

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



“EVALUACIÓN *IN SILICO* Y EXPERIMENTAL DE LA EFICACIA
INMUNOGÉNICA DE UNA VACUNA DNA-WT1 EN UN MODELO MURINO”

POR

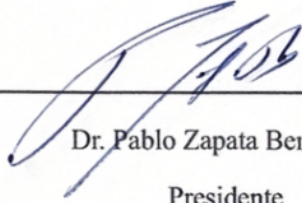
LBG. VIANEY JETZABEL DEL MERCADO GONZÁLEZ

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

2025

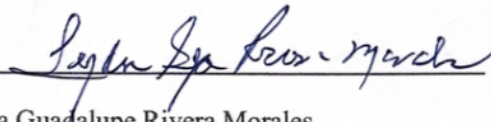
**“Evaluación *in silico* y experimental de la eficacia inmunogénica de una vacuna
DNA-WT1 en un modelo murino”**

Comité de Tesis



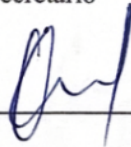
Dr. Pablo Zapata Benavides

Presidente



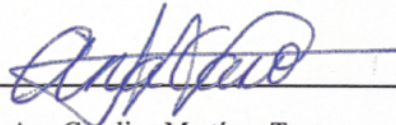
Dra. Lydia Guadalupe Rivera Morales

Secretario



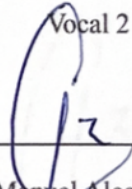
Dr. Moisés Franco Molina

Vocal 1



Dra. Ana Carolina Martínez Torres

Vocal 2



Dr. Juan Manuel Alcocer González

Vocal 2



Dra. Katiushka Arévalo Nájera

Subdirectora de Posgrado



SUBDIRECCIÓN
DE POSGRADO

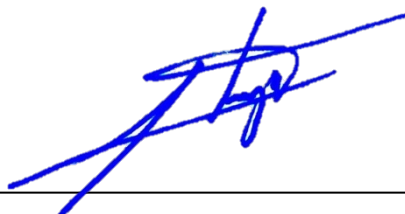
**“Evaluación *in silico* y experimental de la eficacia inmunogénica de una vacuna
DNA-WT1 en un modelo murino”**

Dirección de Tesis



Dr. Pablo Zapata Benavides

Director Interno



Dr. Santiago Saavedra Alonso

Asesor interno

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Humanidad, Ciencias y Tecnologías (CONAHCYT) por el apoyo económico para poder realizar mis estudios.

Al Laboratorio de Inmunología y Virología de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León y a la Dra. Cristina Rodríguez Padilla por permitirme realizar mis estudios en su organización

Agradezco al Dr. Pablo Zapata Benavides, por permitirme formar parte de su equipo de trabajo, por ser mi mentor en este paso de mi carrera profesional, por escucharme y aconsejarme, por darme animos cuando más lo necesitaba y por ser un gran ejemplo a seguir. Gracias por todas las enseñanzas que me ha brindado en este tiempo.

Al Dr. Santiago Saavedra Alonso, por siempre aconsejarme tanto en lo profesional como en lo personal. Por su paciencia y su amistad incondicional.

A mi comité de tesis: Dr. Moisés Franco, Dra. Ana Carolina Martínez, al Dr. Juan Manuel Alcocer y a la Dra. Lydia, por su apoyo en la realización de este proyecto, por aconsejarme y dar dirección a este trabajo.

Agradezco al Dr. Kenny Calvillo, al Dr. Alberto Valadez y a la Dra. Diana Caballero, que aunque no fueron parte de mi comité de tesis me ayudaron con sus consejos y apoyo con material para poder realizar este trabajo.

A Mara y Juan Pablo, las risas nunca faltaron! Gracias por su amistad, compañía y ayuda en el lab.

A mis compañeros: Ana, Jess, Daniel, Devany, Lenin, David, Adri. Que bonitos momentos pasamos juntos, por su compañía, por las risas, sus consejos y por hacer agradable este camino.

A mis compañeros del L-5: Rámses, Tafur, Jesús, Mony, Juan Manuel, Isaí, Fer, Pao, Rubén, Wendy, Luisa y a todos, por su apoyo cuando lo necesite y por crear un ambiente agradable de trabajo.

DEDICATORIA

*A mis padres **Azalia Isabel González Garza** y **Victor Alejandro Del Mercado González** por su amor y por su apoyo en todo lo que me propongo.*

*A mis hermanos, **Leah** y **Victor**, por escucharme y estar siempre conmigo.*

*A **Óscar**, por estar siempre presente, por motivarme a dar mi mayor esfuerzo, por tu amor y paciencia.*

*A mis mascotas: **Monty**, **Margu**, **Penny**, **Pelusa** y **Blue**, que me han acompañado en mis desvelos.*

¡Los amo!

ÍNDICE

RESUMEN	15
ABSTRACT	17
1. INTRODUCCIÓN	1
2. ANTECEDENTES	2
2.1 Cáncer	2
2.2 Etiología del cáncer	2
2.3 Cáncer de mama.....	3
2.3.1 Signos y síntomas.....	3
2.3.2 Clasificación.....	4
2.4 Epidemiología del cáncer de mama a nivel mundial.....	5
2.5 Epidemiología del cáncer de mama en México.....	6
2.6 Tratamiento	7
Tabla 3. Opciones de tatamientos típicos para las diferentes etapas de progresión del cáncer de mama. (Modificada de: Maughan et al., 2010)	7
2.6.1 Cirugía.....	8
2.6.2 Evaluación de los nódulos linfáticos	8
2.6.3 Radioterapia	9
2.6.4 Terapias sistemicas de adyuvantes	9
2.7 Respuesta inmune contra el cáncer de mama.....	10
2.8 Inmunoterapias contra el cáncer	12
2.9 Vacunas contra el cáncer	13
2.10 Vías de administración	15
2.11 Vacunas de DNA contra el cáncer.....	17
2.12 Gen de WT1	18
2.13 Función de WT1	20

2.14	WT1 como oncogén	20
2.15	WT1 como antígeno universal para inmunoterapias contra el cáncer	21
3.	<i>JUSTIFICACIÓN</i>	24
4.	<i>HIPÓTESIS</i>	25
5.	<i>OBJETIVO DEL TRABAJO</i>	26
	OBJETIVO GENERAL.....	26
	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	26
6.	<i>MATERIALES Y MÉTODOS</i>	27
6.1	Características y propiedades fisicoquímicas de la vacuna de DNA-WT1 27	
6.2	Análisis de la estructura secundaria de la vacuna de DNA-WT1.....	27
6.3	Predicción de los epitopos de MHC-I y MHC-II en la vacuna de DNA-WT1. 27	
6.4	Análisis de la cobertura poblacional	28
6.5	Estimulación del sistema inmune in silico.....	28
6.6	Vacuna de DNA de epítomos de WT1.....	28
6.7	Transformación de células calcio competentes con la vacuna de DNA de WT1 29	
6.8	Producción a gran escala de la vacuna de DNA-WT1	29
6.9	Cultivo celular	30
6.10	Determinación de la expresión de WT1 en la línea celular B16F10, 4T1 y K562 por medio de un PCR tiempo real.	30
6.11	Determinación de la expresión de WT1 en la línea celular B16F10, 4T1 y K562 por medio de un qPCR.	31
6.12	Transfección de la vacuna DNA-WT1 en la línea B16F10 en placa de 6 pozos 32	

6.13	Animales.....	33
6.14	Inmunización de los ratones Balb/c con la vacuna DNA-WT1 a través de la administración subcutánea.....	33
6.15	Sacrificio de animales	34
6.16	Especificidad antigénica de la inmunización subcutánea con DNA-WT1 en ratones Balb/c.....	34
A.	Citotoxicidad celular	34
7.	RESULTADOS	35
7.1	Identificación y predicción de los epítomos que se encuentran en la vacuna de DNA-WT1	35
7.2	Análisis de la estructura primaria y secundaria del constructo de la vacuna de DNA-WT1.....	39
7.3	Docking molecular del constructo de la vacuna de DNA-WT1 y la proteína de WT1 nativa.	40
7.4	Predicción de parámetros fisicoquímicos, antigenicidad y alergenicidad de la vacuna de DNA-WT1.....	41
7.5	Análisis de la cobertura población de los epítomos inmunogénicos de la vacuna de DNA-WT1	43
7.6	Perfil de la estimulación del sistema inmune de la vacuna de DNA-WT1. 44	
7.7	Caracterización de la vacuna DNA-WT1	46
7.8	Análisis de la expresión de la vacuna DNA-WT1 <i>in vitro</i>	47
7.9	Análisis de la expresión de WT1 en las líneas celulares 4T1, B16F10 y K562. 47	
7.10	Expresión relativa de WT1 en líneas celulares B16F10, 4T1 y K562.	48

7.11	Efecto citotóxico de los esplenocitos obtenidos a partir de los ratones inmunizados vía subcutánea en contra de las líneas celulares B16F10 y 4T1.	49
7.12	Análisis de la reducción de masa tumoral tras el implante de células 4T1 en ratones previamente inmunizados vía subcutánea.....	51
7.13	Evaluación de la seguridad del efecto de la vacuna DNA-WT1 tras la inmunización vía subcutánea.	52
7.	<i>DISCUSIÓN</i>	54
8.	<i>CONCLUSIÓN</i>	58
9.	<i>PERSPECTIVAS</i>	59
10.	<i>BIBLIOGRAFÍA</i>	60

ÍNDICE DE TABLAS

TABLA 1. TIPOS DE CARCINÓGENOS.....	2
TABLA 2. CATEGORÍAS DE LOS SUBTIPOS DE CÁNCER DE MAMA	5
TABLA 3. OPCIONES DE TATAMIENTOS TÍPICOS PARA LAS DIFERENTES ETAPAS DE PROGRESIÓN DEL CÁNCER DE MAMA	7
TABLA 4. MEDICAMENTOS UTILIZADOS PARA EL TRATAMIENTO DEL CÁNCER DE MAMA	10
TABLA 5. TIPOS GENERALES DE VACUNAS TERAPÉUTICAS EN INMUNOTERAPIA DEL CÁNCER.	14
TABLA 6. SECUENCIAS DE PRIMERS PARA DETERMINAR WT1	31
TABLA 7. CONDICIONES DE REACCIÓN PCR	31
TABLA 8. PREDICCIÓN DE ANTIGENICIDAD DE LOS EPÍTOPOS DE MHC CLASE I DE LA SECUENCIA DE LA VACUNA DE DNA-WT1.....	35
TABLA 9. PREDICCIÓN DE ANTIGENICIDAD DE LOS EPÍTOPOS DE MHC CLASE II DE LA SECUENCIA DE LA VACUNA DE DNA-WT1.....	37
TABLA 10. PROPIEDADES FÍSICOQUÍMICAS, ANTIGENICIDAD Y ALERGÉNICIDAD DE LA VACUNA DE DNA-WT1.....	42
TABLA 11. REPRESENTACIÓN DEL PORCENTAJE DE MASA DE LOS GRUPOS DE RATONES.....	53

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 1. ANATOMÍA DEL CÁNCER DE MAMA EN MUJERES	3
FIGURA 2. CLASIFICACIÓN TNM DEL CÁNCER DE MAMA	4
FIGURA 3. DISTRIBUCIÓN DE LA INCIDENCIA Y MUERTES POR CÁNCER DE MAMA A NIVEL MUNIDAL	6
FIGURA 4. ESQUEMA REPRESENTATIVO DE LA INCIDENCIA DEL CÁNCER DE MAMA DE LAS ENTIDADES EN MÉXICO EN 2022 EN MUJERES	6
FIGURA 5. ESQUEMA DE PRESENTACIÓN DE LAS CÉLULAS DEL SISTEMA INMUNE EN CONTRA DEL TUMOR	12
FIGURA 6. REPRESENTACIÓN GRÁFICA DE CUATRO TIPOS DE INMUNOTERAPIAS CONTRA EL CÁNCER DE MAMA	13
FIGURA 7. CICLO DE LA RESPUESTA INMUNE CONTRA EL TUMOR INDUCIDO POR LAS VACUNAS CONTRA EL CÁNCER	18
FIGURA 8. ESQUEMA DEL GEN Y PROTEÍNAS DE WT1	19
FIGURA 9. WT1 INVOLUCRADO EN LEUCEMOGÉNESIS Y TUMORIGÉNESIS	20
FIGURA 10. SOBREEXPRESIÓN DE WT1 EN LEUCEMIA Y OTROS TIPOS DE CANCERES SÓLIDOS.....	21
FIGURA 11. MAPA DEL PLÁSMIDO pCDNA3.1(+)	29
FIGURA 12. PLOT DE ANTIGENICIDAD DE LA SECUENCIA DE LA VACUNA DE DNA- WT1.....	35
FIGURA 13. ALINEAMIENTO DE LA SECUENCIA PEPTÍDICA DE LA VACUNA DNA-WT1.	38
FIGURA 14. ALINEAMIENTO DE LA SECUENCIA PEPTÍDICA DE LA PROTEÍNA DE WT1 MURINO Y DE HUMANO.....	39
FIGURA 15. GRÁFICO PREDICTIVO DE LA ESTRUCTURA SECUNDARIA DEL CONSTRUCTO DE LA VACUNA DE DNA-WT1	40
FIGURA 16. REPRESENTACIÓN TRIDIMENSIONAL DEL CONSTRUCTO VCUNAL DE DNA- WT1	40
FIGURA 17. MODELO TRIDIMENSIONAL DE SUPERFICIE DE LOS EPÍTOPOS DE MHC-I Y MHC-II EN WT1 NATIVO Y DE LA VACUNA DE DNA-WT1	41
FIGURA 18. COBERTURA POBLACIONAL GLOBAL DE LA VACUNA DE DNA-WT1	43

FIGURA 19. COBERTURA POBLACIONAL EN MÉXICO DE LA VACUNA DE DNA-WT1.....	44
FIGURA 20. SIMULACIÓN DE LA RESPUESTA INMUNITARIA DEL HUMANO TRAS LA INMUNIZACIÓN CON LA VACUNA DE DNA-WT1.	45
FIGURA 21. SECUENCIA DE AMINOÁCIDOS CODIFICADOS POR LA VACUNA DE DNA- WT1	46
FIGURA 22. CARACTERIZACIÓN DE LA VACUNA CON ENZIMAS DE RESTRICCIÓN ECORI Y XHOI.	46
FIGURA 23. EXPRESIÓN DE LA PROTEÍNA DE WT1 DE LA VACUNA DE DNA-WT1 Y WT1 NATIVA EN CÉLULAS DE MELANOMA MURINO B16F10	47
FIGURA 24. EXPRESIÓN DE WT1 EN LAS LÍNEAS CELULARES 4T1, B16F10, K562 POR RT-PCR	48
FIGURA 25. EXPRESIÓN RELATIVA DE WT1 EN LÍNEAS CELULARES B16F10, 4T1 Y K562 MEDIANTE UNA PCR TIEMPO REAL.....	48
FIGURA 26. IMÁGENES REPRESENTATIVAS DEL TAMAÑO DE LOS BAZOS EXTRAÍDOS DE RATONES INMUNIZADOS VÍA SUBCÚTAEA CON LOS DIFERENTES TRATAMIENTOS ..	50
FIGURA 27. EFECTO CITOTÓXICO DE ESLENOCITOS OBTENIDOS A PARTIR DE RATONES INMUNIZADOS EN CONTRA DE LAS CÉLULAS B16F10.	50
FIGURA 28. EFECTO CITOTÓXICO DE ESLENOCITOS OBTENIDOS A PARTIR DE RATONES INMUNIZADOS EN CONTRA DE LAS CÉLULAS 4T1.....	51
FIGURA 29. IMAGENES REPRESENTATIVAS DE LOS TUMORES DISECCIONADOS DE LOS GRUPOS DE RATONES BALB/C INMUNIZADOS Y RETADOS CON UN MODELO DE CÁNCER DE MAMA MURINO 4T1	52
FIGURA 30. CINÉTICA DEL PESO DE RATONES INMUNIZADOS	53

LISTA DE SIMBOLOS Y ABREVIATURAS

AAT	Antígeno asociado a tumor
BSA	Albúmina de suero bovino
°C	Grados Celsius
$CaCl_2$	Cloruro de calcio
CCDA	Citotoxicidad celular dependient de anticuerpos
CTL	Linfocito T citotoxico
CO_2	Dióxido de carbono
CPA	Células presentadoras de antígeno
DCs	Células dendríticas
DMEM	Medio de cultivo Eagle modificado de Bulbeco
DNA	Ácido desoxirribonucleico
ELISA	Ensayo de inmunoabosrción ligadoa enzima
FDA	Food and Drug Administration
g	Gramos
h	Hora
H_2O	Agua
HLA	Antígenos Leucocitarios Humanos
$IFN - \gamma$	Interferón gamma
IgG	Inmunoglobulina G
IgM	Inmunoglobulina M
IL	Interleucina
kb	Kilobases
kDa	Kilodalton
MHC	Complejo mayor de histocompatibilidad
min	Minuto

ml	Mililitro
μg	Microgramo
μl	Microlitro
μm	Micrómetro
mM	Milimolar
mRNA	Ácido ribonucleico mensajero
MTT	Bromuro de 3-(4,5-demetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol
NaCl	Cloruro de sodio
NK	Natural Killer
PBS	Amortiguador fosfato salino
PEI	Polietilenimina
pH	Potencial de hidrógeno
rpm	Revoluciones por minuto
SDS	Dodecil sulfato de sodio
SFB	Suero fetal bovino
TBS	Amortiguador tris salino
TCR	Receptor de células T
TGF-β	Factor de crecimiento transformante beta
Th	Linfocito T cooperador
V	Volt
x g	Gravedades
WT1	Proteína del tumor de Wilm's 1

RESUMEN

El cáncer de mama, es una enfermedad la cual se le atribuye el primero lugar en muertes en el sexo femenino. En el 2020, aproximadamente 2,3 millones de mujeres fueron diagnosticadas dentro de las cuales 685,000 fallecieron a esta causa ese mismo año. En la actualidad, la terapia convencional disminuye la calidad de vida del paciente debido a la citotoxicidad y efectos secundarios que se puedan presentar en el individuo. Las vacunas actuales dirigidas contra WT1 son de tipo peptídicas y su principal desventaja es que están restringidas a un HLA específico, por lo que la población que podría beneficiarse es restringida. La presente investigación evalúa una vacuna de DNA dirigida contra el antígeno tumoral WT1, expresado en diversas neoplasias. Se analizaron características bioinformáticas, destacando propiedades fisicoquímicas, epítomos inmunogénicos y cobertura poblacional, así como su potencial para inducir una respuesta celular y humoral. Primero, el constructo vacunal DNA-WT1 demuestra potencial inmunogénico robusto mediante la integración de epítomos de alta antigenicidad validados por VaxiJen e IEDB. Se identificaron cuatro epítomos de MHC-I y tres de MHC-II homólogos a los de murino con elevada afinidad por alelos HLA, destacando su capacidad para activar células T CD8+ y CD4+. El análisis de la cobertura poblacional estimada alcanza el 99.26% global y el 98.37% en México, atribuible a la inclusión de epítomos compatibles con alelos prevalentes en esta población (HLA-A*02, HLA-B*35:01, HLA-B*40:02, HLA-DRB1*04:07). Mientras que el análisis estructural reveló que los epítomos se localizan en regiones superficiales accesibles de la proteína, facilitando su procesamiento por células presentadoras de antígeno, predominando una estructura desordenada que le confiere flexibilidad funcional que potencia su interacción con el sistema inmune, aunque podría modular su estabilidad térmica. Así mismo, su perfil bioquímico óptimo (pI 9.26) y la ausencia de alergenicidad y toxicidad predicen estabilidad y seguridad para aplicaciones preclínicas. Además, se realizó una simulación *in silico* que evidenció una activación del sistema inmune, ya que se observó una transición de IgM a IgG1/IgG2, proliferación sostenida de linfocitos T CD8+ y secreción de IFN- γ /IL-2, así como generación de células T de memoria y activación de células presentadoras de antígenos. Por último, la validación experimental confirmó la

integridad estructural del plásmido a través de una digestión enzimática y la expresión funcional del antígeno (25-30 kDa) en la línea celular B16F10.

