

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE MEDICINA**



**“EFECTO ANTITUMORAL DE LAS QUIMIOCINAS IP-10 Y LINFOTACTINA
SECRETADAS *in vivo* POR *Lactococcus lactis* Y SU ACTIVIDAD ADYUVANTE EN
UN MODELO DE CÁNCER CÉRVICO UTERINO”**

POR

Q.B.P. JULIO VILLATORO HERNÁNDEZ

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

FEBRERO 2009

**“EFECTO ANTITUMORAL DE LAS QUIMIOCINAS IP-10 Y LINFOTACTINA
SECRETADAS *in vivo* POR *Lactococcus lactis* Y SU ACTIVIDAD ADYUVANTE EN
UN MODELO DE CÁNCER CÉRVICO UTERINO”**

APROBACIÓN DE TESIS

DR. ROBERTO MONTES DE OCA LUNA
Director de Tesis

DR. ARTURO CHÁVEZ REYES
Comisión de Tesis

DRA. ODILA SAUCEDO CÁRDENAS
Comisión de Tesis

DR. ALMA YOLANDA ARCE MENDOZA
Comisión de Tesis

DR. DIONICIO A. GALARZA DELGADO
Subdirector de Estudios de Posgrado

**“EFECTO ANTITUMORAL DE LAS QUIMIOCINAS IP-10 Y LINFOTACTINA
SECRETADAS *in vivo* POR *Lactococcus lactis* Y SU ACTIVIDAD ADYUVANTE EN
UN MODELO DE CÁNCER CÉRVICO UTERINO”**

Por

JULIO VILLATORO HERNÁNDEZ

**El presente trabajo de investigación se realizó en el Departamento de Histología de la
Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Nuevo León, bajo la dirección
del Dr. Roberto Montes de Oca Luna**

FIRMAS

Director de Tesis

Dr. Roberto Montes de Oca Luna

Co-director de Tesis

Co-director de Tesis

Dr. Arturo Chávez Reyes

Dra. Odila Saucedo Cárdenas

Monterrey, Nuevo León

Febrero 2009

Este trabajo de investigación se fue apoyado por la beca 194581 asignada a Julio Villatoro Hernández por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología de México, por el proyecto 47478 asignado al Dr. Roberto Montes de Oca Luna por el CONACyT y por el PAICYT.

RECONOCIMIENTOS

Es importante para mi reconocer la labor invertida por cada uno de mis profesores y mis asesores que participaron en este trabajo y sin la cual no podría haber sido posible la realización del mismo. A cada uno de mis profesores, maestros, asesores, miembros de la Facultad de Medicina, del departamento de Histología y a la Facultad de Biología de la U.A.N.L. que de alguna forma colaboraron y me extendieron su apoyo y su amistad, a cada uno de ustedes les expreso mi agradecimiento total.

No olvido a todos mis compañeros a lo largo de mis estudios que me extendieron su mano y me externaron su apoyo. A todos ellos les agradezco por su compañía y por su apoyo académico pero más importante, por su apoyo moral. Sin cada uno de ustedes, no hubiera sido posible lograr llegar hasta este punto.

A Roberto Montes de Oca.

Un agradecimiento a la sub-dirección de estudios de posgrado, en especial al Dr. Dionicio Galarza Delgado por su apoyo durante mi estancia en la Facultad de Medicina y para realizar una estancia doctoral en el Hospital Johns Hopkins.

El reconocimiento final es imperativo para mis padres, (los cuales me otorgaron beca por más de 20 años) sin los cuales nada de esto sería posible, ya que el comienzo de todo esto fue darme vida, educarme y formar a la persona que soy. Sin ustedes esto no sería posible. Sin ustedes no podría haber completado este reto. Gracias.

INDICE GENERAL

INDICE GENERAL	I
INDICE DE FIGURAS	IV
INDICE DE TABLAS	V
LISTA DE ABREVIATURAS	V
RESUMEN	VI
ABSTRACT	VII
INTRODUCCIÓN	1
ANTECEDENTES	3
Microorganismos como vectores de expresión.	3
Vacunas vivas: Bacterias Gram Positivas para inducir respuestas inmunes	5
<i>Lactococcus lactis</i>	7
<i>Lactococcus lactis</i> como vacuna y adyuvante	8
Citocinas	10
Quimiocinas	11
Función de las quimiocinas	13
IP-10	14
Linfotactina	16
HIPÓTESIS	18
IMPACTO	18
OBJETIVO GENERAL	19

OBJETIVOS PARTICULARES	19
ESTRATEGIA EXPERIMENTAL	20
MATERIAL Y MÉTODOS	21
Cepas de bacterias y condiciones de cultivo	21
Preparación de muestras de IP-10 y linfotactina para Quimiotaxis	22
Obtención y cultivo de linfocitos	22
Quimiotaxis	23
Conteo de linfocitos T CD3 ⁺ por citometría de flujo	24
Análisis del sistema de expresión de <i>L. lactis</i> en función del tiempo	24
Extracción de proteínas	25
SDS-PAGE y Western Blot	26
Mantenimiento y cultivo de la línea tumoral TC1	27
Inducción de tumor con TC1	28
Preparación de cultivos de <i>L. lactis</i> IP-10 y <i>L.lactis</i> linfotactina	28
Administración intranasal con <i>L. lactis</i> -IP-10 y <i>L. lactis</i> -linfotactina	28
Protocolo de administración para ensayo profiláctico	29
Protocolo de administración para ensayo terapéutico	29
Inyección intratumoral del adenovirus	32
RESULTADOS	33
DISCUSIÓN	48

CONCLUSIÓN	55
LITERATURA CITADA	56

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Esquema de Tratamiento Profiláctico	29
Figura 2. Esquema de Tratamiento Terapéutico	30
Figura 3. Esquema de tratamiento combinado de <i>Lactococcus</i> y Adenovirus	32
Figura 4. La IP-10 secretada por <i>L. lactis</i> es biológicamente activa	34
Figura 5. La IP-10 secretada por <i>L. lactis</i> es capaz de inducir quimiotaxis de linfocitos T CD3+	35
Figura 6. La linfotactina secretada por <i>L. lactis</i> es biológicamente activa	36
Figura 7. La linfotactina secretada por <i>L. lactis</i> es capaz de inducir quimiotaxis de linfocitos T CD3+	37
Figura 8. <i>L. lactis</i> secreta IP-10 hasta por 6 horas después de haber inducido con nisina	39
Figura 9. La administración intranasal con las cepas de <i>L.</i> <i>lactis</i> -IP-10 y linfotactina inhiben el crecimiento tumoral	40
Figura 10. La administración profiláctica con <i>L. lactis</i> -IP-10 y <i>L. lactis</i> linfotactina inhiben el desarrollo tumoral	42
Figura 11. La co-administración terapéutica de <i>L. lactis</i> IP-10 mejora el efecto antitumoral de <i>L. lactis</i> E7	44
Figura 12. <i>L. lactis</i> secretoras de IP-10 y linfotactina aumentan el efecto de protección antitumoral de <i>L. lactis</i> E7	45
Figura 13. La co-administración de <i>L. lactis</i> E7 o <i>L. lactis</i> linfotactina con el adenovirus-E7 inhiben el crecimiento tumoral	47

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Uso de <i>Lactococcus lactis</i> como vacuna y adyuvante.	10
Tabla 2. Características de quimiocinas humanas.	13

LISTA DE ABREVIATURAS

VLPs	Partículas parecidas a virus (del inglés Virus-Like Particles)
HIV	Virus de Inmunodeficiencia Humana
Kbp	miles de pares de bases (nucleotídicas)
µm	micrómetros
NK	Leucocitos NK, células asesinas.
TA	temperatura ambiente
DO	densidad óptica
µl	microlitros
mM	milimolar
%	por ciento
SDS	Dodecil-sulfato de sodio
mA	miliamperes

INTRODUCCIÓN

El sistema encargado de vigilar y regular que el cuerpo se encuentre en orden y libre de enfermedades es el sistema inmunológico. El sistema inmunológico o sistema inmune es una colección de procesos que ocurren en un organismo para protegerlo de una enfermedad mediante la identificación y destrucción de patógenos o células tumorales. Cuando se establece una enfermedad y avanza, implica alguna disfuncionalidad o evasión del sistema inmune por un agente causal. En condiciones normales, es necesaria la presencia de un inmunógeno para que ocurra una respuesta inmune. Este inmunógeno puede ser algún antígeno o cualquier otra molécula que ejerza un estímulo en una o varias células del sistema inmunológico para que ocurra una reacción y se monte la respuesta inmune. Las células del sistema inmunológico, mediante varios mecanismos complejos, son las responsables de establecer dicha respuesta. Uno de estos mecanismos es la producción de citocinas.

Las citocinas son proteínas, péptidos o glicoproteínas cuya misión es transmitir señales entre células en el curso de una respuesta inmune. La mayoría de ellas son producidas por células del sistema inmunológico aunque existen algunas otras producidas por células que no pertenecen a este sistema. Algunas de ellas tienen la capacidad de ejercer su actividad de forma autónoma actuando directamente en la patología mientras que otras ejercen su efecto estimulando células blanco (del sistema inmune por ejemplo) y que éstas realicen la actividad efectora. La gran cantidad de eventos inmunológicos que ocurren mediados por las citocinas han despertado interés en la investigación para conocer su efecto como terapia. En años recientes el uso de vectores biológicos para la producción *in vivo* de citocinas y

otras moléculas ha generado resultados alentadores. En pruebas experimentales, la manipulación de cepas bacterianas o virales patógenas “no-virulentas” capaces de inducir la expresión de citocinas *in vitro* e *in vivo* ha resultado en altos niveles de producción de proteínas heterólogas, pero el hecho de ser un microorganismo patógeno, incluso aunque se le haya manipulado para perder su patogenicidad, resulta aberrante y finalmente improbable de usarlo en humanos. Por esa razón se pensó en utilizar bacterias o virus no patógenos y manipularlos genéticamente para que expresen proteínas heterólogas de interés terapéutico. De esta forma no resulta tan improbable o inaccesible el uso de estos microorganismos inocuos en modelos animales y humanos.

Actualmente la mayoría de las proteínas recombinantes terapéuticas de uso para humanos, son producidas en microorganismos recombinantes como levaduras, células de insecto y bacterias. A partir de cultivos de estos microorganismos se procesan las proteínas para ser administradas en humanos. La desventaja de usar estos microorganismos, es que algunas de estas bacterias comúnmente usadas son Gram (-) y/o producen sustancias tóxicas como lipopolisacáridos. En algunos de los casos el método de purificación de la proteína terapéutica llega a ser complicado y tardado lo cual repercute en el precio de la misma.

Por esta razón se pensó en utilizar cepas de microorganismos inocuos para que produzcan moléculas de interés en la medicina, para poder ser administrados de manera segura sin causar reacciones alérgicas o inmunes indeseadas. Algunos de los géneros de bacterias inocuas y seguras de usar que han sido administradas en humanos son del género de *Lactobacillus*, *Streptococcus* y *Lactococcus*.

La bacteria láctica *Lactococcus lactis*, ha sido utilizada a lo largo de muchos años por la humanidad para la producción de productos fermentados como quesos y yogures, pero hasta hace pocos años se le dio importancia médica ya que se encontró que *L. lactis* era

segura y fácil de administrar en modelos animales con fines terapéuticos. Estudios con cepas recombinantes de *L. lactis* demostraron que es capaz de producir y entregar proteínas a nivel mucosa cuando son administradas de manera oral o intranasal. Estos hallazgos apoyaron la idea de utilizar cepas de *L. lactis* en modelos animales para estudiar el efecto de su inmunización y hacer frente a ciertas enfermedades inducidas de forma experimental. Resultados de previos trabajos de nuestro grupo de investigación han demostrado que la inmunización con una cepa de *L. lactis* que secreta la proteína antigénica E7 del Virus del Papiloma Humano tiene actividad antitumoral. Con un interés en crear más alternativas terapéuticas utilizando a esta noble bacteria de grado alimenticio hemos construido cepas de *L. lactis* capaces de secretar citocinas antitumorales. Resultados de varias tesis de licenciatura de nuestro grupo de investigación demostraron como dos cepas de *L. lactis* eran eficientes para secretar las quimiocinas IP-10 y linfotactina. En el presente trabajo de investigación nuestro objetivo principal fue determinar si las quimiocinas IP-10 y linfotactina secretadas por *L. lactis* son biológicamente activas y si estas cepas tienen actividad antitumoral en un modelo de cáncer cérvico uterino.

ANTECEDENTES

Microorganismos como vectores de expresión.

En la actualidad el uso de vectores biológicos como procariontes y virus para la expresión de moléculas de interés terapéutico es una opción factible para la producción de éstas a nivel fermentador (a gran escala) o incluso para su entrega en modelos *in vivo*. El propósito de

esta práctica es inducir respuestas inmunes favorables específicas contra cierto antígeno. Una vez que se producen respuestas inmunes específicas contra este antígeno, es posible desarrollar protección o incluso una terapia para alguna enfermedad.

Un ejemplo es el uso de cepas atenuadas de *Salmonella typhimurium* que expresan partículas virales (VLPs) del Virus del Papiloma Humano, capaces de inducir respuestas inmunes a nivel mucosa y de manera sistémica (Nardelli-Haefliger *et al.*, 1997). La desventaja de hacer uso de estas cepas bacterianas es su improbable uso en modelos animales o humanos, debido a que por su propia naturaleza se catalogan como patógenas, y aunque se encuentren atenuadas o modificadas para reducir su virulencia, pueden causar reacciones indeseadas al administrarse.

En 1999 se reportó una cepa no-patógena de *Escherichia coli* que expresa la proteína antigénica gp120 del VIH anclada a la superficie de esta bacteria (Kwak *et al.*, 1999). Los estudios demostraron que el procesamiento y el anclaje de la proteína heteróloga eran adecuados. El objetivo de este trabajo era la producción de la gp120 del VIH anclada a la pared de una bacteria para elevar su inmunogenicidad y mejorar el efecto terapéutico de su administración en forma soluble. En este caso resulta contraproducente administrar una bacteria Gram (-) capaz de producir lipopolisacáridos y toxinas que pudiesen empeorar la condición de una persona infectada con el VIH. Aun en individuos no infectados, se corre el riesgo de desarrollar un cuadro patológico causado por *E. coli* que infecta al sistema digestivo y urinario.

Otra estrategia es el uso de vectores virales para la producción de moléculas terapéuticas. Esto se realiza mediante la modificación genética y construcción de virus que de manera silvestre tienen la capacidad de infectar células eucariotas para que una vez que infecten la célula, expresen la proteína terapéutica de interés. Uno de los tipos de virus más recurridos

para este propósito son los adenovirus. Este tipo de virus con genomas de entre 30 y 35 kpb se han manipulado genéticamente para que pierdan la capacidad de causar el efecto citopático pero que puedan expresar el gen de la proteína de interés en la célula infectada. A partir de este principio se han generado adenovirus para que produzcan citocinas como la interleucina 12 o antígenos bacterianos como de *Clostridium botulinum* (Narvaiza *et al.*, 2000; Xu *et al.*, 2009). Este último adenovirus capaz de producir una neurotoxina de *C. botulinum* se evaluó su efecto en un modelo murino y se determinó que inducía protección contra el agente causal y no se producía el botulismo (Xu *et al.*, 2009). A pesar de que se ha demostrado que mediante el uso de adenovirus o vaccinia la expresión de la proteína heteróloga es eficiente y que mediante la administración de estos adenovirus se producen respuestas inmunes favorables, se han registrado casos en donde ocurre tolerancia hacia el virus, ya que el organismo produce anticuerpos de forma normal contra éste, e incluso se han reportado daños hepáticos en individuos inmunizados. No obstante, actualmente la diversidad de vectores para generar respuestas inmunes específicas es bastante amplia y todas estas opciones poseen ventajas y desventajas.

Vacunas vivas: Bacterias Gram Positivas para inducir respuestas inmunes

El objetivo principal de utilizar microorganismos genéticamente modificados como vacunas es hacer que por sí solos sean inocuos y no causen algún efecto no deseado, pero que al estar expresando la proteína de interés sean capaces de generar respuestas inmunes efectivas y que actúen como vacunas. Una forma para realizar este objetivo, es el uso de bacterias inocuas para el humano, para que no causen ninguna patología. Esto tiene sentido ya que algunas de ellas incluso existen de forma comensal o simbiótica en animales y humanos.

En años recientes se han generado varias cepas recombinantes de bacterias Gram positivas que expresan una gran diversidad de moléculas de diversos orígenes, con el fin de ser utilizadas como vacunas o para inducir respuestas inmunes.

Por ejemplo, el simbiote probiótico *Lactobacillus plantarum*, fué modificado genéticamente para que expresara el alérgeno *Der p1* del ácaro común, el principal agente causal de dermatitis y asma. La administración intranasal con esta cepa de forma profiláctica demostró que inducía un efecto protector evitando el desarrollo de la dermatitis y de asma en un modelo murino (Rigaux *et al.*, 2008). Esto demuestra que es posible expresar proteínas por estos microorganismos, pero más importante, que al administrarse son capaces de inducir respuestas inmunes al organismo y generar respuestas inmunes.

Otro caso de expresión de moléculas con propiedades terapéuticas es el reportado en el 2003, en el cual se menciona el uso de una cepa de *Streptococcus gordonii* que secreta el receptor soluble de la interleucina 1 de origen murino. Los ensayos *in vivo* demostraron en grupos de ratones inmunizados vía mucosa con esta cepa de *S. gordonii* que presentaban un bloqueo en la actividad de la IL-1, con lo cual concluyeron que esta cepa administrada por mucosa es capaz de secretar la forma soluble del receptor de la IL-1 en cantidades suficientes para bloquear el efecto de su ligando y que este receptor expresado por un Gram positivo es biológicamente activo (Ricci *et al.*, 2003).

Recientemente se ha demostrado como cepas de *Lactococcus lactis* que expresan citocinas y proteínas antigénicas poseen el mismo efecto del caso anterior de *Lactobacillus*, reportando actividad biológica de las citocinas producidas. *L. lactis* también se ha reportado que actúa como vacuna, como el caso de una cepa de *L. lactis* que expresa el antígeno LrcV de *Yersinia pseudotuberculosis*, (agente causal de necrosis tisular y granulomas en bazo e

hígado), cuya aplicación a murinos en su mucosa indujo una protección en contra de la infección de *Y. pseudotuberculosis*.

Lactococcus lactis

La bacteria *L.lactis* perteneciente a la familia *Streptococcaceae*, es un microorganismo considerado de grado alimenticio, ya que es utilizado en procesos fermentativos para la preparación de quesos y yogures. Esta bacteria utilizada por cientos de años por el humano sigue siendo considerada como una de las bacterias más importantes para la producción de productos lácteos. *L. lactis* es una bacteria Gram positiva, no esporulada y no móvil, su morfología es ovoide y su tamaño varía de 0.5 a 1.5 μm de diámetro. Su fuente de carbono preferencial es lactosa la cual al metabolizarse para generar ATP produce ácido láctico como sub-producto, de donde se le cataloga como bacteria ácido-láctica. En cultivo, típicamente forma cadenas con células adyacentes en forma de “collar de perlas” ramificándose en ocasiones.

