

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



**EVALUACIÓN DE LA ADMINISTRACIÓN VÍA AEROSOL DE LA
VACUNA SINTÉTICA BASADA EN WT1-CPG EN UN MODELO DE
CÁNCER PULMONAR**

POR

I.B.T. DANIELA ARRIAGA HERNÁNDEZ

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

FEBRERO 2016

**EVALUACIÓN DE LA ADMINISTRACIÓN VÍA AEROSOL DE LA
VACUNA SINTÉTICA BASADA EN WT1-CPG EN UN MODELO DE
CÁNCER PULMONAR**

Comité de Tesis

Director de tesis

Dr. Pablo Zapata Benavides

Secretario

Dra. Cristina Rodríguez Padilla

Vocal

Dr. Moisés A. Franco Molina

Vocal

Dra. Laura María Trejo Ávila

Vocal

Dr. Edgar Mendoza Gamboa

**EVALUACIÓN DE LA ADMINISTRACIÓN VÍA AEROSOL DE LA
VACUNA SINTÉTICA BASADA EN WT1-CPG EN UN MODELO DE
CÁNCER PULMONAR**

DIRECCIÓN DE TESIS

Dr. Pablo Zapata Benavides

Director

AGRADECIMIENTOS

Antes que todo, mi máximo agradecimiento corresponde únicamente para Dios, quien ha sido la piedra angular de cualquier etapa de edificación en mi vida, por cada deseo puesto en mi corazón, así como los medios y fortaleza para cumplirlos.

A mis padres, por el apoyo incondicional, por ser quienes sembraron en mi vida, espero dar frutos dignos de su esfuerzo y trabajo. A mi hermano Miguel Arriaga Hernández por escucharme y estar ahí.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, por el apoyo económico brindado para la realización de mis estudios y manutención.

Agradezco al laboratorio de Inmunología y Virología y a la Dra. Cristina Rodríguez Padilla, por abrirme las puertas para hacer estancias profesionales y abrírmelas una vez más para la realización de este proyecto de maestría.

Al Dr. Pablo Zapata Benavides, por su apoyo de principio a fin en el ámbito académico de este proyecto que es suyo, también por sus regaños y por la convivencia, quiero que sepa que ha tenido parte importante en mi aprendizaje no sólo académico sino también en mi vida personal. Así como a mi comité de tesis por su tiempo y disposición.

Al Laboratorio de Inmunología y Biología Molecular (UAZ) y en especial al Dr. José Bollaín y Goytia de la Rosa, por permitirme trabajar en sus instalaciones y el apoyo tan atento en los análisis por IFI.

A Felipe Torres del Muro, por mostrarme su ciudad, una técnica nueva y por haber apoyado con tanto entusiasmo durante horas en la realización de una parte de este trabajo.

A la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la UANL y al Dr. Armando Trejo de la misma, por su apoyo con el análisis histológico.

A mis compañeros y amigos del LIV: Phillip, Chago, Kary, Evelyn, Ramiro, Ash, por la ayuda material, intelectual y emocional cuando la necesitaba, los quiero. También a Edgar Manilla, Erikita (por todo el apoyo brindado con la citometría de flujo y siempre con una sonrisa), Edgar Pacheco, Tavo, Sara, Willy, Karlita.

A mis tíos Gloria Cantú y Ricardo Velázquez, Jorge Banda y Liz Ojeda, por abrirme las puertas de su casa y hacerme sentir en familia.

Por último pero no menos importante, infinitas gracias a mi novio y mejor amigo Baldomero Vizcarra Valdes, por estar ahí para apoyarme cuando más lo necesitaba y ser un respiro en medio de tanto estrés y trabajo. Te amo.

DEDICATORIA

A Dios, mi dulce fiel amigo...

Y a mi familia, mis padres Daniela Hernández Coronado y Miguel Arriaga Ramírez,
quienes siempre han estado con sus sabios consejos y ejemplo de vida.

TABLA DE CONTENIDO

RESUMEN.....	XIV
ABSTRACT.....	XV
1. INTRODUCCIÓN	1
1. ANTECEDENTES.....	2
1.1 Cáncer.....	2
1.2 Cáncer de pulmón.....	3
1.2.1 Epidemiología.....	4
1.3 Melanoma maligno.....	6
1.3.1 Epidemiología.....	8
1.4 Terapias contra cáncer.....	9
1.5 Inmunoterapias	11
1.5.1 Inmunoterapia pasiva.....	12
1.5.2 Inmunoterapia activa	13
1.5.2.1 Vacunas	14
1.5.2.2 Vías de administración.....	14
1.5.2.3 Aerosol.....	16
1.5.2.4 Mecanismo inmune.....	16
1.5.2.5 Inmunidad en mucosas del tracto respiratorio.....	19
1.6 Gen Wt-1	20
1.6.1 Estructura de WT-1.....	20
1.6.2 WT-1 en cáncer	22
1.6.3 WT1 en cáncer de pulmón	22
1.6.4 WT1 en melanoma	23
1.6.5 Epítopes inmunodominantes.....	23
1.7 Oligodeoxinucleótidos CpG's	25
2. JUSTIFICACIÓN.....	27
3. HIPÓTESIS.....	28
4. OBJETIVOS.....	29
4.1 Objetivo General	29
4.2 Objetivos Particulares.....	29
5. MATERIALES Y MÉTODOS	30
5.1 Estrategia experimental	30

5.2	Cultivo celular	31
5.3	Oligodeoxinucleótidos CpG	31
5.4	Péptidos inmunodominantes de WT1.....	31
5.5	Formulación de complejos PEI-CpG y péptido-CpG.....	32
5.6	Transformación de bacterias <i>E. coli</i> TOP10 con plásmido H+/-	32
5.7	Estimulación de ratones C57Bl/6 con CpG vía aerosol	33
5.8	Análisis de la expresión de TLR9 en pulmón de ratón C57BL/6.....	33
5.9	Análisis histológico de pulmones post-estimulación con CpG.....	34
5.10	Expresión de CD3, CD19, CD20, CD80 y CD69 en tejido pulmonar de ratones estimulados con CpG.....	35
5.11	Análisis de citocinas en suero de ratones post-estimulación con CpG.	36
5.12	Aislamiento de células mononucleares de bazo de ratón.	36
5.13	Evaluación de la endocitosis de complejos CpG-péptido “ <i>in vitro</i> ”	36
5.14	Ensayo de fagocitosis por FITC-Dextran.....	37
5.15	Especificidad antigénica de péptidos de WT1 <i>in vitro</i>	37
5.16	Inducción de tumor.....	37
5.17	Inmunización	38
5.18	Medición del peso de ratones	38
5.19	Obtención de peso promedio de pulmones e índice tumoral.....	39
5.20	Análisis de la respuesta inmune en ratones inmunizados mediante cuantificación de citocinas	39
5.21	Análisis estadístico	39
6.	RESULTADOS	40
6.1	Expresión de TLR9 en tejido pulmonar de ratones C57BL/6	40
6.2	Análisis histológico de pulmones de ratones estimulados con CpG	41
6.3	Expresión de CD3, CD19, CD20, CD80 y CD69 en tejido pulmonar de ratones estimulados con CpG.....	48
6.4	Análisis de citocinas post-estimulación con CpG.	59
6.5	Internalización de Complejos CpG-péptido	63
6.6	Fagocitosis FITC-Dextran	66
6.7	Especificidad antigénica de péptidos de WT1 <i>in vitro</i>	67
6.8	Establecimiento del modelo de metástasis pulmonar con las células B16F10..	68
6.9	Medición del peso de ratones con tumor pulmonar	69
6.10	Diseccción de pulmones de ratones inoculados	70
6.11	Índice tumoral.....	72
6.12	Análisis de supervivencia.....	73
6.13	Análisis de la respuesta inmune en ratones inmunizados mediante cuantificación de citocinas.	74
7.	DISCUSIÓN	77

8. CONCLUSIONES	84
9. PERSPECTIVAS.....	86
BIBLIOGRAFÍA.....	87

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla

Tabla 1. Incidencia, mortalidad y prevalencia a 5 años de cáncer a nivel mundial en 2012.	9
Tabla 2. Monitoreo de la respuesta inmune para ensayos clínicos.	12
Tabla 3. Eventos de relevancia histórica para la inmunología moderna de cáncer.	17
Tabla 4. Unión de péptidos de WT1 a moléculas H-2D ^b	24
Tabla 5. Clasificación de características histológicas en segmentos pulmonares de ratones estimulados con CpG.	46

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura

Figura 1. Incidencia estimada de cáncer a nivel mundial en 2012, ambos sexos.....	4
Figura 2. Mortalidad estimada de cáncer a nivel mundial en 2012, ambos sexos.....	5
Figura 3. Vía de procesamiento de antígeno MHC clase I.	18
Figura 4. Ubicación anatómica y vías migratorias de células dendríticas pulmonares.....	19
Figura 5. Estructura del gen WT1 y sus productos.....	21
Figura 6. Expresión de la proteína TLR9 en pulmón de ratón C57BL/6 por WB, β -actina como control endógeno.....	40
Figura 7. Análisis de Densitometría de la expresión de TLR9/ β -actina en biopsia de pulmón control y nebulizado con PEI, CpG DSL03, 1826, y en combinación con PEI.	41
Figura 8. Histología de pulmón control.	42
Figura 9. Histología de pulmón nebulizado con PEI.	42
Figura 10. Histología de tejido pulmonar nebulizado con scramble-2395.	43
Figura 11. Histología de pulmón estimulado con CpG 2395.	43
Figura 12. Histología de pulmón estimulado con CpG 1826.....	44
Figura 13. Histología de tejido pulmonar estimulado con CpG DSL03.....	44
Figura 14. Histología de tejido pulmonar estimulado con CpG 1826-PEI.	45
Figura 15. Histología de tejido pulmonar estimulado con CpG DSL03-PEI.	45
Figura 16. IFI de tejido pulmonar de ratones control y CpG DSL03.A) anti-CD3-FITC B) Dapi C) Traslape.	48
Figura 17. Histograma de células CD3+ en tejido pulmonar de ratones control y tratados con CpG.	49

Figura 18. Gráfico de análisis de Medias de células CD3+ con unidades de decisión del 95%.	49
Figura 19. IFI de tejido pulmonar de ratones control y tratados con CpG. A) anti-CD19-PE B) Dapi C) Traslape	50
Figura 20. Histograma de células CD19+ en tejido pulmonar de ratones control y tratados con CpG.	52
Figura 21. Gráfico de análisis de Medias de células CD19+ con unidades de decisión del 95%.	52
Figura 22. IFI de tejido pulmonar de ratones control y tratados con CpG. A) anti-CD20-FITC B) Dapi C)Traslape.	53
Figura 23. Histograma de células CD20+ en tejido pulmonar de ratones control y tratados con CpG.	55
Figura 24. IFI de tejido pulmonar de ratones control y tratados con CpG. A) anti-CD80-FITC B) Dapi C)Traslape.	56
Figura 25. Histograma de células CD80+ en tejido pulmonar de ratones control y tratados con CpG.	56
Figura 26. IFI de tejido pulmonar de ratones control y tratados con CpG. A) anti-CD69-FITC B) Dapi C)Traslape	57
Figura 27. Histograma de células CD69+ en tejido pulmonar de ratones control y tratados con CpG.	58
Figura 28. Nivel de IL-10 en suero de ratones estimulados con CpG y control.	59
Figura 29. Nivel de IL-4 en suero de ratones estimulados con CpG y control.	60
Figura 30. Nivel de IL-6 en suero de ratones estimulados con CpG y control.	60
Figura 31. Nivel de TNF en suero de ratones estimulados con CpG y control.	61
Figura 32. Nivel de IFN- γ en suero de ratones estimulados con CpG y control.	61
Figura 33. Nivel de IL-2 en suero de ratones estimulados con CpG y control.	62
Figura 34. Nivel de IL-17A en suero de ratones estimulados con CpG y control.	62

Figura 35. Internalización de complejos CpG-FITC : Péptido en células B16F10 y células adherentes de bazo de ratón.	63
Figura 36. Análisis de internalización de complejos CpG-FITC : Péptido en células B16F10.	64
Figura 37. Análisis de internalización de complejos CpG-FITC : Péptido en células adherentes de bazo de ratón.	65
Figura 38. Histograma de porcentaje de internalización de complejos CpG:Péptido en células adherentes de bazo de ratón ($p<0.05$).	66
Figura 39. Captación de FITC-Dextran por células adherentes de bazo de ratón tras la estimulación con CpG.	67
Figura 40. Especificidad antigénica <i>in vitro</i>	68
Figura 41. Inducción de metástasis pulmonar en ratón C57BL/6.....	68
Figura 42. Peso de ratones con tumor pulmonar control y tratados.	69
Figura 43. Comparación de pulmones de grupos control y tratados al final del ensayo.....	71
Figura 44. Peso de pulmones de ratones control y tratados con tumor.	72
Figura 45. Índice tumoral de ratones control y tratados.	73
Figura 46. Análisis de supervivencia de ratones con tumor pulmonar y tratados.	74
Figura 47. Niveles de citocinas TH2 en suero de ratones post-vacunación.	75
Figura 48. Niveles de citocinas TH1 en suero de ratones post-vacunación.	76
Figura 49. Niveles de IL-17 en suero de ratones post-vacunación.	76

LISTA DE SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS

ARN	Ácido ribonucleico
ELISA	Ensayo inmunoabsorbente ligado a enzima
PEI	Polietilenimina
TLR-9	Receptor tipo Toll 9
WT1	Tumor de Wilms 1
x g	Fuerzas relativas gravitacionales
IV	Intravenosa
µg	Microgramos
µL	Microlitros
MHC	Complejo Mayor de Histocompatibilidad
CSCs	Células Madre de Cáncer
CTL	Linfocitos T citotóxicos
DTCs	Células Tumorales Diseminadas
VIH	Virus de Inmunodeficiencia Humana
Mm	Milímetros
H&E	Hematoxilina y Eosina
HLA	Antígeno leucocitario humano
Aa	Aminoácidos
ADN	Ácido desoxirribonucleico
PBMCs	Células mononucleares de sangre periférica
TBS-T	Buffer salino Tris- Tween
IFN	Interferón
mL	Mililitros
mM	milimolar

RESUMEN

El producto del gen de WT1 es un factor de transcripción tipo dedos de zinc, que se encuentra sobre expresado en diversos tipos de neoplasias (leucemias y tumores sólidos), por ejemplo: melanoma y cáncer de pulmón. Su expresión restringida en tejido normal lo convierte en un blanco atractivo para inmunoterapia en cáncer. El objetivo de este trabajo fue determinar si la administración vía aerosol de la vacuna sintética basada en epítopes T CD8+ y T CD4+ específicos de WT1, en combinación con CpG, era capaz de inducir una respuesta antitumoral en un modelo de cáncer pulmonar B16F10 en ratones C57BL/6. Se nebulizó cada CpG para evaluar su efecto a nivel local y sistémico en ratones C57BL/6; se estudió su capacidad para estimular “*in vitro*” (fagocitosis e internalización de complejos Péptido:CpG-FITC). Finalmente se evaluó el efecto de la vacuna en el modelo de tumor en pulmón en ratones C57BL/6. La vacuna se administró a los tres días de la inducción tumoral (3 vacunas en un espacio de 5 días). En el análisis de la administración de los diferentes CpG en pulmón normal de ratón se observó la formación de infiltrados celulares en tejido pulmonar siendo el CpG 2395 el más significativo; en la activación de las citocinas Th1 y Th2, el CpG 1826 incrementó significativamente los niveles de IL-10 e IL-4 en suero, en contraste el CpG 2395 no mostró efecto alguno comparado con el control negativo; en cuanto a la estimulación de la expresión de la proteína TLR9 solamente fue observada con el CpG 1826. El CpG fue utilizado para formar complejos con los péptidos de WT1-9mer y 16 mer, lo cual mejoró su internalización en células fagocíticas y no fagocíticas. En los ratones con tumor post-vacunación no se observaron cambios en el peso, índice tumoral ni supervivencia. La vacunación con el péptido WT1-9mer incrementó de forma significativa los niveles en suero de IL-10 y disminuyó los niveles de IL-4 y TNF- α . Sugiriendo que la inmunización con CpG 2395 y los péptidos de WT1 (reconocidos por T CD8+ y T CD4+) vía aerosol, no fue suficiente para levantar una respuesta contra tumor en pulmón, adjudicado al modelo pobremente inmunogénico de melanoma B16F10, donde la presentación de antígeno por parte de dichas células es afectada por la subexpresión de proteínas transportadoras asociadas al procesamiento de antígeno (TAP 1 y 2).

ABSTRACT

The product of WT1 gene is a zinc finger transcription factor is overexpressed in different types of tumor, not only in several leukemia cell lineages but also in solid tumors. Its restricted expression in normal tissue makes it an attractive target for cancer immunotherapy. The aim of this study is to determine whether an aerosolized peptide vaccine with WT1- specific T CD8+ and T CD4+ epitopes in combination with CpG is able to induce an effective antitumor response against a lung cancer B16F10 model. CpG was aerosolized in order to evaluate its effect, locally and systemically, in C57BL/6 mice. CpG's ability to stimulate phagocytic activity and peptide:CpG-FITC internalization was evaluated on murine cells "in vitro". Finally, the vaccine effect was evaluated in the tumor model in C57BL/6 mice. The vaccine administration was carried out three days after tumor induction (three total vaccinations were applied, every 5 days each). Within CpG administration analysis in normal lung tissue, cellular infiltration was observed, being CpG 2395 the most significant treatment, regarding TH1 and TH2 cytokine activation, CpG 1826 increased significantly IL-10 and IL-4 serum levels, in contrast CpG 2395 did not show any effect compared to untreated group; concerning stimulation of TLR9 expression, it was only observed after CpG 1826 stimuli. CpG was used to form complexes with WT1-9 mer and 16 mer peptides, which improved its internalization within phagocytic and non-phagocytic cells. Post-vaccination effects on weight, tumor index and survival of treated mice were not observed. WT1-9mer peptide vaccination increased IL-10, and decreased IL-4 and THF- α serum levels significantly. Suggesting that CpG 2395 and WT1-9:16 mer aerosolized immunization could not elicit a sufficient immune response against a lung induced tumor due to the poorly immunogenic B16F10 melanoma model; where B16F10 antigen presentation is primarily affected by a down-regulation in the TAP 1-2 (Transporter associated with antigen processing) expression.

1. INTRODUCCIÓN

La inmunoterapia en cáncer ha tenido una posición sobresaliente en la prevención y tratamiento de cáncer. En este tipo de terapia, el sistema inmune es activado para eliminar células cancerosas y células madre de cáncer (CSCs) que son resistentes a quimioterapia, radioterapia y terapias moleculares dirigidas.

La proteína del gen de Tumor de Wilms (WT1) es un blanco atractivo para inmunoterapia en cáncer. El tumor de Wilms 1 (WT1) es un factor de transcripción tipo dedos de zinc, que se encuentra sobre-expresado en muchos tumores. Su expresión restringida en tejido normal lo convierte en un blanco prometedor para inmunoterapias novedosas cuyo objetivo es acentuar la respuesta de linfocitos T citotóxicos (CTL) contra cáncer.

El pulmón es un sitio atractivo para la entrega/distribución de vacunas terapéuticas, ya que es accesible, tiene una extensa área superficial y es altamente celular y vascularizado para facilitar la presentación del antígeno.

La terapia vía pulmonar resulta prometedora en la mitigación de problemas de seguridad de las vacunas y en reducir la necesidad de agujas y personal capacitado para usarlas.

En el presente estudio, se implementaron varias estrategias para diseñar una vacuna eficiente con dos péptidos inmunodominantes de WT1, uno restringido a MHC I para linfocitos T citotóxicos CD8+ (CTLs), y otro MHC II para inducir respuesta específica de linfocitos T CD4+, en combinación con CpG como adyuvante, los cuales tienen un papel central en la respuesta inmune celular.

2. ANTECEDENTES

2.1 Cáncer

El cáncer es una enfermedad caracterizada por el crecimiento descontrolado de células con material genético dañado que no ha podido ser reparado y no es dirigido a apoptosis; además, se puede generar metástasis, lo cual ocurre cuando las células cancerosas entran al torrente sanguíneo o a los vasos linfáticos, invadiendo otros tejidos (Hanahan and Weinberg, 2000).

La carcinogénesis es un proceso que se define como la capacidad que adquiere la célula para multiplicarse descontroladamente e invadir otros órganos. Esta ocurre en diferentes etapas; la primera, se da cuando existe una mutación del material genético de la célula, transmitiendo a su descendencia la mutación; en la segunda etapa, ocurre la transformación maligna y la tercera etapa es llamada de progresión de la lesión local a enfermedad general (Senra, 2002). El daño o mutación mencionada puede ser por un aumento en la expresión de los genes involucrados en la división celular o por una pérdida de función de los genes que la frenan.

Además, el cáncer puede ser causado por factores exógenos, como agentes químicos, físicos y biológicos, así como por factores endógenos tal es el caso de factores hereditarios, inmunitarios, hormonales, nutritivos o relacionados a la alimentación.

Debido a esto, se ha demostrado que es una enfermedad multifactorial; según la OMS en una nota descriptiva del 2014, aproximadamente un 30% de las muertes por cáncer se deben a cinco factores de riesgo comportamentales y alimentarios como son el índice de masa corporal elevado, consumo insuficiente de frutas y verduras, falta de actividad física, consumo de tabaco y alcohol y, por lo tanto, pueden prevenirse. (OMS, 2014).

La mayor causa de muertes relacionadas a cáncer es el crecimiento metastásico de células tumorales diseminadas, lo cual puede ocurrir años o incluso décadas

después de un exitoso tratamiento del tumor primario mediante cirugía y tratamientos adyuvantes.(Páez et al., 2012)

La metástasis es un proceso multifacético complejo, en el cual las células tumorales malignas se diseminan del tumor primario a órganos secundarios. Las células tumorales adquieren un fenotipo invasivo para invadir el tejido estromal e irrumpir en el endotelio vascular. Una vez que llega a la sangre, las células tumorales diseminadas (DTCs) deben sobrevivir en el ambiente en circulación y escapar los daños físicos y ataques del sistema inmune. Después de que las células tumorales arrestan o se adhieren a las paredes de los vasos, invaden a través de la pared capilar (extravasación). Finalmente, las DTCs se deben adaptar al nuevo microambiente del sitio secundario y empezar a formar micro-metástasis o reprogramarse en un estado quiescente que puede durar años. (CE et al., 2008)

2.2 **Cáncer de pulmón**

Se cree que el cáncer de pulmón surge después del desarrollo de una serie de cambios patológicos progresivos, a los cuales se les conoce como lesiones precursoras o pre-neoplásicas, en la mucosa respiratoria. (Holland et al., 2010)

Diferentes etapas son necesarias para la expresión del fenotipo maligno, el cual se caracteriza por una heterogeneidad de tumor distinta.

Desde la perspectiva histopatológica y biológica, el cáncer de pulmón es una neoplasia compleja. La clasificación histológica se basa en el análisis de tumores de pulmón por microscopía con técnicas de tinción estándar y guías publicadas por la Organización Mundial de la Salud. Las neoplasias de pulmón se clasifican generalmente por la región mejor diferenciada del tumor y calificadas por la región menos diferenciada. Se divide por su histopatología en cáncer de pulmón de células pequeñas, el cual constituye aproximadamente el 20% de los casos reportados, y en cáncer de células no pequeñas, al que se le adjudican el 80% de los casos; este último se divide en adenocarcinoma, de células escamosas y células largas. (Holland et al., 2010;Minna et al., 2004)

En contraste con otros tumores sólidos comunes, el cáncer de pulmón no tiene métodos bien establecidos para su detección temprana y la mayoría de los casos son diagnosticados en etapas avanzadas. Recientemente, se ha mejorado el conocimiento sobre la biología del cáncer de pulmón, llevando al descubrimiento de potenciales blancos moleculares y al desarrollo de agentes novedosos que inhiban su actividad; lo cual se traduce en una mejora en la supervivencia del paciente y en su calidad de vida. (Hollandet al., 2010)

2.2.1 Epidemiología

El cáncer de pulmón es la principal causa de muerte en cuanto a cáncer se refiere. En 2012, 8.2 millones de muertes fueron por cáncer y 1.59 millones de ellas, por cáncer de pulmón. Como ya se mencionó existen diversos factores que otorgan predisposición a padecer cáncer, el tabaquismo es el factor de riesgo que por sí solo provoca un mayor número de casos y a nivel mundial causa aproximadamente un 22% de las muertes por cáncer y un 71% de las muertes por cáncer de pulmón, acorde con la Organización Mundial de la Salud, 2014. (OMS, 2014)

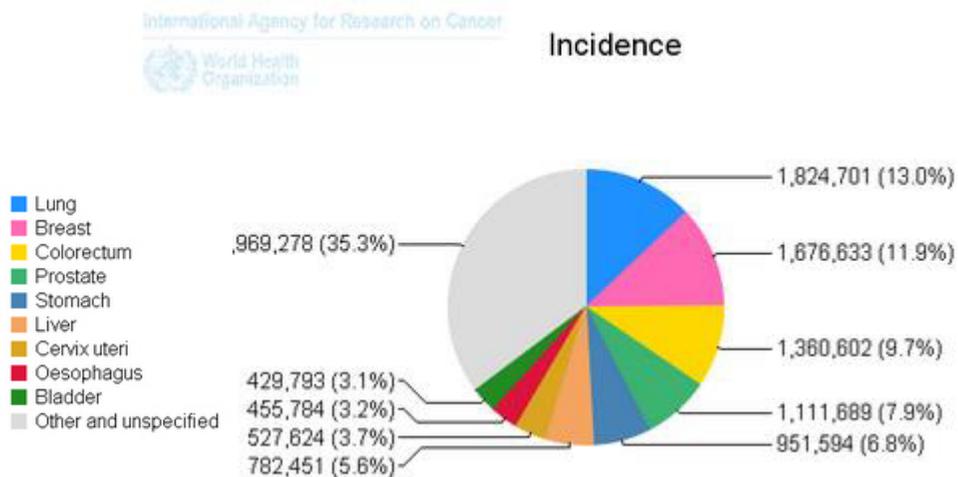


Figura 1. Incidencia estimada de cáncer a nivel mundial en 2012, ambos sexos.

Mortality

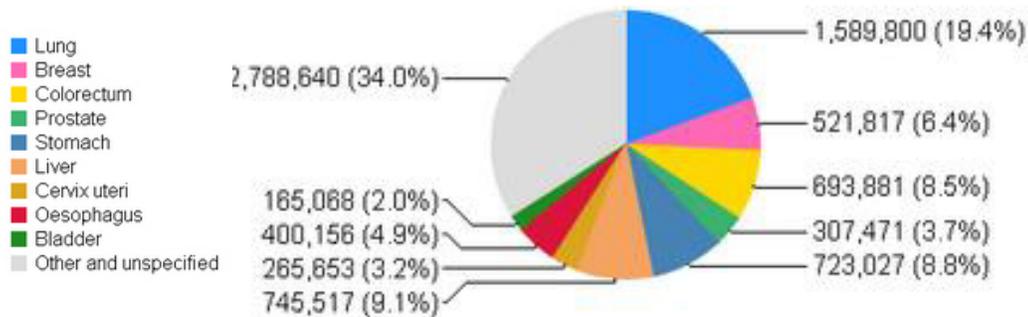


Figura 2. Mortalidad estimada de cáncer a nivel mundial en 2012, ambos sexos

Se han observado ciertas diferencias en la epidemiología del cáncer de pulmón entre los países más desarrollados y los menos desarrollados. En los más desarrollados, los índices de incidencia y mortalidad, en general, están declinando en lo que a hombres respecta y en mujeres ha empezado a permanecer constante, reflejando previas tendencias en la prevalencia de fumadores. En contraste, hay ciertas poblaciones en países menos desarrollados donde se prevé que los índices de cáncer de pulmón sigan incrementando, debido al uso endémico de tabaco. Una mayor proporción de casos de cáncer de pulmón se atribuye a causas fuera del humo de tabaco en países menos desarrollados, particularmente en mujeres. Mundialmente, la mayoría de los pacientes con cáncer de pulmón son diagnosticados después de que la enfermedad ha progresado a un estado avanzado. A pesar de los avances en quimioterapia, la prognosis para los pacientes con cáncer de pulmón sigue siendo pobre, con 5 años de supervivencia relativa, para menos del 14% de los hombres y para menos del 18% de las mujeres, en la mayoría de los países. Dado el incremento en la incidencia de cáncer de pulmón en países menos desarrollados y a la carencia actual de un tratamiento efectivo para cáncer de pulmón avanzado, estos resultados resaltan la necesidad de reformas de tabaco para así reducir el

problema de la alta incidencia de cáncer de pulmón. (Youlden, Cramb and Baade, 2008)

2.3 Melanoma maligno

El melanoma es un tumor derivado de la proliferación de melanocitos atípicos con o sin la capacidad de producir pigmento, caracterizado por su gran capacidad de metástasis. Se presenta principalmente en la piel pero se puede presentar en otros órganos.(Goldstein and Goldstein, 2001)

Existen cuatro tipos histológicos, melanoma con propagación/extensión superficial, melanoma nodular o de crecimiento radial, melanoma acrolentiginoso y melanoma lentigo maligno.(Göhl, Hohenberger and Merkel, 2009)

Requena y colaboradores describen los tipos de melanoma de la siguiente manera (Herrera Ceballos et al., 2007):

El melanoma de extensión superficial tiene la tendencia a crecer inicialmente con predominio en la fase de crecimiento radial y una extensión centrífuga y sin tendencia a invadir la dermis o crecer verticalmente. Consiste en una placa de coloración abigarrada con bordes irregulares; en casos de aparición de un nódulo, es signo de que se ha iniciado la fase de crecimiento vertical.

Partiendo de este fenómeno de aparición de nódulo, el melanoma nodular se caracteriza por tener un crecimiento vertical desde estadios muy precoces de su desarrollo. Es una lesión tumoral exofítica, negra o de pigmentación irregular, raramenteacrómico y frecuentemente ulcerado, constituye la forma clínica de peor pronóstico.

El tipo histológico lentigo maligno, denominado clásicamente melanosis precancerosa de Dubreuilh o peca melanótica de Hutchinson, es una lesión que se origina en las áreas de piel foto-expuesta de la cara de personas de edad avanzada con daño actínico crónico. Al igual que el resto de los melanomas primarios, empieza por una fase de melanoma *in situ*; consiste en una mácula de

pigmentación desigual, con bordes irregulares y geográficos y en su evolución suelen desarrollarse áreas de regresión espontánea. Se caracteriza por ser una lesión de crecimiento lento y con el paso del tiempo aparece un nódulo, el cual es indicador de la fase de crecimiento vertical como ya fue mencionado anteriormente.

El melanoma acrolentiginoso es parecido al lentigo maligno, pero localizado en zonas de piel acral, como el lecho ungueal, los dedos de manos y pies o las palmas y las plantas. Es la única forma de melanoma que es más frecuente en individuos de raza negra y también se inicia como una mácula de coloración desigual y bordes irregulares. De acuerdo con Clark, el melanoma acrolentiginoso sería un melanoma más agresivo que el melanoma lentigo maligno.

El melanoma es el tipo de cáncer de piel más agresivo y es resistente a la mayoría de las modalidades de terapia, se dice que puede ser a prueba de un sin número de drogas quimioterapéuticas, debido a su resistencia intrínseca a sufrir apoptosis y a la reprogramación de su proliferación y vías de supervivencia durante la progresión del mismo. (Soengas and Lowe, 2003)

Las estrategias terapéuticas utilizadas para abordar este tipo de neoplasia son primeramente la extirpación quirúrgica de la lesión (Herrera Ceballos et al., 2007), sin embargo puede ser insuficiente debido al crecimiento vertical antes mencionado, que le otorga la capacidad para producir metástasis. Debido a esto, los nódulos linfáticos proximales que resultan clínicamente positivos, son removidos en pacientes menores de 60 años y con lesiones entre 1.5 y 4 mm de grosor; en pacientes con tumores más gruesos, la remoción de nódulos linfáticos no trae mejoras en su pronóstico, ya que es un indicador de la propagación de la enfermedad. (Goldstein and Goldstein, 2001)

En casos de enfermedad avanzada o con metástasis, se utiliza tratamiento adyuvante con interferón, el cual sigue siendo controversial en pacientes con melanoma metastásico, debido a que en ciertos casos no representa ningún

beneficio; por lo que no existe ningún tratamiento estándar para pacientes con metástasis haematogénica.(Goldstein and Goldstein, 2001;Kroon and Nieweg, 2000).

