

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



ACTIVIDAD CITOTÓXICA DE LINFOCITOS T CD8<sup>+</sup> ESTIMULADOS CON INTERLEUCINA 15 y 21  
CONTRA LA LINEA TUMORAL DE CÁNCER DE MAMA MCF-7 *IN VITRO*.

Por

Q.F.B. LUIS FELIPE OLGUÍN CONTRERAS

Como requisito parcial para obtener el Grado de  
MAESTRO EN CIENCIAS con acentuación en Inmunobiología

Agosto 2012

**ACTIVIDAD CITOTÓXICA DE LINFOCITOS T CD8<sup>+</sup> ESTIMULADOS CON  
INTERLEUCINA 15 y 21 CONTRA LA LINEA TUMORAL DE  
CÁNCER DE MAMA MCF-7 *IN VITRO*.**

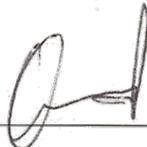
**Comité de Tesis**



---

Director de Tesis

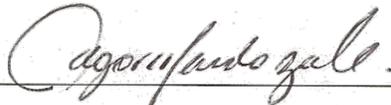
**Dra. Cristina Rodríguez Padilla**



---

Secretario

**Dr. Moisés A. Franco Molina**



---

Vocal

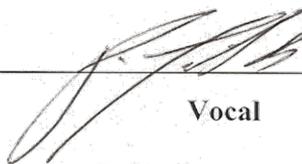
**Dr. Edgar Mendoza Gamboa**



---

Vocal

**Dr. Ricardo Gómez Flores**



---

Vocal

**Dr. Pablo Zapata Benavides**



**El presente trabajo fue desarrollado en el Laboratorio de Inmunología y Virología de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León, bajo la dirección de la Dra. Cristina Rodríguez Padilla.**

## TABLA DE CONTENIDO

<b>Sección</b>	<b>Página</b>
AGRADECIMIENTOS.....	i
DEDICATORIA.....	iv
LISTA DE TABLAS .....	v
LISTA DE FIGURAS .....	vi
NOMENCLATURA.....	viii
RESUMEN.....	xi
ABSTRACT.....	xii
1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. ANTECEDENTES.....	3
2.1 Cáncer.....	3
2.2 Inmunología del cáncer.....	5
2.3 Cáncer de mama .....	6
2.4 Inmunoterapia.....	7
2.5 Inmunoterapia de células T adoptivas.....	8
2.6 Antígenos tumorales.....	10
2.7 Procesamiento de antígenos y HLA.....	11
2.8 HLA-A*0201 en inmunoterapia.....	13
2.9 WT1 en cáncer de mama .....	14
2.10 Citocinas.....	16
2.11 Citocinas de la cadena gamma común.....	17
2.12 IL-2.....	18

2.13	Receptor de IL-2.....	18
2.14	IL-15.....	19
2.15	IL-21.....	20
3.	HIPÓTESIS.....	22
4.	OBJETIVOS.....	23
4.1	Objetivo general.....	23
4.2	Objetivos particulares.....	23
5.	MATERIALES Y MÉTODOS.....	24
5.1	Descripción de la línea celular MCF-7.....	24
5.2	Citocinas y péptido WT1.....	24
5.3	Tipificación de HLA-A.....	25
5.4	Detección de WT1 en la línea tumoral MCF-7.....	26
5.5	Preparación de células T.....	27
5.6	Obtención de células dendríticas a partir de monocitos de sangre periférica .....	28
5.7	Análisis de fenotipo de células dendríticas a partir de monocitos de sangre periféricas.....	28
5.8	Ensayo de fagocitosis con FITC-Dextran.....	29
5.9	Generación de linfocitos T CD8 <sup>+</sup> antígeno-específicos productores de IFN $\gamma$ .....	30
5.10	Ensayo de citotoxicidad de linfocitos T CD8 <sup>+</sup> frente a líneas tumorales de cáncer de mama MCF-7 <i>in vitro</i> .....	31
5.11	Análisis Estadístico.....	33
6.	RESULTADOS .....	34
6.1	Determinación del alelo de histocompatibilidad HLA-A*02.....	34
6.2	Generación de células dendríticas a partir de monocitos de sangre periférica de donadores HLA-A*02+.....	36

6.3 Detección de la expresión de la proteína WT1 en la línea celular tumoral de cáncer de mama MCF-7.....	40
6.4 Producción de IFN- $\gamma$ de los LSP estimulados con células dendríticas en presencia de IL-2, IL-15, IL-21 e IL-15/IL-21.....	41
6.5 Separación magnética de LT CD8 <sup>+</sup> .....	43
6.6 Evaluación de la citotoxicidad de LT CD8 <sup>+</sup> en contra de la línea celular tumoral de cáncer de mama MCF-7.....	44
7. DISCUSIÓN.....	51
8. CONCLUSIONES.....	60
9. PERSPECTIVAS.....	61
10. LITERATURA CITADA .....	63
11. RESUMEN BIOGRÁFICO.....	75

*"Estoy satisfecho con el misterio de la eternidad de la vida y con el conocimiento y el sentido de la maravillosa estructura de la existencia. Con el humilde intento de comprender aunque solamente sea una porción diminuta de la Razón que se manifiesta en la naturaleza".*

*Albert Einstein*

## **AGRADECIMIENTOS**

### ***A Dios***

*Por ser siempre una constante en mi vida, mostrarme lo valioso de los pequeños detalles y demostrarme a cada paso que doy, que la Fe hoy más que nunca no son solo palabras, sino acciones que se transmiten y se contagian a través de cada una de las cosas que hacemos y que amamos en la vida.*

### ***A mis papás***

*Por ser siempre mi apoyo incondicional, que en momentos de grandes decisiones han estado a mi lado y han confiado siempre en mí. Equilibrio como el que me brindan mis padres es lo que me ha sostenido en momentos difíciles, y es gracias a ellos que soy el profesionalista, hijo, hermano y tío que soy ahora, son la razón de mis esfuerzos e indudablemente los orgullosos merecedores de todas sus recompensas, los amo con todo mi corazón!*

### ***A mi hermano Juan***

*Por hacerme sentir cada día que en las buenas y en las malas siempre estaremos juntos, por la confianza que siempre me has tenido y preocuparte siempre por mi bienestar, entre nosotros siempre las palabras han estado de mas pero quiero que sepas que estamos siempre en busca del equilibrio y tú siempre formarás parte del mío, te amo brother!*

### ***A la Dra. Cristina Rodríguez Padilla***

*Jefa del Departamento de Inmunología y Virología de la Facultad de Ciencias Biológicas de la UANL, directora de tesis de este trabajo, le agradezco su apoyo y confianza a lo largo de este tiempo.*

### ***Al Dr. Moisés Franco Molina***

*Por ser mi asesor durante la realización de mi trabajo experimental y la revisión de mi trabajo de tesis, por la confianza que depositó en mí desde el día en que llegué al laboratorio y que ha permanecido constante hasta el día de hoy, muchas gracias.*

### ***A mi comité de Tesis***

*Dr. Edgar Mendoza, por su gran disposición y ayuda brindada durante el desarrollo de mi proyecto y sus importantes observaciones en la revisión del mismo, al Dr. Pablo Zapata Benavides, por su colaboración y apoyo en aspectos técnicos para el mejoramiento de mi trabajo, y al Dr. Ricardo Gómez Flores, por sus enseñanzas transmitidas en clase y con su ejemplo, así como también por su colaboración en la revisión de mi documento de tesis.*

***A la Maestra Herlinda Vielma***

*Por su importante colaboración en el área de citometría de flujo, por su disponibilidad, su confianza y ayuda, por enseñarme una de las técnicas que tanto me gusta, y sobre todo por su paciencia durante el análisis de todas mis muestras y estandarización de mis protocolos.*

***A la Dra. Susanne Wilde***

*Miembro del grupo de trabajo de la Dra. Dolores J. Schendel en el Instituto de Inmunología Molecular del German Research Center for Environmental Health en Munich, Alemania, por su invaluable colaboración para la comprensión y desarrollo de los protocolos de generación de células dendríticas y activación de linfocitos T, por su tiempo, disposición, orientación y paciencia para responder a todas las preguntas y dudas en puntos clave de mi trabajo, y por demostrarme que parte importante de ser un buen investigador es siempre estar abierto a colaborar al desarrollo del conocimiento en nuestra área siempre con sencillez y humildad.*

***A la M.C. Michelle Zamudio Ozuna***

*Por el apoyo brindado con la tipificación de el alelo de histocompatibilidad HLA-A en el Departamento de Hematología del Hospital Universitario Dr. José Eleuterio González de Monterrey, NL, México.*

***A Faby (Diana Fabiola Miranda Hernández)***

*Porque con la donación de su sangre hizo posible el desarrollo de mis experimentos y la obtención de mis resultados, solo ella sabe la importancia que eso tenía para mí y mi proyecto, contar con su ayuda siempre me motivo a dar lo mejor de mí, por su disponibilidad y paciencia en cada toma de muestra, a riesgo de que en una de esas se me fuera a desmayar jeje, por ser mi amiga, por compartir conmigo estos años de trabajo, estrés, alegrías y tristezas, por entrar en mi vida, por abrirme las puertas de tu casa, por tu confianza, por ser tú, porque me has dejado ver a la maravillosa persona que hay en ti, y con eso me has permitido ser parte de tu vida, esas son las cosas mas valiosas que guardo con candado y bajo llave para no perderlas nunca, y porque si no te hubiera conocido, pensar en el tiempo que he estado en Monterrey e incluso en mi mismo no sería lo mismo, gracias por TODO te quiero mucho!*

***A Gisela Lizaran***

*Por su disponibilidad cuando necesite una donación de su sangre ya que fue la segunda agraciada en cumplir con los requisitos para hacerlo, parte importante de los resultados de este trabajo es gracias a ti.*

### ***A mis compañeros y amigos de laboratorio***

*A todos y cada uno de los que han formado parte del laboratorio durante este tiempo y que con su amistad y apoyo han convertido esta experiencia y este logro en algo maravilloso, Paloma, Luis Antonio (luisillo), Crystel (Cris), José Juan (JJ, entre otros apodos ganados a pulso jaja), Ayleen, Edgar, Paola García, Magda Celina, Edgar Manilla, Santiago Saavedra, Caro Becerril (Miss liberty), Ashanti, Karla Morán, Talyha, Itza, Jeanny, muchas gracias a todos, que cada uno con su ayuda, platicas y momentos de diversión hicieron de mi estancia algo digno de recordar.*

### ***A los miembros del LIV***

*Maestros, compañeros y personal que también fueron parte importante en la realización de mi trabajo ya sea con apoyo técnico, material, equipo o trámites cuando se requería.*

### ***A todos mis compañeros de clase***

*Porque aún con largas horas de clase siempre logramos pasar un rato muy ameno, en especial a Gaby, Judith y Clara que aunque de la misma generación pero diferente acentuación fueron parte importante de mi vida y mi trabajo con su ayuda, apoyo y los buenos momentos que pasamos en todas las clases y también fuera de ellas.*

### ***A Sarahí***

*Porque aún con la distancia siempre nos las hemos arreglado para sentir que nuestra amistad se fortalece con cada día que pasa, eres más que mi amiga, eres mi fraterna, mi confidente, quien siempre sabe darme equilibrio con las palabras adecuadas y directas, una hermana que Dios me regaló y que nunca ha dejado de apoyarme y confiar en mí en todos los aspectos, gracias por siempre estar, te quiero muchísimo!*

### ***A todos mis amigos de Durango***

*Porque gracias a Dios tengo la fortuna de contar con una segunda familia tan grande como ustedes, y aunque no me alcanza la tesis para escribir todos sus nombres tengo la confianza que saben que tienen su lugar dentro de estas palabras y que forman parte fundamental de mi vida y mi rompecabezas, hacen del paisaje de mi vida algo maravilloso.*

*Agradezco también al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por brindarme el apoyo económico para la realización de mis estudios de maestría encontrándome en una ciudad lejana a mi lugar de origen.*

*Finalmente debo realizar un agradecimiento muy especial a la **Dra. Angélica Santana** por haber sido quien despertó en mí el gusto y la pasión por la inmunología, con su conocimiento, sencillez, humildad y compromiso, así como también a todo su equipo de trabajo en el laboratorio de Biología Celular y Molecular de la Facultad de Ciencias de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos.*

## DEDICATORIA

*A mi familia, las personas que día con día dan desinteresadamente lo mejor de ellos para impulsar mis sueños y ver cumplidas mis metas, que se desvelaron a mi lado, que se estresaron conmigo, que se preocuparon por mí, que con una llamada bastaba para que sintiera de nuevo la motivación de comenzar con mas ánimo el día siguiente, que el estar lejos de mi hogar nunca significó un desafío para su amor y su incondicionalidad, palabras siempre me faltan cuando tengo que agradecer al pilar de mi vida y la razón de mis triunfos... mi familia.*

*A mi mamá, Alma Rosa Contreras Treviño, que es ejemplo claro del amor incondicional y confianza plena, que vivió estos años de estudio siempre a mi lado con palabras de aliento, importantes consejos y siempre guiando mis acciones de manera que aprendiera que muchas veces mas allá de la razón siempre esta el corazón, que para tomar decisiones es imposible dejarlo de lado, sobre todo cuando se trata del trabajo que amamos y los sueños que perseguimos, eso es algo que no se enseña con palabras, eso se transmite y solo tú has sabido hacerlo mamá, gracias por ser la mejor.*

*A mi papá, Francisco Olguín Figueroa, un ejemplo de superación que jamás dejaré de tener presente, siempre me hizo ver con la perspectiva adecuada la mejor manera de aprender a tomar decisiones, por su amor que va mas allá de las palabras, su apoyo, que siempre lo llevó a estar para mí hasta en las circunstancias mas difíciles y situaciones mas complicadas, por su confianza y sobre todo por su capacidad de escucharme y entender mi lado racional y devolverme en palabras lo que muchas veces es tan complicado, que es el sentimiento de que pese a todo siempre tendré la capacidad de elegir lo mejor para mi vida.*

*A mi hermano Juan Francisco Olguín Contreras, en la vida no hay mejor compañía que la de un hermano, no hay complicidad y entendimiento que supere lo que hemos compartido juntos, porque siempre te has preocupado por verme feliz, y me has apoyado siempre que la vida me ha puesto retos difíciles de vencer, es por ti que tuve siempre un gran ejemplo que admirar al mirar hacia adelante, y es por ti que ser tío se volvió en algo tan especial y es mi responsabilidad transmitirle eso a Aldo, sin importar a donde vayamos o lo que sea que hagamos quiero que sepas que siempre serás el mejor hermano que existe.*

*A Mary que desde el cielo sé que esta orgullosa de verme cumplir un sueño mas, gracias por ser mi ángel, te dedico este logro.*

*Y a mis abuelitos Juan y María que me enseñaron que pese a las distancias la familia es siempre el pilar que fortalece nuestras vidas.*

## LISTA DE TABLAS

CONTENIDO	PÁGINA
<b>Tabla 1.</b> Diferencias entre las moléculas del CMH.....	13
<b>Tabla 2.</b> Tipos de HLA-A de los donadores y la línea celular MCF-7.....	35

## LISTA DE FIGURAS

CONTENIDO	PÁGINA
<b>Figura 1.</b> Probables vías de eliminación de células tumorales o de escape para desarrollar cáncer .....	4
<b>Figura 2.</b> Microambiente celular tumoral.....	5
<b>Figura 3.</b> Características del cáncer.....	7
<b>Figura 4.</b> Esquema general de la Terapia de células T adoptivas.....	8
<b>Figura 5.</b> Origen de antígenos tumorales a partir de antígenos propios .....	10
<b>Figura 6.</b> Complejo mayor de histocompatibilidad.....	12
<b>Figura 7.</b> Citocinas de cadena gamma común.....	17
<b>Figura 8.</b> Disposición recomendada de la placa para el ensayo de citotoxicidad usando el kit CytoTox 96 non-radioactive assay de Promega.....	32
<b>Figura 9.</b> Evolución de la morfología en la maduración de monocitos de sangre periférica a células dendríticas.....	37
<b>Figura 10.</b> Fenotipificación de las células dendríticas generadas a partir de monocitos de sangre periférica de donadores HLA-A*02 <sup>+</sup> .....	38
<b>Figura 11.</b> Ensayo de fagocitosis con FITC-Dextran.....	39
<b>Figura 12.</b> Expresión de la proteína WT1 en la línea celular MCF-7.....	40
<b>Figura 13.</b> Evaluación de la producción de IFN- $\gamma$ por LSP estimulados con células dendríticas.....	42

