in patients affected by different hematological malignancies. *Acta Haematologica* 120: 47-50.

Norton EB, Clements JD, Voss TG, Cárdenas-Freytag L. 2010. Prophylactic administration of bacterially derived immunomodulators improves the outcome of influenza virus infection in a murine model. *Journal of Virology* 84: 2983-2995.

Ohminami H, Yasukawa M, Fujita S. 2000. HLA class I-restricted lysis of leukemia cells by a CD8(+) cytotoxic T-lymphocyte clone specific for WT1 peptide. *Blood* 95: 286-293.

Ohno S, Okuyama R, Aruga A, Sugiyama H, Yamamoto M. 2012. Phase I trial of Wilms' tumor 1 (WT1) peptide vaccine with GM-CSF or CpG in patients with solid malignancy. *Anticancer Research* 32: 2263-2269.

Oka Y, Elisseeva OA, Tsuboi A, Ogawa H, Tamaki H, Li H, Oji Y, Kim EH, Soma T, Asada M, Ueda K, Maruya E, Saji H, Kishimoto T, Udaka K, Sugiyama H. 2000. Human cytotoxic T-lymphocyte responses specific for peptides of the wild-type Wilms' tumor gene (WT1) product. *Immunogenetics* 51: 99-107.

Olguín-Contreras LF. 2012. Actividad citotóxica de linfocitos T CD8+estimulados con interleucina 15 y 21 contra la línea tumoral de cáncer de mama MCF-7 in vitro (tesis de Maestría en Ciencias con acentuación en Inmunobiología). Universidad Autónoma de Nuevo León.

Palucka K, Banchereau J. 2012. Cancer immunotherapy via dendritic cells. *Nature Reviews Cancer* 12: 265-277, 2012.

Panda AK, Bose S, Chakraborty S, Kajal K , Sa G. 2015. Intratumoral immune landscape: immunogenicity to tolerogenicity. *Austin Journal of Clinical Immunology* 2: 1025.

Patton JS, Byron PR. 2007. Inhaling medicines: delivering drugs to the body through the lungs. *Nature Reviews Drug Discovery* 6: 67-74.

Pesce I, Monaci E, Muzzi A, Tritto E, Tavarini S, Nuti S, De Gregorio E, Wack A. 2010. Intranasal administration of CpG induces a rapid and transient cytokine response followed by dendritic and natural killer cell activation and recruitment in the mouse lung. *Journal of Innate Immunity* 2: 144-159.

Pinho SS, Reis CA. 2015. Glycosylation in cancer: mechanisms and clinical implications. *Nature Reviews Cancer* 15: 540-555.

Pio R, Corrales L, Lambris JD. 2014. The role of complement in tumor growth. *Advances in Experimental Medicine and Biology* 772: 229-262.

Ren J, Zheng L, Chen Q, Li H, Zhang L, Hongguang Zhu. 2004. Co-administration of a DNA vaccine encoding the prostate specific membrane antigen and CpG oligodeoxynucleotides suppresses tumor growth. *Journal of Translational Medicine* 2:29.

Ribas A, Weber JS, Chmielowski B, Comin-Anduix B, Lu D, Douek M, Ragavendra N, Raman S, Seja E, Rosario D, Miles S, Diamond DC, Qiu Z, Obrocea M, Bot A. 2011. Intra-lymph node prime-boost vaccination against Melan A and tyrosinase for the treatment of metastatic melanoma: results of a phase 1 clinical trial. *Clinical cancer research* 17: 2987-2996.

Rosenfeld C, Cheever MA, Gaiger A. 2003. WT1 in acute leukemia, chronic myelogenous leukemia and myelodysplastic syndrome: therapeutic potential of WT1 targeted therapies. *Leukemia* 17: 1301-1312.

Sathyanarayanan V, Neelapu SS. 2015. Cancer Immunotherapy: Strategies for personalization and combinatorial approaches. *Molecular Oncology* 9: 2043-2053.

Scharnhorst V, Dekker P, Van der Eb AJ, Jochemsen AG. 1999. Internal Translation Initiation Generates Novel WT1 Protein Isoforms with Distinct Biological Properties. *The Journal of Biological Chemistry* 274 :23456-23462.

Scholz H, Kirschner KM. 2005. A Role for the Wilms' Tumor Protein WT1 in Organ Development. *Physiology* 20: 54-59.

Schuster SJ, Neelapu SS, Gause BL, Janik JE, Muggia FM, Gockerman JP, Winter JN, Flowers CR, Nikcevich DA, Sotomayor EM, McGaughey DS, Jaffe ES, Chong EA, Reynolds CW, Berry DA, Santos CF, Popa MA, McCord AM, Kwak LW. 2011. Vaccination with patient-specific tumor-derived antigen in first remission improves disease-free survival in follicular lymphoma. *Journal of Clinical Oncology* 29: 2787-2794.