2.3.1 Epidemiología

Es la principal causa de muerte en pacientes con cáncer de piel. En hombres, generalmente ocurre en el área del tronco, mientras que en mujeres hay mayor incidencia de melanomas en las extremidades. Es comúnmente una enfermedad exclusiva de adultos, sin embargo, ocurre en niños que presentan ya sea nevi gigante congénito o atípicos o síndrome nevi displásico, también cuando el infante presenta una condición heredable de anormalidad en la reparación del DNA (xeroderma pigmentosum) lo que conduce a múltiples cáncer de piel a temprana edad. (Goldstein and Goldstein, 2001)

En Estados Unidos, la American Cancer Society estima que alrededor de 76 100 casos nuevos de melanoma serán diagnosticados en el 2014. Comprende menos del 2% de casos en lo que a cáncer de piel concierne, a pesar de ello, la mayoría de las muertes por cáncer de piel se le adjudican a melanoma. Su incidencia es rara en afroamericanos, su riesgo de desarrollar melanoma a lo largo de su vida es de 0.1% comparado con el 2.4% de probabilidad en personas de piel blanca. Las tasas de incidencia son mayores en mujeres que en hombres antes de los 45 años, pero a la edad de 60 años, la tasa en hombres es más del doble que en mujeres, y alcanzando los 80 años la tasa se triplica. (ACS, 2014)

Sin embargo, en América Latina no existen estadísticas fidedignas sobre la incidencia de melanoma.

Según la OMS, en el 2012 se estimaban alrededor de 232 130 casos de melanoma en el mundo, teniendo el mayor porcentaje de mortalidad con un 19.4% del total de casos de melanoma, como se presenta en la siguiente tabla (OMS, 2014):

Tabla 1. Incidencia, mortalidad y prevalencia a 5 años de cáncer a nivel mundial en 2012.

Cancer	Incidence			Mortality			5-year prevalence		
	Number	(%)	ASR (W)	Number	(%)	ASR (W)	Number	(%)	Prop.
Lip, oral cavity	300373	2.1	4.0	145328	1.8	1.9	702149	2.2	13.5
Nasopharynx	86691	0.6	1.2	50828	0.6	0.7	228698	0.7	4.4
Other pharynx	142387	1.0	1.9	96090	1.2	1.3	309991	1.0	6.0
Oesophagus	455784	3.2	5.9	400156	4.9	5.0	464063	1.4	8.9
Stomach	951594	6.8	12.1	723027	8.8	8.9	1538127	4.7	29.6
Colorectum	1360602	9.7	17.2	693881	8.5	8.4	3543582	10.9	68.2
Liver	782451	5.6	10.1	745517	9.1	9.5	633170	1.9	12.2
Gallbladder	178101	1.3	2.2	142813	1.7	1.7	205646	0.6	4.0
Pancreas	337872	2.4	4.2	330372	4.0	4.1	211544	0.7	4.1
Larynx	156877	1.1	2.1	83376	1.0	1.1	441675	1.4	8.5
Lung	1824701	13.0	23.1	1589800	19.4	19.7	1893078	5.8	36.5
Melanoma of skin	232130	1.6	3.0	55489	0.7	0.7	869754	2.7	16.8
Kaposi sarcoma	44247	0.3	0.6	26974	0.3	0.3	80395	0.2	1.5
Breast	1676633	11.9	43.3	521817	6.4	12.9	6255391	19.2	240.8
Cervix uteri	527624	3.7	14.0	265653	3.2	6.8	1547161	4.8	59.6
Corpus uteri	319605	2.3	8.3	76155	0.9	1.8	1216504	3.7	46.8
Ovary	238719	1.7	6.1	151905	1.9	3.8	586624	1.8	22.6
Prostate	1111689	7.9	31.1	307471	3.7	7.8	3923668	12.1	151.2
Testis	55266	0.4	1.5	10351	0.1	0.3	214666	0.7	8.3
Kidney	337860	2.4	4.4	143369	1.7	1.8	906746	2.8	17.5
Bladder	429793	3.1	5.3	165068	2.0	1.9	1319749	4.1	25.4
Brain, nervous system	256213	1.8	3.4	189394	2.3	2.5	342914	1.1	6.6
Thyroid	298102	2.1	4.0	39769	0.5	0.5	1206075	3.7	23.2
Hodgkin lymphoma	65950	0.5	0.9	25469	0.3	0.3	188538	0.6	3.6
Non-Hodgkin lymphoma	385741	2.7	5.1	199630	2.4	2.5	832843	2.6	16.0
Multiple myeloma	114251	0.8	1.5	80015	1.0	1.0	229468	0.7	4.4
Leukaemia	351965	2.5	4.7	265461	3.2	3.4	500934	1.5	9.6
All cancers excl. non-melanoma skin cancer	14090149	100.0	182.3	8201030	100.0	102.4	32544633	100.0	626.7

Incidence and mortality data for all ages. 5-year prevalence for adult population only. ASR (W) and proportions per 100,000.

2.4 Terapias contra cáncer

Existen diversos tratamientos contra los distintos tipos de cáncer, los más utilizados son la cirugía, la cual se usa para diagnosticar cáncer, determinar su estado y tratarlo, mediante la cual se extrae tanto el cáncer como tejido adyacente; este tipo de terapia no suele ser suficiente dependiendo del tipo de cáncer, así como su estado y tamaño. A manera de ejemplo, aún en la actualidad el uso de cirugía en pacientes con cáncer de células pequeñas sigue siendo controversial, debido a que en ciertos pacientes no trae consigo beneficio alguno, pero tomando en cuenta ciertos criterios de selección de pacientes, se presume

que puede brindar una mayor supervivencia, principalmente en pacientes con esta enfermedad en etapa I y II. (Stamatis, 2014)

Un método físico altamente utilizado es la radioterapia, el cual usa ondas de alta energía para dañar o matar células cancerosas y prevenir su crecimiento. Es un tratamiento local para eliminar o erradicar tumores, sin embargo no es útil cuando el tumor ha generado metástasis a otros órganos. El principal inconveniente de esta terapia es que la radiación no es específica para las células cancerosas y también daña a células sanas, además de que se ha observado en estudios *in vivo* que esta terapia puede activar vías oncogénicas en glioblastoma por ejemplo. (Falk et al., 2014)

Otro tipo de tratamiento convencional es la quimioterapia, la cual consiste en utilizar fármacos para provocar la muerte de las células cancerosas. Este tipo de fármacos afecta tanto células normales como cancerosas, lo que contribuye a su toxicidad. Las células que tienden a ser más afectadas son las que se encuentran normalmente en replicación rápida, tal es el caso de las células de médula ósea y la pared del intestino.

A principios de los años 1900s, el famoso químico alemán Paul Ehrlich estableció el desarrollo de drogas para tratar enfermedades infecciosas. Fue quien acuñó el término “quimioterapia” y la definió como el uso de químicos para tratar enfermedades. Fue también la primera persona en documentar la efectividad de modelos animales para demostrar el potencial activo de una serie de químicos contra enfermedades, un logro que tuvo una ramificación mayor hacia el desarrollo de drogas contra el cáncer. También trabajó en un modelo de conejo usando arsénicos para tratar la sífilis; pero estaba interesado en drogas para tratamiento de cáncer, incluyendo la anilina y los agentes alquilantes primitivos, pero sin tener ilusiones de éxito. (DeVita and Chu, 2008)

La cirugía y radioterapia dominaban el campo de la terapia contra el cáncer en los años 1960s hasta que resultó evidente que las tasas de curación, después de cada vez más tratamientos radicales locales, se estancaba en un 33% debido a la

presencia de micro-metástasis previa, información nueva mostró que la combinación de quimioterapia podía curar pacientes con cáncer avanzado. Esta observación abrió la oportunidad para aplicar drogas en conjunto con los tratamientos de cirugía o radiación para lidiar con el problema del micro-metástasis. (DeVita and Chu, 2008)

2.5 Inmunoterapias

La inmunoterapia surge de la necesidad de crear tratamientos que suplan las deficiencias de los tradicionales en cuanto a especificidad concierne, basándose en el principio de que el sistema inmune por sí mismo tiene una especificidad exquisita que puede ser entrenada para enfocarse y hacer blanco en células cancerosas sin dañar células sanas.

Este tipo de terapia ha sido bien documentada desde 1890 cuando Coley demostró que los productos bacterianos tenían beneficios en cánceres inoperables y la subsecuente aplicación de otros inmuno-estimulantes mostró beneficios que llevaron a la aprobación regulatoria para su uso en ciertos tumores sólidos (McCarthy, 2006)

La inmunoterapia en cáncer fue ignorada hasta mediados del siglo pasado, cuando tumores inducidos químicamente de cruces de ratones entre la misma cepa presentaban una resistencia a trasplante predecible y regresiones espontáneas de numerosos tumores humanos sólidos sugirieron que la regresión tumoral podía conseguirse a través de nuevos enfoques inmunológicos emergentes.(Waldmann, 2003)

La principal tarea de la inmunoterapia tumoral es incrementar la respuesta del huésped contra cualquier antígeno asociado a tumor y su modulación hacia funciones efectoras de citotoxicidad, así como la iniciación de tal reactividad en el lugar deseado. (Mellman, Coukos and Dranoff, 2011)

Para evaluar la efectividad de una inmunoterapia es necesario hacer un monitoreo inmunológico.

Existen diversos métodos para determinar la frecuencia y función de células T específicas de antígeno. Los linfocitos CD8+ pueden ser detectados mediante péptidos que se unan a multímeros MHC, por citocinas en ensayos de inmunospot, o mediante tinción de citocinas intracelulares y citometría de flujo.(Berzofsky et al., 2004)

Tabla 2. Monitoreo de la respuesta inmune para ensayos clínicos.

Assay	Advantages	Disadvantages	Sensitivity
Proliferation	Technically simple	Unable to enumerate specific cells; measures predominantly CD4, not CD8, T cells	
Tetramer staining	Quantitative cell number; subset analysis possible	Requires synthesis of specific tetramers; not a measure of functional activity; limited to single epitopes	1:10 ⁴
Cytokine flow cytometry	Quantitative cell number; functional assay; subset analysis possible	Requires incubation; unable to obtain live cells after assay; technically complicated	1:5 × 10 ⁴
ELISA	Functional assay	No phenotypic information on responding cells; unable to enumerate specific cells; bystander activation	
ELISPOT	Quantitative cell number; functional assay	No phenotypic information on responding cells; bystander activation	1:10 ⁵
Cytotoxicity	Functional assay; relative cell quantitation	Requires autologous tumor/targets; in vitro stimulations required; unable to enumerate specific cells	
RT-PCR	Universal reagents; indirect measure of function	Measures mRNA, not protein; unable to enumerate specific cells; requires several steps (time consuming)	1:10 ⁵
Limiting dilution	Quantitative cell number; functional assay	Labor intensive; requires multiple stimulations; detects only cells that can proliferate	1:10 ⁵

Progress on new vaccine strategies for the immunotherapy and prevention of cancer (Berzofsky et al., 2004)

La inmunoterapia se divide en dos grandes enfoques, la inmunoterapia pasiva y la activa.

2.5.1 Inmunoterapia pasiva

La inmunoterapia pasiva se refiere a aquella donde reactivos inmunológicos como suero, células o productos de células, de los cuales se cree que tienen actividad antitumoral, son administrados a huéspedes con tumores.

En 1888, Emil Roux y Yerson, aislaron la toxina diftérica del *Corynebacterium diphtheriae*, lo cual proporcionó la base científica para los trabajos de Emil von Behring y Kitasato, quienes inyectaron pequeñas dosis de la toxina diftérica a animales con el objetivo de coleccionar el suero que contenía los anticuerpos o la también llamada “antitoxina”, la cual era administrada y proporcionaba a los pacientes una inmunidad pasiva contra la difteria. (Waldmann, 2003)

En 1982, Miller y colaboradores usaron un anticuerpo monoclonal anti-idiotípico capaz de inducir remisión en pacientes con linfoma de células B, siendo ésta la primera aplicación efectiva de la terapia con anticuerpos monoclonales contra una malignidad humana. (Miller et al., 1982). Sin embargo, la eficiencia de este tipo de anticuerpos era baja, debido a que se trataba de anticuerpos monoclonales murino, los cuales generalmente no matan las células blanco ya que no se unen al sistema de complemento en humanos ni desencadenan una citotoxicidad celular mediada por anticuerpos, además de que presentan inmunogenicidad en humanos y por tanto, tienen una vida media muy corta *in vivo*. Por esta razón, investigadores han creado anticuerpos monoclonales humanizados; algunos ejemplos de este tipo de anticuerpos utilizados actualmente en cáncer son el Bevacizumab (Avastin), cuyo blanco es la proteína involucrada en angiogénesis VEGF, Cetuximab (Erbix) cuyo blanco es EGFR, Ado-trastuzumab emtansine (Kadcyla/TDM-1) que es un anticuerpo anti-HER2 que se encuentra unido a una droga llamada DM1, Brentuximab (Adcetris) un anti-CD30 (localizado en linfocitos) usado para tratar linfoma de Hodgkin, entre otros. (Scott, Wolchok and Old, 2012)

2.5.2 Inmunoterapia activa

La inmunoterapia activa alude a las situaciones en que el huésped es estimulado para producir una respuesta inmune que directa o indirectamente pueda llegar a causar la muerte de las células tumorales.

La estimulación no específica con bacterias o componentes de las mismas fue el primer intento de inmunoterapia que demostró una eficacia antineoplásica en la clínica, como ya fue mencionado con el pionero Dr. Coley, en base a sus experimentos, actualmente el tratamiento estándar para cáncer superficial de vejiga en etapas tempranas, es la administración de Bacillus Calmette-Guerin (BCG) (Askeland et al., 2012), pero su baja eficacia y toxicidad significativa llevó a la búsqueda del potencial inmunoestimulador de bacterias y sus derivados, como es el caso de los oligodeoxinucleótidos CpG. (Krieg, 2003)

Otro tipo de inmunoterapia activa que ha tenido auge en las últimas décadas es el uso de vacunas que buscan activar el sistema inmune contra el crecimiento y diseminación de células cancerosas.

2.5.2.1 Vacunas

Los mayores avances a la fecha son las vacunas con antígenos asociados a tumor, que son capaces de estimular la respuesta específica de células T, algunos antígenos utilizados son antígenos específicos de tumor, proteínas resultado de mutaciones, antígenos virales en cáncer asociados con virus y antígenos que se encuentran diferencialmente expresados en tumor. (Waldmann, 2003)

En este aspecto y haciendo referencia a melanoma, se han probado vacunas para estimular el sistema inmune en pacientes con metástasis, los resultados de Nestle y colaboradores indican que la vacunación con células dendríticas autólogas generadas a partir de sangre periférica, es segura y prometedora para el tratamiento de melanoma metastásico. (Nestle et al., 1998) En 2001, Wolchok y Livingston, abordan tres tipos de vacunas que se encuentran en fase clínica III para tratamiento de melanoma, siendo estas las celulares alogénicas y autólogas, así como las vacunas en base a carbohidratos.(Wolchok and Livingston, 2001)

2.5.2.2 Vías de administración

La vía de administración es un aspecto muy importante a tomar en cuenta cuando de vacunas se trata, ya que la potencia de la respuesta inmune inducida, así como la supervivencia del antígeno, dependen de ésta; por lo tanto, es un componente crítico para un programa de inmunización exitoso.

Existen cinco rutas usadas en la administración de vacunas. La primera de ellas es la oral, las vacunas administradas vía oral tienen el potencial de llevar la inmunización a un nivel fundamentalmente nuevo; este tipo de vacunas son atractivas para inmunizar poblaciones en países desarrollados por muchas razones, primero debido a que jeringas y agujas contaminadas son problemas

mayores tanto para los trabajadores de salud como para la seguridad medio ambiental, ya que países en vías de desarrollo tienen una prevalencia alta de VIH y hepatitis B y C. (Simonsen, et. al., 1999). Sin embargo, vacunas administradas por esta ruta han mostrado ser menos inmunogénicas cuando son administradas a infantes, niños o adultos en bajas condiciones socioeconómicas en países subdesarrollados que cuando son administradas en países industrializados, lo que radica en las condiciones de la barrera intestinal de los individuos. (Levine, M., 2010).

En la vía intramuscular, las inyecciones son administradas en el tejido muscular bajo la dermis y del tejido subcutáneo. Todas las vacunas inactivadas, a excepción de una formulación de vacuna con polisacárido de meningococo (MPSV4), son administradas vía intramuscular. Sólo existen dos sitios recomendados para administración IM de vacunas, que son el *músculo vastus lateralis* (muslo anterolateral) y el músculo deltoide (en la parte superior del brazo). El inyectar estas zonas reduce la probabilidad de involucrar estructuras neurales o vasculares, y el lugar depende de la edad del individuo y del grado de desarrollo muscular. Esta administración optimiza la inmunogenicidad de la vacuna y minimiza las reacciones adversas en el sitio de inyección. (Zuckerman, 2000)

Por otro lado las vacunas subcutáneas son administradas en el tejido adiposo, el cual se encuentra debajo de la dermis y sobre el tejido muscular. Los sitios subcutáneos recomendados para vacunación son la parte superior del tríceps del brazo (para personas de 12 meses o mayores). Debido a la pobre vascularización en la capa subcutánea, la movilización del antígeno, así como su procesamiento será más lento, lo cual puede llevar a que la vacuna no sea exitosa, como la vacuna de la rabia, hepatitis B y de influenza, donde la inyección subcutánea conduce a tasas bajas de seroconversión y a una disminución rápida de respuesta de anticuerpos. (Poland, et. al., 1997).

2.5.2.3 Aerosol

Actualmente, la única vacuna administrada vía pulmonar es la vacuna atenuada de influenza (LAIV), la cual se administra dentro de un dispositivo de spray especial.

Además, Maytal et. al. demostraron que la administración de una vacuna de DNA acomplejada con PEI, es capaz de inducir una respuesta de células T CD8+ y CD4+ específica tanto a nivel pulmonar como a nivel sistémico que puede proteger contra patógenos pulmonares como contra infecciones iniciadas en otros tejidos asociados a mucosas. (Bivas-Benita et al., 2010)

2.5.2.4 Mecanismo inmune

El conocimiento actual sobre la estructura del MHC y de los péptidos que se unen a él, así como del descubrimiento de la secuencia de los residuos de anclaje necesarios para la especificidad de unión de los péptidos a la molécula de MHC ha provisto la respuesta de cómo las células T reconocen antígenos en forma de pequeños péptidos (8-10 aminoácidos), en conjunto con el conocimiento de las secuencias de aminoácidos de los epítopes tumorales han alentado y facilitado el uso de péptidos como agentes terapéuticos en el tratamiento de cáncer, sin embargo, los péptidos individuales sólo serán útiles en pacientes con las moléculas apropiadas de HLA capaces de presentar dicho péptido. (Berzofsky et al., 2004)

Tabla 3. Eventos de relevancia histórica para la inmunología moderna de cáncer.

Investigator(s)	Year(s)	Discovery or Theory
Louis Pasteur	1859	Microbes, refuting spontaneous generation
Robert Koch*	1876	Microbial basis of disease (anthrax, tuberculosis)
Ilya Metchnikoff*	1883	Cellular theory of immunity (phagocytes)
Emil von Behring* & Shibasaburo Kitasato	1890	Discovery of antibodies (antitoxins)
William B. Coley	1891	Treatment of human cancer with bacteria and bacterial filtrates
Paul Ehrlich*	1897–1901	“Side chain” theory of antibody specificity “Horror autotoxicus”
Karl Landsteiner*	1901	Serologic discovery of blood groups
Carl Jensen & Leo Loeb	1901–1908	Studies of transplantable tumors in mice
Emil von Dungern & Ludwik Hirszfeld	1910	Heritability of blood group antigens
Clarence Little	1914	Genetic basis for rejection of transplantable tumors
Leonell Strong & Clarence Little	1915–1920	Establishment of inbred strains of mice
Peter Gorer	1936	Serological identification of erythrocyte II antigen which determined injection of tumor transplants
George Snell* & Peter Gorer	1948	Discovery of histocompatibility antigens as the basis for transplantation rejection
Richmond Prehn & Joan Main	1957	Immune rejection of transplanted syngeneic chemically-induced tumors
Lewis Thomas & McFarlane Burnet	1959	The theory of immune surveillance of cancer
H.B. Hewitt	1976	Lack of demonstrable immunogenicity of spontaneous tumors
George Koehler* & Caesar Milstein*	1975	Monoclonal antibodies
Lloyd Old & colleagues	1975	Discovery of TNF
Robert North	1981	The role of suppressor T cells in limiting tumor immunity
Thierry Boon	1983	Rejection of poorly immunogenic spontaneous tumors after immunization with mutagenized tumors

La vía de procesamiento de antígeno MHC clase I actúa como un mecanismo de vigilancia para detectar cualquier proteína anormal o extraña que está siendo sintetizada en la célula.

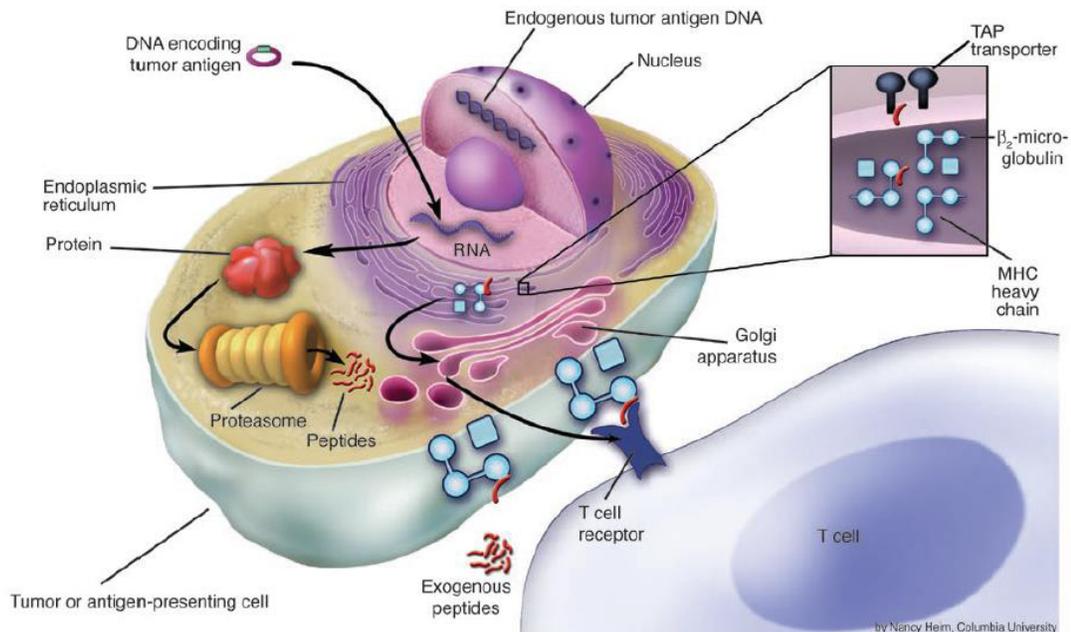


Figura 3. Vía de procesamiento de antígeno MHC clase I.

Las células T reconocen sus epítopes cuando son presentados en el contexto de moléculas de MHC, por lo que estos deben ser procesados por el inmunoproteosoma de la célula blanco, transportados al lumen del retículo endoplasmático vía el transportador asociado al antígeno a procesar (TAP), cargado a moléculas MHC recién sintetizadas y ser conducidos a la superficie celular antes de poder ser reconocidos. Los linfocitos T CD8+ reconocen péptidos de alrededor de 9 aminoácidos presentados por moléculas de MHC clase I (HLA A, B, C en humanos), mientras que los receptores T CD4+ reconocen fragmentos peptídicos de mayor longitud unidos a moléculas de MHC clase II (HLA-DR, DP, DQ). (Berzofsky et al., 2004)

Potenciales epítopes peptídicos son identificados mediante el uso de algoritmos que incorporan la definición de los motifs de unión de los péptidos para múltiples alelos HLA clase I y II. Por ejemplo, está bien establecido que los péptidos clase I deben tener entre 8-10 aa y que ciertos aminoácidos son preferidos en las posiciones de anclaje (posición 2 o 3). Los péptidos que se unen a HLA-A2 generalmente contienen una L o M en la posición 2 y una V o L en la posición 9 o 10. Mientras que el HLA clase II permite mayor promiscuidad, pero también

requiere numerosas posiciones de anclaje. (Berzofsky et al., 2004; Kaufman and Wolchok, 2007)

2.5.2.5 Inmunidad en mucosas del tracto respiratorio

La respuesta inmune adaptativa contra patógenos que ingresan en el cuerpo mediante las vías respiratorias inicia en múltiples locaciones. Los tejidos linfoides en dichas regiones incluyen dos grupos de nódulos linfoides encapsulados, que tienen función en la región superior (pasajes nasales) e inferior (pulmones) del tracto respiratorio. Durante las infecciones los productos microbianos son adquiridos de las vías respiratorias y pasajes nasales por una estrecha red de células dendríticas respiratorias que residen en el epitelio y lámina propia de los pulmones. (Cauley and Lefrançois, 2013)

Las células dendríticas desempeñan un papel esencial en la defensa contra infecciones y cáncer en los pulmones, esto en base a su posición anatómica que les permite crear una interfase celular funcional entre el medio externo y el microambiente pulmonar interno. (Condon et al., 2011)

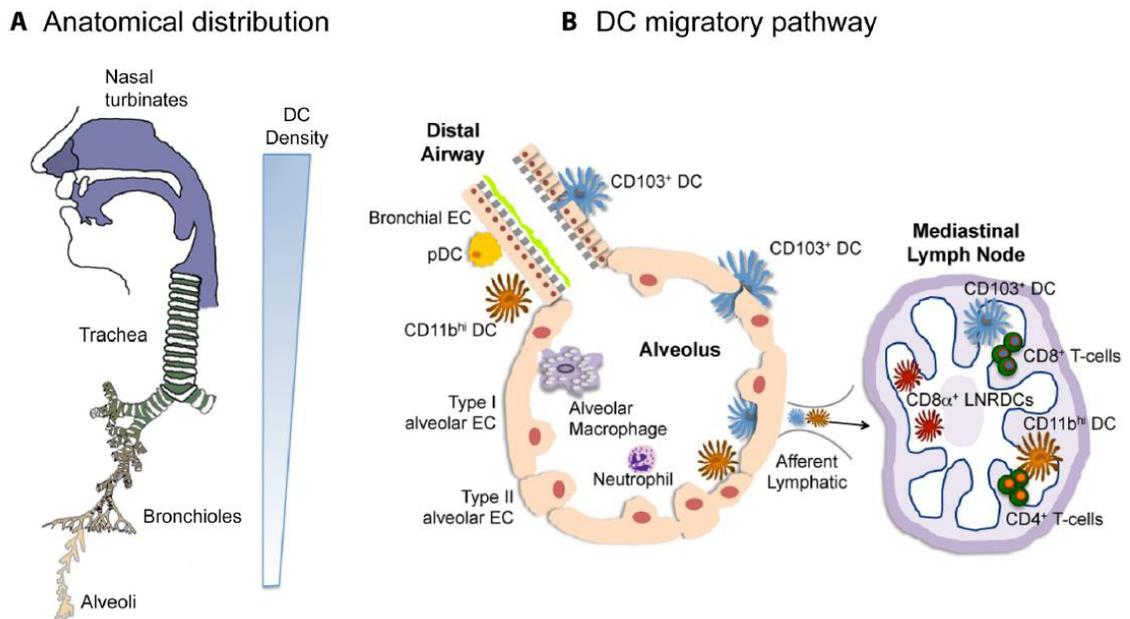


Figura 4. Ubicación anatómica y vías migratorias de células dendríticas pulmonares.

2.6 Gen Wt-1

El gen WT1, está involucrado en el desarrollo del Tumor de Wilms en riñón, donde actúa como gen supresor de tumor y fue uno de los principales genes supresores de tumor en ser clonados, a partir de deleciones en el cromosoma humano 11p13. (Haber et al., 1990).

Se sabe que WT1 se encuentra involucrado al menos en dos procesos celulares, como son el control de la transcripción y el metabolismo del RNA, esto dependiendo de las diferentes isoformas de la proteína. (Hewitt et al., 1996)

Además de que WT1 modula la expresión de diversos genes, también se ha demostrado que tiene la capacidad de inducir a la proliferación o arresto celular, diferenciación sexual y bloquear la apoptosis, mediante activación transcripcional. Se encuentra expresado normalmente en tejidos de origen mesodérmico durante la embriogénesis, incluyendo el riñón, gónadas, mesotelio y bazo. En tejidos de adulto normales tiene una expresión basal en el núcleo de células madre hematopoyéticas normales CD34+, células progenitoras mioepiteliales, podocitos renales y algunas células en testículos y ovario. (Menke, van der Eb and Jochemsen, 1998; Mundlos et al., 1993)

2.6.1 Estructura de WT-1

El gen WT1 codifica para un factor de transcripción que cuenta con cuatro dedos de zinc en su extremo carboxilo terminal, como dominio de unión al ADN. Genera un ARNm de 3.5 Kb. Posee tres sitios de inicio de la traducción, dando lugar a tres isoformas de la proteína con diferente peso molecular (de 62-64KDa, 52-54KDa, y 36-38 KDa). (Menke, van der Eb and Jochemsen, 1998)

WT1, además de su papel como factor de transcripción, interactúa con un factor de splicing, U2AF65, y se asocia con la maquinaria de splicing. (Davies et al., 1998) Un total de 24 isoformas diferentes resultan de las combinaciones de eventos de splicing alternativos, codones de inicio alternativo y edición de ARN,

las cuales fueron descritas después de la clonación de este gen. Los mejores estudiados son las variantes del exón 5, que resultan de la inclusión o exclusión de 51 nt de este exón, y las isoformas KTS, donde incluyen o excluyen tres aminoácidos (KTS) entre el tercer y cuarto dedo de zinc de la proteína mediante el uso de un sitio de splicing donador. Otras isoformas alternativas se derivan del uso de un codón de inicio CTG río arriba y dentro del marco de lectura, un codón de inicio ATG interno al final del exón 1 y un residuo en el exón 6 susceptible a edición de RNA (Hohenstein and Hastie, 2006).