El uso para la producción de alimentos ha influido para que *L. lactis* sea considerada una bacteria inocua, por lo que se consideró un buen candidato para la producción de proteínas recombinantes. La ausencia de lipopolisacáridos en su estructura aunado a la inexistente producción de toxinas en su metabolismo fueron factores determinantes para considerar su uso en animales y administrarse como vector vivo.

Esta bacteria se ha demostrado que es eficaz para la producción de proteínas heterólogas. La producción de interleucinas es eficiente y estable (Schotte *et al.*, 2000; Steidler *et al.*, 1998) al igual que enzimas y antígenos de origen viral y bacteriano (Le Loir *et al.*, 2005). Las proteínas expresadas en esta bacteria se han podido dirigir a varias localizaciones celulares como al compartimento intracelular (citoplasmático), en la pared (de forma

anclada) o extracelular (de secreción). Dependiendo del efecto de la proteína que se desea expresar, es la forma en la que se diseña la estrategia para que la proteína recombinante se dirija a cualquiera de estos lugares. La expresión de citocinas (interleucinas) en su gran mayoría se ha realizado fusionando un péptido señal para que dirijan a la proteína madura hacia afuera de la célula, por lo cual el medio de cultivo es en donde se localiza finalmente la proteína. El uso de proteínas de anclaje a la pared de peptidoglucano ha mostrado dar un mejor efecto inmunogénico cuando se quiere producir antígenos, aunque también se han reportado cepas de *L. lactis* que expresan antígenos intracelulares capaces de producir protección en animales inmunizados con estas cepas (Hanniffy *et al.*, 2007).

***Lactococcus lactis* como vacuna y adyuvante**

Varios reportes demuestran que cepas de *L. lactis* recombinantes son capaces de inducir respuestas inmunes específicas, dando como resultado la prevención de infecciones contra agentes patógenos, actuando como tratamientos en enfermedades inflamatorias e incluso ejerciendo efectos antitumorales. En el primero de los casos, se ha demostrado como una cepa de *L. lactis* capaz de producir el antígeno PspA de *Streptococcus pneumoniae* (pneumococcus), agente causal de la neumonía, es capaz de tener efecto de vacuna protectora. En ese reporte se demuestra como la inmunización intranasal con la cepa de *L. lactis* protege cuando se realiza un reto con el agente causal, e induce una reducción de la carga bacteriana en el pulmón, sitio en donde ocurre la mayor infección en el transcurso de la enfermedad (Hanniffy *et al.*, 2007).

La producción de la interleucina 2 y la interleucina 10 por *L. lactis* ha sido estable y eficiente (Schotte *et al.*, 2000; Steidler *et al.*, 1995). Por primera vez se reportaba como una cepa de una bacteria láctica Gram positiva era capaz de secretar una interleucina de origen

animal por lo que el paso siguiente fue determinar si las citocinas secretadas por *L. lactis* tenían actividad biológica. Mediante ensayos *in vitro* e *in vivo* se pudo demostrar que las interleucinas eran biológicamente activas. En este mismo reporte se pudo comprobar que la IL-10 secretada por *L. lactis* podía detectarse *in situ* en ratones IL-10 $-/-$ (Steidler, 2001). Estos eventos apoyaron la idea de seguir utilizando esta bacteria y evaluar que efectos terapéuticos podían tener frente a otras enfermedades, por lo cual se construyó una cepa de *L. lactis* con el gen de la IL-10 integrado en su genoma. La producción de la IL-10 fue descrita como eficiente y estable. Más tarde se estudió el efecto de esta cepa en un modelo de colitis murina. La administración oral de esta bacteria productora de IL-10 redujo las lesiones intestinales y se observó como el epitelio intestinal se regeneraba, disipando la enfermedad (Steidler *et al.*, 2000). Los resultados fueron tan alentadores que después de varios años se aprobó el uso de esta misma cepa en humanos como terapia para la enfermedad de Crohn's, la cual es una enfermedad inflamatoria del sistema digestivo (Braat *et al.*, 2006).

Un ejemplo más del uso de *L. lactis* para enfrentar a enfermedades ha sido la construcción de una cepa que expresa el antígeno E7 del VPH tipo 16. En un modelo de cáncer cérvico uterino, la administración profiláctica y terapéutica de *L. lactis*-E7 demostró cierta actividad antitumoral, que al combinarse con una cepa de *L. lactis* que secreta la IL-12 el efecto antitumoral se ve incrementado (Bermudez-Humaran *et al.*, 2005). Estos hallazgos indican como la inmunización con la cepa de *L. lactis* que expresa E7 induce una respuesta inmune contra un tumor que expresa E7. De igual forma, podemos inferir que la cepa que expresa IL-12 incrementa el efecto de protección y terapéutico reduciendo el tamaño de los tumores en el grupo inmunizado con las cepas que producen E7 e IL-12, con esto se demuestra cómo se mejora el efecto antitumoral cuando se involucra a una citocina.

Tabla 1. Uso de *Lactococcus lactis* como vacuna y adyuvante.

Patógeno	Cepa	Antígeno*	Modelo y Ruta de inmunización**	Respuestas inmunes	Resultados	Ref
<i>H. pylori</i>	<i>L. lactis</i>	Ureasa B (Cit)	Ratón, IG	Ninguna	Colonización (No protección)	
Tetano	<i>L. lactis</i>	TTFC (C)	Ratón, IG, IN, SC	Anticuerpos en suero, IgA en heces	Sobrevivencia después de reto con toxina (protección)	
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	<i>L. lactis</i>	PspA (C)	Ratón, IN	Anticuerpos en suero y en BALF	Incremento en supervivencia con retos intranasales	
HIV	<i>L. lactis</i>	V2-V4 de gp120 (AP)	Ratón, IG con toxina de cólera como adyuvante	Anticuerpos en suero y en heces	Carga viral reducida con reto intraperitoneal	
Rotavirus	<i>L. lactis</i>	VP7 (C, AP, S)	Ratón, IG	Anticuerpo en suero	Neutralización viral	
<i>Brucella abortus</i>	<i>L. lactis</i>	L7 o L12 (C)	Ratón, IG	IgA en heces	Protección parcial con retos de <i>B. abortus</i> intraperitoneal	
Tumor inducido por HPV-16	<i>L. lactis</i>	E7 (AP) IL-12 (S)	Ratón, IN	Respuesta mediada por linfocitos	Protección contra desarrollo de tumor.	

* C, Citoplasmático; AP, Anclado a Pared; S, Secreción.

** IN, Intranasal; IG, Intragástrica; SC, Subcutánea.

Citocinas

Uno de los eventos mediante el cual el sistema inmune ejerce su actividad es mediante la presencia de citocinas. Las citocinas son proteínas (generalmente glicoproteínas) reguladoras de procesos importantes como crecimiento y activación celular, inflamación,

inmunidad, reparación de tejido, fibrosis y morfogénesis. Estas proteínas, generalmente de bajo peso molecular, son producidas por un gran número de células (la mayoría de ellas pertenecientes al sistema inmunológico) de manera inducida o constitutiva.

El gran grupo de las citocinas ha sido diferenciado en varias familias: 1) Interleucinas, 2) Interferones, 3) Factores de Necrosis Tumoral (TNF), 4) Factores Estimuladores de Colonias (CSF) y 5) Quimiocinas. El nombre de este último grupo deriva de su principal actividad la cual es inducir quimiotaxis en células responsivas hacia tejidos específicos.

Las citocinas por su amplio espectro de actividad, despertaron el interés para ser utilizadas como moduladoras del sistema inmune y estudiar su efecto en modelos animales frente a diferentes enfermedades crónicas o infecciosas. Citocinas como la IL-12, IL-22 y la IL-27 han sido identificadas como citocinas antimicrobianas y su efecto ha demostrado disminuir la carga bacteriana de agentes infecciosos del genero *Mycobacterium* y del agente causal de la pneumonia *Klebsiella pneumoniae* en modelos murinos (Aujla *et al.*, 2008; Kolls *et al.*, 2008).

Sin duda el mayor interés de la actividad de las citocinas ha sido frente al cáncer. Por esta razón se ha investigado el efecto que poseen las citocinas frente a modelos experimentales con tumores y cómo éstas influyen en el crecimiento y desarrollo del mismo (Cutler & Brombacher, 2005).

Quimiocinas

Las quimiocinas son citocinas de bajo peso molecular (8-12 kDa) cuya principal función es dirigir la migración de leucocitos hacia tejidos donde sean requeridos. Este grupo de citocinas activan procesos inflamatorios y participan en procesos pleiotróficos incluyendo regulación de crecimiento tumoral. Se han detectado cuatro mecanismos principales por los

cuales las quimiocinas modulan el desarrollo tumoral: 1) Regulación de neovascularización tumoral, 2) activación de la inmunidad específica contra tumor, 3) regulación de la proliferación de células tumorales de manera autocrina y 4) reclutamiento de leucocitos hacia el lugar donde se desarrolla el tumor (Frederick & Clayman, 2001).

Las quimiocinas ejercen su actividad quimiotáctica mediante su unión a receptores transmembranales asociados a la proteína-G de la superfamilia de la rodopsina. Estos receptores se encuentran expresados de manera inducida o constitutiva en las células blanco. No todos los receptores de las quimiocinas son iguales, pero algunos de ellos pueden unirse a varias quimiocinas diferentes, por lo cual las quimiocinas se catalogan dependiendo del receptor al cual se unen. Resulta sobresaliente que algunos de estos receptores son comúnmente usados por virus para ingresar hacia el interior de la célula que infectan, como lo es el caso del VIH.

Tabla 2. Características de quimiocinas humanas.

Nombre común	Receptor(es)	Función Quimiotáctica	Funciones relacionadas con cáncer
IL-8	CXCR1, CXCR2	NK, T, B, Ba	Angiogénica
MIG	CXCR3	Ta, Eo	Angiostática, Inhibe crecimiento tumoral
IP-10	CXCR3	Ta, M, NK, Eo	Angiostática, Inhibe crecimiento tumoral
SDF-1	CXCR4	T, B, CD, M, Ba	Angiostática
RANTES	CCR1, CCR3, CCR5, CCR9	T, M, NK, CD, Eo, Ba	
Linfotactina (XCL1)	XCRI	T, NK	Incrementa antigenicidad

B, Linfocitos B; **Ba**, Basofilo; **CD**, Célula Dendrítica; **Eo**, Eosinófilo; **M**, Monocitos; **NK**, Célula Asesina; **T**, Linfocitos T; **Ta**, Linfocitos T activados.

Función de las quimiocinas

La principal función de las quimiocinas es orquestar la migración de leucocitos hacia tejidos donde sean requeridos. El evento de quimiotaxis ocurre cuando el receptor de las células blanco interacciona con las quimiocinas las cuales van aumentando en concentración hasta llegar a su destino final. La quimiotaxis es la responsable de regular las células del sistema inmunológico durante procesos de “vigía” controlando la migración de linfocitos hacia nódulos linfáticos para reaccionar con células presentadoras de antígeno (CPA) que hayan sido estimuladas por la presencia de algún patógeno. A estas se les llama

quimiocinas homeostáticas y son producidas sin necesidad de algún estímulo. Algunas otras quimiocinas tienen actividad reguladora para el desarrollo celular de ciertos tejidos, ya que pueden estimular o reprimir la angiogénesis o conducir células que producen señales específicas para la maduración celular. Existen quimiocinas que participan en procesos inflamatorios y que generalmente son producidas de forma inducida en infecciones bacterianas, en presencia de virus o agentes que causen daño fisiológico a tejidos como la sílica o los cristales de urato. Su producción suele ser inducida directamente por citocinas pro-inflamatorias como la IL-1 (Fernandez & Lolis, 2002). Una citocina que es conocida por inducir la producción de varias quimiocinas es el Interferón gamma. El INF gamma es una glicoproteína dimérica capaz de inducir respuestas inmunes como la activación de macrófagos y también regula la expresión de citocinas. Una de las citocinas que se produce de forma inducida por el INF-gamma es la IP-10 o Proteína-10 inducible por interferón gamma.

IP-10

La quimiocina Proteína-10 inducible por interferón gamma o IP-10, es una glicoproteína de aproximadamente 10 kDa que pertenece al grupo de las quimiocinas. Esta citocina también llamada CXCL10 es producida por varios tipos celulares en donde destacan los monocitos, neutrófilos y linfocitos T, quienes la secretan de forma inducida por el estímulo del INF-gamma o lipopolisacáridos. La función más destacada de la IP-10 es inducir quimiotaxis de leucocitos como linfocitos T, monocitos y NK a tejidos donde son requeridos. Como su nombre lo indica, la IP-10 es una quimiocina producida de manera inducida por INF-gamma, aunque no del todo, ya que se produce a niveles muy bajos en ciertos órganos del sistema inmunológico como el bazo, el timo y ganglios linfáticos. La presencia de esta

quimiocina en estos órganos induce la movilización de leucocitos, favoreciendo el arribo de células presentadoras de antígenos a estos órganos para que puedan llevar a cabo el procesamiento de dicho antígeno y montar la respuesta inmune contra él (Dufour *et al.*, 2002). Este efecto de quimiotaxis ocurre mediante el receptor CXCR3 el cual se expresa en linfocitos T activados y células NK. En condiciones normales estas células expresan el receptor de forma latente, pero en linfocitos T no estimulados no se producen transcritos para este receptor, lo cual cambia al ser estimulados con IL-2, volviéndose responsivos a IP-10 (Loetscher *et al.*, 1998). La IP-10 se ha demostrado que actúa de forma favorable contra el desarrollo de tumores gracias a su propiedad de inhibir la angiogénesis tumoral. La neovascularización tumoral es un evento que ocurre en el desarrollo de tumores para incrementar la irrigación sanguínea en el sitio de la neoplasia. Esto contribuye a incrementar su crecimiento y a facilitar la metástasis. Estudios de la IP-10 realizados en modelos tumorales han demostrado que su actividad antiangiogénica regula la neovascularización tumoral y que de manera dependiente de la dosis puede suprimir la diferenciación de células endoteliales a estructuras tubulares precursoras de capilares *in vitro* (Angiolillo *et al.*, 1995).

La IP-10 también ha mostrado un efecto de sinergismo con otras citocinas. Tal es el caso de un reporte que demuestra como la co-inyección de dos adenovirus, uno que codifica para la IL-12 y otro que codifica para la IP-10 ejercen un efecto antitumoral robusto, el cual induce una regresión del 100% en tumores colo-rectales establecidos en ratones (Narvaiza *et al.*, 2000). Este mismo efecto se confirmó en experimentos posteriores, en donde se determinó que la IP-10 y MIG eran necesarios para el efecto antitumoral de la IL-12. Esto lo demostraron en un modelo murino con tumores de carcinoma renal, en donde se utilizaron anticuerpos específicos para IP-10 para bloquear su actividad *in vivo*, aquí se determinó que

al bloquear la actividad de esta quimiocina inhibía la actividad antitumoral de la IL-12, ya que no ocurría quimiotaxis de linfocitos T en el tumor (Tannenbaum *et al.*, 1998).

La IP-10 también se reporta que actúa como defensina. Este efecto antimicrobiano se demostró mediante la inhibición del crecimiento en placa de cultivos de *E. coli* y de *Listeria monocytogenes* en presencia de IP-10 (Cole *et al.*, 2001). Estos hallazgos dieron pauta a investigar más a profundidad la actividad antimicrobiana de la IP-10 en un modelo murino frente a el agente infeccioso causal de neumonía, *Klebsiella pneumoniae*. El uso de anticuerpos específicos anti-IP-10 para bloquear la actividad de esta quimiocina en ratones infectados con el *K. pneumoniae* condujo al avance acelerado de la infección y a una muerte más rápida que aquellos ratones en donde no se les administraba anti-IP-10. En este mismo reporte, el uso de un adenovirus que codifica para la IP-10 administrado en grupos de ratones infectados con el agente causal, redujo la carga bacteriana en pulmones y aumentó significativamente el periodo de vida de los grupos en donde se administró este adenovirus-IP-10 (Zeng *et al.*, 2005).

Linfotactina

Las quimiocinas se subdividen en 4 familias nombradas CXC, CC, CX3C y C por su estructura, por su genotipo y por su función. La referencia de “C” denomina a las cisteínas presentes en dominios conservados en el extremo carboxilo terminal, separados por un aminoácido variable (“X”). La linfotactina es la única quimiocina que pertenece al grupo “C” ya que solo posee una cisteína en este dominio. Esta solitaria citocina conformada por un único puente de disulfuro, posee actividad quimiotáctica para linfocitos T y células NK. Así mismo, es expresada por células cebadas, linfocitos T y células NK. (Hedrick *et al.*, 1997; Kelner *et al.*, 1994; Kennedy *et al.*, 1995). Poco se conoce del mecanismo celular por

el cual la linfotactina ha mostrado tener actividad antitumoral, pero se presume que es determinante la presencia de las células NK y los linfocitos atraídos en su presencia. En modelos murinos, se ha demostrado que la linfotactina se encarga de mantener la integridad epitelios y regular respuestas inmunes en mucosa mediante la regulación y quimiotaxis de células Th1 y Th2 (Lillard *et al.*, 1999).

Por estas propiedades, se han desarrollado técnicas para producir la linfotactina en bacterias como *E. coli* y en células S2 de insecto para posteriormente estudiar su actividad biológica y su potencial como terapia en varios modelos experimentales de enfermedades (Dong *et al.*, 2005). También se han construido líneas celulares estables derivadas de tumores para que expresen linfotactina y evaluar el efecto de esta quimiocina en el desarrollo y progreso del tumor. Los resultados de estos experimentos demostraron que las líneas celulares que expresaban linfotactina perdían su capacidad para implantarse y para desarrollarse, mientras que la línea celular que no expresaba linfotactina se podía implantar y desarrollar tumor (Cairns *et al.*, 2001).

Otro grupo de investigación desarrolló un vector adenoviral con la secuencia que codifica para la linfotactina. Este adenovirus-Linfotactina se administró en un modelo murino de cáncer de colon y se demostró que mejoraba el efecto antitumoral de una terapia basada en citocin-deaminasa, ya que se registraba un mayor infiltrado celular de CD4+ y CD8+, de células NK y mayor cantidad de IL-2 que en los grupos en donde no se aplicaba este adenovirus-Linfotactina (Ju *et al.*, 2000). Por todos estos resultados, se ha continuado con el estudio de esta quimiocina y su efecto en modelos experimentales de enfermedades crónicas e infecciosas.

