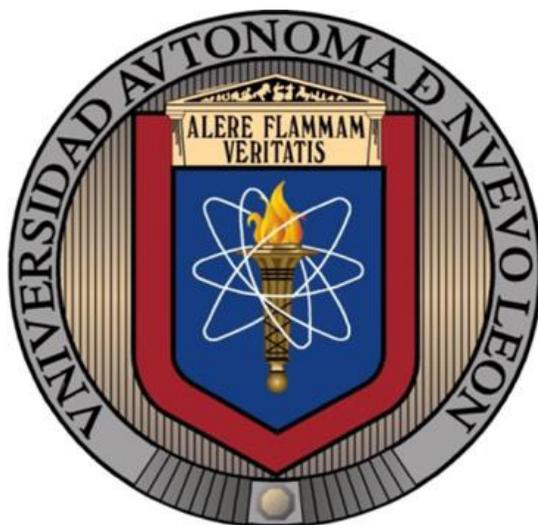


**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN**  
**FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**



TESIS

EVALUACIÓN DE LA RESPUESTA INMUNE PULMONAR POR LA  
VACUNACIÓN VÍA AEROSOL DE DNA CONTRA WT1 EN UN MODELO  
DE CÁNCER MURINO

POR

M.C. ANA KARINA CHÁVEZ ESCAMILLA

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

MAYO, 2017

**EVALUACIÓN DE LA RESPUESTA INMUNE PULMONAR POR LA  
VACUNACIÓN VÍA AEROSOL DE DNA CONTRA WT1 EN UN MODELO  
DE CANCER MURINO**

**COMITÉ DE TESIS**

---

DIRECTOR DE TESIS  
Dr. Pablo Zapata Benavides

---

SECRETARIO  
Dr. Moisés Franco Molina

---

VOCAL  
Dra. Cristina Rodríguez Padilla

---

VOCAL  
Dr. Juan Manuel Alcocer

---

VOCAL  
Dr. Edgar Mendoza Gamboa

SAN NICOLÁS DE LOS GARZA, MAYO DE 2017



**El presente trabajo fue realizado en el laboratorio de Inmunología y Virología de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León**

## AGRADECIMIENTOS

A mi marido, mi mentor, amigo, cómplice, compañero de aventuras, Santiago Saavedra, gracias por sembrar en mí ese amor por la ciencia y el trabajo, gracias por estar conmigo en los buenos y en los malos momentos, y por enseñarme a ser terca y persistente en las metas que me planteo, sin tu apoyo, cariño y paciencia (sobre todo esta última jaja) jamás lo hubiera logrado, gracias por ver lo mejor de mí, te amo.

A la Dra. Cristina Rodríguez Padilla, a quien reconozco su liderazgo, visión y pasión por la ciencia, y que a pesar de saber que estaba pasando por momentos difíciles en la salud de Sarita en su momento, me dio la oportunidad y la confianza de ingresar al posgrado de Inmunología en el laboratorio, muchas gracias Doctora.

Al Dr. Pablo Zapata Benavides, por darme la oportunidad de entrar a su laboratorio desde el servicio social en la licenciatura y motivarme a cumplir mis metas personales de licenciatura, maestría y doctorado bajo su asesoría y dirección de tesis. Gracias por no quitar el dedo del renglón, por motivarme a su manera y apoyarme en los momentos que más necesitaba, gracias por tantas enseñanzas académicas y personales que ha dejado en mí, gracias por su amistad.

A mis profesores los Drs. Edgar Mendoza, Moisés Franco y Laura Trejo que siempre han estado al pendiente y apoyando a una servidora cuando ha solicitado su ayuda, gracias por su amistad.

A mis amigos y hermanos del LIV: Karlita, Ash, Fer, Liz, Evy, Dany, Edgar, Felipe, Cyn, Beto, Itza, Caro, el otro Dany, Ramiro, Erikita, Yarys, Amaro, Mario, Mayra, Bertha, Anita, Laura, Perita, Maricela, uuufff, todos todos toooodos, los que de alguna u otra forma han compartido conmigo su tiempo, consejos, enseñanzas, tips, reactivos, kits, alegrías, tristezas y enojos... Gracias amigos, para mí son como mi familia, ¡sin ustedes no lo hubiera logrado!

Al Laboratorio de Inmunología y Virología de la Facultad de Ciencias biológicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León, por proveer el apoyo financiero y la infraestructura requeridos para la realización de este proyecto.

A CONACyT ya que, gracias a su apoyo económico, me ayudó a hacer posible una meta más en mi vida profesional de posgrado.

## DEDICATORIA

*A ti luz del universo*

A Sara,

A Kenya,

A Santiago

Los amo con infinita locura...

## ÍNDICE GENERAL

<b>Contenido</b>	<b>Página</b>
<i>Contraportada</i>	
<i>Comité de tesis</i>	
<i>Área de trabajo</i>	<i>i</i>
<i>Agradecimientos</i>	<i>ii</i>
<i>Dedicatoria</i>	<i>iii</i>
<i>Índice general</i>	<i>iv</i>
<i>Índice de tablas</i>	<i>vi</i>
<i>Índice de figuras</i>	<i>vii</i>
<i>Lista de símbolos y abreviaturas</i>	<i>x</i>
<i>Resumen</i>	<i>xii</i>
<i>Abstract</i>	<i>xiii</i>
<i>1. Introducción</i>	<i>1</i>
<i>2. Antecedentes</i>	
2.1. <i>Cáncer</i>	<i>3</i>
2.2. <i>Etiología del cáncer</i>	<i>3</i>
2.3. <i>Etapas del cáncer</i>	<i>3</i>
2.4. <i>Terapias contra el cáncer</i>	<i>5</i>
2.5. <i>Inmunoterapia</i>	<i>6</i>
2.6. <i>Inmunoterapia contra el cáncer</i>	<i>6</i>
2.7. <i>Vacunas de DNA</i>	<i>8</i>
2.8. <i>Aplicación de terapia génica</i>	<i>9</i>
2.9. <i>Gen WT1</i>	<i>11</i>
2.10. <i>Gen WT1 en cáncer</i>	<i>14</i>
2.11. <i>Terapia inmunológica contra WT1</i>	<i>16</i>
<i>3. Justificación</i>	<i>18</i>
<i>4. Objetivo general</i>	
4.1. <i>Objetivos particulares</i>	<i>19</i>
<i>5. Hipótesis</i>	<i>21</i>
<i>6. Diseño experimental</i>	<i>22</i>
<i>7. Metodología</i>	
7.1. <i>Diseño y construcción de una vacuna de DNA contra WT1</i>	<i>23</i>
7.2. <i>Transformación de bacterias calcio competentes con la vacuna DNA-WT1</i>	<i>24</i>
7.3. <i>Caracterización de la vacuna por enzimas de restricción</i>	<i>24</i>
7.4. <i>Electroforesis en gel de agarosa</i>	<i>24</i>
7.5. <i>Producción a gran escala de</i>	<i>25</i>

	<i>vacuna de DNA-WT1</i>	
7.6.	<i>Cultivo celular</i>	26
7.7.	<i>Transfección de la línea celular B16F10 con los plásmidos WT1 y pcDNA3.1(+) en placa de 96 y 6 pozos</i>	26
7.8.	<i>Ensayo de viabilidad celular mediante MTT</i>	27
7.9.	<i>Animales</i>	27
7.10.	<i>Establecimiento del modelo de cáncer murino</i>	27
7.11.	<i>Vacunación con DNA contra WT1 por un sistema de aerosol por exposición de nariz.</i>	28
7.12.	<i>Evaluación de la carga tumoral</i>	28
7.13.	<i>Sangrado y obtención de suero de ratones inmunizados</i>	29
7.14.	<i>Análisis de la respuesta inmune activada por vacunación</i>	29
7.15.	<i>Especificidad antigénica de la inmunización vía aerosol con DNA-WT1 in vitro</i>	29
7.16.	<i>Extracción de proteínas y western blot</i>	31
7.17.	<i>Inmunohistoquímica de WT1 en tejido Pulmonar murino nebulizado</i>	32
7.18.	<i>Análisis de citocinas Th1/Th2/Th17 en suero de ratones nebulizados con la vacuna DNA-WT1.</i>	32
8.	<i>Resultados</i>	
8.1	<i>Caracterización y expresión de la vacuna de DNA-WT1 in vitro</i>	33
8.2	<i>Secuenciación del inserto de la vacuna DNA-WT1</i>	33
8.3	<i>Análisis de la expresión de la vacuna DNA-WT1 in vitro</i>	36
8.4	<i>Expresión de la vacuna DNA-WT1 administrada vía aerosol en pulmones de ratones C57BL/6</i>	37
8.5	<i>Análisis de la respuesta inmune tras la nebulización de la vacuna DNA-WT1</i>	39

8.6	<i>Evaluación de la actividad profiláctica de la vacuna DNA-WT1 modelo subcutáneo de cáncer</i>	42
8.7	<i>Evaluación de la actividad terapéutica de la vacuna DNA-WT1 modelo subcutáneo de cáncer</i>	46
8.8	<i>Evaluación de la actividad terapéutica de la vacuna DNA-WT1 en modelo de cáncer pulmonar murino</i>	48
8.9	<i>Análisis del perfil de citocinas Th1/Th2/Th17 en suero de ratones, tras la administración en aerosol de la vacuna de WT1</i>	50
9.	<i>Discusión</i>	51
10.	<i>Conclusiones</i>	56
11.	<i>Bibliografía</i>	59
12.	<i>Autobiografía</i>	65

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla</b>	<b>Página</b>
Tabla 1 Métodos de aplicación de terapia génica.	9
Tabla 2 Genes blanco de regulación por WT1.	13
Tabla 3. Concentración de citocinas en suero de ratones inmunizados contra WT1 por vía pulmonar.	50

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura</b>	<b>Página</b>
Figura 1 Activación del sistema inmune por medio de una vacuna de DNA.	10
Figura 2 El gen wt1 y sus isoformas	12
Figura 3 Ranking de antígenos asociados a tumor del proyecto del National Cancer Institute 2009.	15
Figura 4 Mapa del plásmido pcDNA 3.1 (+)	23
Figura 5. Caracterización de la vacuna DNA-WT1 con enzimas de restricción.	33
Figura 6 Secuencia nucleotídica obtenida tras el análisis de secuenciación Sanger	34
Figura 7 Análisis de alineamiento de la secuencia peptídica de la vacuna DNA-WT1	35
Figura 8 Secuencia amino acídica codificada por la vacuna DNA-WT1	35
Figura 9 Expresión de la vacuna DNA-WT1 en la línea celular B16F10	36
Figura 10 Sistema de nebulización de la vacuna DNA-WT1 por exposición de nariz.	37
Figura 11 Distribución de la vacuna DNA-WT1 en los cuadrantes de pulmones de ratones nebulizados.	38

Figura 12 Inmunohistoquímica de tejido pulmonar murino nebulizado con la vacuna DNA-WT1.	39
Figura 13. Actividad citotóxica <i>ex vivo</i> mediada por esplenocitos en contra de células B16F10.	40
Figura 14. Producción de IFN gamma por esplenocitos co cultivados con células B16F10	41
Figura 15. Análisis de la producción de anticuerpos específicos para WT1 en sueros de ratones inmunizados vía aerosol con vacuna DNA-WT1	42
Figura 16 Esquema de inmunización vía aerosol de la vacuna DNA-WT1 evaluando la actividad profiláctica.	43
Figura 17 Cinética de peso en ratones nebulizados con vacuna DNA-WT1 evaluando la actividad profiláctica.	43
Figura 18 Cinética de crecimiento de tamaño tumoral en el modelo de vacunación profiláctica con vacuna DNA-WT1	45
Figura 19 Gráfico de supervivencia de ratones C57BL/6 inmunizados vía aerosol con vacuna DNA-WT1 en el modelo profiláctico.	46
	47
Figura 20 Cinética de peso en ratones nebulizados con la vacuna DNA-WT1 evaluando la actividad terapéutica.	
Figura 21 Cinética de crecimiento tumoral en ratones nebulizados con la vacuna DNA-WT1	47
Figura 22 Gráfico de supervivencia de ratones C57BL/6 inmunizados vía aerosol con vacuna DNA-WT1 en el modelo terapéutico.	48
Figura 23 Fotografías representativas de los pulmones de los grupos de ratones nebulizados con los diferentes tratamientos.	49

## LISTA DE SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS

Ac.	Anticuerpo
BCG	Bacilo Calmette-Guerin
bFGF	Factor de crecimiento de fibroblastos básico
°C	Grados Celsius
Caspasa	Cisteína-aspartato-proteasa
CO <sub>2</sub>	Dióxido de carbono
CC50	Concentración citotóxica media.
ELISA	Ensayo de inmunoabsorción ligado a enzima
G	Gramo
H <sub>2</sub> O	Agua
IL-2	Interleucina-2
IL-8	Interleucina-8
INF $\alpha$ 2b	Interferón alfa 2b
kDa	Kilodalton
Mg	Miligramo
$\mu$ g	Microgramo
min	Minuto
mL	Mililitro
$\mu$ L	Microlitro
mM	Milimolar
MTT	Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol
NaCl	Cloruro de sodio
Ng	Nanogramo
Nm	Nanómetro
O <sub>2</sub>	Oxígeno
PARP	Poli (ADP-ribosa) polimerasa
PBS	Amortiguador fosfato salino

PCR	Reacción en cadena de polimerasa
Pg	Picogramo
pH	Potencial de hidrógeno
Rpm	Revoluciones por minuto
SDS	Dodecil sulfato de sodio
TBS	Amortiguador tris salino
V	Volumen

## RESUMEN

En la actualidad las terapias que se ofrecen a pacientes con cáncer incluyen la cirugía, quimioterapia y radioterapia o combinaciones de éstas. Sin embargo, la quimioterapia y la radioterapia son muy agresivas y poco específicas al blanco tumoral. Hoy en día, se plantea la posibilidad de desarrollar terapias específicas para generar inmunidad contra antígenos del tumor, y una de las vías, es utilizando vacunas de DNA que nos permitan una eficaz respuesta antitumoral. El gen WT1 ha demostrado ser un buen blanco terapéutico contra el cáncer, incluso ya existen algunas vacunas contra este blanco tumoral en fase clínica para tratar malignidades hematopoyéticas y tumores sólidos. Actualmente la nebulización de medicamentos y otras moléculas vía aerosol ha mostrado ser una alternativa para la entrega directa de terapias en contra de diversas enfermedades. En este trabajo se llevó a cabo el diseño de una vacuna de DNA contra WT1 basada en administración vía aerosol para evaluar su efecto anti tumoral en un modelo de cáncer murino. La inmunización vía aerosol en ratones sanos mostró una distribución homogénea en el tejido pulmonar, así como una expresión en un periodo de tiempo de hasta 15 días. Células de bazo de ratones inmunizados con la vacuna DNA-WT1 mostraron una reactividad específica en contra de la línea celular de melanoma murino B16F10 en un ensayo *ex vivo*, obteniendo altos títulos de IFN en los sobrenadantes. Los sueros de ratones tratados con la vacuna mostraron presencia de anticuerpos específicos contra WT1 en comparación con los sueros de ratones sin inmunizar, sugiriendo que la vía de inmunización via aerosol en combinación con la aplicación de una vacuna DNA pueden tener un efecto sistémico en la generación de una respuesta inmune antígeno específica. Sin embargo, al llevar a cabo el modelo de cáncer *in vivo*, utilizando la misma línea celular B16F10, la cual sobre expresa WT1, no se observaron diferencias significativas en las cinéticas de crecimiento tumoral y supervivencia de los grupos tratados con la vacuna DNA-WT1 con los ratones tratados con el vector y sin tratamiento. Ha sido reportado que la línea celular B16F10 presenta resistencia a diferentes tipos de terapias anti tumorales, incluidas las terapias inmunológicas, se plantea que es debido a una baja en la expresión de moléculas del MHC sumado a modificaciones en el patrón de expresión de moléculas como las TAP, señalándola como pobremente inmunogénica e inadecuada para su uso como modelo de cáncer en terapias inmunológicas de tipo celular. Con los resultados obtenidos, concluimos que el uso de una vacuna de DNA contra WT1 administrada vía aerosol, promete ser una alternativa terapéutica efectiva contra el desarrollo del cáncer, debido a que puede fomentar una respuesta inmune a nivel sistémico.

## ABSTRACT

Currently, the therapies offered to patients with cancer include surgery, chemotherapy and radiation therapy or combinations thereof. However, chemotherapy and radiotherapy are very aggressive and not very specific to the tumor target. Today, the possibility of developing specific therapies to generate immunity against tumor antigens is proposed, and one of the pathways is using DNA vaccines that allow us an effective antitumor response. The WT1 gene has proven to be a good therapeutic target against cancer, and there are already some vaccines against this tumor target in the clinical phase to treat hematopoietic malignancies and solid tumors. Nowadays, nebulization of drugs and other molecules via aerosol has been shown to be an alternative for direct delivery of therapies against various diseases. In this work, the design of an aerosol-based DNA vaccine against WT1 was carried out to evaluate its anti-tumor effect in a murine cancer model. Aerosol immunization in healthy mice showed a homogenous distribution in lung tissue as well as expression over a period of up to 15 days. Spleen cells from immunized mice with the DNA-WT1 vaccine showed specific reactivity against the B16F10 murine melanoma cell line in an *ex vivo* assay, obtaining high titers of IFN in the supernatants. Sera from mice treated with the vaccine showed the presence of specific antibodies against WT1 as compared to sera from unimmunized mice, suggesting that the route of immunization via aerosol in combination with the application of a DNA vaccine may have a systemic effect on the generation of a specific antigen-specific immune response. However, in carrying out the cancer model *in vivo*, using the same B16F10 cell line, with WT1 overexpression, no significant differences were observed in tumor kinetics and survival of the groups treated with the DNA-WT1 vaccine with the mice treated with the vector and without treatment. It has been reported that the B16F10 cell line exhibits resistance to different types of anti-tumor therapies, including immunological therapies, which is thought to be due to a low expression of MHC molecules coupled with modifications in the expression pattern of molecules such as TAP, indicating it to be poorly immunogenic and unsuitable for use as a cancer model in cellular type immunological therapies. With the results obtained, we concluded that the use of a DNA vaccine against WT1 administered via aerosol, promises to be an effective therapeutic alternative against the development of cancer, because it can promote a systemic immune response.

## 1. INTRODUCCIÓN

El cáncer se define como un conjunto de enfermedades cuya característica común es el crecimiento descontrolado y la diseminación de células anormales en un organismo. Es causado tanto por factores externos (tabaco, organismos infecciosos, nutrición deficiente, agentes químicos, radiación, etc.), como por factores internos (mutaciones heredables, factores hormonales, condiciones inmunológicas y mutaciones que ocurren en el metabolismo).