<b>Figura 14.</b> Separación magnética de linfocitos T CD8 <sup>+</sup> .....	43
<b>Figura 15.</b> Ensayo de citotoxicidad de LT CD8 <sup>+</sup> frescos estimulados con IL-2, IL-15 e IL-21 contra la línea tumoral MCF-7.....	47
<b>Figura 16.</b> Ensayo de citotoxicidad de LT CD8 <sup>+</sup> antígeno específicos estimulados con IL-2, IL-15, IL-21 e IL-15/IL-21 contra la línea tumoral MCF-7.....	48
<b>Figura 17.</b> Tinción de naranja de acridina para evaluar viabilidad celular de la línea tumoral MCF-7 en presencia de linfocitos estimulados con células dendríticas.....	49
<b>Figura 18.</b> Morfología celular en los co-cultivos de LT CD8 <sup>+</sup> estimulados con células dendríticas y la línea tumoral MCF-7.....	50
<b>Figura 19.</b> Diferencias en el ciclo de vida y muerte celular entre IL-2 e IL-15.....	56
<b>Figura 20.</b> Potencial fenotípico y efector de células estimuladas con IL-21.....	59

## NOMENCLATURA

aa	Aminoácidos
ADN	Ácido desoxirribonucleico
CD	Células dendríticas
CD40L	Ligando de CD40
CDi	Células dendríticas inmaduras
CDm	Células dendríticas maduras
cm <sup>2</sup>	Centímetros cuadrados
CMH I	Complejo mayor de histocompatibilidad I
CMSP	Células mononucleares de sangre periférica
CPA	Células presentadoras de antígeno
Cr <sup>51</sup>	Isotopo radioactivo Cromo 51
DMSO	Dimetil sulfóxido
ELISA	Ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas
FcγR	Receptor de la fracción cristalizable gamma
FITC	Isotiocianato de Flouresceina
G3PDH	Gliceraldehido 3-fosfato Deshidrogenasa
GM-CSF	Factor estimulante de colonias de granulocitos y monocitos
grs	Gramos
HLA	Antígenos leucocitarios humanos
Hrs	Horas
IDCS-X	Inmunodeficiencia combinada severa ligada al cromosoma X

IFN	Interferón
IgG1, IgG2	Inmunoglobulina G 1 y 2 isotipos control
IL	Interleucina
IL-2R	Receptor de interleucina 2
IL-2R $\alpha$	Cadena alfa del receptor de interleucina 2
IL-2R $\beta$	Cadena beta del receptor de interleucina 2
kDa	Kilo Daltones
LDH	Lactato deshidrogenasa
LSP	Linfocitos de Sangre Periférica
LT CD8 <sup>+</sup>	Linfocitos T CD8 <sup>+</sup>
LTC	Linfocitos T citotóxicos
LTh	Linfocitos T cooperadores
mg	Miligramos
mL	Mililitros
NaCl	Cloruro de Sodio
ng	Nanogramos
NK	Asesinas naturales
nm	Nanómetros
PBS	Solución amortiguadora de fosfatos
PE	Ficoeritrina
PE-TR	Ficoeritrina-rojo Texas
PGE <sub>2</sub>	Prostaglandina E2
RCT	Receptor de células T

SDS	Dodecilsulfato sódico
SFB	Suero fetal bovino
TBS	Buffer Salino Tris
TC	Tricolor
TCA	Terapia de células adoptivas
Th17	Subset 17 de células T cooperadoras
TNF- $\alpha$	Factor de necrosis tumoral alfa
U	Unidades
V	Volts
WT1	Proteína del tumor de Wilms
x g	Fuerza de gravedad relativa (gravedades)
$\gamma_c$	Cadena gamma común
$\mu\text{g}$	Microgramos
$\mu\text{L}$	Microlitros
$\mu\text{M}$	Micromolar

## RESUMEN

En la actualidad, las investigaciones y descubrimientos que se han centrado en encontrar métodos más efectivos para activar y potenciar la actividad inmunológica celular antígeno-específica asociada a tumores, han dado lugar a la llamada terapia de células T adoptivas (TCA), una de las terapias más prometedoras contra el cáncer en los últimos años. Esta terapia consiste en la generación y transfusión de cultivos de linfocitos T CD8<sup>+</sup> autólogos estimulados con IL-2 *ex vivo*, lo que desencadena una fuerte activación y les confiere una mayor reactividad. Aunque el uso de IL-2 ha sido recurrente en los actuales protocolos clínicos, su efectividad en el cultivo de células con actividad antitumoral puede verse disminuida debido a que se ha demostrado que las células estimuladas con esta interleucina tienden a morir vía apoptosis, además de fomentarse su diferenciación hacia un fenotipo regulatorio, factores que disminuyen el efecto citotóxico antitumoral, por lo tanto, proponemos que el uso de IL-2 para la estimulación de cultivos *ex vivo* de células con reactividad específica hacia tumores puede ser reemplazado por IL-15 o IL-21, las cuales no solo pueden potenciar la actividad citotóxica sino guiar el estado de diferenciación celular de manera que se mantengan las capacidades efectoras de las mismas, en este estudio *in vitro* serán evaluadas las capacidades de estas interleucinas para mejorar el potenciamiento de la actividad citotóxica correspondiente a los linfocitos T CD8<sup>+</sup> contra la línea celular de cáncer de mama MCF-7, utilizando un antígeno tumoral de la proteína de WT1 para que la respuesta sea específica. El efecto citotóxico mediado por el estímulo de las citocinas IL-2, IL-15, IL-21 y la combinación IL-15/IL-21 en un contexto de restricción por HLA y el antígeno específico de WT1 fue del 100% para cada caso, en comparación con un control donde no existió especificidad antigénica ( $p < 0.05$ ), y se observó que esta citotoxicidad es suficiente para detener el crecimiento de la línea tumoral MCF-7. Por su parte, los mecanismos de activación que estimulan cada citocina difieren en la producción de IFN- $\gamma$ , lo cual no tuvo un impacto en su capacidad efectora. Finalmente el antígeno de 9 aa de WT1 (RMFPNAPYL) resultó ser un blanco eficiente con un gran potencial para la inmunoterapia del cáncer de mama e IL-21 un potencial modulador de la respuesta celular antitumor.

## ABSTRACT

Outcoming investigations to find new and more effective methods to activate and enhance an antigen-specific immunity associated with tumors has set up the field for adoptive T cell therapy (TCA), one of the most promising therapies against cancer in the last years. This therapy consist in the generation and transfusion of an *ex vivo* culture of autologous antigen-specific CD8<sup>+</sup> T lymphocytes stimulated with IL-2, which results in its strong activation and reactivity against tumors. Although the use of IL-2 has been constant in the current clinical protocols, its effectiveness may be diminished because it has been demonstrated that cells stimulated with this interleukin tend to die via apoptosis and can also acquire a regulatory phenotype that downregulates the cytotoxic effect against tumors, we proposed that the use of IL-2 for the stimulation of the *ex vivo* cultures of tumor reactive cells can be replaced with IL-15 or IL-21, for this reason, in this work we established an *in vitro* studio where we evaluated the capacity of these interleukins to improve the cytotoxic activity of CD8<sup>+</sup> T cells against MCF-7 breast cancer tumor cell line, using the WT1 antigen to make the cytotoxic response specific to this cell line. The cytotoxic effect of the CD8<sup>+</sup> T cells cultured with IL-2, IL-15, IL-21 and the combination IL-15/IL-21 within a context of HLA and antigen-specific restriction (WT1 peptide) was of a 100% for each case, compared with their respective control that was not antigen-specific restricted ( $p < 0.05$ ); furthermore, this cytotoxicity proved to be enough to stop the growth of the MCF-7 tumor cell line. The mechanisms that activate the lymphocytes for each stimulation differs in the IFN- $\gamma$  production, but this had no impact in the acquisition of cell effector functions. Finally, the 9aa peptide of the WT1 protein (RMFPNAPYL) resulted to be an efficient target with a great potential for breast cancer immunotherapy and IL-21 a promising regulator of the immune response against tumors.

## 1. INTRODUCCIÓN

Existen a la fecha diferentes tipos de tratamientos contra el cáncer como la quimioterapia y la radioterapia, además de la inmunoterapia, en esta última se ha utilizado la interleucina-2 (IL-2) administrada de manera exógena como potenciador de la respuesta inmune tumoral en los pacientes, sin embargo, estos tratamientos han demostrado una efectividad muy limitada, además de impactar de manera negativa en la calidad de vida del paciente (Schwartzentruber, 2001; Schwartz *et al.*, 2002; National Institutes of Health Clinical Center, 2012) El conocimiento de las bases moleculares de la respuesta inmunológica en el cáncer, y el conocimiento de los mecanismos básicos de la inmunología celular, han delimitado un campo sumamente importante para la implementación de inmunoterapias efectivas con el fin de combatir esta enfermedad y al mismo tiempo no dañar la integridad física del paciente. Esto ha dado como resultado la terapia de células T adoptivas, la cual es una forma de terapia transfusional que consiste en la infusión de varias subpoblaciones de células T con actividad antitumoral propias del mismo paciente, expandidas y capacitadas *in vitro* con el objetivo de eliminar tumores y prevenir su reincidencia.

Dentro de esta terapia, llama la atención el cultivo de las células que se extraen del paciente para ser capacitadas *ex vivo* con el objeto de reaccionar contra tumores malignos y posibles metástasis de los mismos, el uso de la citocina IL-2 como factor estimulante en los cultivos linfocíticos ha sido generalizado en los protocolos de investigación, a pesar de que se ha demostrado que su uso en cultivos estimula a las células a entrar en apoptosis y al desarrollo de células T reguladoras las cuales son incapaces de atacar al tumor. Sin embargo, en los últimos años se han reconocido citocinas como IL-15 e IL-21 que pueden desarrollar la misma función que IL-2, esto es estimular a los linfocitos T citotóxicos antígeno-específicos para su proliferación (Montes *et al.*, 2005; Spolski and Leonard, 2008; Hinrichs *et al.*, 2008), y mucho más aun aumentando también su capacidad citotóxica, disminuyendo la muerte por apoptosis de los mismos, e incluso, guiando su desarrollo hacia un fenotipo de memoria, lo cual confiere a estas células propiedades migratorias y efectoras de más larga duración una vez

que son transfundidas al paciente (Judge *et al.*, 2002; Moroz *et al.*, 2004; Zeng *et al.*, 2005; Li *et al.*, 2005; Bolesta *et al.*, 2006; Tagaya, 2010; Brincks and Woodland, 2010), todo esto gracias a que las señales que brindan a las células estas citocinas, son dirigidas por una cadena  $\gamma$  común presente en sus receptores los cuales a su vez presentan incluso una semejanza muy cercana con el receptor de IL-2.

Por esta razón, nos resultó de gran interés desarrollar un proyecto que aporte un beneficio y una mejora a este tipo de tratamiento que se ha considerado tiene una de las perspectivas más importantes y relevante para combatir el cáncer.

Este trabajo tiene como objetivo, desarrollar un método de cultivo y la capacitación de linfocitos T citotóxicos *in vitro* haciendo uso de células dendríticas pulsadas con el antígeno tumoral específico de WT1, y utilizando IL-15 e IL-21 como factores de estimulación, que brinden una diferenciación celular adecuada para reaccionar efectivamente en contra de la línea celular de cáncer de mama (MCF-7), con esto, esperamos proponer mejoras en el campo de la terapia de células T adoptivas en la fases de cultivo *in vitro*, principalmente en la estimulación de la respuesta citotóxica mediada por células, con el fin de desarrollar una mejor respuesta contra tumores en futuras terapias de aplicación clínica.

## 2. ANTECEDENTES

### 2.1 CÁNCER

El cáncer comienza en las células, las cuales son las unidades básicas que forman los tejidos, mientras que los tejidos forman los órganos del cuerpo. Normalmente las células crecen y se dividen para formar nuevas células a medida que el cuerpo las necesita, cuando las células envejecen, mueren, y son reemplazadas por células nuevas. Algunas veces este proceso ordenado se descontrola y células nuevas se siguen formando cuando el cuerpo no las necesita, mientras que las viejas no mueren cuando deberían morir. Estas células que no son necesarias pueden formar una masa de tejido, que es lo que se llama tumor (Fig.1) (National Cancer Institute, 2007).

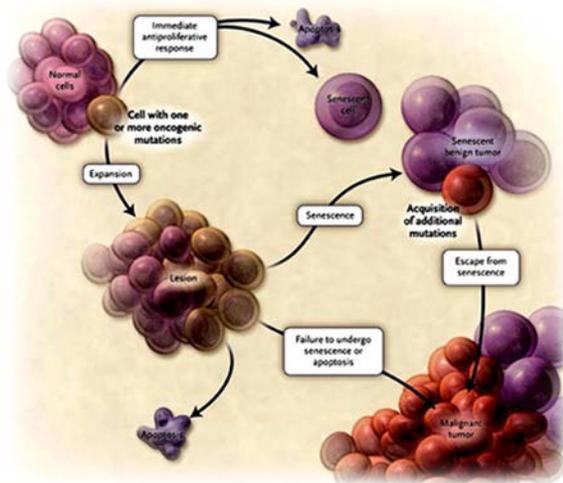
A lo largo de la evolución del conocimiento en el área de la investigación del cáncer se ha llegado a dilucidar una amplia gama de cambios genéticos y dinámica celular implicados en las neoplasias, desde la participación de oncogenes y genes supresores de tumor que caracterizan la alteración de las funciones celulares normales, hasta la compleja interacción celular y el microambiente que dicha comunicación propicia dentro del organismo en el sitio donde se desarrolla un tumor (Hanahan and Weinberg, 2000).

Al cáncer como patología, se le considera como un conjunto de enfermedades en las cuales el organismo produce un exceso de células malignas conocidas como cancerígenas o cancerosas, con crecimiento y división más allá de los límites normales, que invaden el tejido circundante y pueden producir metástasis, o sea la propagación de células originarias del cáncer a otras partes del organismo por vía linfática o sanguínea, y la implantación de nuevos tumores en órganos distantes, esto causa recurrencia de la neoplasia después de tratamientos severos como la cirugía, y particularmente esta propiedad es una circunstancia considerada importante para determinar el pronóstico de la enfermedad en los pacientes (Young Park *et al.*, 2009).

Se conocen muchos factores de riesgo que precipitan la aparición de la enfermedad, el principal factor de riesgo es la edad avanzada, ya que dos terceras partes de todos los cánceres ocurren bajo esta condición. El segundo factor de riesgo es el tabaquismo, y le siguen la dieta, el sedentarismo, la exposición solar y otros estilos de vida. Sin embargo, no podemos pensar en el cáncer como una enfermedad de causa única, sino más bien como la consecuencia de una interacción de múltiples factores, entre los que se incluyen el ambiente, los hábitos dietéticos, la herencia genética, entre otros. Por estas razones, el cáncer se ha considerado la segunda causa principal de muerte, detrás de las enfermedades cardíacas, sin embargo, las muertes por enfermedades cardiovasculares están disminuyendo, mientras que las muertes por cáncer están aumentando ([National Cancer Institute, 2007](#)).

El cáncer es generalmente clasificado según el tejido a partir del cual las células cancerosas se originan. Un diagnóstico definitivo requiere un examen histológico, aunque las primeras indicaciones de cáncer pueden ser dadas a partir de síntomas o radiografías.

Se estima que a lo largo del siglo XXI, el cáncer será la principal causa de muerte en los países desarrollados.

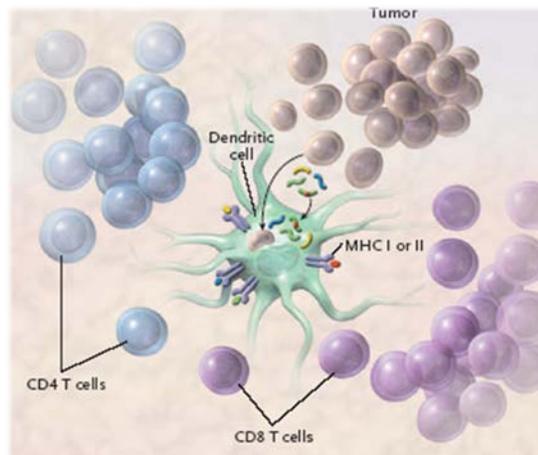


**Figura 1. Probables vías de eliminación de células tumorales o de escape para desarrollar cáncer.** Se muestran las vías que puede seguir una célula mutada hasta la progresión a cáncer.

## 2.2 INMUNOLOGÍA DEL CÁNCER

El papel del sistema inmunológico en el cáncer consiste en erradicar las células cancerígenas por medio de respuestas específicas del tipo adaptativo mediadas principalmente por células T (Abbas, 2008).

Las dos formas en que el sistema inmune puede responder contra la presencia de células tumorales son, ya sea respondiendo contra antígenos específicos de tumor que son moléculas que se encuentran presentes únicamente en las células transformadas, o bien, contra antígenos asociados al tumor, que son moléculas que se encuentran expresadas de forma diferente en las células tumorales que en las normales. Las dos formas de respuesta están mediadas por la interacción del receptor de células T activadas por células presentadoras de antígeno (CPA) con su contraparte en las células tumorales que es el complejo principal de histocompatibilidad tipo I, por sus siglas en inglés CMH I (Fig.2), encargándose de presentar a células T CD8+ dichos antígenos resultantes del procesamiento de proteínas propias de las células, lo que a su vez es la herramienta que el sistema inmunológico utiliza para distinguir cualquier daño o alteración celular como lo es en el caso del cáncer o bien para diferenciar entre lo propio y no propio (Finn, 2008).