LITERATURA CITADA

Angiolillo, A. L., Sgadari, C., Taub, D. D., Liao, F., Farber, J. M., Maheshwari, S., Kleinman, H. K., Reaman, G. H. & Tosato, G. (1995). Human interferon-inducible protein 10 is a potent inhibitor of angiogenesis in vivo. *J Exp Med* **182**, 155-162.

Aujla, S. J., Chan, Y. R., Zheng, M., Fei, M., Askew, D. J., Pociask, D. A., Reinhart, T. A., McAllister, F., Edeal, J., Gaus, K., Husain, S., Kreindler, J. L., Dubin, P. J., Pilewski, J. M., Myerburg, M. M., Mason, C. A., Iwakura, Y. & Kolls, J. K. (2008). IL-22 mediates mucosal host defense against Gram-negative bacterial pneumonia. *Nat Med* **14**, 275-281.

Bermudez-Humaran, L. G., Cortes-Perez, N. G., Lefevre, F., Guimaraes, V., Rabot, S., Alcocer-Gonzalez, J. M., Gratadoux, J. J., Rodriguez-Padilla, C., Tamez-Guerra, R. S., Corthier, G., Gruss, A. & Langella, P. (2005). A novel mucosal vaccine based on live Lactococci expressing E7 antigen and IL-12 induces systemic and mucosal immune responses and protects mice against human papillomavirus type 16-induced tumors. *J Immunol* **175**, 7297-7302.

Braat, H., Rottiers, P., Hommes, D. W., Huyghebaert, N., Remaut, E., Remon, J. P., van Deventer, S. J., Neiryck, S., Peppelenbosch, M. P. & Steidler, L. (2006). A phase I trial with transgenic bacteria expressing interleukin-10 in Crohn's disease. *Clin Gastroenterol Hepatol* **4**, 754-759.

Cairns, C. M., Gordon, J. R., Li, F., Baca-Estrada, M. E., Moyana, T. & Xiang, J. (2001). Lymphotoxin expression by engineered myeloma cells drives tumor regression: mediation by CD4⁺ and CD8⁺ T cells and neutrophils expressing XCR1 receptor. *J Immunol* **167**, 57-65.

Cole, A. M., Ganz, T., Liese, A. M., Burdick, M. D., Liu, L. & Strieter, R. M. (2001). Cutting edge: IFN-inducible ELR- CXC chemokines display defensin-like antimicrobial activity. *J Immunol* **167**, 623-627.

Cutler, A. & Brombacher, F. (2005). Cytokine therapy. *Ann N Y Acad Sci* **1056**, 16-29.

Dong, C., Chua, A., Ganguly, B., Krensky, A. M. & Clayberger, C. (2005). Glycosylated recombinant human XCL1/lymphotoxin exhibits enhanced biologic activity. *J Immunol Methods* **302**, 136-144.

Dufour, J. H., Dziejman, M., Liu, M. T., Leung, J. H., Lane, T. E. & Luster, A. D. (2002). IFN-gamma-inducible protein 10 (IP-10; CXCL10)-deficient mice reveal a role for IP-10 in effector T cell generation and trafficking. *J Immunol* **168**, 3195-3204.

Fernandez, E. J. & Lolis, E. (2002). Structure, function, and inhibition of chemokines. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **42**, 469-499.

Frederick, M. J. & Clayman, G. L. (2001). Chemokines in cancer. *Expert Rev Mol Med* **3**, 1-18.

Hanniffy, S. B., Carter, A. T., Hitchin, E. & Wells, J. M. (2007). Mucosal delivery of a pneumococcal vaccine using *Lactococcus lactis* affords protection against respiratory infection. *J Infect Dis* **195**, 185-193.

Hedrick, J. A., Saylor, V., Figueroa, D., Mizoue, L., Xu, Y., Menon, S., Abrams, J., Handel, T. & Zlotnik, A. (1997). Lymphotactin is produced by NK cells and attracts both NK cells and T cells in vivo. *J Immunol* **158**, 1533-1540.

Ju, D. W., Tao, Q., Cheng, D. S., Zhang, W., Zhang, M., Hamada, H. & Cao, X. (2000). Adenovirus-mediated lymphotactin gene transfer improves therapeutic efficacy of cytosine deaminase suicide gene therapy in established murine colon carcinoma. *Gene Ther* **7**, 329-338.

Kelner, G. S., Kennedy, J., Bacon, K. B., Kleyensteuber, S., Largaespada, D. A., Jenkins, N. A., Copeland, N. G., Bazan, J. F., Moore, K. W., Schall, T. J. & et al. (1994). Lymphotactin: a cytokine that represents a new class of chemokine. *Science* **266**, 1395-1399.

Kennedy, J., Kelner, G. S., Kleyensteuber, S., Schall, T. J., Weiss, M. C., Yssel, H., Schneider, P. V., Cocks, B. G., Bacon, K. B. & Zlotnik, A. (1995). Molecular cloning and functional characterization of human lymphotactin. *J Immunol* **155**, 203-209.

Kolls, J. K., McCray, P. B., Jr. & Chan, Y. R. (2008). Cytokine-mediated regulation of antimicrobial proteins. *Nat Rev Immunol* **8**, 829-835.

Kwak, Y. D., Yoo, S. K. & Kim, E. J. (1999). Cell surface display of human immunodeficiency virus type 1 gp120 on Escherichia coli by using ice nucleation protein. *Clin Diagn Lab Immunol* **6**, 499-503.

Le Loir, Y., Azevedo, V., Oliveira, S. C., Freitas, D. A., Miyoshi, A., Bermudez-Humaran, L. G., Nouaille, S., Ribeiro, L. A., Leclercq, S., Gabriel, J. E., Guimaraes, V. D., Oliveira, M. N., Charlier, C., Gautier, M. & Langella, P. (2005). Protein secretion in Lactococcus lactis : an efficient way to increase the overall heterologous protein production. *Microb Cell Fact* **4**, 2.

Lillard, J. W., Jr., Boyaka, P. N., Hedrick, J. A., Zlotnik, A. & McGhee, J. R. (1999). Lymphotactin acts as an innate mucosal adjuvant. *J Immunol* **162**, 1959-1965.

Loetscher, M., Loetscher, P., Brass, N., Meese, E. & Moser, B. (1998). Lymphocyte-specific chemokine receptor CXCR3: regulation, chemokine binding and gene localization. *Eur J Immunol* **28**, 3696-3705.

Nardelli-Haeffliger, D., Roden, R. B., Benyacoub, J., Sahli, R., Kraehenbuhl, J. P., Schiller, J. T., Lachat, P., Potts, A. & De Grandi, P. (1997). Human papillomavirus type 16 virus-like particles expressed in attenuated Salmonella typhimurium elicit mucosal and systemic neutralizing antibodies in mice. *Infect Immun* **65**, 3328-3336.

Narvaiza, I., Mazzolini, G., Barajas, M., Duarte, M., Zaratiegui, M., Qian, C., Melero, I. & Prieto, J. (2000). Intratumoral coinjection of two adenoviruses, one encoding the chemokine IFN-gamma-inducible protein-10 and another encoding IL-12, results in marked antitumoral synergy. *J Immunol* **164**, 3112-3122.

Ricci, S., Macchia, G., Ruggiero, P., Maggi, T., Bossu, P., Xu, L., Medagliani, D., Tagliabue, A., Hammarstrom, L., Pozzi, G. & Boraschi, D. (2003). In vivo mucosal delivery of bioactive human interleukin 1 receptor antagonist produced by Streptococcus gordonii. *BMC Biotechnol* **3**, 15.

Rigaux, P., Daniel, C., Hisbergues, M., Muraille, E., Hols, P., Pot, B., Pestel, J. & Jacquet, A. (2008). Immunomodulatory properties of *Lactobacillus plantarum* and its use as a recombinant vaccine against mite allergy. *Allergy*.

Schotte, L., Steidler, L., Vandekerckhove, J. & Remaut, E. (2000). Secretion of biologically active murine interleukin-10 by *Lactococcus lactis*. *Enzyme Microb Technol* **27**, 761-765.

Steidler, L., Wells, J. M., Raeymaekers, A., Vandekerckhove, J., Fiers, W. & Remaut, E. (1995). Secretion of biologically active murine interleukin-2 by *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*. *Appl Environ Microbiol* **61**, 1627-1629.

Steidler, L., Robinson, K., Chamberlain, L., Schofield, K. M., Remaut, E., Le Page, R. W. & Wells, J. M. (1998). Mucosal delivery of murine interleukin-2 (IL-2) and IL-6 by recombinant strains of *Lactococcus lactis* coexpressing antigen and cytokine. *Infect Immun* **66**, 3183-3189.

Steidler, L., Hans, W., Schotte, L., Neiryck, S., Obermeier, F., Falk, W., Fiers, W. & Remaut, E. (2000). Treatment of murine colitis by *Lactococcus lactis* secreting interleukin-10. *Science* **289**, 1352-1355.

Steidler, L. (2001). In situ delivery of therapeutic cytokines by genetically engineered *Lactococcus lactis*. *Meded Rijksuniv Gent Fak Landbouwk Toegep Biol Wet* **66**, 551, 553-556.

Tannenbaum, C. S., Tubbs, R., Armstrong, D., Finke, J. H., Bukowski, R. M. & Hamilton, T. A. (1998). The CXC chemokines IP-10 and Mig are necessary for IL-12-mediated regression of the mouse RENCA tumor. *J Immunol* **161**, 927-932.

Xu, Q., Pichichero, M. E., Simpson, L. L., Elias, M., Smith, L. A. & Zeng, M. (2009). An adenoviral vector-based mucosal vaccine is effective in protection against botulism. *Gene Ther*.

Zeng, X., Moore, T. A., Newstead, M. W., Deng, J. C., Kunkel, S. L., Luster, A. D. & Standiford, T. J. (2005). Interferon-inducible protein 10, but not monokine induced by gamma interferon, promotes protective type 1 immunity in murine *Klebsiella pneumoniae* pneumonia. *Infect Immun* **73**, 8226-8236.

HIPÓTESIS

Las Cepas de *Lactococcus lactis* que secretan IP-10 y linfotactina poseen y aumentan la actividad antitumoral de una cepa de *Lactococcus lactis* que expresa E7.

IMPACTO

Las quimiocinas IP-10 y linfotactina en modelos experimentales han mostrado tener efecto terapéutico frente a tumores y enfermedades infecciosas. Este trabajo propone determinar el efecto antitumoral de dos cepas de una bacteria de grado alimenticio que secretan las quimiocinas IP-10 y linfotactina y examinar si mejoran el efecto antitumoral de una cepa de *L. lactis* que expresa E7. En la actualidad no existen cepas de *L. lactis* que secreten quimiocinas antitumorales con actividad biológica, por lo que nuestro trabajo propone el uso de estas cepas como un adyuvante de la respuesta inmune contra tumor.

OBJETIVO GENERAL

Evaluar el efecto antitumoral y adyuvante de cepas de *Lactococcus lactis* que expresan las quimiocinas IP-10 y linfotactina.

OBJETIVOS PARTICULARES

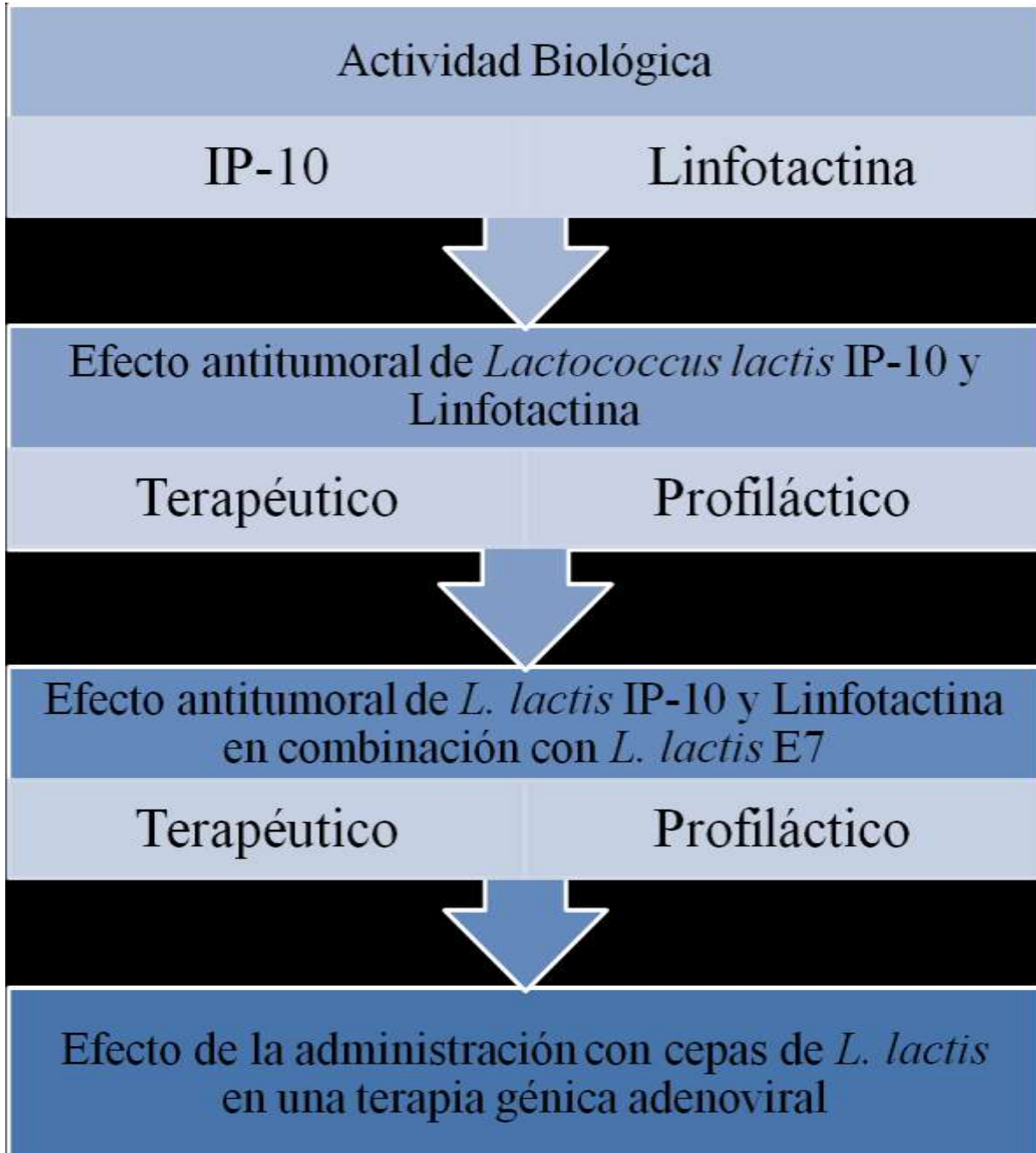
- I. Determinar la actividad biológica de las citocinas IP-10 y linfotactina producidas por *Lactococcus lactis*.

- II. Evaluar el efecto antitumoral de las cepas de *Lactococcus lactis* que secretan IP-10 y linfotactina.

- III. Demostrar si las cepas de *Lactococcus lactis* que secretan IP-10 y linfotactina incrementan el efecto antitumoral de *Lactococcus lactis* que expresa E7.

- IV. Evaluar el efecto de una pre-inmunización con las cepas de *L. lactis* en una terapia génica basada en un adenovirus que expresa E7 en un modelo de cáncer cérvico uterino.

ESTRATEGIA EXPERIMENTAL



MATERIAL Y MÉTODOS

ACTIVIDAD BIOLÓGICA DE LAS QUIMIOCINAS IP-10 Y LINFOTACTINA SECRETADAS POR *LACTOCOCCUS LACTIS*.

Las quimiocinas IP-10 y linfotactina son glicoproteínas de bajo peso molecular cuya principal actividad es causar quimiotaxis de leucocitos, principalmente de linfocitos T. Debido a que los procariotes no realizan modificaciones post-transduccionales como la glicosilación, fue necesario determinar si las quimiocinas producidas por *L. lactis* eran biológicamente activas. Para realizar este objetivo utilizamos las quimiocinas IP-10 y linfotactina obtenidas a partir de cultivos de *L. lactis* y determinamos si eran capaces de inducir quimiotaxis de linfocitos T. Esto se realizó mediante un ensayo de quimiotaxis in vitro con cámaras de Boyden utilizando células T obtenidas a partir de sangre periférica. El análisis del número de células atraídas por las quimiocinas producidas por *L. lactis* se realizó por microscopía de luz y por citometría de flujo haciendo uso de la prueba estadística de Tukey.

Cepas de bacterias y condiciones de cultivo

La cepa NZ9000 silvestre y las recombinantes de *Lactococcus lactis* fueron crecidas en condiciones aeróbicas en medio M17 (Difco) suplementado con 0.5% de glucosa de grado molecular (Sigma) al cual se le llamó GM17. Las condiciones del cultivo fueron a 30°C sin agitación. Las cepas recombinantes fueron mantenidas en presencia del antibiótico cloranfenicol a una concentración de 10 µg/mL.

Preparación de muestras de IP-10 y linfotactina para Quimiotaxis

Se realizó un pre-inóculo de las cepas de *L. lactis* IP-10, *L. lactis* linfotactina y *L. lactis* silvestre agregando 50 μ L de un stock en glicerol preservado a -80°C en 1 mL de GM17 con cloranfenicol, y se incubaron toda la noche a 30°C . Al día siguiente se agregaron 500 μ L del pre-inóculo de cada cepa a 20 mL de GM17 (con sus respectivos antibióticos para las recombinantes) y se incubaron hasta alcanzar una $\text{DO}_{600\text{nm}}$ de 0.6. Una vez que alcanzaron esta DO se les agregó 10 ng/mL de nisina (Sigma) para inducir la secreción de las quimiocinas y se incubaron por una hora a 30°C . Transcurrido este tiempo se centrifugaron los cultivos en tubos cónicos estériles de 50 mL de capacidad y se centrifugaron a 4700 rpm por 15 minutos a 4°C . Se recuperó el medio de cultivo libre de células y se filtró utilizando filtros con poro de 0.22 μm de diámetro (Milex, Millipore) para asegurar su esterilidad. Las muestras fueron conservadas en hielo hasta ser utilizadas para el ensayo de quimiotaxis.

Obtención y cultivo de linfocitos

Los linfocitos T utilizados para quimiotaxis fueron obtenidos a partir de sangre periférica de un voluntario. A 20 mL de sangre periférica (heparinizada) se les agregó lentamente 20 mL de Histopaque 1077 (Sigma) por las paredes del tubo y se centrifugó a 1500 rpm a temperatura ambiente (TA) por 30 minutos. Se recuperó la fase que correspondía a las células mononucleares con una pipeta serológica y se realizaron 3 lavados con medio RPMI a las células, centrifugando a 1500 rpm a TA por 15 minutos en cada lavado. Después del tercer lavado las células se pusieron en cultivo en medio RPMI 1640 (Gibco) suplementado con 10% de suero AB humano (Sigma), 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de fitohemaglutinina (Gibco) y 200

U/mL de interleucina humana (IL-2, Santa Cruz Biotechnologies) a 37°C con una atmósfera de 5% de CO₂. Durante todo el cultivo la densidad celular se mantuvo entre 1 y 3 x10⁶ células/mL.