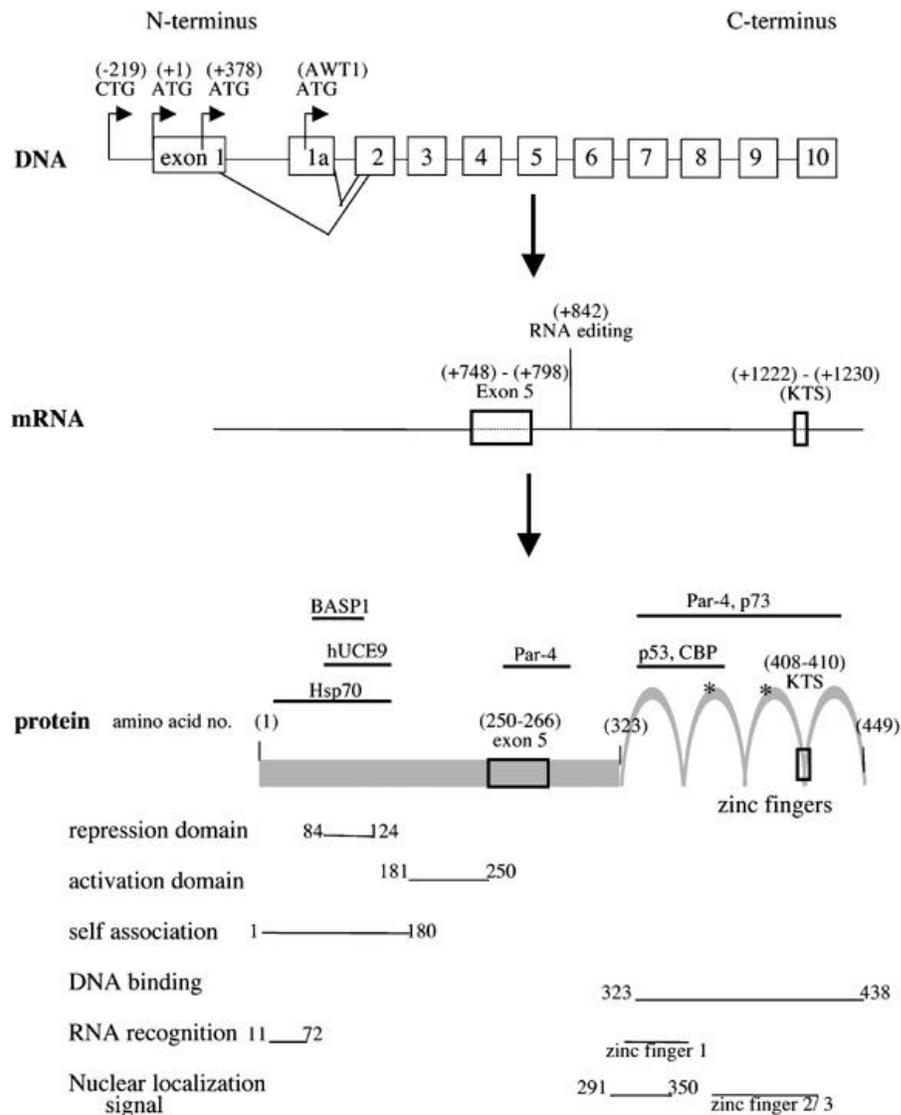


Figura 5. Estructura del gen WT1 y sus productos.

2.6.2 WT-1 en cáncer

La proteína WT1 se ha visto sobre-expresada en todos los linajes de células de leucemia, Inoue y colaboradores encontraron que existe una sobreexpresión aberrante del gen WT1 en células de leucemia y que implica el papel de este gen en leucemogénesis humana. (Inoue et al., 1997). Por lo que altos niveles en la expresión de esta proteína están asociados a una prognosis pobre en leucemias, así como en cáncer de mama. (Renshaw et al., 2004)

Además en 1999, Oji y colaboradores demostraron la sobreexpresión de este gen en numerosos tumores sólidos como mesotelioma maligno, pulmón, mama y próstata, donde observaron que el gen WT1 juega un papel esencial en crecimiento de tumores sólidos y lleva a cabo una función oncogénica más que la de gen supresor de tumor. (Oji et al., 1999) Aunado a esto, estudios de Lee y colaboradores, del 2002, establecen a WT1 como un marcador altamente específico en carcinoma de ovario. (Lee et al., 2002)

WT1 no sólo se ha visto expresado en distintos tipos de cáncer sino que activamente juega un papel que contribuye al desarrollo del tumor, tal es el caso del cáncer de próstata, donde su alta expresión contribuye a la migración y metástasis, por lo que es considerado un oncogén que puede facilitar el desarrollo del fenotipo metastásico letal. (Brett, Pandey and Fraizer, 2013)

Debido a esto, WT1 es considerado un antígeno tumoral, por tanto es un potencial marcador de tumor y posible blanco terapéutico, de ahí la importancia de su estudio.

2.6.3 WT1 en cáncer de pulmón

El gen de WT1 no mutado, juega un papel importante en tumorigénesis en cáncer de pulmón y se ha visto que puede ser un blanco, tanto el gen como sus productos, para crear nuevas estrategias terapéuticas. (Oji et al., 2002).

Oji y colaboradores, en uno de sus estudios no encontraron una correlación entre la expresión de WT1 y la histología de líneas celulares de cáncer de pulmón, sin

embargo, sus resultados indicaron que WT1 se encuentra funcionando como gen oncogénico a diferencia de otros tipos de cáncer donde funge como gen supresor de tumor. (Ojiet al., 1999)

En 2002, Makita y colaboradores concluyeron que WT1 es un antígeno asociado a tumor universal y que la inmunoterapia contra dicha proteína ofrece un tratamiento potencialmente efectivo para cáncer de pulmón. (Makita et al., 2002)

Los resultados de Xu y colaboradores demuestran que WT1 es un oncogen y que promueve la proliferación celular de NSCLC mediante la regulación positiva de la expresión de ciclina D1 y de p-pRb. (Xu et al., 2013)

2.6.4 WT1 en melanoma

La proteína WT1 se encuentra expresada en la mayoría de los tipos de melanoma. (Perry et al., 2006)

Se ha observado que en melanoma, WT1 presenta una translocación al citoplasma, lo que sugiere que puede estar involucrado en el desarrollo de este tumor. (Nakatsuka et al., 2006)

Debido a su alta expresión es usada como herramienta rutinaria de diagnóstico en melanoma. Aunque su utilidad está limitada por el hecho de que la mayoría de los melanomas juveniles benignos expresan dicha proteína, puesto que más de un tercio de nevus displásico pueden expresar WT1 y no todos los melanomas han demostrado su expresión. (Wilsher and Cheerala, 2007). Además, la expresión de WT1 se ha visto relacionada con una corta supervivencia en melanoma. (Garrido-Ruiz et al., 2010)

2.6.5 Epítopes inmunodominantes

Se han probado tres péptidos restringidos para MHC I derivados de la proteína de WT1 de 9-mer, correspondientes al Db126, que comprende de los aminoácidos 126-134 de la proteína con la secuencia de aminoácidos RMFPNAPYL, Db227 de los aminoácidos 227-235 con la secuencia YQMTSQLEC y el Db 235 de los

aminoácidos 235-243 (CMTWNQMNL), para determinar su habilidad para inducir CTLs específicos contra WT1 en un modelo murino, los ratones fueron retados con células leucémicas WT1+, se observó un rechazo y sobrevivieron, sin mostrar daño histopatológico en órganos que expresan WT1. (Sugiyama, 2005)

Tabla 4. Unión de péptidos de WT1 a moléculas H-2D^b.

Peptide	Amino Acid Sequence	Binding Score	K _d (M)
WT1 peptides			
Db126	aa 126–134 RMFPN ^a APYL	1.77	5.7 × 10 ⁻⁷
Db227	aa 227–235 YQMTSQLEC	1.93	1.0 × 10 ⁻⁶
Db235	aa 235–243 CMTWNQMNL	1.20	1.3 × 10 ⁻⁶
Db221	aa 221–229 YSSDNLYQM	1.05	2.6 × 10 ⁻⁶
Db136	aa 136–144 SCLESQPTI	1.61	3.7 × 10 ⁻⁶
Known epitope peptides			
SV40 T antigen	aa 223–231 CKGVNKEYL	1.85	1.9 × 10 ⁻⁷
Influenza A34 NP	aa 366–374 ASNENMETM	1.24	1.9 × 10 ⁻⁷

Por otro lado, Fujiki y colaboradores en 2007, identificaron y caracterizaron un péptido de 16 mer derivado de la proteína de WT1, WT1(332)(KRYFKLSHLQMHSRKH), restringido a HLA -DRB1*0405 (HLA-clase II), que funciona como un epítipo cooperador y que puede inducir la respuesta de linfocitos T CD4+ y observaron que el uso de este péptido en conjunto con el epítipo 235 de WT1, puede incrementar la respuesta de CTLs así como su actividad funcional; por lo que sus resultados indican que resulta útil el uso del péptido WT1-332 para mejorar la eficacia de la vacuna de WT1 con epítopes específicos para CD8+ en casos clínicos. También demostraron que esta proteína no sólo es restringida a HLA-DRB1*0405, sino también a HLA-DRB1*1501, -DRB1*1502, o -DPB1*0901, demostrando que es un péptido cooperador promiscuo y que dichas células TCD4+ producen IFN- γ mas no secretan IL-4 o IL-10 con estimulación del péptido WT1332, por lo que induce una subpoblación Th1. (Fujiki et al., 2007)

En 2004, Tsuboi y colaboradores proporcionaron la primer evidencia clínica de que la inmunoterapia basada en un péptido de 9 mer de WT1 restringido a HLA-A*2402, puede ser un tratamiento prometedor para pacientes con cáncer de pulmón, fue probado en dos pacientes con este tipo de neoplasia y fue capaz de reducir marcadores de tumor, así como el tamaño del mismo. (Tsuboi et al., 2004)

2.7 Oligodeoxinucleótidos CpG's

Los oligodeoxinucleótidos (ODN) con dinucleótidos deoxycitil-deoxyguanosina (CpG) sin metilar, mimetizan la actividad inmunoestimuladora del ADN bacteriano. Existen tres tipos de clases, los CpG ODN de clase B, estimulan la activación de células B y NK, así como la producción de citocinas. Los niveles más altos de NK estimuladas, al igual que secreción de IFN- α por células dendríticas plasmocitoides se ha visto que es inducido por ODN de clase A. Mientras que una tercera clase de CpG ODN combina los efectos inmunes de las clases A y B; esta clase C de ODN, estimula fuertemente la activación de células B o NK y la producción de IFN- α . En contraste con la clase A, la clase C está completamente fosforotiolada, no tiene segmentos poli-G, pero tiene secuencias palindrómicas combinadas con motifs estimuladores de CpG. (Vollmer et al., 2004)

Estos ODNs sintéticos que contienen motivos CpG inmunoestimuladores desencadenan una cascada inmunoestimuladora que involucra células B y T, Natural killer y células presentadoras de antígeno profesionales, al ser reconocidos por los TLR9. La respuesta a estos CpG ODNs favorece el ambiente inmune del huésped para generar respuestas por parte de células T cooperadoras 1 (TH1) y producción de citocinas pro-inflamatorias, por lo que se han utilizado como agentes inmunoprotectores, adyuvantes en vacunas y anti-alérgenos. Estudios preclínicos evidencian que los CpG ODNs son efectivos para cada uno de estos usos. Estudios clínicos indican que el uso de CpG ODNs es seguro en humanos y que modulan la respuesta inmune para co-administrar alérgenos y vacunas. (Klinman, 2004).

Más aún y relacionado con la vía de administración que se empleó en el presente proyecto, se ha demostrado que TLR9 se encuentra expresado en células epiteliales respiratorias y que ADN bacteriano y oligodeoxinucleótidos CpG estimulan células respiratorias mediante activación de TLR9. (Platz et al., 2004)

Por otro lado, McCluskie y Davis demostraron que los CpG ODN son adyuvantes prometedores para estrategias de vacunación en mucosas, al ser usados solos o en combinación con otros adyuvantes de mucosas. (McCluskie and Davis, 2000)

3. JUSTIFICACIÓN

Debido a la gran incidencia de pacientes que padecen cáncer y al considerarse una de las principales causas de muerte a nivel mundial, resulta imperante la necesidad de crear terapias dirigidas y específicas para atacarlo. Actualmente la FDA ha aprobado sólo una vacuna contra cáncer, siendo esta de aplicación parenteral, estas vías de administración resultan en una pobre respuesta a nivel de mucosas, siendo insuficientes para levantar una respuesta contra tumores en dichos tejidos. Por lo que en el presente trabajo se busca crear una vacuna con péptidos derivados de la proteína de WT1, el cual se encuentra sobre-expresado en muchos tipos de cáncer, con el fin de promover la producción de CTLs específicos contra dicha proteína, para ser administrada vía pulmonar, tomando ventaja de la gran cantidad de células dendríticas en vías respiratorias de forma que se garantice una eficiente presentación del antígeno; además de reducir los problemas de seguridad de las vacunas, así como la necesidad de agujas y personal capacitado para usarlas. Esta terapia resulta una alternativa prometedora a los tratamientos tradicionales como la quimioterapia y radioterapia que traen consigo un sin número de efectos adversos.

4. HIPÓTESIS

La administración vía aerosol de una vacuna con péptidos inmunodominantes de WT1 es capaz de estimular una respuesta contra tumor en pulmón.

5. OBJETIVOS

5.1 Objetivo General

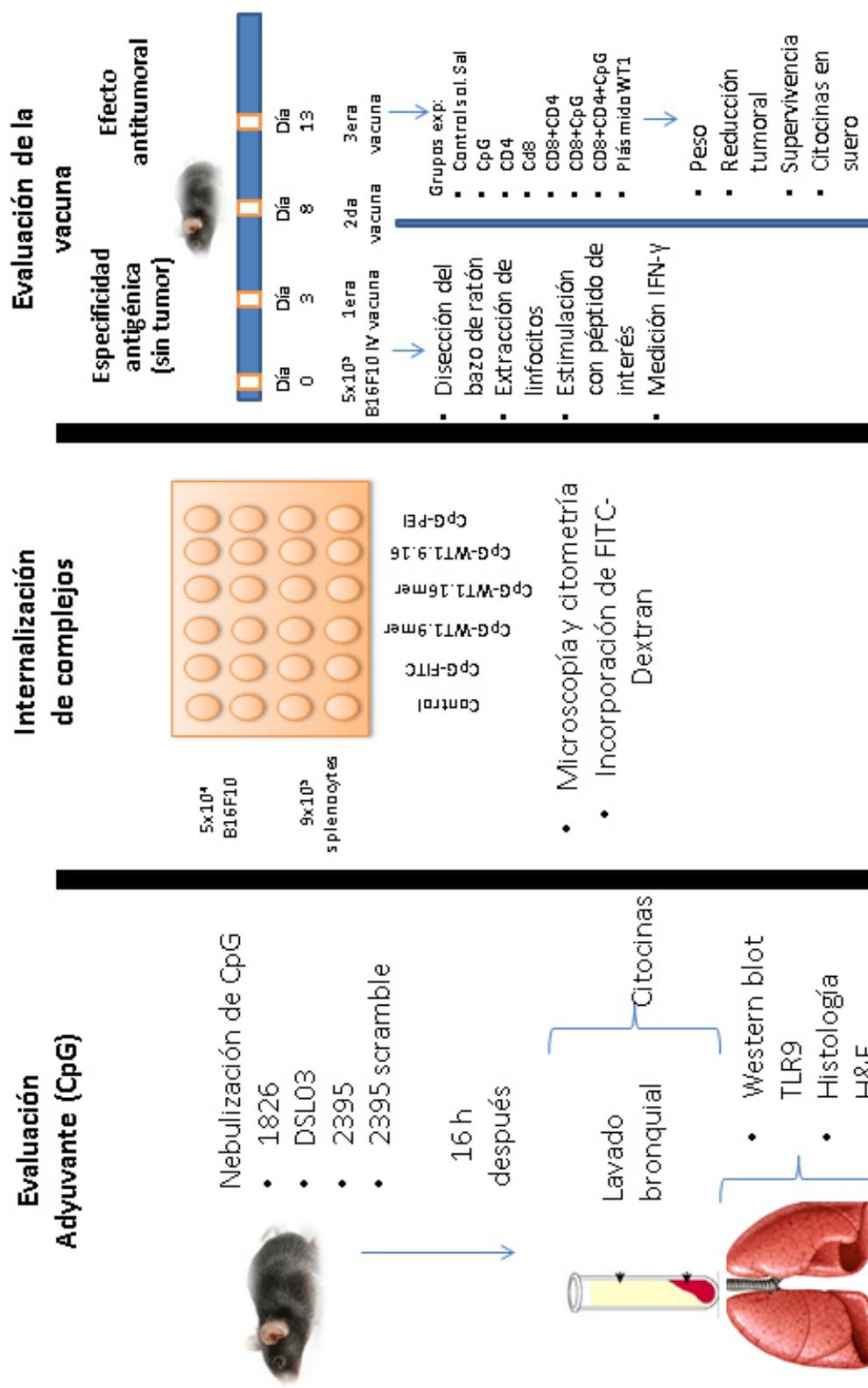
Determinar la efectividad de una vacuna con péptidos inmunodominantes de WT1 administrada vía aerosol para estimular una respuesta contra tumor en pulmón.

5.2 Objetivos Particulares

1. Determinar la expresión de TLR9 en pulmón de ratón
2. Analizar la presencia de células del sistema inmune infiltradas en pulmón tras la nebulización de CpG.
3. Caracterizar el perfil de citocinas inducido por CpG a nivel sistémico
4. Analizar la capacidad del complejo CpG-péptido de ser internalizado “*in vitro*”.
5. Determinar el efecto de la vacuna peptídica vía aerosol contra tumor en pulmón.
6. Analizar la respuesta inmune en ratones inmunizados mediante cuantificación de citocinas.

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 Estrategia experimental



6.2 Cultivo celular

Fue utilizada la línea celular B16F10 de melanoma murino, la cual se obtuvo de la American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA). La línea celular fue mantenida en medio mínimo de Dulbecco's modificado de Eagle (DMEMF-12; Life Technologies, Invitrogen, Burlington, Ontario, Canada) suplementado con 10% de suero fetal bovino (FBS; Gibco, Grand Island, NY), 100 U/ml de penicilina, 100 mg/ml streptomycin. Las células se mantuvieron en cajas de cultivo a 37°C en una atmósfera húmeda a 95% de O₂ y con 5% de CO₂.

6.3 Oligodeoxinucleótidos CpG

Los oligos CpG fueron sintetizados por la compañía Alpha DNA, como un liofilizado libre de endotoxinas purificado mediante HPLC, correspondientes a las siguientes secuencias: ODN 1826 clase B (5'-tccatgacgttctctgacgtt-3'), ODN DSL03 clase C (5'-tcgcgaacgttcgccggttcgaacgcgg-3'), ODN 2395 clase C (5'-tcgtcgttttcggcgc:gcgccg-3'), y ODN 2395 clase C marcado con FITC en el extremo 3', con la secuencia antes mencionada; todos estos con enlace fosforotioato y la región subrayada corresponde a la región palindrómica. Los cuales se resuspendieron en agua miliQ estéril hasta alcanzar una concentración de 100 µM y se realizaron alícuotas de 30 µl las cuales se almacenaron a -80°C hasta su uso.

6.4 Péptidos inmunodominantes de WT1

Los péptidos inmunodominantes de WT1, uno de ellos restringido a MHC I de 9 mer (pWT1-126), correspondiente a la secuencia de aminoácidos 126-134 (RMFPNAPYL) y otro restringido a MHC II de 16 mer (pWT1-332), correspondiente a la secuencia de aminoácidos 332-345 (KRYFKLSHLQMHSRKH) de la proteína codificada por el gen del tumor de Wilms (WT1), fueron adquiridos con la compañía Biopeptek, como un liofilizado libre de endotoxinas y con una pureza >98%. Para su reconstitución, se añadieron 5 µl de DMSO y 95 µl de agua miliQ estéril por cada mg de péptido liofilizado, se hicieron alícuotas que contenían 300 µg de péptido y se almacenaron a -20°C hasta su uso.

6.5 Formulación de complejos PEI-CpG y péptido-CpG

Para la formulación de complejos péptido-CpG utilizados “*in vitro*” se pusieron en contacto durante 30 min, en una relación molar equivalente a la utilizada “*in vivo*”. Para los complejos de PEI-CpG utilizados *in vitro*, se utilizó una concentración de 1 μM de CpG en 500 μl de medio. En los ensayos *in vivo* de estimulación con CpG, fueron añadidos 30 μg por cada ratón. Mientras que al aplicar la vacuna en los ratones con tumor, se administraron 25 μg . Para la cantidad de PEI necesaria se utilizó la siguiente fórmula:

$$\mu\text{l de PEI} = \frac{(\mu\text{g de DNA} \times 3)(\text{radio N/P})}{150 \text{ mM}}$$

Donde 150mM corresponde a la concentración de la solución de PEI. Para los ensayos *in vitro* se utilizó un radio de N/P de 5 e *in vivo* de 10 (Zamora-Avila et al., 2009)

6.6 Transformación de bacterias *E. coli* TOP10 con plásmido H+/-

Se derritió en hielo 1 vial de 50 μl de células One Shot. Posteriormente se añadieron 1-5 μl de DNA (10 pg-100 ng) en el vial de células competentes y se mezcló sin pipetear, para ser incubadas 30 minutos en hielo, seguido de una incubación a 42°C durante 30 segundos para generar el shock térmico, con una posterior incubación en hielo durante 2 minutos. En condiciones asépticas se añadieron 250 μl de medio S.O.C atemperado y se incubaron a 37°C durante 1 hr a 225 rpm. Finalmente se expandió el cultivo durante la noche en caldo LB con 100 $\mu\text{g/ml}$ de ampicilina bajo las mismas condiciones de temperatura y agitación. La extracción y purificación del plásmido se efectuó con un filtro para eliminar endotoxinas del kit GenElute HP Endotoxin-Free Plasmid Maxiprep kit de sigma y el resto del proceso de acuerdo al protocolo del kit Plasmid Maxi Kit (10) de QIAGEN.

6.7 Estimulación de ratones C57Bl/6 con CpG vía aerosol

30 µg de los diferentes CpG, ya mencionados, fueron nebulizados a grupos de 3 ratones C57Bl/6, solos o en combinación con PEI. A las 16 horas post-estimulación, se sangraron los ratones de forma retro-orbital y se separó el suero, se sacrificaron mediante una sobredosis de pentobarbital. Posteriormente se realizó una traqueotomía para introducir un catéter en la tráquea para facilitar la realización de los lavados bronquiales, esto con 0.2 ml de solución salina. Finalmente se diseccionaron los pulmones, almacenando inmediatamente en hielo uno de ellos y el otro en formalina para su posterior análisis.

6.8 Análisis de la expresión de TLR9 en pulmón de ratón C57BL/6.

La expresión del Receptor Tipo Toll 9 se determinó mediante Western Blot en tejido pulmonar de ratones estimulados con CpG y control. Para la extracción de proteínas a partir de tejido pulmonar, primeramente, con un bisturí, se tomó un corte de pulmón del tamaño de un pellet, en crisoles previamente esterilizados (en horno de 2-3 hrs) se añadió nitrógeno líquido y se maceró el tejido. A partir de ahí se realizó la extracción con TRIzol. Para la homogenización se añadió 1 ml de TRIzol por cada 50-100 mg de tejido, mezclando bien y se incubó 5 minutos a temperatura ambiente. Para extraer el ARN, se añadieron 0.2 ml de cloroformo, agitando vigorosamente. Se incubó de 2-15 min a temperatura ambiente. Posteriormente se centrifugó a 12000 xg por 15 min a 4°C. Se descartó la fase acuosa que contenía el ARN; de las fases restantes se precipitó el DNA (interface color blanco), para ello se retiró cualquier fase acuosa restante, se añadió 0.3 ml de etanol al 100%, se mezcló por inversión, seguido de una incubación de 2-3 min a temperatura ambiente. Se centrifugó a 2000 xg por 5 min a 4°C y finalmente se removió el sobrenadante fenol-etanol para la extracción de proteína. Para extraer la proteína se añadieron 1.5 ml de isopropanol, se incubó 10 min a temperatura ambiente, con una centrifugación posterior a 12000 xg por 10 min a 4°C. Se descartó el sobrenadante.

Las proteínas obtenidas fueron cuantificadas con el kit DC Protein Assay (BIO-RAD, Hercules, CA, USA). Donde se añaden 20 µl del reactivo S por cada ml de

reactivo A que será necesario; se hizo una dilución 1:5 de las muestras y se pipetearon 5 µl a cada pozo, se añadieron 25 µl del reactivo A' y 200 µl del reactivo B, después de 15 minutos se leyó la absorbancia a 750 nm.

Se corrieron 70 µg de proteínas de pulmón de ratón, más la cantidad necesaria de buffer de Laemli 5X, en un gel de poliacrilamida al 10%. El corrimiento se efectuó en una cámara de electroforesis con buffer de corrida (Tris Base 25 mM, glicina 250 mM pH 8.3 y SDS al 1%) durante 20 min a 40V y después a 100 V, durante 1 hora y media. Para la transferencia, se formó un “sándwich” de la siguiente forma: una esponja, papel filtro, el gel de poliacrilamida, una membrana de nitrocelulosa, papel filtro y esponja, esto en la cámara húmeda de transferencia en buffer de transferencia (Buffer Tris-Gly 10X: 30 g Tris Base, 114 g de glicina. Buffer de transferencia 1X: 100 ml de buffer Tris-Gly 10X, 200 ml de metanol y 700 ml de agua miliQ), a 26V durante toda la noche en cuarto frío. Para la inmunodetección primeramente se bloqueó la membrana con una solución al 5 % de leche descremada en TBS 1X con Tween al 0.5%, durante 1 hora. Posterior a esto, se retiró la solución de bloqueo y se agregó un anticuerpo monoclonal contra TLR-9 a una dilución 1:500 y un anticuerpo contra β-actina a una dilución 1:20000 durante toda la noche en un cuarto frío. Después de la incubación con estos anticuerpos primarios, se efectuaron tres lavados con TBS-T 1X por 10 minutos cada uno. Se añadió el anticuerpo secundario, un monoclonal anti-ratón conjugado con peroxidasa de rábano en una dilución 1:5000 durante 1 hora y media, seguido de tres lavados como ya se mencionó. Por último se añadió 1.5 ml de quimioluminiscencia como sustrato y se reveló con un film en cuarto oscuro, con 1 minuto de exposición. La señal se analizó en el software de densitometría ImageJ2x.

6.9 Análisis histológico de pulmones post-estimulación con CpG.

A partir del pulmón fijado en formalina, se realizó el análisis histológico de la siguiente manera: Se realizó la separación de cada pulmón (con ayuda de un bisturí) en lóbulo craneal, medio y caudal. Se embebieron en parafina y se procedió a realizar los cortes con un micrótopo. Posteriormente se extendieron y adhirieron los cortes a un portaobjetos y se procedió a realizar la tinción con H&E.

6.10 **Expresión de CD3, CD19, CD20, CD80 y CD69 en tejido pulmonar de ratones estimulados con CpG**

La expresión de CD3, CD19, CD20, CD80 y CD69 se determinó por IFI en cortes de biopsia pulmonar de ratones de la cepa C57BL/6 tratados con: (CpG 1826, 2395, DSL03, 1826-PEI, DSL03-PEI, PEI, 2395 scramble y control), los cortes de las biopsias de 4 µm de espesor se desparafinaron por 18 hrs., a 60°C en una incubadora (LAB-LINE INSTRUMENTS, Inc.), luego de sumergir en Xileno por 10 min., se rehidrataron en un tren de alcoholes iniciando por alcohol absoluto, 96%, 70% y 50%, después de lavar en agua destilada se calentó por 1 min., en microondas con Buffer Citrato (1.05 g de ácido cítrico monohidratado en 500 ml de agua destilada) para la recuperación antigénica; los cortes se enfriaron con agua destilada y seguido de los lavados con PBS 1X, se incubó a 4 °C por 8 min., con Tritón X-100 (Tritón al 0.1% con citrato de sodio al 0.1% en PBS 1X) para permeabilizar el tejido, luego de los lavados los cortes se sumergieron 30 min., en (Tris-HCl 0.1M pH 7.5 BSA 3% y 20% de suero fetal bovino) para bloquear sitios inespecíficos, seguido de los lavados se incubó por 4 hrs., a TA y en cámara húmeda con los anticuerpos monoclonales Anti-CD3-Isotiocianato de fluoresceína también llamado FITC por sus siglas en inglés (Fluorescein IsoTioCyanate)/CD19-PE (Sigma Immuno Chemicals F-6902), anti-CD20 ((2Q1271) sc-70579, Santa Cruz Biotechnology, Inc.), anti-CD80 ((N-20) sc-1634, Santa Cruz Biotechnology, Inc.) y anti-CD69 (No. 310901 BioLegend) diluidos respectivamente 1:20 y 1:50 en diluyente de anticuerpo (No. 00-3118 ZYMED), después de los lavados se incubó por 2 hrs., el anti-CD20 con el anticuerpos anti-IgM de ratón-FITC (sc-358950, Santa Cruz Biotechnology, Inc.), el CD80 con el anti-IgG de cabra-FITC (sc-2024, Santa Cruz Biotechnology, Inc.), y el CD69 con el anti-IgG de ratón-FITC (No. 62-6611, ZYMED), diluido 1:100 en diluyente de anticuerpo, luego de los lavados se incubó por 30 min., con DAPI (4',6-Diamidino-2-fenilindole dihidrochloride, ROCHE), posterior al lavado con metanol y metanol-PBS se montaron en PBS/Glicerol (3/7) para ser fotografiadas a 20 y 40X con una cámara DP-71 en un microscopio (Olympus B-Max-40) y analizadas en el programa Image-Pro Plus Versión 7.0. El CD3, CD20, CD80 y

CD69 se identificaron por emitir fluorescencia en color verde y el CD19 rojo, con el contraste del DAPI se determinó la localización en el tejido. El análisis se realizó de manera independiente por 2 investigadores.

6.11 **Análisis de citocinas en suero de ratones post-estimulación con CpG.**

El suero de la sangre de los ratones estimulados con CpG fue separado y almacenado a -80°C hasta la evaluación mediante citometría de flujo de las citocinas con el kit de BD Cytometric bead array (CBA) mouse Th1/Th2/Th17 cytokine.

6.12 **Aislamiento de células mononucleares de bazo de ratón.**

Para el ensayo de internalización de complejos en células adherentes de bazo de ratón, se extrajeron las células de la siguiente manera: El bazo fue colocado en una caja de Petri con PBS. Se realizó perfusión del mismo, hasta conseguir que el PBS se tornara opaco, para obtener la mayor cantidad de células. Dichas células se depositaron cuidadosamente sobre el mismo volumen de Lymphoprep, seguido de una centrifugación a 400xg por 30 min. Las células de la interfase opaca (células mononucleares) son transferidas a un tubo de 15 ml, donde se lavan con 10 ml de PBS y son centrifugadas a 250 xg durante 10 minutos. Se desecha el sobrenadante y el pellet es resuspendido en 5 ml de PBS, con una centrifugación posterior a 250xg por 10 min. Seguido de otro lavado. Las células son contadas en cámara de Neubauer (dilución 10 μL de suspensión celular en azul tripán).

6.13 **Evaluación de la endocitosis de complejos CpG-péptido “*in vitro*”**

Se plaquearon 5×10^4 células B16F10 por pozo, en una placa de 24. A las 24 horas se estimularon dichas células con CpG-FITC, CpG-FITC+pWT1-126, CpG-FITC-pWT1-332, CpG-FITC-pWT1-126:332, CpG-FITC-PEI. A los 15 min (Ahmad-Nejad et al., 2002) se observó por microscopía de fluorescencia la internalización de CpG. Se plaquearon 1×10^6 células de bazo de ratón por pozo, en una placa de 24. Se incubaron por 24 horas en medio RPMI 10% SFB. Se conservaron las células adherentes (monocitos/macrófagos) y se administró CpG-FITC, CpG-FITC+pWT1-126, CpG-FITC-pWT1-332, CpG-FITC-pWT1-126:332 a los 15 min (Ahmad-Nejad et al., 2002) se observó por microscopía de fluorescencia la internalización de

CpG. Se repitió el ensayo con una estimulación de 30 minutos y fue leído por citometría de flujo.

6.14 **Ensayo de fagocitosis por FITC-Dextran**

Además se realizó un ensayo de fagocitosis de FITC-dextran. Para lo cual se plaquearon 2×10^5 células de bazo de ratón por pozo, en una placa de 12. Se estimularon con CpG+péptido por 12-16 horas y se añadió el reactivo FITC-dextran (1mg/ml) en medio de cultivo RPMI con 10% SFB, durante 5 horas. Después del tiempo de incubación se realizaron 3 lavados con PBS 1% SFB frío. Finalmente se resuspendieron las células en 100 μ l de PBS para ser analizados por citometría de flujo.

6.15 **Especificidad antigénica de péptidos de WT1 *in vitro*.**

Se nebulizaron 50 μ g del péptido de 9 mer (epítoto para linfocitos CD8+) y 100 μ g del péptido de 16 mer (epítoto para linfocitos CD4+) a ratones C57BL/6, 6 días después se sacrificaron. Se extrajeron las células mononucleares de 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) 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- γ .