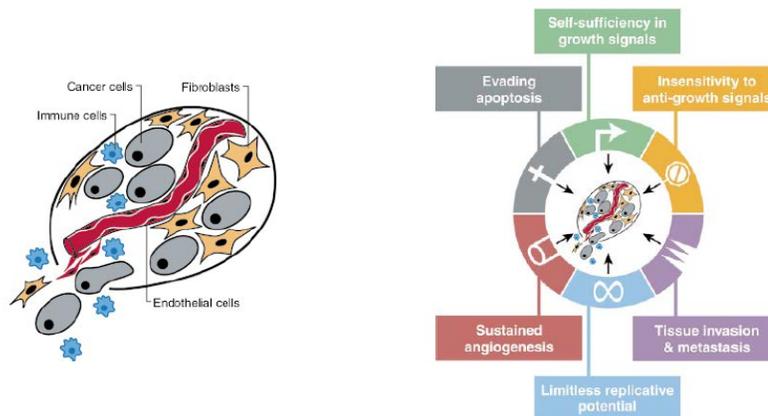
**Figura 2. Microambiente celular tumoral.** Se muestran las células del sistema inmune involucradas en la defensa contra el crecimiento descontrolado de células tumorales (Finn, 2008).

## 2.3 CÁNCER DE MAMA

El cáncer de mama resulta el más común entre las mujeres de países desarrollados, aproximadamente el 2% ocurre en mujeres jóvenes de entre 20 a 34 años, mientras que un 11% en mujeres de 35 a 44 años de edad. La supervivencia a este cáncer en particular ha mejorado significativamente, y los potenciales efectos secundarios de los tratamientos, así como el impacto en la calidad de vida se han vuelto cada vez más importantes (M. Hickey *et al.*, 2009).

La mayoría de los cánceres de mama son diagnosticados en etapas tempranas, lo cual indica que son potencialmente curables y aún no han sufrido un proceso de metástasis a nodos linfáticos axilares, sin dejar de lado los casos en los que el cáncer ya se ha disipado a otros sitios del organismo, dificultando con esto su tratamiento y por ende la expectativa de vida del paciente, aumentando por consecuencia la agresividad de los tratamientos utilizados comúnmente (Young Park *et al.*, 2009; M. Hickey *et al.*, 2009).

Muchos casos pueden ser tratados y algunos curados, dependiendo de la localización, etapa o estado en el que se encuentre. Una vez detectado, se trata generalmente con la combinación apropiada de cirugía, quimioterapia y radioterapia. Según investigaciones, los tratamientos se especifican según el tipo de cáncer y, recientemente, también del propio paciente (Gillmore *et al.*, 2006). Ha habido además un significativo progreso en el desarrollo de medicamentos que actúan específicamente en anomalías moleculares de ciertos tumores que se relacionan con las capacidades que los mismos adquieren y que les confieren su carácter cancerígeno, tales como evasión de la apoptosis, autosuficiencia de señales de crecimiento, metástasis, entre otros (Fig.3), minimizando así el daño a las células normales, así como tratamientos basados en la inmunoterapia utilizando células autólogas capacitadas *ex vivo*, o bien, la administración de citocinas de manera exógena (IL-2) para potenciar la respuesta inmunológica celular, propiciando un ataque específico contra las células cancerígenas (Zhou and Zhong, 2004; Hanahan and Weinberg, 2000).



**Figura 3. Características del cáncer.** Se muestra a la izquierda el modelo del tejido canceroso caracterizado por su constante interacción con otras estirpes celulares, y a la derecha las características que adquieren las células tumorales y por las que se desencadena la progresión del cáncer (Hanahan and Weinberg, 2000).

## 2.4 INMUNOTERAPIA

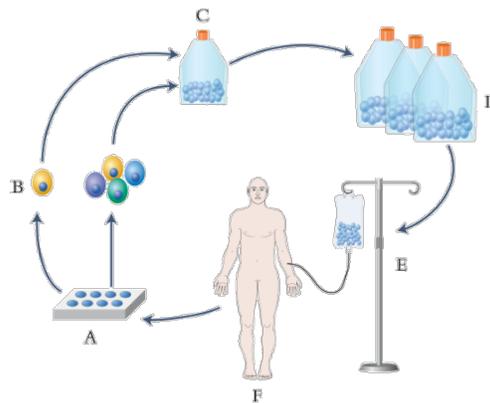
La posibilidad de poder erradicar los cánceres mediante respuestas inmunitarias específicas ha impulsado muchos trabajos en el campo de la inmunología tumoral. El concepto de vigilancia inmunitaria, que fue propuesto por Macfarlane Burnet en los años cincuenta, afirma que una función fisiológica del sistema inmunitario es reconocer y destruir clones y células transformadas antes de que se hayan formado (Finn, 2008). Actualmente es evidente que el sistema inmunitario reacciona frente a muchos tumores, y aprovechar estas reacciones para destruir específicamente los mismos, sigue siendo un importante objetivo de los inmunólogos tumorales (Abbas, 2008).

En la actualidad, pese al desarrollo de modernas técnicas de cirugía y trasplantes, nuevas y más efectivas drogas citotóxicas y mejores métodos de irradiación, que han permitido tratar con éxito algunas patologías neoplásicas, algunas células malignas sobreviven a estas terapias y se diseminan en el organismo, haciendo necesario el desarrollo de nuevos tratamientos complementarios a los actuales, una de estas terapias está basada en la modulación del sistema inmunológico. A partir de la

década de los 80's se logró aislar linfocitos T citotóxicos (LTC) con actividad antitumoral de sangre periférica, ganglios linfáticos y tejido tumoral de pacientes con melanoma, y a raíz de esto, se ha producido un creciente interés por utilizar el sistema inmune como herramienta en el tratamiento del cáncer. Citocinas como IL-2, interferón alfa (IFN- $\alpha$ ) son comúnmente utilizadas como terapias adyuvantes en algunas neoplasias, al igual que terapias adoptivas utilizando LTC estimulados *in vitro* con el fin de atacar de manera específica a las células cancerígenas (López *et al.*, 2004).

## 2.5 INMUNOTERAPIA DE CÉLULAS T ADOPTIVAS

La terapia de células T adoptivas utilizada para el tratamiento de cáncer consiste en la infusión de varias subpoblaciones de células T propios del mismo paciente con actividad antitumoral, expandidas y capacitadas *in vitro* con el objetivo de eliminar tumores (Fig.4) y prevenir su reincidencia (Rosenberg, 2001, 2004, 2005; Gattinoni *et al.* 2006).



**Figura 4. Esquema general de la Terapia de células T adoptivas.** Se muestra las etapas de la terapia comenzando por la extracción y selección de células T del paciente (A, B), el cultivo *in vitro* de las mismas para seleccionar clones antígeno específicas (C), su expansión para obtener la cantidad de células suficiente (D) para finalmente ser transfundidas nuevamente al paciente (E, F).

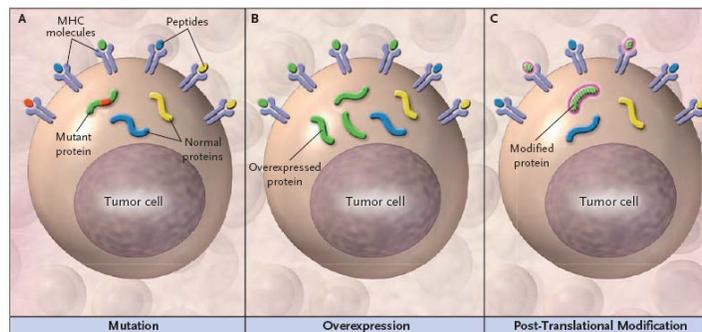
Las células utilizadas para esta terapia pueden ser obtenidas de varios sitios anatómicos, incluyendo sangre periférica e incluso del mismo tumor, siendo las principales células de interés los linfocitos T CD8<sup>+</sup>, conocidos como linfocitos T citotóxicos (LTC). Dada la potente actividad citolítica de éstos y su especificidad asociada al reconocimiento de antígeno por medio del complejo principal de histocompatibilidad de tipo I (CMH I), convierte a esta población celular en la de mayor interés para su uso en la inmunoterapia de células T adoptivas (June, 2007 a; Yee, 2002).

El cultivo y la proliferación de estas células *in vitro*, una vez que se han extraído del paciente y se han aislado con éxito, representa un punto de gran interés que ofrece nuevas perspectivas para el mejoramiento de la terapia, por ejemplo, el uso de la IL-2 como factor de desarrollo en los cultivos linfocíticos ha sido generalizado en todos los protocolos actuales de cultivo celular para la terapia de células adoptivas, además de ser administrada de manera exógena para el mantenimiento de las células *in vivo* en etapas posteriores a la transfusión, sin embargo, el uso de otras citocinas que junto con la IL-2 comparten una cadena  $\gamma$  común en su receptor, tales como IL-15 e IL-21 (Crawley *et al.*, 2008), propone ser un punto importante a considerar para mejorar tanto el cultivo *ex vivo*, como su persistencia *in vivo*, ya que a diferencia de IL-2, el cultivo con estas citocinas no solo promovería una respuesta citotóxica más eficaz, sino también estimularía una diferenciación celular hacia un fenotipo de memoria que conserva en la célula las características de proliferación, activación, funciones efectoras y de supervivencia sin que se vea influenciada por procesos propios de inmunosenescencia (Berger *et al.*, 2008; Klebanoff *et al.*, 2006, 2005), se cree además que a diferencia del cultivo con IL-2, el uso de estas citocinas no estimula la tendencia a apoptosis de las células en cultivo.

## 2.6 ANTÍGENOS TUMORALES

Una de las características de las células malignas es que sufren cambios en la expresión de las moléculas que se ubican en la membrana celular. Estos cambios determinan una pérdida en la tolerancia inmunológica, lo que propicia que se induzcan respuestas inmunológicas contra ellas. Para que se desarrollen mecanismos inmunitarios contra tumores tiene que existir como requisito previo que las células tumorales contengan moléculas que sean reconocidas como extrañas. Estas moléculas son conocidas como antígenos tumorales y como ya se explicó antes aparecen como una consecuencia de la transformación maligna (Fig. 5).

Aunque estas transformaciones pueden ser identificadas tanto en el interior como en la superficie de las células malignas, el campo de la inmunología tumoral abarca fundamentalmente los antígenos ubicados en la superficie de la célula tumoral, sin embargo, la TCA también puede ser dirigida contra antígenos intracelulares producidos por las células cancerígenas, dada la capacidad de toda célula de presentar a los mismos mediante el CMH I como parte del mecanismo que el sistema inmunológico utiliza para reconocer antígenos propios (Batista, 2003).



**Figura 5. Origen de antígenos tumorales a partir de antígenos propios.** Muestra las 3 formas en las cuales un antígeno propio puede convertirse en un antígeno tumoral. (A) Una mutación puede producir el origen de una proteína mutante que exprese péptidos anormales en la superficie celular, (B) Una sobreexpresión de una proteína normal que ocasionaría niveles anormales de sus péptidos presentados en la superficie celular o (C) pueden ocurrir cambios post-traduccionales que den como consecuencia una proteína modificada con un repertorio anormal de péptidos presentados en la superficie celular (Finn, 2008).

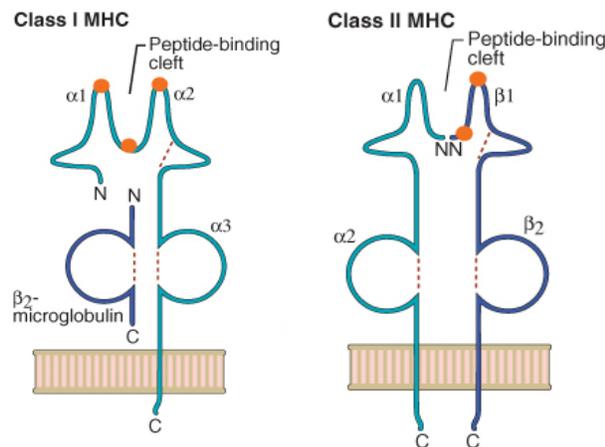
## 2.7 PROCESAMIENTO DE ANTÍGENOS Y HLA

La función básica del sistema inmunológico en el ser humano incluye la generación de respuestas a diferentes tipos de organismos, como las bacterias y los virus, basadas principalmente en la manera en la que estos infectan el organismo y el cómo son reconocidas por las células del sistema inmune. Estas respuestas se clasifican en términos generales en dos tipos: La respuesta humoral, que involucra la activación de los linfocitos B, que lleva a la consiguiente formación de anticuerpos, y la respuesta celular, que incluye la activación y respuestas efectoras de citotoxicidad específica que conducen a la destrucción de la célula blanco, mediada por el linfocito T citotóxico (LTC). La activación de células, T y B, depende de la acción del linfocito T cooperador (LTh). Usualmente, éste se activa al fijar varios determinantes antigénicos presentes sobre las células presentadoras de antígeno (CPA), y esta interacción también es llevada a cabo por los linfocitos T citotóxicos (LTC) para su activación directa por las CPA (Jaime Pérez, 2001).

La regulación de esta red de interacciones del sistema inmunológico, se logra a través de moléculas codificadas por más de 200 genes de un complejo específico localizado en el brazo corto del cromosoma 6, denominado CMH. Los genes del CMH participan en el reconocimiento de antígenos por los linfocitos T, en un proceso que incluye el reconocimiento de determinantes antigénicos particulares en asociación con antígenos propios, constituidos por las moléculas del sistema de antígenos leucocitarios humanos por sus siglas en inglés HLA (Human Leukocyte Antigens), codificadas por el CMH. Este fenómeno (reconocimiento de antígeno asociado con moléculas HLA) es conocido como “restricción en el reconocimiento de antígenos”. Esto permite al sistema inmunitario responder a antígenos extraños, al mismo tiempo que reconoce y no responde a los antígenos propios del individuo, a lo cual se le conoce como tolerancia (Bioarrayanes, 2001).

Las moléculas producidas por el CMH constituyen el sistema de antígenos leucocitarios humanos HLA. Existen dos tipos de moléculas en este sistema, las de

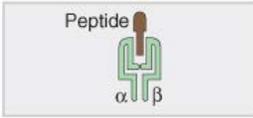
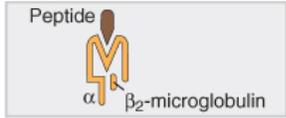
clase I, denominadas HLA-A, -B y -C, y de clase II, HLA-DR, -DQ, y -DP. Estas son, estructural y funcionalmente diferentes (Fig. 6). Todas son proteínas que evolucionaron de la familia de las inmunoglobulinas en un periodo de miles de años. Cada célula del organismo posee en su superficie entre 100 mil y 300 mil moléculas HLA cargadas con péptidos endógenos (clase I) o exógenos (clase II) que pueden ser reconocidos por el receptor de célula T e iniciar una respuesta inmune (Dzik, 2010).



**Figura 6. Complejo mayor de histocompatibilidad.** Muestra las diferencias estructurales entre el CMH clase I (izquierda) y el CMH clase II (derecha) (Abbas, 2008).

Los antígenos de la clase I se expresan en la superficie de todas las células nucleadas del organismo y están ligadas a la regulación de las respuestas de células T a las infecciones virales y también contra las células tumorales, las cuales presentan un crecimiento fuera de lo normal y que a su vez esto genera mutaciones que producen cambios en diferentes niveles de la síntesis de proteínas los cuales llevan a la expresión de los llamados antígenos tumorales, que son reconocidos por las células T citotóxicas, llevando a las células afectadas a su destrucción. En contraste, los antígenos de la clase II tienen un papel determinante en el reconocimiento de antígenos por los linfocitos T cooperadores. Esto se debe a que los antígenos de organismos extraños, como

bacterias, son procesados y expresados en la membrana de las CPA, en asociación con las moléculas de la clase II del sistema HLA, formando un complejo que es reconocido por el receptor de células LTh. De esta manera se puede decir que el tipo de respuesta inmunológica estará determinada por el tipo de antígenos que son reconocidos y procesados, ya sea extracelulares (bacterias) o intracelulares (virales, células tumorales) (Tabla 1) (Starck and Shastri, 2011).