ABSTRACT

Breast cancer represents the leading cause of cancer-related mortality among women globally. In 2020, approximately 2.3 million women were diagnosed with this malignancy, resulting in 685,000 deaths within the same year. Conventional therapies often compromise patient quality life due to inherent cytotoxicity and adverse side effects. Current peptide-based vaccines targeting WT1 face limitations from HLA restriction, narrowing their applicability to specific populations. To address these limitations, we developed a DNA vaccine targeting WT1 antigen and conducted comprehensive bioinformatic and experimental characterization. Our findings demonstrate that the DNA-WT1 construct exhibits robust immunogenicity through integrated epitopes validated by VaxiJen and IEDB, comprising four MHC-I and three murine-homologous MHC-II epitopes with high HLA affinity, enabling CD8⁺ and CD4⁺ T cell- activation. Crucially, projected population coverage reaches 99.26% globally and 98.37% in Mexico, attributable to inclusion of prevalent HLA alleles (HLA-A*02, HLA-B*35:01, HLA-B*40:02, HLA-DRB1*04:07). Structural analyses further confirmed epitopes positioned on accessible surface regions, facilitating antigen processing by APCs. A predominantly disordered conformation enhances immune interaction through structural flexibility, albeit with potential thermal stability trade-offs. Complementary biochemical profiling revealed optimal properties (pI 9.26, negative GRAVY, solubility) and absence of allergenicity and toxicity, supporting preclinical safety. In silico immune simulations predicts potent immunity, class switching from IgM to IgG/IgG2, sustained CD8⁺ T-cell proliferation, Th1-polarizing IFN- γ /IL-2, and memory T-cell generation. Experimental validation subsequently confirmed plasmid integrity thorough restriction enzyme digestion and functional 25-30 kDa antigen expression of B16F10 melanoma cells, collectively positioning DNA-WT1 as a viable preclinical candidate for broad-coverage cancer immunotherapy.

1. INTRODUCCIÓN

El cáncer es una enfermedad multifactorial originada en cualquier tejido u órgano del cuerpo y que ha sido reportada como la segunda causa de muerte seguida de las enfermedades cardiovasculares. La causa fundamental en todos los cánceres inicia por el daño genético, el cual es usualmente adquirido; sin embargo, a veces es heredado. Esta desregulación genética causa una proliferación celular incontrolada como resultado de la activación de oncogenes promotores de crecimiento y la inactivación de genes supresores del crecimiento tumoral.

En la actualidad, la comunidad científica se encuentra investigando terapias alternativas para diversos tipos de cáncer ya que las terapias utilizadas comúnmente presentan pocos resultados favorables, además de presentar diversos efectos citotóxicos que pueden empeorar la calidad de vida. Es por esto que las vacunas terapéuticas son una alternativa que pueden adaptarse a pacientes individuales en función de la composición genética y a su perfil de antígenos específicos, permitiendo un tratamiento personalizado y preciso. Dentro de estas alternativas se encuentra el uso de antígenos a través de la aplicación de una vacuna de DNA. Esta clase de vacunas introducen el plásmido el cual codifica para algún antígeno asociado a tumor (TAAs) en la célula hospedera para activar la respuesta inmune celular y eliminar las células cancerígenas a través de los linfocitos CD8⁺ citotóxicos. Estudios recientes catalogan a WT1 como un antígeno prometedor en la inmunoterapia contra el cáncer. WT1 es un gen que se encuentra en tejidos normales, pero en neoplasias se encuentra altamente expresado en leucemias y distintos tumores sólidos, por ello se le puede considerar como un antígeno universal.

Este trabajo se enfoca en un análisis integral de la vacuna de DNA-WT1, abordando su diseño bioinformático hasta la evaluación de su capacidad para inducir una respuesta inmune específica contra WT1 en un modelo murino. Se exploran sus propiedades fisicoquímicas, la capacidad de sus epítomos de inducir una respuesta inmunológica y el potencial inmunogénico de la vacuna de DNA-WT1 *in silico* e *in vivo*. Este enfoque multidimensional busca aportar evidencia preclínica sobre su eficacia como herramienta inmunoterapéutica.

2. ANTECEDENTES

2.1 Cáncer

El cáncer es una enfermedad multifactorial que genera una masa anormal de tejido como resultado de la expansión clonal de un precursor celular que ha tenido un daño genético. Este daño genético puede ser heredado, adquirido por exposición a agentes químicos, radiación, microorganismos o una combinación de estos.

2.2 Etiología del cáncer

La causa fundamental en todos los cánceres es el daño genético, el cuál es usualmente adquirido sin embargo a veces es heredado. Esta desregulación genética causa una proliferación celular incontrolada como resultado de la activación de oncogenes promotores de crecimiento y/o la delección o inactivación de genes supresores del crecimiento tumoral (Yang et al., 2007; Hill, 2019). Existen varios factores que pueden inducir daño genético conocidos como carcinógenos y son representados en la siguiente tabla:

Tabla 1. Tipos de carcinógenos. (Modificado de https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-3-030-04489-3_2).

Químico	Radiación	Infeccioso	Dieta	Iatrogénico
Ocupacional Arsénico Asbesto Alquitranes de hulla Hollín Benceno Cloruro de vinilo	Luz UV Rayos X Rayos gamma Radiación nuclear	Virus VPH VEB KSHV HTLV-1 HEP B/C	Grasa Calorías Baja fibra	Radiación Inmunosupresión Quimioterapia
Conductal Tabaco Alcohol		Bacteria <i>H. pylori</i> <i>C. pisstaci</i>		
		Hongo <i>A.flavus</i>		
		Parasito <i>Schistosoma</i> <i>Clonorchis</i>		

2.3 Cáncer de mama

La enfermedad del cáncer de mama es un tipo de cáncer con diversas presentaciones en mujeres y es originada en un 85% en células epiteliales de los conductos y en el restante 15% de los casos en los lobullos del tejido glandular de los pechos. Al inicio, cuando el tumor es localizado, es conocido como “*in situ*”, sin embargo, a medida que progresa esta enfermedad puede invadir el tejido mamario alrededor hasta extenderse a los ganglios linfáticos, causando un fenómeno conocido como metástasis regional o metástasis distante cuando afecta a otros órganos como el pulmón y cerebro, llegando a provocar la muerte del paciente (OMS, 2021).

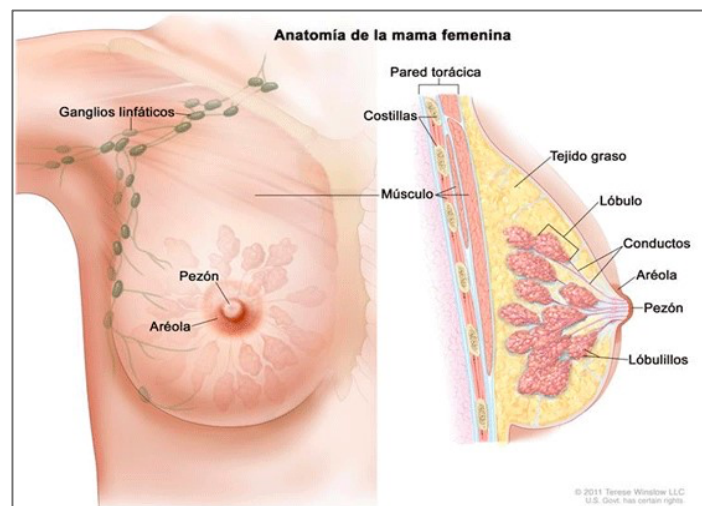


Figura 1. Anatomía del cáncer de mama en mujeres. (Imagen tomada de: <https://seom.org/125Informaci%C3%B3n%20al%20P%C3%BAblico%20-%20Patolog%C3%ADas/cancer-demama>)

2.3.1 Signos y síntomas

El cáncer de mama a comparación con otros tipos de cánceres, no es una enfermedad infecciosa o transmisible, ya que no hay evidencia si existen infecciones por virus o bacterias que puedan estar relacionadas con la aparición de dicho tipo de cáncer (OMS, 2021).

El síntoma más frecuente que se puede presentar en esta enfermedad, es la aparición de una masa que no presenta dolor, es dura con bordes irregulares, sin embargo, estas masas también pueden ser suaves, redondas, blandas o dolorosas en algunos casos. Otros posibles síntomas son los siguientes: hinchazón en todo el pecho o en alguna parte de este (aunque no haya una masa/bulto), presencia de hoyuelos en el seno, dolor en el pecho o en el pezón, secreción o cambios en el aspecto del pezón e hinchazón de los nódulos linfáticos abajo del brazo o cerca de la clavícula (American Cancer Society, 2022).

2.3.2 Clasificación

El sistema de clasificación TNM fue sugerido por el Instituto Europeo de Oncología (EIO, por sus siglas en inglés) como un esfuerzo para incluir las características tumorales. En este sistema, las propiedades anatómicas y biológicas como los receptores hormonales RE y RP (receptor de estrógenos y receptor de progesterona, respectivamente) y HER-2 (Receptor del factor de crecimiento epidermal 2) son incluidos. La clasificación es la siguiente:

CLASIFICACION TNM CÁNCER MAMARIO		ESTADIFICACION TNM			
T = Tumor					
Tx	: Tumor desconocido	Estadio 0	=	Tis	N0 M0
To	: Sin evidencias de tumor primario	Estadio I	=	T1	N0 M0
Tis	: Carcinoma <i>in situ</i> (CDIS - CLIS - Paget no asociado tumor)	Estadio II A	=	T0	N1 M0
T1	: Tumor de 2 cm o menos en su diámetro mayor			T1	N1 M0
T1 mic	: Microinvasión menor de 0,1cm en su diámetro mayor			T2	N0 M0
T1a	: Tumor de 0,5 cm o menos	Estadio II B	=	T2	N1 M0
T1b	: Tumor mayor de 0,5 cm y hasta 1 cm			T3	N0 M0
T1c	: Tumor mayor de 1 cm y hasta 2 cm	Estadio III A	=	T0	N2 M0
T2	: Tumor mayor de 2 cm y hasta 5 cm			T1	N2 M0
T3	: Tumor mayor de 5 cm			T2	N2 M0
T4	: Tumor de cualquier tamaño con extensión a pared torácica o a piel			T3	N1 M0
T4a	: Extensión a pared torácica			T3	N2 M0
T4b	: Piel con edema, ulceración o nódulos satélites en la mama	Estadio III A	=	T4	N0 M0
T4c	: Suma de a + b			T4	N1 M0
T4d	: Cáncer inflamatorio			T4	N2 M0
		Estadio III B	=	Cualquier T N3 M0	
		Estadio IV	=	Cualquier T + cualquier N + M1	

Figura 2. Clasificación TNM del cáncer de mama. (Imagen tomada de: <http://revistas.uach.cl/html/cuadcir/v22n1/body/art09.htm>)

En base a la evidencia molecular e histológica, esta enfermedad se puede clasificar en tres grupos: cáncer de mama con expresión de receptores hormonales receptor de estrógeno

positivo (RE+) o receptor de progesterona positivo (RP+), cáncer de mama con expresión de receptor epidérmico humano 2 (HER2+) y cáncer de mama triple negativo (CMTN) (RE-, RP-, HER2-). Esta clasificación molecular sirve para brindar un tratamiento adecuado para el paciente.

Tabla 2. Categorías de los subtipos de cáncer de mama. (Modificado de: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1567576920304768?via%3Dihub>)

Subtipo de cáncer de mama	Perfil del receptor	Prevalencia del subtipo	Subcategorías
Receptor hormonal positivo	RE+ o RP+	60%	Luminal A y B
HER2 positivo (HER2+)	HER2+	20%	-
Cáncer de mama triple negativo	RE-, RP-, HER2-	10-20%	BL-1, BL-2, inmunomodulatorio (IM), mesenquimal (M), células similares a células madre (MSL) y receptor andrógeno luminal (LAR).

2.4 Epidemiología del cáncer de mama a nivel mundial

En las ultimas decadas, el cáncer de mama es uno de los tipos de cánceres mayormente diagnosticados a nivel mundial, tan solo en el año 2020 se diagnosticaron 2.3 millones de casos de cáncer de mama en mujeres y 685,000 defunciones a causa de esta enfermedad, representando un cuarto de los casos de cáncer en mujeres en el este de Asia, seguido de Norte América (12.5%), Asia Central Sur (11.3%) y el Oeste de Europa (7.5%) (Arnold. M. et al. 2022).

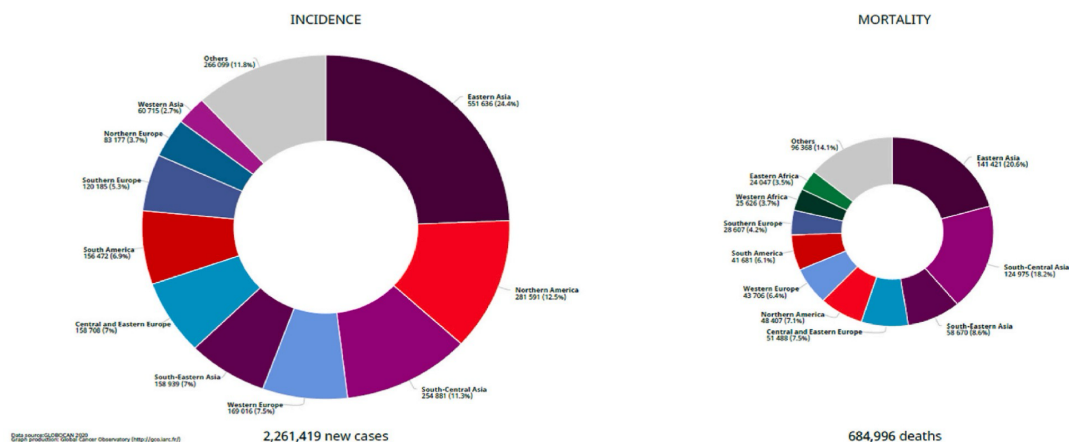


Figura 3. Distribución de la incidencia y muertes por cáncer de mama a nivel mundial. (Imagen tomada de Arnold. M. et al. 2022)

2.5 Epidemiología del cáncer de mama en México

En México, se reportaron alrededor de 23,790 casos nuevos de cáncer de mama en una población mayor de 20 años, representando una incidencia de 27.64 por cada 100,000 habitantes. Alrededor de los 87,880 casos (9%) de las muertes atribuidas por tumores malignos en México se le atribuyen al cáncer de mama aproximadamente 7,888 casos.

A partir de estas cifras, las mujeres representan el 99.4% (7,838) en comparación con los hombres en un 0.6% (50) de los casos (INEGI, 2023).

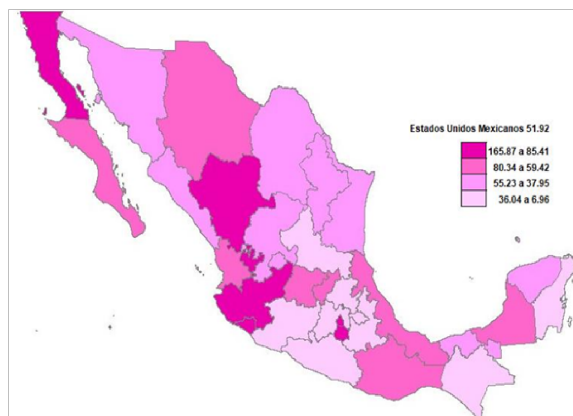


Figura 4. Esquema representativo de la incidencia del cáncer de mama de las entidades en México en 2022 en mujeres. (Imagen tomada de: https://www.inegi.org.mx/contenidos/saladeprensa/aproposito/2023/EAP_CMAMA23.pdf).

2.6 Tratamiento

Debido a la alta tasa de incidencia y mortalidad por cáncer de mama, la detección y tratamiento en una etapa temprana pueden permitir un alto porcentaje de supervivencia del paciente hasta un 90%. El pronóstico y los tratamientos para el cáncer de mama generalmente se basan en su etapa de progresión, la expansión linfocascular, el grado histológico, el estado de los receptores hormonales, la sobreexpresión de ERBB2 (HER2/neu), las comorbilidades, el estado menopáusico de la paciente y la edad (Maughan et al., 2010). La siguiente tabla muestra las opciones de tratamiento aplicadas en las diferentes etapas de esta enfermedad:

Tabla 3. Opciones de tratamientos típicos para las diferentes etapas de progresión del cáncer de mama. (Modificada de: Maughan et al., 2010)

Terapia adyuvante					
Etapas de cáncer y tipo	Tratamiento primario	Evaluación del nódulo	Receptor hormonal negativo	Receptor hormonal	Sobreexpresión ERBB2 positivo
Etapas 0: <i>in situ</i>					
Carcinoma lobular <i>in situ</i>	Sin tratamiento o considerar profilaxis con tamoxifeno	-	-	-	-
Carcinoma ductal <i>in situ</i>	Cirugía para conservar mamas (considerar mastectomía en caso de ser extenso o multifocal) y radioterapia	-	-	-	-
Etapas I y II: etapas tempranas invasivas	Cirugía de conservación de mamas y radioterapia.	Biopsia SLN o disección ALN	Quimioterapia	Quimioterapia y terapia endócrina	Quimioterapia y trastuzumab (Herceptina)
Etapas III: Localmente avanzadas					

No inflamatoria	Inducción de quimioterapia seguido de cirugía de conservación de mamas y radioterapia	Disección ALN o biopsia SLN	Inducción de quimioterapia	Inducción de quimioterapia y terapia endocrina post-operación	Inducción de quimioterapia y trastuzumab post operación.
Inflamatoria	Inducción de quimioterapia, seguido de masectomia y radioterapia.	Disección ALN			
Etapas IV: Metastasis inicial o recurrente	Tomar en consideración las metas de tratamiento del paciente; radioterapia o bisfosfonatos para el dolor de huesos	-	Quimioterapia	Terapia endocrina con o sin quimioterapia	Trastuzumab con o sin quimioterapia

2.6.1 Cirugía

Durante las etapas I y II, la mastectomía radical modificada ha sido utilizada tradicionalmente. Sin embargo, las cirugías para conservar el seno han sido más favorables. Esta cirugía implica remover el tumor sin extraer tejido sano de la mama y suele ser más estética para el paciente en comparación con la masectomía radical. Posterior a la cirugía, se realiza una terapia de radiación para disminuir la recurrencia total y mejorar la supervivencia del paciente, obteniendo resultados equivalentes a los de la masectomia. No obstante, este tipo de cirugía no se recomienda en pacientes con una tasa alta de recurrencia (Clarke et al., 2005).

2.6.2 Evaluación de los nódulos linfáticos

El estado de los nódulos linfático-axilares (ALNs, por sus siglas en inglés) determinará si el paciente requiere terapia de radiación y terapia adyuvante sistémica. La biopsia del nódulo linfático centinela reduce el dolor en el brazo del paciente en comparación con la

dissección del ALN, que generalmente ocasionaba molestias, hinchazón y una disminución de la movilidad en el brazo afectado (Mansel et al., 2006; Maughan et al., 2010).

2.6.3 Radioterapia

Típicamente la radiación en la totalidad de la mama se realiza post cirugía de conservación de la mama. Este tipo de terapia, junto con la cirugía reduce significativamente el riesgo de recurrencia hasta por 5 años. Sin embargo, la radiación suele ser costosa y consume mucho tiempo, por lo que otros tipos de terapias de menor duración suelen ser más atractivas (Clarke et al., 2005).

2.6.4 Terapias sistémicas de adyuvantes

La mayoría de las mujeres en etapas tempranas de cáncer de mama suelen recibir este tipo de terapia. La quimioterapia, la terapia endocrina y terapias dirigidas al tejido mejoran la terapia local definitiva, disminuyendo la recurrencia de esta enfermedad (Maughan et al., 2010).

La quimioterapia es el estándar para las mujeres con cáncer de nódulo positivo o con un tumor mayor a 1 cm. Sin embargo, existen otros factores para decidir si es una terapia óptima, por ejemplo, la edad y las comorbilidades, que también influyen en la decisión. Dentro de la quimioterapia se utilizan las antraciclinas y taxanos (Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group (EBCTCG), 2005).