6.16 **Inducción de tumor**

Se inocularon 5×10^5 células B16F10 de melanoma murino IV 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 a pulmón.

El tamaño de los grupos experimentales fue de 5 ratones cada uno, siendo los siguientes:

Tumor pulmonar
Control/Sol. Salina
CpG
pWT1-332
pWT1-126
pWT1-332+ pWT1-126
pWT1-126+CpG
pWT1-126+ pWT1-332+CpG
Plásmido WT1

6.17 **Inmunización**

Tres días después de la inoculación de las células tumorales, se comenzó con el esquema de inmunización. Se inmunizaron los ratones con un total de tres vacunaciones, en un tiempo espaciado de 5 días. Se administraron 50 µg totales de pWT1-126, 100 µg de pWT1-332 y 25 µg de CpG en solución salina por ratón, en un volumen final por grupo de 2 ml. Las nebulizaciones para administrar los 2 ml de solución tomaron alrededor de 15 min.

En el caso del grupo experimental tratado con el plásmido que codifica para la isoforma H+/- de WT1, se llevó a cabo una sola nebulización de 40 µg, a los tres días de inocular el tumor, con referencia a estudios previos.

6.18 **Medición del peso de ratones**

Durante los estudios se monitoreó cada tercer día el peso de los ratones de cada grupo, con la finalidad de contribuir al registro del estado físico general del ratón, así como conducta de los mismos. Al presentarse defunción, se removieron los pulmones con focos tumorales, y se registró su peso. Además se registraron los días de supervivencia.

6.19 **Obtención de peso promedio de pulmones e índice tumoral**

Los ratones fueron sacrificados mediante dislocación cervical al día 20 después de inoculación, se obtuvieron los pulmones y fueron lavados en solución salina. Los pulmones fueron pesados y examinados con el estereoscopio para contar los focos tumorales visibles. Se utilizó un sistema de escala del 1 al 5 reportado previamente, donde se aplica un valor de 1 si hay menos de 10 focos tumorales, de 2 si existen entre 10-100 focos tumorales, 3 si uno de los lóbulos pulmonares está lleno de tumor, 4 si ambos lóbulos están llenos de tumor y 5 si además de estar los pulmones llenos de tumor, éste se prolonga fuera de los pulmones a la cavidad torácica. El índice tumoral se calculó mediante la siguiente fórmula:

$$\text{Índice Tumoral} = \text{Peso del pulmón} \times \text{grado del grupo}$$

6.20 **Análisis de la respuesta inmune en ratones inmunizados mediante cuantificación de citocinas**

Se usará el kit de BD Cytometric bead array (CBA) mouse Th1/Th2/Th17 cytokine, para determinar la determinación de las citocinas secretadas en el suero de los ratones tratados y grupos control.

6.21 **Análisis estadístico**

Los datos de la respuesta inmune se presentan en promedios con error estándar para cada grupo experimental. Se usó la prueba de ANOVA de una vía. Al existir diferencia se utilizó el análisis post-hoc de Tukey, $P < 0.05$ se consideró significativo.

7. RESULTADOS

7.1 Expresión de TLR9 en tejido pulmonar de ratones C57BL/6

La expresión del receptor tipo Toll 9 (TLR9) se determinó por Western Blot en pulmón de ratones control y post-nebulización con CpG, y β -actina como control de carga.

En Western Blot se observó la expresión basal de dicha proteína en pulmón normal de ratón C57BL/6.

El estímulo vía aerosol de PEI, CpG 1826, y la combinación de estos reguló de manera positiva la expresión de TLR9 (en un 30%, 60% y 24%, respectivamente, respecto al control). Mientras que el estímulo con CpG DSL03 trae consigo una regulación negativa de la expresión de la proteína (disminuyendo un 36%), tal como se muestra en las figuras 6 y 7.

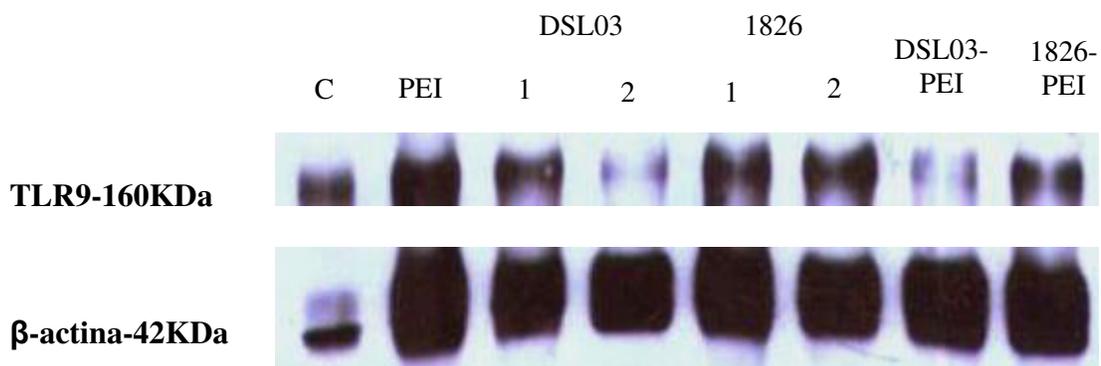


Figura 6. Expresión de la proteína TLR9 en pulmón de ratón C57BL/6 por WB, β -actina como control endógeno. Grupos experimentales: Control, PEI, CpG DSL03 (ratones 1 y 2), CpG 1826 (ratones 1 y 2), CpG DSL03-PEI, CpG 1826-PEI.

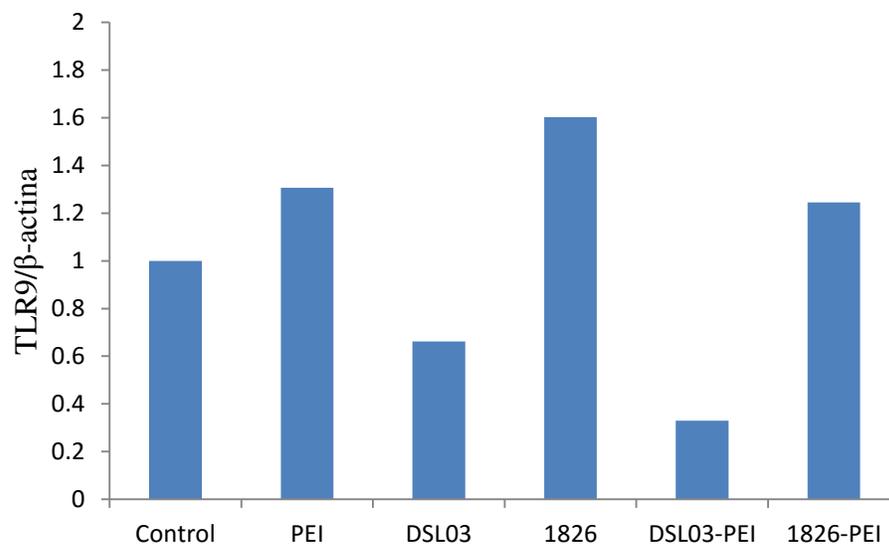


Figura 7. Análisis de Densitometría de la expresión de TLR9/β-actina en biopsia de pulmón control y nebulizado con PEI, CpG DSL03, 1826, y en combinación con PEI.

7.2 Análisis histológico de pulmones de ratones estimulados con CpG

El análisis del efecto de la nebulización de CpG en la migración linfocitaria hacia pulmones se realizó haciendo cortes histológicos de los ratones nebulizados, con tinción de H&E.

El tejido pulmonar de los ratones control presentó la arquitectura característica, sin infiltrados significativos ni daño aparente (Figura 8). El PEI promueve un poco la infiltración celular, sin embargo presenta efecto citotóxico comparado con el control (Figura 9). En el caso del scramble del CpG 2395 no promueve la infiltración linfocitaria, mas sí una hiperplasia marcada (Figura 10).

El CpG 2395 fue el que mayor infiltrado celular presentó (Figura 11); en los cortes de pulmón tratado con CpG 1826 y DSL03 solos (Figura 12 y 13 respectivamente), se observaron focos de infiltrado linfocitario peribronquiolar de moderado a severo; sin embargo, al administrarlo en conjunto con PEI se observó un infiltrado peribronquiolar moderado con una hiperplasia discreta (Figura 14 y 15).

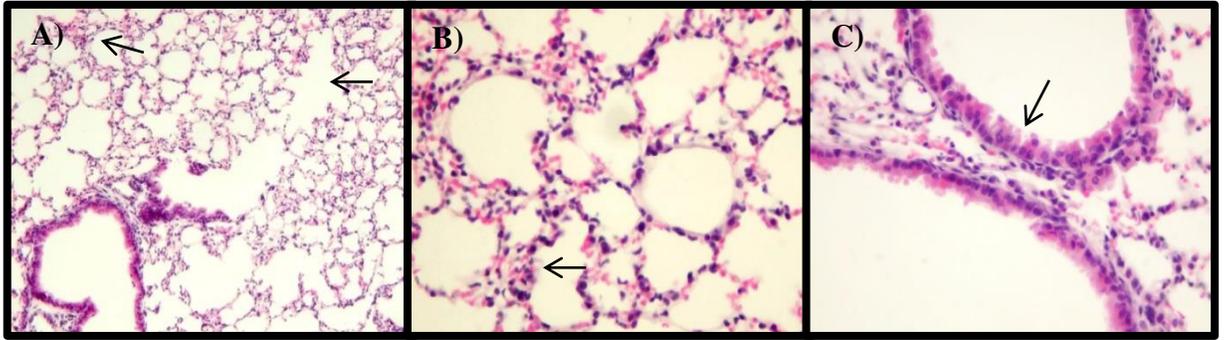


Figura 8. Histología de pulmón control. A) Engrosamiento de los sacos alveolares y enfisema discreto (10X). B) Discreto engrosamiento de los sacos alveolares (40X). C) Bronquiolos con epitelio respiratorio normal (40X).

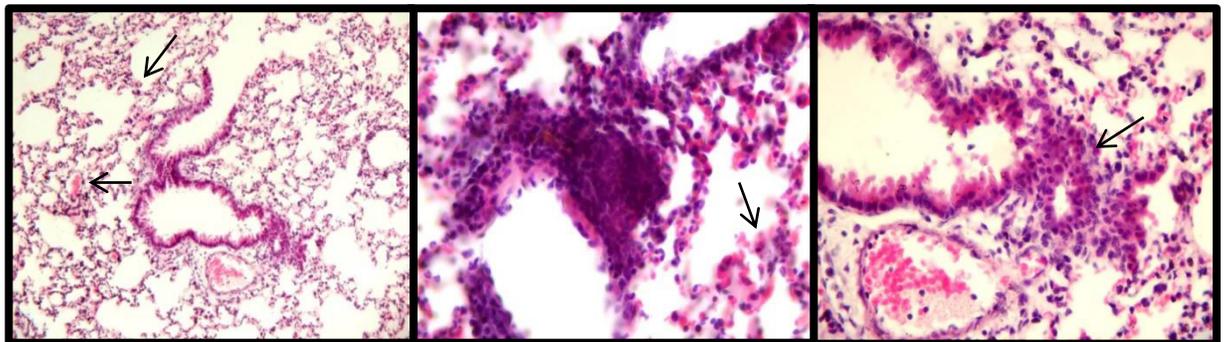


Figura 9. Histología de pulmón nebulizado con PEI. A) Congestión discreta difusa y moderado engrosamiento alveolar (10X). B) Engrosamiento moderado de sacos alveolares (40X). C) Infiltrado linfocitario peribronquiolar severo difuso (40X).

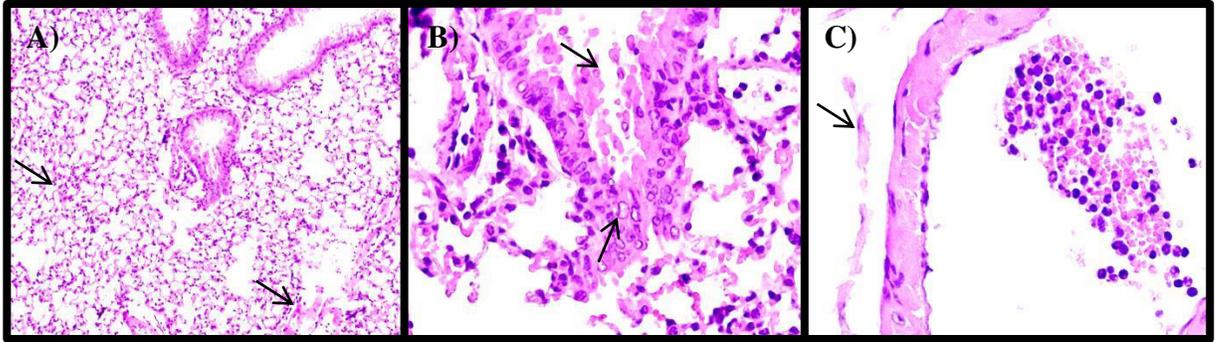


Figura 10. Histología de tejido pulmonar nebulizado con scramble-2395. A) Congestión y engrosamiento de sacos alveolares discreta difusa (100X). B) Hiperplasia moderada difusa con descamación (400X). C) Edema perivascular moderado difuso (400X).

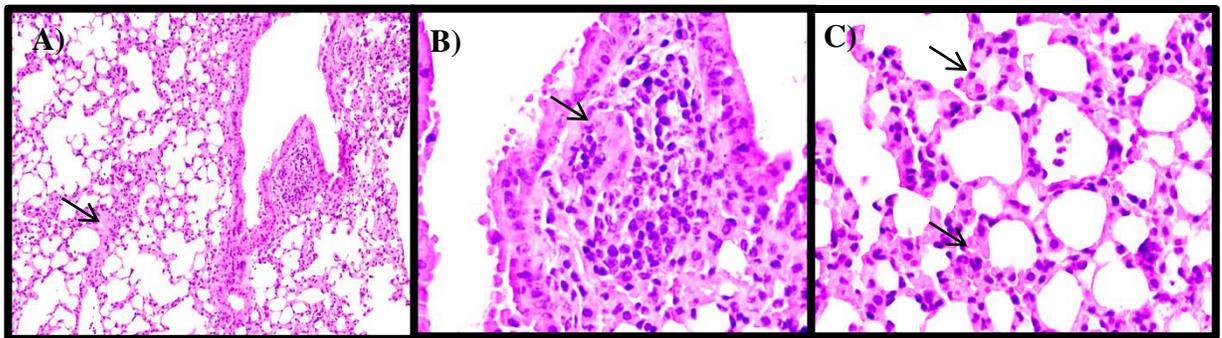


Figura 11. Histología de pulmón estimulado con CpG 2395. A) Congestión discreta difusa (100X). B) Infiltrado linfocitario peribronquiolar severo difuso (400X). C) Engrosamiento moderado de sacos alveolares (400X).

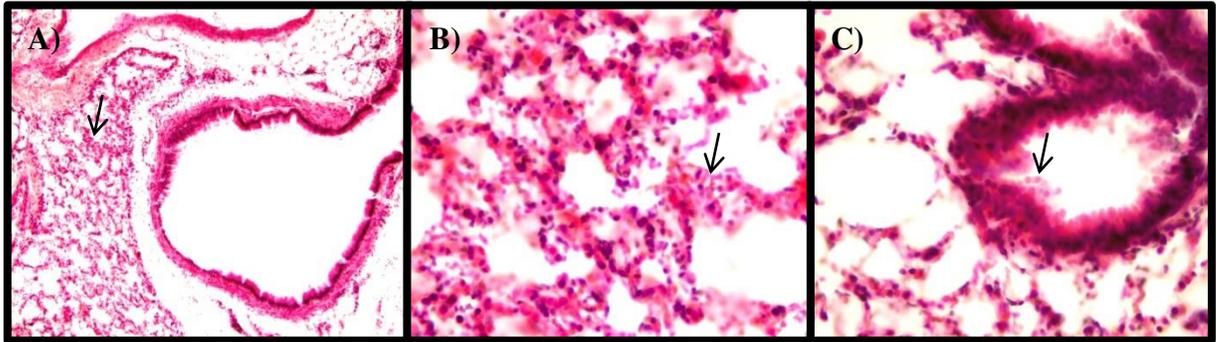


Figura 12. Histología de pulmón estimulado con CpG 1826. A) Engrosamiento marcado de los sacos alveolares (100X). B) Severo engrosamiento de los sacos alveolares y congestión marcada (400X). C) Hiperplasia epitelial bronquiolar severa difusa.

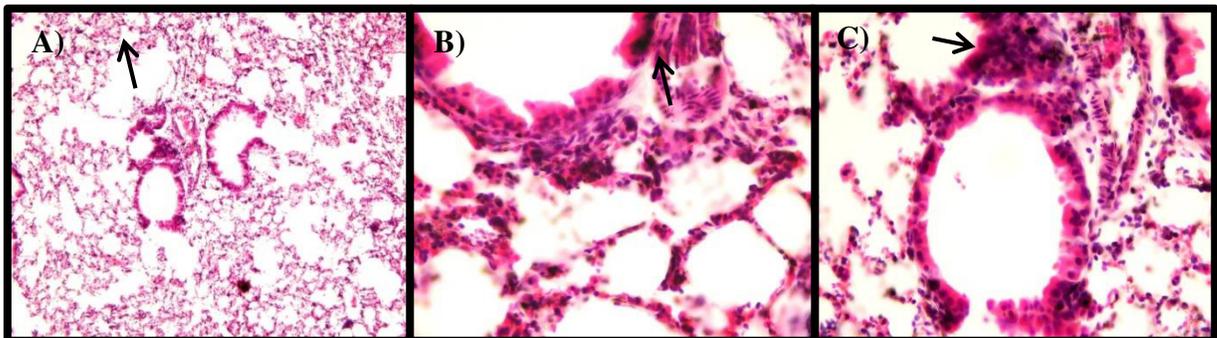


Figura 13. Histología de tejido pulmonar estimulado con CpG DSL03. A) Engrosamiento marcado de los sacos alveolares y rompimiento de algunos de ellos (100X). B) Hiperplasia epitelial bronquiolar discreta difusa (400X). C) Infiltrado linfocitario peribronquiolar moderado difuso (400X).

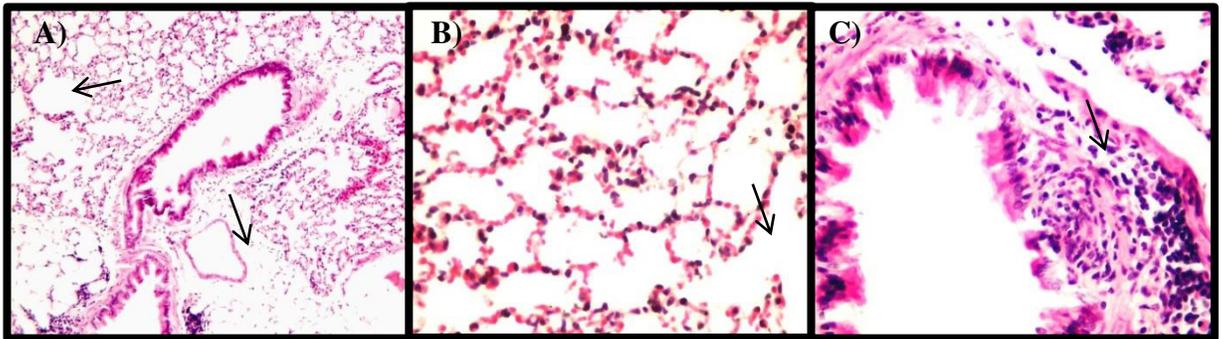


Figura 14. Histología de tejido pulmonar estimulado con CpG 1826-PEI. A) Se observan algunos sacos alveolares rotos con enfisema intersticial discreto (100X). B) Rompimiento discreto de algunos sacos alveolares (400X). C) Bronquiolo con infiltrado linfocitario peribronquiolar (400X).

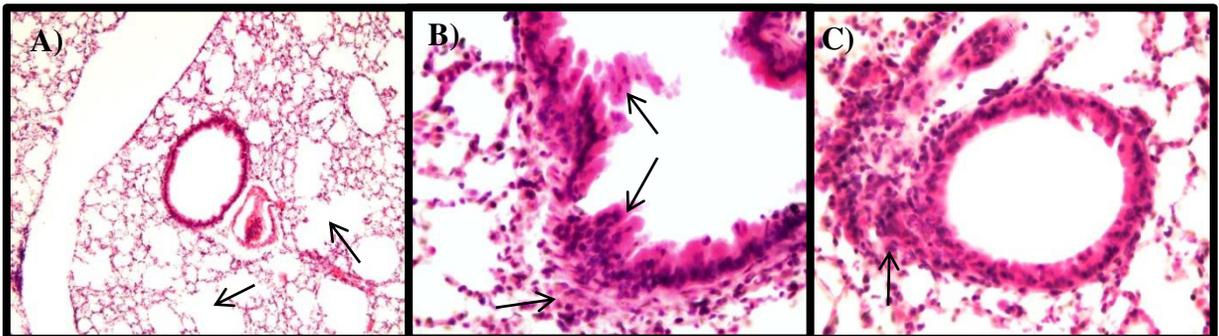


Figura 15. Histología de tejido pulmonar estimulado con CpG DSL03-PEI. A) Rompimiento discreto de sacos alveolares (100X). B) Bronquiolo con hiperplasia discreta e infiltrado peribronquilar (400X). C) Bronquiolo con infiltrado peribronquiolar moderado (400X).

La clasificación de las características histológicas de los segmentos pulmonares analizados (craneal, medio y caudal), se resume en la tabla 5.

Tabla 5. Clasificación de características histológicas en segmentos pulmonares de ratones estimulados con CpG.

Grupos	Segmentos	Congestión	Hiperplasia	Infiltrado linfocitario	Enfisema	Edema	Engrosamiento sacos alveolares
C1	Craneal	+	-	+	-	-	-
	Medio	++	+	+	+	-	+
	Caudal	-	+	-	+	-	-
C2	Craneal	-	-	-	+	-	+
	Medio	+	-	-	+	-	+
	Caudal	+	+	+	+	-	+
C3	Craneal	+	+	+	-	-	+
	Medio	+	-	-	+	+	+
	Caudal	+	-	+	+	+	-
PEI 1	Craneal	+	-	++	-	-	++
	Medio	++	+++	++	-	-	++
	Caudal	++	-	++	+	-	-
PEI2	Craneal	-	+	++	+	-	-
	Medio	-	+	-	+	-	+
	Caudal	+	+	-	+	++	+
PEI3	Craneal	++	-	+	+	+	++
	Medio	-	+	+	+	+	++
	Caudal	+++	+	+++	+	+	++
2395-Scramble-1	Craneal	+	++	-	+	+++	+
	Medio	-	+++	-	+++	+++	-
	Caudal	-	++	+	+	-	++
2395-Scramble-2	Craneal	++	+++	-	+	+++	+
	Medio	-	++	+++	++	+++	+++
	Caudal	-	+++	-	+	-	+
2395-Scramble-3	Craneal	+	++	-	+	-	+
	Medio	+	+++	+++	+	++	+
	Caudal	-	+++	+++	+	+++	++
2395-1	Craneal	++	+	-	+	-	-
	Medio	++	+++	++	+	+	+
	Caudal	++	++	+	+	++	+
2395-2	Craneal	++	+	++	+	+	-
	Medio	+	+	+++	++	-	++
	Caudal	-	++	++	+	+	+
2395-3	Craneal	+	+++	++	-	++	++
	Medio	+	+++	+++	-	+++	++
	Caudal	++	++	++	+	+	++
1826-1	Craneal	++	-	+	++	-	-
	Medio	++	++	++	+	++	+++
	Caudal	+	+	+	++	-	++
1826-2	Craneal	++	+	+	++	+	++
	Medio	+	++	+	+	-	+

	Caudal	++	++	-	+	++	++
1826-3	Craneal	++	++	++	+	+	++
	Medio	+	+	+	+	-	+
	Caudal	+	-	-	+	-	+
DSL03-1	Craneal	++	+++	+	+	-	++
	Medio	++	++	+	+	+	+
	Caudal	+	-	+	+	-	++
DSL03-2	Craneal	++	+	++	++	-	++
	Medio	++	+	++	++	-	+
	Caudal	++	++	++	+++	-	++
DSL03-3	Craneal	++	++	+	+	+	++
	Medio	+	++	-	++	-	+
	Caudal	+	++	+	-	+	+
1826-PEI-1	Craneal	+	+	++	+	-	+
	Medio	+	++	++	+	-	++
	Caudal	+	+	+	+++	+	++
1826-PEI-2	Craneal	+	-	+	+	+	+
	Medio	++	-	+	+	+	++
	Caudal	++	+	++	++	-	+
1826-PEI-3	Craneal	++	+	++	+	-	-
	Medio	+	+++	++	+	+	+
	Caudal	++	++	+	+	-	++
DSL03-PEI-1	Craneal	+	+	-	++	+	+
	Medio	++	-	++	+	-	++
	Caudal	++	+	-	++	+	+
DSL03-PEI-2	Craneal	++	++	-	+++	-	+
	Medio	+	-	++	+	++	+
	Caudal	++	++	-	++	-	+
DSL03-PEI-3	Craneal	++	++	+++	+	+++	-
	Medio	++	++	-	++	++	++
	Caudal	++	+	-	+	-	++

+: Discreta, ++: Moderada, +++: Severa.

7.3 Expresión de CD3, CD19, CD20, CD80 y CD69 en tejido pulmonar de ratones estimulados con CpG

La expresión del marcador de superficie CD3+ se determinó por IFI en tejido pulmonar de ratones nebulizados con tres diferentes CpG, previamente mencionados y control. Se observaron 3 células CD3+ (por campo) en el control y en el tratamiento con el CpG DSL03, 5 células, como se observa en las figuras 16 y 17. El resto de los tratamientos fueron negativos para este marcador.

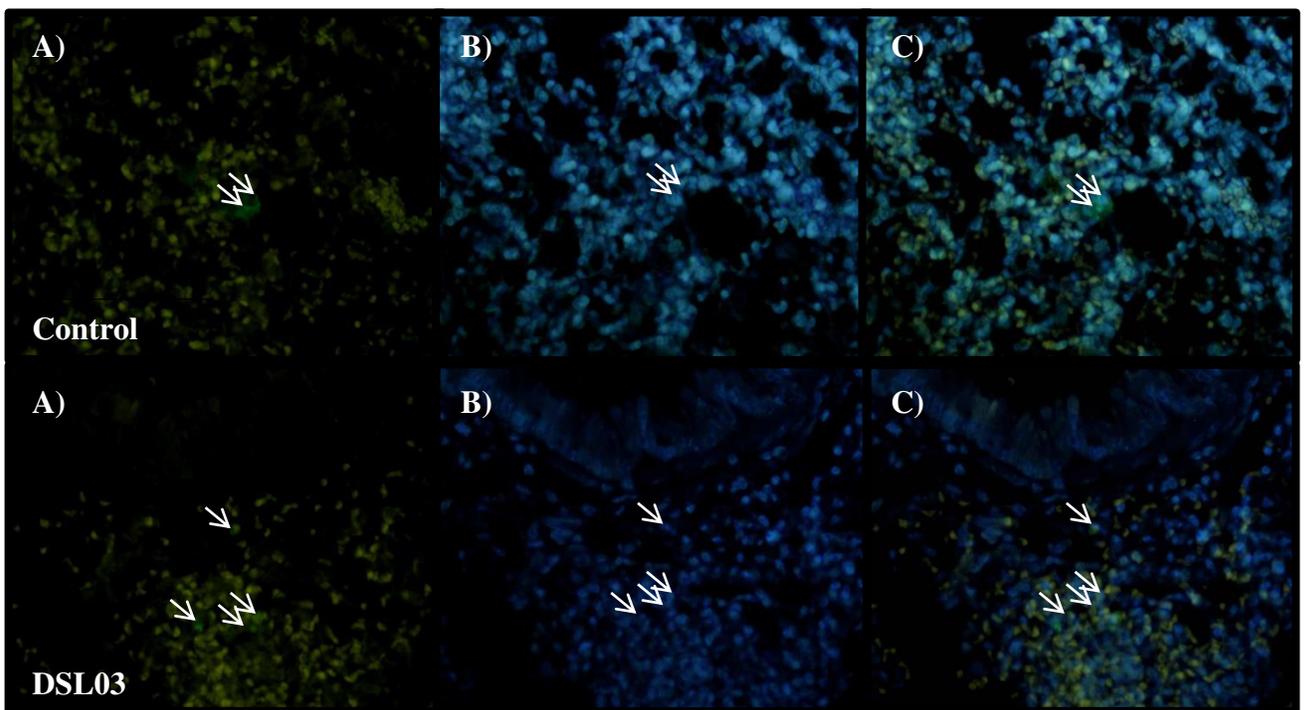


Figura 16. IFI de tejido pulmonar de ratones control y CpG DSL03. A) anti-CD3-FITC B) Dapi C) Traslape.