Quimiotaxis

La actividad biológica de las quimiocinas secretadas por *L. lactis* se midió por quimiotaxis de linfocitos T humanos utilizando cámaras Boyden. Para este experimento se utilizaron filtros de nitrato de celulosa con poro de 5.0 µm de diámetro (Whatman). Una vez que se instalaron los filtros, se agregó 3 mL de cada muestra que contenía IP-10, linfotactina y los controles a la parte inferior de la cámara. Inmediatamente después se agregaron 100,000 células (del cultivo de linfocitos) suspendidas en RPMI 1640 a la parte superior de la cámara y se incubó la reacción a 37°C por una hora.

Transcurrido el tiempo se procedió a desmontar la cámara y se retiraron los filtros cuidadosamente de manera que no se confundiera que cara estuvo en contacto con las células y cual estuvo en contacto con las muestras. El filtro de nitrato de celulosa se procesó por la técnica histológica con Hematoxilina, se montaron en portaobjetos con resina y se procedió a realizar conteos en 5 campos de cada filtro seleccionados al azar y mediante microscopía de luz con un aumento de 1000x. Cada muestra se realizó por triplicado. Como control positivo se utilizó suero humano con complemento activado. Para la preparación de este suero se extrajo sangre periférica de un voluntario y se obtuvo el suero por sedimentación por 1 hora a temperatura ambiente. Se agregaron 10 mg de Zymosan (Sigma) y se incubó a 37°C por una hora. El suero se utilizó inmediatamente para los ensayos de quimiotaxis. Como control negativo se utilizaron muestras de *L. lactis* silvestre y PBS.

Conteo de linfocitos T CD3⁺ por citometría de flujo

El conteo de células que migraron a la parte inferior de la cámara se realizó por citometría de flujo de la siguiente manera. Primeramente se recuperó la parte acuosa del compartimento inferior de la cámara de cada muestra y se realizaron 3 lavados con PBS. El pellet de cada muestra fue incubado con 2 µg de anti-CD3 humano (BD Pharmingen) conjugado con Isotiocianato de fluoresceína (FITC) en 50 µL de PBS y se incubaron a temperatura ambiente por 1 hora. Las muestras fueron lavadas 3 veces con PBS y se procesaron por citometría de flujo por conteo de fluorescencia (Fluorescence-activated cell-sorting, FACS) utilizando un citómetro BD (San Jose CA). Los resultados obtenidos del conteo de células fueron analizados por la prueba estadística de Tukey.

Análisis del sistema de expresión de *L. lactis* en función del tiempo

Para determinar por cuánto tiempo el sistema de expresión de *Lactococcus lactis* continuaba activo una vez que era inducido con nisina, se diseñó un experimento para determinar si la proteína continuaba secretándose a diferentes tiempos. Para este experimento se preparó un cultivo de la cepa de *L. lactis* que secreta la IP-10 en 75 mL de medio GM17-cloranfenicol. Al alcanzar una $DO_{600nm} = 0.4$ se agregaron 25 mL del inóculo en cada uno de 3 tubos cónicos estériles con capacidad de 50 mL de manera que se prepararon 3 cultivos a una DO igual que provenían del mismo inóculo. En este momento a cada uno de los cultivos A, B y C se les agregó 10 ng/mL de nisina para inducir la expresión de IP-10. El cultivo A permaneció intacto a lo largo del experimento, a la hora 1 los cultivos B y C se centrifugaron a 4700 rpm a TA y se les realizó un lavado con medio nuevo, después de este lavado se agregaron nuevamente 25 mL de medio de cultivo y se

continuó el experimento. Al cultivo B se le volvió a realizar un lavado y se le agregó medio nuevamente a la hora 3. En cada lavado se eliminó la cantidad de proteína secretada y la nisina del medio de cultivo. A cada cultivo se les realizó extracción de proteínas y se analizaron por Western Blot.

Extracción de proteínas

La fracción celular y la fracción correspondiente al medio de cultivo libre de células se procesaron de manera independiente de la siguiente manera: Para la fracción celular se tomó 1.35 mL del cultivo inducido y se centrifugó a 14000 rpm a 4°C por 5 minutos. Se transfirió el medio de cultivo libre de células a otro tubo y se procesó el pellet agregando 100 µL de Buffer de Lisis Celular [25% Sacarosa, 1 mM EDTA, 50 mM TRIS·HCL pH 8.0, 10 mg/mL de lisozima (Sigma), 1 mM Fenil-metil-sulfonil fluoruro (PMSF) y 10 mM de ditiotreitól (DTT)] e incubándolo a 37°C por 1 hora. Transcurrido el tiempo se le agregó a la reacción 50 µL de SDS al 20%, se agitó por vortex y se agregó 150 µL de buffer de carga para proteínas (Fermentas). Las muestras se mantuvieron a -20°C hasta cargarse en el gel.

El medio de cultivo libre de células se procesó primeramente concentrando las proteínas totales. Para realizar esto se tomó 1.35 mL del medio libre de células y se agregó 150 µL de ácido tricloroacético al 100%, y 1 mM de PMSF y 10 mM DTT para evitar proteólisis. La mezcla se incubó en hielo por 15 minutos y posteriormente se centrifugó a 14000 rpm a 4°C por 30 minutos y se descartó la fase acuosa. Los tubos se centrifugaron una vez más bajo las mismas condiciones nuevamente solo por 5 minutos, se retiró el excedente líquido con una micropipeta y se dejaron secar al aire por 20 minutos. Finalmente se agregó 50 µL de 50 mM de NaOH a cada muestra y 50 µL de Buffer de carga para proteínas (Fermentas) y se mantuvieron a -20°C

hasta antes de cargarse en el gel. Todas las muestras, las de la fracción celular y las del medio de cultivo libre de células se calentaron a 99°C por 5 minutos antes de cargarse en el gel de acrilamida.

SDS-PAGE y Western Blot

La electroforesis de las proteínas se realizó en geles de acrilamida al 12%, preparados a partir de una solución de acrilamida/bisacrilamida 19:1, aplicando 80 volts constantes, utilizando una cámara para electroforesis vertical (BioRad). La transferencia del gel a la membrana de nitrocelulosa se realizó en la cámara de transferencia horizontal semi-húmeda (BioRad) aplicando 120 mA constantes por 45 minutos y haciendo uso de buffer para transferencia. Después de la transferencia el gel se tiñó con azul de coomassie para visualizar las bandas correspondientes a proteínas y se colocó la membrana en buffer de bloqueo por dos horas en agitación moderada a TA. Transcurrido el tiempo de bloqueo se realizaron 3 lavados con TBS-Tween y se incubó la membrana toda la noche a 4°C con el anticuerpo primario utilizando la dilución recomendada por el fabricante. Se realizaron 3 lavados con TBS-Tween y se incubó con el anticuerpo secundario a TA por 1 hora utilizando la dilución recomendada por el fabricante y se les realizaron 3 lavados con TBS-Tween. La quimioluminiscencia se llevó a cabo con el kit SuperSignal West Pico para peroxidasa de PIERCE siguiendo las instrucciones del fabricante. Para mayor detalle del protocolo favor de referirse a (Villatoro-Hernandez *et al.*, 2008).

ACTIVIDAD ANTITUMORAL DE IP-10 Y LINFOTACTINA

Para evaluar la actividad antitumoral de las cepas de *L. lactis*-IP-10 y *L. lactis*-linfotactina se utilizó un modelo de cáncer cérvico uterino. La inducción de tumores se hizo mediante el implante de la línea TC1, la cual expresa los antígenos E6 y E7 que son también expresados de forma constitutiva en cánceres cervicales. En esta serie de experimentos se determinaron dos parámetros principales: La capacidad de protección contra el desarrollo de tumores en ratones que recibieron administraciones con las cepas de *L. lactis* de forma profiláctica, y el efecto terapéutico de la administración con las cepas de *L. lactis* en ratones con tumores ya establecidos.

Mantenimiento y cultivo de la línea tumoral TC1

La línea celular TC1 es una cepa estable que expresa de manera constitutiva los antígenos E6 y E7 que son producidos en tumores cervicales. En nuestro laboratorio se cuenta con una colección de líneas celulares donde se incluye la TC1. La preservación de esta línea es mediante criogénesis en contenedores con nitrógeno líquido. La línea TC1 criopreservada se descongeló colocando el criotubo en una incubadora a 37°C y una vez que se descongeló se agregó su contenido a 3 mL de medio de cultivo TC1 (Medio MEM suplementado con 5% de suero fetal bovino y antibióticos [Gibco]) en una caja para cultivo celular de 25 cm² y se incubó a 37°C en una atmósfera de 5% CO₂ toda la noche. Al día siguiente se retiró cuidadosamente el medio de cultivo para descartar el DMSO que provenía del criotubo y se agregaron 5 mL de medio de cultivo para TC1. Se realizaron varios pasajes celulares hasta llegar a la cantidad necesaria de células para cada experimento.

Inducción de tumor con TC1

Las células TC1 utilizadas para la inducción de tumor se obtuvieron a partir de cajas de cultivo con una confluencia igual o menor al 70% (generalmente al 70%) mediante la disgregación celular con tripsina. Después de 3 lavados con PBS se realizó el conteo celular y viabilidad con azul de tripano. La viabilidad de las células utilizadas en todos los experimentos fue superior al 95%. Las células se mantuvieron en hielo en todo momento hasta antes de inyectarlas en los ratones.

La inducción de tumor se realizó inyectando de forma subcutánea 50,000 células TC1 en el muslo derecho de cada ratón. Cada ratón fue etiquetado de forma distintiva para registrar la evolución del desarrollo tumoral en cada muestra.

Preparación de cultivos de *L. lactis* IP-10 y *L. lactis* linfotactina

Se reactivaron las cepas de *L. lactis*-IP-10, *L. lactis*-linfotactina y *L. lactis* silvestre agregando 50 μ L de un stock en glicerol preservado a -80°C a 1 mL de GM17 con cloranfenicol, excepto para la cepa silvestre, y se incubaron toda la noche. Un mL de este pre-inóculo se agregó a 50 mL de medio de cultivo y se agregaron 10 ng/mL de nisina al alcanzar una $\text{DO}_{600\text{nm}} = 0.6$, y se continuó el cultivo por 2 horas más. Transcurrido este tiempo se centrifugaron las células a 4700 rpm por 15 minutos a TA y se les retiró el medio de cultivo, se realizó un lavado con PBS y se resuspendió el pellet celular en PBS ajustando la concentración a 1×10^8 UFC/ μ L.

Administración intranasal con *L. lactis*-IP-10 y *L. lactis*-linfotactina

Para los experimentos profilácticos y terapéuticos se utilizaron ratones C57BJ/6J hembras de 7-9 semanas de edad. Se administraron 1×10^9 UFC suspendidas en 10 μ L de PBS estéril

con una micropipeta sobre la nariz del ratón, cerciorándose que éste aspirara por completo el volumen total.

Protocolo de administración para ensayo profiláctico

Para determinar la capacidad de protección contra el desarrollo de tumor se realizaron 4 administraciones a grupos de 10 ratones hembras C57BJ de 7-9 semanas de edad con las cepas de *L. lactis*-IP-10 y *L. lactis*-linfotactina a los días 0, 14, 28 y 32, y al día 35 se les retó con 50,000 células de la línea TC1 para la inducción de tumor. El volumen de los tumores se calculó midiendo de forma perpendicular con un vernier la longitud y altura de los tumores y mediante la fórmula de la elipse (longitud x altura²)/2.

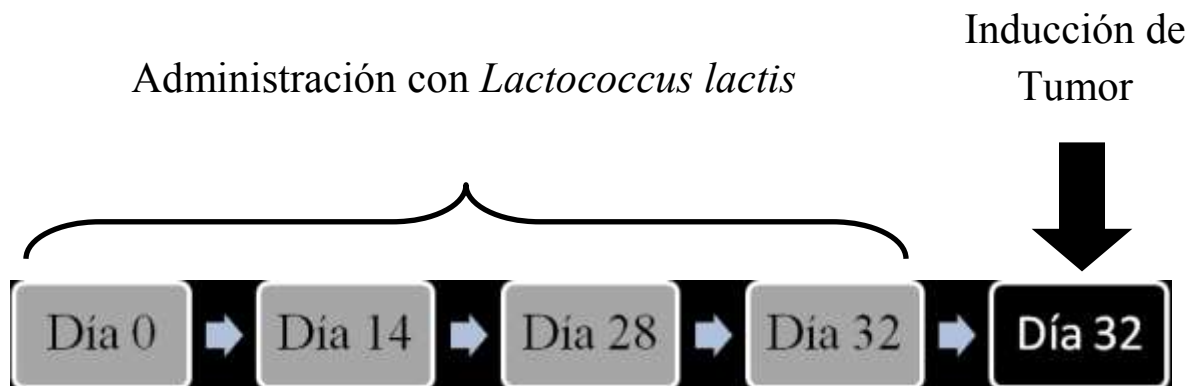


Figura 1. Esquema de Tratamiento Profiláctico. Calendario de administración de cepas de *L. lactis* en el ensayo profiláctico, e inducción de tumor con la línea TC1 para evaluar la protección contra el desarrollo de tumores.

Protocolo de administración para ensayo terapéutico

Para determinar la actividad antitumoral terapéutica de las cepas de *L. lactis*, primero se establecieron tumores a ratones hembras C57BJ de 7-9 semanas de edad con 50,000 células TC1 inyectadas en el muslo derecho de forma subcutánea. Se realizaron grupos de 10 ratones por tratamiento con aquellos ratones que desarrollaron tumor y se les administraron las diferentes cepas de *L. lactis* como previamente se ha descrito a los días 7, 14 y 21 post-implante de tumor. El volumen de los tumores se calculó midiendo de forma perpendicular con un vernier la longitud y altura de los tumores y mediante la fórmula de la elipse $(\text{longitud} \times \text{altura}^2) / 2$.

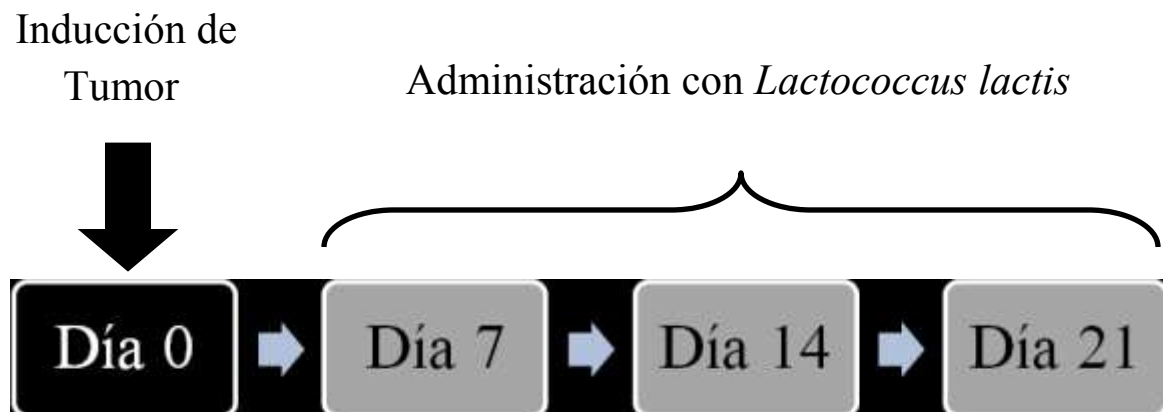


Figura 2. Esquema de Tratamiento Terapéutico. Calendario de inducción de tumor con TC1 y administración de las cepas de *L. lactis* en el ensayo terapéutico para evaluar la actividad antitumoral en ratones con tumores establecidos.

ACTIVIDAD ADYUVANTE DE *L. LACTIS*-IP-10 Y *L. LACTIS*-LINFOTACTINA EN LA ACTIVIDAD ANTITUMORAL DE *L. LACTIS* QUE EXPRESA E7

En nuestro laboratorio se cuenta con una cepa de *L. lactis* que expresa el antígeno E7. La inmunización con esta cepa ha mostrado tener cierto efecto antitumoral en el modelo de cáncer cérvico uterino. Por estos motivos se quiso determinar el efecto de la administración de las cepas de *L. lactis* que secretan las quimiocinas IP-10 y linfotactina en combinación con la que expresa E7. Para esto se realizaron experimentos en donde se administraron las cepas que secretan IP-10 y linfotactina en combinación con la que expresa E7. Los protocolos para la inducción de tumor, preparación de células y los calendarios de administración de las bacterias que se siguieron en este experimento son los descritos en el experimento anterior.

EFFECTO DE LA ADMINISTRACIÓN DE *LACTOCOCCUS LACTIS* EN UNA TERAPIA GÉNICA ADENOVIRAL.

Previamente se ha demostrado como la administración de un vector adenoviral expresando el antígeno E7 actúa como una terapia antitumoral. En este experimento quisimos determinar el efecto de una administración profiláctica con las cepas de *L. lactis* sobre una terapia génica basada en un adenovirus que induce la expresión de E7. Para realizar este objetivo, primeramente se indujo el desarrollo de tumores con la línea TC1 en grupos de ratones y se les inyectó de manera intratumoral el adenovirus-E7 al día 7. La administración de las cepas de *L. lactis* fueron a los días 7, 14 y 21. La inducción de tumor, la preparación de cepas de *L. lactis*, y la medición de tumor se realizaron como previamente se ha descrito.