En la terapia endocrina, los SERMs, inhibidores de aromatasas y agnistas de la hormona liberadora de gonadotropinas previenen la producción de estrógeno o bloquean su acción, evitando la estimulación de tumores sensibles al estrógeno. Los inhibidores de aromatasas están indicados en mujeres menopáusicas con receptores hormonales positivos con el objetivo de bloquear la conversión de andrógenos a estrógenos (Goldhirsch et al., 2007; Maughan et al., 2010).

Por último, las terapias dirigidas al tejido se utilizan aproximadamente en el 20-30% de los casos de etapas tempranas de cáncer de mama que sobreexpresan HER-2 (ERBB2 o HER2/neu) (Maughan et al., 2010). Generalmente, este tipo de cáncer tienen un peor

prognóstico. En esta terapia se emplea un anticuerpo monoclonal anti-ERBB2 conocido como trastuzumab (Herceptin) (Romond et al., 2005; Smith et al., 2007).

Tabla 4. Medicamentos utilizados para el tratamiento del cáncer de mama.

(Modificado de:

<https://www.aafp.org/pubs/afp/issues/2010/0601/p1339.pdf>)

Tipo de terapia	Medicamento
Quimioterapia	Antraciclinas
	Doxorubicina (Adriamicina)
	Epirubicina (Ellence)
	Taxanos
	Docetaxel
	Paclitaxel
Endocrina	Inhibidores de aromatasa
	Anastrozol (Arimidex)
	Exemestano (Aromasin)
	Letrozol (Femara)
	Agonistas de la hormona liberadora de gonadotropinas
	Goserelina (Zoladex)
	Moduladores selectivos de receptores de estrógeno (SERMs)
Dirigidos al tejido	Tamoxifeno
	Anticuerpos monoclonales
	Trastuzumab (Herceptin)

2.7 Respuesta inmune contra el cáncer de mama

La inmunidad antitumoral es una línea de defensa presente en nuestro cuerpo para combatir tumores y esta compuesta por la respuesta innata y la adaptativa. La respuesta innata consiste en células Natural Killer (NK), que atacan el tumor primario. Según

DeNardo y colaboradores, estas células podrían estar involucradas en la prevención de neoplasias antes de desarrollarse por completo a tumores.

En la respuesta adaptativa, se encuentran células T citotóxicas (conocidas como CTLs, por sus siglas en inglés), que atacan al tumor, aunque otras células del sistema inmune adaptativo como las células B, tienen funciones duales en el microambiente tumoral del cáncer de mama, ya que puede promover la progresión tumoral o prevenirla (Amens et al., 2021).

Los linfocitos T citotóxicos CD8⁺ son células que desempeñan un papel importante en la respuesta antitumoral. Las células presentadoras de antígenos (APCs) presentan el antígeno en su superficie para activar a las CTLs. Estas actúan a través de los ligandos Fas/FasL, uniéndose a la superficie de la célula objetivo para desencadenar un proceso apoptótico (Hassin et al., 2011).

En cambio, las células B actúan mediante la secreción de anticuerpos o inmunoglobulinas, así como de citocinas. El rol de las células B en el cáncer de mama es bilateral, ya que pueden secretar citocinas que inhiben a los CTLs antitumorales o promover la inmunidad antitumoral (Schwartz et al., 2016). Además, pueden contribuir en la progresión del cáncer de mama hacia metástasis. Olkahuand y colaboradores demostraron que las células B convierten a las CD4⁺ (células T-helper) en T reguladoras, lo cual lleva a metástasis y, que la inactivación de las células B promueve la inhibición de la metástasis en un modelo murino de adenocarcinoma de mama.

Por lo tanto, estos hallazgos sugieren que las células B actúan en la inmunidad antitumoral en las etapas tempranas del cáncer de mama, pero una vez que la enfermedad progresa, las células B se vuelven tumorigénicas y promueven la metástasis (Lee-Chang et al., 2013; Nazir et al., 2019).

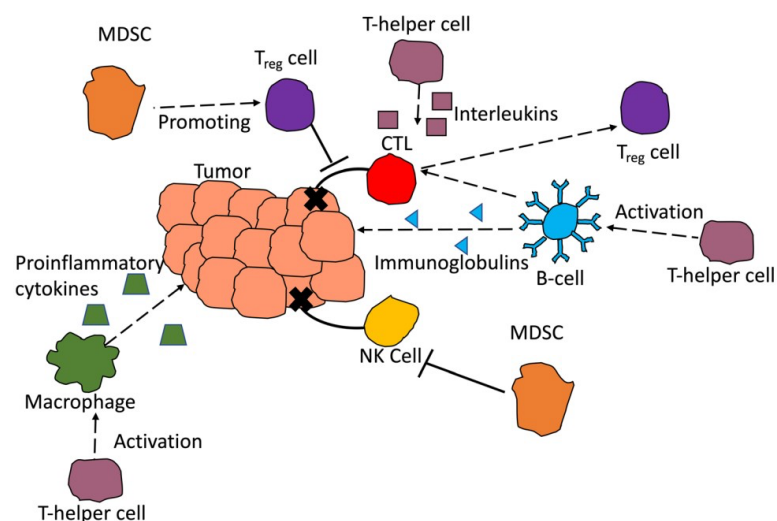


Figura 5. Esquema de presentación de las células del sistema inmune en contra del tumor. (Imagen tomada de Amens, J. et al. 2021)

2.8 Inmunoterapias contra el cáncer

Como se mencionó previamente, los tratamientos comúnmente utilizados para el cáncer de mama son la intervención quirúrgica, la radioterapia, la quimioterapia y la terapia de reemplazo hormonal. Estos se aplican en casos de cáncer de mama no invasivos y no metastásicos. Por ello, el objetivo de las inmunoterapias es encontrar un método que pueda dirigirse al cáncer de mama invasivo y metastásico. Varias de estas inmunoterapias son experimentales y se encuentran en ensayos clínicos para comprobar su eficacia y su seguridad. Los métodos aplicados para el desarrollo de inmunoterapias se presentan en la Figura 6.

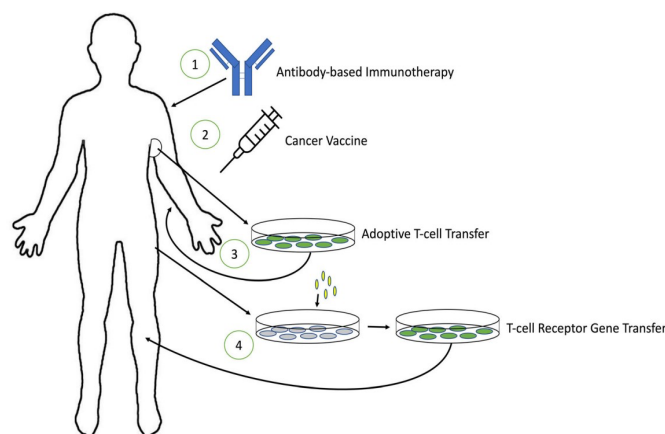


Figura 6. Representación gráfica de cuatro tipos de inmunoterapias contra el cáncer de mama. Imagen tomada de Amens, J. et al. 2021).

2.9 Vacunas contra el cáncer

Actualmente, las vacunas para cáncer se han clasificado en dos grupos: preventivas y terapéuticas. Las vacunas preventivas protegen a los individuos en riesgo de desarrollar tipos específicos de cáncer, particularmente aquellos ocasionados por virus (Tojjari et al., 2023). Algunos ejemplos que pertenecen a esta categoría son las vacunas contra el virus de hepatitis B (VHB) y contra el virus de papiloma humano (VPH), que han demostrado en estudios la prevención del cáncer de hígado y cervicouterino (Schiller & Lowy, 2012).

Por otra parte, las vacunas terapéuticas están diseñadas para pacientes que ya han sido diagnosticados con cáncer. Estas vacunas mejoran la capacidad de la respuesta inmune para identificar y atacar a las células cancerosas, lo que resulta en una regresión o control tumoral. Su objetivo principal es fortalecer la respuesta inmune contra los tumores, por lo que se consideran una opción de tratamiento potencial para los pacientes (Tojjari et al., 2023).

Las vacunas terapéuticas pueden adaptarse a pacientes individuales en función de su composición genética y su perfil de antígenos específicos, permitiendo un tratamiento personalizado y preciso. Estas vacunas pueden subdividirse según su origen, incluyendo vacunas basadas en péptidos, células dendríticas, vectores virales y vacunas basadas en DNA y mRNA. A continuación, se muestra un resumen de las vacunas terapéuticas:

Tabla 5. Tipos generales de vacunas terapéuticas en inmunoterapia del cáncer.

(Modificado de: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC10459477/>).

Tipo de vacuna	Mecanismo	Ventajas	Limitaciones
Vacunas basadas en péptidos	Los péptidos inician una respuesta inmune enfocada contra antígenos asociados a tumor (TAAs) en la superficie de células cancerosas.	Alta especificidad reduce el riesgo de efectos no deseados y reacciones autoinmunes. Proceso de producción sencillo.	La heterogeneidad clonal significativa del tumor permite que algunas células cancerosas sin el antígeno diana escapen de la detección inmunitaria.
Vacunas de células dendríticas (DC)	Las células dendríticas capturan y procesan los antígenos de células tumorales y se las presentan a las células T.	Ofrece un enfoque prometedor como inmunoterapia contra el cáncer con resultados clínicos. Puede complementar o mejorar las terapias contra el cáncer existentes.	Los desafíos incluyen identificar los TAAs específicos a tumores individuales y mejorar la migración de las DCs a los ganglios linfáticos. Además, otra limitación es contrarrestar la inmunosupresión inducida por tumores.
Vacunas basadas en vectores virales	Los vectores virales transportan antígenos relacionados al cáncer al sistema inmune.	Demuestra un potencial considerable en la inmunoterapia contra el cáncer en estudios preclínicos y clínicos.	Requiere de continua investigación y ensayos clínicos para entender su potencial y evaluar su efectividad terapéutica en diferentes tipos de cáncer.
Vacunas de DNA	Las vacunas de ADN introducen el plásmido codificando el TAAs en la célula hospedera.	Tiene eficiencia potencial contra varios tipos de cáncer.	Se requiere de más investigación para la optimización del diseño, método de entrega y, estrategias adyuvantes. Integración con otro enfoque terapéutico o tratamientos tradicionales pueden ser requeridos.

Vacunas de mRNA	Las vacunas basadas en ARNm instruyen a la célula hospedera a producir proteínas específicas asociadas a cáncer o antígenos	Muestra potencial en la prevención y tratamiento de varios tipos de cáncer.	Requiere de más investigación y ensayos clínicos necesarios para evaluar la seguridad, eficacia y aplicación clínica en diferentes tipos de pacientes con cáncer.
Vacunas de lisis celular en cáncer	Los lisados celulares proporcionan una gran cantidad de antígenos tumorales y permite estimular una respuesta inmune cuando se incorporan a una vacuna.	Puede prevenir el agotamiento de las células T y NK inducido por el cáncer. El lisado de células tumorales completas pueden provocar respuestas inmunitarias específicas de antígeno más fuertes.	Se necesita de preparación cautelosa para asegurar que los antígenos pueden desencadenar una respuesta inmunitaria y no sean destruidas en el proceso.
Terapia celular adoptiva/Vacunas	Las células de la respuesta inmune del paciente son alteradas genéticamente para identificar y combatir antígenos de cáncer específicos.	Prometedora en el desarrollo de vacunas terapéuticas contra el cáncer. Las vacunas basadas en péptidos son una estrategia innovadora dentro de este enfoque.	La identificación de los antígenos más eficaces a atacar y el potencial de efectos fuera del objetivo son desafíos que evaluar.

2.10 Vías de administración

Un aspecto relevante para lograr un potencial inmunológico adecuado y la supervivencia del antígeno que se plantea utilizar es la vía de administración (Arriaga, Daniela, 2016).

Según los Centros de Control y Prevención de Enfermedades (CDC, por sus siglas en inglés) existen cinco rutas diferentes para la aplicación de las vacunas.

Dentro de estas, la comúnmente utilizada es la inyección subcutánea o intradérmica. La desviación de la aplicación de alguna de estas puede reducir la eficacia de la vacuna o incrementar el riesgo de reacciones adversas locales. La forma en la que se decide si aplicarla subcutánea o intradérmica depende en parte de la inclusión de adyuvantes en algunas de estas vacunas. El adyuvante es un compuesto que mejora la respuesta inmune al antígeno, sin embargo, es fundamental seleccionar adecuadamente el adyuvante para minimizar los posibles riesgos de reacciones adversas (CDC, 2023)

La administración de la vacuna vía oral es una estrategia inmunotérapuetica potencial para mejorar la respuesta antitumoral ante el cáncer. Esta vía de administración activa la respuesta inmune, Particularmente en relación con la prevención de carcinogénesis a través de la involucreción de la mucosa intestinal. El tracto intestinal es ampliamente reconocido como el sitio inmunológico principal en el cuerpo humano (Islam et al., 2019). Sin embargo, la administración de vacunas contra el cáncer vía oral sigue siendo una esperanza en la práctica clínica actualmente (Gambirasi et al., 2023). Alguna de las vacunas que se administran vía oral en Estados unidos son contra rotavirus, adenovirus, la vacuna de colera y vacunas orales contra la fiebre tifoidea (CDC, 2023).

La inmunización a través de las mucosas es una vía de inmunización atractiva ya que los pulmones son un portal importante para la entrada de patógenos. Se ha observado que la inmunización pulmonar genera una respuesta de Th1 en varios modelos animales (Reina et al., 2008; Wayne Conlan et al., 2005), es por esto que es una estrategia prometedora para el uso de vacunas de DNA. En años recientes se ha reportado que la formulación de un plásmido de ADN con PEI (Polietilenimina) mejora la expresión transgénica y la respuesta del celular T-CD8⁺ a través de la inmunización pulmonar pero no en inmunización intramuscular (Bivas-Benita et al., 2010).

2.11 Vacunas de DNA contra el cáncer

Con base en los tipos de vacunas (Tabla 5), las vacunas a base de DNA se consideran una inmunoterapia prometedora para combatir el cáncer. Primero, se introduce el plásmido que codifica los antígenos asociados a tumores en el hospedero, lo que permite la producción del antígeno diana y desencadena una respuesta inmunológica contra la célula tumoral que exprese dicho antígeno (Tojjari et al., 2023). Las vacunas de DNA suelen ser específicas y seguras, con un costo de producción bajo y facilidad de transporte y almacenamiento. Otra ventaja es su baja tasa de mutación en comparación con las mutaciones espontáneas, por lo que es poco común que se integren al cromosoma del hospedero.

Este tipo de vacuna desencadena una respuesta a través de las células presentadoras de antígenos, que activan el sistema inmune al estímulo del antígeno tumoral. Las células dendríticas (DCs, por sus siglas en inglés) actúan como un puente de comunicación para la activación de células del sistema inmune innato y adaptativo. Una vez que estas células capturan al antígeno, migran hacia los ganglios linfáticos, donde se encuentran las células T. Las células dendríticas maduras presentan los epítopos mediante el complejo mayor de histocompatibilidad de clase I y II a las CD8⁺ y CD4⁺ respectivamente; además, secretan IL-12 e interferón- γ (IFN- γ) para aumentar el efecto coestimulador (Roberts et al., 2016; Wculek et al., 2020). Esto desencadena la diferenciación hacia células T de memoria y efectoras, que se amplifican y se desplazan hacia el microambiente tumoral para eliminarlo mediante su efecto citotóxico y la producción de citocinas efectoras.

Las células B también desempeña un papel importante en la inducción de apoptosis de las células tumorales, a través del efecto citotóxico dependiente de anticuerpos (ADCC) o de la citotoxicidad dependiente del complemento (Liu et al., 2022).

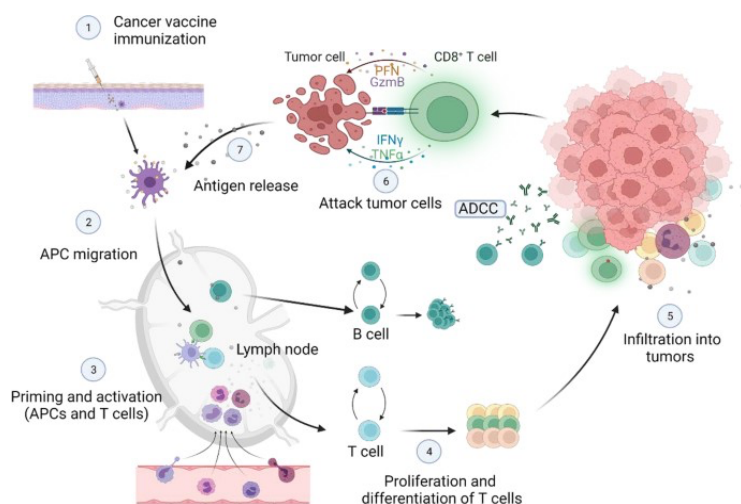


Figura 7. Ciclo de la respuesta inmune contra el tumor inducido por las vacunas contra el cáncer. (Imagen tomada de:

<https://jhoonline.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13045-02201247-x>)

2.12 Gen de WT1

El gen del tumor de Wilm's 1 (WT1) fue identificado por primera vez como un gen mutado esporádico en algunos casos de tumor de Wilms, una neoplasia maligna del riñón que afecta las células precursoras renales embrionarias pluripotentes. En condiciones normales el gen de wt1 codifica un factor de transcripción con dominios de dedos de zinc y desempeñan un papel importante en el crecimiento y la diferenciación celular. Se encuentran expresado en tejidos, incluidos gónadas, útero, riñón, mesotelio y células progenitoras de distintos tipos de tejidos (Sugiyama, 2010)

Esta localizado en el cromosoma 11p13 y consta de 10 exones y codifica un factor de transcripción con dedos de zinc que produce un patrón complejo de especies de mRNA, generando 36 isoformas (Gaiger et al., 2000; Maugeri et al., 2016). La proteína de WT1 se produce a partir del mismo templado de DNA mediante mecanismos como el inicio de transcripción alternativo, empalme alternativo, empalme alternativo de pre-mRNA, edición de mRNA y un inicio de traducción alternativo (Kramarzova et al., 2012).

En estudios recientes, WT1 ha sido identificado en el citoplasma de varios tejidos en desarrollo, como vasos sanguíneos, músculo esquelético, la glía radial y neuroblastos del sistema nervioso simpático (Maugeri et al., 2016)

Es importante resaltar que el gen wt1 presenta cuatro isoformas principales, de los cuales dos se generan por eventos de splicing alternativos:

1. Splicing alternativo que involucra 17 aminoácidos del exón 5, en antes del dominio de dedo de zinc;
2. Splicing alterativo en el exón 9, que resulta en una inserción de tres aminoácidos lisina-treonina-serina (KTS) entre el tercer y cuarto dedo de zinc.

Este gen expresa una proteína con un peso molecular de entre 52-54 kDa y una secuencia de 449 aminoácidos. En su estructura se distingue un dominio N-terminal rico en glutamina y prolina, involucrado en la activación y represión transcripcional, y un dominio C-terminal compuesto por dominios de dedo de zinc (Cys-Cys-His-His) implicados en la interacción con DNA, RNA y proteínas (Han et al., 2007).