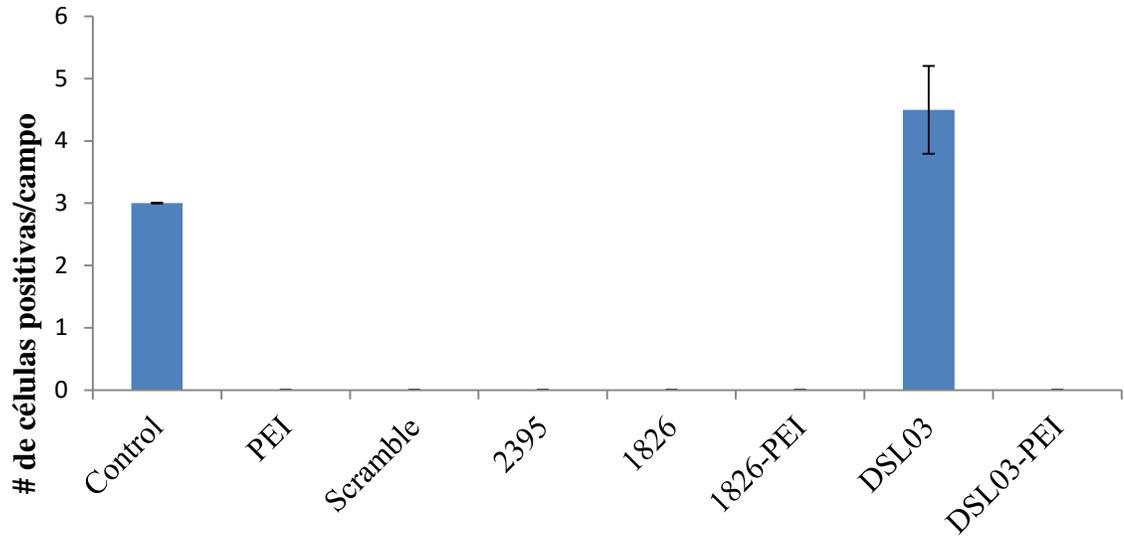


Figura 17. Histograma de células CD3+ en tejido pulmonar de ratones control y tratados con CpG

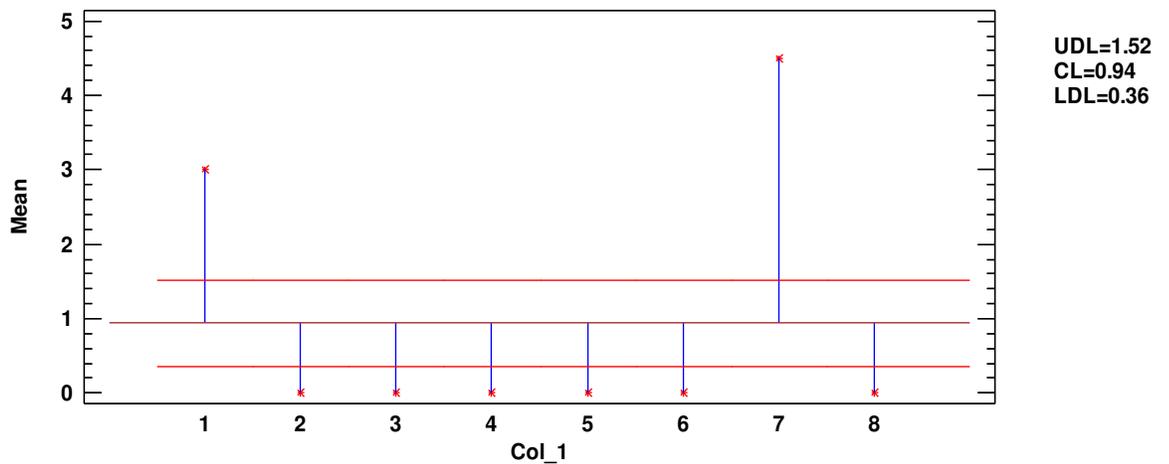
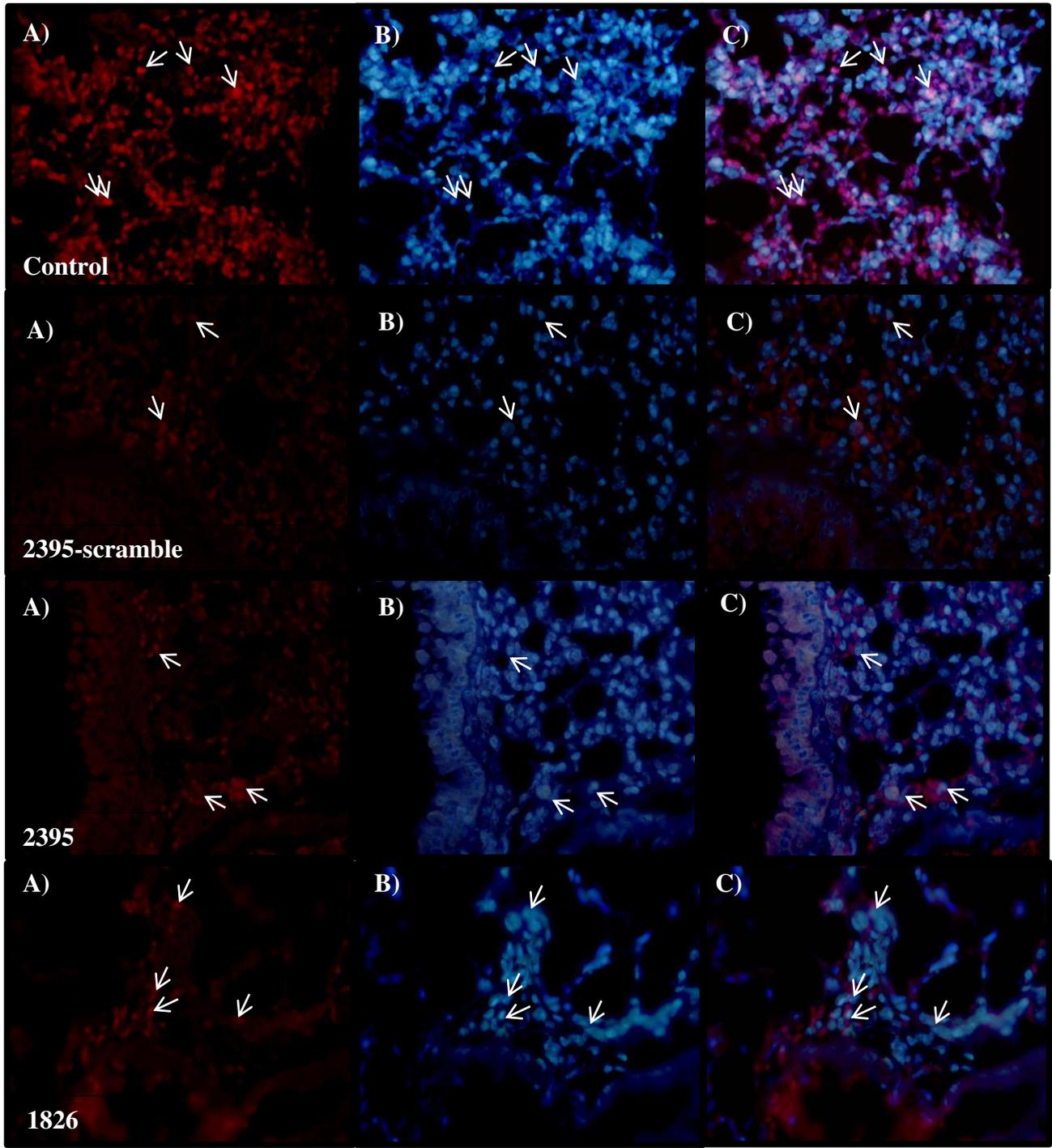


Figura 18. Gráfico de análisis de Medias de células CD3+ con unidades de decisión del 95%. 1: Control. 2: PEI. 3: Scramble. 4: 2395. 5: 1826. 6: 1826-PEI. 7: DSL03. 8: DSL03-PEI.

En cuanto a la expresión de CD19+, en el control se observó un mayor número de células positivas que en los tratamientos con CpG. Por otro lado, los tratamientos de CpG en combinación con PEI, presentaron mayor número de células CD19+, mientras que el tejido tratado con PEI fue negativo para dicho marcador.



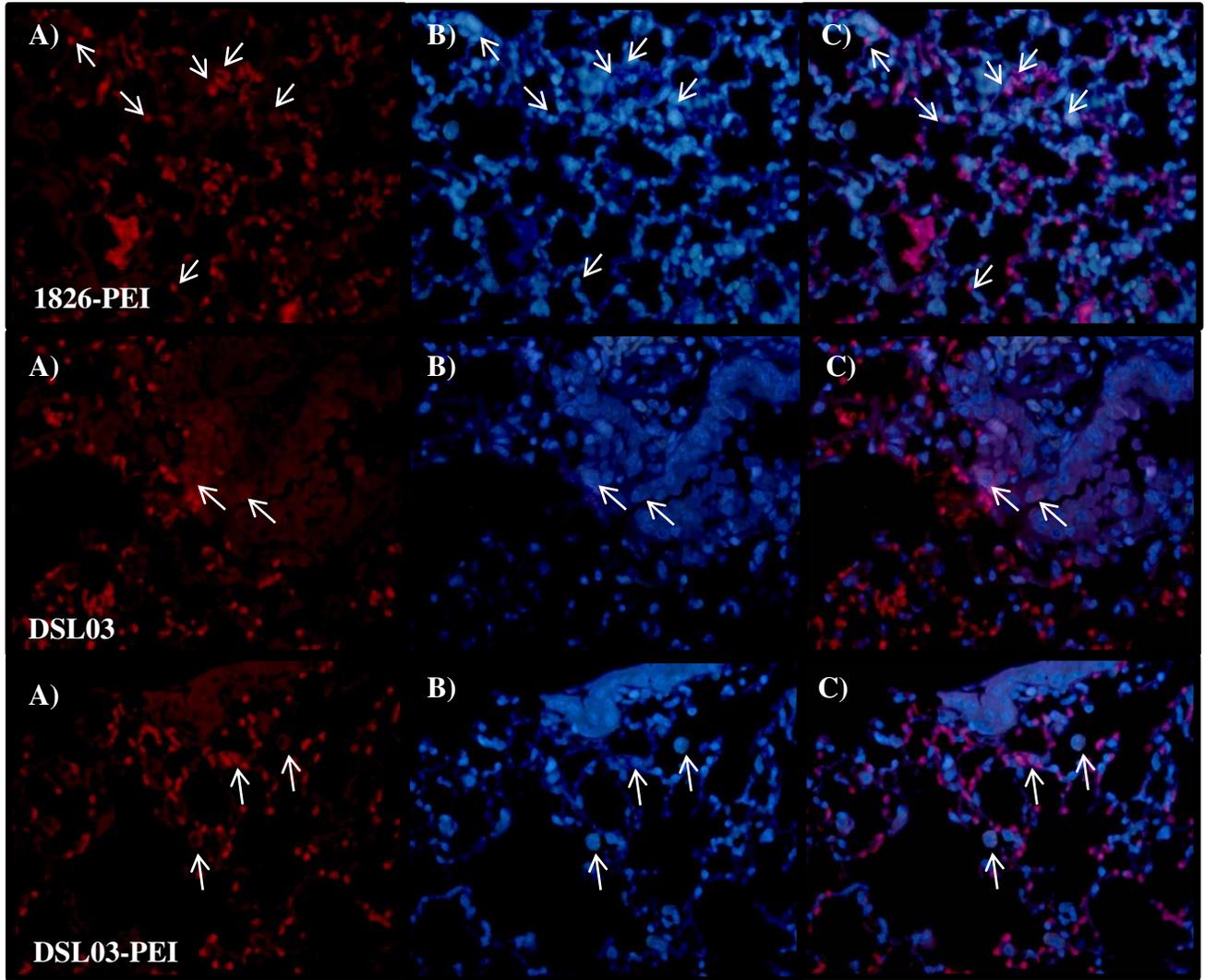


Figura 19. IFI de tejido pulmonar de ratones control y tratados con CpG. A) anti-CD19-PE B) Dapi C) Traslaje

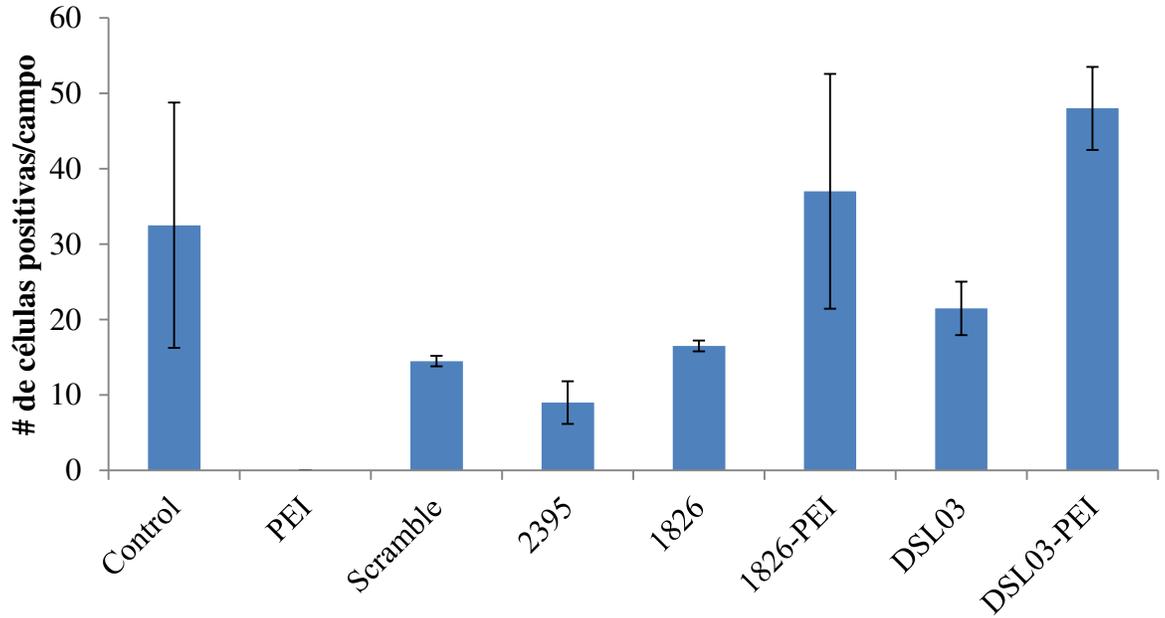


Figura 20. Histograma de células CD19+ en tejido pulmonar de ratones control y tratados con CpG.

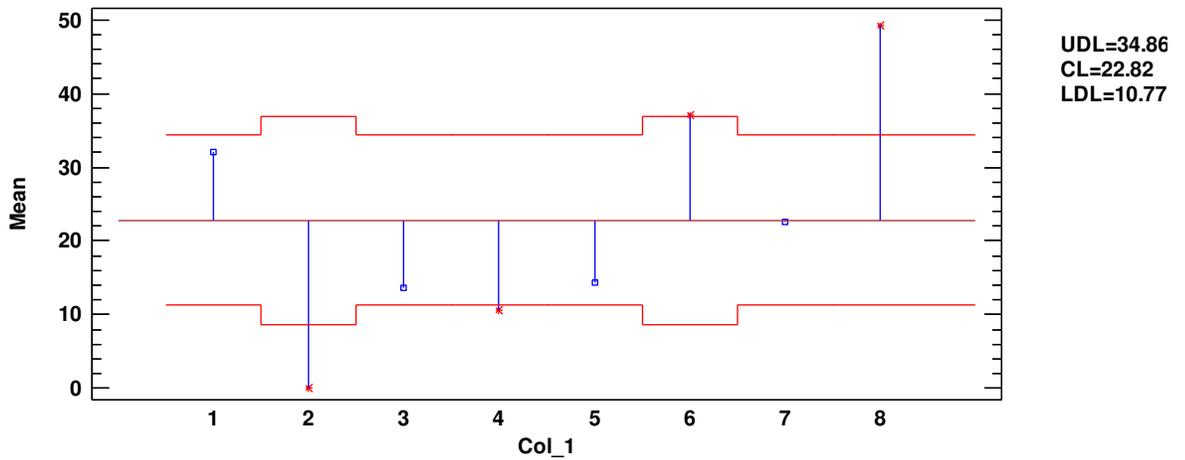
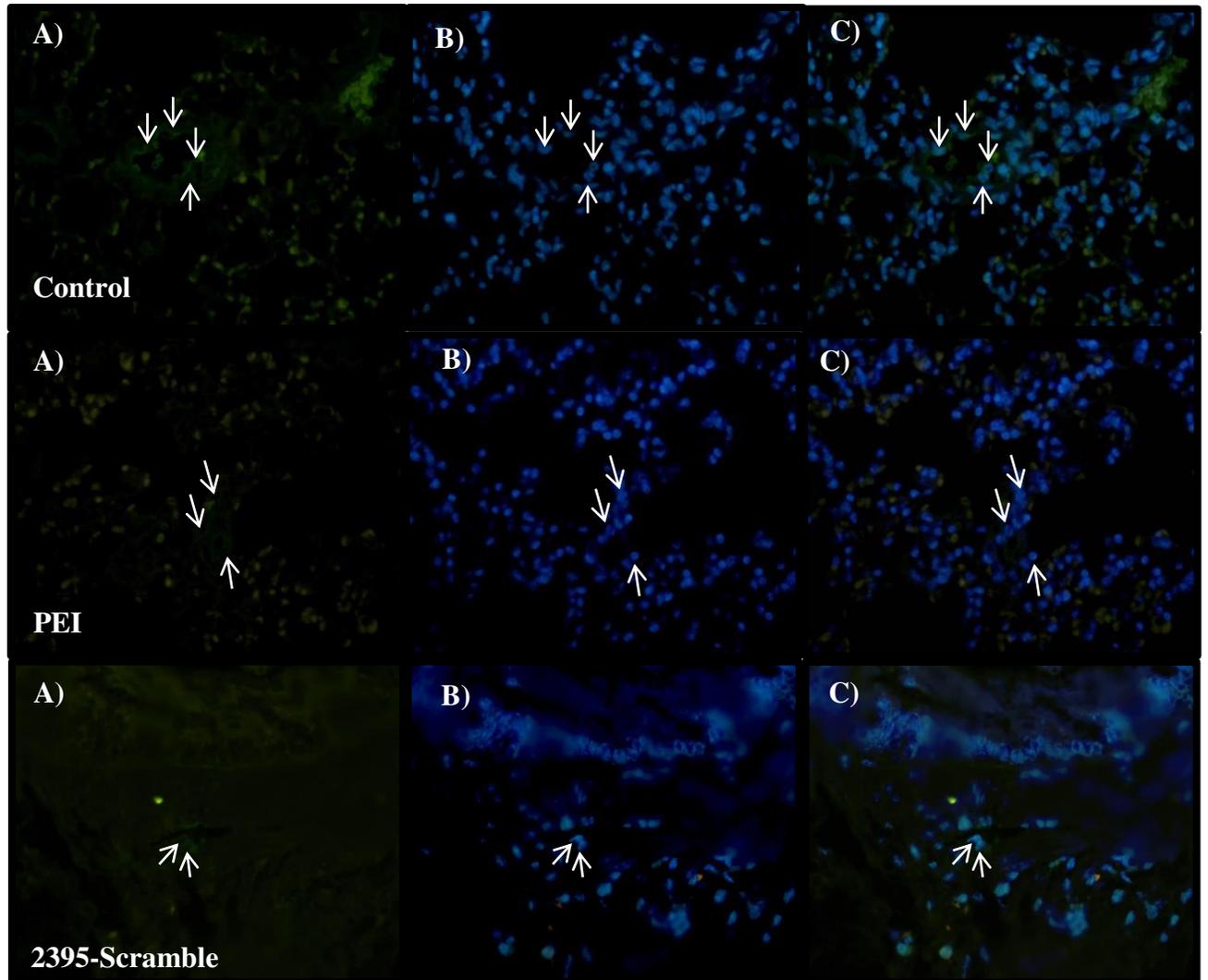


Figura 21. Gráfico de análisis de Medias de células CD19+ con unidades de decisión del 95%. 1: Control. 2: PEI. 3: Scramble. 4: 2395. 5: 1826. 6: 1826-PEI. 7: DSL03. 8: DSL03-PEI.

Los tratamientos con CpG 1826-PEI, DSL03 solo y en combinación con PEI presentaron mayor número de células positivas para el marcador CD20 (11,12 y 10 células CD20+ respectivamente), en comparación con el control sin tratamiento y scramble (5 y 7 células CD20+). Mientras que el tratamiento con CpG 2395 y 1826 fueron negativos para dicho marcador, como se observa en las figuras 22 y 23.



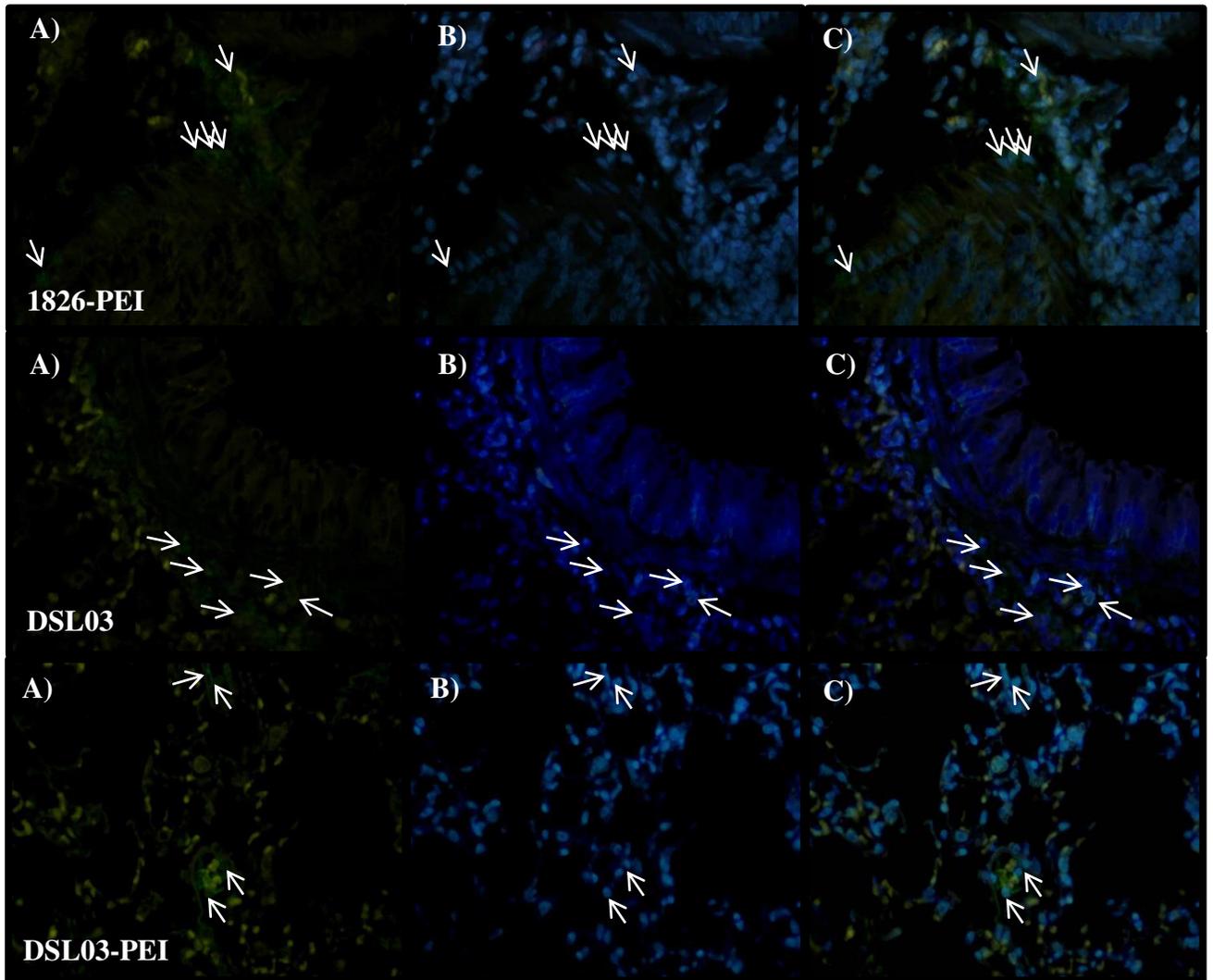


Figura 22. IFI de tejido pulmonar de ratones control y tratados con CpG. A) anti-CD20-FITC B) Dapi C)Traslape

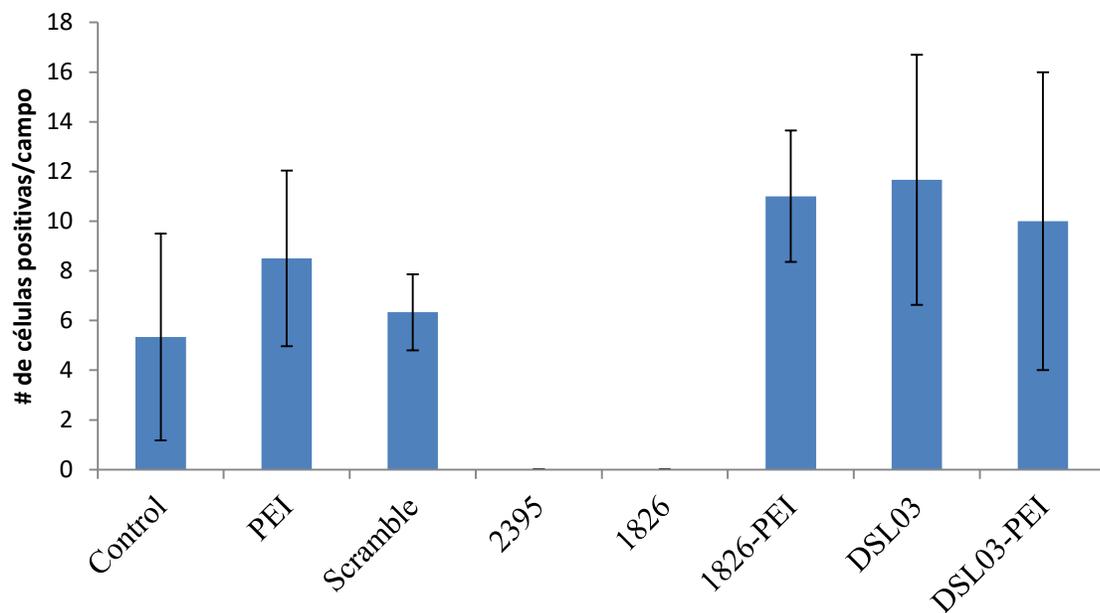


Figura 23. Histograma de células CD20+ en tejido pulmonar de ratones control y tratados con CpG.

La expresión del marcador CD80 sólo pudo ser determinada en los tratamientos con scramble-2395 y con el CpG DSL03. Donde el scramble presentó mayor número de células positivas por campo (5), sin embargo no fue una diferencia significativa con respecto al CpG DSL03 (4).

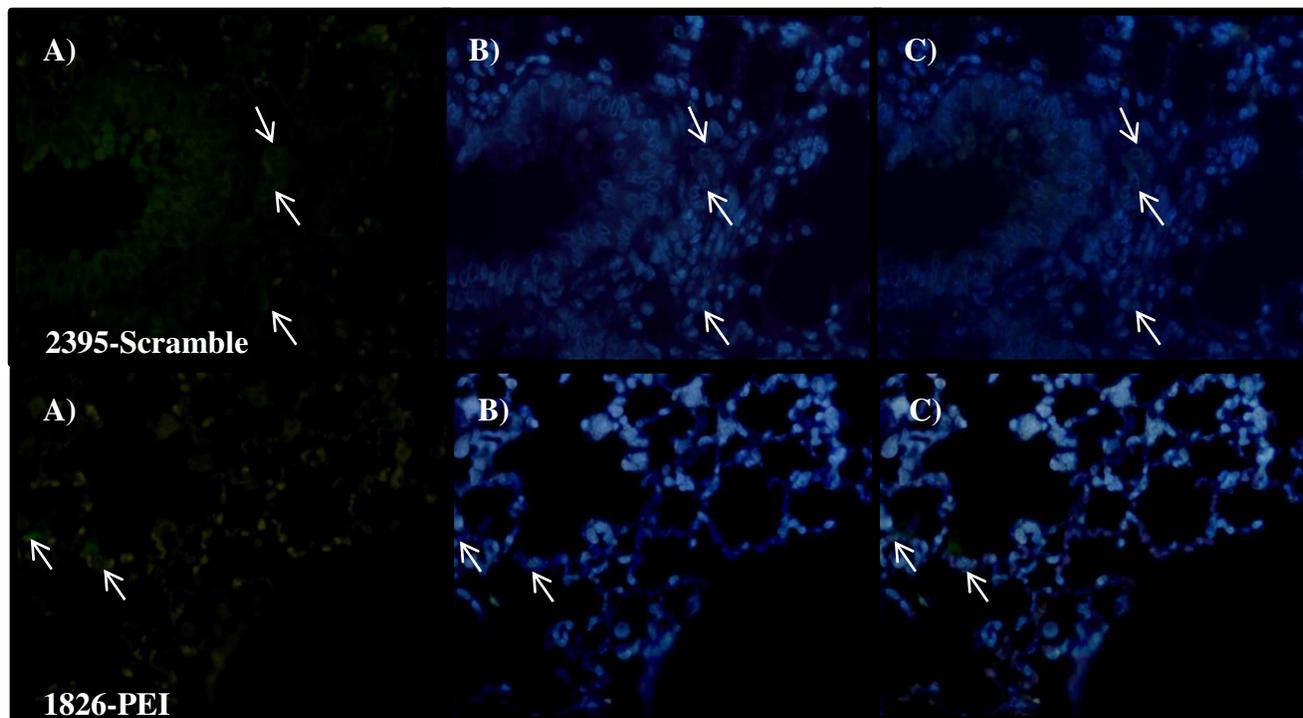


Figura 24. IFI de tejido pulmonar de ratones control y tratados con CpG. A) anti-CD80-FITC B) Dapi C) Traslape.

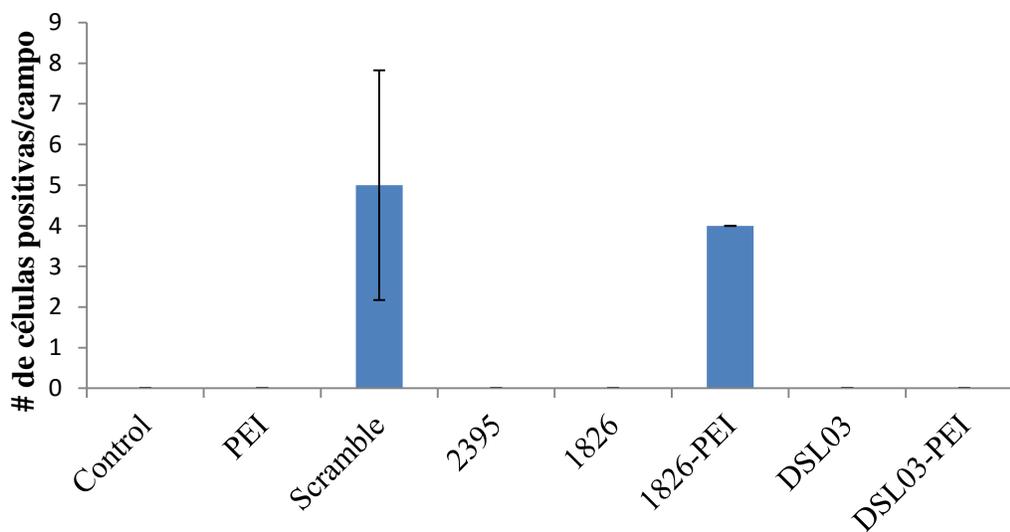


Figura 25. Histograma de células CD80+ en tejido pulmonar de ratones control y tratados con CpG.

La expresión del marcador CD69 no fue observable en el grupo control, ni en los tratamientos con CpG 1826,1826-PEI y DSL03. En el tratamiento con PEI 5 células fueron positivas para dicho marcador (por campo), el tejido del grupo scramble

presentó 7 células positivas, mientras que en los tratamientos con CpG 2395 y DSL03-PEI tan solo hubo presencia de 4 y 3 células CD69+ respectivamente.