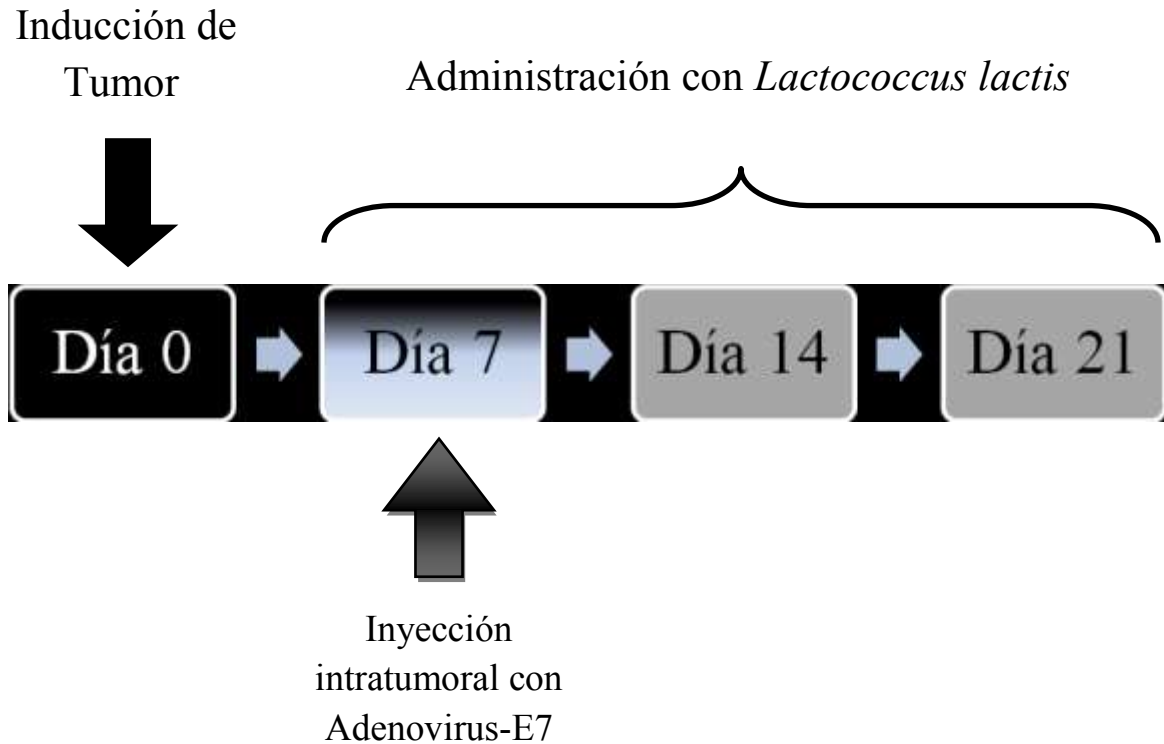


Figura 3. Esquema de tratamiento combinado de *Lactococcus* y Adenovirus. Protocolo para la administración de las cepas de *L. lactis* en una terapia génica adenoviral.

Inyección intratumoral del adenovirus

La aplicación intratumoral de los adenovirus-E7 se realizaron en los ratones cuyos tumores alcanzaban entre 9 y 11 mm de diámetro (en su mayoría al día 7) mediante una microjeringa de 250 μL (Hamilton). A cada ratón se les inyectaron 5×10^{10} partículas virales (PV) suspendidas en 50 μL de PBS. Antes de cada inyección se limpió el área con etanol al 70%.

Villatoro-Hernandez, J., Loera-Arias, M. J., Gamez-Escobedo, A., Franco-Molina, M., Gomez-Gutierrez, J. G., Rodriguez-Rocha, H., Gutierrez-Puente, Y., Saucedo-Cardenas, O., Valdes-Flores, J. & Montes-de-Oca-Luna, R. (2008). Secretion of biologically active interferon-gamma inducible protein-10 (IP-10) by *Lactococcus lactis*. *Microb Cell Fact* **7**, 22.

RESULTADOS

La IP-10 secretada por *Lactococcus lactis* es biológicamente activa

La primera parte de este trabajo de investigación se enfoca a determinar la actividad biológica de dos quimiocinas producidas por *L. lactis*, una bacteria láctica de grado alimenticio. Estas corresponden a dos cepas de *L. lactis* que secretan las quimiocinas IP-10 y linfotactina, y que son el producto de dos tesis de licenciatura. Se sabe que la actividad principal de estas dos citocinas es inducir quimiotaxis de leucocitos (Farber, 1997; Hedrick *et al.*, 1997), principalmente de linfocitos. Esta propiedad nos permitió demostrar si la IP-10 y linfotactina secretadas por *L. lactis* eran biológicamente activas al analizar su capacidad para quimioatraer linfocitos T. Para esto diseñamos un experimento de quimiotaxis con cámaras Boyden en las cuales se utilizaron linfocitos T humanos y sobrenadantes de las cepas recombinantes secretoras de las quimiocinas IP-10 y linfotactina.

En este experimento se utilizó como control positivo suero humano con complemento activado, ya que se conoce que el complemento es capaz de actuar como un quimioattractante de linfocitos T. Los resultados en la Figura 4 representan el análisis del conteo de linfocitos en el filtro teñido con hematoxilina. Como se observa en la gráfica, la mayor cantidad de células quimioatraídas a la membrana corresponde a la muestra que contiene la IP-10 secretada por *L. lactis*, por el contrario en los controles negativos, como era de esperarse, la quimiotaxis de linfocitos fue muy baja.

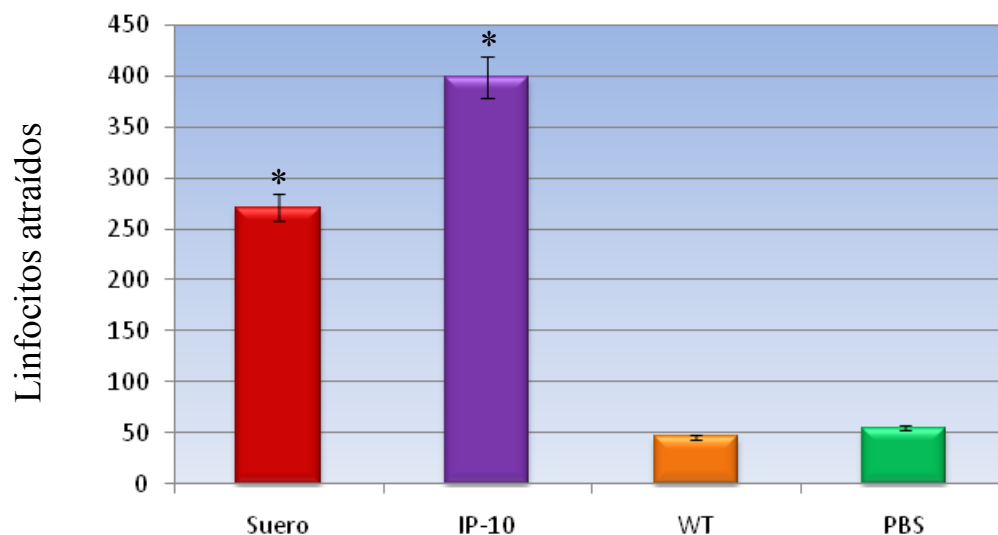


Figura 4. La IP-10 secretada por *L. lactis* es biológicamente activa. Después de la quimiotaxis por una hora en presencia de IP-10 se contaron las células en el filtro por microscopía de luz a 1000x. *L. lactis* silvestre y PBS se utilizaron como controles. Para el control positivo se utilizó suero humano con complemento activado. * $p < 0.001$.

El resultado del conteo directo sobre el filtro teñido con hematoxilina indica la cantidad de células que fueron atraídas por la muestra con las quimiocinas secretadas y que se quedaron embebidas en el filtro, ya que no lograron pasar en su totalidad hacia el compartimento de la cámara en donde se encontraba la muestra. Para determinar la cantidad de células totales que si lograron pasar dicho filtro, hacia el compartimento en donde se encontraba la muestra, se recuperaron las células y se les realizaron lavados para posteriormente incubarlas con un anticuerpo anti CD3+ conjugado con FITC. Esto permitió realizar un conteo por medio de citometría de flujo y tener la cifra de cuantas células lograron ser atraídas y cruzar el filtro en su totalidad. El resultado de este experimento se encuentra graficado en la Figura 5, la cual muestra como a pesar de que es mucho mayor la cantidad

de linfocitos CD3+ atraídos en el control positivo (Suero) el número de células atraídas por la IP-10 secretada por *L. lactis* es estadísticamente diferente a los controles.

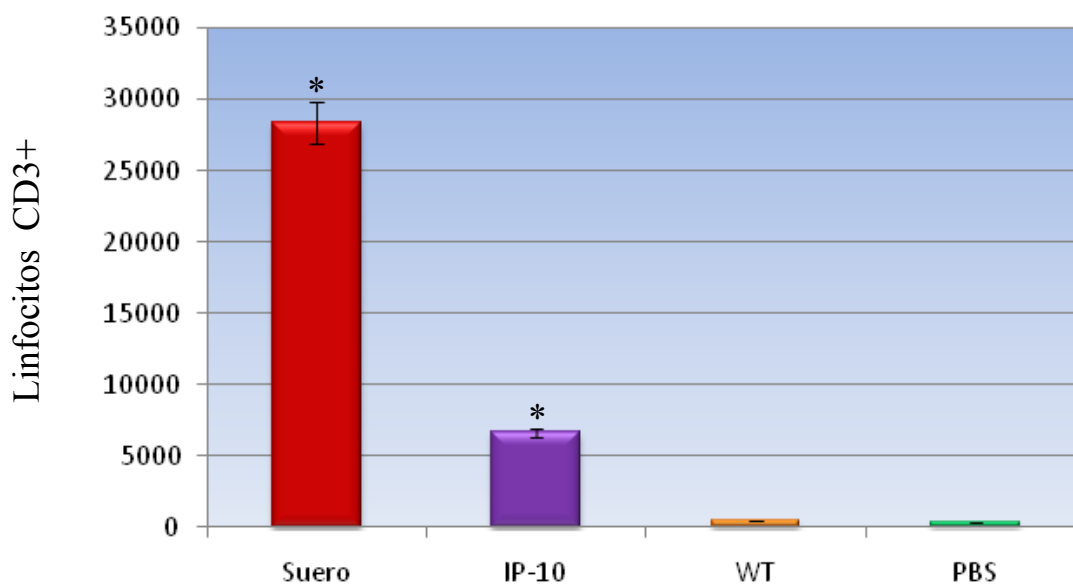


Figura 5. La IP-10 secretada por *L. lactis* es capaz de inducir quimiotaxis de linfocitos T CD3+. La cantidad de linfocitos T CD3+ atraídos por la IP-10 producida por *L. lactis* se midió por citometría de flujo. Se recuperó la fase inferior de la cámara y se incubó con un anticuerpo anti- CD3 conjugados con FITC. La cantidad de células atraídas por la IP-10 es estadísticamente significativa que los controles (*L. lactis* silvestre y PBS). Para el control positivo se utilizó suero humano con complemento activado. * $p < 0.001$.

Posterior al análisis de la actividad biológica de la quimiocina IP-10 secretada por *L. lactis* se continuó con el estudio de la actividad biológica de la linfotactina haciendo uso también de un ensayo de quimiotaxis.

La linfotactina (XCL1) secretada por *L. lactis* es biológicamente activa

La linfotactina es una glicoproteína secretada por leucocitos perteneciente a la familia de las quimiocinas y es capaz de inducir quimiotaxis de linfocitos T y células NK (Hedrick *et al.*, 1997). Ya que la linfotactina en nuestros experimentos esta secretada por un procarionta, fue importante demostrar que esta quimiocina tuviera actividad biológica. Esto lo determinamos al igual que para la IP-10 mediante un ensayo de quimiotaxis utilizando Linfocitos T humanos. De igual forma, para determinar la cantidad de células atraídas por la linfotactina secretada por *L. lactis*, se analizaron dos parámetros, el número de células presentes en la parte inferior del filtro de quimiotaxis, el cual no estuvo en contacto con las células, y mediante citometría de flujo, el número de linfocitos CD3+ que si lograron atravesar por completo el filtro. La figura 6 muestra la gráfica que representa el análisis del conteo de linfocitos en filtro mediante microscopía de luz.

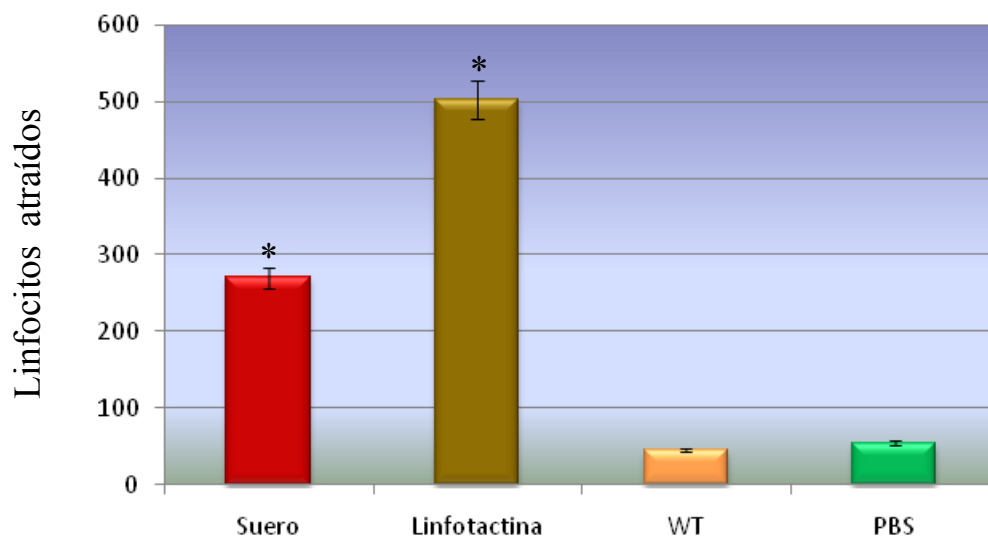


Figura 6. La linfotactina secretada por *L. lactis* es biológicamente activa. Después de la quimiotaxis por una hora en presencia de linfotactina se contaron las células en el filtro por microscopía de luz a 1000x. *L. lactis* silvestre y PBS se utilizaron como controles. Para el control positivo se utilizó suero humano con complemento activado. * $p < 0.001$.

Para determinar la cantidad de linfocitos T CD3⁺ que fueron atraídos por la linfotactina secretada por *L. lactis*, se recuperó la fase acuosa inferior de la cámara de quimiotaxis y se incubaron las células con anticuerpo anti-CD3⁺ conjugado con FITC para posteriormente analizar las muestras por citometría de flujo. El resultado de este experimento se detalla en la gráfica de la Figura 7, en la cual se observa como la linfotactina mostró valores mayores de 15,000 linfocitos quimioatraídos en una hora, en contraste con los controles negativos (PBS y sobrenadantes de la cepa silvestre de *L. lactis*) los cuales prácticamente no presentaron actividad quimiotáctica.

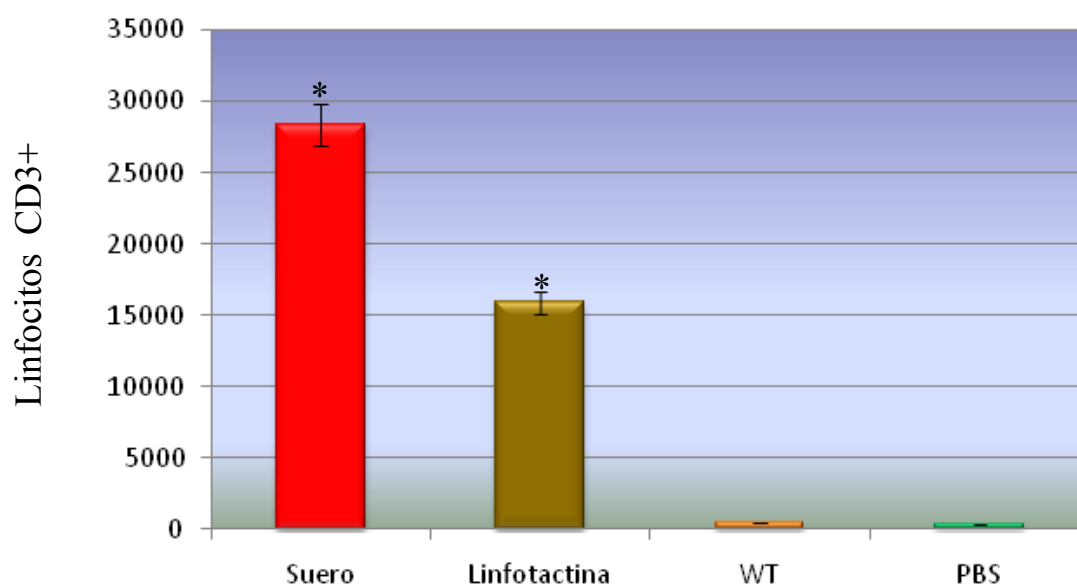


Figura 7. La linfotactina secretada por *L. lactis* es capaz de inducir quimiotaxis de linfocitos T CD3⁺. La cantidad de linfocitos T CD3⁺ atraídos por la linfotactina producida por *L. lactis* se midió por citometría de flujo. Se recuperó la fase inferior de la cámara y se incubó con un anticuerpo anti- CD3 conjugados con FITC. La cantidad de células atraídas por la IP-10 es estadísticamente significativa en comparación con los controles (*L. lactis* silvestre y PBS). Para el control positivo se utilizó suero humano con complemento activado. * $p < 0.001$.

***Lactococcus lactis* secreta IP-10 hasta por 6 horas**

Una vez que se demostró la actividad biológica de IP-10 y linfotactina secretadas por *L. lactis*, nos interesamos en determinar por cuánto tiempo *L. lactis* era capaz de continuar secretando las quimiocinas, incluso cuando el inductor (la nisina) se había retirado del medio. Esto con la finalidad de tener una referencia de la capacidad que podría tener *L. lactis* de secretar las quimiocinas *in vivo*, una vez que la bacteria fuera administrada vía nasal y en donde ya no habría disponibilidad del inductor nisina. Para esto, se prepararon cultivos de *L. lactis*-IP-10 y se les retiró el medio de cultivo en varios tiempos, agregando medio nuevo y continuando el cultivo. La cantidad relativa de IP-10 secretada por *L. lactis* en función del tiempo se analizó mediante Western Blot y los resultados se muestran en la Figura 8. Como se observa en la figura, después de la inducción y remoción de la nisina (B y C), se puede detectar secreción de IP-10 hasta la hora 6 posterior a la inducción. Para demostrar que la quimiocina detectada correspondía, no únicamente a IP-10 secretada en las primeras 3 horas, a este tiempo se removió y adicionó medio nuevo. La proteína secretada en las horas siguientes corresponde a la que se observa en el carril marcado con un asterisco (Para mayor detalle del protocolo favor de referirse a Material y Metodos).