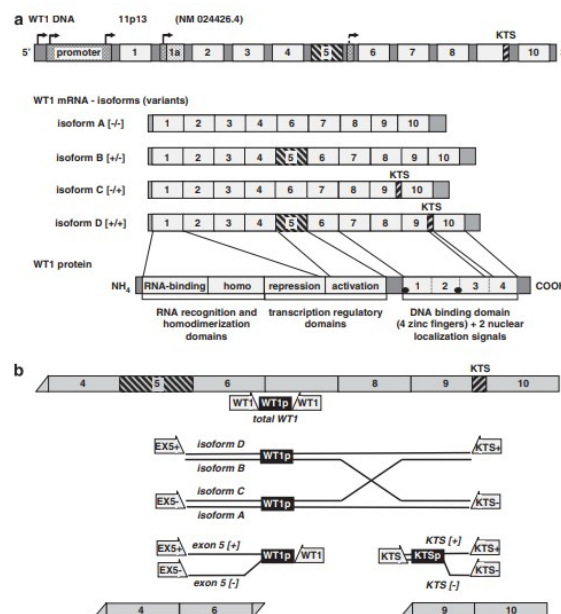


Figura 8. Esquema del gen y proteínas de WT1. (Imagen tomada de: <https://www.nature.com/articles/leu201276#citeas>)

2.13 Función de WT1

Durante la embriogénesis, WT1 está involucrado en la regulación del crecimiento y la diferenciación, así como en la interacción con un repertorio de genes blanco. Se une al factor de respuesta temprana de secuencias consenso de DNA-1 en promotores de genes de factores de crecimiento, como el promotor del factor de crecimiento derivados de plaquetas, cadena A, y el promotor del factor de crecimiento similar a insulina tipo II. Se sugiere que la expresión aberrante del gen de wt1 conduce a una proliferación celular descontrolada con diferenciación anómala, lo que eventualmente da lugar a la formación tumoral (Gaiger et al., 2000).

2.14 WT1 como oncogén

Como se mencionó, el gen wt1 fue descrito principalmente como un gen supresor de tumores; sin embargo, se ha demostrado que desempeña una función oncogénica importante en leucemogénesis y la tumorigénesis (Sugiyama, 2010). Algar y colaboradores observaron que el crecimiento de células cancerosas que expresaban WT1 fue inhibido mediante un oligonucleótido antisentido de WT1 (Algar et al., 1996) y la sobreexpresión de WT1 promueve el crecimiento, la mortalidad celular, la supresión de la apoptosis e induce leucemia en ratones transgénicos con WT1 (Nishida et al., 2006; Sugiyama, 2010). En el contexto de WT1 en cáncer de mama, se ha observado que tiene la capacidad de promover la proliferación celular y participar en la infiltración y metástasis regulando la expresión transcripcional de factores de crecimiento (Zhang et al., 2020).

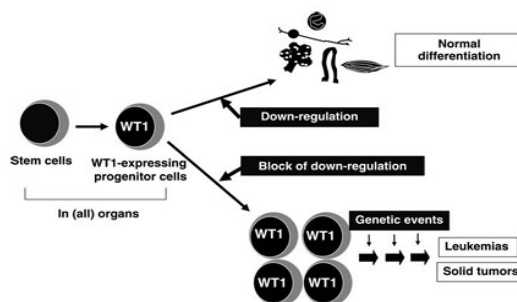


Figura 9. WT1 involucrado en leucemogénesis y tumorigénesis. (Imagen tomada de: https://academic.oup.com/jjco/article/40/5/377/863825?login=false#google_vignette)

WT1 no solamente tiene un rol en la leucemogénesis y tumorigénesis; sino que también se encuentra expresado en niveles elevados en varios tipos de tumores sólidos, lo que permite utilizar como un factor pronóstico (Sugiyama, 2010).

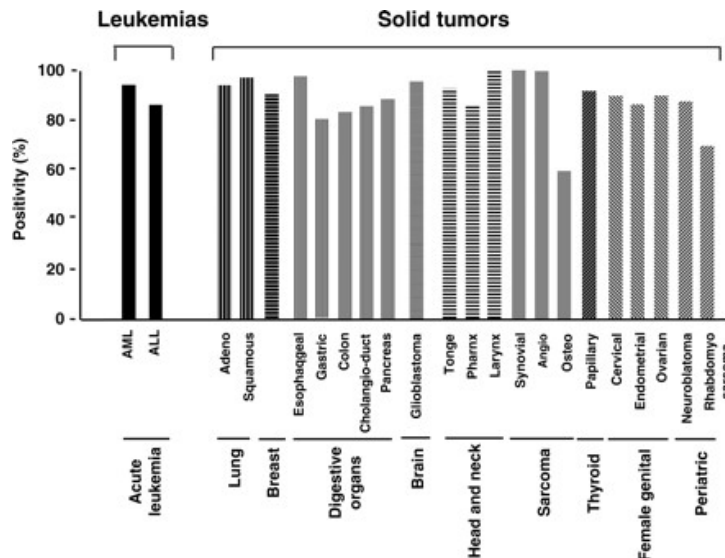


Figura 10. Sobreexpresión de WT1 en leucemia y otros tipos de cánceres sólidos.
Imagen tomada de Sugiyama, 2010.

Por lo que además, la proteína 1 de tumor de Wilm's (WT1) es un antígeno asociado a tumor (TAA) prometedor para el desarrollo de la nueva clase de vacunas universales de cáncer. Varias características lo convierten en un blanco prometedor para la inmunoterapia.

2.15 WT1 como antígeno universal para inmunoterapias contra el cáncer

El instituto Nacional del Cáncer (NCI por sus siglas en inglés, National Cancer Institute) realizó un estudio a gran escala de antígenos de cáncer y obtuvo una lista con 75 antígenos prometedores asociados a tumores. Dentro de los parámetros que se establecieron para dicho estudio, WT1 encabeza la lista, lo que permite impulsar la investigación para el diseño de vacunas contra el cáncer basadas en WT1, dado que es una proteína altamente expresada.

En las últimas décadas, WT1 ha demostrado ser un blanco prometedor para la inmnoterapia, ya que, además de su alta expresión, es una proteína blanco inmunogénica con alta antigenicidad para células T y la capacidad de inducir la producción natural de

anticuerpos IgG anti-WT1 en pacientes con neoplasias (Nicoli et al., 2008; Wu et al., 2005). Aunque WT1 se expresa en tejidos normales como gónadas (testículos, ovarios), riñones, bazo y médula ósea, hasta la fecha no existe evidencia que indique la generación de reacciones autoinmunes en ratones o humanos después de la inmunoterapia dirigida contra WT1.

Se ha demostrado que la inmunoterapia dirigida a WT1 tiene utilidad clínica en múltiples formas, incluyendo vacunas de células dendríticas pulsadas con péptidos de WT1 o células dendríticas electroporadas con mRNA de WT1, así como terapias con células T transducidas con receptores específicos para WT1 (Oji et al., 2023). Gaiger y colaboradores reportaron que la inmunización con los péptidos WT1 p136-144, p235-243 y p117-139, que se unen al MHC murino de clase I, indujo CTL específicos de WT1 en ratones, los cuales lisaron células tumorales que expresaban WT1, sin evidencia de toxicidad autoinmune (Gaiger et al., 2000).

Un estudio clínico de fase I contra la proteína WT1 se inició en 2001. Este ensayo clínico se llevó a cabo en pacientes con AML, MDS, cáncer pulmonar o cáncer de mama, a quienes se les inyectó vía intradérmica el péptido natural de WT1 HLA-A*24:02 (CMTWNQMNL) o un 9-mer modificado (-Y-----) en intervalos de dos semanas. Posteriormente se analizó la respuesta de toxicidad e inmunológica. Esta vacuna de WT1 se administró en 26 pacientes, observándose que en aquellos con cáncer de mama, pulmonar o AML con hematopoyesis normal, la toxicidad se limitó a eritema local en el sitio de administración. Además, en pacientes con cáncer de mama y en tres de los ocho pacientes con cáncer de pulmón vacunados contra WT1, se observó un efecto de regresión tanto de masa tumoral como del marcador tumoral. Estos ensayos muestran la seguridad y eficacia clínica de la inmunoterapia con péptidos de WT1 en pacientes (Oka et al., 2002)

Otro ensayo clínico, elaborado por Morita y colaboradores en el 2006, administró una vacuna con péptido de WT1 en pacientes con tumores sólidos y neoplasia hematopoyéticas maligna, excluyendo MDS y CML. En este estudio se administraron 3.0 mg de péptido modificado de WT1 en un intervalo de tres meses (12 dosis en total) vía intradérmica. El ensayo clínico en fase I mostró eritema cutáneo en el sitio de inyección

como único efecto adverso, lo que confirma que el protocolo de vacunación de WT1 es seguro. La fase clínica II aún se encuentra en curso (Morita, S. et al. 2006).

3. JUSTIFICACIÓN

A nivel mundial, el cáncer de mamá es considerado una de las principales causas de muerte en mujeres. Existen diversas terapias dirigidas a la eliminación de células cancerosas; sin embargo, suelen ser poco específicas y generan efectos citotóxicos que, en ocasiones, pueden poner en riesgo la vida del paciente. Por lo que, se ha enfocado la investigación en buscar alternativas terapéuticas más específicas para eliminar el foco tumoral, además de reducir los efectos secundarios derivados de las terapias convencionales, brindando así un mejor tratamiento y calidad de vida.

Dentro de la inmunoterapia, WT1, ha sido considerado como un antígeno asociado al tumor universal, ya que se encuentra expresado en leucemias y en diversos tipos de tumores sólidos, lo que lo convierte en un candidato prometedor en el desarrollo de terapias contra el cáncer. Es por esto que en este trabajo, se enfoca en un análisis integral de la vacuna de DNA-WT1, abordando su diseño bioinformático hasta la evaluación de su capacidad para inducir una respuesta inmune específica contra WT1 en un modelo murino.

4. HIPÓTESIS

La predicción bioinformática de epítopos inmunogénicos derivados de la vacuna DNA-WT1 permite inducir una respuesta inmune específica en un modelo murino de cáncer de mama.

5. OBJETIVO DEL TRABAJO

OBJETIVO GENERAL

Analizar el potencial inmunoterapéutico de la vacuna de DNA-WT1 a través de la predicción bioinformática de epítomos inmunogénicos y la evaluación de su eficacia antitumoral en un modelo murino de cáncer de mama.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Analizar las propiedades fisicoquímicas y biológicas de la vacuna de DNA-WT1 “*in silico*”, así como identificar los epítomos inmunogénicos de MHC clase I y II con amplia cobertura poblacional, mediante herramientas bioinformáticas.
2. Predecir la capacidad inmunogénica de la vacuna de DNA-WT1 para inducir una respuesta inmune celular y humoral específica utilizando simulaciones computacionales.
3. Caracterizar la expresión de la vacuna de DNA-WT1 “*in vitro*”.
4. Determinar la expresión de WT1 basal en las células de 4T1 de cáncer de mama murino.
5. Determinar el título de anticuerpos en contra de WT1 en suero de ratones Balb/c inmunizados por la vacuna de DNA-WT1
6. Determinar el efecto citotóxico de esplenocitos colectados de ratones inmunizados con la vacuna de DNA-WT1 en contra de las células 4T1.
7. Cuantificar la producción del IFN-gamma (IFN- γ) de esplenocitos colectados de ratones inmunizados con la vacuna de DNA-WT1 en contra de las células 4T1.
8. Analizar la reducción de la masa tumoral tras el implante de las células 4T1 en ratones Balb/c inmunizados con la vacuna de DNA-WT1.

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 Características y propiedades fisicoquímicas de la vacuna de DNA-WT1

Las propiedades fisicoquímicas de la vacuna de DNA-WT1, incluyendo la composición aminoácidica, peso molecular, punto isoeléctrico teórico, índice de inestabilidad, índice alifático y el promedio de hidropaticidad (GRAVY), se obtuvieron mediante el servidor ProtParam (<https://web.expasy.org/protparam/>). Por su parte, la antigenicidad, alergenicidad y toxicidad de la vacuna fueron predichas utilizando los servidores VaxiJen (<https://www.ddg-pharmfac.net/vaxijen3/accounts/login/?next=/vaxijen3/home/>), AllerTOP (https://www.ddg-pharmfac.net/allertop_test/) y ToxinPred (<https://webs.iitd.edu.in/raghava/toxinpred/>).

6.2 Análisis de la estructura secundaria de la vacuna de DNA-WT1

La estructura secundaria de la vacuna de DNA-WT1 se predijo utilizando el servidor SOPMA (https://npsa-prabi.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=/NPSA/npsa_sopma.html). Para la visualización de la estructura tridimensional, se empleó PyMOL, a partir del archivo generado mediante AlphaFold3.

6.3 Predicción de los epítomos de MHC-I y MHC-II en la vacuna de DNA-WT1.

Los epítomos de linfocitos T helper se predijeron mediante el servidor MHC-II Binding Predictions (<http://tools.iedb.org/mhcii/>), utilizando los parámetros preestablecidos, lo cual permitió identificar epítomos de 15 aminoácidos presentes en la vacuna de DNA-WT1. Posteriormente, se realizó un análisis de antigenicidad de estos epítomos usando VaxiJen, filtrando aquellos con un valor superior al umbral de 0.4.

Para la predicción de epítomos de linfocitos T citotóxicos, se empleó el servidor MHC-I Binding Prediction (<http://tools.iedb.org/mhci/>), también bajo parámetros por defecto, para identificar epítomos de 9 a 10 aminoácidos. La antigenicidad de estos epítomos se evaluó mediante VaxiJen.

6.4 Análisis de la cobertura poblacional

Todos los epítomos calificados, junto con su respectivo alelo de MHC, se analizaron utilizando la herramienta IEDB Population Coverage (<http://tools.iedb.org/population/>). Se seleccionó la opción “World Coverage” para estimar la cobertura poblacional global de los epítomos de MHC clase I y, en un análisis independiente, de MHC clase II y, en un análisis independiente, de MHC clase II. Posteriormente, se repitió el análisis a nivel nacional, seleccionando la opción “México”.

6.5 Estimulación del sistema inmune *in silico*

La estimulación del sistema inmune *in silico* de la vacuna de DNA-WT1 se simuló mediante el servidor C-ImmSim (<http://150.146.2.1/C-IMMSIM/index.php>). Los parámetros empleados fueron los siguientes: velocidad al azar (12,345), volumen de simulación (10), número de pasos de simulación (100) y número de pasos de inyección (1), con el fin de simular la administración de una única dosis de la vacuna en el día 1, a lo largo de los 35 días de duración total de la simulación.

6.6 Vacuna de DNA de epítomos de WT1

La secuencia de la vacuna de DNA-WT1 incluye la región de la proteína WT1 murino (de GenBank con el número de acceso M55512), correspondiente a 815 pb que codifica 256 aminoácidos del extremo amino terminal, identificada como la región más inmunogénica. Para su inserción y expresión eucariota pcDNA3.1(+) (Cat no. V790, Invitrogen), permitiendo así la incorporación de la secuencia de WT1. A continuación, se muestra el mapa con las características del vector de expresión:

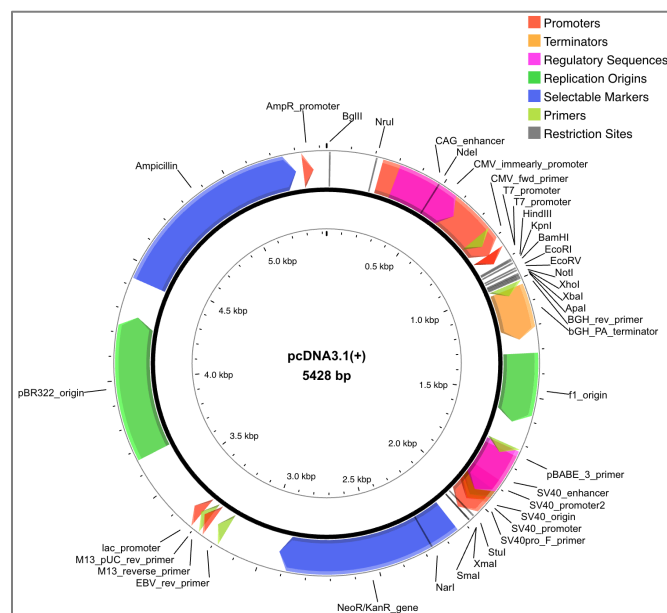


Figura 11. Mapa del plásmido pcDNA3.1(+). Obtenido a partir de la herramienta bioinformática PlasMapper 3.0: <https://plasmapper.wishartlab.com/>

6.7 Transformación de células calcio competentes con la vacuna de DNA de WT1

Se llevo a cabo la transformación bacteriana de *Escherichia coli* cepa DH5 α por lisis alcalina. Se realizo una selección de clonas transformadas sembrando en tubos de ensayo con caldo LB adicionado con ampicilina 100 μ g/mL e incubándose durante 24 horas a 37°C en agitación a 250 rpm. Posteriormente se llevó a cabo la centrifugación de estos tubos a 6000 g por 15 min y el pellet bacteriano fue procesado para extraer el DNA plasmídico utilizando un miniprep casero.

6.8 Producción a gran escala de la vacuna de DNA-WT1

Se llevo a cabo la producción a gran escala de la vacuna de DNA-WT utilizando la misma cepa previamente transformada con cada uno de los plásmidos: el plásmido pcDNA3.1(+)/WT1, el cual presenta la inserción de la secuencia de DNA-WT1 y el plásmido pcDNA3.1(+)/GFP, el cual será utilizado como control experimental.

Cada cultivo se creció en matraces con 200 mL de caldo LB adicionado con ampicilina como antibiótico de selección, posteriormente se incubó durante 14 hrs a 37°C en agitación continua a 250 rpm. Una vez que pasó el tiempo del crecimiento, se centrifugo

el medio a 5000 rpm por 10 min, para obtener la pastilla de cada una de las clonas. A partir de la formación de los pellets se procedió con el protocolo de purificación a gran escala siguiendo las instrucciones de protocolo de PureLink™ HiPure Plasmid Filter Maxiprep Kit (Invitrogen).

6.9 Cultivo celular

Para los ensayos *in vitro* para determinar la expresión del plásmido vacunal DNA-WT1 se utilizó la línea celular B16F10 y 4T1 nuestra línea celular de interés, estas fueron cultivadas en medio DMEM (Life Technologies, Invitrogen) suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB) a 37°C en una atmósfera de 95% de O₂ y 5% de CO₂. Para la purificación del antígeno WT1 que fue utilizado para la prueba de hipersensibilidad retardada se utilizó la línea celular K562, la cual sobreexpresa WT1.

6.10 Determinación de la expresión de WT1 en la línea celular B16F10, 4T1 y K562 por medio de un PCR tiempo real.

Para analizar la expresión endógena de WT1 en las líneas celulares de interés, se realizó una RT-PCR a partir de pellets obtenidos de estas líneas celulares. Se realizó la extracción de RNA empleando Trizol adicionando 1 mL para la lisis celular, se incubó por 5 min a temperatura ambiente, y se añadió 200 µL de cloroformo y se agitó vigorosamente por 15 s, a la mezcla se dejó en incubación por 2 min a temperatura ambiente y se centrifugó a 12,000 g por 5 min a 4°C. Después de centrifugar, se tomó la fase acuosa que es donde se encuentra el RNA, la precipitación se realizó en un tubo eppendorf con 500 µL de isopropanol, se dejó incubar a temperatura ambiente por 10 min, en seguida se centrifugó a 12,000 g por 10 min a 4°C, se lavó el pellet con 1 mL de etanol al 75%. Se mezcló y después se centrifugó a 7,500g por 5 min a 4°C, se dejó secar de 5 a 10 min para posteriormente re suspender en 50 µL de agua libre de RNasa. Las muestras se incubaron a 55°C de 10 a 15 min para posteriormente leer su concentración.

Para cada reacción se adiciono en un tubo eppendorf un volumen de 10 µL que contendrá 5 µg de RNA, 2 µL de 10X TR Buffer, 0.8 µL de 25X dNTP MIX, 2 µL de 10X RT Random Primers, 1 µL de Multitranscribe™ Revers Transcriptase y 4.2 µL de agua libre de RNasa. La reacción se llevó a cabo en el termociclador con las siguientes

condiciones: 1 min a 25°C, 120 min a 37°C y 5 min a 85°C. RT-PCR para expresión de WT1 y GA3PDH. La reacción se realizó con 5 µL de cDNA, 5 µL de 5X My Taq Reaction, 0.5 µL de Primers Forward y Reverse, 0.5 My Taq DNA Polymerase y agua suficiente para un volumen total de 25 µL. Los productos de PCR se corrieron en un gel de agarosa al 1.2% y se observó en un fotodocumentador.