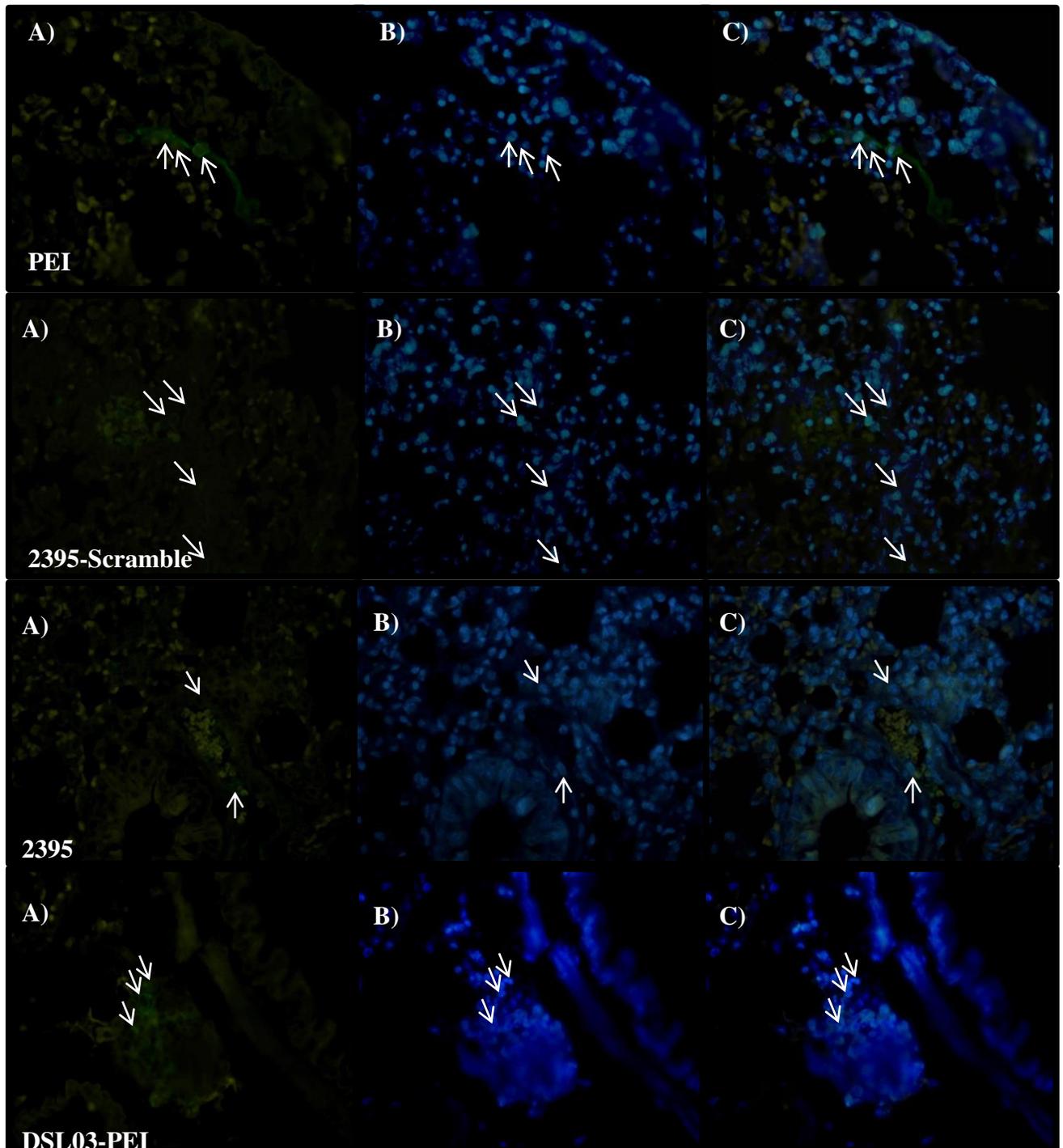


Figura 26. IFI de tejido pulmonar de ratones control y tratados con CpG. A) anti-CD69-FITC B) Dapi C) Traslape

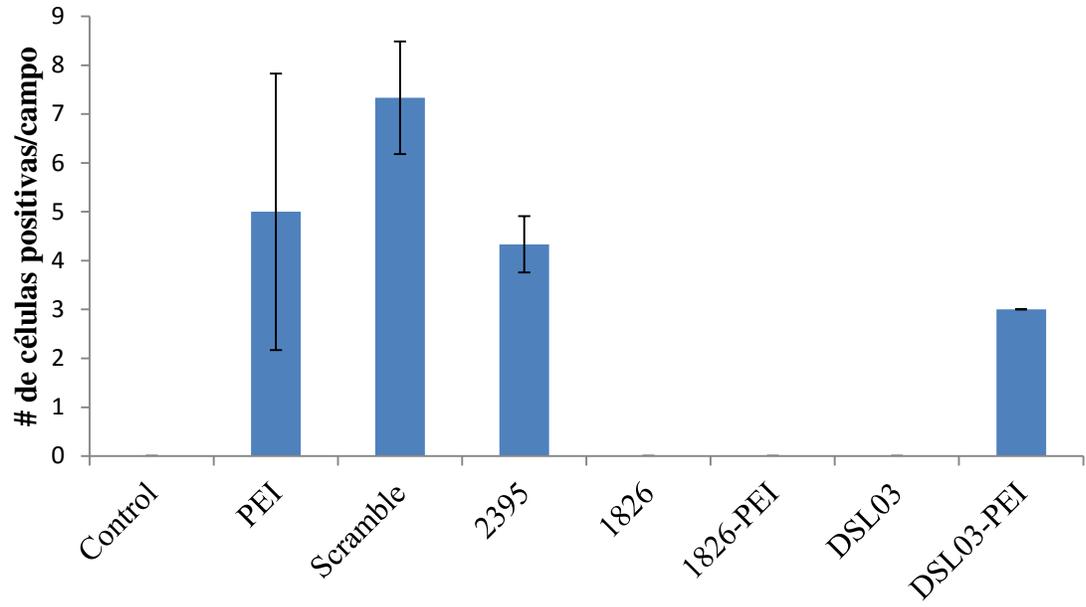


Figura 27. Histograma de células CD69+ en tejido pulmonar de ratones control y tratados con CpG.

7.4 Análisis de citocinas post-estimulación con CpG.

La estimulación con CpG 1826 vía aerosol promovió significativamente una mayor producción de IL-10 ($p=0.001$) e IL-4 ($p=0.004$) respecto al control, esto a nivel sistémico; además incrementó los niveles de IL-6, mas no significativamente. El estímulo con PEI incrementó los niveles de IFN- γ de forma significativa ($p=0.005$); a su vez se observó un incremento en los niveles de IL-10, IL-4, IL-6 y TNF, sin embargo no fue significativo.

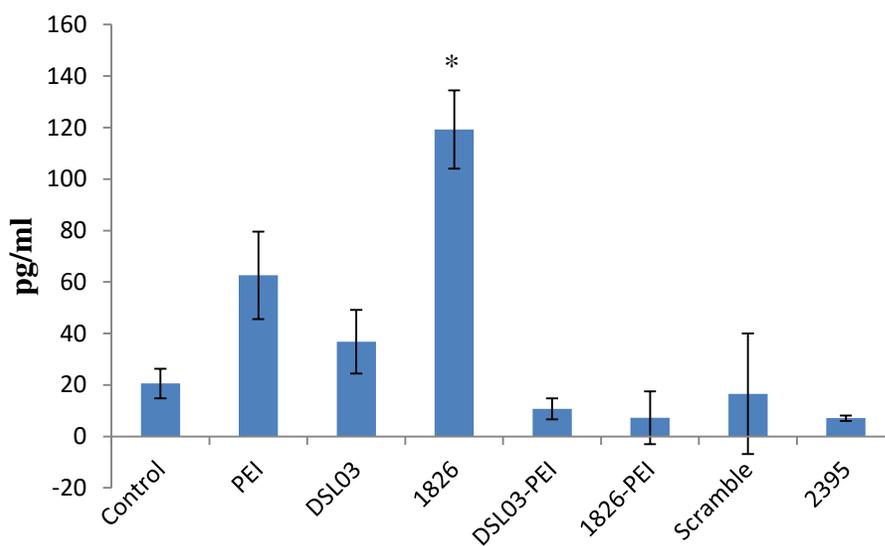


Figura 28. Nivel de IL-10 en suero de ratones estimulados con CpG y control.

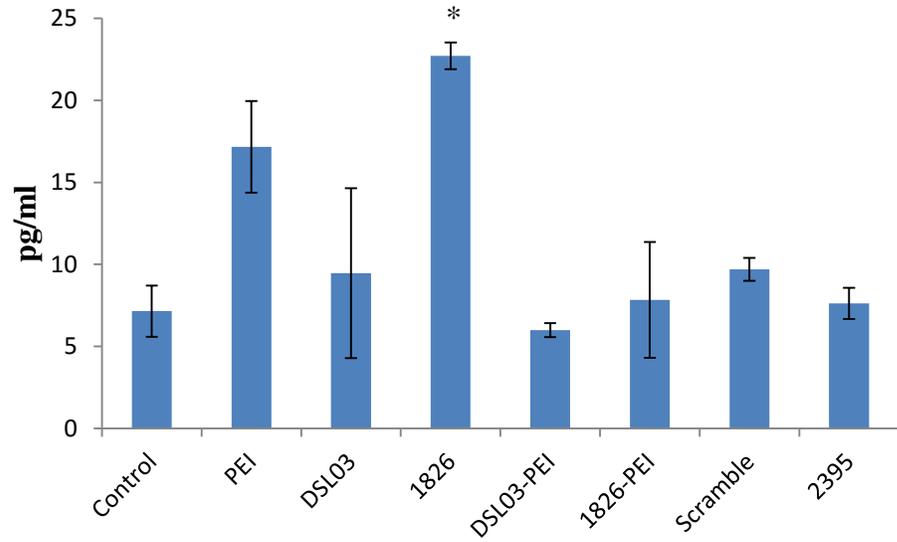


Figura 29. Nivel de IL-4 en suero de ratones estimulados con CpG y control.

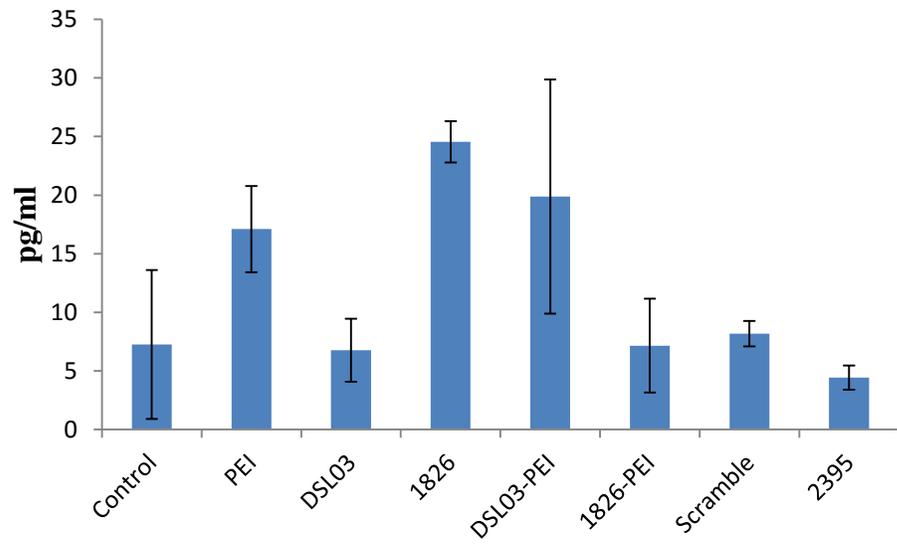


Figura 30. Nivel de IL-6 en suero de ratones estimulados con CpG y control.

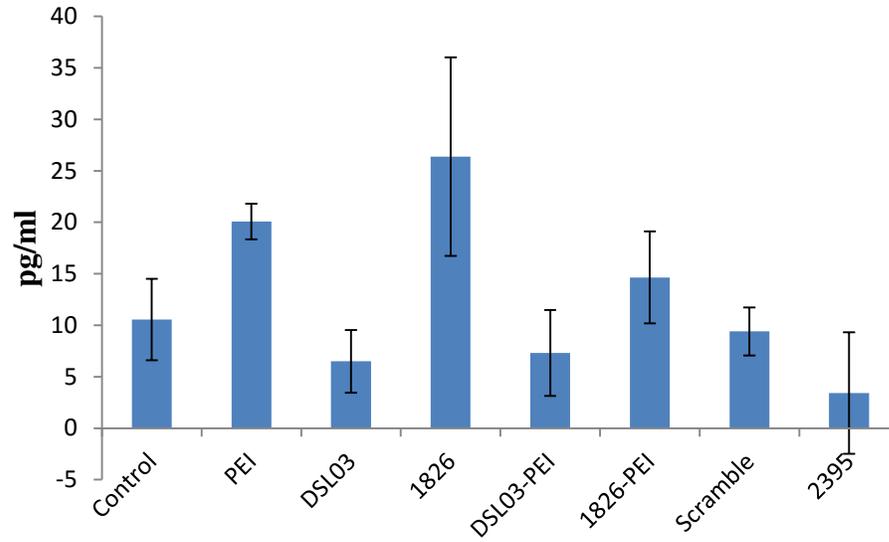


Figura 31. Nivel de TNF en suero de ratones estimulados con CpG y control.

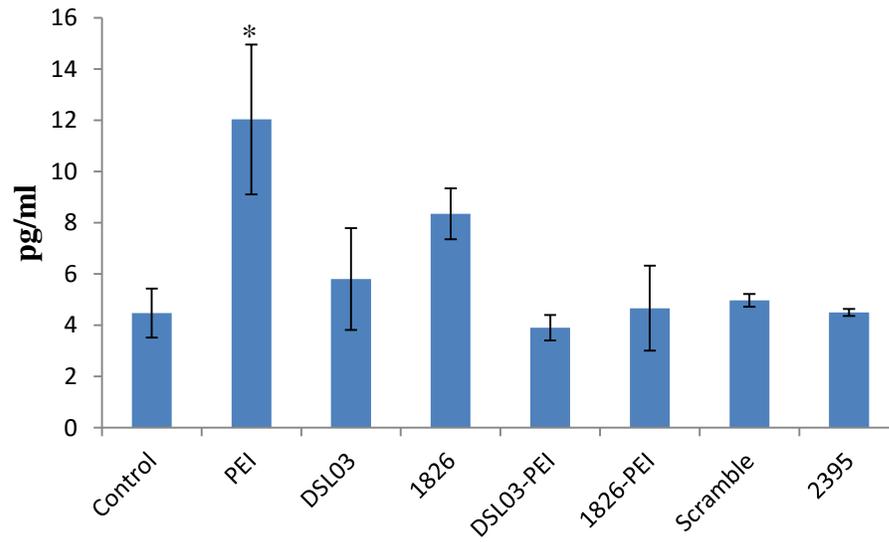


Figura 32. Nivel de IFN-γ en suero de ratones estimulados con CpG y control.

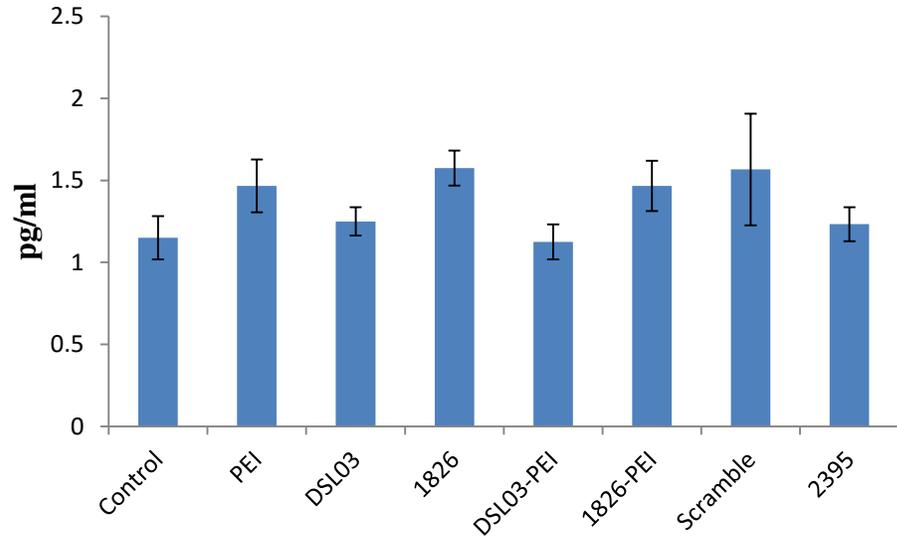


Figura 33. Nivel de IL-2 en suero de ratones estimulados con CpG y control.

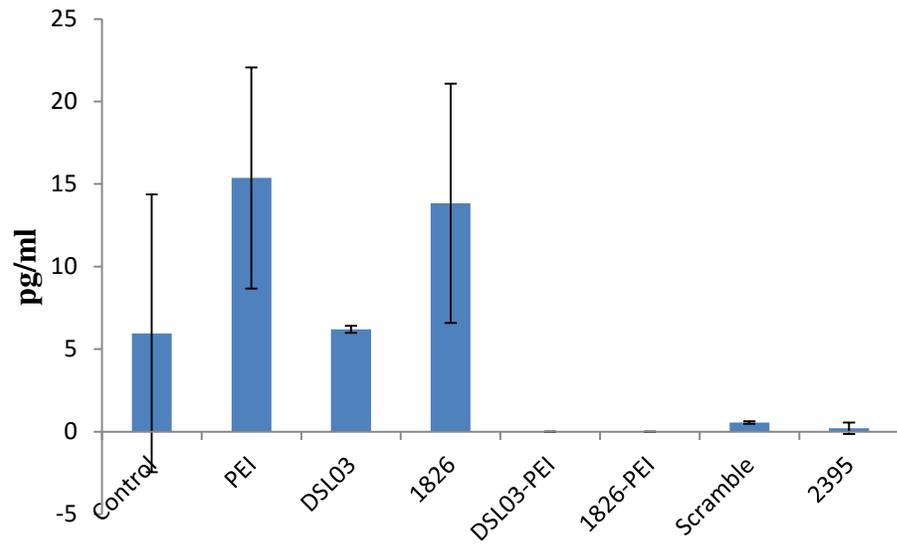


Figura 34. Nivel de IL-17A en suero de ratones estimulados con CpG y control.

7.5 Internalización de Complejos CpG-péptido

Para demostrar que los péptidos de WT1, que presentan naturaleza catiónica, son capaces de acomplejar el CpG (con naturaleza aniónica), se realizó un ensayo donde se analizó la internalización de CpG-FITC solo y su internalización diferencial al estar en combinación con los péptidos, así como con PEI como control positivo de acomplejamiento e internalización, pues es el principal agente transfectante utilizado en el laboratorio.

Se realizó en células B16F10 y en células adherentes de bazo de ratón (fagocíticas). Se observó mediante microscopio de fluorescencia y mediante citometría de flujo.

Al estar el CpG en combinación con el péptido de mayor carga (CD4+:16 mer, carga 5+), se observa una mayor internalización en células fagocíticas, mediante microscopía. Sin embargo en células B16F10 se observaron más células marcadas al estar en combinación con el péptido de menor carga (CD8+:9 mer, carga 1+) y con ambos péptidos, como se muestra en la figura 29.

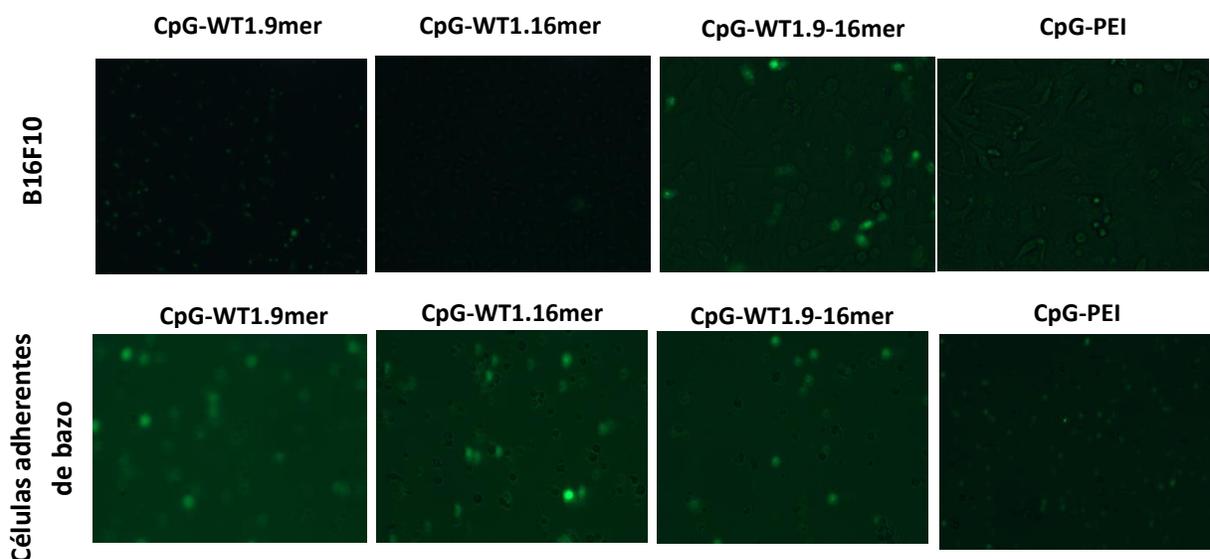


Figura 35. Internalización de complejos CpG-FITC : Péptido en células B16F10 y células adherentes de bazo de ratón.

Por otro lado, en el análisis por citometría de flujo, se despegaron las células y se lavaron en PBS 1X, se leyeron en el citómetro. En células B16F10, al estar el CpG en

combinación con el péptido de 9 mer, aumenta al doble la cantidad de células marcadas con respecto al CpG solo, sin embargo al estar el CpG en combinación con el péptido de 16 mer, el 54.6 % de las células se encuentra marcada, aumentando el porcentaje de internalización en un 52.4 %; por lo contrario, al combinar ambos péptidos y el CpG hay un menor porcentaje de células marcadas que con sólo el péptido de 16 mer, por lo que puede estar ocurriendo competencia entre lo péptidos por el CpG. Finalmente en el control de internalización (PEI) se observa que el 78.8% de las células analizadas internalizaron el CpG, sin embargo es evidente un daño generado por parte del PEI, ya que había una menor cantidad de células intactas y por lo tanto se analizó una población menor (5000 eventos), tal como se muestra en la figura 30.

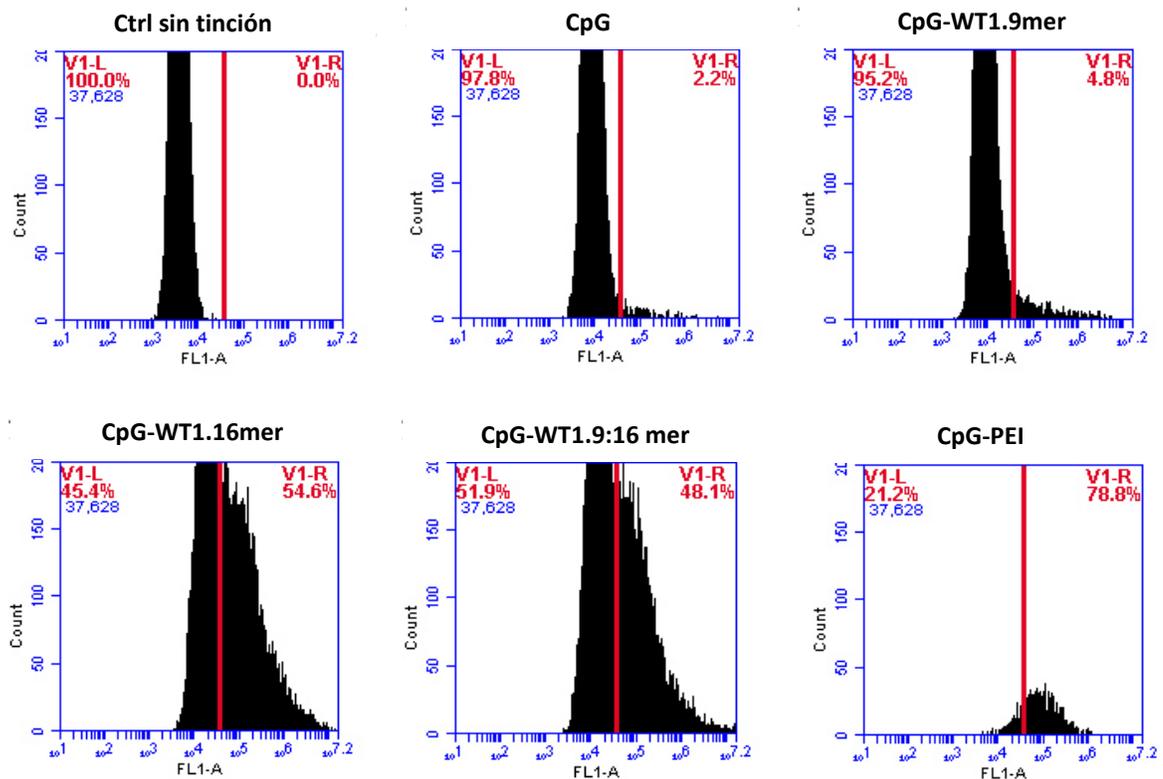


Figura 36. Análisis de internalización de complejos CpG-FITC : Péptido en células B16F10. 5×10^4 células B16F10 fueron plaqueadas, a las 24 h se estimularon con CpG-FITC, CpG-FITC-WT1.9, CpG-FITC-WT1-16, CpG-FITC-WT1.9-16 y CpG-FITC-PEI. Se incubaron por 30 min y se analizó por citometría de flujo la cantidad de células marcadas con FITC.

En células adherentes de bazo de ratón, se observó un 13.4% de células marcadas, comprobando su potencial fagocítico, al poner el CpG en combinación con el péptido de 9 mer, se observa un aumento ligero en la internalización al estar marcadas el 14.2% de las células. Sin embargo, la combinación de CpG con el péptido de 16 mer la internalización fue mayor al estar marcadas el 25.6% de las células; no obstante el aumento fue todavía mayor con un 33.4% acomplejando ambos péptidos al CpG. De nuevo se observa con el PEI una mayor cantidad de células marcadas (58%).

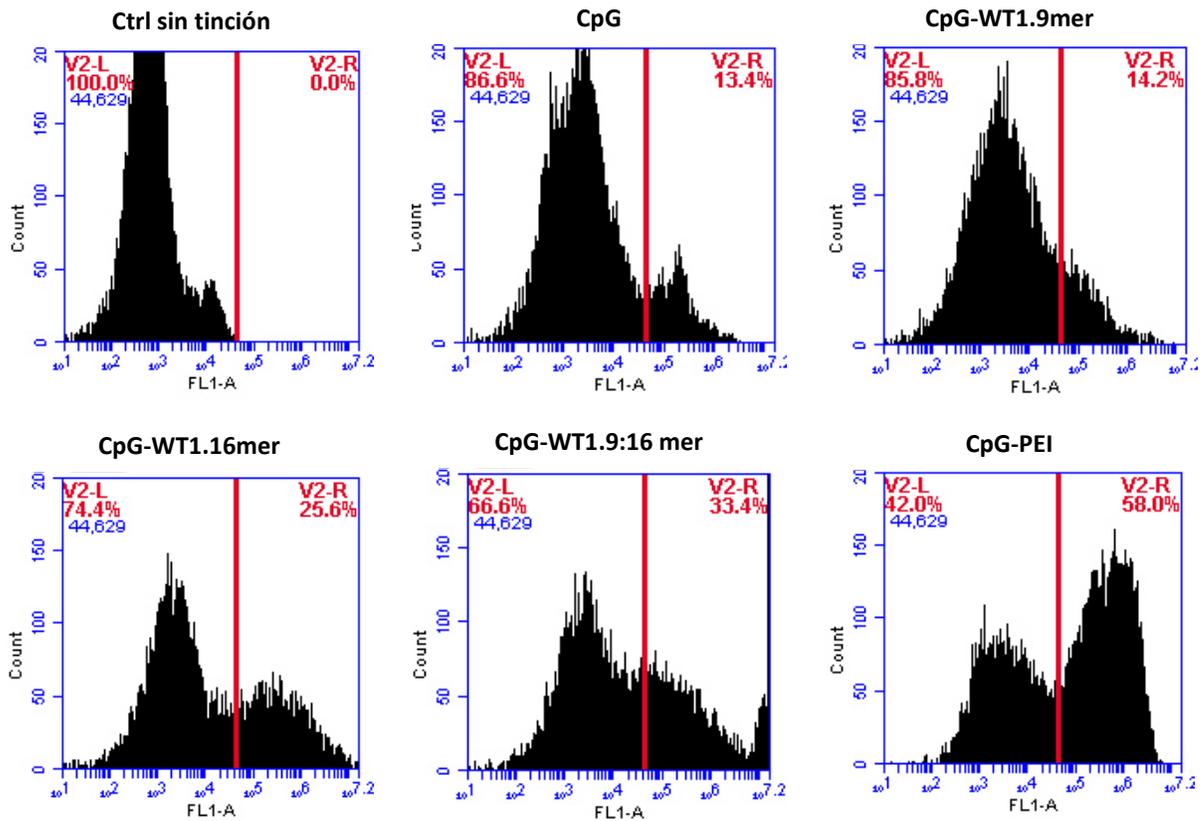


Figura 37. Análisis de internalización de complejos CpG-FITC : Péptido en células adherentes de bazo de ratón. 9×10^5 células de bazo de ratón fueron plaqueadas, a las 24 h se retiró el sobrenadante para retener las células adherentes y se estimularon con CpG-FITC, CpG-FITC-WT1.9, CpG-FITC-WT1-16, CpG-FITC-WT1.9-16 y CpG-FITC-PEI. Se incubaron por 30 min y se analizó por citometría de flujo la cantidad de células marcadas con FITC.

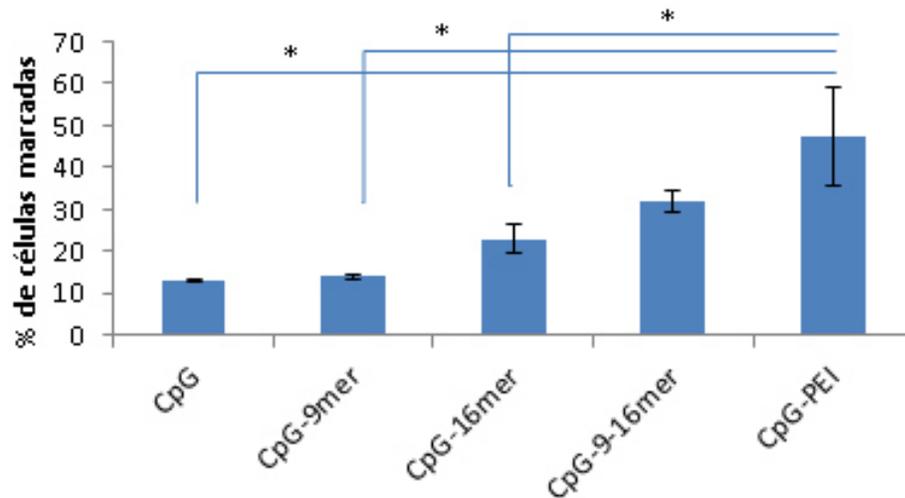


Figura 38. Histograma de porcentaje de internalización de complejos CpG:Péptido en células adherentes de bazo de ratón ($p < 0.05$).

7.6 Fagocitosis FITC-Dextran

La capacidad fagocítica de las células adherentes de bazo de ratón posterior a la estimulación con CpG durante 18 horas, fue evaluada mediante la captación de FITC-Dextran por citometría de flujo.

No hubo diferencia significativa en la capacidad de captación de FITC-Dextran por parte de las células adherentes de bazo después del estímulo con CpG con respecto al control.

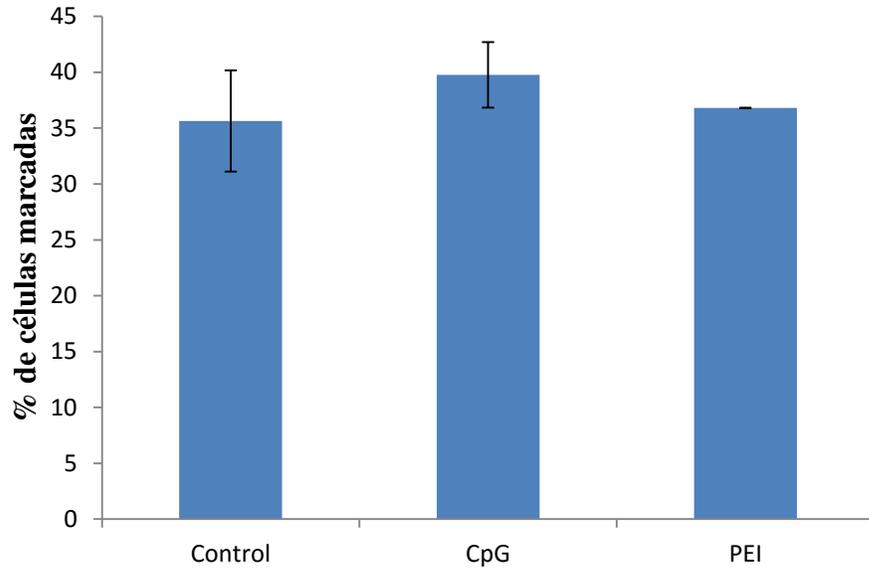


Figura 39. Captación de FITC-Dextran por células adherentes de bazo de ratón tras la estimulación con CpG.

7.7 Especificidad antigénica de péptidos de WT1 *in vitro*.

La especificidad antigénica de los péptidos se evaluó de manera indirecta mediante cuantificación de IFN- γ secretado en sobrenadante de linfocitos de ratón estimulado co-cultivados con células B16F10. Se observó una diferencia significativa entre la producción de IFN- γ del ratón estimulado con el epítipo de WT1 para CD8+ y el epítipo de WT1 para CD4+, $p=0.012$, como se observa en la figura 34.