Característica	Vía del CMH de la clase II	Vía del CMH de la clase I
<b>Composición del complejo péptido-CMH estable</b>	Cadenas $\alpha$ y $\beta$ polimorfas, péptido 	Cadena $\alpha$ polimorfa, $\beta_2$ -microglobulina, péptido 
<b>Tipos de CPA</b>	Células dendríticas, fagocitos mononucleares, linfocitos B; células endoteliales, epitelio tímico.	Todas las células nucleadas
<b>Linfocitos T sensibles</b>	Linfocitos T CD4 <sup>+</sup>	Linfocitos T CD8 <sup>+</sup>
<b>Origen de los antígenos proteicos</b>	Proteínas endosómicas/lisosómicas (principalmente interiorizadas a partir del ambiente extracelular)	Proteínas citosólicas (principalmente sintetizadas en la célula; pueden entrar en el citosol desde los fagosomas), péptidos solubles pequeños.
<b>Enzimas responsables de la generación del péptido</b>	Proteasas endosómicas y lisosómicas.	Proteosoma citosólico
<b>Lugar de carga del péptido en el CMH</b>	Compartimiento vesicular especializado	Retículo endoplásmico

**Tabla 1. Diferencias entre las moléculas del CMH.** Resume las diferencias más relevantes en cuanto a funcionamiento y estructura entre el CMH I y el CMH II (Abbas, 2008).

## 2.8 HLA-A\*0201 EN INMUNOTERAPIA

La predicción de epítopes asociados a células T se ha convertido en un tema de gran importancia para el desarrollo de nuevas terapias contra el cáncer y enfermedades infecciosas, todo esto en conjunto con el incremento de secuencias de aminoácidos publicadas en bases de datos tanto de patógenos como de proteínas asociadas al desarrollo y la progresión de cáncer (Pelte *et al.*, 2004).

La molécula HLA-A2 es la más comúnmente encontrada en la población caucásica y su alelo HLA-A\*0201 es el que se presenta con mayor frecuencia, al igual que fue el primer alelo humano para el cual se desarrolló un sistema de predicción de unión a péptidos, lo cual ha sido una herramienta de gran importancia para el desarrollo de mejoras en el campo de la inmunoterapia en concreto para el cáncer de mama (Hawkins *et al.*, 2007; Gatz *et al.*, 2000).

La importancia de este alelo además de su asociación con el proceso de presentación de antígenos propios a los linfocitos T CD8<sup>+</sup>, que son las células responsables de la identificación y eliminación de células tumorales o infectadas con virus, es su presencia en diferentes líneas celulares tumorales de cáncer de próstata y mama, que son un blanco utilizado de manera representativa en modelos inmunoterapéuticos *in vitro*, ya que pueden presentar una amplia gama de péptidos antigénicos relacionados con el proceso del desarrollo del cáncer, lo cual ha servido para mejorar los distintos enfoques de esta terapia, en concreto la identificación de antígenos asociados a tumor, el cual es uno de los puntos clave a mejorar en la TCA para poder tener una respuesta mas específica dirigida a células malignas sin afectar a las normales. En el caso particular de la línea celular MCF-7 se comprobó que ésta resulta ser una candidata ideal para el desarrollo de experimentos con estos fines ya que se ha detectado en ella la expresión de estas moléculas HLA-A de manera constitutiva, así como el aumento de su expresión en presencia de estímulos de IFN $\gamma$ , lo cual ayudará de manera significativa a estudiar las respuestas inmunológicas derivadas de una terapia celular adoptiva con especificidad de antígeno en cáncer de mama (Carlsson *et al.*, 2007).

## **2.9 WT1 EN CÁNCER DE MAMA**

Hoy en día, en la terapia celular adoptiva, las respuestas inmunológicas que se busca que monten los linfocitos T CD8<sup>+</sup> y que brindan protección antitumoral han sido dirigidas contra antígenos asociados a tumor, que pueden originarse de distintas

maneras en una célula cancerígena como se menciona con anterioridad en este documento, esto representa uno de los aspectos claves para mejorar la especificidad y efectividad de esta terapia, ya que al dirigir la respuesta contra una proteína específica y exclusiva de las células tumorales, el daño a tejido normal causado por la actividad citotóxica de los linfocitos T CD8<sup>+</sup> será nulo y por ende mejorará la calidad de vida del paciente. Uno de los antígenos que en la actualidad está siendo investigado como potencial blanco para el tratamiento de distintos tipos de cáncer, incluido el cáncer de mama, es la proteína del tumor de Wilms (WT1), del cual se ha reportado con anterioridad su papel oncogénico principalmente en pacientes con leucemia; asociando sus altos niveles de expresión con un diagnóstico negativo, lo que ha llevado a proponer potenciales regímenes de vacunación utilizando péptidos derivados de la proteína WT1 (Oka *et al.*, 2000; Sugiyama, 2010, Ochsenreither *et al.*, 2011).

En base al conocimiento adquirido acerca de la relevancia y función de WT1, esta proteína se ha convertido en un atractivo antígeno blanco para el desarrollo de inmunoterapia dirigida contra el cáncer de mama, en primer lugar debido a que se encuentra sobreexpresado en más del 90% de los casos de cáncer de mama en contraste, por ejemplo, con el oncogen Her-2/neu que solo está expresado en alrededor del 25 al 30 % de los casos, mientras que la expresión en tejido normal solo ocurre durante etapas de desarrollo embrionario, mas no en una etapa adulta, salvo en circunstancias posteriores a un infarto al miocardio donde condiciones de hipoxia o isquemia estimulan la expresión de WT1 (Gillmore *et al.*, 2006). En segundo lugar, WT1 puede estar asociado de manera importante con el mantenimiento de un fenotipo maligno, ya que existen evidencias de que la pérdida de la expresión de WT1 en las células tumorales impacta de manera negativa su proliferación y las lleva a su eventual muerte, esto se comprueba en estudios que se han realizado en un panel de diversas líneas celulares de cáncer de mama, en donde al dirigir oligonucleótidos antisentido contra WT1, se observó un decremento en el índice de crecimiento en 8 de 10 líneas celulares tratadas, dentro de las cuales se encuentra la línea MCF-7 (Zapata-Benavides, *et al.*, 2002; Driessche *et al.*, 2012).

Finalmente existe evidencia de que WT1 esta sobreexpresado en una gran variedad de tumores sólidos, incluyendo ovario, colon, pulmón, entre otros, lo que sugiere que una inmunoterapia contra el cáncer de mama podría no solo ser dirigida contra WT1, sino que tendría éxito en el tratamiento de un mayor grupo de pacientes con diversos tipos de cáncer lo que le ha valido ser considerado como un antígeno potencial para el desarrollo de vacunas de carácter universal (Gillmore *et al.*, 2006).

Todos estos datos sugieren que sería poco probable que las células tumorales escaparan a un tratamiento basado en inmunoterapia dirigida contra el antígeno WT1.

## **2.10 CITOCINAS**

Las citocinas son proteínas secretadas por las células de la inmunidad innata y adaptativa y se producen en respuesta a microorganismos y otros antígenos. Diferentes citocinas estimulan diferentes respuestas en las células que participan en la inmunidad y la inflamación. En la fase de activación de las respuestas inmunitarias adaptativas, las citocinas estimulan el crecimiento y la diferenciación de los linfocitos, y en las fases efectoras de la inmunidad innata y adaptativa activan a diferentes células efectoras para que eliminen a los antígenos.

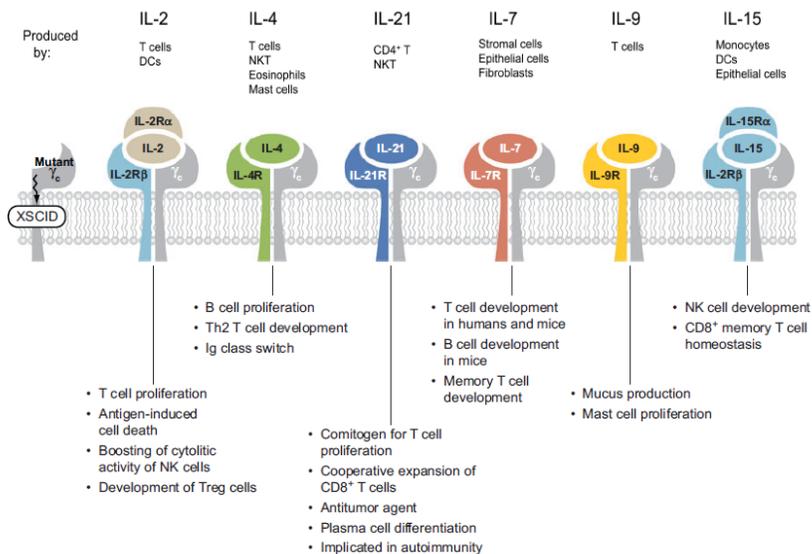
Como muchas citocinas son sintetizadas por los leucocitos y actúan sobre otros leucocitos, se les denominó interleucinas, y aunque se ha demostrado en los últimos años que existen citocinas que no son producidas por leucocitos pero que tienen acción sobre estos, se sigue utilizando el mismo término con fines prácticos.

Siendo las citocinas proteínas de suma importancia en los distintos tipos de respuestas inmunológicas, son cada vez más utilizadas en situaciones clínicas y en estudios en animales para estimular o inhibir la inflamación o la inmunidad en distintos tipos de enfermedades como las infecciones causadas por microorganismos, el cáncer y enfermedades autoinmunes entre otras (Abbas, 2008; Bioarrayanes, 2001).

## 2.11 CITOCINAS DE CADENA GAMMA COMÚN

Las citocinas de cadena  $\gamma$  común ( $\gamma_c$ ) son una importante familia de las citocinas de tipo I y está conformada por IL-2, IL-4, IL-7, IL-9, IL-15 y más recientemente IL-21, se nombro a este grupo de esta manera debido a que los receptores para todas estas citocinas comparten la cadena  $\gamma_c$ . Todas estas cumplen con funciones fundamentales en el desarrollo, proliferación, sobrevivencia y diferenciación de múltiples linajes celulares tanto de la inmunidad innata como de la inmunidad adaptativa.

La cadena  $\gamma_c$  fue identificada por primera vez en el receptor de la IL-2 (IL-2R) que ha servido como el prototipo para el estudio de esta familia, de esta manera y conociendo ya las estructuras de los receptores de algunas de las citocinas que forman parte de este grupo, se tiene una visión de cómo cada una de éstas interactúan con la  $\gamma_c$ , lo cual ha llevado a identificar mutaciones en el gen que codifica esta cadena, como en el caso de la inmunodeficiencia combinada severa ligada al cromosoma X (IDCS-X), la cual lleva a padecimientos más severos que la falta únicamente de alguna de las citocinas de esta familia en específico (Fig.7) (Rochman *et al.*, 2009).



**Figura 7. Citocinas de cadena gamma común.** Muestra el origen celular, la conformación de su receptor y los efectos de cada una de las citocinas de cadena  $\gamma_c$  (Spolski and Leonard, 2008).

## 2.12 Receptor de IL-2

La expresión de receptores funcionales de IL-2 (IL-2R) es inducida por la activación de los linfocitos T reguladores, que pueden estar en un estado constante de activación por los antígenos propios por lo que siempre se expresan receptores de IL-2. Este receptor está formado por tres proteínas asociadas no covalentemente que incluyen IL-2R $\alpha$  (CD25), IL-2/15R $\beta$  y  $\gamma_c$ . De las tres cadenas, sólo la primera es exclusiva del IL-2R. La cadena  $\gamma$  es compartida con los receptores de la IL-4, IL-7, IL-15 e IL-21 (Rebollo and Silva, 1994), por lo tanto se denomina cadena gamma común. Por acción de esta cadena común, es que citocinas como IL-15 y 21 son capaces de generar señales de proliferación y diferenciación en los linfocitos T citotóxicos utilizados en la terapia de células adoptivas, además de potenciar la actividad anti-tumoral de los mismos, sin necesidad de la interacción con IL-2 (Santos, 2006; Sivakumar *et al.*, 2004; Savia, 2006).

## 2.13 IL-2

Esta citocina es un factor de crecimiento, supervivencia y diferenciación para los linfocitos T, y tiene una función importante en la regulación de las respuestas de los linfocitos T efectores mediante su interacción con la subpoblación de linfocitos T reguladores (Abbas, 2008).

Es sintetizada principalmente por los linfocitos T CD4<sup>+</sup>, su síntesis es transitoria, y la secreción máxima se produce aproximadamente 8 a 12 horas después de la activación. Se describió inicialmente como un factor de crecimiento de los linfocitos T, basándose en estudios *in vitro*, aunque estudios más recientes indican que *in vivo* pueden predominar otras funciones, como lo es la estimulación del fenotipo T regulador CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FOXP3<sup>+</sup> que inhibe la acción de linfocitos CD8<sup>+</sup> anti-tumorales, además de promover la vía de apoptosis en células activadas (Dejaco *et al.* 2006).

Es necesaria para la supervivencia y para la función de los linfocitos T reguladores, que suprimen las respuestas inmunitarias frente a los antígenos propios y a

otros antígenos. La expresión constitutiva de los receptores de IL-2 sobre los linfocitos T reguladores es compatible con su necesidad de IL-2 a fin de sobrevivir, estimula también la supervivencia, proliferación y diferenciación de los linfocitos T activados por el antígeno (Abbas, 2008).

En la actualidad, es la única citocina utilizada clínicamente para el tratamiento del cáncer, con el fin de potenciar las respuestas inmunológicas de los pacientes, sin embargo, ha demostrado tener efectos adversos no deseados al ser aplicada en altas dosis como suele ser costumbre en pacientes con diversos tipos de cáncer, por lo que no difiere mucho de la quimioterapia. Su uso también es generalizado en los protocolos de capacitación de cultivos linfocíticos en la terapia de células adoptivas para su proliferación y diferenciación (Rosenberg *et al.*, 2008), en donde ha presentado desventajas importantes que representan inconvenientes significativos para la TCA, siendo el primero su capacidad de estimular el fenotipo regulador de los linfocitos T, y el segundo, la activación de señales de apoptosis en las células en cultivo (Dejaco *et al.* 2006).

## **2.14 IL-15**

La interleucina-15 (IL-15) es una citocina que está involucrada en el desarrollo y mantenimiento de células efectoras, las cuales median los mecanismos de defensa del hospedero. Se plantea que actúa en la inmunidad innata, mediada fundamentalmente por neutrófilos, monocitos/macrófagos y por células asesinas naturales (NK), y en la inmunidad adaptativa, mediada por linfocitos T y B activados por antígenos. Realiza otras funciones importantes como la de inhibir la apoptosis y actúa sobre células que no pertenecen al sistema inmunitario (Santos, 2006).

Uno de los principales papeles de la IL-15 además de los ya mencionados, es el hecho de que estimula la proliferación de células T humanas de memoria CD4 y CD8, principalmente en aquellas que presentan el marcador CD44<sup>+</sup>, que a diferencia de las células normales que regulan su supervivencia de manera dependiente de su contacto con antígenos presentados por el CMH, éstas son capaces de regularla

independientemente de su interacción con el antígeno y de manera mas dependiente de su interacción con citocinas como IL-15, lo cual abre un campo potencialmente importante para el tratamiento de diferentes enfermedades, como el cáncer en donde se busca una respuesta antitumor eficiente y el establecimiento de un sistema de vigilancia inmunológica mediada por células de memoria en caso de probables reincidencias (Judge *et al.*, 2002; Brincks and Woodland, 2010).

IL-15 también favorece el incremento de los linfocitos T citotóxicos, de células asesinas inducidas por citocinas y de células T asesinas naturales citolíticas, las cuales son altamente efectivas en la citotoxicidad, favoreciendo su proliferación y activación, aumenta la producción de IFN- $\gamma$  por éstas células así como la expresión de granzimas y perforinas, además favorece la diferenciación hacia un fenotipo de memoria y a diferencia de IL-2 no fomenta la proliferación ni la diferenciación de células T reguladoras de fenotipo CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> FOXP3<sup>+</sup>, las cuales en el contexto de la terapia celular adoptiva disminuyen la efectividad de respuesta antitumoral (Santos, 2006).

Es muy importante mencionar que la IL-15, funciona también como un potente inhibidor de la apoptosis inducida por la señalización de TNF- $\alpha$ , o bien contra señales de muerte inducida por activación mediante el RCT.

Dadas estas importantes características se ha planteado su uso como un posible sustituto de la IL-2, en la capacitación *in vitro* de células autólogas para el tratamiento del cáncer (Rosenberg *et al.*, 2008; Brincks and Woodland, 2010).

## 2.15 IL-21

IL-21 es un tipo de citocina que al igual que IL-15 comparte la cadena gamma común del receptor de IL-2. Es producida por linfocitos CD4 activados, células NK y células de la subpoblación Th17, y tiene acciones pleiotrópicas en un amplio rango de linajes celulares linfoides (Spolski and Leonard, 2008).