Tabla 6. Secuencias de primers para determinar WT1

Gen	Primers	Fragmento
WT1	Forward 5'-CACATGAGAGAACGCCCCTTCATGTG-3' Reverse 5'-TTTGAGCTGGTCTGAACGAGAAA-3'	160 pb
GA3PDH	Forward 5'- ACCACAGTCCATGCCATCAC-3' Reverse 5'- TCCACCACCCTGTTGCTGTA-3'	452 pb

Tabla 7. Condiciones de reacción PCR

Gen	Desnaturalización	Alineamiento	Extensión	Ciclos
WT1	94°C 40s	64°C 30s	72°C 30s	35
GA3PDH	94°C 40s	60°C 30s	72°C 40s	35

6.11 Determinación de la expresión de WT1 en la línea celular B16F10, 4T1 y K562 por medio de un qPCR.

Para cada reacción relacionada con el WT1, se utilizó un volumen de 4 µL de DNAC, acompañado de 10 µL de Master Mix, 1 µL de GA3PDH (que sirve como control endógeno) y 0,7 µL de la sonda WT1, con el volumen total ajustado a 20 µL utilizando agua tratada con DEPC. Todas las reacciones experimentales se realizaron por triplicado y el análisis posterior de los datos resultantes se facilitó mediante la aplicación del

software termociclador de PCR en tiempo real (Applied Biosystems 7500 Software v2.0.1).

6.12 Transfección de la vacuna DNA-WT1 en la línea B16F10 en placa de 6 pozos

Para determinar si el plásmido expresa el péptido de la vacuna, se realizaron ensayos en placa de 6 pozos. Se cultivaron 100,000 células de B16F10 y se dejaron incubando toda la noche. Al día siguiente se retiró el medio y se agregó medio fresco adicionado con 0.2 μ L de PEI a 150 mM por duplicado como control experimental y el plásmido vacunal DNA-WT1 (2 μ g y 4 μ g) acomplexado con PEI a 150 mM como agente de transfección. Una vez que se cumplieron las 48 hrs, las células fueron sometidas a una extracción total de proteínas para Western Blot.

A. Extracción de proteínas y Western blot

Los pellets obtenidos de los ensayos fueron resuspendidos con 100 μ L de buffer de lisis Tritón 1%, NaCl 150 mM, Tris 25 mM a un pH de 7.6) y fueron incubados en hielo por 30 minutos, mezclando por inversión cada 10 minutos. Posteriormente las células fueron centrifugadas a 7,500 rpm por 5 minutos y el sobrenadante fue transferido a un tubo estéril y almacenado a -80°C hasta su uso.

B. Cuantificación de proteínas por método de Bradford.

La concentración de proteínas se determinó usando el Kit Bio-Rad DC Protein Assay siguiendo las instrucciones del fabricante. Para la cuantificación de los extractos proteínicos se prepararon diluciones de 1:5.

C. Electroforesis en gel SDS-PAGE

Se tomó 50 μ g de proteína total y se desnaturalizaron en buffer de carga que contiene SDS y β -mercaptoetanol, se colocaron a 95°C por 5 minutos y después se cargaron en geles de acrilamida-SDS page al 12%, corrieron por 40 V por 15 min y se incrementó el voltaje a 100 V por 2 hrs. Posteriormente se transfirieron las proteínas del gel a una membrana de nitrocelulosa usando un casete de transferencia de proteínas en condiciones de 75 V por 90 min, finalizando la transferencia se bloqueó la membrana con una solución de TBS-Tween al 1x con leche al 5%.

6.13 Animales.

Se utilizaron ratones hembra de la cepa BALB/c de 6 a 10 semanas de edad. Los animales fueron sometidos en ciclos de 12 hrs de luz y 12 hrs de oscuridad, siendo alimentadas con dieta de roedores y agua *ad libitum*.

Llevando a cabo el esquema de inmunización que se describirá más adelante, se anestesiaron a los ratones con Ketamina y Xilazina al 10% en el día 21 y se eutanizaron a los ratones por dislocación cervical. El tejido pulmonar fue diseccionado y almacenado en formalina y congelado a -80°C hasta su uso. De la misma manera, los sueros de los ratones serán colectados según el esquema de inmunización previamente descritos.

6.14 Inmunización de los ratones Balb/c con la vacuna DNA-WT1 a través de la administración subcutánea.

Los grupos aplicados para las inmunizaciones de los ratones Balb/c con la vacuna de DNA-WT1 fueron los siguientes:

- **Grupo 1:** pcDNA3.1(+)/ GFP + Adyuvante
- **Grupo 2:** Vacuna DNA-WT1 + Adyuvante
- **Grupo 3:** Vacuna DNA-WT1
- **Grupo 4:** Solución Salina

Se administró 20 µg de la vacuna de DNA-WT1 acomplexado con PEI por ratón re suspendidos en solución salina estéril a un volumen total de 100 µL y en los grupos con adyuvante utilizando Frenud's incomplete adjuvant (Sigma F-5506) en un volumen de 100 µL. Se aplicó esta mezcla por vía subcutánea y se inmunizaron a los ratones Sangrado y obtención del suero de los ratones Balb/c inmunizados

Se llevó a cabo el sangrado y obtención de suero de los diferentes grupos de ratones en el día 14 y 21 post inmunización por punción retro orbital utilizando un capilar de vidrio. Una vez que se obtuvo la sangre, se procedió a centrifugar cada muestra a 1500 rpm por 10 min, al finalizar se tomó el suero y se pasó a un tubo eppendorf nuevo y se almacenó a -80°C hasta su uso.

6.15 Sacrificio de animales

En el día 35 del experimento se administrara una sobredosis de Ketamina y Xilazina al 10% para posteriormente realizar una dislocación cervical.

6.16 Especificidad antigénica de la inmunización subcutánea con DNA-WT1 en ratones Balb/c.

A. Citotoxicidad celular

Para la determinación de la capacidad citotóxica específica al antígeno de WT1, se obtuvo los esplenocitos a partir del bazo extraído de los ratones inmunizados con la vacuna DNA-WT1, estos esplenocitos fueron co-cultivados con las células 4T1 (con expresión de WT1) en un ratio de 20:1 y 10:1 (células efectoras: células blanco), una vez que pasaron las 24 hrs se llevó a cabo un análisis de viabilidad celular mediante MTT.

7. RESULTADOS

7.1 Identificación y predicción de los epítomos que se encuentran en la vacuna de DNA-WT1

Los epítomos predichos por la base de datos de IEDB con un umbral de >0.4 por VaxiJen fueron coinsiderados como epítomos inmunogénicos. Dentro de los cuales se encontraron 4 epítomos de 9 aminoácidos correspondientes a la clase I con una puntuacion de antigenicidad entre 0.7120-1.1742 con los respectivos HLA a los que se puede unir respectivamente (Tabla 7).

Para la identificación de los epítomos de clase II se identificaron 3 epítomos constituidos de 15 aminoácidos. El rango de antigenicidad se encuentra dentro del 0.5405-0.8012 respectivamente. Así mismo se reportó los HLA a los que se le puede unir (Tabla 8). Estos epítomos predichos son homólogos a los del modelo murino.

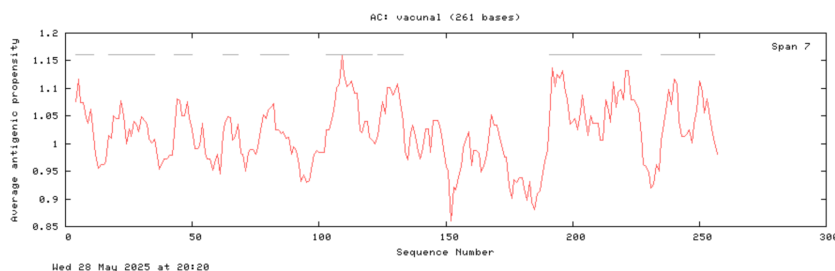


Figura 12. Plot de antigenicidad de la secuencia de la vacuna de DNA-WT1.

Tabla 8. Predicción de antigenicidad de los epítomos de MHC clase I de la secuencia de la vacuna de DNA-WT1. La antigenicidad fue calculada mediante VaxiJen 2.0 (modelo tumoral) e IEDB. Epítomos con score >0.4 (VaxiJen v2.0) y >0.10255 (IEDB) fueron cosiderados positivos.

T cell epitopes				
	RMFPRAPYL	SENHTAPIL	RIHTHGVFR	HTHGVFERGI
Antigenic score	1.0656	0.7120	1.1453	1.1742

(VaxiJen v2.0)				
Antigenic score (IEDB)	0.10255	0.173	0.2162	0.2584
Puntuación del péptido	0.9092	0.9803	0.9330	0.7508
Percentil de afinidad	0.01	0.01	0.01	0.07
Inicio (aa)	40	187	201	203
Final (aa)	48	195	209	211
Longitud	9	9	9	9
Alelo HLA-I	A*32:01, A*02:01, A*02:03, A*30:01, A*02:06, B*08:01, B*15:01, A*23:01, A*30:02, A*24:02, A*31:01, A*03:01, B*07:02, B*58:01, B*57:01, B*40:01, B*51:01, A*68:02, A*26:01,	B*40:01, B*44:03, B*44:02, B*15:01, B*35:01, B*53:01, B*07:02, A*02:06 B*51:01, B*08:01, A*26:01, A*01:01, A*23:01, A*24:02, A*30:02, A*32:01, A*02:01, A*68:02, A*02:03,	A*31:01, A*30:01, A*03:01, A*11:01, A*33:01, A*68:01, A*32:01, A*30:02/ B*15:01, A*26:01, B*07:02, A*02:01 A*24:02, B*57:01, A*01:01, A*02:06, A*02:03, A*23:01, B*58:01,	A*68:02, A*32:01, A*30:01, A*26:01, B*57:01, B*51:01, A*02:06, A*02:03, B*58:01, A*30:02, A*68:01, A*24:02, A*33:01, A*23:01, B*07:02, A*02:01, A*31:01, B*53:01, B*08:01, A*11:01, B*15:01, A*03:01, B*44:02, A*01:01, B*35:01, B*44:03, B*40:01

	A*33:01, A*11:01, A*44:02 B*53:01, A*01:01, B*35:01, B*44:03, A*68:01	B*58:01, A*11:01, A*68:01, A*30:01, A*03:01, B*57:01, A*33:01, A*31:01	A*68:02, B*44:02, B*35:01, B*44:03, B*40:01, B*08:01, B*53:01, B*51:01	
--	--	---	---	--

Tabla 9. Predicción de antigenicidad de los epítomos de MHC clase II de la secuencia de la vacuna de DNA-WT1. La antigenicidad fue calculada mediante VaxiJen 2.0 (modelo tumoral) e IEDB. Epítomos con score >0.4 (VaxiJen v2.0) y >0.10255 (IEDB) fueron considerados positivos.

T cell epitopes			
	GVFRGIQGVRRVSGV	CGAQYRIHTHGVFRG	KRYFKLSHLQMHSRK
Antigenic score (VaxiJen v2.0)	0.6751	0.8012	0.5405
Antigenic score (IEDB)	93.392	75.2938	84.6877
Puntuación del péptido	0.8382	0.6676	0.1113
Percentil de afinidad	0.08	0.49	1.8

Inicio (aa)	206	196	246
Final (aa)	220	210	260
Longitud	15	15	15
Alelo	DRB1*03:01/DRB1*07	DRB1*03:01/DRB1*07:01	DRB1*03:01/DRB1*07:01
HLA-I	:01/DRB1*15:01/DRB 3*01:01/DRB3*02:02/ DRB4*01:01/DRB5*01 :01	/DRB1*15:01/DRB3*01:0 1/DRB3*02:02/DRB4*01: 01/DRB5*01:01	/DRB1*15:01/DRB3*01:0 1/DRB3*02:02/DRB4*01: 01/DRB5*01:01

Posteriormente, se realizó un alineamiento para identificar la conservación de la proteína codificada por la vacuna de DNA-WT1, la cual muestra una conservación del 96% de identidad.

Wilms tumor homolog, partial [Mus musculus]						
Sequence ID: EDL27737.1 Length: 413 Number of Matches: 1						
Range 1: 53 to 311 GenPept Graphics				▼ Next Match ▲ Previous Match		
Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps	
512 bits(1319)	3e-180	Compositional matrix adjust.	249/259(96%)	254/259(98%)	0/259(0%)	
Query 2	VSAFTLHFSGQFTGTAGACRYGPF	PPPSQASSGQARMFPAPYLPRGLESQPTIRNQG	61			
Sbjct 53	LSAFTLHFSGQFTGTAGACRYGPF	PPPSQASSGQARMFP APYLP LESQPTIRNQG	112			
Query 62	YSTVTFDGA	PSWGHTPSHHAAQFPNHSFKHEDPMGQQGSLGEQQYSVPPPVWGCHTPTDS	121			
Sbjct 113	YSTVTFDGA	PSYGHTPSHHAAQFPNHSFKHEDPMGQQGSLGEQQYSVPPPVYGCHTPTDS	172			
Query 122	CTGSQALLRTPYSSD	ONLYQMTSOLDCTWQNMNLGATLKGMAAGSSSSSVKTEGQSNHG	181			
Sbjct 173	CTGSQALLRTPYSSD	ONLYQMTSQL+CMTWQNMNLGATLKGMAAGSSSSVK TEGQSNHG	232			
Query 182	TGWESENHTAPILCGA	QYRIHTHGVRFGIQVRRVSGVAPTLVRSASETSEKRPFMCAYP	241			
Sbjct 233	TGYESENHTAPILCGA	QYRIHTHGVRFGIQVRRVSGVAPTLVRSASETSEKRPFMCAYP	292			
Query 242	GCNKRYFKLSHLQMHSRKH	260				
Sbjct 293	GCNKRYFKLSHLQMHSRKH	311				

Figura 13. Alineamiento de la secuencia peptídica de la vacuna DNA-WT1. La secuencia aminoácidica de la proteína codificada por la vacuna de DNA-WT1 fue alineada en protein BLAST del NCBI.

WT1 protein [Homo sapiens]

Sequence ID: [AAH32861.1](#) Length: 302 Number of Matches: 1

Range 1: 3 to 302 [GenPept](#) [Graphics](#)

[▼ Next Match](#) [▲ Previous Match](#)

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
608 bits(1567)	0.0	Compositional matrix adjust.	291/303(96%)	295/303(97%)	3/303(0%)
Query 215		QGYSTVTFDGP	SYGHTPSHAAQFPNHSFKHEDPMGQQGS	LGEQQYSVPPPVYGCHTPT	
Sbjct 3		QGYSTVTFDGP	SYGHTPSHAAQFPNHSFKHEDPMGQQGS	LGEQQYSVPPPVYGCHTPT	
Query 275		DSCTGSQALLL	RTPYSSDNLYQMTSQLECM	TWNQMNLGATLKGMAAGSSSSVKWTEGQSN	
Sbjct 63		DSCTGSQALLL	RTPYSSDNLYQMTSQLECM	TWNQMNLGATLKGMAAGSSSSVKWTEGQSN	
Query 335		HGTGYESENHT	AIPILCGAQYRIHTHG	VFRGIQDVRRVSGVAPTLVRSASETSEKRPFMCA	
Sbjct 123		HGTGYESENHT	AIPILCGAQYRIHTHG	VFRGIQDVRRVSGVAPTLVRSASETSEKRPFMCA	
Query 395		YPGCNKRYFKL	SHLQMHSRKHTGEKPYQ	CDFKDCERRFSRSDQLKRHRRTGVKPFQCK	
Sbjct 183		YPGCNKRYFKL	SHLQMHSRKHTGEKPYQ	CDFKDCERRFSRSDQLKRHRRTGVKPFQCK	
Query 455		TCQRKFSRSDH	LKTHTRTHTGKTSEKPF	SCRWHSQKKFARSDELVRHHNMHQRNMTKLQ	
Sbjct 243		TCQRKFSRSDH	LKTHTRTHTGKTSEKPF	SCRWHSQKKFARSDELVRHHNMHQRNMTKLQ	
Query 515		LAL	517		
Sbjct 300		LAL	302		

Figura 14. Alineamiento de la secuencia peptídica de la proteína de WT1 murino y de humano. La secuencia aminoacídica de la proteína de WT1 de murino (número de acceso: NP_659032.3) y de la de humano (número de acceso: AAH32861.1)

7.2 Análisis de la estructura primaria y secundaria del constructo de la vacuna de DNA-WT1.

A través del análisis de SOPMA, se identificó conformaciones de la estructura primaria y secundaria de la vacuna de DNA-WT1. En la Figura 12 (A), se observa la presencia de 13 residuos organizados en hélices alfa (4.98%), 23 residuos en láminas extendidas (8.81%) y 225 residuos en conformación de espiral aleatoria (86.21%). Estos datos reflejan que la proteína tiene una naturaleza desordenada compuesta de 225 aminoácidos. En la figura 12 (B), se muestra la gráfica correspondiente a la puntuación obtenida en la predicción estructural.

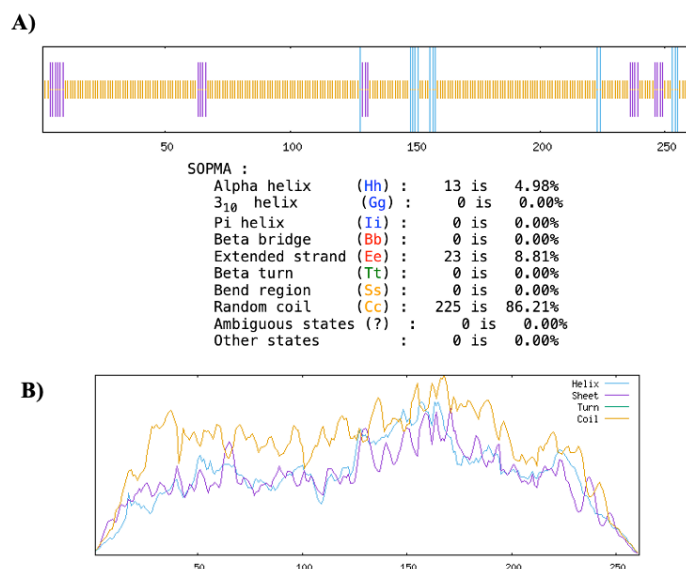


Figura 15. Gráfico predictivo de la estructura secundaria del constructo de la vacuna de DNA-WT1. Las hélice alfa son representadas en azul, mientras que láminas beta y extendidas se muestran en rojo y verde, respectivamente.

7.3 Docking molecular del constructo de la vacuna de DNA-WT1 y la proteína de WT1 nativa.

Por medio de AlphaFold se realizó el docking de la proteína nativa de WT1 y de la vacuna de DNA-WT1 (Fig. 14 A) y se muestra la estructura de la vacuna de DNA-WT1 en modelo de cintas y de superficie (Fig. 14 B y C).

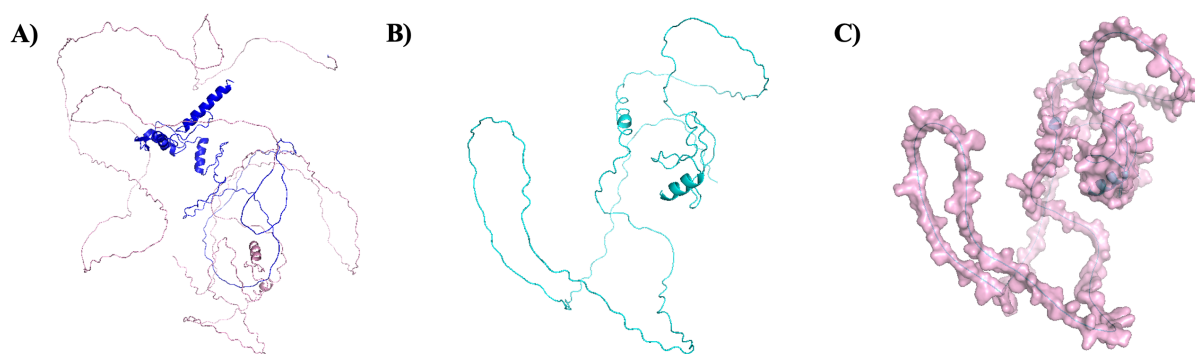


Figura 16. Representación tridimensional del constructo vcunal de DNA-WT1. A) Modelo tridimensional de la proteína WT1 nativa (azul) en comparación con la proteína de WT1 codificada por la vacuna (rosa). B) Representación en forma de cintas de la

proteína codificada por el constructo de DNA-WT1. C) Modelo de superficie de la proteína codificada por el constructo de la vacuna de DNA-WT1 (rosa), donde es visible la estructura secundaria interna (cian).