En la actualidad existe una diversidad de terapias que se ofrecen a los pacientes con cáncer, donde los tres pilares fundamentales incluyen la cirugía, quimioterapia y radioterapia. Sin embargo, estas alternativas son muy agresivas y poco específicas al blanco tumoral, teniendo una gran variedad de efectos secundarios nocivos en los que se incluyen la destrucción de células no cancerosas, deterioro del sistema inmunitario y una muy mala calidad de vida del paciente. En los últimos años se han buscado terapias alternativas específicas contra el tumor y que sean menos dañinas al organismo del paciente, generando un especial interés a la aplicación de terapia génica e inmunoterapia.

Dentro la inmunoterapia contra el cáncer hay trabajos donde se describe una diversidad de antígenos asociados a tumor (TAA) de distinto origen, incluyendo cáncer cérvico uterino, leucemias, cáncer de pulmón, cáncer de próstata y cáncer de mama, donde se observa que se puede llegar a generar una buena respuesta antígeno específica mediante la generación de anticuerpos efectores del mismo paciente.

El gen WT1 (gen del Tumor de Wilms) ha sido un blanco importante en el estudio del cáncer ya que se encuentra sobre expresado en una gran variedad de neoplasias tanto hematopoyéticas como tumores sólidos. Algunos grupos de investigación ya lo identifican como un TAA, proponiéndolo como un blanco terapéutico para la erradicación de la enfermedad.

Hay estudios en fase clínica que utilizan vacunación contra WT1, esto mediante la utilización de péptidos sintéticos de 9 mers por inoculación intradérmica e intramuscular, donde se han tenido buenos resultados en cuanto a la disminución

del tamaño del tumor, e incluso remisión completa de la enfermedad. Sin embargo, esta vacunación es exclusiva a un solo tipo de HLA y únicamente los pacientes que lo expresen son candidatos a su aplicación, sumado a esto se reporta que hay reacciones adversas en el área de la vacunación tales como eritema, hinchazón y dolor.

En un trabajo previo se probó el sistema de deliberación vía aerosol de un RNAi contra WT1 en un modelo de cáncer pulmonar murino, obteniendo una disminución drástica de la masa tumoral sin mostrar efectos adversos en el tejido sano, además de emplear dosis bastante bajas de ácido nucleico.

En este trabajo se plantea que la generación de una vacuna de DNA contra WT1 que nos permita generar un péptido antigénico para distintos HLA y que esta vacuna sea inoculada vía aerosol a dosis bajas, tendrá un efecto antitumoral profiláctico y terapéutico, además de nulificar los efectos adversos de las vacunas actuales. Proponemos generar así un producto biotecnológico innovador y altamente eficiente, de fácil producción, bajos costos y con una amplia gama de aplicación en el mercado.

## **2. ANTECEDENTES**

### **2.1 Cáncer**

El cáncer es un conjunto de enfermedades cuya característica en común es el crecimiento descontrolado de células anormales y diseminación a otros tejidos usando la vía linfática o sanguínea. Actualmente es considerado como una enfermedad moderna emergente ya que representa un problema de salud pública que ha ido en aumento de una manera alarmante en los últimos 100 años.

Tan sólo en el año 2008 se reportaron 12 millones de nuevos casos de cáncer a nivel global con una mortalidad superior a los 7 millones de personas y se pronostica que para el año 2030 existan 27 millones de nuevos casos, sumados a 17 millones de muertes (World Cancer Report, 2008).

### **2.2 Etiología del cáncer**

El cáncer no posee un único origen, estudios hechos en los últimos 60 años determinan la etiología del cáncer como multifactorial, es decir, es necesaria una combinación tanto de factores biológicos intrínsecos del organismo, como factores del medio ambiente y estilo de vida en el que se desarrolla.

Los agentes causales de la enfermedad se podrían agrupar en factores externos como: tabaquismo, organismos infecciosos, nutrición inadecuada, exposición a agentes químicos, radiación; factores internos como: mutaciones heredables, factores hormonales, condiciones inmunológicas entre otras (National Cancer Institute, 2008).

### **2.3 Etapas del cáncer**

De acuerdo a su grado de invasión los carcinomas se clasifican en:

- a) carcinoma *in situ*.- se define como un estadio del cáncer que se encuentra en forma localizada sin representar un estadio invasor; normalmente asociado a etapas tempranas de la enfermedad.
- b) carcinoma invasivo.- tipo de estadio del cáncer encontrado en etapas avanzadas de la enfermedad que se caracteriza por crecer en todas direcciones,

por lo que las células tumorales se pueden infiltrar y fijarse en otros órganos, diseminando la enfermedad a otras partes del cuerpo.

La estadificación describe la extensión o gravedad del cáncer que aqueja a un individuo en base al tamaño del tumor original (tumor primario) y a la extensión o diseminación en el cuerpo. Esta clasificación por etapas es muy importante ya que le permiten al médico planear asertivamente el tratamiento al paciente, además que funciona para estimar el pronóstico de la enfermedad.

Uno de los métodos de estadificación de neoplasias frecuentemente usado es el TNM, desarrollado por el Comité Americano Conjunto contra el Cáncer (AJCC por sus siglas en inglés) junto con la Unión Internacional contra el Cáncer (UICC) en 1977, es el sistema más utilizado actualmente para la clasificación y pronóstico de las neoplasias, y se basa en la medición del **Tamaño del tumor** (letra **T** seguida por un número que va del 0- IV), a la cuantificación de **Nódulos linfáticos locales al tumor primario** que se encuentran con células malignas (letra **N** seguida por un número del 0- 3) y a la **Metástasis** que expresa si el cáncer se ha extendido a otros órganos distantes (letra **M** seguida por un número 0 ó 1).

La metástasis es el aspecto más mortífero del cáncer y consiste en la capacidad de propagación de un foco tumoral a un órgano o tejido distinto al de origen. La infiltración y movilidad de estas células tumorales generalmente ocurre por la vía sanguínea o linfática. El 98% de las muertes por cánceres no detectados son debidas a la metástasis.

La capacidad que tienen las células tumorales de infiltrar o penetrar en los tejidos normales y en los vasos sanguíneos no es debida sólo a la presión del crecimiento tumoral, sino a características fenotípicas que adquieren las células cancerosas. Estudios realizados en las últimas décadas proponen 4 principios para explicar la capacidad de infiltración y diseminación de las células cancerosas, estos son: adherencia celular que es el anclaje de la célula tumoral por medio de la adquisición de receptores específicos a la membrana basal y a la matriz extracelular; proteólisis, refiriéndose a la destrucción de la membrana basal y de la matriz celular mediante la secreción de enzimas, como las colagenasas, que

destruyen el colágeno, y así poder abrirse camino entre estas estructuras; a la movilidad definida como la migración o locomoción de las células malignas a través de la matriz celular para llegar a un vaso sanguíneo o linfático, intravasarse, ser transportadas por la corriente sanguínea hasta lechos capilares distantes, extravasarse, y migrar una cierta distancia para iniciar la formación de una nueva colonia y a la angiogénesis o neovascularización, que se refiere a la capacidad de formación de vasos sanguíneos nuevos a partir de vasos sanguíneos preexistentes por medio de la secreción de factores de crecimiento (National Cancer Institute, 2008).

#### **2.4.Terapias contra el cáncer**

Actualmente las terapias que se ofrecen a los pacientes con cáncer se fundamentan en tres pilares: cirugía, quimioterapia y radioterapia. Donde la primera incluye la remoción quirúrgica de la masa tumoral, inclusive según su diseminación se remueven también los ganglios linfáticos circundantes para eliminar riesgo de metástasis; la quimioterapia se basa en la utilización de agentes químicos, esencialmente análogos de nucleótidos, que frenan el ciclo celular; y la radioterapia utiliza la exposición a rayos ionizantes que tienen un efecto citotóxico en la célula tumoral.

La cirugía es el método más empleado en contra del cáncer, generalmente es la primera opción de terapia en una gran diversidad de neoplasias y seguido de esta se complementa con la quimioterapia o la radioterapia según el origen y la severidad de la enfermedad.

Ya es conocido que estas tres opciones de tratamiento antitumoral tienen efectos secundarios bastante nocivos para el paciente, ya que no son específicos y dañan a células sanas del organismo, deteriorando gravemente el sistema inmunológico, generando daños en órganos, en general, el paciente tiene una mala calidad de vida.

En la última década se empezaron a desarrollar terapias alternativas altamente específicas para la remisión del cáncer, la generación de la terapia génica e inmunoterapia abrieron una nueva perspectiva sobre el tratamiento de la

enfermedad con una disminución drástica de los efectos secundarios además de una alta eficiencia en la erradicación de la patología.

## **2.5. Inmunoterapia**

En la medicina tradicional la inmunoterapia se refiere al conjunto de estrategias de tratamiento para estimular o reponer el sistema inmunitario frente al cáncer, infecciones u otras enfermedades así como aminorar los efectos secundarios de tratamientos muy agresivos usados contra los tumores (National Institute of Health, 2013).

La forma en que puede funcionar la inmunoterapia incluye la profilaxis, previniendo la enfermedad, o la terapéutica, siendo un tratamiento curativo o de estabilización de la enfermedad.

Algunos ejemplos de tratamientos biológicos son los anticuerpos monoclonales, las vacunas y los denominados factores de crecimiento.

## **2.6. Inmunoterapia contra el cáncer**

En la inmunoterapia contra el cáncer se intenta estimular el sistema inmune para rechazar y destruir tumores. El primer caso de inmunoterapia en cáncer fue en 1890, cuando con la inyección de *Streptococcus pyogenes* en un tumor se inducía su regresión. Sin embargo, no se habló de inmunoterapia contra el cáncer hasta casi 100 años después, cuando Rosenberg publicó un artículo en el que se informaba de una baja tasa de remisión del tumor en 1205 pacientes con cáncer que fueron sometidos a diferentes tipos de inmunoterapia (Rosenberg, 1984).

Hasta el día de hoy existen dos grandes ramas de inmunoterapia contra el cáncer, donde la fase efectora de cada una involucra una vía biológica distinta, pero con el mismo efecto antitumoral (Overes, 2009). Estas dos grandes ramas son:

- Inmunoterapia basada en células dendríticas
- Inmunoterapia de transferencia adoptiva de células T

Para ambos tipos de inmunoterapia es necesaria la utilización de antígenos asociados a tumor (TAA), los cuales son secuencias peptídicas altamente inmunogénicas y específicas de células neoplásicas.

La inmunoterapia basada en células dendríticas utiliza éstas células para activar una respuesta citotóxica hacia un antígeno. La manera de funcionar de ésta terapia es la siguiente: Las células dendríticas (célula presentadora de antígeno) son creadas por organismo del paciente. Estas células son activadas con un antígeno (TAA) o transfectadas con un vector viral. Las células dendríticas activadas son entonces puestas de nuevo en el paciente y presentan los antígenos a los linfocitos efectores (células T CD4+, células T CD8+, en células dendríticas especializadas y también en células B). Esto inicia una respuesta citotóxica que ocurre contra estos antígenos y cualquier cosa que pueda presentar estos antígenos.

Los antígenos tumorales son presentados a las células dendríticas que causan que el sistema inmunitario tenga como objetivo estos antígenos, que a menudo están expresados en células cancerosas (Rotrosen, 2002). La vacuna Provenge es un ejemplo de este tipo de terapia, actualmente está en fase clínica III y es utilizada específicamente contra cáncer de próstata mostrando buenos resultados.

La inmunoterapia basada en células T usa las respuestas citotóxicas para atacar al cáncer. En resumen, las células T que tienen una reactividad natural o manipulada genéticamente al cáncer de los pacientes son expandidas *in vitro* y entonces transferidas adoptivamente en un paciente con cáncer. Las células T con una reactividad que ocurre de manera natural hacia el cáncer de los pacientes pueden encontrarse infiltradas en los propios tumores del paciente. El tumor es creado, y estos linfocitos infiltrantes de tumor (TIL) son expandidos *in vitro* usando altas concentraciones de interleucina-2 (IL-2), anti-CD3 y alimentadores alorreactivos. Estas células son entonces transferidas de nuevo al paciente junto con administración exógena de IL-2. Hasta este momento, ha sido observada una tasa de respuesta objetiva del 51%; en algunos pacientes, los tumores se encogen a tamaños no detectables. En el caso de las células T manipuladas, los receptores

de células T (TCR) que han sido identificados por tener reactividad contra los antígenos asociados a los tumores, son clonados en un virus incompetente para la replicación que es capaz de la integración genómica. Los linfocitos propios de un paciente son expuestos a estos virus y entonces expandidos no específicamente o estimulados usando los TCR manipulados. Y finalmente, las células son transferidas de nuevo en el paciente. Esta terapia ha sido aplicada con éxito en pacientes con cáncer refractario en fase IV. La rama de cirugía del National Cancer Institute está investigando activamente esta forma de tratamiento del cáncer para pacientes que padecen melanomas agresivos (Rotrosen, 2002).

La terapia génica es la herramienta más comúnmente utilizada para la activación de células dendríticas y células T para que tengan una actividad específica contra un antígeno tumoral determinado. Generalmente la transfección con DNA, virus recombinantes o péptidos sintéticos son las metodologías más exploradas.

### **2.7. Vacunas de DNA**

Este tipo de terapia génica es de desarrollo reciente, consiste en la inyección directa de DNA a través de un plásmido o un vector de expresión. Este DNA codifica una proteína antigénica de interés, que inducirá la activación del sistema inmune. De esta forma se puede inducir tanto anticuerpos neutralizantes (respuesta humoral) como inmunidad medida por linfocitos T citotóxicos (respuesta celular) (Figura 1).

Para generar una vacuna de DNA se inserta la secuencia nucleotídica que codifica para el antígeno esperado, ya sea de bacterias, virus o células tumorales, dentro de células humanas o animales. Algunas células del sistema inmunitario van reconocer la proteína surgida del DNA extraño y atacan tanto a la propia proteína como a las células que la expresen. Si la respuesta generada contra el antígeno es efectiva, se podrán generar anticuerpos de memoria que combatirán la enfermedad en dado caso que se volviese a presentar en el individuo.

Las ventajas que proporcionan el uso de vacunas de DNA son la fácil producción y almacenaje, la expresión endógena del antígeno es semejante a la infección natural, además de que se produce una estimulación antigénica continua, esto es, permite una inmunidad duradera en el individuo.

## 2.8. Aplicación de la terapia génica

Se han desarrollado diversos protocolos de deliberación de ácido nucleico en células animales (Tabla I). Las dos metodologías más populares son la inyección de DNA en solución salina usando una jeringa convencional y la pistola génica (Weiner, DB., 1999).

Método de deliberación		Formulación DNA	Aplicación	Cantidad de DNA
Parenteral	<i>Inyección</i>	Solución salina	Intramuscular, Intradérmica, Intraperitoneal, Subcutánea	Grandes cantidades (100-200ug)
	<i>Pistola génica</i>	DNA con partículas de oro	Epidermal, vaginal, tejido expuesto quirúrgicamente	Cantidades pequeñas (16ng)
	<i>Inyección Neumática</i>	Solución acuosa	Epidermal	Alta (hasta 300ug)
Aplicación tópica		Solución acuosa	Ocular, intravaginal	Cantidades pequeñas (hasta 100ug)
Mediada por Citofectina		Liposomas, microesferas, adenovirus recombinantes, lípidos catiónicos aerosolizados	Intramuscular, Intravenosa, Intraperitoneal, Nasal/Pulmonar, Oral,	Variable

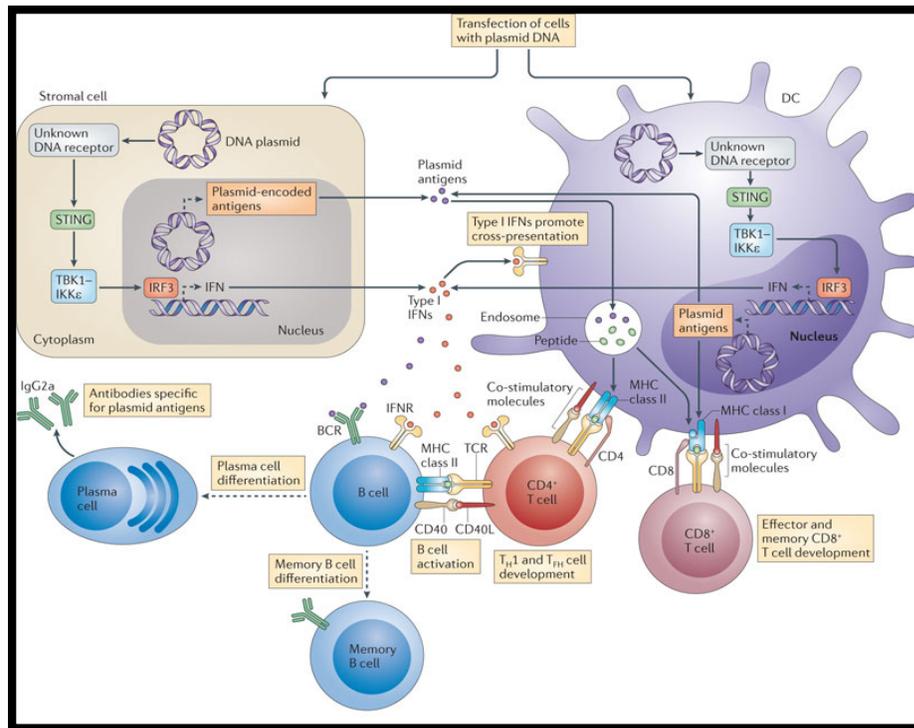
**Tabla I. Métodos de aplicación de terapia génica.**

La principal desventaja de la aplicación intramuscular, intradérmica, subcutánea es la baja respuesta inmune generada, es necesaria la utilización de grandes dosis para tener una respuesta mejor, mientras que la pistola de genes requiere forzosamente el uso de partículas de oro inerte.

La deliberación génica por medio de liposomas, adenovirus y aerosoles ha mostrado mejores resultados ya que genera una respuesta inmune potenciada específica del antígeno, el espectro de tejidos que pueden llegar a ser

transfectados es más amplio, además de que podría ser menos invasivo (Lewis, 1999).

El mecanismo de acción de una vacuna de DNA se basa en la respuesta inmunitaria hacia una molécula de naturaleza extraña, se reconoce al ácido nucleico y su producto peptídica como ajeno y se activan diversas vías de señalización celular que culminan en la activación de linfocitos T citotóxicos antígeno- específicos y la producción de anticuerpos de memoria (Figura 1).



**Figura 1. Activación del sistema inmune por medio de una vacuna de DNA.**  
*Imagen tomada de Nature Reviews, 2013.*

El éxito de una vacunación con DNA radica en la generación de una amplia respuesta tanto celular como humoral contra el antígeno problema.

Existen ya en estudios de fase clínica y en mercado una variedad de vacunas recombinantes desarrolladas para combatir distintos tipos de neoplasias podemos citar Stimuvax para cáncer de mama, CimaVax-EGF para cáncer de pulmón,

CVAC en cáncer de ovario, Onncophage para cáncer de riñón, entre otros (Giarelli, 2007).