Tiene la capacidad de expandir linfocitos CD8<sup>+</sup> y llevar a cabo la diferenciación de las células Th17, no tiene efecto alguno sobre células de tipo regulador y existen reportes que indican su participación en la inhibición de la presentación de antígeno

por las células dendríticas, y puede ser pro-apoptótica para linfocitos B y células NK. Sin embargo, tiene un potente efecto antitumoral ya que la señalización a través de su receptor en células NK y linfocitos T CD8<sup>+</sup> deriva en la expresión de genes como perforinas y granzima B que son moléculas importantes en la actividad citolítica de estas células (Sivakumar *et al.*, 2004) y se cree está implicada en el desarrollo de enfermedades autoinmunes mediadas por linfocitos B, ya que en estudios realizados en modelos murinos de lupus eritematoso sistémico, se encuentra una correlación entre la progresión de la enfermedad y el aumento en los niveles de IL-21 en suero, misma que promueve la diferenciación, proliferación y formación de anticuerpos autoreactivos de alta afinidad por linfocitos B (Spolski and Leonard, 2008). Se cree que regulando la acción de IL-21, se puede tener un potencial clínico para una amplia gama de enfermedades, incluidas entre ellas el cáncer, por lo que es un área de investigación realmente activa.

Al igual que IL-15, IL-21 ha sido propuesta como una probable alternativa para la capacitación de linfocitos T CD8<sup>+</sup> antígeno-específicos *in vitro* para su uso en la terapia de células T adoptivas, y aunque se desconoce mucho aún sobre su acción, se propone que quizás actuando de manera simultánea con IL-15 puede potenciar la actividad citotóxica de estas células y propiciar la diferenciación al fenotipo de memoria que es el ideal para aumentar la eficacia de la terapia, ya que prolongaría la viabilidad celular *in vivo* permitiendo atacar más eficazmente los tumores y sus metástasis (Rosenberg *et al.*, 2008; Sivakumar *et al.*, 2004).

### **3. HIPÓTESIS**

El empleo de linfocitos T CD8<sup>+</sup> estimulados con un antígeno específico y las citocinas IL-15 e IL-21, aumenta la actividad citotóxica antitumoral contra la línea celular MCF-7 de cáncer de mama *in vitro* en comparación con las células estimuladas con IL-2.

## **4. OBJETIVOS**

### **4.1 OBJETIVO GENERAL**

Demostrar la efectividad de las citocinas IL-15 e IL-21 para estimular la actividad citotóxica de los linfocitos T CD8<sup>+</sup> específicos de antígeno *in vitro* contra células tumorales de cáncer de mama MCF-7.

### **4.2 OBJETIVOS PARTICULARES**

1. Seleccionar un donador sano que sea positivo para el alelo de histocompatibilidad HLA-A\*02.
2. Generar células presentadoras de antígeno (CPA) específicas a partir de monocitos de sangre periférica del donador HLA-A\*02<sup>+</sup>.
3. Generar linfocitos T CD8<sup>+</sup> antígeno-específicos mediante cultivo conjunto con CPAs utilizando estímulos de IL-2, IL-15, IL-21 e IL-15/IL-21.
4. Evaluar la eficacia citotóxica de los cultivos linfocíticos resultantes frente a la línea celular de cáncer de mama MCF-7, con y sin la estimulación de las citocinas.

## 5. MATERIALES Y MÉTODOS

### 5.1 Línea celular tumoral MCF-7

Esta línea celular se ha empleado como modelo para la investigación de nuevos tratamientos en la terapia del cáncer de mama.

La línea celular MCF-7 es de origen epitelial, derivada de un adenocarcinoma mamario humano (mujer caucásica de 69 años). Estas células muestran una morfología epitelial y conserva demasiadas características de epitelio mamario diferenciado, entre las cuales incluye la habilidad de procesar estradiol vía citoplasmática, receptor de estrógenos y la capacidad de formar domos.

Requiere de estradiol para la formación del tumor *in vivo*, su crecimiento es estimulado por estradiol y es inhibido por anti estrógenos *in vitro*.

### 5.2 Citocinas y Péptido WT1

Las citocinas GM-CSF, IL-4, IL-1 $\beta$ , TNF $\alpha$ , IL-2, IL-15 e IL-21 fueron adquiridas con la compañía Peprotech (México, D.F.) mientras que la PGE<sub>2</sub> fue adquirida a la compañía Sigma Aldrich (St. Louis, MO, USA). Todos estos reactivos vinieron en presentación liofilizada y fueron reconstituidos con medio completo RPMI 1640 suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB) (GIBCO, invitrogen), alicuotadas según las concentraciones necesarias para realizar la estimulación de los cultivos experimentales y almacenados a -20°C hasta el momento de su utilización.

El péptido WT1 correspondiente a la secuencia de aminoácidos 126 a 134 (RMFPNAPYL) de la proteína codificada por el factor de transcripción WT1 correspondiente al tumor de Wilms, fue adquirido con la compañía GeneScript (Piscataway, NJ, USA) como un liofilizado libre de endotoxinas y con una pureza

>98%. Para su reconstitución, se añadieron 10µL de dimetil sulfóxido (DMSO) y 190 µL de agua bidestilada estéril por cada mg del péptido liofilizado, posteriores diluciones para alcanzar la concentración deseada se llevaron a cabo en medio RPMI 1640 suplementado con 10% de SFB (GIBCO, invitrogen), se hicieron alícuotas de 25µL que contenían 50µg del péptido y se almacenaron a -20°C hasta su uso.

### **5.3 Tipificación de HLA-A**

Las muestras de los donadores sanos fueron tipificadas para el alelo de histocompatibilidad HLA-A en el departamento de hematología del Hospital Universitario Dr. José Eleuterio González de Monterrey, NL, México, con la gentil colaboración de la M.C. Michelle de Jesús Zamudio Osuna.

Brevemente, para realizar esta tipificación se realizó una extracción de ácidos nucleicos a partir de muestras de sangre total de los donadores por medio del equipo automatizado Maxwell® 16 system (Promega Corporation, USA), que consiste en el aislamiento del ADN de forma automatizada en muestras de sangre total y capa leucocitaria humanas, mediante el principio de separación de lisis celular y la unión de los ácidos nucleicos a partículas de sílice magnetizadas.

La calidad y concentración del ADN extraído fue verificada espectrofotométricamente con el equipo NanoDrop ND-1000 (Thermo Fisher Scientific, Inc) que cuantifica ácidos nucleicos y proteínas para medir la concentración y la pureza de las muestras, con una relación entre ambas de 1.65-1.80 y una concentración final de 100 ng/µL de muestra.

Posteriormente la tipificación del HLA se realizó por la técnica de PCR-SSP (Micro SSP™ HLA ADN Typing Trays, ONE LAMBDA, INC, Canoga Park, CA) a partir de 100 ng/µL de muestra por el personal del departamento de hematología del Hospital Universitario.

#### **5.4 Detección de WT1 en la línea MCF-7**

##### Extracción de proteínas:

Se cultivaron  $1 \times 10^6$  células MCF-7 en cajas de cultivo de  $25 \text{ cm}^2$ , posteriormente, las células fueron lisadas con  $100 \mu\text{L}$  de buffer de lisis (Triton 1%, NaCl 150 mM, Tris 25 mM pH 7.6) y las proteínas obtenidas fueron cuantificadas con el kit DC Protein Assay (BIO-RAD, Hercules, CA, USA) para lo cual se mezclaron 19 partes del reactivo A con una parte del reactivo S para cada una de las muestras y se agregaron los  $20 \mu\text{L}$  a cada uno de los pozos de una placa de 96 pozos, posteriormente se agregaron  $5 \mu\text{L}$  de las proteínas en una dilución 1:5 y finalmente se agregaron a cada pozo  $175 \mu\text{L}$  del reactivo B, se incubaron a temperatura ambiente y se analizó la placa a 595 nm en un lector de ELISA.

##### Western Blot:

Una vez cuantificadas las muestras de proteínas de la línea MCF-7, se corrieron  $50 \mu\text{g}$  mas  $4 \mu\text{L}$  de buffer de carga 6X (Tris base, SDS, azul bromofenol,  $\beta$  mercaptoetanol) y se ajustó el volumen a  $20 \mu\text{L}$  con buffer de lisis en un gel de poliacrilamida al 12%.

Se corrió el gel en cámara de electroforesis con buffer de corrida (Tris 25 mM Base, glicina 250 mM pH 8.3 y SDS al 1%) por 20 minutos a 46V y después a 100V por aproximadamente 1 hora 40 minutos.

Para la transferencia en membrana de nitrocelulosa, se formó un “sándwich” de la siguiente manera: se colocan esponjas, papel filtro y la membrana de nitrocelulosa en buffer de transferencia (Buffer de transferencia 10X: 30 grs Tris-Base y 144 grs de glicina. Solución de trabajo: 100 mL de stock 10X mas 200 mL de metanol y 700 mL de agua) y se colocan en el siguiente orden: esponja, papel filtro, gel de acrilamida, membrana de nitrocelulosa, y de nuevo papel filtro y esponjas. Se corrió en la cámara húmeda de transferencia a 26V por 2 horas.

Para la inmunodetección, se colocó la membrana de nitrocelulosa en una solución bloqueadora compuesta de TBS-Tween con leche descremada al 5% durante 1 hora, posteriormente, se incubó con el anticuerpo WT1-C19 (1:1000) (Santa Cruz Biotechnology, Inc, Santa Cruz, CA, USA) y como control constitutivo con el anticuerpo de G3PDH (1:1000).

Se lavó la membrana tres veces con TBS-Tween y se agregó el segundo anticuerpo (anti-conejo) en una dilución 1:5000 y se incubó por 2 horas.

Las proteínas fueron visualizadas utilizando el sistema de quimioluminiscencia Lumi-Light Western Blotting (Roche, Pleasanton, CA, USA).

## **5.5 Preparación de células T**

Se obtuvieron muestras de sangre periférica de donadores sanos HLA-A\*02<sup>+</sup> por punción venosa, luego, se obtuvieron células mononucleares de sangre periférica (CMSP) aislándolas por un gradiente de densidad de Ficoll-Hypaque (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA) por centrifugación a 400 x g por 30 minutos a 20°C. Las CMSP fueron lavadas dos veces con PBS 1X, la primera vez a 400 x g por 10 minutos a 20°C y la segunda ocasión a 200 x g por 10 minutos a 20°C para eliminar la mayor parte de probable contaminación plaquetaria, y finalmente fueron resuspendidas en medio RPMI 1640 suplementado con 10% de suero fetal bovino (GIBCO, Invitrogen) ajustadas a  $1.8 \times 10^6$  células por pozo en placas de 12 pozos e incubadas por 2 horas a 37°C en ambiente de 5% de CO<sub>2</sub>. Tras el tiempo de incubación, las células que quedaron sin adherirse a la placa de cultivo, fracción correspondiente a los linfocitos de sangre periférica (LSP), fueron colectadas y transferidas a una nueva placa de 12 pozos en donde fueron cultivados bajo cuatro diferentes e independientes condiciones: en medio suplementado con 10 ng/mL de IL-2, otro con 100 ng/mL de IL-15, otro con 100 ng/mL de IL-21 y un cuarto con una combinación de IL-15 e IL-21 (PeproTech) en las mismas concentraciones que

para los tratamientos individuales, y conservados así hasta el momento en el que se realizaron los co-cultivos con las células presentadoras de antígeno específicas.

### **5.6 Obtención de células dendríticas (CD) a partir de monocitos de sangre periférica**

De las células obtenidas tras la separación por gradiente de densidad, la fracción adherente (principalmente monocitos y macrófagos) que quedó en la superficie plástica de las placas de cultivo de 12 pozos fueron colectadas e incubadas a 37°C y una atmósfera de 5% de CO<sub>2</sub> por un periodo de 48 hrs con medio RPMI 1640 suplementado con 10% de suero fetal bovino, en donde las primeras 24 hrs. recibieron estímulos con 1000 U/mL de factor estimulante de colonias de granulocitos y monocitos (GM-CSF) y 500 U/mL de IL-4 (PeproTech), transcurridas las primeras 24 hrs se agregó el péptido WT1 para su captación por las células dendríticas inmaduras en una concentración de 10µg/mL por 2 hrs, tiempo tras el cual se agregó el cocktail final de estimulación, que constó de IL-1β a una concentración de 10 ng/mL, TNF-α a una concentración de 1000 U/mL, IL-6 a una concentración de 10 ng/mL y PGE<sub>2</sub> en una concentración 1 µM (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA) y se incubaron por 24 hrs más. Las células que se generaron después de recibir estos estímulos fueron células dendríticas maduras que presentaban de manera específica el antígeno de interés para el estudio que se utilizaron para la generación de linfocitos T CD8<sup>+</sup> específicos de antígeno.

### **5.7 Análisis de fenotipo de las células dendríticas obtenidas a partir de monocitos de sangre periférica**

Tras la incubación de 48 hrs bajo los estímulos de GM-CSF, IL-4, IL-1β, TNF-α, IL-6 y PGE<sub>2</sub>, las células se lavaron 2 veces con PBS (1600 rpm por 10 minutos), se ajustó la cantidad de células a 1x10<sup>6</sup> y se resuspendieron en 100 µL de PBS en un

tubo de poliestireno de 5 mL y se incubaron por lapsos de 20 minutos en hielo y en oscuridad con 5 $\mu$ L de anticuerpo. Tras la incubación con el primer anticuerpo, se da un lavado con 1 mL de PBS 1X centrifugando a 1600 rpm por 10 minutos, se descarta el sobrenadante para eliminar el exceso de anticuerpo, se resuspende el pellet nuevamente en 100 $\mu$ L de PBS 1X y se agrega el siguiente anticuerpo, este procedimiento se repite hasta teñir las células con cada uno de los 4 anticuerpos, y el orden en que estos se incuban no afecta el resultado final del ensayo, sin embargo, con fines de estandarización el orden de tinción es el que se menciona a continuación. El panel de anticuerpos para citometría que se usaron para la fenotipificación de células dendríticas están dirigidos contra HLA-DR/FITC, CD80/PE, CD83/TC y CD14/PE-TR (Invitrogen). Como control negativo, se leyeron tres tubos con 5x10<sup>5</sup> células marcadas con un anticuerpo de ratón anti-humano IgG1/FITC e IgG2/PE (BD Bioscience), con esto se determinaron las zonas de positividad y negatividad de los histogramas para los marcadores antes mencionados. Las muestras fueron lavadas, fijadas en un volumen final de 500  $\mu$ L de paraformaldehído al 1% y finalmente fueron sujetas a un análisis fenotípico por Citometría de flujo (Beckman Coulter EPICS).

### **5.8 Ensayo de Fagocitosis de FITC-Dextran**

La capacidad fagocítica de las células dendríticas fue evaluada mediante la capacidad de captación del reactivo FITC-Dextran (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA).

2  $\times$  10<sup>5</sup> células fueron cultivadas en placas de 12 pozos con 1mL de medio de cultivo RPMI 1640 suplementado con 10% de suero fetal bovino (GIBCO). Una serie de pozos serán incubados por 1hr en presencia de 20 $\mu$ g/mL de FITC-Dextran a 37°C con un ambiente de 5% de CO<sub>2</sub>.

Como controles, una serie de pozos con la misma concentración de células dendríticas fueron incubados en medio sin FITC-Dextran (con H<sub>2</sub>O) por 1hr a

37°C, y a la vez una serie de pozos más con la misma concentración celular serán incubados con 20µg/mL de FITC-Dextran a 4°C.

Después del tiempo de incubación, las células fueron sometidas a 3 lavados con PBS 1X frío suplementado con 1% de suero fetal bovino para eliminar el exceso de FITC-Dextran que se encuentre en el medio o adherido inespecíficamente a la superficie de las células. Posterior a los lavados, las células se resuspendieron en un volumen final de 500 µL de paraformaldehído al 1% en tubos de poliestireno de 5 mL y fueron analizadas por citometría de flujo (Beckman Coulter EPICS).