La figura 15 muestra el modelo tridimensional de la vacuna con la localización de los epítomos más inmunogénicos de clase MHC-I y II reportados anteriormente en la tabla 7 y 8 en la proteína nativa de WT1 (Fig. 16 A y B). y la localización de estos epítomos en la vacuna de DNA-WT1. Por lo que, tanto en la proteína de WT1 nativa y de vacuna de DNA-WT1 muestran sus epítomos en la superficie.

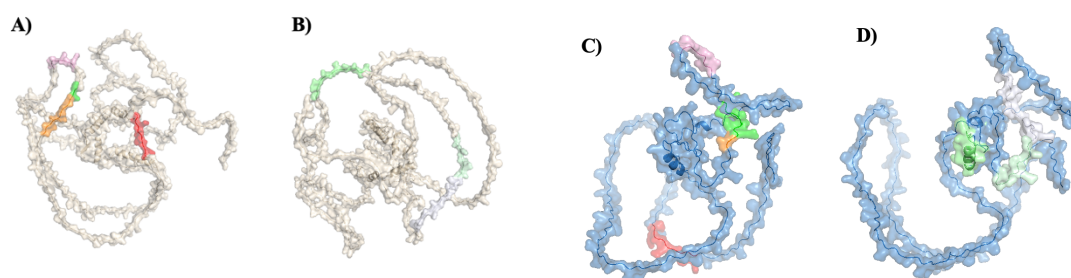


Figura 17. Modelo tridimensional de superficie de los epítomos de MHC-I y MHC-II en WT1 nativo y de la vacuna de DNA-WT1. A) Epítomos de MHC-I en la proteína WT1 nativa. B) Epítomos de MHC-II en la proteína WT1 nativa. C) Epítomos de MHC-I en la vacuna de DNA-WT1. D) Epítomos de MHC-II en a vacuna de DNA-WT1.

7.4 Predicción de parámetros fisicoquímicos, antigenicidad y alergenicidad de la vacuna de DNA-WT1.

Los parámetros fisicoquímicos evaluados incluyendo la composición de aminoácidos, punto isoeléctrico, índice alifático y promedio general de hidropaticidad (GRAVY), así como la vida media estimada *in vitro* e *in vivo* utilizando el servidor ProtParam (<https://web.expasy.org/protparam>). Estos análisis revelaron parámetros fisicoquímicos y una vida teórica media compatibles con el desarrollo vacunal.

Las propiedades fisicoquímicas, antigenicidad, alergenicidad y toxicidad se evaluaron mediante VaxiJen v3.0, AllerTOP v2.0. VaxiJen determinó que la vacuna de DNA-WT1 constituye un antígeno probable (valor de 0.5821), superando el umbral de positividad ≥ 0.4 . Posteriormente AllerTOP v2.0 confirmó la ausencia de propiedades alergénicas.

El porcentaje de solubilidad de la vacuna de DNA-WT1 en *E.coli* fue predicha por protein-sol (<https://protein-sol.manchester.ac.uk/>) calculando la solubilidad de las proteínas basadas en la solubilidad de las proteínas en *E.coli*.

Tabla 10. Propiedades fisicoquímicas, antigenicidad y alergenicidad de la vacuna de DNA-WT1.

Propiedades	Resultados predichos
No. total de aminoácidos	260 aa
Peso Molecular	28373.71
Fórmula	$C_{1236}H_{1878}N_{368}O_{373}S_{16}$
pI teórico	9.26 (básico)
No. total de átomos	3871
Vida media estimada	1.9 h (reticulocitos de mamíferos, <i>in vitro</i>) > 20 horas (levadura, <i>in vivo</i>) > 10 horas (<i>Escherichia coli</i> , <i>in vivo</i>)
Índice de inestabilidad	49.48
Índice alifático	46.40
Promedio general de hidropaticidad (GRAVY)	-0.600
Antigenicidad	0.5821 (ANTÍGENO)
Alergenicidad	No alergénico
Toxicidad	No tóxico

7.5 Análisis de la cobertura población de los epítomos inmunogénicos de la vacuna de DNA-WT1

El análisis de cobertura poblacional mundial mostró que los epítomos de clase I de la vacuna DNA-WT1 estima una cobertura del 98.55%, mientras que los de clase II un 49.02%. La combinación de ambas clases de epítomos incrementa la cobertura a 99.26%.

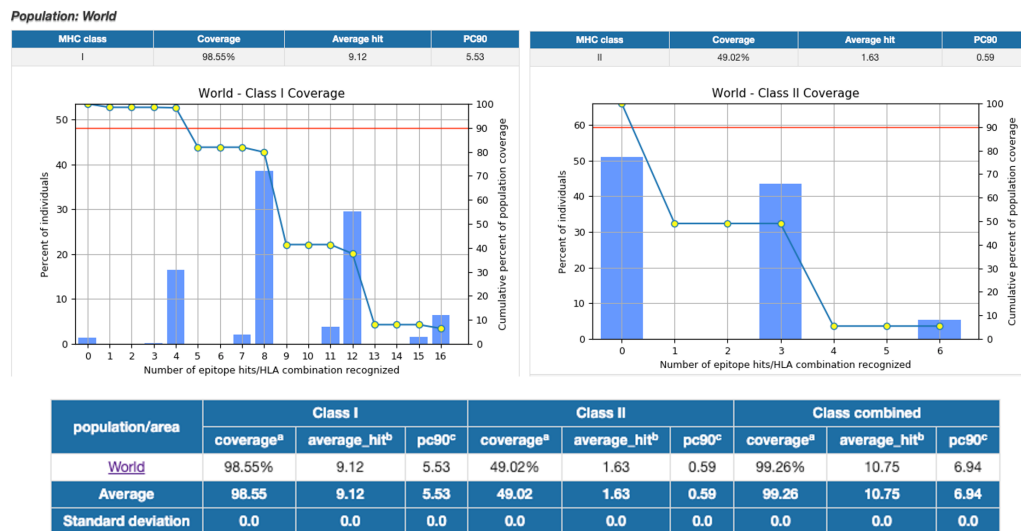


Figura 18. Cobertura poblacional global de la vacuna de DNA-WT1. A la izquierda se muestra la cobertura estimada para los epítomos de clase I, mientras que a la derecha corresponde a los epítomos de clase II.

Este mismo análisis realizó en la población mexicana, obteniendo una cobertura estimada de 97.97% para epítomos de clase I y 19.29% para los de clase II. La combinación de ambas clases, alcanza una cobertura de aproximadamente 98.37%, lo que sugiere una alta probabilidad de reconocimiento en la población especialmente de los epítomos de clase I.

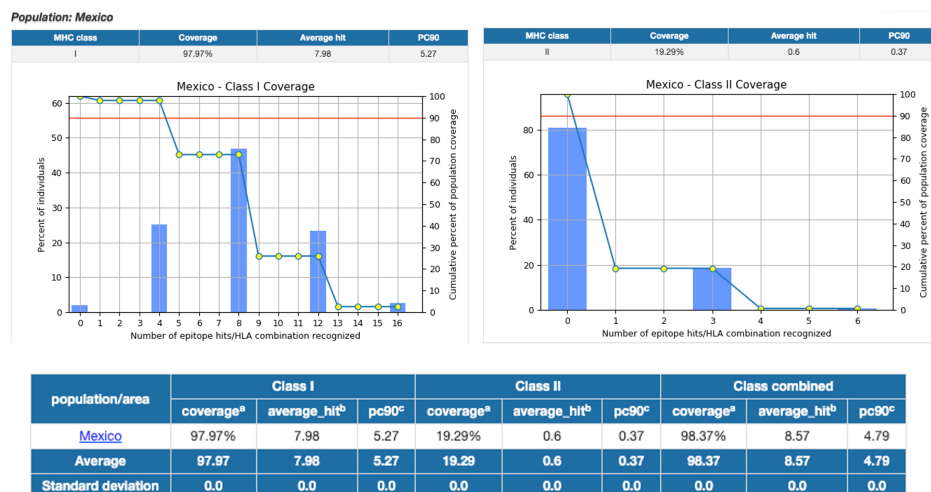


Figura 19. Cobertura poblacional en México de la vacuna de DNA-WT1.

7.6 Perfil de la estimulación del sistema inmune de la vacuna de DNA-WT1.

El análisis de la simulación inmunológica (C.IMMSIM) muestra una activación del sistema inmune innato y adaptativo como resultado de la administración del antígeno en combinación con un adyuvante. La respuesta humoral (Fig. 18 A) muestra una rápida producción de anticuerpos donde IgM es la primera en detectarse y posteriormente un aumento de las clases IgG1 e IgG2, alcanzando un pico en el día 5 y 10. Posterior al día 10, se observó una disminución gradual.

Las células B totales (Fig. 18 B) incrementaron hasta el día 5, alcanzando un máximo de ~ 600 células/mm³, estas se mantuvieron a niveles estables. Además, se observa la predominancia de las células B activas y duplicantes en los primeros días, sin embargo a partir del día 10 se observa una transición hacia estados de reposo y anergia.

La población total de células T CD8⁺ se vio aumentada hasta el día 10, alcanzando un máximo de 150 células/mm³. Estas células presentaron una expansión activa y duplicación durante los primeros 15 días, posteriormente se evidenció un incremento en el estado anérgico. En cuanto a las células T helper (Th) (Fig. 18 F y G) se presentaron de forma robusta, con un pico de población total alrededor de día 7 (~ 6000 células/mm³) aproximadamente en cual después se estabilizó. Los estados funcionales muestran que, tras la fase de activación temprana, predominan células en estado de reposo y memoria.

En el contexto de la inmunidad innata, las células dendríticas (DC) mostraron un aumento en el estado presentador hasta el día 10, posteriormente se observa una disminución. Los macrófagos también muestran una fase inicial de actividad fagocítica y presentadora. Las células NK y las células epiteliales presentadoras también muestran poblaciones constantes, sin expansión significativa. Por último, en las citocinas se puede observar un incremento de IFN-gamma, TGF- β e IL-2.

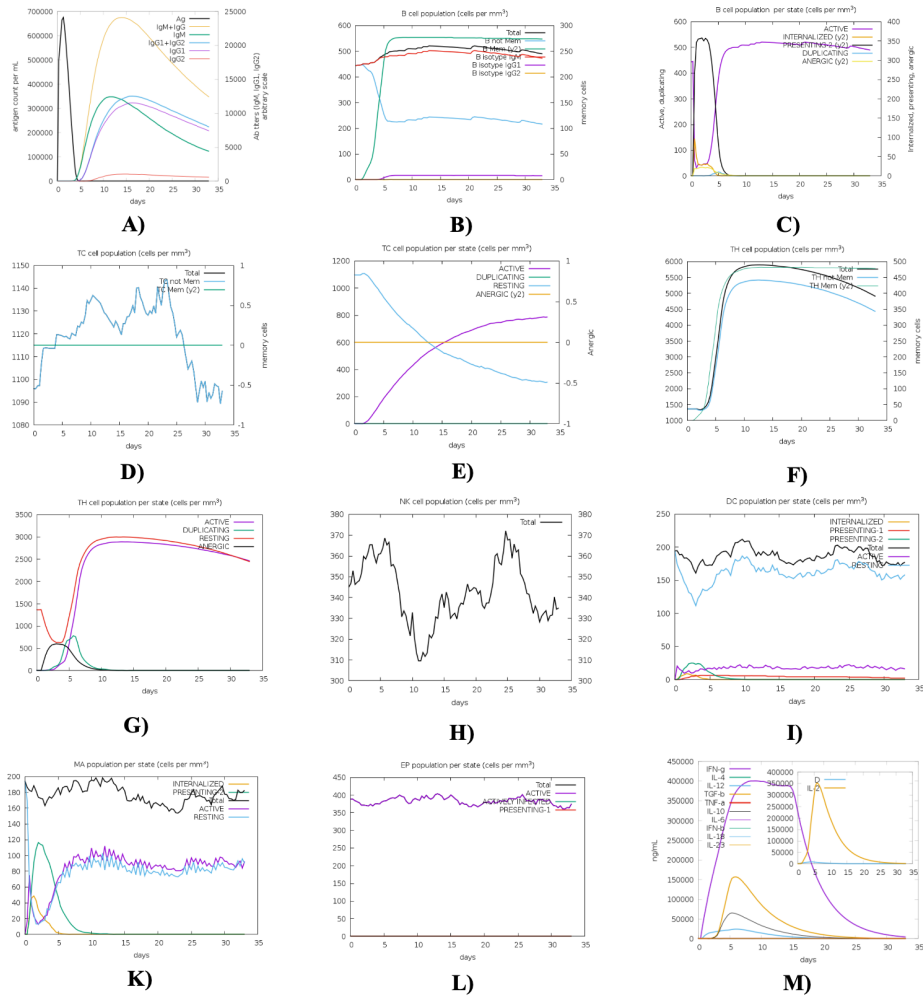


Figura 20. Simulación de la respuesta inmunitaria del humano tras la inmunización con la vacuna de DNA-WT1.

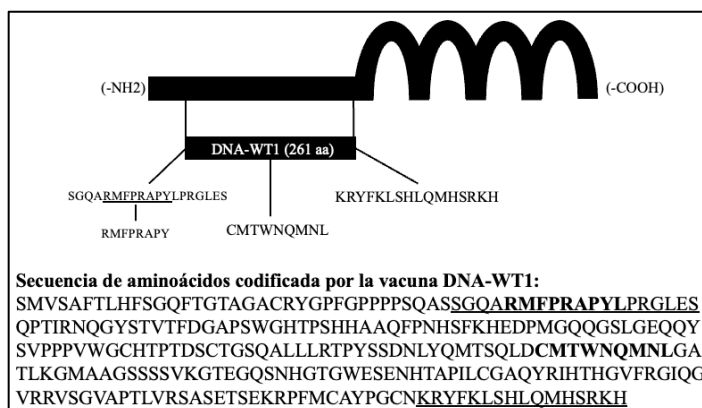


Figura 21. Secuencia de aminoácidos codificados por la vacuna de DNA-WT1. Descripción de la secuencia de la vacuna de DNA-WT1, que incluye los epítopes de clase I (en negritas) y clase II (subrayado).

7.7 Caracterización de la vacuna DNA-WT1

La construcción del plásmido vacunal DNA-WT1 de la figura 21 fue previamente visualizada en el laboratorio (Chavez, K. 2017) en un gel agarosa al 0.8% con enzimas de restricción EcoRI y XhoI, los cuales flanquean el inserto de la secuencia condificante correspondiente a 800 pb que coincide con el producto esperado de 815 pb.

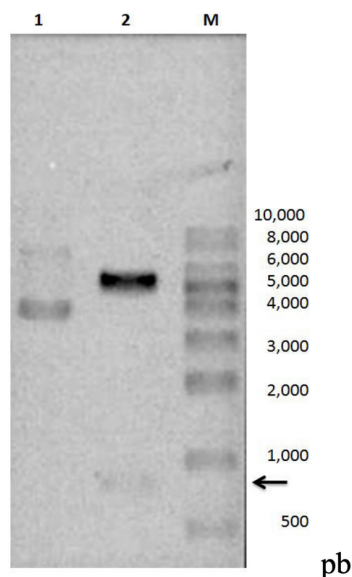


Figura 22. Caracterización de la vacuna con enzimas de restricción EcoRI y XhoI.

7.8 Análisis de la expresión de la vacuna DNA-WT1 *in vitro*

La expresión del plásmido vacunal en la línea celular de melanoma murino B16F10 mediante la transfección con la vacuna DNA-WT1 fue previamente realizada en el laboratorio (Chavez, K. 2017). Las proteínas totales fueron analizadas por Western blot. La figura 23 muestra el resultado de la visualización de la banda de 52-54 kDa que representa a la proteína de WT1 wild type y una banda de aproximadamente 25 kDa que corresponde al peso de la proteína codificada por la vacuna de DNA-WT1.

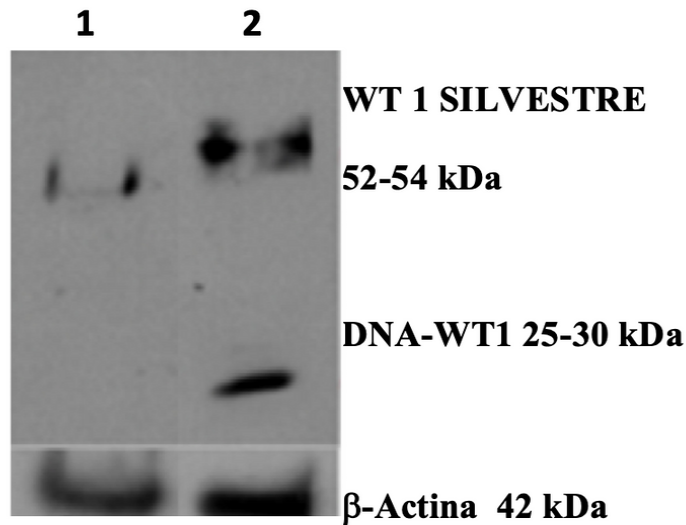


Figura 23. Expresión de la proteína de WT1 de la vacuna de DNA-WT1 y WT1 nativa en células de melanoma murino B16F10. El peso molecular de WT1 nativa corresponde a 52-54 kDa y de la vacuna de DNA-WT1 entre 25 y 30 kDa. Como control positivo se utilizó la proteína endógena b-actina.

7.9 Análisis de la expresión de WT1 en las líneas celulares 4T1, B16F10 y K562.

Para determinar la expresión de WT1 en las líneas celulares de interés se realizó un RT-PCR visualizándolo en un gel de agarosa de 1.2%. En la figura 22 se observan tres bandas de aproximadamente 160 pb correspondiente al producto que se obtendría con los primers de WT1. Esto confirma que las tres líneas celulares expresan WT1.



Figura 24. Expresión de WT1 en las líneas celulares 4T1, B16F10, K562 por RT-PCR. Carril 1: Expresión basal de WT1 en las células 4T1; Carril 2: Expresión basal de WT1 en las células B16F10; Carril 3: Expresión basal de WT1 en células K562.

7.10 Expresión relativa de WT1 en líneas celulares B16F10, 4T1 y K562.

Por medio de una PCR tiempo real se determinó la expresión relativa de WT1 en diferentes líneas celulares de interés (B16F10, 4T1 y K562). En donde se observa que WT1 se encuentra en mayor expresión en las células K562 (leucemia mieloide crónica) mostrando una expresión de 1511396.3, seguido de B16F10 (melanoma murino) con una expresión de 364181.592 y por último con menor expresión 4T1 (cáncer de mama murino triple negativo) con una expresión relativa de 12176.4499.

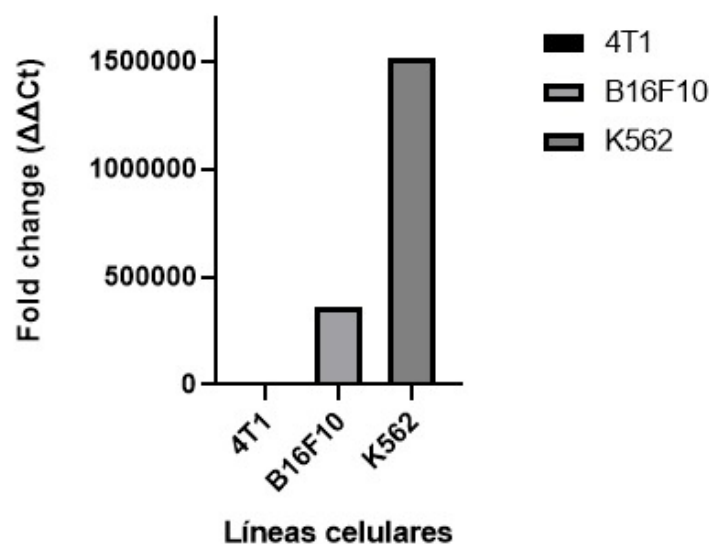


Figura 25. Expresión relativa de WT1 en líneas celulares B16F10, 4T1 y K562 mediante una PCR tiempo real. En la expresión relativa del mRNA de WT1 mediante RT-qPCR en las diferentes líneas celulares se observa que una expresión baja de 4T1 en comparación con las líneas celulares B16F10 y K562. Estos datos fueron normalizados utilizando GA3PDH como gen endógeno.