### **2.9.Gen WT1**

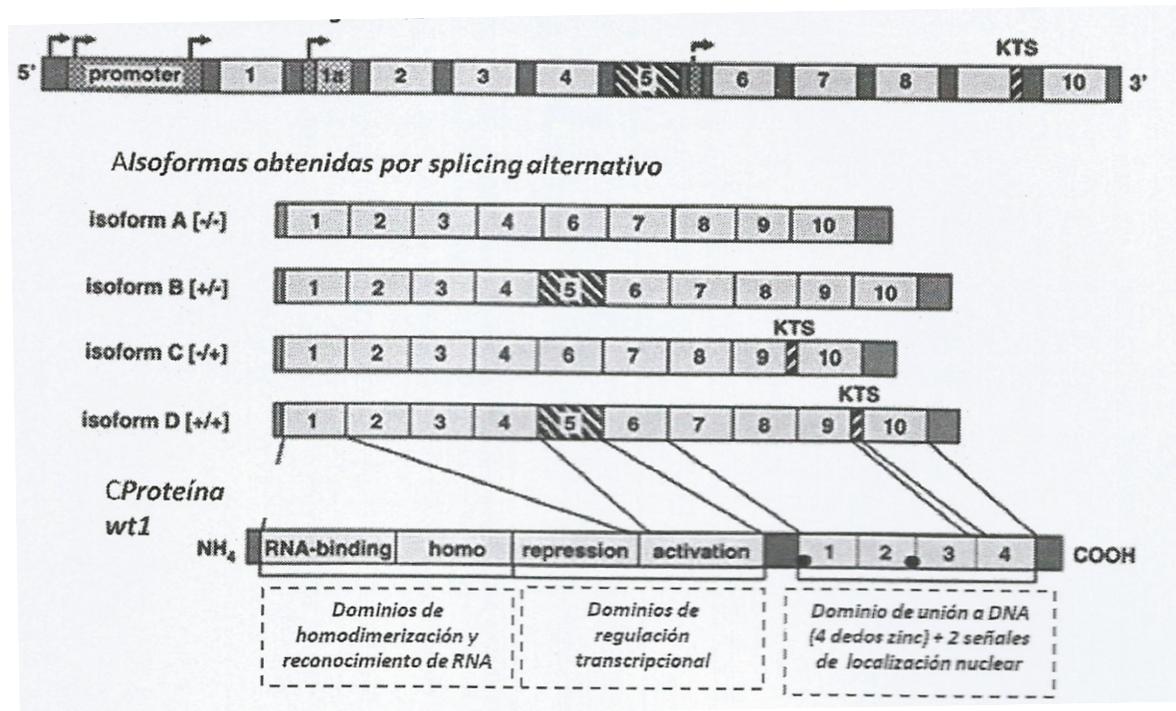
El gen WT1 codifica para un factor de transcripción involucrado en proliferación, diferenciación celular y apoptosis (Menke et al., 1998). Se encuentra localizado en el cromosoma 11p13 y codifica para un RNA mensajero de 3 kb formado por 10 exones (Call et al., 1990).

El dominio N-terminal de WT1 está compuesto de secuencias ricas en prolina-glutamina y está involucrado en interacciones RNA y proteínas, este dominio es crítico para la función de regulación transcripcional ya que contiene dominios de represión y activación. El dominio C-terminal está formado por 4 dedos de zinc tipo Krüppel, que representan su dominio de unión al DNA pero también está involucrado en interacciones RNA y proteínas (Menke et al., 1998).

La primera función asignada a WT1 fue como regulador de la transcripción debido a la presencia de los dedos de zinc en el extremo C-terminal (Roberts, 2005).

Se han descrito alrededor de 24 isoformas de WT1 resultado de los procesos de *splicing* y/o edición del RNA e inicio de traducción diferencial (*Figura 2*).

Otras isoformas alternativas se derivan del uso del codón de inicio CTG que se encuentra río arriba del codón de inicio ATG interno localizado al final del exón 1 y un residuo en el exón 6 para la edición del RNA.



**Figura 2. El gen WT1 y sus isoformas**

Los *splicing* del RNAm de wt1 son dos: uno en el exón 5 donde se insertan o no 17 aminoácidos (51 pb) y otro donde se da o no la inserción de tres aminoácidos KTS (lisina-treonina-serina) entre los dedos de zinc 3 y 4. Bajo condiciones fisiológicas normales, la expresión de KTS+/ KTS- se mantiene aproximadamente 2:1 (Hohenstein y Hastie, 2006). En general la isoforma KTS + está asociada con procesos de maduración del RNAm, mientras que la isoforma KTS – está asociada al proceso de transcripción.

Otras isoformas alternativas se derivan del uso del codón de inicio CTG que se encuentra río arriba del codón de inicio ATG interno localizado al final del exón 1 y un residuo en el exón 6 para la edición del RNA.

Existe un largo listado de genes que son blanco de la activación / represión por parte de WT1, destacando los involucrados en el crecimiento y metabolismo celular, como son componentes de matriz extracelular, factores de crecimiento y factores de transcripción, incluyéndose el mismo gen wt1 (*Tabla II*).

<i><b>Función represora</b></i>	<i><b>Función activadora</b></i>
<b>EGFR</b>	<b>MIS</b>
<b>IGF-II</b>	<b>SRY</b>
<b>IGFR</b>	<b>Dax-1</b>
<b>c-myc, n- myc</b>	<b>E-cadherina</b>
<b>PDGF</b>	<b>P21</b>
<b>TGF</b>	<b>Amphiregulina</b>
<b>RAR</b>	<b>Bcl-2</b>
<b>CSF</b>	<b>Ciclina- E</b>
<b>Bcl-2</b>	<b>ETS-1</b>
<b>EGR1</b>	<b>WT1</b>
<b>WT1</b>	

***Tabla 2. Genes blancos de regulación por WT1.***

Hay resultados paradójicos en el papel exacto de wt1 en la transcripción ya que parece que puede ser tanto activador como represor transcripcional dependiendo del contexto celular y experimental. El hecho de que WT1 pueda ser activador o represor puede ser influenciado por los niveles de expresión de WT1, las isoformas de WT1 que se estén expresando (principalmente KTS+ ó KTS-), la localización del sitio de inicio de la transcripción en relación con el sitio de unión a DNA y el tipo celular en el que se realice el experimento (Reddy et al., 1995; Wang et al., 1995; Laity et al., 2000).

Se ha demostrado que la expresión exógena de WT1 en las líneas celulares de cáncer de mama MDA-MB-468 y MCF-7 y en la línea leucémica K562 puede activar el promotor de c-myc y estimular la proliferación celular (Han et al., 2004). En contraste, en la línea HeLa sea mostrado una represión del promotor

de c-myc por WT1 (Hewitt SM et al., 1995). Otro ejemplo relevante es el del gen antiapoptótico Bcl-2, en células HeLa y DHL-4 una co-transfección transiente de WT1 con el promotor de Bcl-2 ligado a un gen reportero resulta en una represión significativa del promotor de Bcl-2 (Heckman, 1997), mientras que en la línea celular G401 conlleva a un incremento endógeno de la proteína Bcl-2 (Mayo, 1999).

Genes como la anfirregulina (Lee, 1999), sprouty1 (Gross , 2003), TrkB (Wagner, 2005), nefrina (Wagner, 2006) y pou4f2 (Wagner, 2003) parecen ser activados por WT1 mas que reprimidos, algunos cofactores como BASP1 y WT1P (Srichai, 2004) han sido descritos que específicamente actúan como co-supresores transcripcionales para WT1.

### **2.10. Gen WT1 en cáncer**

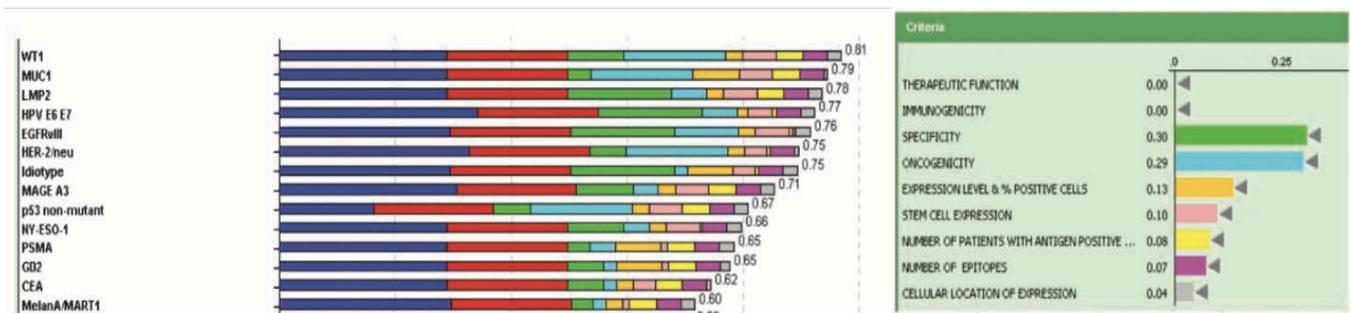
El gen wt1 fue caracterizado originalmente como un gen supresor de tumor que se encontraba inactivado en su función en un grupo de niños con predisposición genética a nefroblastomas o también llamados Tumores de Wilm's, del cual deriva el nombre del gen.

La primera evidencia que apoya su papel de oncogén es la sobreexpresión de wt1 silvestre en una variedad de cánceres humanos, tanto de origen hematológico como no hematológico. Estudios recientes en leucemia, cáncer de pulmón, sarcoma de hueso y tejido blando, carcinoma de células escamosas en cabeza y cuello además de cáncer de tiroides y mama muestran evidencia de la importancia biológica o clínica de WT1 en la sobrevivencia celular, diferenciación y proliferación; partiendo del principio que estos tejidos normalmente no expresan WT1 y además no se encontraron mutaciones, sugiriendo que la expresión de wt1 puede jugar un rol de oncogen en estos tejidos (Oji, 2003).

Desde el año 2000 se comenzaron a realizar estudios para evaluar al gen WT1 como un antígeno tumoral. Se ha determinado que para neoplasias tales como la leucemia linfocítica aguda, leucemia mieloide aguda y síndrome mielodisplásico la expresión de este gen se encontraba en niveles muy superiores a los encontrados en tejido oseo-medular sano o en sangre periférica (Oka, 2000).

A partir de estos descubrimientos se empezó a estudiar la respuesta inmune humoral contra WT1 en los pacientes con malignidades hematopoyéticas, encontrando que de manera natural su sistema inmune reaccionaba en contra de WT1, generando anticuerpos específicos que combatían el foco tumoral; sin embargo, esta producción de anticuerpos no era suficiente para poder erradicar la enfermedad (Elisseeva, 2002).

El NCI ( National Cancer Institute) de los Estados Unidos, realizó un proyecto piloto de priorización de antígenos tumorales, con base a criterios objetivos y preponderados, donde se seleccionó 75 antígenos asociados a tumor representativos para su comparación y puntaje. Los criterios ponderados en orden descendiente fueron los siguientes: a) función terapéutica, b) inmunogenicidad, 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. 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 inunoterapias en cáncer (Cheever et al., 2009)



**Figura 3. Ranking de antígenos asociados a tumor del proyecto del National Cancer Institute 2009.** Con base a criterios objetivos predefinidos y preponderados, se rankearon antígenos tumorales. Se muestran los primeros 14 antígenos del listado reportados, siendo WT1 el antígeno asociado a tumor número 1 del ranking general, así como los criterios elegidos para llevar a cabo el estudio. Grafico tomado de: Cheever, 2009.

## **2.11. Terapia Inmunológica contra WT1**

Después de que se determinó que WT1 es un buen antígeno tumoral, por lo menos en malignidades hematológicas, se procedió a llevar a cabo estudios en ratones a los cuales se inmunizaba mediante vacunación intradérmica con un péptido sintético de 9 mer (9 aminoácidos) de la porción amino terminal de WT1, encontrando que al ser retados con las células tumorales, estas fallaban para establecerse en el ratón en comparación con los ratones que no habían recibido vacunación (Oka, 2000).

Se ha probado la acción de la vacuna peptídica contra WT1 en la activación de la respuesta inmune de las células T citotóxicas en fases clínicas I/II, obteniendo una reducción de la masa tumoral e inclusive la remisión de la enfermedad en algunos pacientes con cáncer de mama y cáncer de pulmón (Oka, 2004).

Aunque los resultados de la vacuna peptídica son muy prometedores, los candidatos a este tipo de terapia son pocos, ya que el péptido es específico a el HLA-A\*2402 para poder llevar a cabo la activación de los linfocitos T CD8+.

Otra desventaja que se presenta es una intensa inflamación e induración del área donde se lleva la aplicación de la vacuna, aunque no se reportan citotoxicidades graves que pongan en riesgo la vida (Morita, 2006).

En nuestro laboratorio se estandarizó un método de deliberación de material genético via aerosol en un modelo murino, donde se transfectaban células pulmonares tumorales con un RNAi contra WT1, mostrando un efecto citotóxico específico al blanco tumoral, sin mostrar efectos nocivos al tejido sano circundante además de que permitía el uso de dosis bajas del ácido nucleico (Zamora-Avila, 2009).

Actualmente no existen reporte de la utilización de una vacuna de DNA contra WT1 donde se inocule vía aerosol, por todo esto nosotros planteamos la generación de una vacuna de DNA que codifique un fragmento de 325 aminoácidos de la porción amino terminal del gen WT1, el cual podrá transfectar

células presentadoras de antígeno, así como células somáticas permitiendo el inicio de una respuesta celular y humoral en contra del antígeno transfectado.

En este trabajo pretendemos obtener una vacuna de bajos costos de producción, sencilla obtención, fácil aplicación, sin efectos secundarios y que tenga una acción profiláctica y terapéutica contra las neoplasias que sobre expresen el antígeno asociado a tumor WT1.

### 3. JUSTIFICACIÓN

El cáncer es una de las principales causas de muerte a nivel mundial. Las terapias utilizadas comúnmente contra el cáncer son poco específicas y con efectos citotóxicos potentes, que en ocasiones son los causantes de la muerte del paciente. Es necesaria la búsqueda de nuevas alternativas terapéuticas antitumorales que sean altamente específicas y efectivas contra el foco tumoral, además de disminuir drásticamente sus efectos secundarios y aumentar la calidad de vida del paciente. Ya que el gen WT1 es considerado como un antígeno asociado a tumor, y que está sobre expresado en una gran variedad de neoplasias que incluyen tumores hematopoyéticos y sólidos, promete ser un buen candidato para el desarrollo de una terapia inmunológica contra el tratamiento del cáncer. Es por esto que nosotros proponemos la generación de una vacuna de DNA en aerosol contra WT1, la cual tendrá características profilácticas y terapéuticas contra el desarrollo del cáncer, teniendo una mejor respuesta inmunológica en comparación de las vacunas anti-cáncer actuales, además de ser la única en su tipo planteando seguir con la investigación para lanzarla en el mercado.

#### **4. OBJETIVO GENERAL**

Evaluar el efecto antitumoral local y sistémico, inducido por la administración en aerosol de una vacuna de DNA contra WT1, en un modelo de cáncer murino.

#### **4.1 OBJETIVOS PARTICULARES**

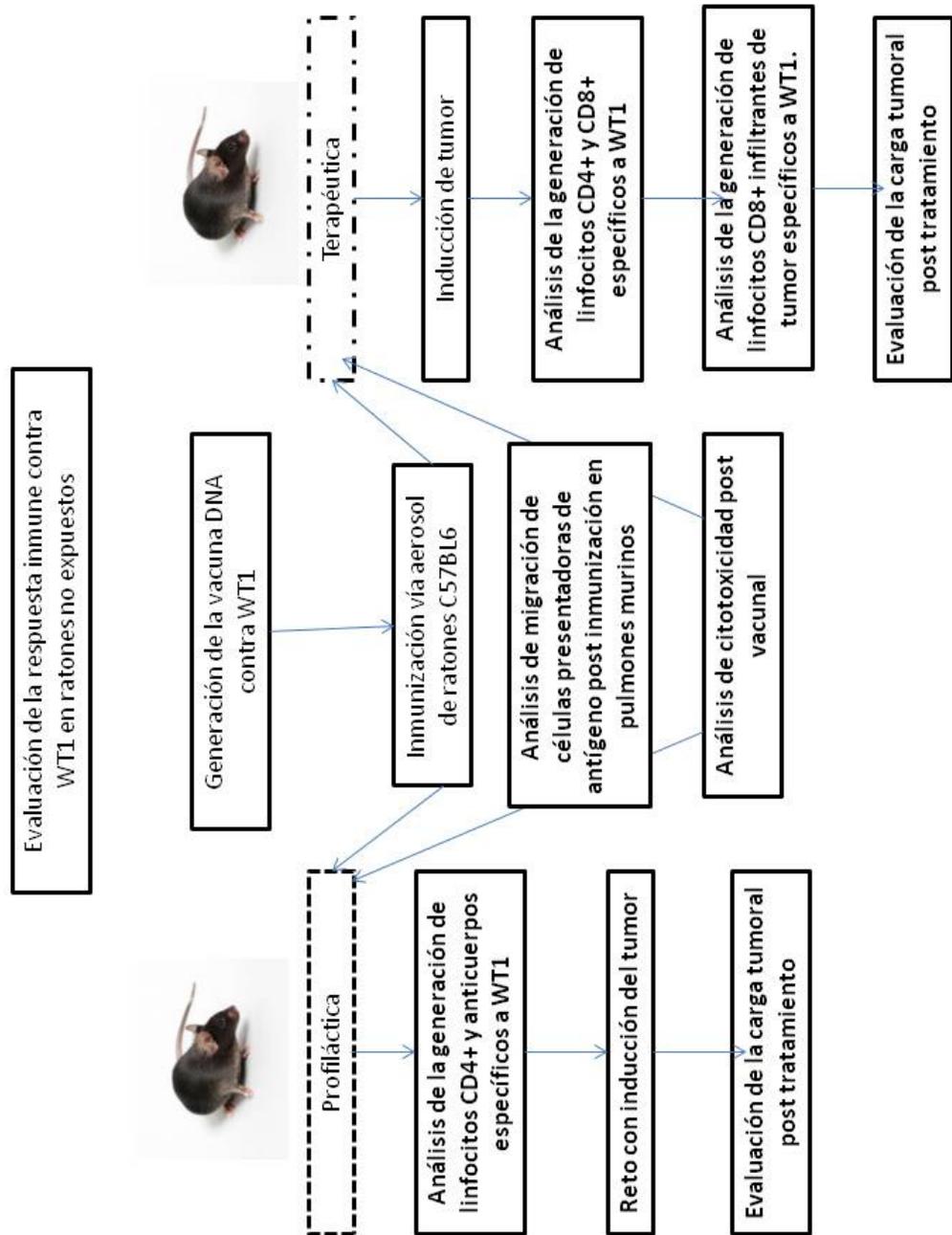
1. Diseñar un vector plasmídico codificante de epítopes inmunogénicos de la proteína WT1, para su empleo como vacuna de DNA.
2. Caracterizar y determinar la expresión de la secuencia aminoacídica correspondiente a WT1 *in vitro*.
3. Determinar la distribución y nivel de expresión de WT1 en tejido pulmonar de ratones Balb/c, tras la administración por aerosol de la vacuna.
4. Evaluar la especificidad de la respuesta inmune citotóxica, inducida por la vacuna de WT1.
5. Analizar la producción de anticuerpos IgG específicos de WT1 en suero de ratones inmunizados.
6. Evaluar la especificidad de la respuesta inmune inducida por la vacunación contra WT1, a través de la cuantificación de IFN- $\gamma$ .
7. Analizar el perfil de citocinas Th1/Th2/Th17 en suero de ratones, tras la administración en aerosol de la vacuna de WT1, en los grupos de tratamiento.
8. Evaluar el efecto de la vacunación profiláctica contra WT1, sobre el crecimiento de tumores B16F10 pulmonares.
9. Evaluar el efecto de la vacunación terapéutica contra WT1, sobre el crecimiento de tumores B16F10 pulmonares.
10. Evaluar el efecto de la vacunación profiláctica contra WT1, sobre el crecimiento de tumores B16F10 subcutáneos.