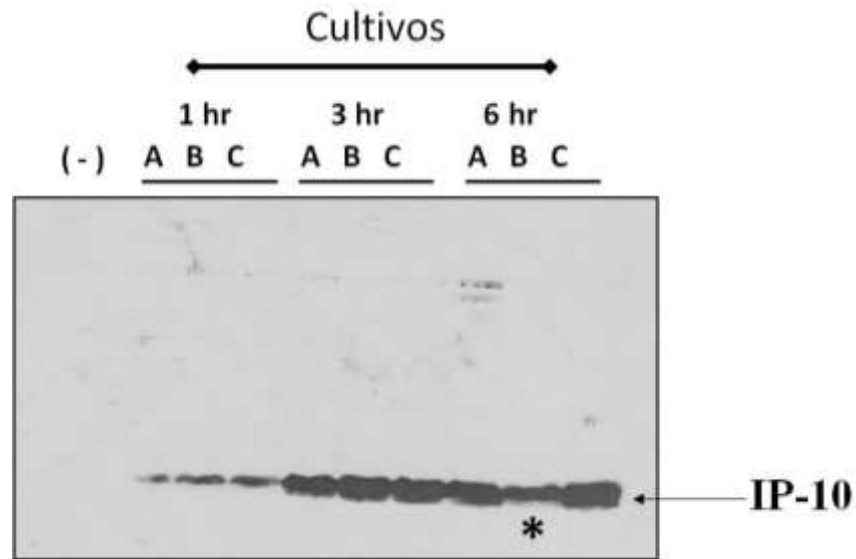


Figura 8. *L. lactis* secreta IP-10 hasta por 6 horas después de haber inducido con nisina. Tres cultivos de *L. lactis*-IP-10 (A, B y C) fueron inducidos con 10 ng/mL de nisina por 1 hora. El cultivo A estuvo en presencia de nisina durante todo el cultivo, el cultivo B se lavó y se suspendió en medio nuevo sin nisina a las horas 1 y 3, y el cultivo C se lavó y agregó medio nuevo sin nisina solo a la hora 1. Todos los cultivos se incubaron hasta 6 horas, se realizaron extracción de proteínas y Western Blot. La banda en el cultivo B a la hora 6 (*) representa la cantidad de IP-10 secretada de la hora 3 a la 6 en ausencia total de nisina.

La administración terapéutica de cepas de *L. lactis* secretoras de IP-10 y linfotactina inhiben el desarrollo tumoral

Una vez que se determinó que las quimiocinas IP-10 y linfotactina secretadas por *L. lactis* tenían actividad biológica, nos enfocamos a determinar el efecto de la administración de estas cepas en un modelo murino de cáncer cérvico uterino. Se sabe que la IP-10 ha sido reportada como mediadora de necrosis tumoral, inhibidora de angiogenesis tumoral, que

induce quimiotaxis de linfocitos T y NK y que posee actividad antitumoral (Angiolillo *et al.*, 1995; Farber, 1997; Narvaiza *et al.*, 2000). Se conoce también que la linfotactina además de tener actividad quimiotáctica para linfocitos y células NK posee cierto efecto antitumoral (Cairns *et al.*, 2001; Hedrick *et al.*, 1997). Por estos motivos nos formulamos la pregunta de si las cepas de *L. lactis* que secretan IP-10 y linfotactina podrían tener algún efecto antitumoral. Para contestar esta pregunta, utilizamos un modelo de cáncer cérvico uterino en ratones y evaluamos el efecto de la administración de estas cepas en ratones con tumores establecidos.

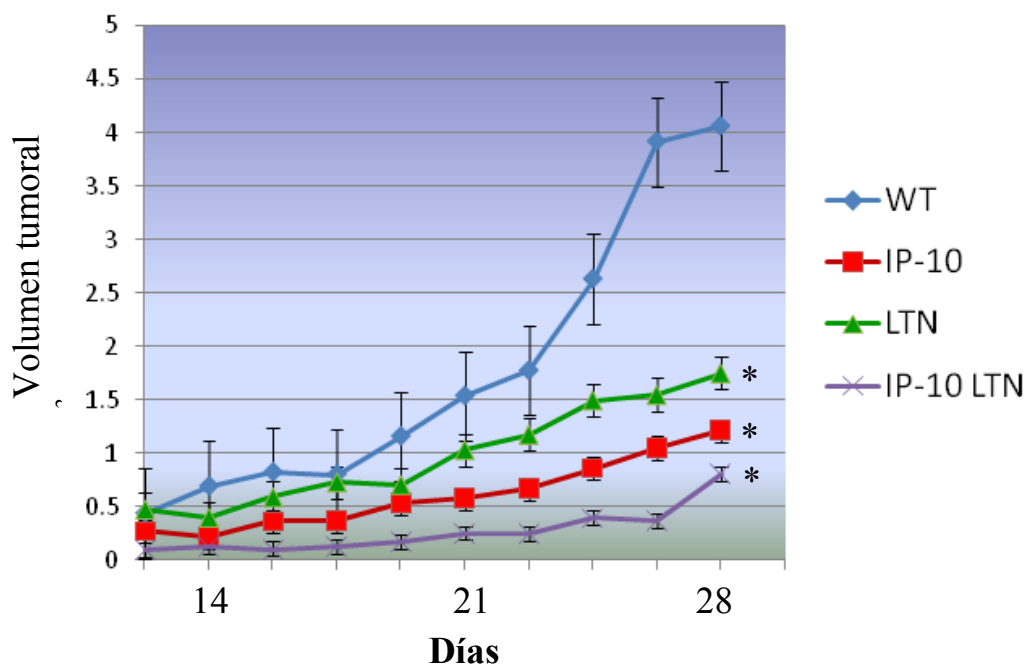


Figura 9. La administración intranasal con las cepas de *L. lactis*-IP-10 y *L. lactis*-linfotactina inhiben el crecimiento tumoral. Cepas de *L. lactis* que secretan IP-10 y linfotactina se administraron intranasalmente a los días 7, 14 y 21 a ratones con tumores de 5 mm en promedio. Los grupos en donde se aplicaron las cepas IP-10 y linfotactina muestran un menor tamaño en el volumen tumoral que el control en donde se administró la cepa silvestre de *L. lactis*. * $p < 0.001$.

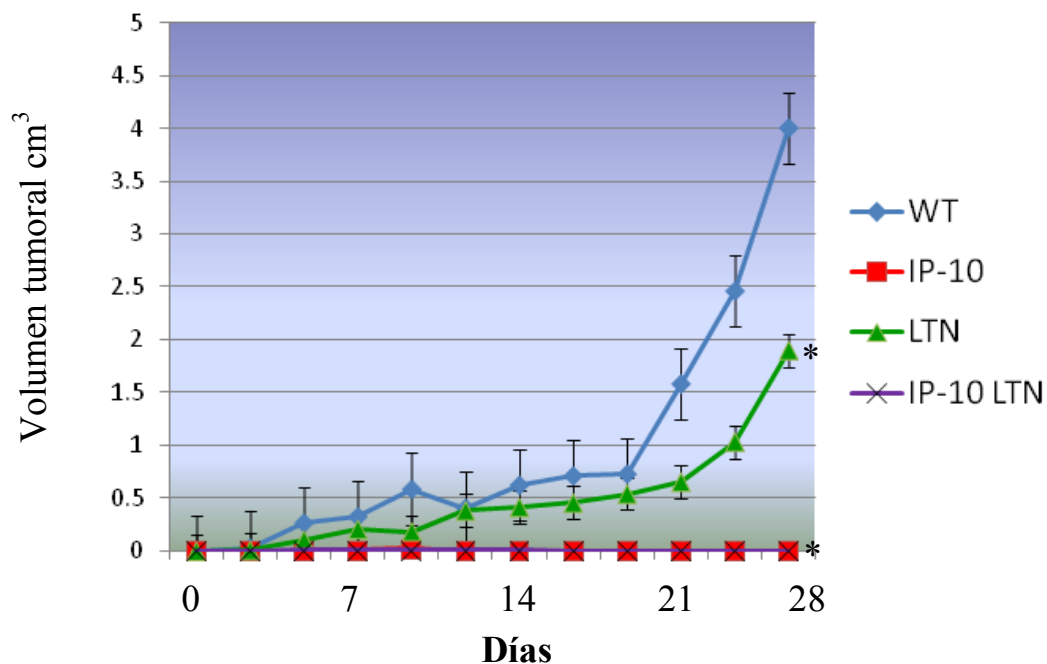
La administración de las cepas de forma intranasal (para detalles de protocolo y calendario de inmunización favor de referirse a material y métodos) se realizaron en ratones con tumores de aproximadamente 5 mm en promedio y se midió el desarrollo de los mismos. La Figura 9 muestra la gráfica de los valores promedio de los volúmenes de los tumores expresados en centímetros cúbicos en función del tiempo. En el grupo que solamente recibió la cepa silvestre de *L. lactis* se observa como los tumores fueron de mayor tamaño que en el resto de los grupos, tal y como era esperado.

En el grupo en donde se administró la cepa que secretaba linfotactina se pudo observar una disminución en el tamaño de los tumores en comparación con la cepa silvestre. Al inocular a los ratones con la cepa que secreta IP-10 se observó una disminución mayor en el tamaño de los tumores comparado con los grupos anteriores, por lo que se infiere que esta citocina podría tener un mayor efecto antitumoral. Un cuarto grupo de ratones fue inmunizado de manera simultánea con ambas cepas de *L. lactis*, la que secreta IP-10 y la que secreta linfotactina. En este grupo se observa como el desarrollo de los tumores es el menor de todos los tratamientos (Figura 9).

La administración profiláctica con cepas de *L. lactis* secretoras de IP-10 y linfotactina inhiben el desarrollo tumoral

Para determinar la capacidad de nuestras cepas secretoras de IP-10 y linfotactina, se diseñó un experimento, el cual consistió en realizar 4 administraciones y posteriormente retar con la línea tumoral TC1 y de esta manera determinar si la administración profiláctica con las cepas de *L. lactis* protegía contra el desarrollo de tumor en los ratones. Se inoculó a los ratones con las bacterias a los días 0, 14, 28 y un último “boost” al día 32 seguido del reto

A)



B)

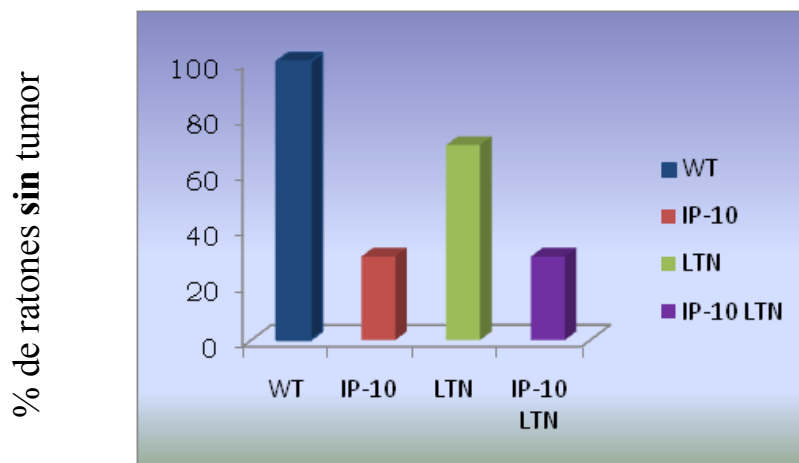


Figura 10. La administración profiláctica con *L. lactis*-IP-10 y *L. lactis* linfotactina inhiben el desarrollo tumoral. A) Para determinar el efecto de protección de las cepas de *L. lactis* se realizaron primeramente 4 administraciones y al día “0” se les retó con la línea tumoral TC1. Como control negativo se utilizó la cepa silvestre de *L. lactis*. **B)** Porcentaje de ratones sin tumor de cada grupo donde se administró *L. lactis* IP-10 y linfotactina.

* $p < 0.001$.

con la línea tumoral TC1 al día 35. Las mediciones del crecimiento tumoral se realizaron como se describió anteriormente. El análisis de los resultados se encuentra graficado en la Figura 10A. La gráfica refiere al “día 0” como a el día en que se retó con la línea TC1 para inducir los tumores.

Los resultados muestran que los tratamientos con la cepa de *L. lactis* que secreta la IP-10, y el del tratamiento combinado IP-10/linfotactina inhibieron casi completamente el desarrollo del tumor. El tratamiento con la cepa que expresa linfotactina no mostró el mismo efecto inhibitorio, pero el desarrollo tumoral fue menor que en el grupo control.

En este experimento profiláctico, varios de los ratones de los diferentes grupos lograron desarrollar el tumor inducido el cual lograba desaparecer conforme avanzaba el experimento. En otros ratones no se alcanzó a desarrollar en su totalidad. El porcentaje de ratones que al final del experimento no tenían tumores, es decir que se encontraban libres de tumor, se graficó y se presentan en la Figura 10B.

La administración terapéutica de *L. lactis* IP-10 incrementa el efecto antitumoral de *L. lactis* E7

La siguiente parte de nuestra investigación fue determinar si la administración de *L. lactis* que expresan IP-10 y linfotactina podían mejorar el efecto antitumoral de una cepa de *L. lactis* que expresa el antígeno E7. Para esto hicimos uso del modelo de cáncer cérvico uterino en ratones e implementamos el mismo calendario de administración terapéutica. La cantidad de bacteria administrada en los diferentes tratamientos fue de 1×10^9 UFC, de cada

cepa, suspendidas en 10 μ L de PBS y administrada de forma intranasal. El análisis de los resultados de este experimento se muestra en la Figura 11.

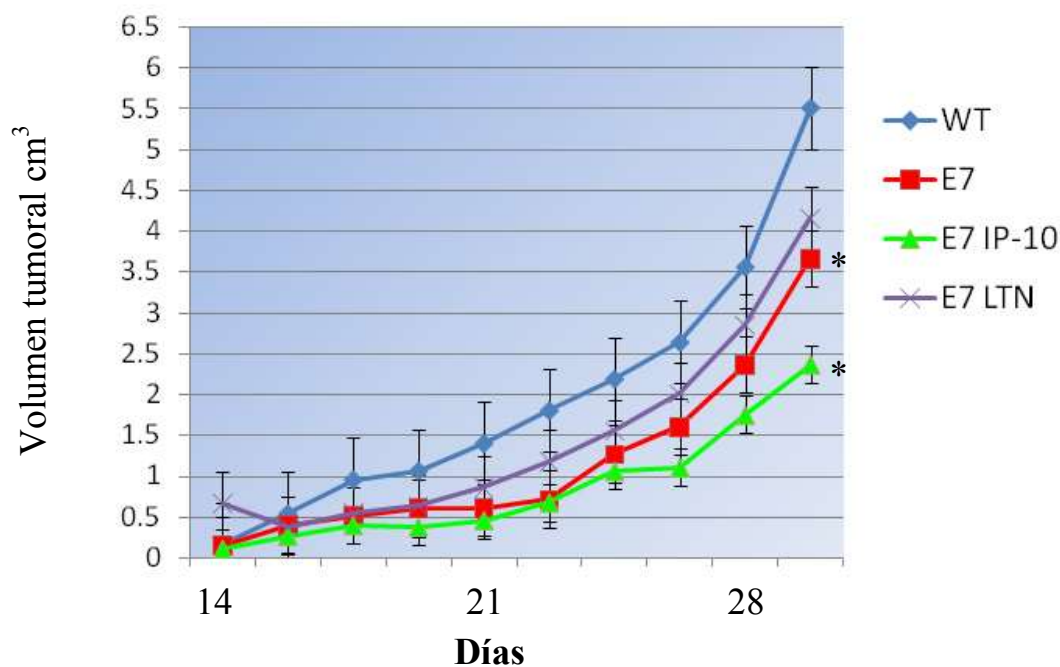


Figura 11. La co-administración terapéutica de *L. lactis* IP-10 mejora el efecto antitumoral de *L. lactis* E7. Las diferentes cepas de *L. lactis* que secretan IP-10, linfotactina y/o E7 se administraron intranasalmente a los días 7, 14 y 21, a ratones con tumores ya establecidos de 5 mm en promedio. * $p < 0.001$.

***L. lactis* IP-10 y linfotactina aumentan el efecto de protección de *L. lactis* E7**

Para determinar si se mejoraba la actividad de protección de la cepa que expresa E7 con las cepas secretoras de IP-10 y linfotactina, se realizaron 4 pre-inmunizaciones con la cepa E7 sola, y en combinación con ya sea la cepa secretora de IP-10 o linfotactina a los días previamente establecidos. Al terminar las pre-inmunizaciones se retó con la línea tumoral TC1 y se tomaron medidas durante 4 semanas a aquellos ratones que desarrollaran tumor.

En la Figura 12 se encuentran los datos graficados de este experimento (el día “0” de la gráfica representa el día de la inducción de tumor con TC1), en donde se puede observar como la co-administración con las cepas secretoras de IP-10 y linfotactina aumentaron el efecto de inhibición de desarrollo tumoral de la cepa que expresa únicamente E7.

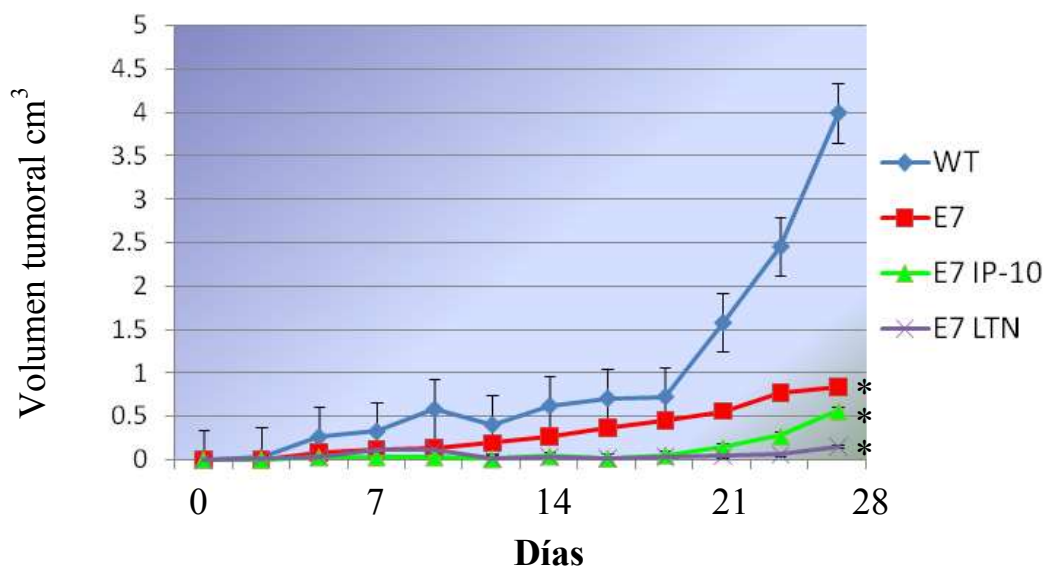


Figura 12. Las cepas de *L. lactis* secretoras de IP-10 y linfotactina aumentan el efecto de protección antitumoral de la cepa que expresa E7. Las diferentes cepas de *L. lactis* que secretan IP-10, linfotactina y/o E7 se administraron intranasalmente a los días 0, 14, 28 y 32, y cinco días después se implantaron las células TC1. El desarrollo del tumor se midió cada tercer día. * $p < 0.001$.

La co-administración de *L. lactis* E7 y *L. lactis* linfotactina en combinación con un adenovirus-E7 inhiben el crecimiento tumoral.

En nuestro laboratorio se cuenta con una terapia génica a base de adenovirus que codifican para varios antígenos tumorales. Estos adenovirus inyectados en tejidos sanos o tumorales,

son capaces de inducir respuestas inmunes específicas contra tumor. En esta última parte de nuestro trabajo experimental, nos dimos a la tarea de determinar si la co-administración con cepas de *L. lactis* linfotactina y E7 incrementaban el efecto terapéutico de una terapia adenoviral con un adenovirus que expresa E7.