7.11 Efecto citotóxico de los esplenocitos obtenidos a partir de los ratones inmunizados vía subcutánea en contra de las líneas celulares B16F10 y 4T1.

Se seleccionaron imágenes representativas tres ratones de cada uno de los cuatro grupos: Solución Salina, GFP + Adyuvante, Vacuna DNA-WT1 y Vacuna DNA-WT1 + Adyuvante. En estas imágenes se puede visualizar como los bazo de la solución salina, la vacuna de DNA-WT1 con y sin adyuvante presentan un tamaño promedio en comparación con el grupo de GFP + Adyuvante, ya que estos presentan un mayor tamaño que los otros tres grupos.

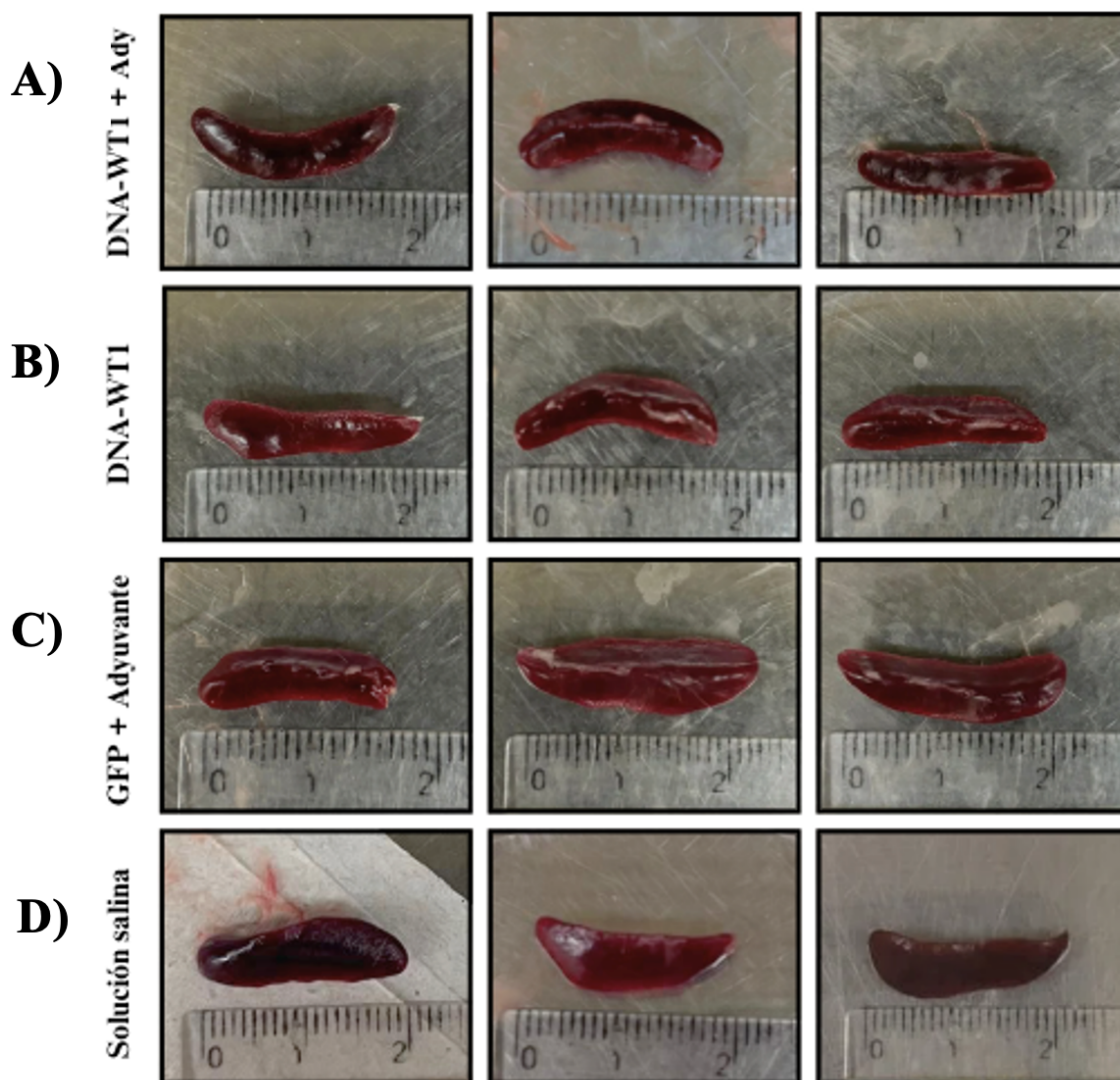


Figura 26. Imágenes representativas del tamaño de los bazos extraídos de ratones inmunizados vía subcutánea con los diferentes tratamientos. A) Bazos representativos del grupo de la vacuna DNA-WT1 con adyuvante; B) Bazos representativos del grupo de la vacuna DNA-WT1 sin adyuvante; C) Bazos representativos del grupo de GFP con adyuvante; D) Bazos representativos del grupo control de solución salina.

Una vez que se extrajeron los esplenocitos, se realizó un pool de estas muestras correspondientes a cada grupo para agregarlo a una placa de 96 pozos el cual previamente las células B16F10 y 4T1 habían sido sembradas. Se realizó una relación 20:1 y 10:1 a estas placas y se incubó durante 24 hr. A partir de esto se realizó el ensayo de MTT y se leyó en un lector de placas a 570 nm.

En la línea celular B16F10 con relación 20:1 se puede observar como hay mayor viabilidad celular con la aplicación del plásmido GFP y adyuvante en comparación del grupo control con solución salina. Sin embargo, se puede visualizar como se obtuvo un efecto citotóxico en el grupo vacunal DNA-WT1 con adyuvante y sin adyuvante, siendo más pronunciado en este último. En cuanto a la relación 10:1 de esta misma línea celular se muestra un efecto similar, sin embargo la viabilidad en el grupo de la vacuna de DNA-WT1 con y sin adyuvante fue más fuerte en comparación con la relación 20:1.

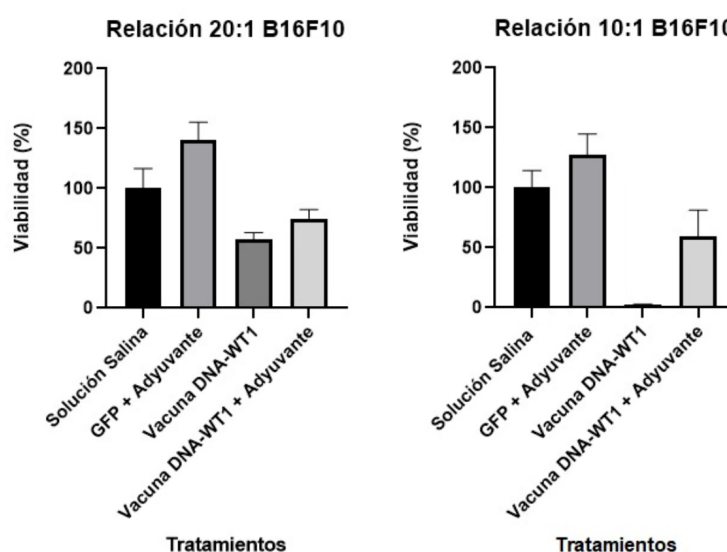


Figura 27. Efecto citotóxico de esplenocitos obtenidos a partir de ratones inmunizados en contra de las células B16F10. A) Porcentaje de viabilidad de las células

B16F10 en co-cultivo con esplenocitos de ratones inmunizados en una relación 20:1. B) Porcentaje de viabilidad de las células B16F10 en co-cultivo con esplenocitos de ratones inmunizados en una relación 10:1. El experimento se realizó por triplicado y se incluyó en la gráfica la desviación estándar.

Figura 28. Efecto citotóxico de esplenocitos obtenidos a partir de ratones inmunizados en contra de las células 4T1. A) Porcentaje de viabilidad de las células 4T1 en co-cultivo con esplenocitos de ratones inmunizados en una relación 20:1. B) Porcentaje de viabilidad de las células 4T1 en co-cultivo con esplenocitos de ratones inmunizados en una relación 10:1. El experimento se realizó por triplicado y se incluyó en la gráfica la desviación estándar.

7.12 Análisis de la reducción de masa tumoral tras el implante de células 4T1 en ratones previamente inmunizados vía subcutánea.

En el día 33 post inmunización y tras el implante de las células 4T1 en ratones, se eutanizaron y se disecciono el tumor para la toma de fotografías. Se puede observar que el grupo de la vacuna de DNA-WT1 con adyuvante dos ratones desarrollaron el tumor que corresponde a ratón 1 y 5. El ratón 1 mostró un tumor de aproximadamente 0.8 g. Mientras que el ratón 5 muestra un tumor de un peso de 0.2 g similar al grupo control de solución salina (ambos tumores de este grupo control corresponden a un peso de 0.2 g). Sin embargo, el grupo de la vacuna de DNA-WT1 sin adyuvante solamente un ratón correspondiente al número 3 mostró aparición tumoral de un peso de 0.05 g el cual es más pequeño en comparación al grupo control. Posteriormente, el grupo de GFP y adyuvante el ratón 3 muestra un tumor similar al ratón 1 del grupo de la vacuna de DNA-WT1 con adyuvante con un peso de 0.9 g y el segundo tumor correspondiente al ratón 4 muestra un tumor de tamaño similar al control correspondiente a 0.2 g.

DNA-WT1 + Ady

DNA-WT1

GFP + Ady

Solución Salina



Figura 29. Imágenes representativas de los tumores diseccionados de los grupos de ratones Balb/c inmunizados y retados con un modelo de cáncer de mama murino 4T1. Las imágenes representan los tumores diseccionados después de eutanizar a los ratones en los diferentes grupos: Vacuna DNA-WT1 aplicada con adyuvante, Vacuna DNA-WT1 sin adyuvante, GFP aplicado con adyuvante y solución salina como control.

7.13 Evaluación de la seguridad del efecto de la vacuna DNA-WT1 tras la inmunización vía subcutánea.

Durante el tiempo de inmunización y reto de las células 4T1 en los ratones inmunizados se realizó un monitoreo de cada 3 días de los pesos de los ratones. En base a la figura 30, se tomaron los promedios de cada grupo por cada 3 días hasta el día 31 del experimento. Durante este tiempo se observó poca diferencia en la pérdida de peso en comparación a los pesos tomados en el día 0.

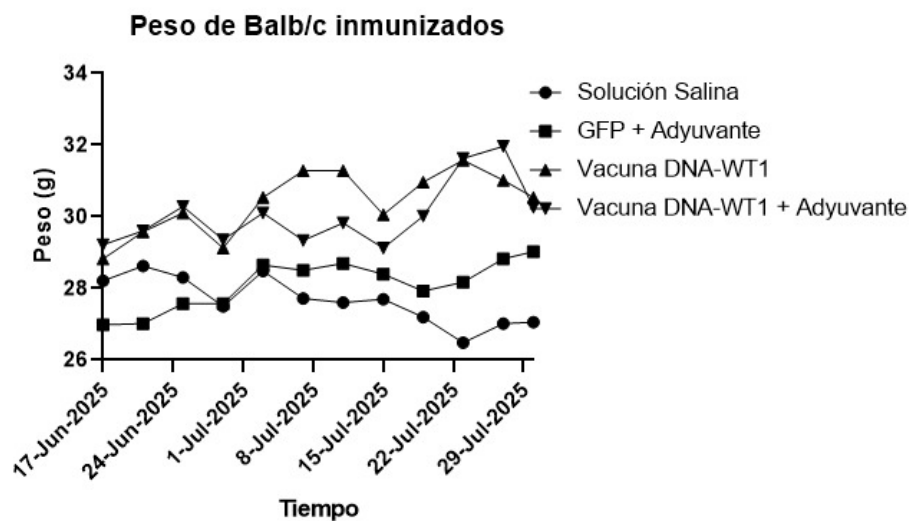


Figura 30. Cinética del peso de ratones inmunizados. La gráfica representa los pesos promedios de los grupos de inmunización: Solución salina, GFP con adyuvante, DNA-WT1 y DNA-WT1 con adyuvante durante el desarrollo del experimento. En el gráfico se incluye la desviación estándar.

Tabla 11. Representación del porcentaje de masa de los grupos de ratones. La tabla representa el promedio de peso inicial y final correspondiente a cada grupo representado en gramos y la pérdida/ganancia final con su respectivo porcentaje de cambio.

Grupos	Peso Inicial	Peso Final	Δ Peso (g)	% Cambio
Solución salina	28.26	26.76	- 1.48	- 5.24%
GFP + Adyuvante	26.775	29.725	+ 2.95	+ 11.01%
Vacuna DNA-WT1	28.82	31.52	+ 2.7	+ 9.36%
Vacuna DNA-WT1 + Adyuvante	29.22	31.38	+ 2.16	+ 7.39%

7. DISCUSIÓN

Se ha demostrado que las vacunas de DNA poseen numerosas ventajas en comparación con las modalidades de vacunación alternativas; por lo general, son fáciles de producir, muestran una mayor estabilidad en comparación con las vacunas que requieren un mantenimiento riguroso de la cadena de frío debido a susceptibilidad a la degradación, pueden introducir múltiples antígenos de manera efectiva y, lo que es más importante, no se limitan a un antígeno leucocitario humano (HLA) específico como ocurre con las vacunas peptídicas, lo que permite una aplicación más amplia en diversas poblaciones (Safavi et al., 2021; L. Zhao et al., 2013).

El diseño de la vacuna de DNA-WT1 demostró un potencial inmunogénico robusto (0.5821) mediante la integración de epítomos que cumplen con los parámetros de antigenicidad tanto para el MHC clase I como clase II. Se discernieron un total de cuatro epítomos de clase I y tres de clase II que superaron los umbrales de positividad establecidos por VaxiJen y el IEDB, asegurando con ello su eficacia inmunoestimuladora.

Específicamente, los epítomos de clase I exhibieron puntuaciones elevadas de antigenicidad junto con percentiles de afinidad, lo que significa una pronunciada capacidad de interacción con diversos alelos HLA. Esta característica es crucial para la activación específica de las células T CD8⁺, las cuales son fundamentales para ejecutar la respuesta citotóxica contra las células tumorales. Además, los epítomos de clase II demostraron una antigenicidad y afinidad por diversos alelos DRB1, lo que facilitó la activación de las células T helper y posteriormente potenció las respuestas de memoria humoral e inmunológica.

Una característica particularmente sobresaliente fue la cobertura poblacional estimada. A nivel global, se anticipó que los epítomos incorporados dentro del diseño de la vacuna podrían ser reconocidos por los sistemas inmunes del 99.26% de la población, y específicamente en el contexto de México, en 98.37% ya que incluye epítomos con alta frecuencia en esta población HLA-A*02, HLA-B*35:01 y HLA-B*40:02 para MHC-I y HLA-DRB1*04:07 para MHC-II (Arnaiz-Villena et al., 2020; Leal et al., 2005). Esta cobertura casi universal refuerza la relevancia del constructo vacunal como instrumento para futuras aplicaciones clínicas.

El análisis estructural de la proteína codificada por el plásmido DNA-WT1 dilucidó que los epítomos inmunogénicos están situados en las regiones accesibles de la superficie de la proteína. Esta configuración es crítica para su procesamiento por las células presentadoras de antígenos (APC) y su posterior visualización a los linfocitos T (Sette & Rappuoli, 2010). La proteína exhibió una conformación predominantemente desordenada, con 86% de su estructura adoptando una configuración de regiones aleatorias. Esta característica, más que ser un pasivo, puede conferir flexibilidad estructural que potencia la interacción del antígeno con el sistema inmune facilitando el acceso a proteasas de las APC y promover interacciones dinámicas con receptores inmunes (Dunker et al., 2013). Sin embargo, esta conformación con alto contenido de desorden estructural podría comprometer su estabilidad térmica pero esta flexibilidad puede ser funcionalmente ventajosa en el reconocimiento molecular (Uversky, 2013). Además, el parecido estructural entre la proteína recombinante y la forma nativa de WT1 puede suscitar una respuesta inmune específica contra las células tumorales que sobreexpresan este antígeno (Cheever et al., 2009; Sugiyama, 2010).

La vacuna de DNA-WT1 exhibió un perfil bioquímico que se alinea con los criterios necesarios para el desarrollo de una formulación vacunal estable. Presenta un punto isoelectrico fundamental (pI de 9.26), un índice de solubilidad adecuado, y un valor GRAVY negativo, que colectivamente sugieren una característica hidrofílica favorable propicia para la expresión y manipulación. Además, las evaluaciones *in silico* de toxicidad y alergenicidad descartaron la posibilidad de riesgos inmunológicos indeseables, con lo que se afirmó que el constructo es no alergénico, no tóxico, y posee una semivida adecuada para la evaluación preclínica (Dimitrov et al., 2014). Estos atributos son críticos para garantizar su aplicación experimental sin producir estos efectos adversos en un modelo murino.

Los estudios *in silico* relativo a las respuestas inmunitarias demostraron una activación sistémica y eficaz del sistema inmune. Durante la fase inicial de la respuesta inmune humoral se documentó una síntesis preliminar de IgM, sucedida por una notable proliferación de IgG1 e IgG2, lo que implica una maduración de la respuesta inmune acoplada a un interruptor de isotipo por la activación de linfocitos T helper (Fink, 2012).

Al mismo tiempo, se observó una proliferación persistente de células T CD8+ junto a una elevada secreción de citocinas proinflamatorias, incluyendo IFN- γ e IL-2, lo que significa un cambio hacia una respuesta inmune tipo Th1, que es particularmente potente dentro del paradigma de la inmunoterapia antitumoral (Melero et al., 2014). La formación poblaciones de células T de memoria, junto con la activación de células presentadoras de antígenos como células dendríticas y macrófagos, fundamenta la noción de que el constructo no solo induce una respuesta inmune efectiva sino que también cultiva una inmunidad duradera (Saade & Petrovsky, 2012).

La caracterización molecular del plásmido mediante digestión con enzimas de restricción corroboró la presencia del inserto, el cual exhibió el tamaño anticipado de aproximadamente 815 pb. Siguiendo esto, se evaluó su funcionalidad en células de melanoma murino B16F10, donde se detectó la expresión de la proteína de aproximadamente 25-30 kDa, correspondiente al antígeno diseñado. Estos resultados no sólo afirma la integridad estructural del plásmido sino que también ilustran su capacidad para expresar el antígeno, potenciando así su utilidad potencial como agente inmunoterapéutico.

En las evaluaciones *ex vivo*, los esplenocitos recolectados de ratones inmunizados con la vacuna DNA-WT1 mostraron un efecto citotóxico contra la línea celular B16F10 (que presenta una expresión elevada de WT1), en contraste con la línea 4T1 (caracterizada por una expresión más baja). Esta observación subraya el procesamiento y la presentación adecuados de los antígenos endógenos por parte de las células transducidas y las células presentadoras de antígenos especializadas (APC), lo que mejora el reconocimiento por parte de las células T CD8+ y su posterior impacto citotóxico en las células con una expresión pronunciada de WT1 (Robinson, 1999).

A diferencia de las vacunas convencionales que requieren el uso de adyuvantes, las vacunas de DNA poseen características inmunoestimuladoras innatas, activadas por los receptores de reconocimiento de patrones (PRR) del sistema inmunitario innato, que incitan señales proinflamatorias y facilitan la maduración de las APC (Suschak et al., 2016). Como resultado, la vacuna DNA-WT1 administrada sin ningún adyuvante produjo

un efecto profiláctico significativamente mejorado en comparación con su contraparte que contenía adyuvante, lo que demuestra sus notables capacidades de autoadyuvación.