11. Evaluar el efecto de la vacunación terapéutica contra WT1, sobre el crecimiento de tumores B16F10 subcutáneos.

## **5. HIPÓTESIS**

Es posible generar una respuesta inmune específica contra el tumor implementando una vacuna de DNA contra WT1 administrada vía aerosol en un modelo de cáncer murino.

## 6. DISEÑO EXPERIMENTAL





## **7.2 Transformación de bacterias calcio competentes con la vacuna DNA-WT1**

Se llevó a cabo la transformación bacteriana de *E. coli* cepa TOP10 del kit One Shot TOP10 Competent Cells (No. Cat C4040-10) de Invitrogen, según el protocolo del fabricante.

Se llevó a cabo la selección de las clonas transformadas sembrando en placas de agar LB adicionado con ampicilina 100 ug/mL e incubando por 24 horas a 37 °C. Las clonas obtenidas bajo la selección del antibiótico fueron picadas y crecidas en 3 mL de caldo LB adicionado con ampicilina 100 ug/mL e incubado en un agitador por 24 hrs a 37 °C a 250 rpm. Finalmente se llevó a cabo la centrifugación de estos tubos a 6000 g por 15 minutos y el pellet bacteriano fue procesado para la extracción del DNA plasmídico utilizando el kit QIAGEN Plasmid Purification (Quiagen), el cual correspondía a la vacuna DNA-WT1, para la consecuente caracterización.

## **7.3 Caracterización de la vacuna por enzimas de restricción**

Para determinar la correcta construcción de la vacuna DNA-WT1 se realizó la digestión del plásmido previamente purificado con las enzimas de restricción que flanqueaban la secuencia nucleotídica de interés: EcoRI y XhoI.

Se preparó en un tubo eppendorf cada reacción utilizando 2 uL de la enzima EcoRI, 2 ug del plásmido, 4 uL de buffer y se aforó a 20 ul de volumen total. Para la digestión con XhoI se realizó la reacción utilizando 2 uL de la enzima, 2 ug del plásmido, 4 uL de buffer y se aforó a 20 uL. Se incubó el mix por 1 hora a 37 °C y finalmente se visualizaron los productos de la digestión enzimática en un gel de agarosa al 0.8 %.

## **7.4 Electroforesis en gel de agarosa**

Se prepararon geles de agarosa al 0.8 % en buffer SB para el corrimiento y visualización del producto de digestión enzimática de la vacuna DNA-WT1. Las condiciones de electroforesis fueron de 110 volts por 20 – 40 minutos. Los geles

se analizaron bajo la luz UV en un transiluminador, se fotodocumentaron y se llevó a cabo la purificación de la banda de interés para su posterior análisis de secuenciación.

### **7.5 Producción a gran escala de vacuna de DNA contra WT1**

Posterior a la validación de la correcta clonación se llevó a cabo la producción a gran escala de la vacuna DNA-WT1.

Se empleó la cepa de *E.coli* TOP10 la cual fue previamente transformada con cada uno de los plásmidos: el plásmido pcDNA3.1(+) /WT1, el cual posee la inserción de la secuencia de DNA vacunal contra WT1 y el plásmido pcDNA3.1 (+) /-, el cual no tiene el inserto y se utilizó como control experimental.

Cada cultivo fue crecido en matraces con 25 mL de caldo LB adicionando ampicilina como antibiótico de selección, posteriormente se incubaron durante 14 hrs a 37°C en agitación continua de 250 rpm. Pasado el tiempo de crecimiento, se procedió a centrifugar el medio a 5000 rpm por 10 minutos, para formar la pastilla para cada una de las clonas.

Ya obtenida la pastilla se procedió según instrucciones del protocolo de purificación a gran escala Pure Link Hi Pure Plasmid Midi Prep Kit (Invitrogen). A cada pastilla celular se le agregaron 4 mL del Buffer R3 hasta homogenizar, después se agregaron 4 mL del Buffer L7 y mezclando por inversión el tubo 5 veces, después se agregaron 4 mL del Buffer N3 y se mezclaron por inversión el tubo hasta verse homogéneo. Posteriormente se centrifugaron los tubos a 20,000 x g por 10 minutos a temperatura ambiente, después se tomó el sobrenadante y este fue pasado por gravedad a través de una columna provista por el fabricante, después la columna fue lavada 3 veces con buffer W8 y después se agregaron 5 mL de Buffer E4 a la columna para eluir el DNA y recuperarlo en un tubo estéril, después para precipitar el DNA plasmídico se agregaron 0.7 volúmenes de isopropanol y esta mezcla se centrifugó a 12000 rpm por 15 minutos a 4°C, después se descartó el sobrenadante y se agregaron 5 mL de etanol al 70 % para después pasar a centrifugar a 7500 rpm por 10 minutos, después se decantó el sobrenadante y se procedió a secar la pastilla por inversión a temperatura

ambiente. Pasados 30 minutos de secado de la pastilla, se procedió a resuspender el DNA en 2 ml de buffer TE1X y este se cuantificó en nanodrop 2000 (Thermo Scientific) y fue almacenado a -80°C hasta su uso.

### **7.6 Cultivo celular**

Para los ensayos *in vitro*, *in vivo* y *ex vivo*, se empleó la línea celular de melanoma murino B16F10 (ATCC, Manassas, VA, USA), la cual fue cultivada en medio DMEM-F12 (Life Technologies, Invitrogen, Burlington, Ontario, Canadá) suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB) a 37°C en una atmósfera de 95% de O<sub>2</sub> y 5% de CO<sub>2</sub>.

### **7.7 Transfección de la línea celular B16F10 con los plásmidos WT1 y pcDNA3.1(+) en placa de 96 y 6 pozos .**

Para evaluar el efecto de la vacuna en la proliferación celular en la línea celular B16F10, se cultivaron 3000 células por pozo en una placa de 96, a las 24 horas del plaqueo se colocaron diferentes concentraciones del plásmido vacunal y del plásmido sin inserto por triplicado se agregaron medio fresco junto con cada una de las concentraciones (0.2, 0.4, 0.6, 0.8 µg/mL) de los plásmidos acomplejadas con la PEI correspondiente según la siguiente ecuación:

$$\mu\text{L PEI} = [ \mu\text{g DNA} \times 3 \times (\text{N/P}) ] / 150$$

y posteriormente a las 48 horas después de la transfección se llevó a cabo el análisis de proliferación mediante MTT.

Para determinar si el plásmido expresaba el polipéptido vacunal de interés fue necesario realizar ensayos en placas de 6 pozos con distintas concentraciones de los plásmidos, para ello se sembraron 100,000 células por pozo en placa de 6 pozos, pasadas las 24 horas se procedió a retirar el medio y agregó medio fresco junto con cada una de las concentraciones ( 0.6, 0.8 µg/mL.)

Cada tratamiento se realizó por triplicado incluyendo como control de agente de transfección PEI 150 mM. Pasadas las 48 horas, las células serán sometidas a extracción total de proteínas para Western Blot.

### **7.8 Ensayo de viabilidad celular mediante MTT**

Para la determinación de la viabilidad celular se empleó la técnica de Methylthiazolyldiphenyl-tetrazolium bromide (MTT), que consta de la preparación en solución de 5mg/mL de MTT en buffer PBS estéril, posteriormente se agregaron 20µL de esta solución a cada pozo y la placa fue incubada de 35 a 45 minutos a 37°C; pasado el tiempo de incubación se procedió a decantar el sobrenadante para después agregar 200 µL de DMSO para solubilizar las sales precipitadas; finalmente la placa fue llevada al lector de ELISA empleando la longitud de onda 570nm. Finalmente, los resultados fueron graficados incluyendo la desviación estándar.

### **7.9 Animales**

Se utilizaron ratones macho de la cepa C57/BL6 de 6 a 10 semanas de edad (20-25g), los cuales fueron obtenidas de Harlan México (México, D.F.). Los animales se mantuvieron en ciclos de 12 horas luz y 12 horas de oscuridad, siendo alimentados con dieta para roedores y agua ad libitum.

### **7.10 Establecimiento del modelo de cáncer murino**

Para el establecimiento del modelo murino se utilizó la línea celular B16F10. Se emplearon cultivos confluentes y se inocularon 500,000 células disueltas en medio DMEMF12 sin suero vía subcutánea en el flanco derecho de la pata posterior del ratón.

Para el caso de los ensayos realizados en el modelo de cáncer pulmonar, se inocularon  $5 \times 10^6$  células B16F10 diluidas en 150 uL de medio DMEM/F12 sin suero, en la vena caudal de ratones C57BL/6. Al tercer día post inducción de tumor se formaron aleatoriamente los grupos experimentales para nebulización con la vacuna DNA-WT1 acompañada con PEI, vector acompañada con PEI como control, PEI y ratones sin tratamiento como controles negativos,

nebulizados solamente con solución salina. Se llevó a cabo el esquema de inmunización terapéutico, para verificar la funcionalidad de la vacuna en este modelo de distribución directa de la terapia sobre el tejido tumoral. Conforme los grupos experimentales iban muriendo, el tejido pulmonar fue diseccionado y almacenado en formalina o congelado a  $-80^{\circ}\text{C}$  hasta su uso. De igual manera los sueros de los ratones fueron colectados según el esquema de inmunización previamente descrito.

### **7.11 Vacunación con DNA contra WT1 por un sistema de aerosol por exposición de nariz.**

Se utilizó un sistema de liberación por aerosol controlado de exposición de nariz para 4 ratones, el cual fue estandarizado para el uso con un RNA de interferencia (Zamora-Ávila, 2009), empleando un compresor comercial Pulmo-Aide modelo 5650D, el cual incluye un nebulizador Micro-Mist de 115V (DeVilbiss Health Care Corp; Somerset, PA).

Se administraron  $40\ \mu\text{g}$  de la vacuna DNA-WT1 acompañado con Polietiliminina (PEI) por ratón re suspendidos en solución salina estéril, se colocó la mezcla en el nebulizador y se nebulizaron los ratones hasta que se consumiera el contenido del frasco. El esquema de inmunización constaba en una nebulización al día 0 y 14 para evaluar la actividad profiláctica de la vacuna y a los días 7 y 14 post inducción tumoral según lo reportado por Sandoval, F. 2013.

### **7.12 Evaluación de la carga tumoral**

Para determinar el efecto profiláctico y terapéutico de la vacuna se llevó a cabo la medición de la carga tumoral de la siguiente manera:

**Vacuna profiláctica:** A los 21 días después de la primera inmunización se inocularon células B16F10 al grupo de ratones por la metodología antes descrita, y se realizó el monitoreo del crecimiento tumoral hasta el día 36 (contando como 1<sup>o</sup> día el día de reto).

**Vacuna terapéutica:** Se llevó a cabo la inducción de la tumoración por la metodología antes descrita en el día 0, y al día 4 se comenzó con la aplicación de

la vacuna vía aerosol 2 veces por semana por 6 semanas. Cumplido el lapso de tiempo se llevó a cabo la necropsia para analizar el tejido tumoral.

Para ambos casos se contabilizó el número de focos tumorales y se midió con un Vernier el tamaño de estos, sacando un promedio, se llevó a cabo un registro de peso, tamaño tumoral y supervivencia para cada ensayo, haciendo lecturas de medición y conteo cada tercer día. Mediante un análisis estadístico por T de student se determinó si existe o no diferencias significativas entre los tratamientos.

### **7.13 Sangrado y obtención de suero de ratones inmunizados.**

Se llevó a cabo el sangrado y obtención de suero de los diferentes grupos de ratones cada 7 días por punción retro orbital utilizando un capilar de vidrio. Obtenida la sangre se procedió a centrifugar cada muestra a 1500 rpm por 10 minutos, al finalizar se tomó el suero, se pasó a un tubo eppendorf nuevo y se almacenó a  $-80^{\circ}\text{C}$  hasta su uso.

### **7.14 Análisis de la respuesta inmune activada por vacunación**

Para determinar el efecto de la vacunación en la respuesta inmune innata, se analizaron cortes de tejido pulmonar de ratones C57BL6 que fueron inmunizados con la vacuna de DNA-WT1. Se determinó la presencia de infiltrados celulares mediante tinción con hematoxilina-eosina por microscopia.

### **7.15 Especificidad antigénica de la inmunización vía aerosol con DNA-WT1 *in vitro*.**

#### **A) Producción IFN- $\gamma$**

Se nebulizaron 40  $\mu\text{g}$  de la vacuna DNA-WT1 acompañada con PEI a ratones C57BL6, 6 días después se sacrificaron. Se extrajeron esplenocitos totales del bazo de ratón con el protocolo antes mencionado y se colocaron en una placa para separar los linfocitos (no adherentes), se co-cultivaron con células B16F10 (con expresión de WT1) en un ratio de 10:1 (células efectoras: células blanco) durante 4 horas, posteriormente se tomó el sobrenadante, se centrifugó para

separar los linfocitos remanentes y se analizaron en un kit de ELISA para IFN- $\gamma$  (Invitrogen Cat. BMS606) siguiendo el protocolo del fabricante.

#### **B) Citotoxicidad celular**

Paralelamente, para determinar la capacidad citotóxica específica al antígeno de wt1 se extrajeron esplenocitos de bazo de ratón con el protocolo antes mencionado y se colocaron en una placa y se co-cultivaron con células B16F10 (con expresión de WT1) en un radio de 10:1 (células efectoras: células blanco), pasadas 24 horas se llevó a cabo un análisis de viabilidad celular mediante MTT.

#### **C) Generación anticuerpos específicos para WT1 en suero**

Para la medición de producción de anticuerpos específicos contra wt1, se utilizó una placa de 96 pozos (Nunc), la cual se recubrió con 1 $\mu$ g/50  $\mu$ L de anticuerpo monoclonal IgM contra WT1 (WT1 Anticuerpo (H-1): sc-393498, Santa Cruz) e incubó toda la noche a 4° C. Posteriormente el exceso de anticuerpo se eliminó realizando 3 lavados con buffer de lavado (TBS-Tween 0.5%). Seguido de esto, se bloqueó la placa usando BSA al 5% por 1 hora a temperatura ambiente. Finalizada la incubación se realizó un lavado extensivo y se incubó la placa con 10 $\mu$ g/mL de proteínas totales de la línea celular B16F10 durante 2 horas a temperatura ambiente. Después se llevaron a cabo 3 lavados con el buffer de lavado y se llevó a cabo la incubación de la placa con la curva estándar de anticuerpo monoclonal de WT1 (WT1 Anticuerpo (F-6): sc-7385, Santa Cruz) y los sueros de los ratones inmunizados con los diferentes tratamientos, esto por toda la noche a 4° C. Posteriormente, se llevaron a cabo 3 lavados con buffer de lavado y se realizó el revelado de la placa usando 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine (TMB)(Sigma-Aldrich, Cat. 0440 SIGMA) por 15 minutos y deteniendo la reacción con H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0.2M. Finalmente se llevó a cabo la lectura de absorbancias a 450nm en un espectrofotómetro y se procedió a graficar y analizar los resultados.

## **7.16 Extracción de proteínas y Western blot**

Las pastillas celulares que se obtuvieron de cada ensayo, se lavaron con PBS para después tener un paquete celular, el cual se re suspendió en 100  $\mu$ L de buffer de lisis (Tritón 1%, NaCl 150mM, Tris 25mM, pH 7.6) y se incubó en hielo por 30 minutos. Posteriormente las células fueron centrifugadas a 7,500 rpm por 5 minutos y el sobrenadante fue transferido a un tubo estéril y almacenados a -80 °C hasta su uso.

En el caso de tejido pulmonar obtenido, proteínas totales de tejido pulmonar seccionado proveniente de ratones nebulizados con 40  $\mu$ g de vacuna DNA-WT1 y analizados a los días 5,10 y 15 posterior a la administración se colectaron con un saca bocados muestras tejido del tamaño de un pellet celular, se congelaron con nitrógeno liquido, y se maceraron en mortero estéril, para finalmente llevar a cabo el protocolo de extracción de proteínas totales utilizando Trizol (Invitrogen, No. Cat. 15596026), una vez obtenidas las proteínas, se colectaron en tubos eppendorf de 1.5 mL y se almacenaron a -80° C hasta su uso.

### ***A) Cuantificación de proteínas***

La concentración de proteínas se determinó usando el Kit Bio-Rad DC Protein Assay siguiendo las instrucciones del fabricante. Para la cuantificación de los extractos proteínicos se prepararon diluciones de 1:5 utilizando como diluyente el buffer de lisis; después se prepararon las diluciones 1:20 con los reactivos S y A; posteriormente se agregaron 177 $\mu$ L de reactivo B para después incubar por 10 minutos a temperatura ambiente. Después se pasó a leer la placa en el lector de ELISA a una longitud de 595 nm.

### ***B) Electroforesis en gel de poliacrilamida-SDS***

Se tomaron 50  $\mu$ g de proteína total y se desnaturalizaron en buffer de carga que contiene SDS y  $\beta$ -mercaptoentanol, se colocaron a 95°C por 5 minutos y después se cargaron en geles de acrilamida-SDS page al 12%, se corrieron a 40 volts por 20 minutos y posteriormente se incrementó el voltaje a 100 volts por 90 minutos,

después se procedió a transferir las proteínas del gel a una membrana de nitrocelulosa usando un casete de transferencia de proteínas en condiciones de 25 volts por 2.5 horas, finalizando con la transferencia de proteínas se continuó con el bloqueo de la membrana con una solución de TBS con leche al 5 % y Tween al 5 % por una hora.

### ***C) Inmunodetección***

Para la inmuno detección se emplearon anticuerpos primarios: anti-WT1 monoclonal F-6 (Santa Cruz Biotechnology) y  $\beta$ -actina monoclonal (Sigma-Aldrich); y como segundos anticuerpos se emplearon anti-ratón proveído por BIORAD; para su detección se empleó el Kit de quimioluminiscencia de Roche y los resultados se visualizaron de acuerdo a las instrucciones del fabricante.