### **5.9 Generación de linfocitos T CD8<sup>+</sup> antígeno-específicos productores de IFN $\gamma$ .**

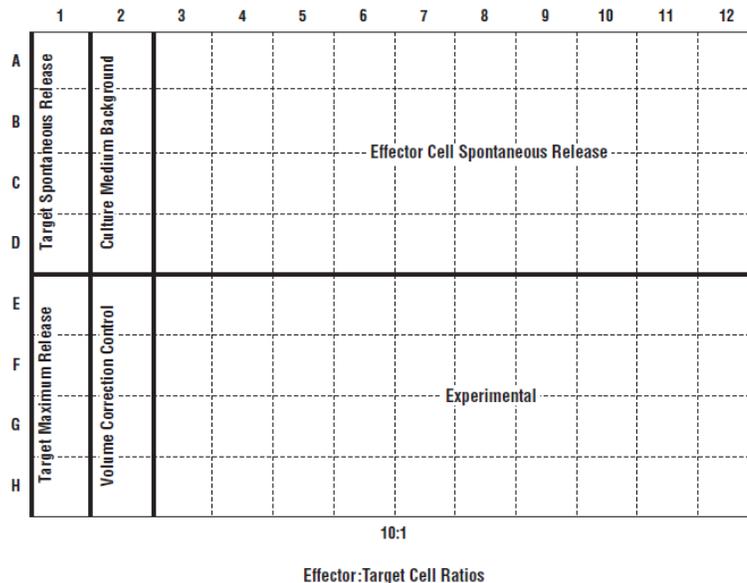
Los LSP previamente separados y que se encontraban bajo los estímulos de IL-2, IL-15, IL-21 e IL-15/IL-21 fueron co-cultivados en medio completo RPMI 1640 suplementado con 10% de SFB en conjunto con las células dendríticas pulsadas con 20µg/mL de antígeno WT1 en una relación efector:estimulador de 10:2 durante 7 días, durante este tiempo los cultivos se mantuvieron bajo los estímulos de IL-2, IL-15, IL-21 e IL-15/IL-21 y cada tercer día se reemplazaba la mitad del medio y se daban nuevamente estímulos de las citocinas antes mencionadas. Tras los 7 primeros días de incubación, se dio un reestímulo con  $2 \times 10^5$  células dendríticas frescas pulsadas con el antígeno por un lapso de 24 hrs. Al concluir esta última incubación, se colectaron los sobrenadantes y se evaluó la producción de IFN $\gamma$  por medio de un ensayo de ELISA (Invitrogen) según las instrucciones del fabricante. Con base en esta característica, se seleccionaron los pozos que contenían LSP activados que mostraron producción de IFN $\gamma$ , los cuales fueron sometidos a una separación magnética por selección negativa con el kit Dynabeads Untouched Human CD8 T cells (Invitrogen) según las instrucciones del fabricante, brevemente, la muestra se incubó con una mezcla de anticuerpos monoclonales biotinilados dirigidos contra todas aquellas células que no son linfocitos T CD8<sup>+</sup> (células B, NK, monocitos, células dendríticas, linfocitos T CD4<sup>+</sup> y granulocitos)

una vez que estos anticuerpos se unen a estas células, se agregan las perlas magnéticas Dynabeads que se unirán a las células marcadas con los anticuerpos, posteriormente las células unidas a las perlas magnéticas serán separadas y descartadas usando un magneto y las células que permanecen en el sobrenadante después de utilizar el magneto serán únicamente los linfocitos T CD8<sup>+</sup>, mismos que se mantuvieron en cultivo bajo la estimulación de IL-2, IL-15, IL-21 e IL-15/IL-21 en las concentraciones previamente mencionadas y en presencia de 0.1 µg/mL de anticuerpo anti-CD3 (Abcam, Cambridge, MA) para fomentar su proliferación hasta el momento de la evaluación de la citotoxicidad en contra de la línea MCF-7 de cáncer de mama. La pureza de la separación magnética se analizó mediante citometría de flujo (Beckman Coulter EPICS) utilizando anticuerpos simultest CD3(FITC)/CD8(PE) (BD Bioscience).

#### **5.10 Evaluación de citotoxicidad mediada por células utilizando el kit CytoTox 96 Non-Radioactive Cytotoxicity Assay**

Se utilizó el kit CytoTox 96 non-radioactive assay (Promega) para medir la actividad citotóxica según las instrucciones del fabricante. Este es un ensayo colorimétrico usado como alternativa al ensayo de liberación de Cr<sup>51</sup>. Mide cuantitativamente la enzima lactato deshidrogenasa (LDH), que es liberada al medio después de la lisis celular, de la misma manera que se libera el Cr<sup>51</sup>. La LDH liberada en el sobrenadante de los cultivos es medida en un lapso de incubación de 30 minutos usando un ensayo de acoplamiento enzimático. La densidad del color formado es proporcional al número de células lisadas. Se colectan datos de absorbancia usando una placa de cultivo de 96 pozos de fondo plano. 4,000 células MCF-7 fueron plaqueadas por triplicado para cada tratamiento e incubadas por 4 horas en presencia de 4x10<sup>4</sup> linfocitos T CD8<sup>+</sup> antígeno específicos para el péptido de WT1, que fueron obtenidos bajo los estímulos de IL-2, IL-15, IL-21 y la combinación de IL-15 e IL-21, así como también con 4 x10<sup>4</sup>

linfocitos que no fueron específicos del antígeno de WT1 y que estuvieron en presencia de los mismos estímulos de cada una de las citocinas. Después de la incubación se centrifugó la placa y se tomaron alícuotas de 50µL de cada pozo y fueron transferidos a una nueva placa de 96 pozos. A cada pozo de la placa se le agregaron 50µL del mix de substrato y se incubó la placa por 30 minutos a temperatura ambiente protegida de la luz. Antes de hacer la medición, se agregaron 50 µL de la solución de paro a cada pozo de la placa. La cantidad máxima de liberación de LDH de las células blanco, en este caso la línea MCF-7, fue alcanzada agregando solución de lisis proporcionada en el kit 45 minutos antes de recolectar el sobrenadante, y los controles negativos fueron pozos de células efectoras (linfocitos T CD8<sup>+</sup>) solas, así como de las células blanco (MCF-7), que serán considerados como controles de liberación espontanea de LDH para ambos tipos celulares. Finalmente se llevó a cabo la lectura de absorbancia de la placa a 490 nm dentro de la primera hora después de la adición de la solución de paro.



**Figura 8. Disposición recomendada de la placa para el ensayo de citotoxicidad usando el kit CytoTox 96 non-radioactive assay de Promega.**

El porcentaje de citotoxicidad fue calculado utilizando los promedios de las lecturas de absorbancia para cada tratamiento mediante la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Citotoxicidad} = \left( \frac{\text{Exp.} - \text{LE cel. efect.} - \text{LE cel. blanco}}{\text{max. LDH cel. blanco} - \text{LE cel. blanco}} \right) \times 100$$

Donde:

- Exp. = Promedio de las lecturas de los pozos experimentales
- LE cel. efect. = Promedio de las lecturas de la liberación espontánea de LDH de las células efectoras.
- LE cel. Blanco = Promedio de las lecturas de la liberación espontánea de LDH de las células blanco.
- max. LDH cel. blanco = Promedio de las lecturas de la liberación máxima de LDH de las células blanco

### 5.11 Análisis Estadístico

Cada experimento fue realizado dos veces por triplicado. Se utilizó el análisis de varianza (ANOVA) y las pruebas de Tuckey y Dunnett para discernir si existía diferencia entre las distintas estimulaciones, tomándose valores de  $p < 0.05$  como significativos.

## 6. RESULTADOS

### 6.1 Determinación del alelo de histocompatibilidad HLA-A\*02

Para llevar a cabo los ensayos *in vitro* en el contexto de una terapia celular adoptiva, se tuvo como objetivo determinar el tipo de HLA-A de los probables donadores en busca del alelo HLA-A\*02, así como confirmar la expresión del mismo en la línea celular MCF-7 que con anterioridad ya se ha reportado en la bibliografía. Para este fin se contó con la gentil colaboración de la M.C. Michelle de Jesús Zamudio Osuna del departamento de hematología del Hospital Universitario Dr. José Eleuterio González de Monterrey, NL, México.

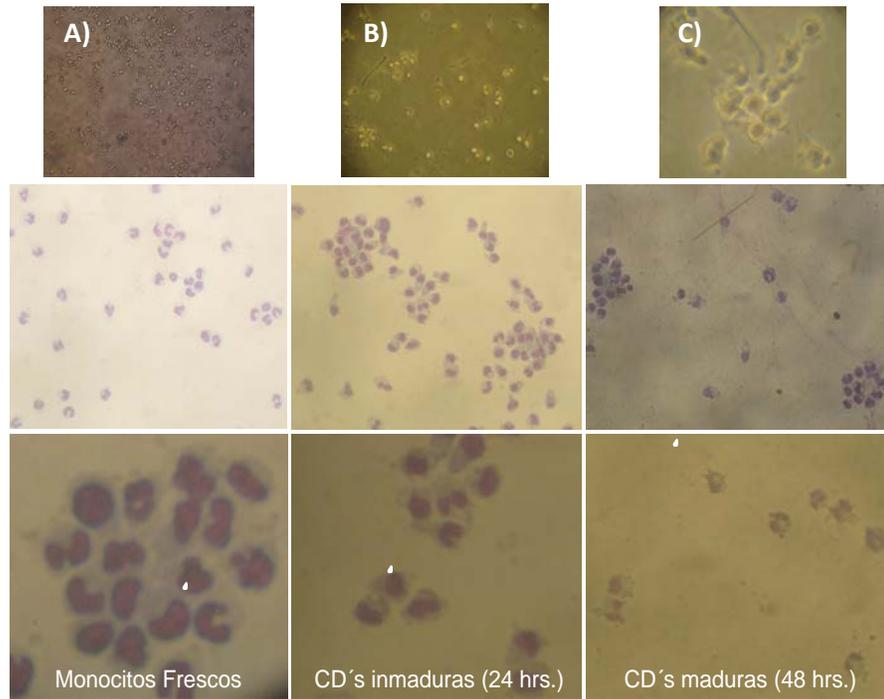
Se encontró que de 6 donadores sanos voluntarios, 3 mujeres y 3 hombres, solo 2 presentaron el alelo HLA-A\*02, ambos mujeres de entre 23 y 27 años de edad y heterocigotos para la expresión del mismo, siendo para los dos casos la más probable tipificación específica de este alelo HLA-A\*0201, lo cual con fines de la terapia celular adoptiva, resultaba indicado para la realización de los posteriores experimentos *in vitro*. Además, se confirmó que la línea celular tumoral MCF-7 de cáncer de mama con la que se contaba en el laboratorio, efectivamente expresaba el alelo de histocompatibilidad HLA-A\*02 siendo la tipificación específica del mismo HLA-A\*0201 al igual que para los dos donadores seleccionados.

Donador	Expresión de alelos HLA-A	Probable tipificación HLA-A
MCF-7	A*02 A*02	A*0201
1	A*02 A*24	A*0201 A*2402
2	A*24 A*68	A*2402 A*6801
3	A*24 A*31	A*2402 A*3101
4	A*02 A*68	A*0201 A*6801
5	A*24 A*31	A*2402 A*3101
6	A*01 A*36	A*0101 A*3604

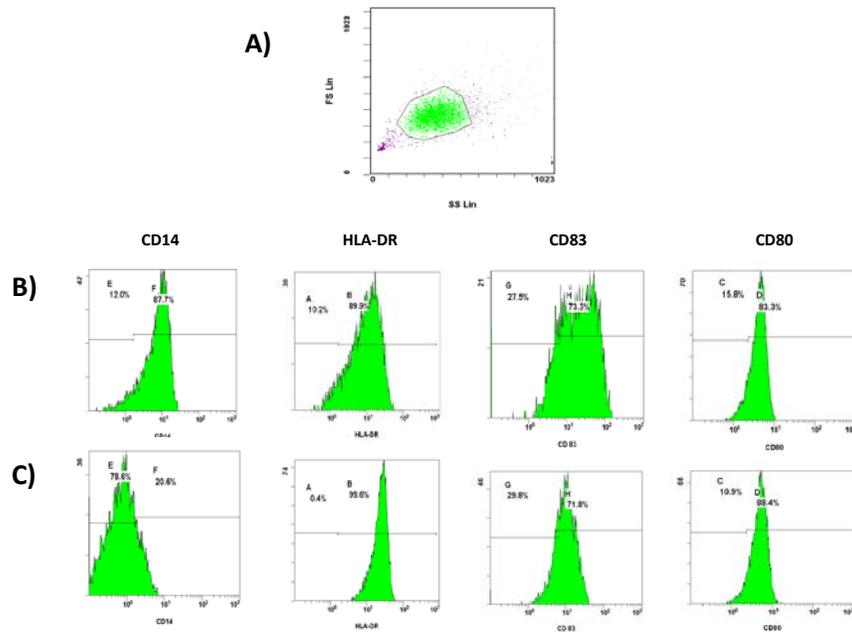
**Tabla 2. Tipos de HLA-A de los donadores y la línea celular MCF-7.** Se tomó una muestra de 6 mL de sangre periférica en tubos heparinizados por punción venosa de cada uno de los donadores, posteriormente se obtuvieron las CMSP de cada muestra por gradiente de densidad Ficoll-Hypaque centrifugando a 400 x g por 30 minutos a una temperatura de 20°C, las CMSP se lavaron 2 veces con PBS 1X centrifugando a 400 x g por 10 minutos y el pellet celular fue entregado en el departamento de hematología del Hospital Universitario Dr. José Eleuterio González, en donde se purificó el ADN y se secuenció el alelo HLA-A de cada muestra.

## **6.2 Generación de células dendríticas a partir de monocitos de sangre periférica de donadores HLA-A\*02<sup>+</sup>**

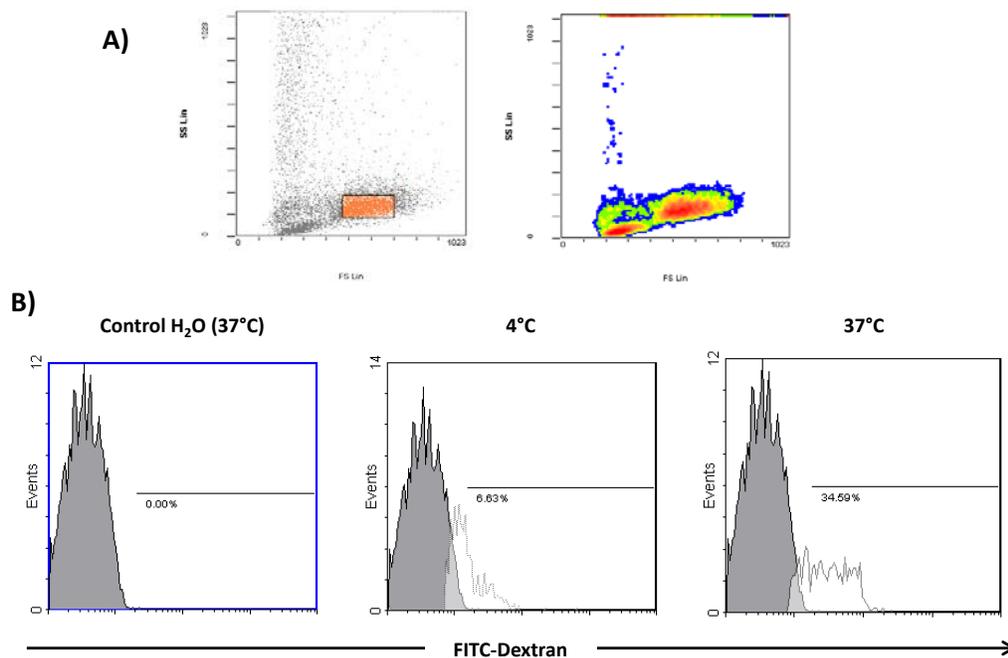
Con el fin de obtener células presentadoras de antígeno para estimular la generación de linfocitos específicos del antígeno WT1, los monocitos de sangre periférica de los donadores HLA-A\*02<sup>+</sup> fueron sometidos a un periodo de incubación de 48 horas en medio completo RPMI 1640 suplementado con 10% de suero fetal bovino a 37°C en una atmósfera de 5% de CO<sub>2</sub> en presencia de estímulos de las citocinas GM-CSF e IL-4 las primeras 24 horas, y de IL-1β, TNF-α, IL-6 y PGE<sub>2</sub> por 24 horas más, tiempo tras el cual los monocitos maduran a células dendríticas. La maduración se confirmó mediante 3 criterios, el primero, una tinción de Wright que muestra la evolución morfológica de las células durante el periodo de maduración de 48 horas el segundo, un análisis de fenotipificación por citometría de flujo utilizando 4 marcadores de superficie indicadores de maduración (HLA-DR/FITC, CD83/TC, CD80/PE y CD14/PE-TR) y el tercero, un ensayo de funcionalidad fagocítica utilizando el reactivo FITC-Dextran y analizado también por medio de citometría de flujo. Los resultados indicaron que los monocitos de sangre periférica de los donadores HLA-A\*02<sup>+</sup> presentan una maduración a células dendríticas en un periodo de 48 horas en presencia de estímulos con las citocinas antes mencionadas, lo cual es evidente morfológicamente (Fig. 9), así como en el patrón de expresión de marcadores de superficie en donde CD14 que es un marcador de linaje monocítico disminuye su expresión hasta en un 70%, HLA-DR homogeniza su expresión en 99% de la población y CD80 y CD83 muestran un perfil de expresión homogéneo y consistente de alrededor de 83 y 72% respectivamente (Fig. 10). Finalmente en el ensayo de fagocitosis se observó que 34% de las células dendríticas inmaduras (CDi) fagocitan el antígeno soluble en un lapso de 1 hora, 10 % más que lo que lo hacen las células dendríticas maduras (CDm), siendo mejor este tiempo para pulsarlas con el antígeno de WT1 a la par con el segundo estímulo de maduración con citocinas en las 24 horas finales del proceso (Fig. 11).