En última instancia, la monitorización del peso corporal de los modelos murinos validó el perfil de seguridad de la vacuna. Los ratones vacunados, independientemente de la presencia de adyuvante, mostraron un aumento de peso a lo largo del experimento, en marcado contraste con el grupo de control (que recibió solución salina), que experimentó una disminución de peso notable. Según Zhao y otros, de 2022, se considera que una pérdida de peso del 5 al 10% entra dentro del ámbito de las fluctuaciones fisiológicas normales en los animales jóvenes (H. Zhao et al., 2022). Esto sugiere que el DNA-WT1 no induce ningún efecto adverso fisiológico y que la presencia del adyuvante no proporcionó ningún beneficio adicional en cuanto a la seguridad.

8. CONCLUSIÓN

- La vacuna DNA-WT1 demostró un efecto citotóxico mejorado en comparación con la administración de la misma vacuna junto con el adyuvante.
- La proporción elevada de esplenocitos con respecto a las células tumorales aumentó el efecto citotóxico en el grupo de la vacuna sin adyuvante, a diferencia del grupo que recibió la vacuna combinada con adyuvante, en las líneas celulares B16F10 y 4T1.
- La eficacia de la vacuna DNA-WT1 está directamente asociada con los niveles de expresión de WT1; una mayor expresión dentro de la línea celular se correlaciona con un efecto citotóxico más pronunciado observado *in vitro*.
- La vacuna DNA-WT1 se considera segura en un modelo murino, ya que la monitorización del peso corporal indicó un aumento en relación con el peso inicial de los sujetos.
- No se observaron efectos adversos en los ratones tratados con la vacuna DNA-WT1
- La vacuna DNA-WT1 presenta un efecto profiláctico, como lo demuestra el crecimiento tumoral mínimo observado en comparación con el grupo de control al que se administró solución salina.

9. PERSPECTIVAS

- Determinar si la administración del adyuvante influye en la viabilidad de las células tumorales.
- Evaluar el efecto citotóxico sobre la línea celular K562, con alta expresión de WT1, y compararlo con el efecto observado en las líneas celulares 4T1 y B16F10.
- Determinar el momento óptimo de administración del adyuvante durante el esquema de inmunización.

10. BIBLIOGRAFÍA

1. Algar, E. M., Khromykh, T., Smith, S. I., Blackburn, D. M., Bryson, G. J., & Smith, P. J. (1996). A WT1 antisense oligonucleotide inhibits proliferation and induces apoptosis in myeloid leukaemia cell lines. *Oncogene*, 12(5), 1005-1014.
2. Amens, J. N., Bahçecioglu, G., & Zorlutuna, P. (2021). Immune System Effects on Breast Cancer. *Cellular and Molecular Bioengineering*, 14(4), 279-292. <https://doi.org/10.1007/s12195-021-00679-8>
3. Arnaiz-Villena, A., Juarez, I., Lopez-Nares, A., Crespo-Yuste, E., Callado, A., & Suarez-Trujillo, F. (2020). HLA study in Amerindian Bolivia La Paz Aymaras. *Human Immunology*, 81(6), 265-266. <https://doi.org/10.1016/j.humimm.2020.04.005>
4. Arriaga, Daniela. (2016). *EVALUACIÓN DE LA ADMINISTRACIÓN VÍA AEROSOL DE LA VACUNA SINTÉTICA BASADA EN WT1-CPG EN UN MODELO DE CÁNCER PULMONAR*. Universidad Autónoma de Nuevo León.
5. Bivas-Benita, M., Bar, L., Gillard, G. O., Kaufman, D. R., Simmons, N. L., Hovav, A.-H., & Letvin, N. L. (2010). Efficient Generation of Mucosal and Systemic Antigen-Specific CD8⁺ T-Cell Responses following Pulmonary DNA Immunization. *Journal of Virology*, 84(11), 5764-5774. <https://doi.org/10.1128/JVI.02202-09>
6. Chavez, Karina. (2017). *EVALUACIÓN DE LA RESPUESTA INMUNE PULMONAR POR LA VACUNACIÓN VÍA AEROSOL DE DNA CONTRA WT1 EN UN MODELO DE CÁNCER MURINO*. Universidad Autónoma de Nuevo León.
7. Cheever, M. A., Allison, J. P., Ferris, A. S., Finn, O. J., Hastings, B. M., Hecht, T. T., Mellman, I., Prindiville, S. A., Viner, J. L., Weiner, L. M., & Matrisian, L. M. (2009). The Prioritization of Cancer Antigens: A National Cancer Institute Pilot Project for the Acceleration of Translational Research. *Clinical Cancer Research*, 15(17), 5323-5337. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-09-0737>
8. Clarke, M., Collins, R., Darby, S., Davies, C., Elphinstone, P., Evans, V., Godwin, J., Gray, R., Hicks, C., James, S., MacKinnon, E., McGale, P., McHugh, T., Peto, R., Taylor, C., Wang, Y., & Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group

- (EBCTCG). (2005). Effects of radiotherapy and of differences in the extent of surgery for early breast cancer on local recurrence and 15-year survival: An overview of the randomised trials. *Lancet (London, England)*, 366(9503), 2087-2106. [https://doi.org/10.1016/S01406736\(05\)67887-7](https://doi.org/10.1016/S01406736(05)67887-7)
9. Dimitrov, I., Bangov, I., Flower, D. R., & Doytchinova, I. (2014). AllerTOP v.2—A server for in silico prediction of allergens. *Journal of Molecular Modeling*, 20(6), 2278. <https://doi.org/10.1007/s00894-014-2278-5>
 10. Dunker, A. K., Babu, M. M., Barbar, E., Blackledge, M., Bondos, S. E., Dosztányi, Z., Dyson, H. J., Forman-Kay, J., Fuxreiter, M., Gsponer, J., Han, K.-H., Jones, D. T., Longhi, S., Metallo, S. J., Nishikawa, K., Nussinov, R., Obradovic, Z., Pappu, R. V., Rost, B., ... Uversky, V. N. (2013). What's in a name? Why these proteins are intrinsically disordered: Why these proteins are intrinsically disordered. *Intrinsically Disordered Proteins*, 1(1), e24157. <https://doi.org/10.4161/idp.24157>
 11. Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group (EBCTCG). (2005). Effects of chemotherapy and hormonal therapy for early breast cancer on recurrence and 15-year survival: An overview of the randomised trials. *Lancet (London, England)*, 365(9472), 1687-1717. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(05\)66544-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(05)66544-0)
 12. Fink, K. (2012). Origin and Function of Circulating Plasmablasts during Acute Viral Infections. *Frontiers in Immunology*, 3. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2012.00078>
 13. Gaiger, A., Reese, V., Disis, M. L., & Cheever, M. A. (2000a). Immunity to WT1 in the animal model and in patients with acute myeloid leukemia. *Blood*, 96(4), 1480-1489. <https://doi.org/10.1182/blood.V96.4.1480>
 14. Gaiger, A., Reese, V., Disis, M. L., & Cheever, M. A. (2000b). Immunity to WT1 in the animal model and in patients with acute myeloid leukemia. *Blood*, 96(4), 1480-1489.
 15. Gambirasi, M., Safa, A., Vruzha, I., Giacomini, A., Sartor, F., & Toffoli, G. (2023). Oral Administration of Cancer Vaccines: Challenges and Future Perspectives. *Vaccines*, 12(1), 26. <https://doi.org/10.3390/vaccines12010026>

16. Goldhirsch, A., Wood, W. C., Gelber, R. D., Coates, A. S., Thürlimann, B., Senn, H.-J., & 10th St. Gallen conference. (2007). Progress and promise: Highlights of the international expert consensus on the primary therapy of early breast cancer 2007. *Annals of Oncology: Official Journal of the European Society for Medical Oncology*, 18(7), 1133-1144. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdm271>
17. Han, Y., San-Marina, S., Yang, L., Khoury, H., & Minden, M. D. (2007). The zinc finger domain of Wilms' tumor 1 suppressor gene (WT1) behaves as a dominant negative, leading to abrogation of WT1 oncogenic potential in breast cancer cells. *Breast Cancer Research*, 9(4), R43. <https://doi.org/10.1186/bcr1743>
18. Hassin, D., Garber, O. G., Meiraz, A., Schiffenbauer, Y. S., & Berke, G. (2011). Cytotoxic T lymphocyte perforin and Fas ligand working in concert even when Fas ligand lytic action is still not detectable: CTL perforin and FasL complementation. *Immunology*, 133(2), 190-196. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2567.2011.03426.x>
19. Hill, B. T. (2019). Etiology of Cancer. En A. D. Singh & B. E. Damato (Eds.), *Clinical Ophthalmic Oncology* (pp. 11-17). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-030-04489-3_2
20. Islam, M. A., Firdous, J., Badruddoza, A. Z. M., Reesor, E., Azad, M., Hasan, A., Lim, M., Cao, W., Guillemette, S., & Cho, C. S. (2019). M cell targeting engineered biomaterials for effective vaccination. *Biomaterials*, 192, 75-94. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2018.10.041>
21. Kramarzova, K., Stuchly, J., Willasch, A., Gruhn, B., Schwarz, J., Cermak, J., MachovaPolakova, K., Fuchs, O., Stary, J., Trka, J., & Boublikova, L. (2012). Real-time PCR quantification of major Wilms' tumor gene 1 (WT1) isoforms in acute myeloid leukemia, their characteristic expression patterns and possible functional consequences. *Leukemia*, 26(9), 2086-2095. <https://doi.org/10.1038/leu.2012.76>
22. Leal, C. A., Mendoza-Carrera, F., Rivas, F., Rodriguez-Reynoso, S., & Portilla-de Buen, E. (2005). HLA-A and HLA-B allele frequencies in a mestizo population from Guadalajara, Mexico, determined by sequence-based typing. *Tissue Antigens*, 66(6), 666–673. <https://doi.org/10.1111/j.1399-0039.2005.00495.x>

23. Lee-Chang, C., Bodogai, M., Martin-Montalvo, A., Wejksza, K., Sanghvi, M., Moaddel, R., De Cabo, R., & Biragyn, A. (2013). Inhibition of Breast Cancer Metastasis by Resveratrol-Mediated Inactivation of Tumor-Evoked Regulatory B Cells. *The Journal of Immunology*, 191(8), 4141-4151. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1300606>
24. Liu, J., Fu, M., Wang, M., Wan, D., Wei, Y., & Wei, X. (2022). Cancer vaccines as promising immuno-therapeutics: Platforms and current progress. *Journal of Hematology & Oncology*, 15(1), 28. <https://doi.org/10.1186/s13045-022-01247-x>
25. Mansel, R. E., Fallowfield, L., Kissin, M., Goyal, A., Newcombe, R. G., Dixon, J. M., Yiangou, C., Horgan, K., Bundred, N., Monypenny, I., England, D., Sibbering, M., Abdullah, T. I., Barr, L., Chetty, U., Sinnott, D. H., Fleissig, A., Clarke, D., & Ell, P. J. (2006). Randomized multicenter trial of sentinel node biopsy versus standard axillary treatment in operable breast cancer: The ALMANAC Trial. *Journal of the National Cancer Institute*, 98(9), 599-609. <https://doi.org/10.1093/jnci/djj158>
26. Maugeri, G., Grazia D'Amico, A., Maria Rasà, D., Reitano, R., Saccone, S., Federico, C., Parenti, R., Magro, G., & D'Agata, V. (2016). Expression profile of Wilms Tumor 1 (WT1) isoforms in undifferentiated and all-trans retinoic acid differentiated neuroblastoma cells. *Genes & Cancer*, 7(1-2), 47-58. <https://doi.org/10.18632/genesandcancer.94>
27. Melero, I., Gaudernack, G., Gerritsen, W., Huber, C., Parmiani, G., Scholl, S., Thatcher, N., Wagstaff, J., Zielinski, C., Faulkner, I., & Mellstedt, H. (2014). Therapeutic vaccines for cancer: An overview of clinical trials. *Nature Reviews Clinical Oncology*, 11(9), 509–524. <https://doi.org/10.1038/nrclinonc.2014.111>
28. Maughan, K. L., Lutterbie, M. A., & Ham, P. S. (2010). Treatment of breast cancer. *American Family Physician*, 81(11), 1339-1346.
29. Nazir, S. U., Kumar, R., Singh, A., Khan, A., Tanwar, P., Tripathi, R., Mehrotra, R., & Hussain, S. (2019). Breast cancer invasion and progression by MMP-9 through Ets-1 transcription factor. *Gene*, 711, 143952. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2019.143952>
30. Nicoli, P., Defilippi, I., Carturan, S., Roetto, A., Messa, F., Arruga, F., Messa, E., Rotolo, A., Iacobucci, I., Bracco, E., Saglio, G., & Cilloni, D. (2008). Detection of

- Humoral Immune Responses against WT1 Antigen in Patients Affected by Different Hematological Malignancies. *Acta Haematologica*, 120(1), 47-50. <https://doi.org/10.1159/000158576>
31. Nishida, S., Hosen, N., Shirakata, T., Kanato, K., Yanagihara, M., Nakatsuka, S., Hoshida, Y., Nakazawa, T., Harada, Y., Tatsumi, N., Tsuboi, A., Kawakami, M., Oka, Y., Oji, Y., Aozasa, K., Kawase, I., & Sugiyama, H. (2006). AML1-ETO rapidly induces acute myeloblastic leukemia in cooperation with the Wilms tumor gene, WT1. *Blood*, 107(8), 3303-3312. <https://doi.org/10.1182/blood-2005-04-1656>
 32. Oji, Y., Kagawa, N., Arita, H., Naka, N., Hamada, K., Outani, H., Shintani, Y., Takeda, Y., Morii, E., Shimazu, K., Suzuki, M., Nishida, S., Nakata, J., Tsuboi, A., Iwai, M., Hayashi, S., Imanishi, R., Ikejima, S., Kanegae, M., ... Sugiyama, H. (2023). WT1 Trio PeptideBased Cancer Vaccine for Rare Cancers Expressing Shared Target WT1. *Cancers*, 15(2), 393. <https://doi.org/10.3390/cancers15020393>
 33. Oka, Y., Tsuboi, A., Elisseeva, O., Udaka, K., & Sugiyama, H. (2002). WT1 as a Novel Target Antigen for Cancer Immunotherapy. *Current Cancer Drug Targets*, 2(1), 45-54. <https://doi.org/10.2174/1568009023334088>
 34. Reina, R., Barbezange, C., Niesalla, H., De Andrés, X., Arnarson, H., Biescas, E., Mazzei, M., Fraiser, C., McNeilly, T. N., Liu, C., Perez, M., Carrozza, M. L., Bandecchi, P., Solano, C., Crespo, H., Glaria, I., Huard, C., Shaw, D. J., De Blas, I., ... Harkiss, G. D. (2008). Mucosal immunization against ovine lentivirus using PEI–DNA complexes and modified vaccinia Ankara encoding the gag and/or env genes. *Vaccine*, 26(35), 4494-4505. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2008.06.065>
 35. Roberts, E. W., Broz, M. L., Binnewies, M., Headley, M. B., Nelson, A. E., Wolf, D. M., Kaisho, T., Bogunovic, D., Bhardwaj, N., & Krummel, M. F. (2016). Critical Role for CD103+/CD141+ Dendritic Cells Bearing CCR7 for Tumor Antigen Trafficking and Priming of T Cell Immunity in Melanoma. *Cancer Cell*, 30(2), 324-336. <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2016.06.003>
 36. Romond, E. H., Perez, E. A., Bryant, J., Suman, V. J., Geyer, C. E., Davidson, N. E., TanChiu, E., Martino, S., Paik, S., Kaufman, P. A., Swain, S. M., Pisansky, T. M.,

- Fehrenbacher, L., Kutteh, L. A., Vogel, V. G., Visscher, D. W., Yothers, G., Jenkins, R. B., Brown, A. M., ... Wolmark, N. (2005). Trastuzumab plus adjuvant chemotherapy for operable HER2-positive breast cancer. *The New England Journal of Medicine*, 353(16), 1673-1684. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa052122>
37. Saade, F., & Petrovsky, N. (2012). Technologies for enhanced efficacy of DNA vaccines. *Expert Review of Vaccines*, 11(2), 189–209. <https://doi.org/10.1586/erv.11.188>
38. Schiller, J. T., & Lowy, D. R. (2012). Understanding and learning from the success of prophylactic human papillomavirus vaccines. *Nature Reviews Microbiology*, 10(10), 681-692. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2872>
39. Schwartz, M., Zhang, Y., & Rosenblatt, J. D. (2016). B cell regulation of the anti-tumor response and role in carcinogenesis. *Journal for ImmunoTherapy of Cancer*, 4(1), 40. <https://doi.org/10.1186/s40425-016-0145-x>
40. Sette, A., & Rappuoli, R. (2010). Reverse Vaccinology: Developing Vaccines in the Era of Genomics. *Immunity*, 33(4), 530–541. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2010.09.017>
41. Smith, I., Procter, M., Gelber, R. D., Guillaume, S., Feyereislova, A., Dowsett, M., Goldhirsch, A., Untch, M., Mariani, G., Baselga, J., Kaufmann, M., Cameron, D., Bell, R., Bergh, J., Coleman, R., Wardley, A., Harbeck, N., Lopez, R. I., Mallmann, P., ... HERA study team. (2007). 2-year follow-up of trastuzumab after adjuvant chemotherapy in HER2-positive breast cancer: A randomised controlled trial. *Lancet (London, England)*, 369(9555), 29-36. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(07\)60028-2](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(07)60028-2)
42. Sugiyama, H. (2010). WT1 (Wilms' Tumor Gene 1): Biology and Cancer Immunotherapy. *Japanese Journal of Clinical Oncology*, 40(5), 377-387. <https://doi.org/10.1093/jjco/hyp194>
43. Tojjari, A., Saeed, A., Singh, M., Cavalcante, L., Sahin, I. H., & Saeed, A. (2023). A Comprehensive Review on Cancer Vaccines and Vaccine Strategies in Hepatocellular Carcinoma. *Vaccines*, 11(8), 1357. <https://doi.org/10.3390/vaccines11081357>

44. Uversky, V. N. (2013). Intrinsic Disorder-based Protein Interactions and their Modulators. *Current Pharmaceutical Design*, 19(23), 4191–4213. <https://doi.org/10.2174/1381612811319230005>
45. Van Driessche, A., Berneman, Z. N., & Van Tendeloo, V. F. I. (2012). Active specific immunotherapy targeting the Wilms' tumor protein 1 (WT1) for patients with hematological malignancies and solid tumors: Lessons from early clinical trials. *The Oncologist*, 17(2), 250-259. <https://doi.org/10.1634/theoncologist.2011-0240>
46. Wayne Conlan, J., Shen, H., KuoLee, R., Zhao, X., & Chen, W. (2005). Aerosol-, but not intradermal-immunization with the live vaccine strain of *Francisella tularensis* protects mice against subsequent aerosol challenge with a highly virulent type A strain of the pathogen by an $\alpha\beta$ T cell- and interferon gamma- dependent mechanism. *Vaccine*, 23(19), 2477-2485. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2004.10.034>
47. Weulek, S. K., Cueto, F. J., Mujal, A. M., Melero, I., Krummel, M. F., & Sancho, D. (2020). Dendritic cells in cancer immunology and immunotherapy. *Nature Reviews Immunology*, 20(1), 7-24. <https://doi.org/10.1038/s41577-019-0210-z>
48. Wu, F., Oka, Y., Tsuboi, A., Elisseeva, O. A., Ogata, K., Nakajima, H., Fujiki, F., Masuda, T., Murakami, M., Yoshihara, S., Ikegame, K., Hosen, N., Kawakami, M., Nakagawa, M., Kubota, T., Soma, T., Yamagami, T., Tsukaguchi, M., Ogawa, H., ... Sugiyama, H. (2005). Th1-biased humoral immune responses against Wilms tumor gene WT1 product in the patients with hematopoietic malignancies. *Leukemia*, 19(2), 268-274. <https://doi.org/10.1038/sj.leu.2403539> .
49. Zhang, Y., Yan, W.-T., Yang, Z.-Y., Li, Y.-L., Tan, X.-N., Jiang, J., Zhang, Y., & Qi, X.-W. (2020). The role of WT1 in breast cancer: Clinical implications, biological effects and molecular mechanism. *International Journal of Biological Sciences*, 16(8), 1474-1480. <https://doi.org/10.7150/ijbs.39958>