#### **7.17. Inmunohistoquímica de WT1 en tejido pulmonar murino nebulizado**

El tejido pulmonar de ratones nebulizados con los diferentes tratamientos previamente diseccionado y almacenado en formalina, fue llevado al departamento de Patología del Hospital Universitario de la Universidad Autónoma de Nuevo León para su posterior embebimiento en parafina, corte y montaje en laminillas, que fueron marcadas con anticuerpo monoclonal murino contra WT1.

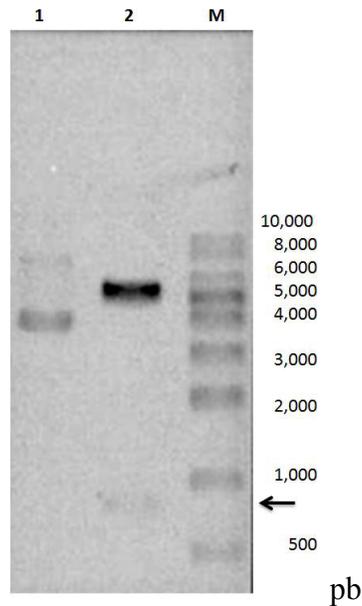
#### **7.18. Análisis de citosinas Th1/Th2/Th17 en suero de ratones nebulizados con la vacuna DNA-WT1.**

La medición de citosinas se realizó por citometría de flujo usando el kit comercial BD Cytometric Bead Array (CBA) Mouse Th1/Th2/Th17 kit (Cat.no. 560485, BD Biosciences, San Jose, CA, USA), siguiendo las instrucciones del fabricante. La adquisición de las muestras se realizó en un citómetro Accuri CD6 (BD Biosciences, San Jose, CA, USA) y el análisis de datos se realizó en el programa CFlow plus proporcionado por la misma compañía. La concentración individual de cada citosina se estimó a partir de la intensidad media de fluorescencia para cada muestra. El valor obtenido corresponde al promedio de tres experimentos independientes +/- la desviación estándar.

## 8. RESULTADOS

### 8.1 Caracterización y expresión de la vacuna de DNA ontra WT1 *in vitro*

Inicialmente la construcción de la vacuna de DNA-WT1 fue verificada mediante el corte con las enzimas de restricción EcoRI y XhoI, las cuales flanquean al inserto de la secuencia codificante. El producto de la digestión fue visualizado en gel de agarosa al 0.8%. El producto de la digestión corresponde a una banda de alrededor de 800 pb la cual coincide con el producto esperado. (Figura 5).



**Figura 5. Caracterización de la vacuna DNA-WT1 con enzimas de restricción.** Carril 1 corresponde al plásmido DNA-WT1 sin enzimas de restricción, el carril 2 corresponde a la digestión con EcoRI y XhoI, y el carril M corresponde al marcador de peso molecular (pb=pares de bases)

### 8.2 Secuenciación del inserto de la vacuna DNA-WT1.

Posterior a la caracterización mediante la digestión enzimática, el plásmido DNA-WT1 fue enviado a Genescript para realizarle la secuenciación de Sanger. Cabe destacar que la secuencia seleccionada fue optimizada por la compañía GenScript, la cual modifico el uso de codones preferenciales, por ello mismo no se realizó un análisis comparativo entre las secuencias de nucleótidos reportadas

en el GenBank (**Figura 6**). El análisis *in silico* de la secuencia de nucleótidos se realizó mediante el software CLC Main WorkBench, el cual detectó el ORF correspondiente a la vacuna de DNA-WT1. Posteriormente, la secuencia fue convertida a secuencia de aminoácidos para posteriormente compararla con la base de datos de Protein Blast del National Center for Biotechnology Information (NCBI). El resultado del análisis nos arrojó un porcentaje del 96 de homología con las secuencias murinas reportadas (**Figura 7**).

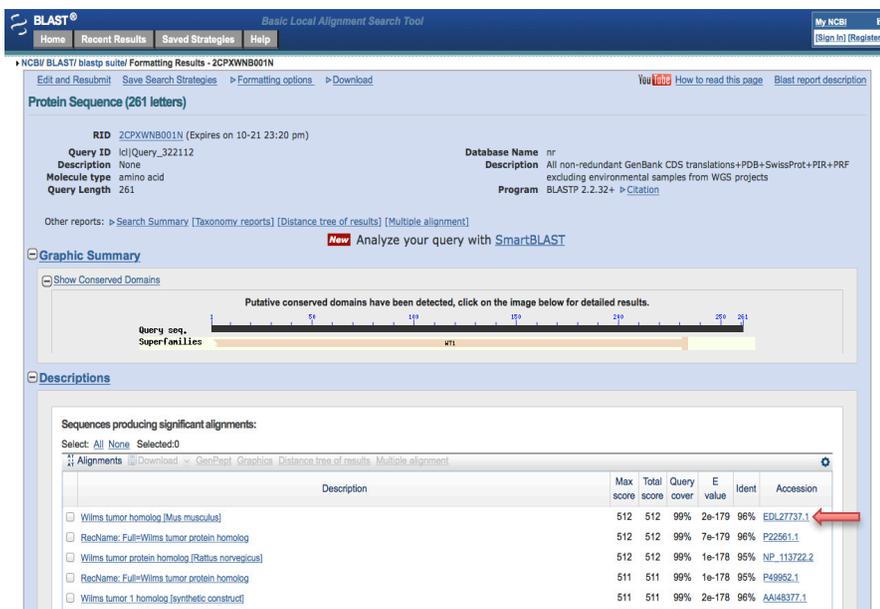
En la **Figura 8** se observa el esquema de la secuencia seleccionada de WT1, y el contenido de los epítopes de clase I y clase II incluidos dentro del inserto de la vacuna DNA-WT1. Estos epítopes corresponden a clase I: SGQARMFPRAPYL y KRYFKLSHLQMHSRKH; clase II RMFPRAPYL y CMTWNQMNL.

```

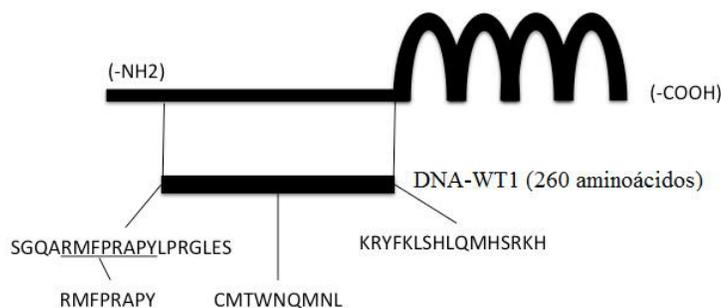
      1           20           40           60
      |           |           |           |
AGCATGGTTT CTGCGTTTAC TCTGCATTTT AGTGGGCAGT TTACAGGGAC CGCTGGTGCG TGTGCTATG GGCCTTTTGG
      80           |           |           |           |
ACCTCCTCCA CCTAGCCAGG CCAGCTCCGG ACAGGCTAGA ATGTTTCCTA GAGCACCATA TCTGCCCCGG GGTCTGAAA
      160          |           |           |           |
GTCAGCCGAC AATCAGAAAC CAGGGGTACT CAACCGTTAC ATTCCGATGGA GCACCATCTT GGGGACACAC CCCTAGTCAC
      240          |           |           |           |
CATGCCGCTC AGTTTCCGAA TCACTCTTTC AAACATGAAG ACCCTATGGG GCAGCAGGGA TCACTGGGCG AGCAGCAGTA
      320          |           |           |           |
TAGCGTGCCA CCCCAGGTTT GGGGATGCCA TACTCCAACC GATAGCTGTA CTGGATCCCA GGCCTGCTG CTGAGAACCC
      400          |           |           |           |
CATATTCTAG TGATAACCTG TACCAGATGA CAAGTCAGCT GGACTGCATG ACTTGGAACC AGATGAATCT GGGTGCTACC
      480          |           |           |           |
CTGAAGGGTA TGGCAGCGGG GTCAAGCTCC TCTGTGAAGG GTACCGAGGG GCAGTCCAAC CACGGCACAG GTTGGGAATC
      560          |           |           |           |
TGAGAATCAT ACTGCACCGA TCCTGTGCGG TGCAGCATAT CGCATTACA CCCATGGGGT CTTTCGTGGC ATCCAGGGAG
      640          |           |           |           |
TGAGACGTGT TAGCGGAGTC GCACCTACCC TCGTGAGAAG TGCTTCAGAA ACATCCGAGA AGCGTCCATT CATGTGTGCA
      720          |           |           |           |
TACCCCGGAT GTAACAAACG CTATTTCAA CTGTACACCC TGCAGATGCA CTCCCGCAA CACTGA

```

**Figura 6. Secuencia codificante de la vacuna DNA-WT1.** El segmento obtenido con los cortes enzimáticos de caracterización de la vacuna, fue secuenciado mediante la técnica Sanger y analizado *in silico* para evaluar su correcto marco de lectura y que correspondiera a los péptidos de interés de WT1.



**Figura 7. Análisis de alineamiento de la secuencia peptídica de la vacuna DNA-WT1.** La secuencia de aminoácidos traducida *in silico* de la vacuna DNA-WT1 fue alineada en el programa BLAST del NCBI.



Secuencia de aminoácidos codificada por la vacuna DNA-WT1

MVSAFTLHFSGQFTGTAGACRYGPFPPPSQASSGQ**ARMFPRAPYLPRGLES**Q

PTIRNQGYSTVTFDGAPSWGHTPSHHAQFPNHSFKHEDPMGQQGSLGEQQYS

VPPPWVGCHTPTDSC TGSQALLRTPYSSDNLYQMTSQLD**CMTWNQMNL**GATL

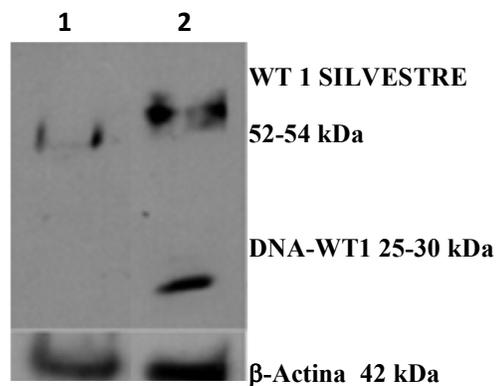
KGMAAGSSSSVKGTEGQSNHGTGWESENHTAPILCGAQYRIHTHG VFRGIQGV R

RVSGVAPT LVRASETSEKRPFCAYPGCNKRYFKLSHLQMHSRKH\*

**Figura 8. Secuencia de aminoácidos codificada por la vacuna de DNA-WT1.** En el esquema se describe la selección de la secuencia de la vacuna de WT1, la cual contiene los epítopes de clase I (en negritas) y clase II (subrayados).

### 8.3 Análisis de la expresión de la vacuna DNA-WT1 *in vitro*.

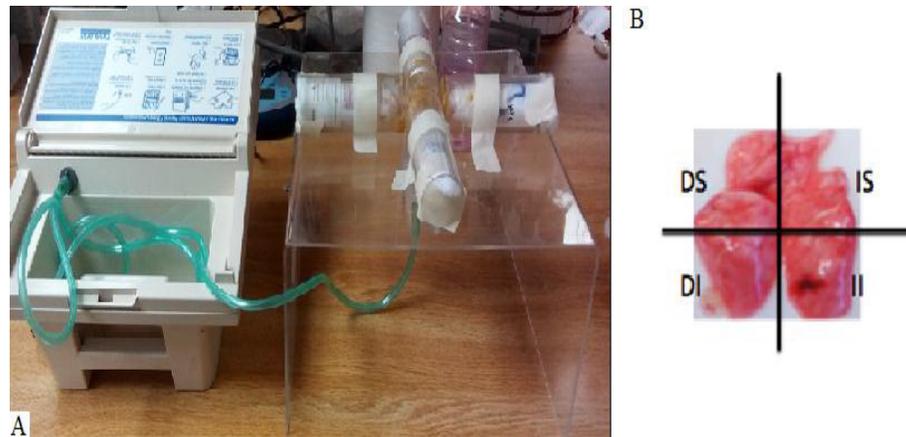
Para determinar la expresión de la proteína vacunal de DNA-WT1 en la línea celular de melanoma murino B16F10, fue realizada mediante la selección de clonas previamente transfectadas y seleccionadas con G418. Las proteínas totales de las clonas con 2 semanas de selección fueron analizadas mediante western blot, mostrando como resultado la visualización de la proteína silvestre de WT1 de 52-54 kDa y la proteína codificada por la vacuna DNA-WT1, a la cual le corresponde un peso aproximado de 25 kDa. (**Figura 9**).



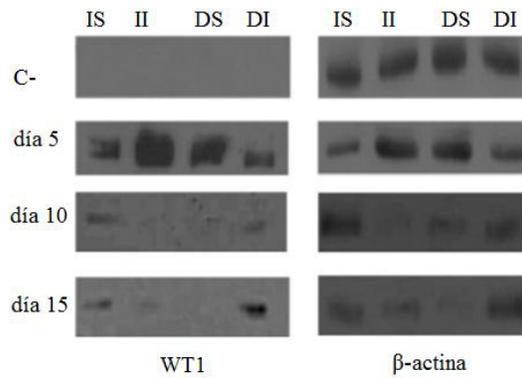
**Figura 9.** Expresión de la vacuna de DNA-WT1 en la línea celular B16F10. El carril 1 corresponde a la línea celular B16F10 sin transfección, el carril 2 corresponde a la clona transfectada con la vacuna DNA-WT1. La expresión de β-actina se utilizó como control endógeno.

#### 8.4 Expresión de la vacuna DNA-WT1 administrada vía aerosol en pulmones de ratones C57BL/6

Para analizar la expresión de la vacuna DNA-WT1 *in vivo*, fueron nebulizados dos grupos de 3 ratones: grupo 1) 40 µg de plásmido DNA-WT1 acarreado con PEI y grupo 2) solución salina. Posteriormente fueron sacrificados a los 5, 10 y 15 días posteriores a la administración. Los pulmones fueron divididos en 4 partes (IS = izquierdo superior, II = izquierdo inferior, DS = derecho superior, y DI = derecho inferior) tal y como se muestra en la **Figura 10 B**. El resultado muestra que la más alta expresión se observa al día 5, y la expresión de la proteína de 25 kDa de la vacuna DNA-WT1 tiende a disminuirse conforme avanza el tiempo, sin embargo, la expresión puede observarse levemente expresada en la parte IS y DI al día 15. (**Figura 11**)



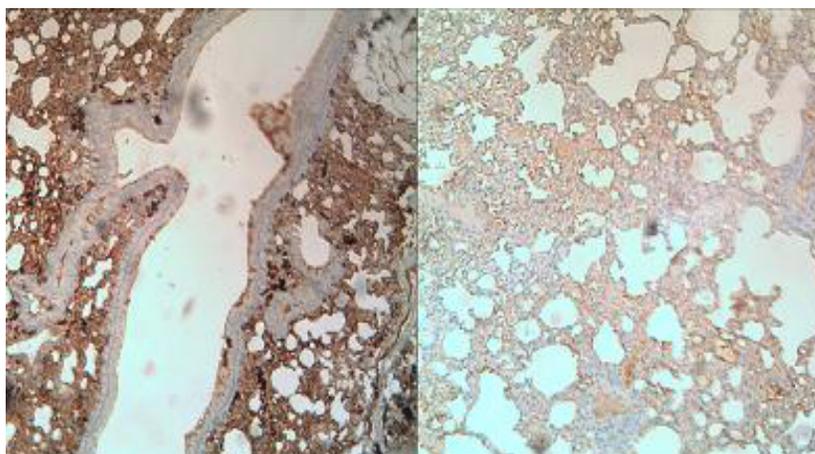
**Figura 10. A) Sistema de nebulización de la vacuna de DNA-WT1 por exposición de nariz. B) Nomenclatura de los segmentos en que se dividieron los pulmones de los ratones incluidos en el tratamiento.**



**Figura 11. Distribución de la vacuna DNA-WT1 en los cuadrantes de pulmones de ratones.**

Western blot con proteínas totales de tejido pulmonar seccionado proveniente de ratones nebulizados con 40  $\mu\text{g}$  de vacuna DNA-WT1 y analizados a los días 5,10 y 15 posterior a la administración. Como control negativo se emplearon pulmones de ratones nebulizados con solución salina.

Posteriormente, para visualizar la expresión de la vacuna DNA-WT1 en el tejido pulmonar de ratones C57BL/6, dos grupos de ratones fueron nebulizados; uno de los grupos fue nebulizado con 40  $\mu\text{g}$  de vacuna DNA-WT1 y el otro grupo con solución salina. Los ratones fueron sacrificados a las 48 horas post-nebulización y el tejido pulmonar fue analizado mediante inmunohistoquímica (**Figura 12**). En la figura se puede observar un incremento en la marca positiva (color café) en comparación al tejido pulmonar control negativo. La marca se caracteriza por ser uniforme y se observa que tiene localización preferentemente citoplasmática. En el tejido pulmonar del control negativo puede observarse el ruido de fondo de la inmunohistoquímica.



**Figura 12. Inmunohistoquímica de tejido pulmonar murino nebulizado con la vacuna DNA-WT1.** Imagen de IHQ de ratones nebulizados con 40  $\mu$ g de vacuna DNA-WT1 y B) IHQ de tejido pulmonar de murino nebulizado con solución salina.

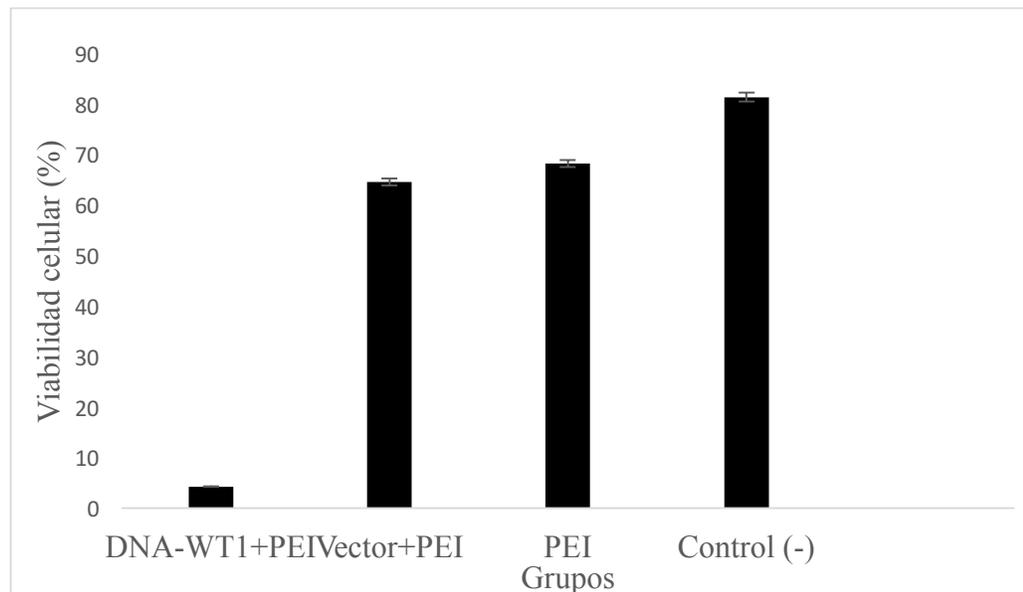
### **8.5 Análisis de la respuesta inmune tras la nebulización de la vacuna DNA-WT1.**

Con la finalidad de analizar la respuesta inmune citotóxica específica tras la inmunización con la vacuna DNA-WT1, fue planeado un ensayo “*ex-vivo*” donde se extrajeron esplenocitos de ratones previamente nebulizados, y posteriormente se incubaron en co-cultivo con células de melanoma murino B16F10, en relación 10:1. Los grupos de ratones nebulizados fueron: vacuna DNA-WT1+PEI, vector+PEI, PEI solo y control negativo (solución salina). En la **Figura 13** se observa una alta actividad citotóxica en el grupo de DNA-WT1+PEI que corresponde al 96% de citotoxicidad, en comparación a los grupos vector+PEI, PEI solo y control negativo los cuales obtuvieron porcentajes de 36%, 32% y 19 %, respectivamente.