Para esto primeramente se implantaron células TC1 para desarrollar el tumor en dos diferentes grupos. En uno de ellos, se aplicaron intratumoralmente los adenovirus que expresan E7 a los 7 días posteriores a la implantación de las células, y el tratamiento intranasal con las cepas de *L. lactis* que expresan linfotactina o E7 fue a los días 7, 14 y 21 posteriores a la implantación. En ambos grupos se registró el desarrollo del tumor y los resultados se presentan en la Figura 13. Como se observa en la figura, el volumen tumoral alcanzó 2 y 3 cm³ en los tratamientos únicamente con *L. lactis*, en contraste con los tratamientos combinados con Adenovirus en donde se observó una inhibición del desarrollo tumoral.

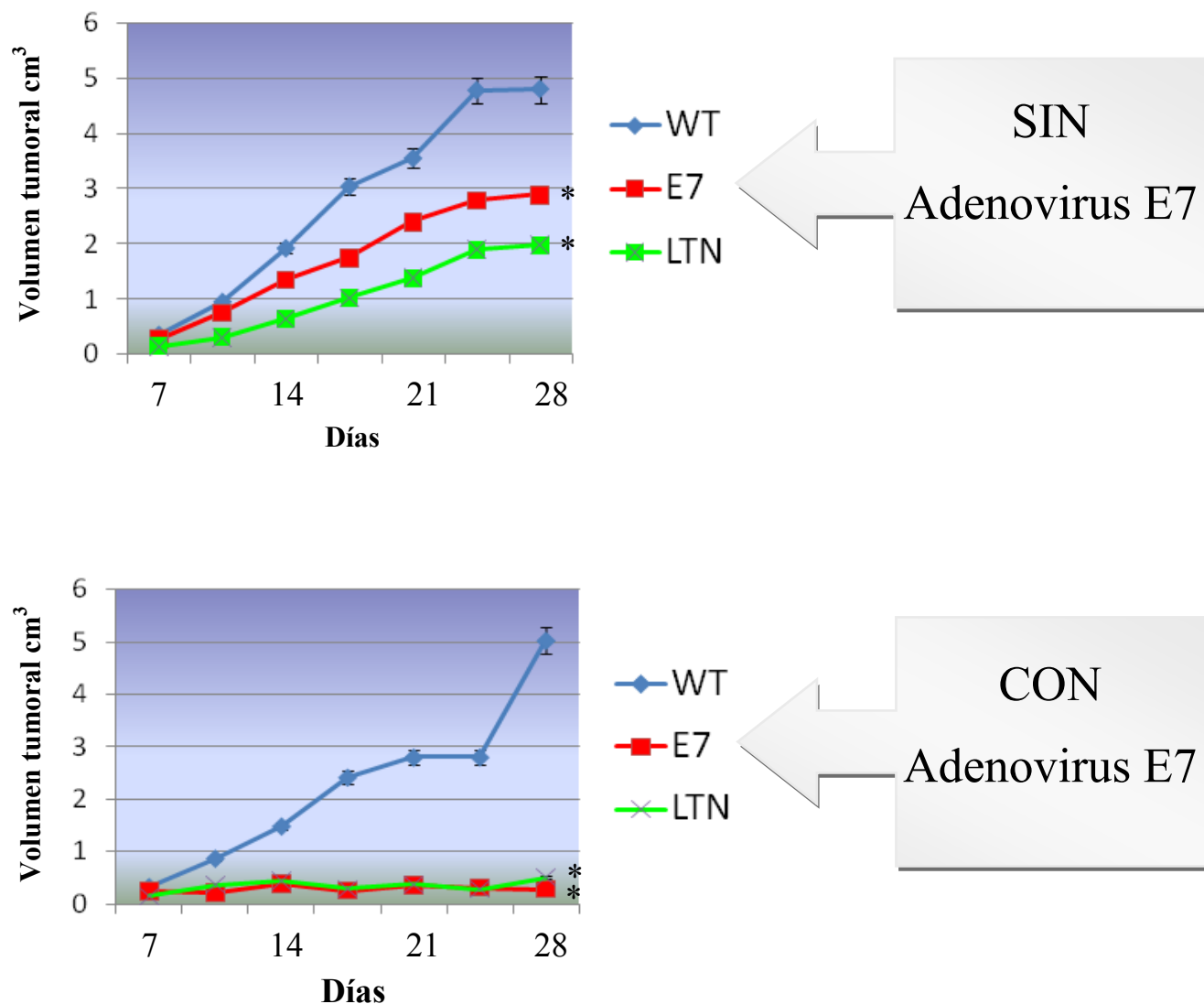


Figura 13. La co-administración de *L. lactis* E7 o *L. lactis* linfotactina con el adenovirus-E7 inhiben el crecimiento tumoral. A dos diferentes grupos se les implantó células TC1. Uno de ellos fue inmunizado a los 7 días con un Adenovirus que expresa E7 y a los 7, 14 y 21 días con las cepas de *L.lactis* que expresan E7 y linfotactina. El otro grupo fue tratado únicamente con las cepas de lactococcus a los mismos tiempos. El desarrollo del tumor se midió cada tercer día. * $p < 0.001$.

Angiolillo, A. L., Sgadari, C., Taub, D. D., Liao, F., Farber, J. M., Maheshwari, S., Kleinman, H. K., Reaman, G. H. & Tosato, G. (1995). Human interferon-inducible protein 10 is a potent inhibitor of angiogenesis in vivo. *J Exp Med* **182**, 155-162.

Cairns, C. M., Gordon, J. R., Li, F., Baca-Estrada, M. E., Moyana, T. & Xiang, J. (2001). Lymphotactin expression by engineered myeloma cells drives tumor regression: mediation by CD4+ and CD8+ T cells and neutrophils expressing XCR1 receptor. *J Immunol* **167**, 57-65.

Farber, J. M. (1997). Mig and IP-10: CXC chemokines that target lymphocytes. *J Leukoc Biol* **61**, 246-257.

Hedrick, J. A., Saylor, V., Figueroa, D., Mizoue, L., Xu, Y., Menon, S., Abrams, J., Handel, T. & Zlotnik, A. (1997). Lymphotactin is produced by NK cells and attracts both NK cells and T cells in vivo. *J Immunol* **158**, 1533-1540.

Narvaiza, I., Mazzolini, G., Barajas, M., Duarte, M., Zaratiegui, M., Qian, C., Melero, I. & Prieto, J. (2000). Intratumoral coinjection of two adenoviruses, one encoding the chemokine IFN-gamma-inducible protein-10 and another encoding IL-12, results in marked antitumoral synergy. *J Immunol* **164**, 3112-3122.

DISCUSIÓN

El uso de *Lactococcus lactis* como vehículo para inducir respuestas inmunes favorables ha sido descrito previamente en una revisión que ejemplifica lo seguro y eficaz que es esta bacteria láctica para el desarrollo de terapias contra enfermedades infecciosas y crónicas (Wells & Mercenier, 2008). Esta revisión enlista más de 15 estudios que reportan el uso de *L. lactis* en modelos animales y la respuesta inmune específica que se midió al administrar las cepas. En estos estudios se determinó el efecto de las cepas de *L. lactis* que producían antígenos microbianos o virales y moléculas relacionadas con el sistema inmunológico como interleucinas, frente a diversas patologías.

Estos antecedentes se analizaron por nuestro grupo de investigación y despertaron la iniciativa para crear diferentes cepas de *L. lactis* que expresen moléculas de relevancia médica y que sean capaces de generar respuestas inmunes favorables y mejorar respuestas inmunes ya reportadas por nuestro laboratorio. Teniendo esto como plataforma, se trató de crear y mejorar: crear algo nuevo y mejorar algo ya descrito. Para realizar esta meta, se pensó en construir una cepa de *L. lactis* para que secretara alguna molécula que haya sido estudiada previamente y haya sido reportada con resultados alentadores y prometedores. Por este motivo se seleccionaron las quimiocinas IP-10 y linfotactina, ya que se consideran citocinas capaces de estimular la respuesta inmune de forma autócrina, de inducir quimiotaxis de leucocitos, de inhibir angiogénesis tumoral, comportarse como microbicidas y finalmente de actuar como moléculas antitumorales (Emtage *et al.*, 1999; Huang & Xiang, 2004; Kanegane *et al.*, 1998; Tannenbaum *et al.*, 1998). Nuestras expectativas se fundamentan en: i) el uso de una bacteria de grado alimenticio reportada como eficaz para

generar respuestas inmunes de forma segura y ii) en dos quimiocinas reportadas como antitumorales y moduladoras de la respuesta inmune.

En nuestro proyecto de investigación tomamos como punto de inicio dos cepas de *L. lactis* resultado de dos tesis de licenciatura cuyo objetivo fue la construcción de las cepas y la detección de la IP-10 y Linfotactina por medio de Western Blot (Tesis de Licenciatura de Villatoro-Hernandez 2004 y Zavala-Flores 2005). Estos proyectos concluyeron hasta la detección de las quimiocinas por Western Blot.

Fue necesario, entonces, plantearse nuevos objetivos y estrategias experimentales para desarrollar este trabajo de investigación. Primeramente nos dimos a la tarea de determinar si las quimiocinas secretadas por *L. lactis* eran biológicamente activas ya que es primordial determinar si son funcionales para poder contemplar su uso en un modelo *in vivo*. Para cumplir con este objetivo, determinamos la actividad biológica de IP-10 y Linfotactina mediante un ensayo de quimiotaxis de linfocitos T humanos.

La linfotactina secretada por *L. lactis* es codificada por un fragmento de DNA clonado a partir de un cDNA humano. El fragmento que codifica para la IP-10 secretada por *L. lactis* deriva de un cDNA proveniente de ratón. Esto nos conlleva a un cuestionamiento de si es o no posible determinar la actividad biológica de una quimiocina de origen murino con linfocitos T humanos. Para disipar nuestra incertidumbre se hizo primeramente un análisis en la secuencia aminoacídica de la IP-10 para razonar que tanta homología existía entre la IP-10 humana y murina. Nuestro análisis determinó que existe un 83% de identidad aminoacídica entre la IP-10 de origen humano y la de origen murino, lo cual nos indica que debido a su alta homología en su estructura primaria podría ser posible demostrar quimiotaxis de linfocitos T humanos por la IP-10 de origen murino secretada *L. lactis*. Un último dato que apoyó nuestra idea, fue un estudio en donde se reporta la inducción de un

flujo de calcio intracelular en linfocitos que expresan el receptor CXCR3 de la IP-10 humana en presencia de la IP-10 de origen murino lo cual demuestra que en realidad existe el acoplamiento entre el receptor humano y el ligando (de origen murino) y su estímulo correspondiente (Jen *et al.*, 1999).

Los resultados de nuestros experimentos para determinar la actividad biológica de la IP-10 y de la linfotactina indicaron que ambas quimiocinas fueron capaces de inducir quimiotaxis de linfocitos CD3+ (Figura 5).

Con respecto a la linfotactina secretada por *L. lactis*, existía una fuerte importancia para demostrar su actividad biológica ya que esta quimiocina es una proteína glicosilada. Se ha demostrado que la bioactividad de muchas proteínas glicosiladas radica en el grado de glicosilación y que la ausencia de esta modificación postraducciona compromete su actividad. Como sabemos, *L. lactis* es un procarionte y puesto que los procariontes no realizan este tipo de modificaciones, fue de vital importancia determinar si la quimiocina secretada por *L. lactis* era capaz de conservar su actividad biológica. Nuestros resultados demuestran que la linfotactina secretada por *L. lactis* posee actividad biológica e induce quimiotaxis de linfocitos T CD3+ (Figura 7). Nuestros datos comparten los hallazgos de un estudio del 2005 que reportan una linfotactina producida por procariontes en *E. coli* y en células S2 de insecto y que ambas linfotactinas obtenidas de diferentes vectores de expresión conservaban sus características biológicas (Dong *et al.*, 2005).

Por su parte la IP-10 secretada por *L. lactis* de origen murino fue capaz de inducir quimiotaxis de linfocitos T CD3+. Con respecto a la homología que existe entre la IP-10 de origen humano y murino, en nuestros experimentos de quimiotaxis incluimos una cepa que no incluimos en nuestro proyecto, pero que nuestro laboratorio desarrolló y que secreta la IP-10 humana. Al comparar ambas quimiocinas de diferente especie, se pudo determinar

que eran capaces de inducir quimiotaxis de linfocitos humanos de manera similar (Datos no mostrados).

Habiendo determinado la actividad de ambas quimiocinas, pasamos al modelo *in vivo*, el cual simula un cáncer cérvico uterino. En este modelo se desarrollan tumores utilizando la línea celular TC1, la cual expresa de manera constitutiva los antígenos E6 y E7, que son expresados en este tipo de cáncer. La administración de las cepas de *Lactococcus* fue por la vía intranasal, ya que se ha demostrado que por esta vía se induce una buena respuesta inmune al usar antígenos inmunizados sobre epitelios mucosos. La ventaja de utilizar este método vs el intragástrico u oral es que mediante estos últimos se corre el riesgo de perder muchas bacterias que perecen al entrar en contacto con el ácido gástrico presente en el estómago.

Nuestros experimentos se enfocaron primeramente a determinar la actividad antitumoral de las cepas secretoras de IP-10 y de linfotactina al administrarse por sí solas y combinadas de forma terapéutica. De los resultados de este experimento se pueden desglosar varias observaciones. La primera es que la administración de la cepa secretora de linfotactina fue la que presentó un efecto antitumoral más moderado, ya que el grupo de ratones en donde se aplicó la cepa secretora de IP-10 presentaba tumores de menor tamaño en comparación con la secretora de linfotactina. De forma interesante, el grupo en donde se aplicaron las cepas secretoras de IP-10 y linfotactina de forma simultánea, fue el grupo donde se registraron tumores de menor tamaño. Para poder explicar este resultado, es importante mencionar ciertos aspectos. El primero de ellos es que se conoce que las actividades más sobresalientes de la linfotactina es la inducción de quimiotaxis de linfocitos T y NK, mientras que las de la IP-10 además de quimiotaxis de linfocitos T, NK y monocitos, son la

capacidad de actuar como inhibidora de la angiogénesis tumoral y puede inducir necrosis tumoral (Angiolillo *et al.*, 1995; Frederick & Clayman, 2001; Hedrick *et al.*, 1997; Sgadari *et al.*, 1996). Mientras que el efecto antitumoral descrito para la linfotactina esta principalmente originado por la presencia de linfocitos T y células NK atraídas por esta quimiocina, la IP-10 es capaz de inducir la producción de más IP-10 de forma localizada y sistémica. Además puede directamente estar bloqueando la neovascularización del tumor establecido, causándole isquemia al privarlo de irrigación y nutrientes acarreados en la sangre. Al igual que lo reportado por Sgadari, en donde reporta que a pesar de que no se induce una regresión al 100% de los tumores subcutáneos, si se reduce el tamaño de este, como ocurre en nuestros resultados, el cual se explica por el daño originado por IP-10 de manera selectiva a la vasculatura tumoral (Sgadari *et al.*, 1996) (Figura 9).

Para determinar la protección contra el desarrollo de tumor de las cepas de *L. lactis* IP-10 y linfotactina, primeramente se realizaron 4 administraciones de forma profiláctica en varios grupos de ratones y se retó con la línea TC1. Los resultados de este experimento indican que la administración con la cepa de *L. lactis*-linfotactina protege contra el desarrollo de tumores. Nuevamente esta cepa fue la que actuó de forma más moderada con respecto a las demás. Para el caso del grupo en donde se administró *L. lactis*-IP-10, los ratones no presentaron tumores con volúmenes tumorales mayores a 0.5 cm³. Un tercer grupo al cual se les aplicaron las dos cepas secretoras de IP-10 y de linfotactina se comportó de forma similar al que se le aplicó solo la cepa que secreta IP-10, por lo que el efecto de protección contra el desarrollo de tumor es presumiblemente llevado a cabo por la cepa que secreta IP-10 (Figura 10). Al final del experimento, en los grupos en donde se inmunizó con IP-10 se pudo determinar que más del 70% de los ratones se encontraban libres de tumor, y tan solo

un 25% de estos aun portaban tumor (Figura 10B). Uno de los factores que pueden explicar este comportamiento es la capacidad de IP-10 de inducir la producción de más IP-10, lo cual incrementa la cantidad de linfocitos que expresan el receptor CXCR3, y aumenta la cantidad de linfocitos responsivos a esta quimiocina, pre-sensibilizándolos o activándolos para un futuro reto con la línea TC1 de forma inespecífica (Loetscher *et al.*, 1998). Otro de los factores que puede estar contribuyendo para un mayor efecto de protección contra tumor de la IP-10, es su capacidad de interactuar con otras citocinas y activar procesos inmunológicos. Mientras que la linfotactina es capaz de reclutar células NK, la IP-10 se ha reportado como necesaria para generar protección contra tumor mediada por linfocitos T CD8. En este reporte utilizando anticuerpos anti-IP-10 para bloquear la actividad de IP-10, demostraron que la presencia de esta quimiocina es importante para reclutar linfocitos T CD8 y generar respuesta inmune específica celular en fases tempranas de inmunización. Finalmente un dato que apoya mas nuestros resultados es que, en este mismo reporte aquellos grupos que recibieron anticuerpos anti IP-10 se les presentó con mayor rapidez la metástasis y se inhibió la lisis celular llevada a cabo por el MHC I mediado por linfocitos T CD8 (Pertl *et al.*, 2001).

Hasta este momento, se pudo demostrar como la administración terapéutica y profiláctica de las cepas de *L. lactis* secretoras de IP-10 y linfotactina tienen efecto antitumoral por si solas, por lo cual la siguiente cuestión era determinar si la administración de estas cepas con una que expresa E7 aumentaba el efecto antitumoral de esta última. Para determinarlo realizamos experimentos terapéuticos y profilácticos co-administrando las cepas IP-10 y linfotactina en combinación con la que expresa E7. El resultado del ensayo terapéutico representado en la Figura 11 muestra como el mayor efecto terapéutico se registra al utilizar

las cepas de *L. lactis* E7 e IP-10 en combinación. Este resultado se puede explicar por la cantidad de macrófagos que al ser reclutados por IP-10 actúan como células presentadoras de antígeno y que al estar presentes con E7 se procesan por medio del complejo mayor de histocompatibilidad tipo I (MHC I). Con respecto al tratamiento con linfotactina, con estos resultados no podemos explicar la razón por la cual el tamaño de los tumores se ve incrementado, incluso más que el grupo en donde solo se inmunizó con *L. lactis* E7. En contraparte con este último resultado, el experimento profiláctico registra una mejor respuesta antitumoral (Figura 12), en donde se ve inhibido el crecimiento del tumor en el grupo inmunizado con *L. lactis* linfotactina y E7 en comparación con el grupo inmunizado solo con *L. lactis*-E7. Esto coincide con el reporte de Lillard en 1999, el cual detalla como la inmunización intranasal con el antígeno OVA en combinación con linfotactina (también administrada de forma intranasal) aumenta la cantidad de anticuerpos específicos contra OVA e incrementa la cantidad de IL-2, IL-19 e INF-gamma en contraste con el grupo que no recibió linfotactina (Lillard *et al.*, 1999).