Schwartzentruber DJ, Lawson DH, Richards JM, Conry RM, Miller DM, Treisman J, Gailani F, Riley L, Conlon K, Pockaj B, Kendra KL, White RL, Gonzalez R, Kuzel TM, Curti B, Leming PD, Whitman ED, Balkissoon J, Reintgen DS, Kaufman H, Marincola

FM, Merino MJ, Rosenberg SA, Choyke P, Vena D, Hwu P. 2011. gp100 peptide vaccine and interleukin-2 in patients with advanced melanoma. *The New England journal of medicine* 364:2119-2127.

Sfondrini L, Sommariva M, Tortoreto M, Meini A, Piconese S, Calvaruso M, Van Rooijen N, Bonecchi R, Zaffaroni N, Colombo MP, Tagliabue E, Balsari A. 2013. Anti-tumor activity of CpG-ODN aerosol in mouse lung metastases. *International Journal of Cancer* 133: 383-393.

Sharpe AH. 2009. Mechanisms of costimulation. *Immunological Reviews* 229: 5-11.

Spurrell EL, Lockley M. 2014. Adaptive immunity in cancer immunology and therapeutics. *Ecancermedicalsecience* 8: 441.

Stasi AD, Jimenez AM, Minagawa K, Al.Obaidi M, Rezvani K. 2015. Review of the results of WT1 peptide vaccination strategies for myelodysplastic syndromes and acute myeloid leukemia from nine different studies. *Frontiers in Immunology* 6: 36.

Stratford R, Douce G, Zhang-Barber L, Fairweather N, Eskola J, Dougan G. 2000. Influence of codon usage on the immunogenicity of a DNA vaccine against tetanus. *Vaccine* 19: 810-815.

Suzuki K, Suda T, Naito T, Ide K, Chida K, Nakamura H. 2005. Impaired toll-like receptor 9 expression in alveolar macrophages with no sensitivity to CpG DNA. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 171: 707-713.

Tasaka S, Kamata H, Miyamoto K, Nakano Y, Shinoda H, Kimizuka Y, Fujiwara H, Hasegawa N, Fujishima S, Miyasho T, Ishizaka A. 2009. Intratracheal synthetic CpG oligodeoxynucleotide causes acute lung injury with systemic inflammatory response. *Respiratory Research* 10: 84.

Tavel JA, Martin JE, Kelly GG, Enama ME, Shen, JM, Gomez PL, Andrews CA, Koup RA, Bailer RT, Stein JA. 2007. Safety and immunogenicity of a Gag-Pol candidate HIV-1 DNA vaccine administered by a needle-free device in HIV-1-seronegative subjects. *Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes* 44: 601-605.

Tcherepanova IY, Adams MD, Feng X, Hinohara A, Horvatinovich J, Calderhead D, Healey D, Nicolette CA. 2008. Ectopic expression of a truncated CD40L protein from synthetic posttranscriptionally capped RNA in dendritic cells induces high levels of IL-12 secretion. *BMC Molecular Biology* 9: 90.

Temizoz B, Kuroda E, Ishii KJ. 2016. Vaccine adjuvants as potential cancer immunotherapeutics. *International Immunology* 28: 329-338.

Terabe M, Berzofsky JA. 2008. The role of NKT cells in tumor immunity. *Advances in Cancer Research* 101: 277-348.

Toes RE, Offringa R, Blom RJ, Melief CJ, Kast WM .1996. Peptide vaccination can lead to enhanced tumor growth through specific T-cell tolerance induction. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 93:7855-7860.

van der Bruggen P, Traversari C, Chomez P, Lurquin C, De Plaen E, Van den Eynde B, Knuth A, Boon T. 1991. A gene encoding an antigen recognized by cytolytic T lymphocytes on a human melanoma. *Science* 254: 1643-1647.

Van Driessche A, Berneman ZN, Van Tendeloo VFI. 2012. Active Specific Immunotherapy Targeting the Wilms' Tumor Protein 1 (WT1) for Patients with Hematological Malignancies and Solid Tumors: Lessons from Early Clinical Trials. *The Oncologist* 17: 250-259.

Van Tendeloo VF, Van de Velde A, Van Driessche A, Cools N, Anguille S, Ladell K, Gostick E, Vermeulen K, Pieters K, Nijs G, Stein B, Smits EL, Schroyens WA, Gadisseur AP, Vrelust I, Jorens PG, Goossens H, de Vries IJ, Price DA, Oji Y, Oka Y, Sugiyama H, Berneman ZN. 2010. Induction of complete and molecular remissions in acute myeloid leukemia by Wilms' tumor 1 antigen-targeted dendritic cell vaccination. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 107:13824-13829.

Vollmer J, Krieg AM. 2009. Immunotherapeutic applications of CpG oligodeoxynucleotide TLR9 agonists. *Advanced Drug Delivery Reviews* 61: 195-204.