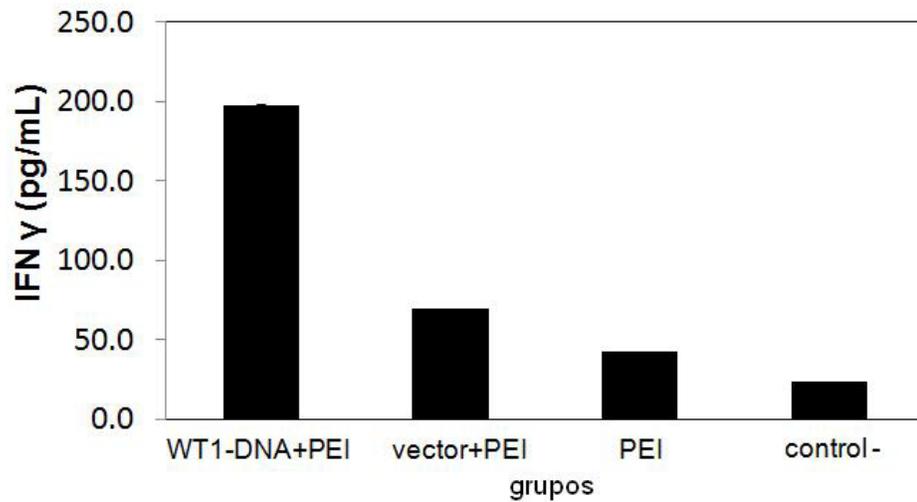
Con la finalidad de confirmar si en el evento citotóxico observado en la **Figura 13**, fue realizado el ensayo anteriormente descrito, a diferencia que fue colectado el sobrenadante a las 4 horas de incubación en co-cultivo, posteriormente las muestras colectadas fueron analizadas por ELISA para obtener la cuantificación de IFN- $\gamma$  en picogramos. Los resultados de este experimento se pueden observar

en la **Figura 14** en la cual se observa una alta producción de IFN- $\gamma$  en la muestra del grupo DNA-WT1+PEI, el cual presentó la concentración de 198 pg/mL, y para los grupos vector+PEI fue de 69 pg/mL, PEI solo de 42 pg/mL y el control negativo (solución salina) de 23 pg/mL.

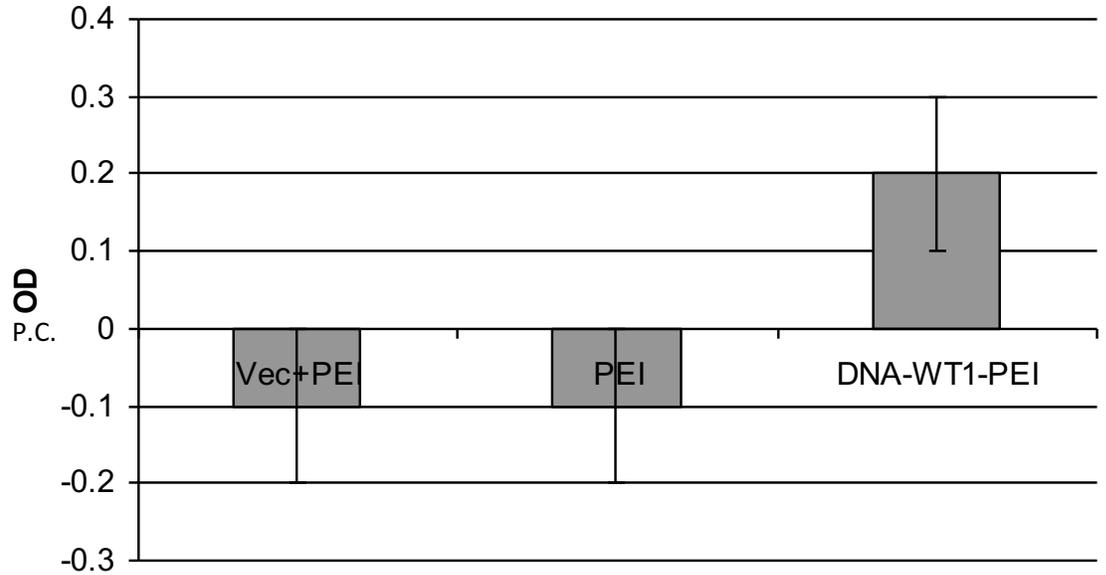
Adicionalmente se realizó un análisis de IgG específica en contra de WT1, tras la inmunización con la vacuna DNA-WT1. Para ello, fueron sanados el día 21 a cada uno de los grupos de ratones que previamente fueron nebulizados al día 0 y 14 con 40  $\mu$ g de vacuna DNA-WT1+PEI. Los grupos incluidos fueron DNA-WT1+PEI, vector+PEI, PEI solo y control negativo (solución salina). En la **Figura 15** se observa un incremento en las unidades relativas de anticuerpos en el grupo DNA-WT1+PEI en comparación a los otros grupos, sugiriendo que la administración vía aerosol de la vacuna DNA-WT1 promueve la generación de anticuerpos específicos contra WT1 a nivel de suero, es decir a nivel sistémico.



**Figura 13. Actividad citotóxica *ex vivo* mediada por esplenocitos en contra de células B16F10.** Después de la administración de la vacuna DNA-WT1+PEI a los ratones, los esplenocitos fueron colectados y sembrados en co-cultivo con las células B16F10, empleando 30,000 esplenocitos por cada 3000 células B16F10 sembradas en placa de 96 pozos y con 24 horas de incubación previa a la combinación. El ensayo se analizó a las 24 horas de incubación. El experimento se realizó por triplicado y en el gráfico se incluyó la desviación estándar.



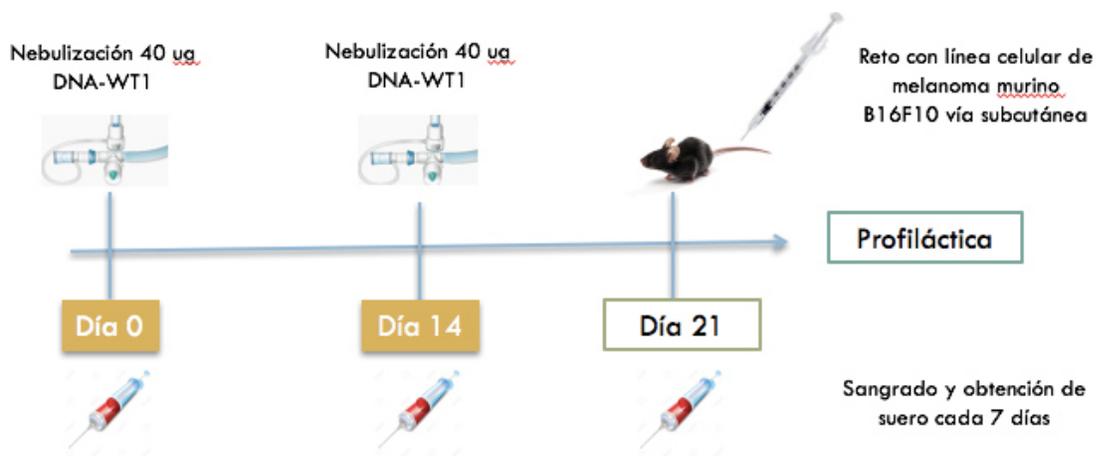
**Figura 14. Producción de IFN- $\gamma$  por esplenocitos incubados con células B16F10.** Para cuantificar la producción de IFN- $\gamma$  fueron incubados los esplenocitos previamente colectados y estos fueron incubados con las células B16F10, empleando 30,000 esplenocitos por cada 3000 células de melanoma sembradas en placa de 96 pozos y con 24 horas de incubación previa a la combinación. Los sobrenadantes de cada uno de los pozos fueron colectados a las 4 horas de incubación y analizados mediante un kit de ELISA de Invitrogen, siguiendo las instrucciones de acuerdo al fabricante. El experimento se realizó por triplicado y en el gráfico se incluyó la desviación estándar.



**Figura 15. Análisis de la producción de IgG específica para WT1 en suero de ratones inmunizados vía aerosol con la vacuna DNA-WT1+PEI.** Los sueros de ratones inmunizados vía aerosol con la vacuna DNA-WT1 colectados al día 7 de iniciada la inmunización y posteriormente fueron analizados mediante un ELISA tipo sándwich. El experimento se realizó por triplicado y en el gráfico se incluyó la desviación estándar.

### **8.6. Evaluación de la actividad profiláctica de la vacuna DNA-WT1 modelo subcutáneo de cáncer.**

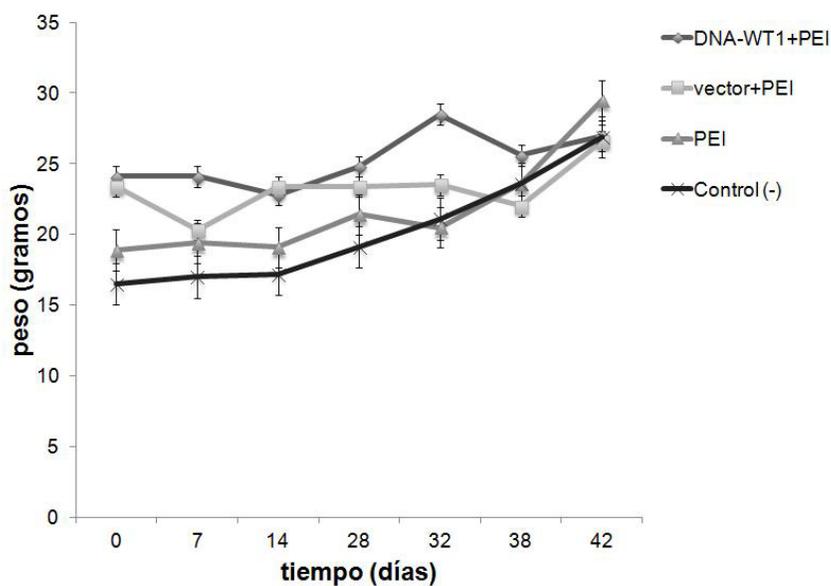
Se realizó el esquema de inmunización descrito en la metodología, nebulizando los grupos de ratones los días 0 y 14 como se muestra en la línea de tiempo de la **figura 16** empleando 40 µg de vacuna DNA-WT1 acompañada con PEI, 40 µg de vector acompañada con PEI, PEI solo y un grupo de ratones control negativo (solución salina).



**Figura 16.** Esquema de inmunización vía aerosol de la vacuna DNA-WT1 evaluando la actividad profiláctica.

Posteriormente a cada ratón se le retó con 500,000 células B16F10 al día 21 y se llevó a cabo el análisis de la evolución del peso en los diferentes grupos de estudio (**Figura 16**), la cinética de crecimiento tumoral (**Figura 17**), así como y el análisis de supervivencia (Figura 18).

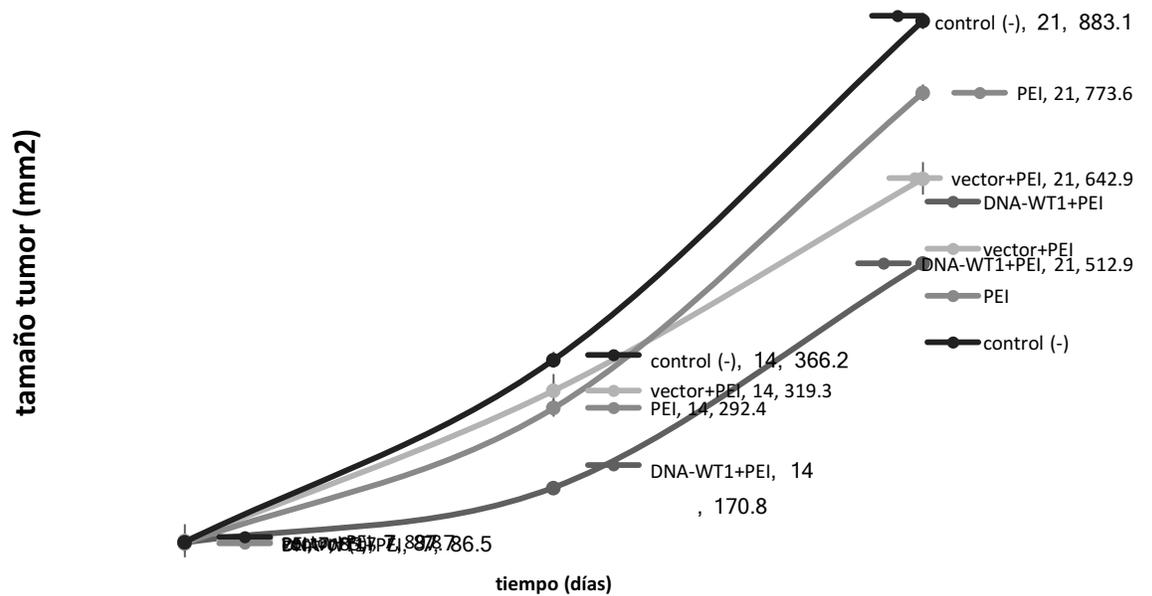
En el análisis de la evolución del peso en los diferentes grupos de estudio no se encontró diferencia significativa en el peso final de los ratones entre los diferentes grupos de experimentación (**Figura 17**).



**Figura 17.** Cinética de peso en ratones nebulizados con la vacuna DNA-WT1 evaluando la actividad profiláctica. La gráfica presenta el record de los pesos promedio de cada uno de los

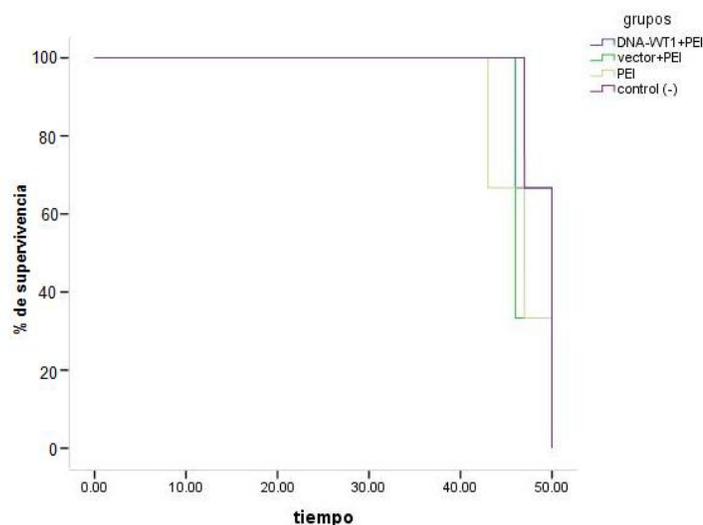
grupos incluidos en el experimento (DNA-WT1+PEI, vector+PEI, PEI solo y control negativo) conforme se desarrolla el experimento (días transcurridos post- inoculación de las células B16F10). En el gráfico se incluye la desviación estándar

A los 7 días después del reto (28 días post inmunización) con células tumorales fue posible visualizar y palpar la masa tumoral en el flanco posterior derecho de los ratones. A partir de ese día se llevó a cabo semanalmente la medición (largo x ancho) para cada individuo con un vernier digital. El grupo de ratones sin tratamiento fue el que mostró un mayor desarrollo tumoral, alcanzando los 600 mm<sup>2</sup> al día 42, en comparación con los grupos nebulizados con los diversos tratamientos. El grupo de ratones nebulizados con la vacuna DNA-WT1 fue el que tuvo un menor tamaño tumoral, además de mostrar un desarrollo más lento con respecto a los días. Al día 42 no se observó una diferencia significativa entre el grupo vacunado con DNA-WT1 y los inmunizados con el vector vacío y usando solamente PEI (**Figura 18**).



**Figura 18. Análisis del crecimiento del tamaño tumoral en el modelo de vacunación profiláctica con la vacuna DNA-WT1.** Durante el desarrollo del experimento fueron recolectados los datos del tamaño de los tumores subcutáneos, estos grupos de ratones fueron previamente nebulizados y divididos en cada uno de los grupos (DNA-WT1+PEI, vector+PEI, PEI y el control negativo (solución salina). En el gráfico se observan los promedios de los tamaños de tumor incluyendo su desviación estándar.

El resultado final del análisis de supervivencia en el ensayo profiláctico aplicando la vacuna DNA-WT1 y posteriormente la inoculación de las células de melanoma murino B16F10, no presentó diferencia significativa entre los otros grupos analizados (**Figura 19**).

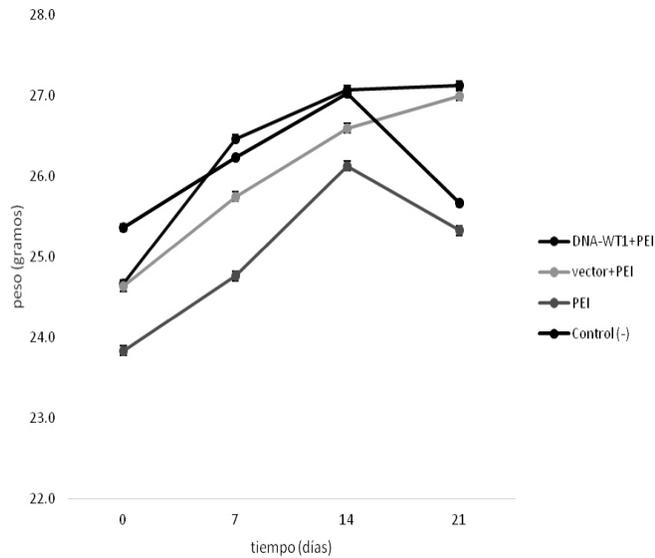


**Figura 19. Gráfico de supervivencia de ratones C57BL/6 inmunizados vía aerosol con vacuna DNA-WT1 en el modelo profiláctico.** El análisis de los datos se realizó mediante el estimado no paramétrico Kaplan Meier, en el programa SPSS Statistics versión 20.