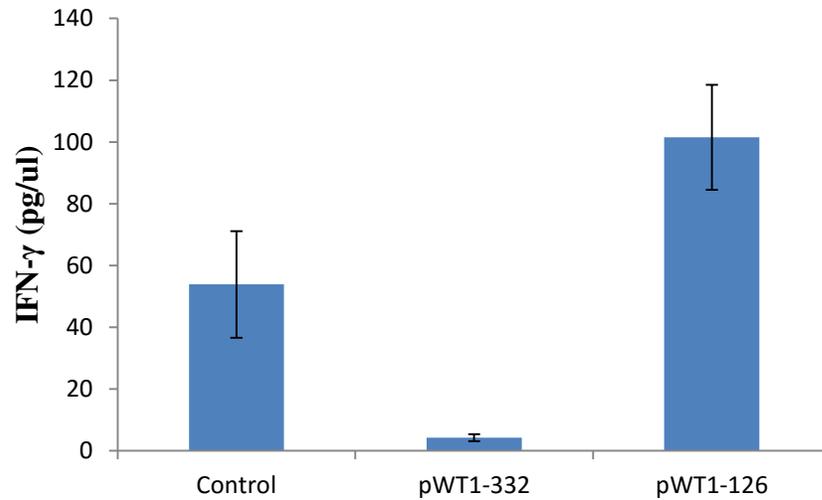


Figura 40. Especificidad antigénica *in vitro*. Medición de IFN- γ en sobrenadantes de linfocitos de ratones estimulados con los péptidos vía aerosol (al día 6) co-cultivados con células B16F10.

7.8 Establecimiento del modelo de metástasis pulmonar con las células B16F10

Se logró establecer el modelo de metástasis pulmonar en ratones C57BL/6 al inocular 5×10^5 células B16F10. A partir del día 7 los pulmones presentaron focos tumorales visibles, como se observa en la Figura 35.

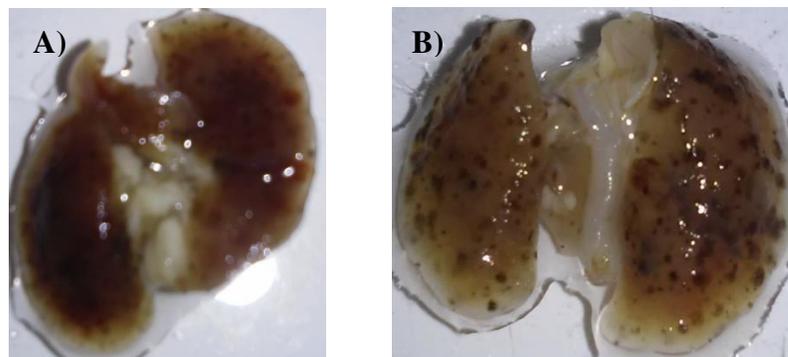


Figura 41. Inducción de metástasis pulmonar en ratón C57BL/6. A) Pulmón de ratón con focos tumorales visibles al día 8 y B) Al día 13 post-inoculación IV con 5×10^5 células B16F10.

7.9 Medición del peso de ratones con tumor pulmonar

Se registró el peso de los ratones a partir del primer día de inoculación de las células B16F10 (día 0), siendo monitoreado cada tercer día y a partir del deceso del primer ratón, se llevó a cabo el registro cada día.

No se observó una diferencia aparente en la evolución de los pesos entre la mayoría de los grupos, sin embargo destaca el grupo con CpG- pWT1-126 como tratamiento, con un aumento del 20% del peso original.

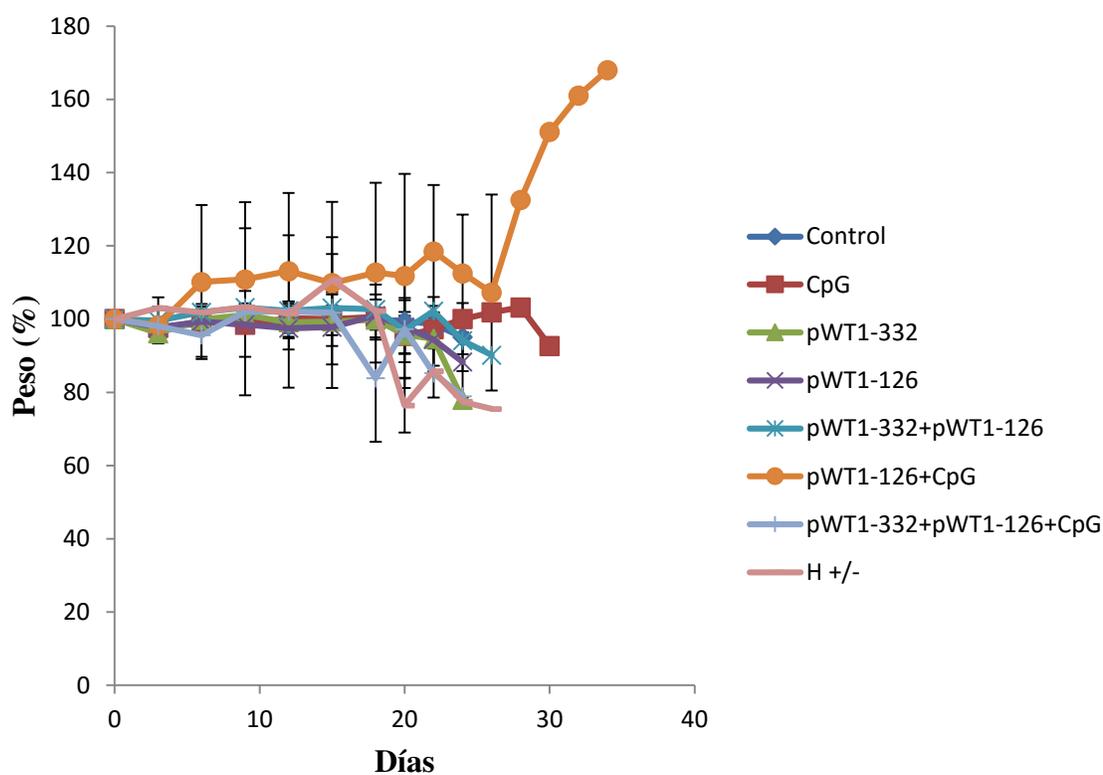


Figura 42. Peso de ratones con tumor pulmonar control y tratados. Se evaluó el peso de los ratones tanto del grupo control como de los distintos tratamientos cada 3 días a partir del día 0 (día de inoculación de células IV), hasta el deceso del total de los ratones. Se muestran los pesos promedio con su respectiva desviación estándar.

7.10 **Dissección de pulmones de ratones inoculados**

Posterior al deceso de los ratones, se realizó la necropsia y se extrajeron los pulmones, los cuales fueron lavados con solución salina y fueron fijados en formalina al 10%. Las fotografías se muestran en la figura 37.

El pulmón 1 con el tratamiento de pWT1-126, presentó tumor en la base de la cola, con focos tumorales visibles <5. El ratón 2 del tratamiento con pWT1-332+pWT1-126 presentó tumor en los ovarios, con focos tumorales visibles en pulmón <10. Por otro lado, el pulmón 1 tratado con CpG presentó menor carga tumoral que el resto de los pulmones de los diferentes tratamientos, además de una mayor supervivencia. Además es posible visualizar que los pulmones de los tratamientos con pWT1-332+pWT1-126 presentan menor carga tumoral aparente con respecto al resto de los tratamientos, sin embargo no fue posible contar la cantidad de focos en ninguno de los casos.

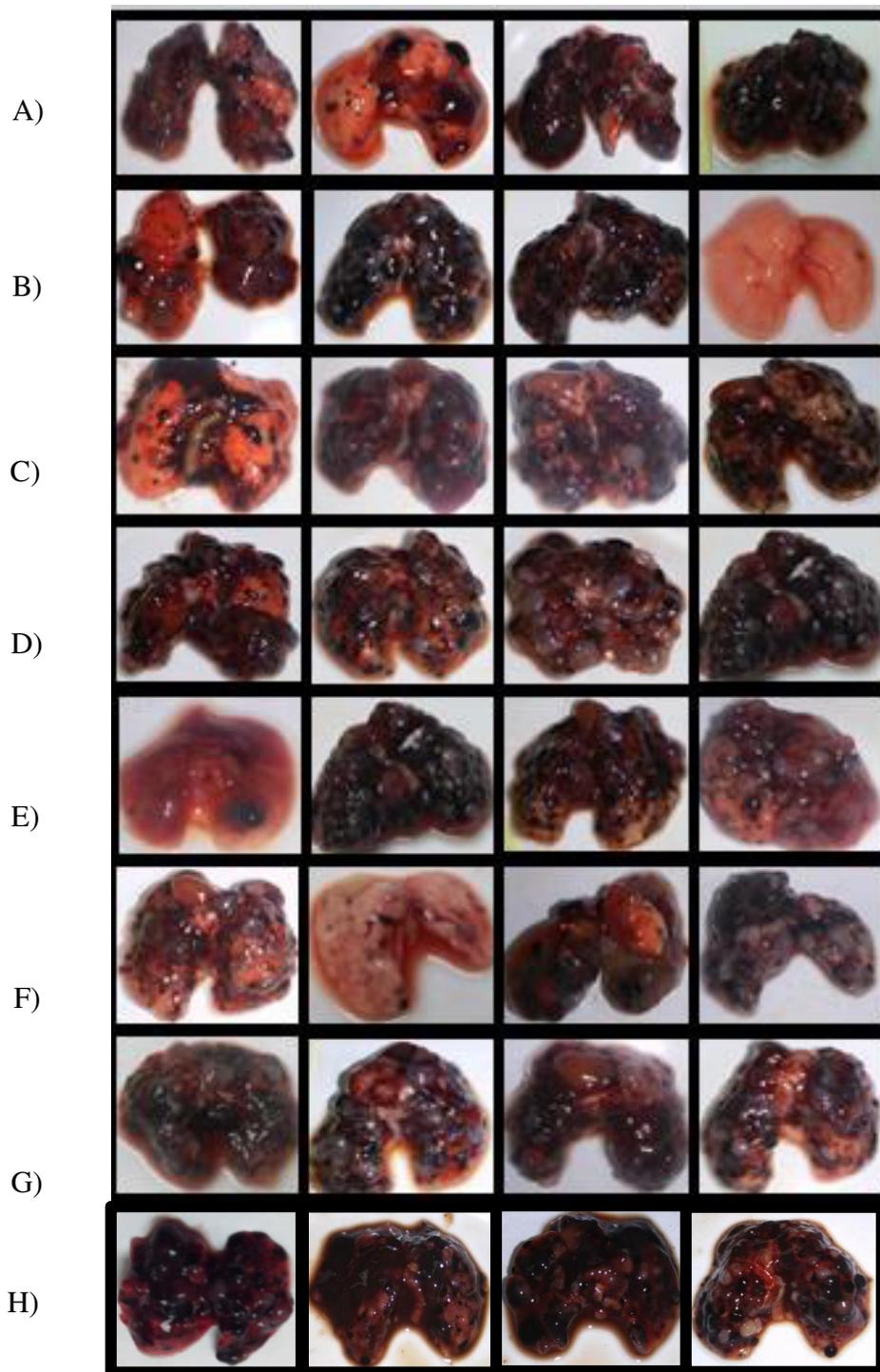


Figura 43. Comparación de pulmones de grupos control y tratados al final del ensayo. A) Control, B) CpG, C) pWT1-332, D) pWT1-126, E) CpG+pWT1-126, F) pWT1-332+pWT1-126, G) CpG+pWT1-332+pWT1-126, H) Plásmido isoforma de WT1 H^{+/-}.

7.11 Índice tumoral

El índice tumoral se determinó diseccionando los pulmones, posteriormente se registró el peso de los mismos como se muestra en la figura 38. Donde los de menor peso corresponden a los que presentaron menor carga tumoral. Posterior al pesaje de los pulmones, se procedió a contar los focos tumorales para establecer el grado de desarrollo tumoral que estos presentaron, en la mayoría no fue posible contar los focos tumorales debido a que la muestra fue tomada siendo la progresión del tumor en etapa final posterior al deceso natural de los ratones. El producto del peso del pulmón por el grado de tumor corresponde al índice tumoral, presentándose en la figura 39.

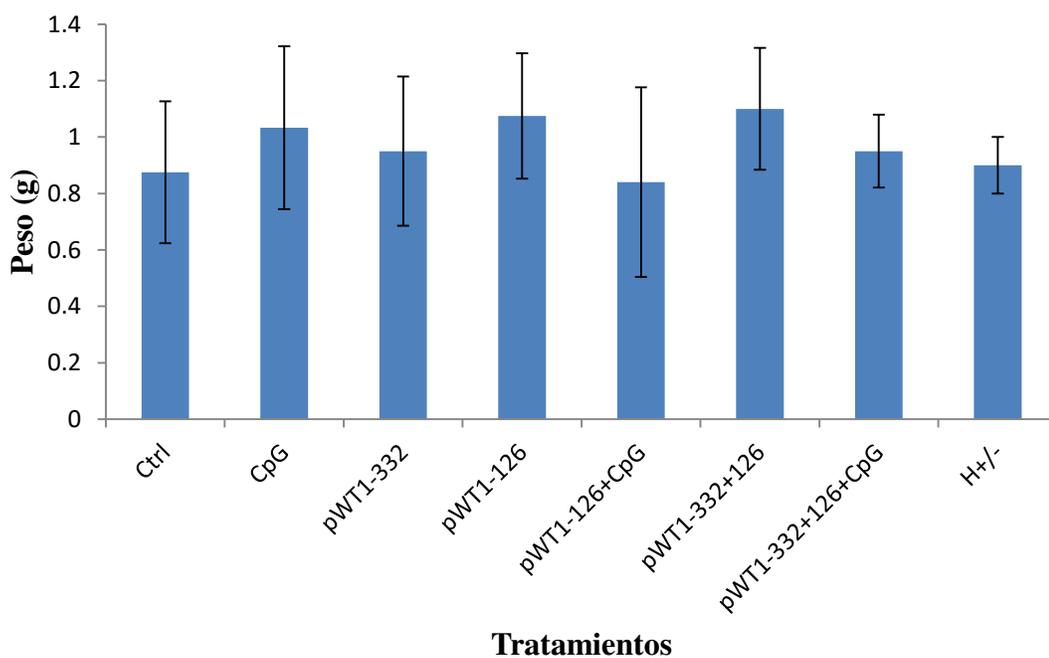


Figura 44. Peso de pulmones de ratones control y tratados con tumor.

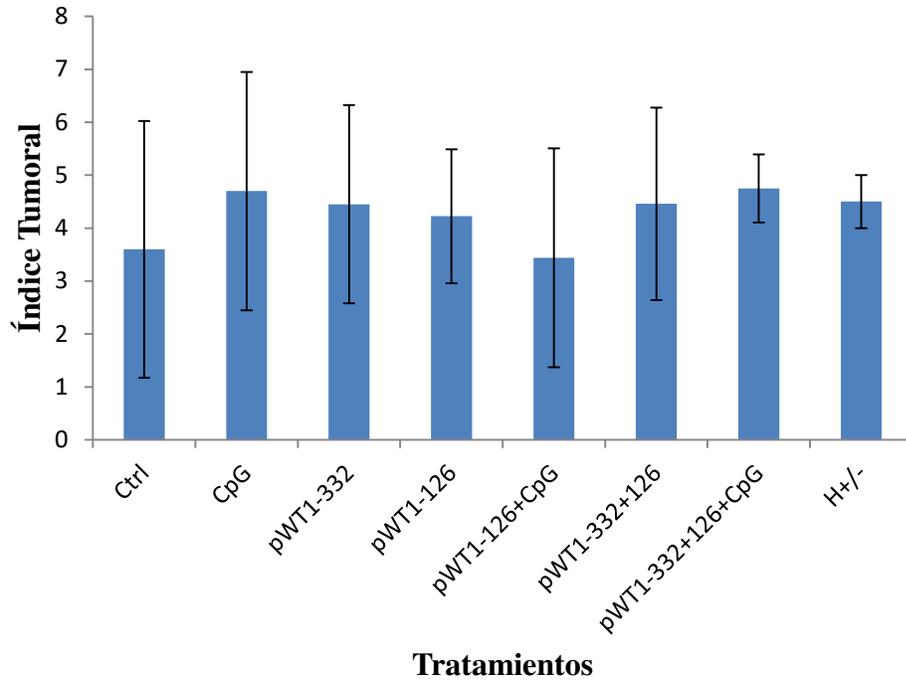


Figura 45. Índice tumoral de ratones control y tratados.

7.12 Análisis de supervivencia

Los ratones a los que se indujo el tumor, tanto control como tratados, fueron analizados hasta que se produjo su deceso natural, esto para evaluar la supervivencia de los mismos. A partir del día 20, ocurrieron los primeros decesos correspondientes a los grupos control, tratados con CpG, pWT1-332, pWT1-126, pWT1-126+CpG y pWT1-332+126+CpG. No se observó una diferencia significativa entre los grupos, $p=0.598$.

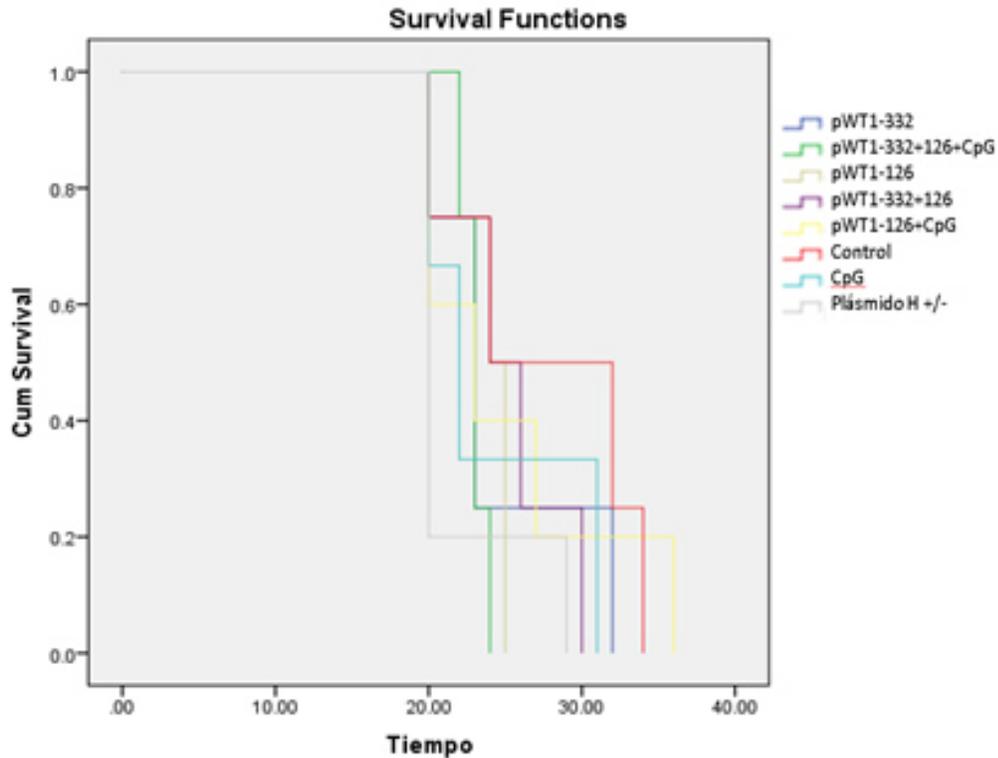


Figura 46. Análisis de supervivencia de ratones con tumor pulmonar y tratados. Gráfica Kaplan-Meyer.

7.13 Análisis de la respuesta inmune en ratones inmunizados mediante cuantificación de citocinas.

Los niveles de citocinas Th1, Th2 y Th17 fueron analizados en suero de ratones con tumor control e inmunizados con el péptido de WT1-9mer para determinar si éste fue capaz de generar una respuesta.

La inmunización con dicho péptido incrementó significativamente los niveles de IL-10 hasta 5 veces más que los registrados en el control ($p=0.006$). Por otro lado, se observó una disminución significativa en el nivel de IL-4 ($p=0.037$) y TNF ($p=0.027$). Además se observó una disminución en los niveles de IFN- γ e IL-17, mas no fue significativa.

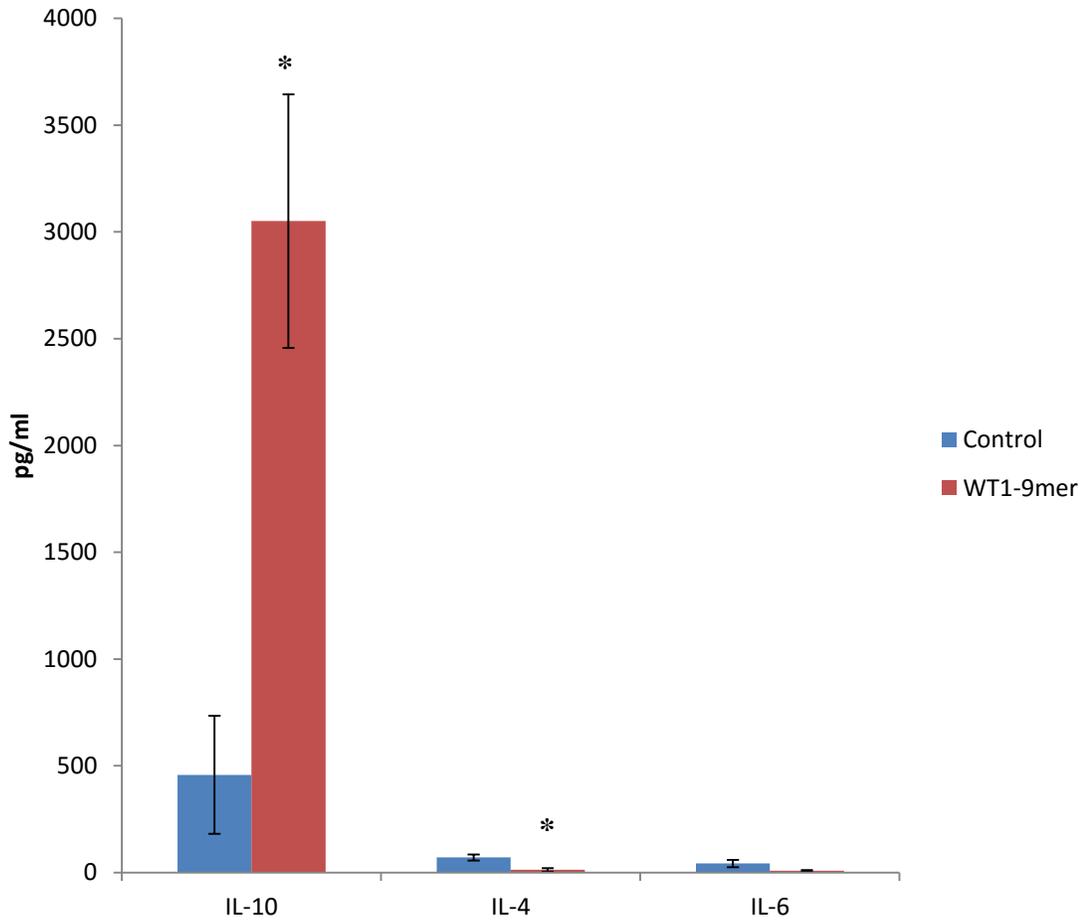


Figura 47. Niveles de citocinas TH2 en suero de ratones post-vacunación.

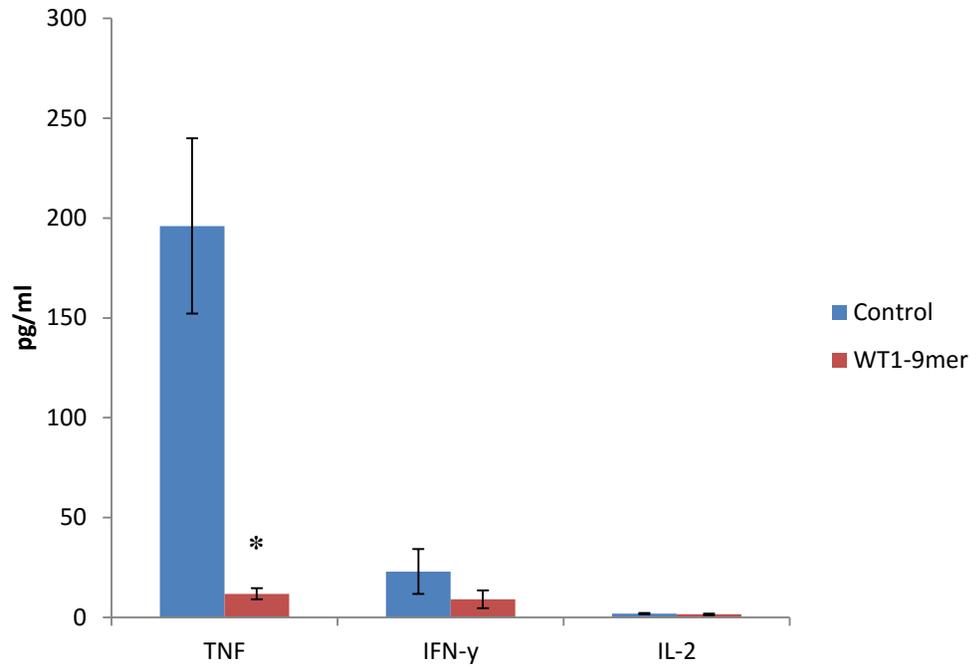


Figura 48. Niveles de citocinas TH1 en suero de ratones post-vacunación.

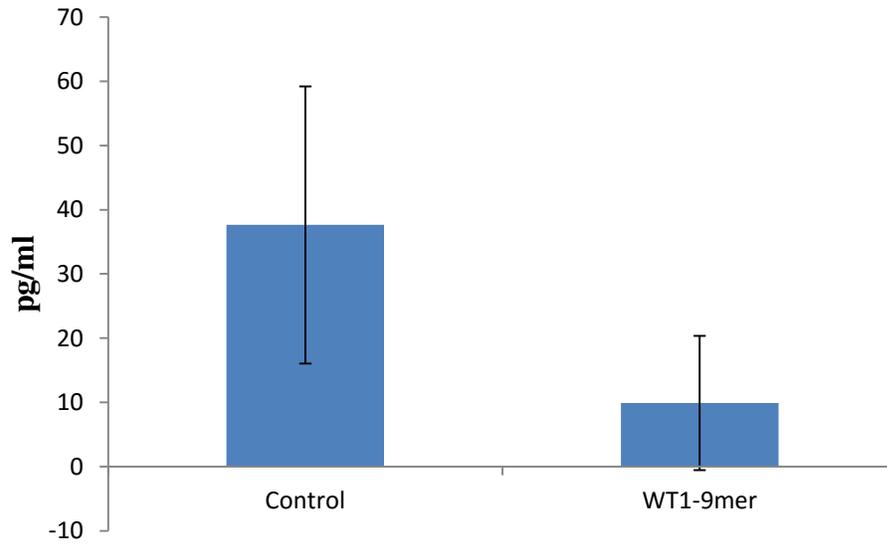


Figura 49. Niveles de IL-17 en suero de ratones post-vacunación.

8. DISCUSIÓN

Vacunas con antígenos asociados a tumor han sido utilizadas para levantar una respuesta inmune específica contra tumor, sin embargo, una de las principales desventajas es la pobre inmunogenicidad característica de un antígeno propio. Por ello, es importante elegir adecuadamente, tanto el antígeno, como la vía de administración y el adyuvante a utilizar para evitar una respuesta tolerogénica.

La vía nasal no ha sido considerada debido a que en ciertos estudios se ha probado que la tendencia es a una respuesta tolerogénica más que protectora. Sin embargo, la misma naturaleza del tejido asociado a mucosas sigue mostrándose prometedora, con posibles oportunidades para idear una mejor aproximación hacia las células del sistema inmune en estas cavidades. 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 and 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).

Este trabajo se enfocó en la aplicación de una vacuna peptídica contra el antígeno asociado a tumor WT1 en combinación con CpG como adyuvante, vía aerosol para potencializar la respuesta en mucosas y atacar así un tumor de melanoma murino implantado en pulmón.

Estudios corroboran que las propiedades adyuvantes de los CpG-ODNs son observadas al administrarse ya sea sistémicamente o en mucosas (Bode et al., 2011). Los resultados de Ewaschuk et al, del 2007 demuestran que células del epitelio intestinal reconocen ADN bacteriano patogénico y responden incrementando la localización de superficie y

la expresión de TLR9, sugiriendo que la respuesta inflamatoria del epitelio a ADN patógeno es mediada al menos en parte por el incremento en la expresión de TLR9 (Ewaschuk et al., 2007). Por otro lado, TLR9 funcionalmente activo se encuentra expresado en células tumorales humanas, y puede representar un nuevo acercamiento hacia el rol de agonistas de TLR9 usados en la inmunoterapia contra cáncer. (Ren et al., 2007). Debido a que los oligos CpG son reconocidos por el receptor tipo Toll 9 presente en células del sistema inmune tales como linfocitos B, células dendríticas plasmocitoides y macrófagos, así como en células epiteliales de pulmón normal, se efectuó un análisis de la expresión de dicho receptor en tejido pulmonar normal y en tejido pulmonar de ratones estimulados con CpG 1826, DSL03 y 2395. Se detectó TLR9 correspondiente al peso de la proteína glicosilada (160KDa), indicando que es la proteína funcional localizable al endolisosoma, acorde con Chockalingam y col. (Chockalingam et al., 2009), por lo que podría activarse la señalización no sólo en células del sistema inmune que expresan dicho receptor (células B, células dendríticas plasmocitoides y macrófagos en el caso de ratones) sino también por células epiteliales de pulmón. Además, la expresión de la proteína del receptor tipo Toll 9 se incrementó en los tejidos tratados con CpG 1826, solo y en combinación con PEI (un 60% y 24% respectivamente), lo cual podría deberse a la migración de células inflamatorias al tejido pulmonar y también a una regulación de la expresión de TLR9 del epitelio pulmonar como respuesta a la misma señalización por el CpG, semejante a lo que ocurre en células del epitelio intestinal.

Conjuntamente se analizó el efecto de esa misma estimulación con los CpG antes mencionados en cortes histológicos de pulmón con la tinción de H&E y posteriormente con IFI para determinar las poblaciones celulares infiltradas. Se observó que la estimulación con ODN-CpG vía aerosol, promueve la infiltración de células linfoides en tejido pulmonar; sin embargo, las células más abundantes en los infiltrados, corresponden a linfocitos CD20+, es decir, linfocitos B maduros. Norton et al. reportan que la administración intranasal de CpG produce cambios histológicos mínimos en pulmones de ratones BALB/c en comparación con el control (Norton et al., 2010).

Haining y colaboradores reportan que células dendríticas plasmocitoides tratadas con ODN-CpG inducen la migración de células T *in vitro*, demostrando que la estimulación de células dendríticas plasmocitoides humanas con ODN-CpG es suficiente para quimio-atraer células T (Haining et al., 2008). Contrastando con estos resultados, la nebulización con CpG 1826 y 2395 no estimuló la migración linfocitaria de células T CD3+ en tejido pulmonar; en cambio, la estimulación de CpG DSL03 sí propició infiltrados de células positivas para dicho marcador, mas no fue significativo comparando con el control; por lo que la estimulación de células dendríticas pudo haber sido insuficiente o verse antagonizada por el microambiente generado *in vivo* por otras poblaciones celulares.

Park y colaboradores demuestran que la administración de CpG 1826 incrementa ligeramente la expresión del marcador de superficie CD80 y que además aumenta la capacidad fagocítica de células RAW (Park et al., 2013), en contraste en este trabajo no se observó diferencia significativa en la capacidad fagocítica de células adherentes de bazo de ratón después de estimular con CpG, por otro lado, la expresión de CD80 no pudo ser evaluada en todas las muestras para hacer un análisis adecuado.

Alari-Pahissa et al. reportan que CD69 no tiene un rol en la co-estimulación, ni un efecto en el procesamiento o presentación de antígeno, en células dendríticas y linfocitos T (Alari-Pahissa et al., 2012). En otro contexto celular, la activación de células NK se caracteriza por la regulación positiva de la expresión de CD69, la cual es independiente del contacto con células dendríticas maduras, pero dependiente de los factores secretados por estas, tales como IFN- α y TNF- α . (Benlahrech et al., 2009; Marshall et al., 2006). La estimulación con CpG 2395 y DSL03-PEI vía aerosol, promovió infiltrados con células positivas para el marcador CD69 en tejido pulmonar; debido a que la expresión del marcador CD3 para células T no fue significativo en los grupos tratados, la presencia de CD69 se puede adjudicar a células dendríticas o NK; serían necesarios futuros ensayos con otros marcadores para diferenciar ambas poblaciones y para poder discriminar con certeza si se encuentran activadas, así como su relación con citocinas como IFN- α , TNF- α e IFN- γ .