- Vollmer J, Weeratna R, Payette P, Jurk M, Schetter C, Laucht M, Wader T, Tluk S, Liu M, Davis HL, Krieg AM. 2004. Characterization of Three CpG oligodeoxynucleotide classes with distinct immunostimulatory activities. *European Journal of Immunology* 34: 251-262.
- Wagner KD, Wagner N, Schedl A. 2003. The complex life of WT1. *Journal of Cell Science* 116: 1653-1658.
- Waldhauer I, Steinle A. 2008. NK cells and cancer immunosurveillance. *Oncogene* 27: 5932-5943.
- Wu F, Oka Y, Tsuboi A, Elisseeva OA, Ogata K, Nakajima H, Fujiki F, Masuda T, Murakami M, Yoshihara S, Ikegame K, Hosen N, Kawakami M, Nakagawa M, Kubota T, Soma T, Yamagami T, Tsukaguchi M, Ogawa H, Oji Y, Hamaoka T, Kawase I, Sugiyama H. 2005. Th1-biased humoral immune responses against Wilms tumor gene WT1 product in the patients with hematopoietic malignancies. *Leukemia* 19: 268-274.
- Xiang R, Luo Y, Niethammer AG, Reisfeld RA. 2008. Oral DNA vaccines target the tumor vasculature and microenvironment and suppress tumor growth and metastasis. *Immunological Reviews* 222: 117-128.
- Yamagami T, Sugiyama H, Inoue K, Ogawa H, Tatekawa T, Hirata M, Kudoh T, Akiyama T, Murakami A, Maekawa T. 1996. Growth inhibition of human leukemic cells by WT1 (Wilms tumor gene) antisense oligodeoxynucleotides: Implications for the involvement of WT1 in leukemogenesis. *Blood* 87: 2878-2884.
- Yang L, Han Y, Suarez Saiz F, Minden MD. 2007. A tumor suppressor and oncogene: the WT1 story (Review). *Leukemia* 21: 868-876.
- Yao QH, Tang YJ, Gao FH, Tang JY. 2009. Antitumor effect of CpG oligonucleotides on human neuroblastoma xenografts in nude mice. *Ai Zheng* 28:344-349.
- Zamora-Avila DE, Franco-Molina MA, Trejo-Avila LM, Rodriguez-Padilla C, Resendez-Perez D and Zapata-Benavides P. 2007. RNAi silencing of the WT1 gene

inhibits cell proliferation and induces apoptosis in the B16F10 murine melanoma cell line. *Melanoma Research* 17: 341-348.

Zamora-Avila DE, Zapata-Benavides P, Franco-Molina MA, Saavedra-Alonso S, Trejo-Avila LM, Reséndez-Pérez D, Méndez-Vázquez JL, Isaias-Badillo J, Rodríguez-Padilla C. 2009. WT1 gene silencing by aerosol delivery of PEI-RNAi complexes inhibits B16-F10 lung metastases growth. *Cancer Gene Therapy* 16: 892-899.

Zapata-Benavides P, Tuna M, Lopez-Berestein G, Tari AM. 2002. Down-regulation of Wilms' tumor 1 protein inhibits breast cancer proliferation. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 295: 784-790.

Zhang QJ, Seipp RP, Chen SS, Vitalis TZ, Li XL, Choi KB, Jeffries A, Jefferies WA. 2007. TAP expression reduces IL-10 expressing tumor infiltrating lymphocytes and restores immunosurveillance against melanoma. *International Journal of Cancer* 120: 1935-1941.

RESUMEN BIOGRÁFICO

Edgar Manilla Muñoz

Candidato para el Grado de Doctor en Ciencias con orientación en Inmunobiología

Tesis: Efecto de la vacunación basada en WT1 y ODN-CpG administrados en aerosol contra tumores pulmonares y subcutáneos.

Campo de estudio: Ciencias de la Salud.

Datos personales: Nacido en Ciudad Valles, S.L.P. el 30 de noviembre de 1983, hijo de Aristeo Manilla García y Juana Muñoz Mendoza.

Educación: Egresado de la Universidad Autónoma de Nuevo León, grado obtenido Químico Bacteriólogo Parasitólogo en 2009.

Egresado de la Universidad Autónoma de Nuevo León, grado obtenido Maestría en Ciencias con acentuación en Inmunobiología en 2012.

Artículos publicados:

Zapata-Benavides P, Manilla-Muñoz E, Zamora-Avila DE, Saavedra-Alonso S, Franco-Molina MA, Trejo-Avila LM, Davalos-Aranda G, Rodríguez-Padilla C. WT1 silencing by RNAi synergizes with chemotherapeutic agents and induces chemosensitization to doxorubicin and cisplatin in B16F10 murine melanoma cells. *Oncol Lett.* 2012 Apr 1;3(4):751-755.

Blancas-Mosqueda M, Zapata-Benavides P, Zamora-Ávila D, Saavedra-Alonso S, Manilla-Muñoz E, Franco-Molina M, DE LA Peña CM, Rodríguez-Padilla C. CD133 antisense suppresses cancer cell growth and increases sensitivity to cisplatin in vitro. *Exp Ther Med.* 2012 Nov;4(5):901-905.

Saavedra-Alonso S, Zapata-Benavides P, Chavez-Escamilla AK, Manilla-Muñoz E, Zamora-Avila DE, Franco-Molina MA, Rodriguez-Padilla C. WT1 shRNA delivery using transferrin-conjugated PEG liposomes in an in vivo model of melanoma. *Exp Ther Med.* 2016 Dec;12(6):3778-3784.