### **8.7. Evaluación de la actividad terapéutica de la vacuna DNA-WT1 modelo subcutáneo de cáncer.**

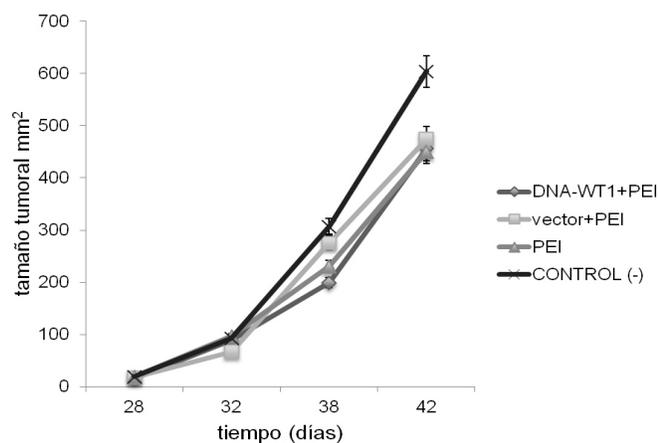
Para analizar el efecto terapéutico de la inmunización con la vacuna DNA-WT1, fue realizado el siguiente experimento con grupos de ratones inoculados con 500,000 células B16F10 en el extremidad posterior derecha, y después fueron nebulizados con cada uno de los tratamientos al día 0 y 14 contando como referencia el día de la inoculación de las células B16F10.

En la Figura 20 se puede observar la cinética del promedio de los pesos de cada uno de los grupos incluidos en el experimento. Como resultado no se observa diferencia significativa en el incremento del peso de los ratones, de los cuales oscilan entre un mínimo de aproximadamente de 24 gramos y un máximo de 27 gramos.



**Figura 20. Cinética de peso en ratones nebulizados con la vacuna DNA-WT1 evaluando la actividad terapéutica.** Como Control negativo se incluyó a ratones nebulizados con solución salina, grupo inmunizado con DNA-WT1+PEI, grupo inmunizado con la vacuna vector+PEI y el grupo inmunizado con PEI.

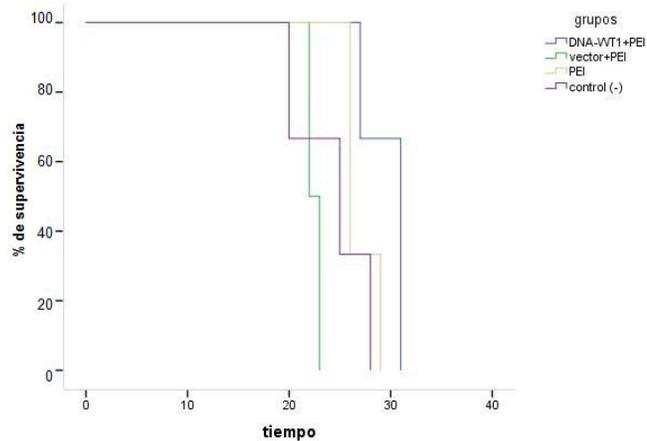
En el análisis del tamaño promedio de la masa tumoral (**Figura 21**), se puede observar un incremento uniforme en todos los grupos incluidos en el experimento y no observándose así diferencia significativa. El resultado muestra una nula respuesta inmune en contra de las células tumorales debido a que se comportan muy similar al control negativo.



**Figura 21. Cinética de crecimiento tumoral en el modelo de vacunación terapéutica con vacuna DNA-WT1.** Como control negativo se incluyó ratones nebulizados con solución salina,

grupo inmunizado con DNA-WT1+PEI, grupo inmunizado con la vacuna vector+PEI y el grupo inmunizado con PEI. En el gráfico se visualiza el promedio del tamaño tumoral incluyendo su respectiva desviación estándar.

En el análisis de la supervivencia en el experimento de la aplicación de la vacuna de DNA-WT1, no se observó diferencia significativa entre los diferentes grupos de tratamiento al ser comparados con la vacunación terapéutica de nuestra construcción.



**Figura 22. Gráfico de supervivencia de ratones C57BL/6 inmunizados vía aerosol con vacuna DNA-WT1 en el modelo terapéutico.** El análisis de los datos se realizó mediante el estimado no paramétrico Kaplan Meier, en el programa SPSS Statistics versión 20.

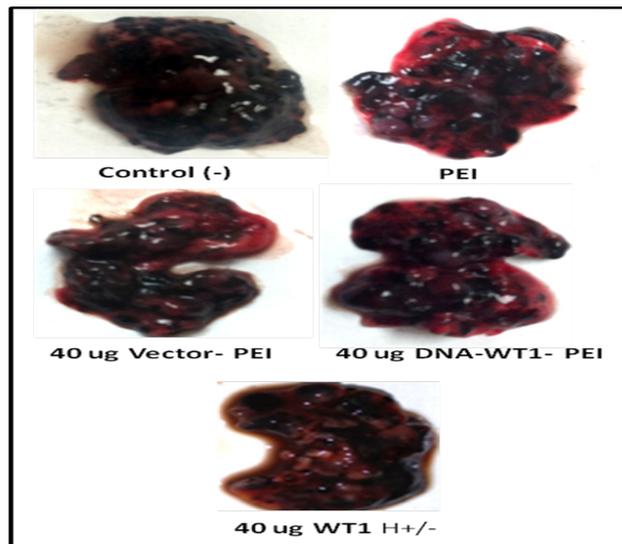
### **8.8. Evaluación de la actividad terapéutica de la vacuna DNA-WT1 en tumores modelo de cáncer pulmonar murino.**

Debido a la ineficacia de la vacunación profiláctica y terapéutica en el modelo de cáncer subcutáneo, pero con el soporte de los resultados observados *in vitro*, se planteó analizar si la administración directa de la vacuna de DNA-WT1 vía aerosol era funcional en un modelo de cáncer pulmonar murino haciendo uso del mismo tipo celular.

Se inocularon  $5 \times 10^5$  células B16F10 de melanoma murino en la vena caudal de la cola de los ratones, pues se ha comprobado en estudios anteriores que la administración de esta línea celular por esta vía produce metástasis directa a pulmón. Posteriormente, a los 3 días post-inoculación de las células

tumorales, se administraron por aerosol en grupos de 3 ratones c/u los siguientes tratamientos: PBS 1X (grupo control), PEI, 40µg Vector-PEI y 40µg de DNA-WT1-PEI. Adicionalmente se incluyó un grupo de ratones que fueron nebulizados con 40µg del plásmido que codifica para la isoforma H+/- de WT1.

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 15**). No se observaron diferencias en el peso de los pulmones ni en la sobrevivencia de los animales.



**Figura 23. Fotografías representativas de los pulmones de los grupos de ratones nebulizados con los diferentes tratamientos.** 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.

### 8.9. Análisis del perfil de citocinas Th1/Th2/Th17 en suero de ratones, tras la administración en aerosol de la vacuna de WT1

La concentración de citocinas Th1, Th2 y Th17 fue analizada en suero de ratones con tumor control e inmunizados con el péptido de WT1-9mer para determinar si éste era capaz de generar una respuesta inmunológica a nivel sistémico. La inmunización con dicho péptido incrementó significativamente los niveles de IL-10 (5 veces más en comparación al grupo control PBS) ( $p=0.006$ ). Por otro lado, se observó una disminución significativa en el nivel de IL-4 ( $p=0.037$ ) y TNF- $\alpha$  ( $p=0.027$ ). Además se observó una disminución no significativa en los niveles de IFN- $\gamma$  e IL-17. La concentración sérica de las citocinas analizadas (expresada en pg/mL se presenta en la **Tabla 3**.

**Tabla 3. Concentración de citocinas en suero de ratones inmunizados contra WT1 por vía pulmonar.**

Grupo	Concentración de citocina (pg/mL)						
	IL-2	IL-4	IL-6	IL-10	IL-17	TNF- $\alpha$	IFN- $\gamma$
<b>PBS</b>	1.9	71.0	42.4	457.9	37.6	196.0	22.9
<b>WT1-9mer</b>	1.8	<b>12.5*</b>	8.8	<b>3050.7**</b>	9.9	<b>11.8*</b>	9.1
<b>DNA-WT1</b>	<b>55.49*</b>	36.32	<b>0.0</b>	60.93	13.46	<b>29.28*</b>	12.51
<b>Tumor sin tratamiento</b>	<b>49.0*</b>	24.5	<b>0.0</b>	43.02	15.57	<b>25.48*</b>	2.12

\*  $p<0.05$ , \*\*  $p<0.01$ , en comparación al grupo control PBS

## 9. DISCUSIÓN

El impacto que tiene el cáncer como una de las principales causas de muerte a nivel mundial, aunado a que las terapias convencionales contra este grupo de enfermedades, en su mayoría son ineficientes en etapas progresivas de la enfermedad, fomenta a la investigación científica y a la propuesta de alternativas terapéuticas efectivas y menos nocivas a los pacientes.

La terapia inmunológica ha demostrado ser una opción terapéutica de primera línea en el tratamiento de neoplasias, debido a su plasticidad para generar una respuesta celular altamente específica a un antígeno en particular y a que esta respuesta se puede generar en el mismo sistema inmune del paciente o de un donador, siendo totalmente funcional y con menores efectos secundarios que las terapias tradicionales.

Actualmente el uso de Antígenos Asociados a Tumor (AAT) ha facilitado el éxito de este tipo de terapias, centralizando la respuesta a un determinado tipo celular o tejido dañado, según sea el origen de la neoplasia. Existen estudios en fase clínica de investigación y algunas terapias inmunológicas ya aprobadas para su uso en humanos que utilizan AAT como blancos terapéuticos y son administradas por vacunación intramuscular y vía intravenosa, sin embargo, la cantidad de inmunizaciones necesarias para generar una adecuada respuesta anti-tumoral es elevada, y debido a la naturaleza de la vacuna tiene consecuencias en los altos costos y dificultades técnicas al momento de aplicar el tratamiento.

La cavidad nasal es uno de los primeros sitios de exposición y ataque hacia patógenos que ingresan al organismo. La eficacia de esta vía de administración radica en diversos factores, de los cuales podemos destacar la cantidad de droga que se deposita más allá de la región orofaríngea, el lugar donde ocurre el depósito y su distribución; así como el tamaño de las partículas inhaladas, las condiciones de respirado, la geometría de las vías respiratorias y los mecanismos

de limpieza mucociliares (Fernández Tena y Casan Clarà, 2012). En un estudio, Phua y colaboradores demostraron que la inmunidad tumoral puede ser inducida tras la administración de mRNA vía nasal, aumentando el potencial de dicha terapia, así como una aproximación hacia la vacunación tumoral no invasiva (Phua et al., 2014).

Existen números reportes de inmunización vía respiratoria para diferentes tipos de enfermedades, incluyendo infecciones virales y bacterianas, además de que el uso de vacunas de DNA muestran una respuesta celular y humoral en contra del antígeno codificado, este tipo de terapias se han probado en modelos de infección de VIH y algunas cepas de virus de Influenza (Yang, 2014; Bivas-Benita, 2010).

Por lo anterior, en el presente trabajo se probó la administración vía aerosol de una vacuna de DNA que codifica para un péptido del gen del tumor de Wilms (WT1), proteína clasificada en primer lugar de los AAT con mejor funcionalidad y especificidad como blanco terapéutico en cáncer, debido a su alta expresión en una gran variedad de neoplasias, tanto de origen hematopoyético como tumores sólidos (Sugiyama, 2010)

El diseño y expresión de la vacuna de DNA-WT1 permitió identificar un péptido de aproximadamente 25-30 kDa, que contiene los epítopes para la activación de linfocitos CD8+ y CD4+, por medio de western blot usando un anticuerpo monoclonal contra WT1, sugiriendo que el funcionamiento de la vacuna como inmunizante sería el adecuado.

La nebulización de 40 ug de vacuna DNA-WT1 tuvo una distribución homogénea, y con una expresión detectable hasta los 15 días post inmunización, esto mediante Western Blot, concordando con lo reportado por Tsuboi, 2000, donde observan expresión de una vacuna de DNA hasta 20 días después de administrar en los ratones.

La sola administración de 40 ug de la vacuna mostró ser suficiente para generar

una respuesta específica de linfocitos CD8+ en células que sobre expresan el AAT WT1 en el ensayo *in vitro*, para la línea celular de melanoma murino B16F10, mostrando una producción significativa de IFN- $\gamma$  (200 pg/mL) en los sobrenadantes de las células tratadas, esto concuerda con lo reportado en la literatura acerca de la liberación de IFN- $\gamma$  por parte de los linfocitos T al reconocer el antígeno, en este caso WT1. Diferentes grupos de trabajo reportan que linfocitos T obtenidos posterior a inmunización con péptidos sintéticos contra WT1 y específicos para CTL CD8+, al ser retados con el antígeno tumoral producen de 150- 300 pg/mL de IFN- $\gamma$ , siendo estos péptidos utilizados en pacientes con cáncer en fase clínica de investigación (Osada, 2009). La producción de IFN- $\gamma$  se correlaciona con el porcentaje de viabilidad observado en la línea celular B16F10 co-cultivada con los esplenocitos obtenidos de las diversas inmunizaciones, resultados apuntan a la especificidad inmunogénica lograda mediante la vacunación vía aerosol de los grupos de tratamiento (Chaise, 2008).

Sin embargo, al probar el modelo de inmunización vía aerosol en el modelo de cáncer pulmonar murino, los resultados no fueron los esperados. El modelo de profilaxis contra desarrollo del tumor tras administrar la vacuna DNA-WT1 vía aerosol no mostró diferencia significativa en el peso y tamaño tumoral final entre los diferentes grupos de tratamiento, sin embargo, el porcentaje de supervivencia de los ratones nebulizados con la vacuna DNA-WT1 fue mayor, alcanzando el 30% de supervivencia a los 34 días post inducción tumoral, en comparación con los otros grupos de tratamiento cuya mortalidad fue del 100% al día 30.

No se observó diferencias significativas en el peso, tamaño tumoral y supervivencia entre los ratones nebulizados con la vacuna DNA-WT1 y los diferentes grupos de estudio.

Recientemente se reportaron resultados similares en modelos de vacunación vía aerosol usando péptidos sintéticos contra WT1 como blanco terapéuticos, así como el uso de CpGs en contra del desarrollo de cáncer pulmonar usando la línea

celular B16F10 de melanoma murino. Arriaga- Hernández en el 2016, concluyó que el uso de los péptidos sintéticos de 9 y 16 mers, ya reportados en uso de fase clínica de investigación en pacientes con diferentes tipos de neoplasias, al ser nebulizados en ratones con metástasis a pulmón no presentan diferencias significativas con los grupos de ratones sin tratamiento evaluando tamaño de tumor, número de focos tumorales, peso de ratones y supervivencia.

Manilla- Muñoz en el 2017, reporta que el uso de una vacuna de DNA que codifica para la proteína completa de WT1, así como los péptidos sintéticos específicos para WT1 usados con CpGs con adyuvantes, no son suficientes para generar una respuesta anti-tumoral en contra del modelo de cáncer pulmonar generado por la línea celular de melanoma murino B16F10, ya que no se observan diferencias significativas en la supervivencia entre los grupos de tratamiento.

La aparente ineficacia de la terapia puede deberse a la baja inmunogenicidad del melanoma murino B16F10 (Baird, JR., 2012). Algunos estudios adjudican esta característica a la baja expresión de MHC I de la propia célula, además de propiciar un microambiente tumoral rico en células T reguladoras, y como consecuencia la acción de linfocitos citotóxicos se ve afectada (Chen et al., 2015).

La depleción de linfocitos T CD4+, la inmunización con AAT y co-estimulación con anti-4-1BB, co-estimulación con IL-12, apuntan a ser estrategias terapéuticas prometedoras para la sensibilización en tumores pobremente inmunogénicos (Fujiwara, 2014; Wilcox R., 2002; Xu D., 2004).

Adicionalmente, se ha reportado que algunas proteínas transportadoras asociadas al procesamiento de antígenos como lo son la TAP1 y TAP2, específicamente en la línea de melanoma murino B16F10 presentan una baja expresión, pudiéndose asociar a una ausencia en el procesamiento de AAT, a la baja expresión de moléculas de MHC I en la superficie y como consecuencia a una casi inexistente inmunogenicidad (Qian et al., 2007).

En el caso particular de melanoma, la terapia inmunológica que ha presentado resultados prometedores es el uso de anticuerpos monoclonales, cuyo uso como un posible adyuvante en algún otro tipo de terapia anti-tumoral, podría potenciar el funcionamiento en conjunto de dos o más vías de ataque (Jazirehi, 2016).

El uso de WT1 en la terapia inmunológica anti cáncer sigue siendo una de las principales líneas de investigación en fase clínica, debido a los resultados tan favorables que se han obtenido en una gama de neoplasias y en etapas avanzadas de la enfermedad. Actualmente la FDA (Food and Drug Administration, USA) se encuentra en proceso de evaluación para la aprobación de una vacuna contra WT1 como segunda línea de tratamiento para el mesotelioma pleural maligno para su uso comercial en pacientes humanos (Sellas Life Sciences, 2016).

Por lo anterior, es necesario el estudio del funcionamiento terapéutico y profiláctico de la vacunación vía aerosol DNA-WT1 en un modelo de cáncer que presente los factores básicos necesarios para poder levantar una respuesta inmunológica antitumoral, a partir de la revisión bibliográfica exhaustiva en el presente trabajo, consideramos al modelo de melanoma murino un modelo neoplásico de estudio complejo para el tratamiento con terapia inmunológica, será necesario conocer más a fondo la biología molecular y funcionamiento inmunológico antes de plantear aplicar una terapia en particular.

## 10. CONCLUSIONES

1. La nebulización de 40 ug una vacuna de DNA-WT1 en ratones C57BL/6 presenta una distribución homogénea en tejido pulmonar y su expresión es detectable hasta 15 días después de la inmunización por medio de Western Blot.
2. La nebulización de 40 ug de una vacuna de DNA-WT1 no genera efectos adversos que comprometan el funcionamiento normal del sistema respiratorio de los ratones tratados.
3. Una sola inmunización de 40 ug de la vacuna DNA-WT1 permitió la generación de una respuesta celular específica contra el antígeno asociado a tumor al probarse en co-cultivo con la línea celular de melanoma murino B16F10, por medio de un ensayo ex vivo.
4. La respuesta celular específica generada a partir de la inmunización vía aerosol de la vacuna DNA-WT1 mostró un efecto citotóxico en la línea células B16F10, por medio de un ensayo ex vivo.
5. La inmunización vía aerosol de ratones C57BL/6 con 40 ug de la vacuna DNA-WT1 semanalmente en un período de un mes, mostró una producción de anticuerpos contra el AAT WT1 en comparación con los sueros de los ratones tratados con el vector vacío, PEI y solución salina.
6. El tratamiento profiláctico de la vacuna DNA-WT1 vía aerosol no mostró diferencias significativas en el peso, tamaño tumoral o supervivencia en comparación a los grupos tratados con el vector vacío, PEI y solución salina, esto en un modelo de cáncer subcutáneo de melanoma murino.
7. El tratamiento terapéutico de la vacuna DNA-WT1 vía aerosol no mostró diferencias significativas en el peso, tamaño tumoral o supervivencia en comparación a los grupos tratados con el vector vacío, PEI y solución salina, esto en un modelo de cáncer subcutáneo con melanoma murino.