Shiow et al. indican que CD69 forma un complejo con S1P1 que lo regula negativamente y que funciona río abajo de IFN- α/β , y posiblemente de otros estímulos de activación para promover la retención de linfocitos en los órganos linfoides (Shiow et al., 2006). Esto correlaciona con los resultados observados por inmunofluorescencia, en donde el grupo control y el tratamiento con CpG DSL03 fueron negativos para el marcador CD69, sin embargo fueron los únicos tratamientos donde se observaron células positivas para CD3. El fenómeno opuesto fue observable en los tratamientos con PEI, Scramble, CpG 2395 y DSL03-PEI, los cuales presentaron células positivas para CD69, pero una ausencia de infiltrados linfocitarios CD3+; por lo que probablemente la expresión de CD69 sea un indicador de la retención de los linfocitos T dentro de los órganos linfoides.

Se ha visto que la estimulación con CpG-ODNs mejora la función de células presentadoras de antígeno profesionales y potencian la generación de una respuesta inmune humoral y celular vacuna-específicas. Estos efectos son optimizados manteniendo ODNs y la vacuna en una proximidad cercana. Estudios preclínicos indican que los CpG mejoran la actividad de vacunas contra enfermedades infecciosas y cáncer, así como la inmunogenicidad de vacunas co-administradas (Bodeet al., 2011). Además, Gungor et al. demuestran que la combinación de un ODN-CpG con un péptido catiónico es capaz de formar complejos en forma de nano-anillos y que estos mejoran la internalización celular, traslocan el CpG al endosoma temprano e inducen una respuesta robusta de IFN α por parte de CDp humanas (Gungor et al., 2014). En este trabajo, los péptidos de WT1 (ligeramente catiónicos con carga 1+ y 5+) fueron capaces de acomplejarse con el CpG 2395 y mejoraron la internalización celular tanto en células B16F10 como en células adherentes de bazo de ratón.

En estudios previos, Olguin reporta que la generación de linfocitos T CD8+ antígeno específicos (mediante estímulo con el péptido de 9 mer de WT1, IL-2, IL-15, IL-21, e IL-15/21), tienen efecto citotóxico contra la línea tumoral MCF-7, probando la eficacia del uso de dicho péptido (Olguin, 2012). Asimismo, en estudios llevados a cabo en el laboratorio, una sola administración vía aerosol de la isoforma H+/- de WT1 solo y en

combinación con CpG 2395 logró inhibir el crecimiento tumoral en comparación con el control en un modelo profiláctico de linfoma L5178Y-R (Zacarias Hernández, 2015). Debido a estos resultados el CpG 2395 fue empleado en este trabajo, al igual que el plásmido de la isoforma H+/- como control positivo, sin embargo los resultados fueron completamente opuestos tanto por el CpG 2395 como por el plásmido, concluyendo que la pobre respuesta antitumoral no fue debido al péptido, al CpG ni al plásmido que, como ya se mencionó, han dado resultados positivos en otros modelos, sino a la pobre inmunogenicidad de los tumores inducidos por la línea celular B16F10.

La IL-10 puede tener una actividad antitumoral en gliomas, melanomas, y carcinomas de mama y ovario, a través de un mecanismo que involucra la regulación negativa de MHC-I, induciendo lisis tumoral mediada por células NK (Kundu and Fulton, 1997). Los niveles de IL-10 del grupo de ratones con tumor tratado con el péptido WT1-9mer fueron significativamente mayores que el nivel del grupo control, sin embargo no hubo diferencia en el índice tumoral entre ambos grupos, lo cual puede deberse a una ausencia de células NK, por lo que sería interesante evaluar por IFI la presencia de células NK infiltradas en pulmón posterior a la inmunización con dicho péptido.

Niveles elevados de IL-6 en suero han sido detectados en pacientes con cáncer sistémico en comparación a controles sanos. La IL-6 se ha propuesto como un predictor de malignidad con una sensibilidad y especificidad alrededor de 60-70% y 58-90% respectivamente (Landskron et al., 2014). Sin embargo en este trabajo, el nivel de IL-6 en suero de ratones con tumor pulmonar inmunizados con WT1-9mer fue menor que en el control, donde quizá esta citocina no es un apropiado indicador de malignidad para este tipo de modelo.

La IL-4 en combinación con TNF incrementa significativamente la habilidad de las células de melanoma de estimular CTL y de actuar como blanco para dichas células (Hoon et al., 1993). Efecto semejante fue descrito por Ohira y col., en B16F10 transfectadas con IL-4 donde observaron que las células T y NK son necesarias para el rechazo de células tumorales (Ohira et al., 1994). En este estudio la administración del

péptido de WT1-9mer disminuyó significativamente tanto el nivel de IL-4 como de TNF- α , respecto al control; lo cual explica que la antigenicidad de las células de melanoma no se vio incrementada, no habiendo una estimulación de linfocitos T citotóxicos significativa, este resultado se ve reforzado con el nivel de IFN- γ detectado tras la nebulización, siendo éste incluso menor al grupo control.

Los mediadores inflamatorios como Hmgb1, IL-23 e IL-17 pueden promover el crecimiento tumoral activando la vía IL-6/STAT3 en el modelo murino de melanoma (Landskronet al., 2014). La administración del péptido de WT1-9mer disminuye el nivel de IL-17, en suero de ratones con metástasis a pulmón de células de melanoma murino (B16F10), aunque no de forma significativa, demostrando que está despertando una respuesta favorable en el modelo de melanoma, que sin embargo no fue suficiente para disminuir la masa tumoral o incrementar la supervivencia.

Dicho todo esto, el mejor adyuvante para mejorar la antigenicidad de las células tumorales B16F10, podría ser el CpG 1826 solo, ya que aumenta significativamente los niveles de IL-10 e IL-4, y también incrementa los niveles de TNF- α e IFN- γ aunque no de forma significativa; o bien la administración vía aerosol de PEI, debido a que incrementó los niveles de IFN- γ de forma significativa, así como los niveles de IL-4 y TNF- α , mas no significativamente, además mediante IFI se observaron mayor número de células CD69+ ($p=0.036$), que como ya se ha mencionado es un marcador para células NK y la lisis tumoral de la línea celular de melanoma murino B16F10 depende en gran medida de dicha población celular.

Zhang y colaboradores, demuestran que la baja inmunogenicidad de la línea celular B16F10 es debida a la sub expresión de las proteínas TAP1 y TAP2 (transportadores asociados al procesamiento de antígeno), lo que además trae consigo una ausencia de procesamiento de antígenos asociados a tumor y una baja expresión de superficie de moléculas de MHC clase I (Zhang et al., 2007). Los resultados de Buhtoiarov y col. Indican que el control del crecimiento de tumores pobremente inmunogénicos durante inmunoterapia basada en CpG, es mediado de manera predominante por macrófagos y

no por células T ni NK. (Buhtoiarov et al., 2007). Retomando la hipótesis de este trabajo, la administración vía aerosol de una vacuna con péptidos inmunodominantes de WT1 y CpG no fue capaz de estimular una respuesta contra tumor en pulmón. Pudiendo concluir que la falta de respuesta contra tumor al administrar los péptidos inmunodominantes de WT1, solos y en combinación con CpG, se puede adjudicar a la pobre inmunogenicidad de las células de melanoma B16F10. Por tanto es probable que la presentación de los epítopes haya sido pobre e insuficiente para reducir el tumor, además que el CpG utilizado en la vacuna (2395) no estimuló en gran medida a macrófagos, lo cual fue observado con un marcaje negativo para CD80 y en el ensayo de fagocitosis, donde no se vio de manera significativa un incremento en la capacidad fagocítica.

9. CONCLUSIONES

- Se detectó la proteína funcional de TLR9 en tejido pulmonar normal de ratón C57BL/6 y un aumento en la expresión de la misma tras el estímulo con CpG 1826 y PEI vía aerosol.
- La administración de los CpG 1826, DSL03 y 2395 vía aerosol, promovió la formación de infiltrados linfocitarios en pulmón de ratón.
- La administración vía aerosol de PEI promovió una infiltración significativa de células CD69+ ($p=0.036$), mas no estimuló la infiltración de células CD19+, CD80+ ni CD3+. La cantidad de células CD20+ fue mayor que en el control, sin embargo la diferencia no fue significativa.
- La estimulación vía aerosol con CpG DSL03 promovió infiltrados linfocitarios CD3+, en pulmón, estadísticamente significativo con respecto al control ($p=0.005$), sin embargo no estimuló la infiltración de células CD69+ ni CD80+.
- La estimulación vía aerosol con CpG 2395 presentó significativamente menor número de células CD19+ y CD69+ respecto al control ($p<0.05$) y no estimuló infiltrados celulares CD3+, CD20+ ni CD80+.
- La estimulación con CpG 1826 vía aerosol incrementó de forma significativa los niveles en suero de IL-10 ($p=0.001$) e IL-4 ($p=0.004$). Así como de TNF- α e IFN- γ aunque no significativamente.
- El estímulo vía aerosol de PEI incrementó el nivel en suero de IFN- γ ($p=0.005$); así como de IL-4 y TNF- α (sin ser un incremento significativo).
- La estimulación con CpG 2395 no fue suficiente para incrementar la capacidad fagocítica de células adherentes de bazo de ratón.

- Se comprobó que el CpG 2395 puede formar complejos con los péptidos inmunodominantes de WT1 tanto de 9 aminoácidos como de 16 aminoácidos y que además le otorgan una mayor capacidad para ser internalizado tanto por células no fagocíticas (B16F10) como fagocíticas (células adherentes de bazo de ratón).
- El co-cultivo de linfocitos estimulados con el péptido de WT1 de 9 mer y células B16F10 produjo estadísticamente un mayor nivel de IFN- γ con respecto al co-cultivo con estímulo del péptido de 16 mer ($p < 0.05$); hubo diferencia con respecto al control, sin embargo no fue significativa.
- Se logró establecer el modelo de metástasis a pulmón al inocular IV células B16F10, con focos tumorales evidentes al día 7 post-inoculación.
- La diferencia en peso entre el grupo control y los tratamientos no fue significativa.
- No se observó diferencia significativa en el índice tumoral del grupo control y tratados.
- No hubo diferencia significativa entre el tiempo de supervivencia del grupo control y tratamientos.
- La inmunización con el péptido WT1-9mer incrementó significativamente el nivel de IL-10 ($p = 0.006$) y disminuyó los niveles de IL-4 ($p = 0.037$) y TNF ($p = 0.027$); así como los niveles de IFN- γ e IL-17, aunque no de forma significativa.

10. PERSPECTIVAS

Como perspectivas se podría contemplar para otro estudio el análisis minucioso de los CpG de forma individual para determinar su actividad antitumoral e inmunomoduladora en diversas líneas celulares tanto inmunogénicas como pobremente inmunogénicas, además sería de utilidad evaluar mayor cantidad de marcadores para determinar específicamente de qué naturaleza son los infiltrados celulares presentes en tejido pulmonar posterior a la nebulización con CpG, así como evaluar por histología e IFI la presencia de linfocitos T CD8+ y células NK infiltrantes de tumor, al igual que la presencia de células inmunosupresoras, para dilucidar qué está ocurriendo en el microambiente y probar mejores acercamientos antitumorales. Además de la evaluación de citocinas a nivel local en lavados bronquiales con el fin de conocer con mayor exactitud el efecto del tratamiento en el tumor y en la zona de administración.

11. BIBLIOGRAFÍA

- ACS. (2014). *Cancer Facts & Figures*. p. 20, Atlanta: American Cancer Society.
- Ahmad-Nejad, P., Häcker, H., Rutz, M., Bauer, S., Vabulas, R. M., and Wagner, H. (2002). Bacterial CpG-DNA and lipopolysaccharides activate Toll-like receptors at distinct cellular compartments. *Eur J Immunol* 32, 1958.
- Alari-Pahissa, E., Notario, L., Lorente, E., Vega-Ramos, J., Justel, A., López, D., Villadangos, J. A., and Lauzurica, P. (2012). CD69 does not affect the extent of T cell priming. *PLoS One* 7, e48593.
- Askeland, E. J., Newton, M. R., O'Donnell, M. A., and Luo, Y. (2012). Bladder Cancer Immunotherapy: BCG and Beyond. *Adv Urol* 2012, 181987.
- Benlahrech, A., Donaghy, H., Rozis, G., Goodier, M., Klavinskis, L., Gotch, F., and Patterson, S. (2009). Human NK Cell Up-regulation of CD69, HLA-DR, Interferon γ Secretion and Cytotoxic Activity by Plasmacytoid Dendritic Cells is Regulated through Overlapping but Different Pathways. *Sensors (Basel)* 9, 386.
- Berzofsky, J. A., Terabe, M., Oh, S., Belyakov, I. M., Ahlers, J. D., Janik, J. E., and Morris, J. C. (2004). Progress on new vaccine strategies for the immunotherapy and prevention of cancer. *J Clin Invest* 113, 1515.
- Bivas-Benita, M., Bar, L., Gillard, G. O., Kaufman, D. R., Simmons, N. L., Hovav, A. H., and Letvin, N. L. (2010). Efficient generation of mucosal and systemic antigen-specific CD8+ T-cell responses following pulmonary DNA immunization. *J Virol* 84, 5764.
- Bode, C., Zhao, G., Steinhagen, F., Kinjo, T., and Klinman, D. M. (2011). CpG DNA as a vaccine adjuvant. *Expert Rev Vaccines* 10, 499.
- Brett, A., Pandey, S., and Fraizer, G. (2013). The Wilms' tumor gene (WT1) regulates E-cadherin expression and migration of prostate cancer cells. *Mol Cancer* 12, 3.
- Buhtoiarov, I. N., Sondel, P. M., Eickhoff, J. C., and Rakhmievich, A. L. (2007). Macrophages are essential for antitumour effects against weakly immunogenic murine tumours induced by class B CpG-oligodeoxynucleotides. *Immunology* 120, 412.
- Cauley, L. S., and Lefrançois, L. (2013). Guarding the perimeter: protection of the mucosa by tissue-resident memory T cells. *Mucosal Immunol* 6, 14.

- CE, H., JH, L., JC, M., SM, S., and PS., S. (2008). The role of metastasis suppressor genes in metastatic dormancy., pp. 586. APMIS, Denmark.
- Chockalingam, A., Brooks, J. C., Cameron, J. L., Blum, L. K., and Leifer, C. A. (2009). TLR9 traffics through the Golgi complex to localize to endolysosomes and respond to CpG DNA. *Immunol Cell Biol* 87, 209.
- Condon, T. V., Sawyer, R. T., Fenton, M. J., and Riches, D. W. (2011). Lung dendritic cells at the innate-adaptive immune interface. *J Leukoc Biol* 90, 883.
- Davies, R. C., Calvio, C., Bratt, E., Larsson, S. H., Lamond, A. I., and Hastie, N. D. (1998). WT1 interacts with the splicing factor U2AF65 in an isoform-dependent manner and can be incorporated into spliceosomes. *Genes Dev* 12, 3217.
- DeVita, V. T., and Chu, E. (2008). A history of cancer chemotherapy. *Cancer Res* 68, 8643.
- Ewaschuk, J. B., Backer, J. L., Churchill, T. A., Obermeier, F., Krause, D. O., and Madsen, K. L. (2007). Surface expression of Toll-like receptor 9 is upregulated on intestinal epithelial cells in response to pathogenic bacterial DNA. *Infect Immun* 75, 2572.
- Falk, A. T., Moncharmont, C., Guilbert, M., Guy, J. B., Alphonse, G., Trone, J. C., Rivoirard, R., Gilormini, M., Toillon, R. A., Rodriguez-Lafrasse, C., and Magné, N. (2014). Radiation-induces increased tumor cell aggressiveness of tumors of the glioblastomas? *Bull Cancer*.
- Fernández Tena, A., and Casan Clarà, P. (2012). Deposition of inhaled particles in the lungs. *Arch Bronconeumol* 48, 240.
- Fujiki, F., Oka, Y., Tsuboi, A., Kawakami, M., Kawakatsu, M., Nakajima, H., Elisseeva, O. A., Harada, Y., Ito, K., Li, Z., Tatsumi, N., Sakaguchi, N., Fujioka, T., Masuda, T., Yasukawa, M., Udaka, K., Kawase, I., Oji, Y., and Sugiyama, H. (2007). Identification and characterization of a WT1 (Wilms Tumor Gene) protein-derived HLA-DRB1*0405-restricted 16-mer helper peptide that promotes the induction and activation of WT1-specific cytotoxic T lymphocytes. *J Immunother* 30, 282.

- Garrido-Ruiz, M. C., Rodriguez-Pinilla, S. M., Pérez-Gómez, B., and Rodriguez-Peralto, J. L. (2010). WT 1 expression in nevi and melanomas: a marker of melanocytic invasion into the dermis. *J Cutan Pathol* 37, 542.
- Goldstein, B. G., and Goldstein, A. O. (2001). Diagnosis and management of malignant melanoma. *Am Fam Physician* 63, 1359.
- Gungor, B., Yagci, F. C., Tincer, G., Bayyurt, B., Alpdundar, E., Yildiz, S., Ozcan, M., Gursel, I., and Gursel, M. (2014). CpG ODN nanorings induce IFN α from plasmacytoid dendritic cells and demonstrate potent vaccine adjuvant activity. *Sci Transl Med* 6, 235ra61.
- Göhl, J., Hohenberger, W., and Merkel, S. (2009). [Malignant melanoma]. *Chirurg* 80, 559.
- Haber, D. A., Buckler, A. J., Glaser, T., Call, K. M., Pelletier, J., Sohn, R. L., Douglass, E. C., and Housman, D. E. (1990). An internal deletion within an 11p13 zinc finger gene contributes to the development of Wilms' tumor. *Cell* 61, 1257.
- Haining, W. N., Davies, J., Kanzler, H., Drury, L., Brenn, T., Evans, J., Angelosanto, J., Rivoli, S., Russell, K., George, S., Sims, P., Neuberg, D., Li, X., Kutok, J., Morgan, J., Wen, P., Demetri, G., Coffman, R. L., and Nadler, L. M. (2008). CpG oligodeoxynucleotides alter lymphocyte and dendritic cell trafficking in humans. *Clin Cancer Res* 14, 5626.
- Hanahan, D., and Weinberg, R. A. (2000). The hallmarks of cancer. *Cell* 100, 57.
- Herrera Ceballos, E., Moreno Carazo, A., Requena Caballero, L., and Rodríguez, J. L. (2007). Dermatopatología: Correlación clínico-patológica. In *Melanoma* (L. Requena Caballero, ed.), pp. 369. Área Científica Menarini.
- Hewitt, S. M., Fraizer, G. C., Wu, Y. J., Rauscher, F. J., and Saunders, G. F. (1996). Differential function of Wilms' tumor gene WT1 splice isoforms in transcriptional regulation. *J Biol Chem* 271, 8588.
- Hohenstein, P., and Hastie, N. D. (2006). The many facets of the Wilms' tumour gene, WT1. *Hum Mol Genet* 15 Spec No 2, R196.
- Holland, J., Frei, E., Hong, W., Bast, R., Hait, W., Kufe, D., Pollock, R., and Weichselbaum, R. (2010). *Cancer Medicine*. pp. 999. PMPH-USA, China.

- Inoue, K., Ogawa, H., Sonoda, Y., Kimura, T., Sakabe, H., Oka, Y., Miyake, S., Tamaki, H., Oji, Y., Yamagami, T., Tatekawa, T., Soma, T., Kishimoto, T., and Sugiyama, H. (1997). Aberrant overexpression of the Wilms tumor gene (WT1) in human leukemia. *Blood* 89, 1405.
- Kaufman, H. L., and Wolchok, J. D. (2007). *General Principles of Tumor Immunotherapy*. Springer, New York.
- Klinman, D. M. (2004). Immunotherapeutic uses of CpG oligodeoxynucleotides. *Nat Rev Immunol* 4, 249.
- Krieg, A. M. (2003). CpG motifs: the active ingredient in bacterial extracts? *Nat Med* 9, 831.
- Kroon, B. B., and Nieweg, O. E. (2000). Management of malignant melanoma. *Ann Chir Gynaecol* 89, 242.
- Kundu, N., and Fulton, A. M. (1997). Interleukin-10 inhibits tumor metastasis, downregulates MHC class I, and enhances NK lysis. *Cell Immunol* 180, 55.
- Landskron, G., De la Fuente, M., Thuwajit, P., Thuwajit, C., and Hermoso, M. A. (2014). Chronic inflammation and cytokines in the tumor microenvironment. *J Immunol Res* 2014, 149185.
- Lee, B. H., Hecht, J. L., Pinkus, J. L., and Pinkus, G. S. (2002). WT1, estrogen receptor, and progesterone receptor as markers for breast or ovarian primary sites in metastatic adenocarcinoma to body fluids. *Am J Clin Pathol* 117, 745.
- Makita, M., Hiraki, A., Azuma, T., Tsuboi, A., Oka, Y., Sugiyama, H., Fujita, S., Tanimoto, M., Harada, M., and Yasukawa, M. (2002). Antitumor effect of WT1-specific cytotoxic T lymphocytes. *Clin Cancer Res* 8, 2626.
- Marshall, J. D., Heeke, D. S., Abbate, C., Yee, P., and Van Nest, G. (2006). Induction of interferon-gamma from natural killer cells by immunostimulatory CpG DNA is mediated through plasmacytoid-dendritic-cell-produced interferon-alpha and tumour necrosis factor-alpha. *Immunology* 117, 38.
- McCluskie, M. J., and Davis, H. L. (2000). CpG DNA as mucosal adjuvant. pp. 231. Elsevier Science, Vaccine.
- Mellman, I., Coukos, G., and Dranoff, G. (2011). Cancer immunotherapy comes of age. *Nature* 480, 480.

- Menke, A. L., van der Eb, A. J., and Jochemsen, A. G. (1998). The Wilms' tumor 1 gene: oncogene or tumor suppressor gene? *Int Rev Cytol* 181, 151.
- Miller, R. A., Maloney, D. G., Warnke, R., and Levy, R. (1982). Treatment of B-cell lymphoma with monoclonal anti-idiotypic antibody. *N Engl J Med* 306, 517.
- Minna, J. D., Gazdar, A. F., Sprang, S. R., and Herz, J. (2004). Cancer. A bull's eye for targeted lung cancer therapy. *Science* 304, 1458.
- Mundlos, S., Pelletier, J., Darveau, A., Bachmann, M., Winterpacht, A., and Zabel, B. (1993). Nuclear localization of the protein encoded by the Wilms' tumor gene WT1 in embryonic and adult tissues. *Development* 119, 1329.
- Nakatsuka, S.-i., Oji, Y., Horiuchi, T., Kanda, T., Kitagawa, M., Takeuchi, T., Kawano, K., Kuwae, Y., Yamauchi, A., Okumura, M., Kitamura, Y., Oka, Y., Kawase, I., Sugiyama, H., and Aozasa, K. (2006). Immunohistochemical detection of WT1 protein in a variety of cancer cells. pp. 804. *Mod Pathol*.
- Nestle, F. O., Alijagic, S., Gilliet, M., Sun, Y., Grabbe, S., Dummer, R., Burg, G., and Schadendorf, D. (1998). Vaccination of melanoma patients with peptide- or tumor lysate-pulsed dendritic cells. *Nat Med* 4, 328.
- Norton, E. B., Clements, J. D., Voss, T. G., and Cárdenas-Freytag, L. (2010). Prophylactic administration of bacterially derived immunomodulators improves the outcome of influenza virus infection in a murine model. *J Virol* 84, 2983.
- Oji, Y., Miyoshi, S., Maeda, H., Hayashi, S., Tamaki, H., Nakatsuka, S., Yao, M., Takahashi, E., Nakano, Y., Hirabayashi, H., Shintani, Y., Oka, Y., Tsuboi, A., Hosen, N., Asada, M., Fujioka, T., Murakami, M., Kanato, K., Motomura, M., Kim, E. H., Kawakami, M., Ikegame, K., Ogawa, H., Aozasa, K., Kawase, I., and Sugiyama, H. (2002). Overexpression of the Wilms' tumor gene WT1 in de novo lung cancers. *Int J Cancer* 100, 297.
- Oji, Y., Ogawa, H., Tamaki, H., Oka, Y., Tsuboi, A., Kim, E. H., Soma, T., Tatekawa, T., Kawakami, M., Asada, M., Kishimoto, T., and Sugiyama, H. (1999). Expression of the Wilms' tumor gene WT1 in solid tumors and its involvement in tumor cell growth. *Jpn J Cancer Res* 90, 194.
- Olguin, L. F. (2012). Actividad Citotóxica de Linfocitos T CD8+estimulados con Interleucina 15 y 21 contra la línea tumoral de cáncer de mama MCF-7 in vitro.

- In Tesis de maestría en ciencias con acentuación en inmunobiología, pp. 44.
Universidad Autónoma de Nuevo León.
- OMS. (2014). Nota descriptiva N°297.
- Park, M. C., Kim, D., Lee, Y., and Kwon, H. J. (2013). CD83 expression induced by CpG-DNA stimulation in a macrophage cell line RAW 264.7. *BMB Rep* 46, 448.
- Perry, B. N., Cohen, C., Govindarajan, B., Cotsonis, G., and Arbiser, J. L. (2006). Wilms tumor 1 expression present in most melanomas but nearly absent in nevi. *Arch Dermatol* 142, 1031.
- Phua, K. K., Staats, H. F., Leong, K. W., and Nair, S. K. (2014). Intranasal mRNA nanoparticle vaccination induces prophylactic and therapeutic anti-tumor immunity. *Sci Rep* 4, 5128.
- Platz, J., Beisswenger, C., Dalpke, A., Koczulla, R., Pinkenburg, O., Vogelmeier, C., and Bals, R. (2004). Microbial DNA induces a host defense reaction of human respiratory epithelial cells. *J Immunol* 173, 1219.
- Páez, D., Labonte, M. J., Bohanes, P., Zhang, W., Benhanim, L., Ning, Y., Wakatsuki, T., Loupakis, F., and Lenz, H. J. (2012). Cancer dormancy: a model of early dissemination and late cancer recurrence. *Clin Cancer Res* 18, 645.
- Ren, T., Wen, Z. K., Liu, Z. M., Liang, Y. J., Guo, Z. L., and Xu, L. (2007). Functional expression of TLR9 is associated to the metastatic potential of human lung cancer cell: functional active role of TLR9 on tumor metastasis. *Cancer Biol Ther* 6, 1704.
- Renshaw, J., Orr, R. M., Walton, M. I., Te Poele, R., Williams, R. D., Wancewicz, E. V., Monia, B. P., Workman, P., and Pritchard-Jones, K. (2004). Disruption of WT1 gene expression and exon 5 splicing following cytotoxic drug treatment: antisense down-regulation of exon 5 alters target gene expression and inhibits cell survival. *Mol Cancer Ther* 3, 1467.
- Scott, A. M., Wolchok, J. D., and Old, L. J. (2012). Antibody therapy of cancer. pp. 278. Nature Publishing Group, a division of Macmillan Publishers Limited. All Rights Reserved.
- Senra, A. (2002). El cáncer: Epidemiología, etiología, diagnóstico y prevención., pp. 15. Elsevier Science, Ediciones Harcourt. , España.

- Shiow, L. R., Rosen, D. B., Brdicková, N., Xu, Y., An, J., Lanier, L. L., Cyster, J. G., and Matloubian, M. (2006). CD69 acts downstream of interferon-alpha/beta to inhibit S1P1 and lymphocyte egress from lymphoid organs. *Nature* 440, 540.
- Soengas, M. S., and Lowe, S. W. (2003). Apoptosis and melanoma chemoresistance. *Oncogene* 22, 3138.
- Stamatis, G. (2014). Neuroendocrine tumors of the lung: the role of surgery in small cell lung cancer. *Thorac Surg Clin* 24, 313.
- Sugiyama, H. (2005). Cancer immunotherapy targeting Wilms' tumor gene WT1 product. *Expert Rev Vaccines* 4, 503.
- Tsuboi, A., Oka, Y., Osaki, T., Kumagai, T., Tachibana, I., Hayashi, S., Murakami, M., Nakajima, H., Elisseeva, O. A., Fei, W., Masuda, T., Yasukawa, M., Oji, Y., Kawakami, M., Hosen, N., Ikegame, K., Yoshihara, S., Udaka, K., Nakatsuka, S., Aozasa, K., Kawase, I., and Sugiyama, H. (2004). WT1 peptide-based immunotherapy for patients with lung cancer: report of two cases. *Microbiol Immunol* 48, 175.
- Vollmer, J., Weeratna, R., Payette, P., Jurk, M., Schetter, C., Laucht, M., Wader, T., Tluk, S., Liu, M., Davis, H. L., and Krieg, A. M. (2004). Characterization of three CpG oligodeoxynucleotide classes with distinct immunostimulatory activities. *Eur J Immunol* 34, 251.
- Waldmann, T. A. (2003). Immunotherapy: past, present and future. *Nat Med* 9, 269.
- Wilsher, M., and Cheerla, B. (2007). WT1 as a complementary marker of malignant melanoma: an immunohistochemical study of whole sections. *Histopathology* 51, 605.
- Wolchok, J. D., and Livingston, P. O. (2001). Vaccines for melanoma: translating basic immunology into new therapies. *Lancet Oncol* 2, 205.
- Xu, C., Wu, C., Xia, Y., Zhong, Z., Liu, X., Xu, J., Cui, F., Chen, B., Røe, O. D., Li, A., and Chen, Y. (2013). WT1 promotes cell proliferation in non-small cell lung cancer cell lines through up-regulating cyclin D1 and p-pRb in vitro and in vivo. *PLoS One* 8, e68837.

- Youlten, D. R., Cramb, S. M., and Baade, P. D. (2008). The International Epidemiology of Lung Cancer: geographical distribution and secular trends. *J Thorac Oncol* 3, 819.
- Zacarías Hernández, J. L. (2015). Evaluación de la respuesta antitumoral inducida por la vacunación de DNA vía aerosol contra WT1 en un modelo murino de linfoma. In Tesis de licenciatura Químico Bacteriólogo Parasitólogo. Universidad Autónoma de Nuevo León.
- Zamora-Avila, D. E., Zapata-Benavides, P., Franco-Molina, M. A., Saavedra-Alonso, S., Trejo-Avila, L. M., Reséndez-Pérez, D., Méndez-Vázquez, J. L., Isaias-Badillo, J., and Rodríguez-Padilla, C. (2009). WT1 gene silencing by aerosol delivery of PEI-RNAi complexes inhibits B16-F10 lung metastases growth. *Cancer Gene Ther* 16, 892.
- Zhang, Q. J., Seipp, R. P., Chen, S. S., Vitalis, T. Z., Li, X. L., Choi, K. B., Jeffries, A., and Jefferies, W. A. (2007). TAP expression reduces IL-10 expressing tumor infiltrating lymphocytes and restores immunosurveillance against melanoma. *Int J Cancer* 120, 1935.

12. Resumen Biográfico

Daniela Arriaga Hernández

Candidato para el Grado de
Maestro en ciencias con Orientación en Inmunobiología

**Tesis: Evaluación De La Administración Vía Aerosol De La Vacuna Sintética
Basada En WT1-CpG En Un Modelo De Cáncer Pulmonar**

Campo de Estudio: Inmunología/ Inmunoterapia del Cáncer

Datos Personales: Nacida en Mazatlán, Sinaloa, México el 10 de marzo de 1993, hija de Miguel Arriaga Ramírez y Daniela Rebeca Hernández Coronado.

Educación: Egresada de la Universidad Politécnica de Sinaloa, obteniendo el grado de Ingeniería en Biotecnología.

Experiencia Profesional: Estancias profesionales en el Centro de Investigación Científica y Estudios Superiores de Ensenada, en el laboratorio de microbiología. Ensenada, Baja California, México en diciembre de 2011. Estancias profesionales en la unidad de biología molecular del cáncer, LIV, FCB, UANL en nov-dic de 2012 y sep-dic de 2013.