En la parte final de nuestro proyecto, quisimos determinar el efecto de una co-administración de las cepas de *L. lactis* E7 y linfotactina en combinación con un adenovirus que expresa E7. Este adenovirus previamente ha sido aplicado en modelos tumorales de cáncer cervicales y ha mostrado tener cierta actividad por lo cual queríamos determinar si este efecto antitumoral se veía aumentado en combinación con el *Lactococcus*. La Figura 13 muestra como el tamaño tumoral de los grupos inmunizados con *L. lactis* E7 y linfotactina en combinación con el adenovirus muestran un mejor efecto que los controles, por lo que se puede determinar que *L. lactis* E7 y linfotactina inducen una respuesta inmune específica contra tumor.

CONCLUSIONES

1. Las quimiocinas IP-10 y Linfotactina secretadas por *Lactococcus lactis* son biológicamente activas.
2. Las cepas de *L. lactis* que secretan IP-10 y Linfotactina poseen efecto antitumoral.
3. La cepa de *L. lactis* que secreta IP-10 mostró un mayor efecto antitumoral que la que secreta Linfotactina.
4. La administración profiláctica y terapéutica de la cepa de *L. lactis* que secreta IP-10 incrementó el efecto antitumoral de *L. lactis*-E7.
5. La administración profiláctica de *L. lactis* que secreta Linfotactina incrementó el efecto antitumoral de *L. lactis*-E7 .
6. La co-administración de un adenovirus que expresa E7 incrementa el efecto antitumoral de las cepas de *L. lactis* que expresan linfotactina o E7.

Angiolillo, A. L., Sgadari, C., Taub, D. D., Liao, F., Farber, J. M., Maheshwari, S., Kleinman, H. K., Reaman, G. H. & Tosato, G. (1995). Human interferon-inducible protein 10 is a potent inhibitor of angiogenesis in vivo. *J Exp Med* **182**, 155-162.

Dong, C., Chua, A., Ganguly, B., Krensky, A. M. & Clayberger, C. (2005). Glycosylated recombinant human XCL1/lymphotactin exhibits enhanced biologic activity. *J Immunol Methods* **302**, 136-144.

Emtage, P. C., Wan, Y., Hitt, M., Graham, F. L., Muller, W. J., Zlotnik, A. & Gauldie, J. (1999). Adenoviral vectors expressing lymphotactin and interleukin 2 or lymphotactin and interleukin 12 synergize to facilitate tumor regression in murine breast cancer models. *Hum Gene Ther* **10**, 697-709.

Frederick, M. J. & Clayman, G. L. (2001). Chemokines in cancer. *Expert Rev Mol Med* **3**, 1-18.

Hedrick, J. A., Saylor, V., Figueroa, D., Mizoue, L., Xu, Y., Menon, S., Abrams, J., Handel, T. & Zlotnik, A. (1997). Lymphotactin is produced by NK cells and attracts both NK cells and T cells in vivo. *J Immunol* **158**, 1533-1540.

Huang, H. & Xiang, J. (2004). Synergistic effect of lymphotactin and interferon gamma-inducible protein-10 transgene expression in T-cell localization and adoptive T-cell therapy of tumors. *Int J Cancer* **109**, 817-825.

Jenh, C. H., Cox, M. A., Kaminski, H., Zhang, M., Byrnes, H., Fine, J., Lundell, D., Chou, C. C., Narula, S. K. & Zavodny, P. J. (1999). Cutting edge: species specificity of the CC chemokine 6Ckine signaling through the CXC chemokine receptor CXCR3: human 6Ckine is not a ligand for the human or mouse CXCR3 receptors. *J Immunol* **162**, 3765-3769.

Kanegane, C., Sgadari, C., Kanegane, H., Teruya-Feldstein, J., Yao, L., Gupta, G., Farber, J. M., Liao, F., Liu, L. & Tosato, G. (1998). Contribution of the CXC chemokines IP-10 and Mig to the antitumor effects of IL-12. *J Leukoc Biol* **64**, 384-392.

Lillard, J. W., Jr., Boyaka, P. N., Hedrick, J. A., Zlotnik, A. & McGhee, J. R. (1999). Lymphotactin acts as an innate mucosal adjuvant. *J Immunol* **162**, 1959-1965.

Loetscher, M., Loetscher, P., Brass, N., Meese, E. & Moser, B. (1998). Lymphocyte-specific chemokine receptor CXCR3: regulation, chemokine binding and gene localization. *Eur J Immunol* **28**, 3696-3705.

Pertl, U., Luster, A. D., Varki, N. M., Homann, D., Gaedicke, G., Reisfeld, R. A. & Lode, H. N. (2001). IFN-gamma-inducible protein-10 is essential for the generation of a protective tumor-specific CD8 T cell response induced by single-chain IL-12 gene therapy. *J Immunol* **166**, 6944-6951.

Sgadari, C., Angiolillo, A. L., Cherney, B. W., Pike, S. E., Farber, J. M., Koniaris, L. G., Vanguri, P., Burd, P. R., Sheikh, N., Gupta, G., Teruya-Feldstein, J. & Tosato, G. (1996). Interferon-inducible protein-10 identified as a mediator of tumor necrosis in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 13791-13796.

Tannenbaum, C. S., Tubbs, R., Armstrong, D., Finke, J. H., Bukowski, R. M. & Hamilton, T. A. (1998). The CXC chemokines IP-10 and Mig are necessary for IL-12-mediated regression of the mouse RENCA tumor. *J Immunol* **161**, 927-932.

Wells, J. M. & Mercenier, A. (2008). Mucosal delivery of therapeutic and prophylactic molecules using lactic acid bacteria. *Nat Rev Microbiol* **6**, 349-362.

LITERATURA CITADA

Angiolillo, A. L., Sgadari, C., Taub, D. D., Liao, F., Farber, J. M., Maheshwari, S., Kleinman, H. K., Reaman, G. H. & Tosato, G. (1995). Human interferon-inducible protein 10 is a potent inhibitor of angiogenesis in vivo. *J Exp Med* **182**, 155-162.

Aujla, S. J., Chan, Y. R., Zheng, M., Fei, M., Askew, D. J., Pociask, D. A., Reinhart, T. A., McAllister, F., Edeal, J., Gaus, K., Husain, S., Kreindler, J. L., Dubin, P. J., Pilewski, J. M., Myerburg, M. M., Mason, C. A., Iwakura, Y. & Kolls, J. K. (2008). IL-22 mediates mucosal host defense against Gram-negative bacterial pneumonia. *Nat Med* **14**, 275-281.

Bermudez-Humaran, L. G., Cortes-Perez, N. G., Lefevre, F., Guimaraes, V., Rabot, S., Alcocer-Gonzalez, J. M., Gratadoux, J. J., Rodriguez-Padilla, C., Tamez-Guerra, R. S., Corthier, G., Gruss, A. & Langella, P. (2005). A novel mucosal vaccine based on live Lactococci expressing E7 antigen and IL-12 induces systemic and mucosal immune responses and protects mice against human papillomavirus type 16-induced tumors. *J Immunol* **175**, 7297-7302.

Braat, H., Rottiers, P., Hommes, D. W., Huyghebaert, N., Remaut, E., Remon, J. P., van Deventer, S. J., Neiryneck, S., Peppelenbosch, M. P. & Steidler, L. (2006). A phase I trial with transgenic bacteria expressing interleukin-10 in Crohn's disease. *Clin Gastroenterol Hepatol* **4**, 754-759.

Cairns, C. M., Gordon, J. R., Li, F., Baca-Estrada, M. E., Moyana, T. & Xiang, J. (2001). Lymphotactin expression by engineered myeloma cells drives tumor regression: mediation by CD4⁺ and CD8⁺ T cells and neutrophils expressing XCR1 receptor. *J Immunol* **167**, 57-65.

Cole, A. M., Ganz, T., Liese, A. M., Burdick, M. D., Liu, L. & Strieter, R. M. (2001). Cutting edge: IFN-inducible ELR- CXC chemokines display defensin-like antimicrobial activity. *J Immunol* **167**, 623-627.

Cutler, A. & Brombacher, F. (2005). Cytokine therapy. *Ann N Y Acad Sci* **1056**, 16-29.

Dong, C., Chua, A., Ganguly, B., Krensky, A. M. & Clayberger, C. (2005). Glycosylated recombinant human XCL1/lymphotactin exhibits enhanced biologic activity. *J Immunol Methods* **302**, 136-144.

Dufour, J. H., Dziejman, M., Liu, M. T., Leung, J. H., Lane, T. E. & Luster, A. D. (2002). IFN-gamma-inducible protein 10 (IP-10; CXCL10)-deficient mice reveal a role for IP-10 in effector T cell generation and trafficking. *J Immunol* **168**, 3195-3204.

Emtage, P. C., Wan, Y., Hitt, M., Graham, F. L., Muller, W. J., Zlotnik, A. & Gauldie, J. (1999). Adenoviral vectors expressing lymphotactin and interleukin 2 or lymphotactin and interleukin 12 synergize to facilitate tumor regression in murine breast cancer models. *Hum Gene Ther* **10**, 697-709.

Fernandez, E. J. & Lolis, E. (2002). Structure, function, and inhibition of chemokines. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **42**, 469-499.

Farber, J. M. (1997). Mig and IP-10: CXC chemokines that target lymphocytes. *J Leukoc Biol* **61**, 246-257.

Frederick, M. J. & Clayman, G. L. (2001). Chemokines in cancer. *Expert Rev Mol Med* **3**, 1-18.

Hanniffy, S. B., Carter, A. T., Hitchin, E. & Wells, J. M. (2007). Mucosal delivery of a pneumococcal vaccine using *Lactococcus lactis* affords protection against respiratory infection. *J Infect Dis* **195**, 185-193.

Hedrick, J. A., Saylor, V., Figueroa, D., Mizoue, L., Xu, Y., Menon, S., Abrams, J., Handel, T. & Zlotnik, A. (1997). Lymphotactin is produced by NK cells and attracts both NK cells and T cells in vivo. *J Immunol* **158**, 1533-1540.

Huang, H. & Xiang, J. (2004). Synergistic effect of lymphotactin and interferon gamma-inducible protein-10 transgene expression in T-cell localization and adoptive T-cell therapy of tumors. *Int J Cancer* **109**, 817-825.

Jenh, C. H., Cox, M. A., Kaminski, H., Zhang, M., Byrnes, H., Fine, J., Lundell, D., Chou, C. C., Narula, S. K. & Zavodny, P. J. (1999). Cutting edge: species specificity of

the CC chemokine 6Ckine signaling through the CXC chemokine receptor CXCR3: human 6Ckine is not a ligand for the human or mouse CXCR3 receptors. *J Immunol* **162**, 3765-3769.

Ju, D. W., Tao, Q., Cheng, D. S., Zhang, W., Zhang, M., Hamada, H. & Cao, X. (2000). Adenovirus-mediated lymphotactin gene transfer improves therapeutic efficacy of cytosine deaminase suicide gene therapy in established murine colon carcinoma. *Gene Ther* **7**, 329-338.

Kanegane, C., Sgadari, C., Kanegane, H., Teruya-Feldstein, J., Yao, L., Gupta, G., Farber, J. M., Liao, F., Liu, L. & Tosato, G. (1998). Contribution of the CXC chemokines IP-10 and Mig to the antitumor effects of IL-12. *J Leukoc Biol* **64**, 384-392.

Kelner, G. S., Kennedy, J., Bacon, K. B., Kleyensteuber, S., Largaespada, D. A., Jenkins, N. A., Copeland, N. G., Bazan, J. F., Moore, K. W., Schall, T. J. & et al. (1994). Lymphotactin: a cytokine that represents a new class of chemokine. *Science* **266**, 1395-1399.

Kennedy, J., Kelner, G. S., Kleyensteuber, S., Schall, T. J., Weiss, M. C., Yssel, H., Schneider, P. V., Cocks, B. G., Bacon, K. B. & Zlotnik, A. (1995). Molecular cloning and functional characterization of human lymphotactin. *J Immunol* **155**, 203-209.

Kolls, J. K., McCray, P. B., Jr. & Chan, Y. R. (2008). Cytokine-mediated regulation of antimicrobial proteins. *Nat Rev Immunol* **8**, 829-835.

Kwak, Y. D., Yoo, S. K. & Kim, E. J. (1999). Cell surface display of human immunodeficiency virus type 1 gp120 on *Escherichia coli* by using ice nucleation protein. *Clin Diagn Lab Immunol* **6**, 499-503.

Le Loir, Y., Azevedo, V., Oliveira, S. C., Freitas, D. A., Miyoshi, A., Bermudez-Humaran, L. G., Nouaille, S., Ribeiro, L. A., Leclercq, S., Gabriel, J. E., Guimaraes, V. D., Oliveira, M. N., Charlier, C., Gautier, M. & Langella, P. (2005). Protein secretion in *Lactococcus lactis* : an efficient way to increase the overall heterologous protein production. *Microb Cell Fact* **4**, 2.

Lillard, J. W., Jr., Boyaka, P. N., Hedrick, J. A., Zlotnik, A. & McGhee, J. R. (1999). Lymphotactin acts as an innate mucosal adjuvant. *J Immunol* **162**, 1959-1965.

Loetscher, M., Loetscher, P., Brass, N., Meese, E. & Moser, B. (1998). Lymphocyte-specific chemokine receptor CXCR3: regulation, chemokine binding and gene localization. *Eur J Immunol* **28**, 3696-3705.

Nardelli-Haefliger, D., Roden, R. B., Benyacoub, J., Sahli, R., Kraehenbuhl, J. P., Schiller, J. T., Lachat, P., Potts, A. & De Grandi, P. (1997). Human papillomavirus type 16 virus-like particles expressed in attenuated *Salmonella typhimurium* elicit mucosal and systemic neutralizing antibodies in mice. *Infect Immun* **65**, 3328-3336.

Narvaiza, I., Mazzolini, G., Barajas, M., Duarte, M., Zaratiegui, M., Qian, C., Melero, I. & Prieto, J. (2000). Intratumoral coinjection of two adenoviruses, one encoding the chemokine IFN-gamma-inducible protein-10 and another encoding IL-12, results in marked antitumoral synergy. *J Immunol* **164**, 3112-3122.

Pertl, U., Luster, A. D., Varki, N. M., Homann, D., Gaedicke, G., Reisfeld, R. A. & Lode, H. N. (2001). IFN-gamma-inducible protein-10 is essential for the generation of a protective tumor-specific CD8 T cell response induced by single-chain IL-12 gene therapy. *J Immunol* **166**, 6944-6951.

Ricci, S., Macchia, G., Ruggiero, P., Maggi, T., Bossu, P., Xu, L., Medagliani, D., Tagliabue, A., Hammarstrom, L., Pozzi, G. & Boraschi, D. (2003). In vivo mucosal delivery of bioactive human interleukin 1 receptor antagonist produced by *Streptococcus gordonii*. *BMC Biotechnol* **3**, 15.

Rigaux, P., Daniel, C., Hisbergues, M., Muraille, E., Hols, P., Pot, B., Pestel, J. & Jacquet, A. (2008). Immunomodulatory properties of *Lactobacillus plantarum* and its use as a recombinant vaccine against mite allergy. *Allergy*.

Schotte, L., Steidler, L., Vandekerckhove, J. & Remaut, E. (2000). Secretion of biologically active murine interleukin-10 by *Lactococcus lactis*. *Enzyme Microb Technol* **27**, 761-765.

Sgadari, C., Angiolillo, A. L., Cherney, B. W., Pike, S. E., Farber, J. M., Koniaris, L. G., Vanguri, P., Burd, P. R., Sheikh, N., Gupta, G., Teruya-Feldstein, J. & Tosato, G. (1996). Interferon-inducible protein-10 identified as a mediator of tumor necrosis in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 13791-13796.

Steidler, L., Wells, J. M., Raeymaekers, A., Vandekerckhove, J., Fiers, W. & Remaut, E. (1995). Secretion of biologically active murine interleukin-2 by *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*. *Appl Environ Microbiol* **61**, 1627-1629.

Steidler, L., Robinson, K., Chamberlain, L., Schofield, K. M., Remaut, E., Le Page, R. W. & Wells, J. M. (1998). Mucosal delivery of murine interleukin-2 (IL-2) and IL-6 by recombinant strains of *Lactococcus lactis* coexpressing antigen and cytokine. *Infect Immun* **66**, 3183-3189.

Steidler, L., Hans, W., Schotte, L., Neiryneck, S., Obermeier, F., Falk, W., Fiers, W. & Remaut, E. (2000). Treatment of murine colitis by *Lactococcus lactis* secreting interleukin-10. *Science* **289**, 1352-1355.

Steidler, L. (2001). In situ delivery of therapeutic cytokines by genetically engineered *Lactococcus lactis*. *Meded Rijksuniv Gent Fak Landbouwkd Toegep Biol Wet* **66**, 551, 553-556.

Tannenbaum, C. S., Tubbs, R., Armstrong, D., Finke, J. H., Bukowski, R. M. & Hamilton, T. A. (1998). The CXC chemokines IP-10 and Mig are necessary for IL-12-mediated regression of the mouse RENCA tumor. *J Immunol* **161**, 927-932.

Villatoro-Hernandez, J., Loera-Arias, M. J., Gamez-Escobedo, A., Franco-Molina, M., Gomez-Gutierrez, J. G., Rodriguez-Rocha, H., Gutierrez-Puente, Y., Saucedo-Cardenas, O., Valdes-Flores, J. & Montes-de-Oca-Luna, R. (2008). Secretion of biologically active interferon-gamma inducible protein-10 (IP-10) by *Lactococcus lactis*. *Microb Cell Fact* **7**, 22.

Wells, J. M. & Mercenier, A. (2008). Mucosal delivery of therapeutic and prophylactic molecules using lactic acid bacteria. *Nat Rev Microbiol* **6**, 349-362.

Xu, Q., Pichichero, M. E., Simpson, L. L., Elias, M., Smith, L. A. & Zeng, M. (2009). An adenoviral vector-based mucosal vaccine is effective in protection against botulism. *Gene Ther.*

Zeng, X., Moore, T. A., Newstead, M. W., Deng, J. C., Kunkel, S. L., Luster, A. D. & Standiford, T. J. (2005). Interferon-inducible protein 10, but not monokine induced by gamma interferon, promotes protective type 1 immunity in murine *Klebsiella pneumoniae* pneumonia. *Infect Immun* **73**, 8226-8236.