8. El modelo de cáncer subcutáneo de melanoma murino generado a partir de la línea celular B16F10 no es apropiado para llevar a cabo terapias inmunológicas basadas en respuesta celular debido a la reportada baja inmunogenicidad de la célula, baja expresión de moléculas de MHC I y disminución de la expresión de proteínas TAP.
  
9. Para validar completamente el funcionamiento *in vivo* de la vacunación profiláctica y terapéutica de nuestra construcción (DNA-WT1 administrado vía aerosol), es necesario aplicar en un modelo de cáncer en el que sea posible que haya interacción celular entre los componentes del sistema inmune y la célula tumoral blanco.
  
10. La vía de inmunización con DNA vía aerosol sugiere una alternativa terapéutica prometedora ya que es capaz de montar una respuesta inmunológica sistémica contra un antígeno específico, siendo de administración no invasiva, sencilla y de relativo bajo costo.

# **BIBLIOGRAFÍA**

## 11. BIBLIOGRAFÍA

1. Arriaga- Hernández D., 2016. Evaluación del efecto antitumoral de una vacuna sintética ccpg administrada vía aerosol en un modelo de cáncer pulmonar (tesis de Maestría en Ciencias con Especialidad en Inmunobiología) Universidad Autónoma de Nuevo León.
2. Astuti, D., Latif, F., Wagner, K., Gentle, D., Cooper, W. N. (2005). Epigenetic alteration at the DLI1 imprinted domain in human neoplasia: analysis of neuroblastoma, pheochromocytoma and Wilms tumor. *Br J Cancer*. 92: 1574-80.
3. Baird JR, Byrne KT, Lizotte PH, et al. Immune-mediated regression of established B16F10 melanoma after intratumoral injection of attenuated *Toxoplasma gondii* protects against rechallenge. *Journal of immunology* (Baltimore, Md : 1950). 2013;190(1):469-478.
4. Bivas-Benita, M., Bar, L., Gillard, G. O., Kaufman, D. R., Simmons, N. L., Hovav, A. H., & Letvin NL (2010). Efficient generation of mucosal and systemic antigen-specific CD8+ T-cell responses by intranasal pulmonary DNA immunization. *Journal of virology*, 84(11), 5764-5774.
5. Boyle, P. (2008). WHO Press. World Cancer Report 2008. [Online] Disponible en: <http://apps.who.int/bookorders/WHP/detart1.jsp?sesslan=1&codlan=1&codcol=76&codcch=26>
6. Broggini, M. (1994). Special conference on 'Growth Factors, Development and Cancer in the 1990s'. Switzerland, March 5–11, 1994. *Annals of oncology*, 5(7), 575-577
7. Chaise, C., Buchan, S. L., Rice, J., Marquet, J., Rouard, H., Kuentz, M., ... & Stevenson, F. K. (2004). Vaccination induces WT1-specific T-cell responses with potential clinical relevance. *Blood*, 112(12), 2964.
8. Cheever MA, Allison JP., Ferris AS., Finn OJ., Hastings BM., Hetch tt., Mellman I., Prindiville SJ., Weiner LM., Matrisian LM. (2009) The prioritization of cancer antigens: a national cancer institute project for the acceleration of translational research. *Clinical Cancer Research* 15: 5233-5237.
9. Coosemans, A., Wölfl, M., Berneman, Z. N., Van Tendeloo, V., Vergote, I., Amant, F., & VAN Cesteren W. (2010). Immunological response after therapeutic vaccination with WT1 mRNA-loaded dendritic cells in end-stage endometrial carcinoma. *Anticancer research*, 30(9), 3709-3714.
10. Davies, R.C., Calvio, C., Bratt, E., Larsson S.H., Lamond, AL., Hastie, N.D. (1998). WT1 interacts with the splicing factor U2AF65 in an isoform-dependent manner and can be incorporated into spliceosomes. *Development*. 6: 3217-3225.

11. Drummond, I. A., Rupprecht, H. D., Rohwer-Nutter, P., Lopez-Guisa, J. M., Madden, S. L., Rausch & Sukhatme, V. P. (1994). DNA recognition by splicing variants of the Wilms' tumor suppressor. *Molecular and cellular biology*, 14(6), 3800-3809.
12. Drummond, I.A., Sukhatme, V.P., Rupprecht H.D., Lopez-Guisa, J.M. (2004). DNA Recognition by variants of the Wilms' tumor suppressor, WT1. *Molecular and Cellular Biology*.p. 3800-3809.
13. Elisseeva, O. A., Oka, Y., Tsuboi, A., Ogata, K., Wu, F., Kim, E. H., ... & Sugiyama, H. (2002). Immune responses against Wilms tumor gene WT1 product in patients with hematopoietic malignancies. *Blood*, 99(9), 3272-3279.
14. Fernández Tena, A., and Casan Clarà, P. (2012). Deposition of inhaled particles in the lungs. *Archives of Bronconeumology*, 48, 240.
15. Fujiki, F., Oka, Y., Kawakatsu, M., Tsuboi, A., Tanaka-Harada, Y. U. K. I. E., Hosen, N., & Sugiyama, H. (2010). A clear correlation between WT1-specific Th response and clinical response in WT1 CT peptide vaccination. *Anticancer research*, 30(6), 2247-2254.
16. Gaiger, A., Reese, V., Disis, M. L., & Cheever, M. A. (2000). Immunity to WT1 in the animal model of acute myeloid leukemia. *Blood*, 96(4), 1480-1489.
17. Hartkamp, J., & Roberts, S. (2008). The role of the Wilms' tumour-suppressor protein WT1 in cancer. *Biochemical Society Transactions*, 36, 629-631.
18. Hashii, Y., Sato, E., Ohta, H., Oka, Y., Sugiyama, H., & Ozono, K. (2010). WT1 peptide immunotherapy for acute myeloid leukemia in children and young adults. *Pediatric blood & cancer*, 55(2), 352-355.
19. Hohenstein, P. y N.D. Hastie, (2006). The many facets of the Wilms' tumour gene, WT1. *Human Molecular Genetics* Spec No 2: R196-201.
20. Hohenstein, P., & Hastie, N. D. (2006). The many facets of the Wilms' tumour gene, WT1. *Human Molecular Genetics*, 15(suppl 2), R196-R201.
21. Jazirehi AR, Lim A, Dinh T. PD-1 inhibition and treatment of advanced melanoma with pembrolizumab. *American Journal of Cancer Research*. 2016;6(10):2117-2128.
22. Keilholz, U., Letsch, A., Busse, A., Asemussen, A. M., Bauer, S., Blau, I. W., ... & Scheibenbogen, C. (2006). A clinical and immunologic phase 2 trial of Wilms tumor gene product 1 (WT1) peptide vaccination in patients with AML and MDS. *Blood*, 113(26), 6541-6548.
23. Kohrt, H. E., Müller, A., Baker, J., Goldstein, M. J., Newell, E., Dutt, S., ... & Strober, S. (2011). Immunization with WT1 peptide augments antileukemic activity after MHC-matched bone marrow transplantation. *Blood*, 118(19), 5319-5329.

24. Maheswaran, S., Englert, C., Bennett, P., Heinrich, G., & Haber, D. A. (1995). The WT1 gene stabilizes p53 and inhibits p53-mediated apoptosis. *Genes & development*, 9(17), 2143-2156.
25. Maheswaran, S., Englert, C., Bennett, P., Heinrich, G., Haber, D.A. (1995). The WT1 gene product p53 and inhibits p53-mediated apoptosis. *Genes & Development*. (9):2143-2156.
26. Manilla- Muñoz E., 2017. Efecto de la vacunación basada en WT1 y ODN-CpG administrados e contra tumores pulmonares y subcutáneos (tesis de Doctorado en Ciencias con Orientación Inmunobiología) Universidad Autónoma de Nuevo León.
27. Maslak, P. G., Dao, T., Krug, L. M., Chanel, S., Korontsvit, T., Zakhaleva, V., ... & Scheinberg, D. A. (2007). Vaccination with synthetic analog peptides derived from WT1 oncoprotein induces T-cell responses in patients with complete remission from acute myeloid leukemia. *Blood*, 116(2), 171-179.
28. Mayo, M. W., Wang, C. Y., Drouin, S. S., Madrid, L. V., Marshall, A. F., Reed, J. C. & Baldwin, A. S. (1997). WT1 modulates apoptosis by transcriptionally upregulating the bcl-2 proto-oncogene. *The EMBO Journal*, 18(14), 3990-4003.
29. McCarty, G., Awad, O., Loeb, D. (2011). WT1 protein directly regulated expression of Vascular Endothelial Growth Factor and is a mediator of tumor response to hypoxia. *JBC*. Vol 286 (51):43634-43643.
30. Menke, A. L., Van der Eb, A. J., & Jochemsen, A. G. (1998). The Wilms' tumor 1 gene: oncogene or tumor suppressor gene? *International review of cytology*, 181, 151-212.
31. Menke, A., McInnes, L., Hastie, N. D., & Schedl, A. (1998). The Wilms' tumor suppressor WT1: a candidate tumor suppressor gene. *Kidney international*, 53(6), 1512-1518.
32. Morita, S., Oka, Y., Tsuboi, A., Kawakami, M., Maruno, M., Izumoto, S., ... & Sakamoto, J. (2006). Phase I/II trial of a WT1 (Wilms' tumor gene) peptide vaccine in patients with solid malignancy: safety as assessed based on the phase I data. *Japanese journal of clinical oncology*, 36(4), 231-236.
33. National Cancer Institute (2012). Cancer Trends Progress Report Update, NIH, DHHS, Bethesda, MD, 2010, [Online]. Disponible en: <http://progressreport.cancer.gov>.
34. Ohno, S., Kyo, S., Myojo, S., Dohi, S., Ishizaki, J., Miyamoto, K. I. & Inoue, M. (2009). Wilms' tumor 1 (WT1) peptide immunotherapy for gynecological malignancy. *Anticancer research*, 29(11), 4779-4784.
35. Ohno, S., Takano, F., Ohta, Y., Kyo, S., Myojo, S., Dohi, S. & Inoue, M. (2011). Frequency of CD8+ T Lymphocytes Can Predict the Efficacy of Wilms' Tumor 1 Peptide Vaccination. *Anticancer research*, 31(12), 2447-2452.
36. Oka, Y., Tsuboi, A., Taguchi, T., Osaki, T., Kyo, T., Nakajima, H. & Sugiyama, H. (2004). Induction of WT1 (Wilms' tumor gene)-specific cytotoxic T lymphocytes by WT1 peptide vaccine and the results of phase I trial. *Journal of clinical oncology*, 22(15), 3447-3452.

- regression. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(38) 13890.
37. Olbryt, M., Jarzab, M., Jazowiecka-Rakus, J., Simek, K., Szala, S., & Sochanik, A. (2006). Gene expression profile of B16 (F10) murine melanoma cells exposed to hypoxic conditions in vitro. *Gene expression* 191-203.
  38. Osada, T., Woo, C. Y., McKinney, M., Yang, X. Y., Lei, G., LaBrecque, H. G., ... & Clay, T. M. Induction of Wilms' Tumor Protein (WT1)-Specific Antitumor Immunity Using a Truncated WT1-E1 Adenovirus Vaccine. *Clinical Cancer Research*, 15(8), 2789-2796.
  39. Phua, K. K., Staats, H. F., Leong, K. W., and Nair, S. K. (2014). Intranasal mRNA nanoparticle vaccine induces prophylactic and therapeutic anti-tumor immunity. *Science Report*, 4, 5128.
  40. Pospori, C., Xue, S. A., Holler, A., Voisine, C., Perro, M., King, J., ... & Morris, E. C. (2011). Specificity of the tumor-associated self-antigen WT1 drives the development of fully functional memory T cells in the absence of vaccination. *Blood*, 117(25), 6813-6824.
  41. Qian F, Li Y-P, Sheng X, et al. PRL-3 siRNA Inhibits the Metastasis of B16-BL6 Mouse Melanoma Cells In Vivo. *Molecular Medicine*. 2007;13(3-4):151-159.
  42. Rezvani, K., Yong, A. S., Mielke, S., Jafarpour, B., Savani, B. N., Le, R. Q., ... & Barrett, A. J. Repeated PR1 and WT1 peptide vaccination in Montanide-adjuvant fails to induce sustained high-affinity epitope-specific CD8<sup>+</sup> T cells in myeloid malignancies. *haematologica*, 96(3), 432-440.
  43. Rezvani, K., Yong, A. S., Mielke, S., Savani, B. N., Musse, L., Superata, J., ... & Barrett, A. J. Leukemia-associated antigen-specific T-cell responses following combined PR1 and WT1 peptide vaccination in patients with myeloid malignancies. *Blood*, 111(1), 236-242.
  44. Sandoval, F., Terme, M., Nizard, M., Badoual, C., Bureau, M. F., Freyburger, L., ... & Tartour, E. Mucosal Imprinting of Vaccine-Induced CD8<sup>+</sup> T Cells Is Crucial to Inhibit the Growth of Mucosal Tumors. *Science translational medicine*, 5(172), 172ra20-172ra20.
  45. Scholz, H., Wagner, K. D., & Wagner, N. (2009). Role of the Wilms' tumour transcription factor WT1 in blood vessel formation. *Pflügers Archiv European Journal of Physiology*, 458(2), 315-323.
  46. Sellas Life Sciences Group. (2016, February 29). SELLAS Life Sciences Announces FDA Orphan Drug Designation for WT1 Cancer Vaccine in Patients with Malignant Pleural Mesothelioma. Retrieved from <http://sellaslifesciences.com/2016/02/sellas-life-sciences-announces-fda-orphan-drug-designation-for-wt1-cancer-vaccine-in-patients-with-malignant-pleural-mesothelioma/>

47. Sociedad Española de Oncología Médica (2012). [Online]. Disponible <http://www.seom.org/infopublico/info-tipos-cancer/que-es-el-cancer-y-como-se-desarrolla>
48. Sugiyama, H. (2005). Cancer immunotherapy targeting Wilms' tumor gene WT1 product. *Expert vaccines*, 4(4), 503-512.
49. Sugiyama, H. (2010). WT1 (Wilms' tumor gene 1): biology and cancer immunotherapy. *Japanese journal of clinical oncology*, 40(5), 377-387.
50. Van Tendeloo, V. F., Van de Velde, A., Van Driessche, A., Cools, N., Anguille, S., Ladell, K., ... & Z. N. (2010). Induction of complete and molecular remissions in acute myeloid leukemia by Wilms antigen-targeted dendritic cell vaccination. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(31) 13829.
51. Wagner, K. D., Wagner, N., & Schedl, A. (2003). The complex life of WT1. *Journal of cell science*, 116, 1653-1658.
52. Wagner, K. D., Wagner, N., Bondke, A., Nafz, B., Flemming, B., Theres, H., & Scholz, H. (2002). The tumor suppressor Wt1 is expressed in the coronary vasculature after myocardial infarction. *The journal*, 16(9), 1117-1119.
53. Wagner, K. D., Wagner, N., Vidal, V. P., Schley, G., Wilhelm, D., Schedl, A., ... & Scholz, H. (2002). Wilms' tumor gene Wt1 is required for normal development of the retina. *The EMBO journal*, 21(10), 1405.
54. Wagner, K., & Roberts, S. (2004). Transcriptional regulation by the Wilms' tumour suppressor protein Wt1. *Biochemical Society Transactions*, 32, 932-935.
55. Wagner, K., & Roberts, S. (2004). Transcriptional regulation by the Wilms' tumour suppressor protein Wt1. *Biochemical Society Transactions*, 32, 932-935.
56. Wagner, K.D., Wagner, N., Vidal, V. P., Schley, G. (2002). The Wilms' tumor gene Wt1 is required for normal development of the retina. *EMBO J.* 21(6): 1398-405.
57. Wagner, K.J. & N. Wagner. (2002). The Wilms' tumor suppressor Wt1 is expressed in the coronary vasculature after myocardial infarction. *FASEB Journal*. 31(6): 732-8.
58. Wagner, K.J. & S.G. Roberts. (2004). Transcriptional regulation by the Wilms' tumour suppressor protein Wt1. *Biochem Soc Trans.* 32(Pt 6): 932-5.
59. Wagner, N., Michiels, J. F., Schedl, A., & Wagner, K. D. (2008). The Wilms' tumour suppressor protein Wt1 is involved in endothelial cell proliferation and migration: expression in tumour vessels in vivo. *Cancer*, 119(26), 3662-3672.

60. Yang, B., Jeang, J., Yang, A., Wu, T. C., & Hung, C. F. (2014). DNA vaccine for cancer immunotherapy. *Human vaccines & immunotherapeutics*, 10(11), 3153-3164
61. Yang, L., Han, Y., Saiz, F. S., & Minden, M. D. (2007). A tumor suppressor and oncogene: the WT1 story. *Leukemia*, 21(5), 868-876.
62. Zamora-Avila, D. E., Franco-Molina, M. A., Trejo-Avila, L. M., Rodríguez-Padilla, C., Resendez-Perez, D., & 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(6), 341.
63. Zamora-Avila, D. E., Zapata-Benavides, P., Franco-Molina, M. A., Saavedra-Alonso, S., Trejo-Avila, L. M., Reséndez-Pérez, D., ... & Rodríguez-Padilla, C. (2009). WT1 gene silencing by aerosol delivery of PEI-RNAi complexes inhibits B16-F10 lung metastases growth. *Cancer Gene Therapy*, 16(12), 892-899.

## **12. AUTOBIOGRAFÍA**

Ana Karina Chávez Escamilla

Candidata para el título de Doctor en Ciencias con Orientación en  
Inmunobiología

### **Título de Tesis**

“EVALUACIÓN DE LA RESPUESTA INMUNE PULMONAR POR LA  
VACUNACIÓN VÍA AEROSOL DE DNA CONTRA WT1 EN UN MODELO  
DE CÁNCER MURINO”

### **Datos Personales**

Nacida en la ciudad de Monterrey, Nuevo León, México el 4 de febrero de  
1988, hija de la Sra. Bertha Alicia Escamilla Lara y el Sr. Jorge Chávez  
Contreras.

### **Educación**

Egresada como Licenciada en Biotecnología Genómica de la Facultad de  
Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León en el 2011.

Egresada como Maestra en Ciencias con Especialidad en Inmunobiología en  
Posgrado de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de  
Nuevo León en el 2013.

### **Artículos Publicados**

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