**Figura 9. Evolución de la morfología en la maduración de monocitos de sangre periférica a células dendríticas.** Se cultivaron  $2 \times 10^5$  monocitos por pozo en placas de 12 pozos en un volumen final de 1 mL de medio completo RPMI 1640 suplementado con 10% de suero fetal bovino. Se destinaron 2 pozos para realizar una tinción de Wright para observar la morfología de los monocitos frescos (A), el resto de los pozos recibieron un estímulo inicial de 24 horas con GM-CSF en una concentración de 1000 U/mL e IL-4 en una concentración de 400 U/mL, transcurrido este tiempo se destinaron 2 pozos para realizar la tinción de Wright y observar la morfología de las células dendríticas inmaduras (CDi) (B), el resto de los pozos recibieron el estímulo final de 24 horas con IL-1 $\beta$  en una concentración de 10 ng/mL, TNF- $\alpha$  en una concentración de 1000 U/mL, IL-6 en una concentración de 10 ng/mL y PGE<sub>2</sub> en una concentración de 1 $\mu$ M, transcurrido el tiempo de incubación con el segundo estímulo, los dos pozos restantes se destinaron a la tinción de Wright para observar la morfología de las células dendríticas maduras (CDm) (C).



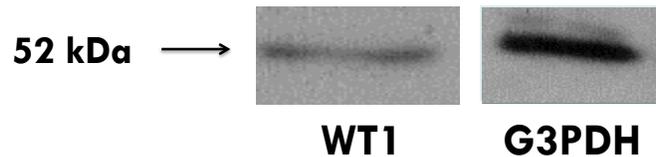
**Figura 10. Fenotipificación de las células dendríticas generadas a partir de monocitos de sangre periférica de donadores HLA-A\*02<sup>+</sup>.** Se cultivaron  $2 \times 10^5$  monocitos por pozo en placas de 12 pozos en un volumen final de 1 mL de medio completo RPMI 1640 suplementado con 10% de suero fetal bovino. Se recolectaron una serie de pozos por triplicado cada uno en un tubo de poliestireno para citometría que consistían en monocitos frescos los cuales se habían adherido a la superficie plástica por una previa incubación por dos horas a 37°C en una atmósfera de 5% de CO<sub>2</sub>, se retiró el medio de cultivo por centrifugación a 1600 rpm a 20°C por 10 minutos, y el pellet fue resuspendió en 100µL de PBS 1X, y a cada tubo se añadieron 5µl de cada anticuerpo asociado a los fluorocromos dirigidos a los 4 marcadores de superficie elegidos para la fenotipificación: HLA-DR/FITC, CD14/PE-TR (marcadores de linaje monocítico), CD83/TC y CD80/PE (marcadores de activación) (Invitrogen), se incubaron por un lapso de 20 minutos en obscuridad a 4°C y finalmente las células se lavaron 2 veces con PBS 1X centrifugando a 1600 rpm a 20°C por 10 minutos y resuspendiendo por último el pellet en 500 µL de una solución de paraformaldehído al 1% para fijar las células y leídas inmediatamente en el citómetro o a más tardar dentro de las 24 horas posteriores a la tinción. Por su parte otra serie de pozos por triplicado fueron sometidos al proceso de maduración de 48 horas para células dendríticas descrito previamente, y concluido el tiempo de estimulación, fueron teñidos de la misma manera que la descrita previamente para los monocitos frescos. Se muestran los histogramas representativos de 1 de 3 experimentos independientes, donde se muestra el dot plot donde se selecciono el gate de la población que se analizó (A), y los histogramas de la expresión de los diferentes marcadores tanto para monocitos (B) como para CDm (C).



**Figura 11. Ensayo de fagocitosis con FITC-Dextran.** Se cultivaron  $2 \times 10^5$  monocitos por pozo en placas de 12 pozos en un volumen final de 1 mL de medio completo RPMI 1640 suplementado con 10% de suero fetal bovino, se sometieron al protocolo de maduración de 48 horas previamente descrito, bajo las siguientes condiciones. Tras las primeras 24 horas de estimulación se agregó FITC-Dextran solubilizado en medio RPMI 1640 suplementado con 10% de suero fetal bovino en una concentración de 20  $\mu\text{g}/\text{mL}$  a pozos por triplicado y se incubó por 1 hora a 37°C con una atmósfera de 5% de  $\text{CO}_2$ , se utilizaron como controles una serie de pozos por triplicado a los que se añadieron 20  $\mu\text{L}$  de agua bidestilada estéril bajo las mismas condiciones de incubación, y finalmente una serie de pozos por triplicado a los que se añadió FITC-Dextran en una concentración de 20  $\mu\text{g}/\text{mL}$  incubados a una temperatura de 4°C, ya que a esta temperatura el proceso de fagocitosis se ve inhibido. Se presentan los gráficos representativos de 1 de 3 experimentos independientes en donde se aprecian el dot plot y el plot de densidad (A) usados para establecer el gate de la población a analizar según tamaño y granularidad, así como los histogramas para la fluorescencia de FITC-Dextran traslapados con su control representado por el área de color gris clara (B).

### 6.3 Detección de la expresión de la proteína WT1 en la línea celular tumoral de cáncer de mama MCF-7.

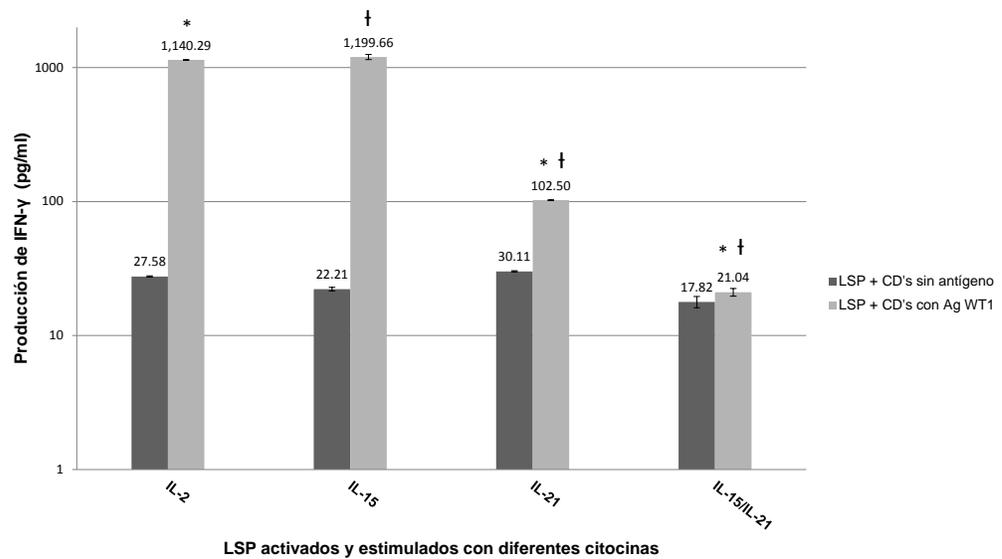
Con el fin de detectar la presencia de la proteína de WT1 que se plantea como blanco para los ensayos de citotoxicidad de LTCD8<sup>+</sup> en las células MCF-7, se realizó un ensayo de Western Blot en donde se logró observar una banda en el rango de los 52 kDa correspondiente a la proteína de WT1 teniendo como control el gen constitutivo G3PDH.



**Figura 12. Expresión de la proteína WT1 en la línea celular MCF-7.** Se corrieron 50  $\mu$ g de proteínas obtenidas de la línea MCF-7 en un gel de poliacrilamida al 12% por 20 min a 46V y después por 1 hora 40 minutos a 100V, una vez que terminó de correr el gel, se realizó la transferencia a membrana de nitrocelulosa corriendo en cámara húmeda a 26V por 2 horas, posteriormente se bloqueó la membrana con TBS-Tween con leche descremada al 5% durante 1 hora, luego se incubó con el anticuerpo WT1-C19 en una dilución 1:1000 y como control con el anticuerpo de G3PDH en una dilución 1:5000 por 1 hora 30 minutos, al finalizar la incubación, se lavó la membrana tres veces con TBS-Tween y se agregó el segundo anticuerpo (anti-conejo) en una dilución 1:5000 y se incubó por 2 horas. Finalmente la proteínas fueron visualizadas utilizando el sistema de quimioluminiscencia Lumi-Light Western Blotting de Roche.

#### **6.4 Producción de IFN- $\gamma$ por los LSP estimulados con células dendríticas y en presencia de IL-2, IL-15, IL-21 e IL-15/IL-21.**

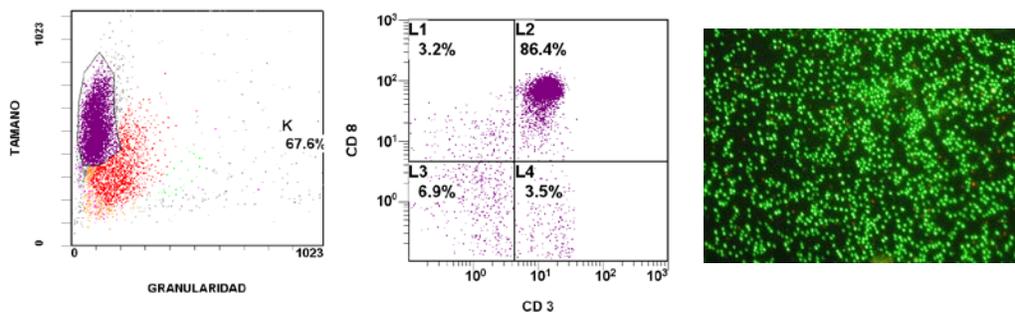
Para determinar la activación de los LSP mediado por las CD, se llevó a cabo un ensayo de ELISA para la detección de IFN- $\gamma$  en los sobrenadantes de los co-cultivos después de un tiempo de estimulación de 7 días para el priming de los linfocitos y 24 horas extra en presencia de CD frescas para su completa activación. Los resultados indican que la activación de LSP utilizando células dendríticas pulsadas con el antígeno de WT1 deriva en una producción de IFN- $\gamma$  mayor a aquella que se detecta para LSP que fueron estimulados con CD que no fueron pulsadas con ningún antígeno, esto para el caso particular de los cultivos que fueron estimulados con IL-2, IL-15 e IL-21, mientras que para el caso particular de la combinación de IL-15/IL-21 la producción de IFN- $\gamma$  de LSP estimulados con CD con o sin el antígeno de WT1 no mostró diferencias entre sí (Fig. 13), sin embargo, los linfocitos de los pozos que contenían el estímulo IL-15/IL-21 fueron tomados en cuenta para realizar los futuros ensayos de citotoxicidad mediante la evaluación de la actividad de la enzima lactato deshidrogenasa (LDH).



**Figura 13. Evaluación de la producción de IFN- $\gamma$  por LSP estimulados con células dendríticas.** Se co-cultivaron LSP que se mantenían en cultivo en presencia de IL-2 en una concentración de 20 ng/mL, IL-15 100 ng/mL, IL-21 100 ng/mL e IL-15/IL-21 100 ng/mL de cada una, junto con células dendríticas pulsadas o no con 20  $\mu$ g/mL del péptido de WT1 en una relación de 10:2, esto quiere decir,  $1 \times 10^6$  LSP con  $2 \times 10^5$  CD en placas de 12 pozos en un volumen final de 1 mL de medio completo RPMI 1640 suplementado con 10% de suero fetal bovino y la citocinas antes mencionadas en las concentraciones correspondientes. Se mantuvieron estos cultivos por 7 días a 37°C en atmósfera de 5% de CO<sub>2</sub>, para permitir que ocurriera el priming o pre-activación de los LSP, durante este periodo de tiempo, cada tercer día se sustituía la mitad del medio y se volvía a estimular con los 4 diferentes esquemas de citocinas en las concentraciones mencionadas para cada una. Al finalizar el séptimo día, se realizó el proceso de activación de los LSP, reestimulándolos con  $2 \times 10^5$  CD frescas pulsadas o no con el péptido de WT1 incubando a 37°C en una atmósfera de 5% de CO<sub>2</sub> por 24 horas más. Al finalizar el periodo de 24 horas, se recolectaron 500 $\mu$ L del sobrenadante de los diferentes pozos y se analizó la producción de IFN- $\gamma$  por medio de ensayos de ELISA. Se tomó como significativo un valor de  $p < 0.05$  (\*, †).

## 6.5 Separación magnética de LT CD8<sup>+</sup>.

Para seleccionar los LT CD8<sup>+</sup> antígeno específicos generados previamente por co-cultivo con células dendríticas pulsadas con el péptido de WT1, se llevó a cabo una separación magnética por selección negativa de los mismos utilizando el kit Dynabeads untouched human CD8 T cells de invitrogen. Se obtuvieron como resultado de la separación magnética, los LT CD8<sup>+</sup> de cada uno de los patrones de estimulación con las diferentes citocinas: IL-2, IL-15, IL-21 e IL15/IL-21. El porcentaje de pureza celular tras la selección negativa es de alrededor del 90% (Fig. 14). Estos linfocitos fueron mantenidos en cultivo bajo los estímulos de las diferentes citocinas antes mencionadas y en presencia de 0.1 µg/mL de anticuerpo anti-CD3 (Abcam) hasta el momento de realizar el ensayo de citotoxicidad.



**Figura 14. Separación magnética de linfocitos T CD8<sup>+</sup>.** Tras llevar a cabo la activación de LSP, se colectaron las células de cada pozo correspondiente a la estimulación con las diferentes citocinas y se sometieron a la separación magnética de selección negativa Untouched human CD8 T cells de invitrogen y fueron teñidas con 5 µL de anticuerpos simultest CD3(FITC)/CD8(PE) para verificar la pureza de la separación por citometría de flujo. Se muestran las gráficas de citometría correspondientes al análisis de pureza de la separación de los LT CD8<sup>+</sup> así como una fotografía de la tinción por naranja de acridina de las células para apreciar su viabilidad. Resultados representativos de 1 de 3 experimentos independientes.

## **6.6 Evaluación de la citotoxicidad de LT CD8<sup>+</sup> en contra de la línea celular tumoral de cáncer de mama MCF-7.**

Para evaluar la eficacia de la activación específica de los LT CD8<sup>+</sup> contra el péptido de 9 aminoácidos correspondiente a la proteína de WT1 que sabemos se expresa en la línea celular de cáncer de mama MCF-7, se llevó a cabo un ensayo de citotoxicidad mediada por células utilizando el kit CytoTox 96 non-radioactive assay de Promega según las especificaciones del fabricante y como se describe en la sección de materiales y métodos. Se realizó un ensayo preliminar en donde se obtuvieron LT CD8<sup>+</sup> frescos sin ninguna estimulación con el antígeno específico de WT1, manteniéndolos solo en cultivo por tres días en presencia de las citocinas IL-2, IL-15, IL-21 e IL-15/IL-21, tras este periodo de incubación se realizó el ensayo de citotoxicidad en contra de la línea tumoral MCF-7. Los resultados demuestran que los LT CD8<sup>+</sup> frescos que no reciben estimulación alguna con el antígeno específico solamente con las diferentes citocinas propuestas en este trabajo, presentan un porcentaje de citotoxicidad muy bajo incluso en el caso de los linfocitos que se mantuvieron sin estímulo de citocinas no se detecta efecto citotóxico (Fig. 15 A), el mínimo porcentaje detectado para los LT CD8<sup>+</sup> puede ser debido a la aloreactividad de algunos linfocitos del donador que se sabe fue heterocigoto para el alelo de histocompatibilidad HLA-A\*02 por lo que esta citotoxicidad puede ser inespecífica, de igual manera se realizó una tinción con naranja de acridina para evaluar viabilidad de las células MCF-7 en presencia de estos linfocitos, observándose que el efecto citotóxico de éstos no es suficiente para evitar el crecimiento de la línea tumoral (Fig. 15 B).

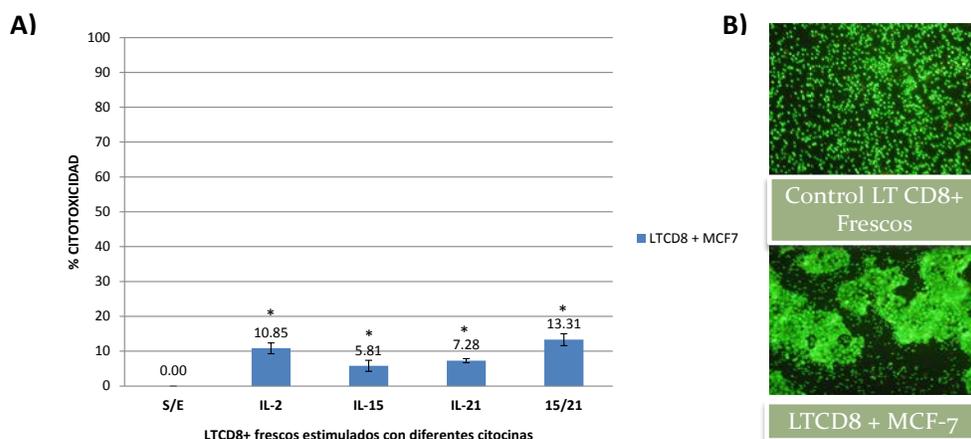
Por su parte el ensayo de citotoxicidad realizado para los LT CD8<sup>+</sup> que pasaron por el proceso de activación de 8 días previamente descrito en presencia de CD con y sin el antígeno de WT1, presentan un aumento en su efecto citotóxico contra la línea celular MCF-7 (Fig.16), por un lado los LT CD8<sup>+</sup> que estuvieron en contacto con las CD que no presentaban el antígeno de WT1 presentan un aumento en su citotoxicidad que en promedio es de un 50% presentando ligeras variaciones entre

los diferentes estímulos con las citocinas, este aumento es propio de la aloreactividad potenciada por la activación de los linfocitos pero sin llegar a ser una respuesta específica. Por el contrario, los LT CD8<sup>+</sup> que estuvieron en contacto con CD que presentaban el antígeno de WT1 muestran una citotoxicidad promedio del 100% sin diferencia estadística entre cada uno de los estímulos con las diferentes citocinas (Fig. 16), lo cual confirma una respuesta específica y dirigida contra la línea celular, en específico contra el antígeno de WT1 que es presentado mediante el alelo de histocompatibilidad HLA-A\*0201 en la línea MCF-7.

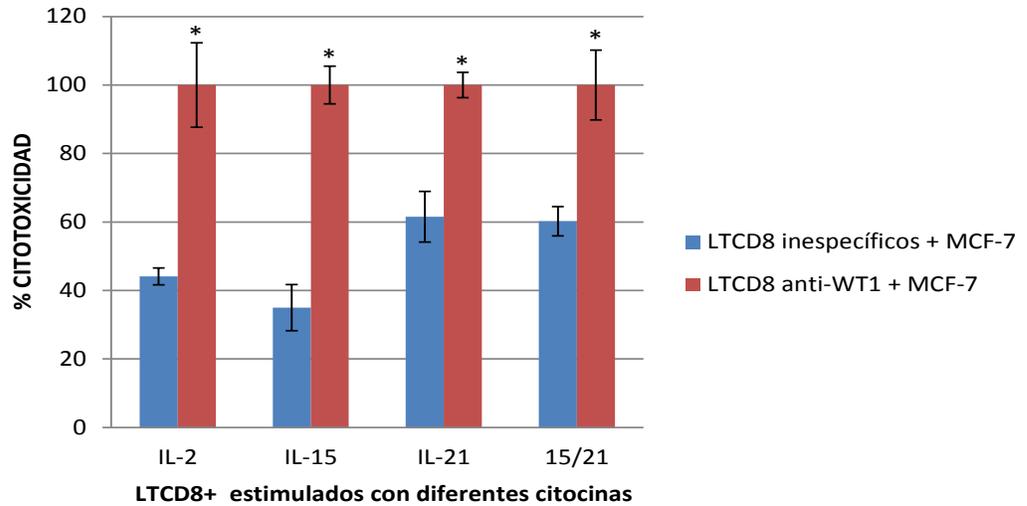
Para confirmar este proceso de citotoxicidad y su impacto sobre la viabilidad de la línea celular MCF-7, se mantuvieron los co-cultivos de LT CD8<sup>+</sup> y células MCF-7 en una relación 10:1 respectivamente, por 48 horas adicionales para observar el comportamiento celular de ambas poblaciones. Tras ese periodo de 48 horas se realizó una tinción con naranja de acridina para observar la viabilidad celular de las poblaciones presentes en los co-cultivos (LT CD8<sup>+</sup> y MCF-7). Se observó que en los pozos que contenían LT CD8<sup>+</sup> no específicos para WT1 tras un periodo de 48 horas no detuvieron el crecimiento de la línea celular tumoral MCF-7, este fenómeno se presentó en cada una de las condiciones de estímulo de las diferentes citocinas (IL-2, IL-15, IL-21 e IL-15/IL-21), por su parte en los pozos que contenían LT CD8<sup>+</sup> específicos del antígeno WT1 tras el periodo de 48 horas, se aprecia que no existen células MCF-7 viables debido al efecto citotóxico específico dirigido contra WT1. Estos resultados se pueden apreciar en la Figura 17, donde se muestran fotografías representativas tanto de los controles de células MCF-7 y LT CD8<sup>+</sup> cultivados por separado así como de la interacción de ambas ya sea si estuvieron o no activadas contra WT1 y bajo los estímulos de las distintas citocinas. Las diferencias en cuanto a viabilidad observadas en los pozos cuyos LT CD8<sup>+</sup> no estuvieron activados contra WT1 con los que si lo estuvieron, se debe a que los primeros presentan una reacción citotóxica inespecífica la cual no es suficiente para detener la proliferación de las células tumorales que tras 48 horas escaparon de esa respuesta inespecífica y continuaron su crecimiento.

Finalmente, con el fin de corroborar la morfología de las células en co-cultivo, LT CD8<sup>+</sup> y MCF-7, se realizó una tinción de Wright para evidenciar la presencia de ambas células en el co-cultivo.

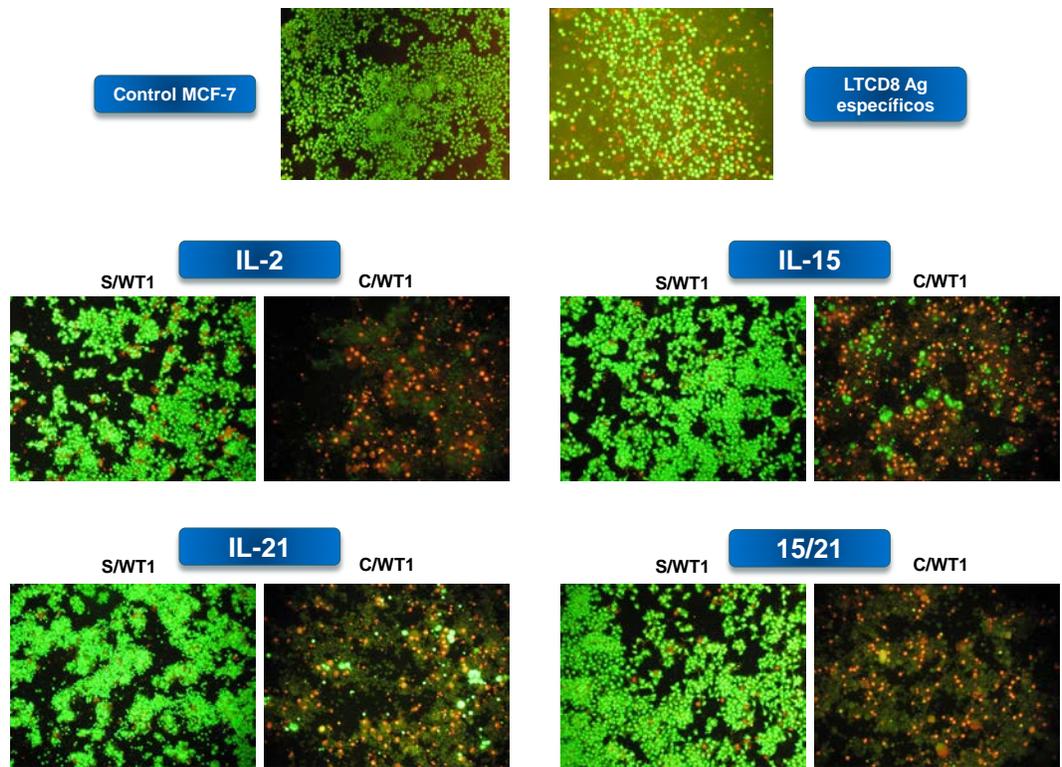
En la figura 18 se aprecian las fotografías del control de la línea celular MCF-7, y también fotografías donde se aprecia la presencia tanto de linfocitos como de la línea en co-cultivo, mismas que solo pudieron obtenerse en los pozos donde los linfocitos no eran específicos y la línea MCF-7 continuó su crecimiento, ya que para los pozos donde los linfocitos eran específicos contra el antígeno WT1 no presentaban células viables y los linfocitos se encontraban en suspensión, al realizar la tinción de Wright con los distintos lavados que implica, todos los residuos y linfocitos fueron arrastrados en los lavados y las células que se distinguen tras la tinción son casi nulas a excepción de algún linfocito residual, lo cual indica la efectividad citotóxica de los LT CD8<sup>+</sup> específicos de WT1.



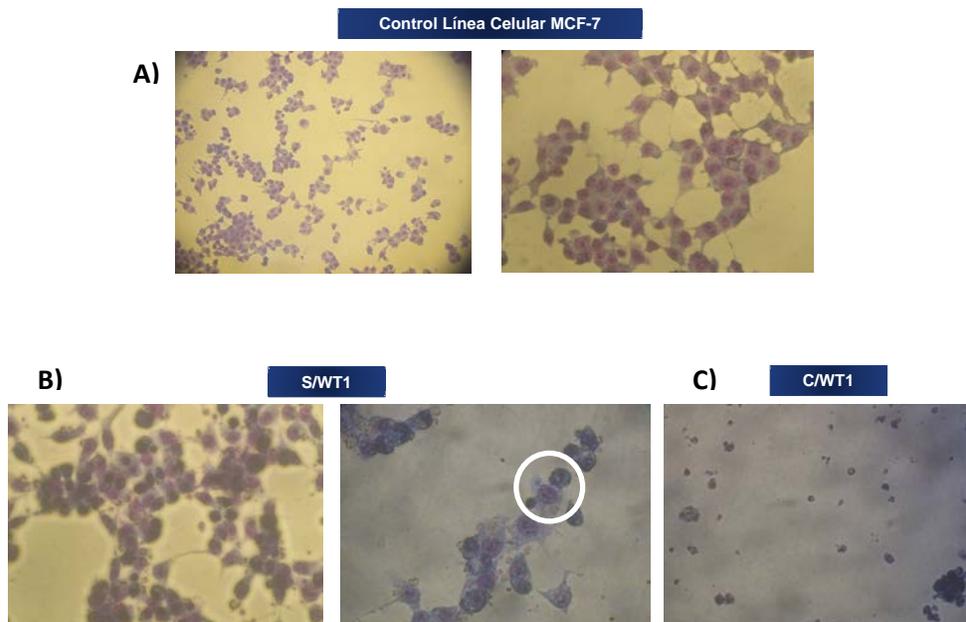
**Figura 15. Ensayo de citotoxicidad de LT CD8<sup>+</sup> frescos estimulados con IL-2, IL-15, IL-21 e IL-15/IL-21 contra la línea tumoral MCF-7.** Se cultivaron  $1 \times 10^5$  LTCD8<sup>+</sup> que se habían mantenido por 3 días bajo estímulos de IL-2, IL-15, IL-21 e IL-15/IL-21 junto con  $1 \times 10^4$  células MCF-7 en placas de 96 pozos en un volumen final de 100  $\mu$ L de medio completo RPMI 1640 suplementado con 10% de suero fetal bovino, se incubaron a 37°C en una atmósfera de 5% de CO<sub>2</sub> por 4 horas y transcurrido ese tiempo se recolectaron 50  $\mu$ L de sobrenadante de cada uno de los pozos en la placa de 96 pozos dispuesta para el ensayo como se especifica en la sección de materiales y métodos y se realizó el ensayo de citotoxicidad según el protocolo indicado en el kit CytoTox 96 non-radioactive assay (A). Para la tinción con naranja de acridina se sembraron  $1 \times 10^5$  LT CD8<sup>+</sup> frescos que se mantuvieron con y sin estímulos de las citocinas antes mencionadas por 3 días, con  $1 \times 10^4$  células MCF-7, se cultivaron a 37°C en una atmósfera de 5% de CO<sub>2</sub> por 48 horas y se realizó la tinción por naranja de acridina, se muestran fotos representativas del control de LT CD8<sup>+</sup> y el co-cultivo de 2 experimentos independientes realizados por triplicado. Se tomó como significativo un valor de  $p < 0.05$  (\*).



**Figura 16. Ensayo de citotoxicidad de LT CD8<sup>+</sup> antígeno específicos estimulados con IL-2, IL-15, IL-21 e IL-15/IL-21 contra la línea tumoral MCF-7.** Los LT CD8<sup>+</sup> específicos para el antígeno WT1 caracterizados previamente por la producción de IFN- $\gamma$  y aquellos que no fueron específicos para WT1 fueron aislados utilizando el kit Dynabeads Untouched human CD8 T cells de invitrogen y fueron estimulados con IL-2, IL-15, IL-21 e IL-15/IL-21 mas 0.1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  del anticuerpo anti-CD3 por 3 días, luego se ajustaron a  $4 \times 10^4$  LT CD8<sup>+</sup> y fueron cultivados junto con  $4 \times 10^3$  células MCF-7 en placas de 96 pozos en un volumen final de 100  $\mu\text{L}$  de medio completo RPMI 1640 suplementado con 10% de suero fetal bovino, se incubaron a 37°C en una atmósfera de 5% de CO<sub>2</sub> por 4 horas y transcurrido ese tiempo se recolectaron 50  $\mu\text{L}$  de sobrenadante de cada uno de los pozos en la placa de 96 pozos dispuesta para el ensayo como se especifica en la sección de materiales y métodos y se realizó el ensayo de citotoxicidad según el protocolo indicado en el kit CytoTox 96 non-radioactive Assay. Se tomó como significativo un valor de  $p < 0.05$  (\*), siendo no estadísticamente significativa la diferencia en cuanto a porcentaje de citotoxicidad entre cada citocina, solo la diferencia entre cada estímulo y su respectivo control.



**Figura 17. Tinción de naranja de acridina para evaluar viabilidad celular de la línea tumoral MCF-7 en presencia de linfocitos estimulados con células dendríticas.** Tras colectar los 50 $\mu$ L de sobrenadantes para el ensayo de citotoxicidad, los co-cultivos de las células MCF-7 y LT CD8<sup>+</sup> específicos de WT1 así como los que no estuvieron en contacto con el antígeno se mantuvieron en incubación por 48 horas en 100  $\mu$ L de medio completo RPMI 1640 suplementado con 10% de suero fetal bovino, transcurrido este tiempo, se tiñó con naranja de acridina cada pozo correspondiente a los LT CD8<sup>+</sup> específicos o no del antígeno WT1 que se activaron bajo los diferentes estímulos de las citocinas IL-2, IL-15, IL-21 e IL-15/IL-21 y se observó la viabilidad de ambas poblaciones con sus respectivos controles.



**Figura 18. Morfología celular en los co-cultivos de LT CD8<sup>+</sup> estimulados con células dendríticas y la línea tumoral MCF-7.** Tras colectar los 50µL de sobrenadantes para el ensayo de citotoxicidad, los co-cultivos de las células MCF-7 y LT CD8<sup>+</sup> específicos de WT1 así como los que no estuvieron en contacto con el antígeno se mantuvieron en incubación por 48 horas en 100 µL de medio completo RPMI 1640 suplementado con 10% de suero fetal bovino, transcurrido este tiempo, se realizó una tinción de Wright cada pozo correspondiente a los LT CD8<sup>+</sup> específicos o no del antígeno WT1 que se activaron bajo los diferentes estímulos de las citocinas IL-2, IL-15, IL-21 e IL-15/IL-21 y se observó la morfología de las células en cultivo, donde se apreció el control de células MCF-7 solas (A) y la interacción entre linfocitos y células MCF-7 (B), excepto en los pozos donde la citotoxicidad fue del 100% correspondiente a la acción de los LT CD8<sup>+</sup> específicos del antígeno WT1, en donde tras realizar los distintos lavados para la tinción, no se observan más que unos cuantos restos celulares y algunos linfocitos residuales (C).

## 7. DISCUSIÓN

Siendo el cáncer una de las principales causas de muerte a nivel mundial y a su vez el cáncer de mama el que mayor índice de casos presenta en mujeres anualmente (Zhou and Zhong, 2004), muchos estudios se han basado en comprender los mecanismos biológicos y moleculares implicados en la evolución multifactorial de tumores en los seres humanos (Hanahan and Weinberg, 2011), dentro de los cuales se ha encontrado el elucidar la interacción que estas células tumorales establecen con el sistema inmunológico y sus diversos componentes (proteínas, anticuerpos y células de respuesta especializada) el cual se sostiene como el principal y único mecanismo de defensa natural de nuestro organismo contra las enfermedades, y que es capaz de montar una serie de respuestas contra la generación de tumores que implica diversas conexiones e interacciones a nivel molecular y celular tan importantes de comprender como complejas de descifrar y que se establecen de diferentes maneras dependiendo de los factores que originan este tipo de neoplasias y las células que participan en este proceso (Finn, 2008).

Todos estos esfuerzos han sido guiados hacia la generación de terapias que potencien esta respuesta inmunológica sin impactar negativamente la calidad de vida de los pacientes, a diferencia de los tratamientos actualmente establecidos como los pilares históricos para combatir esta enfermedad (Kirkwood *et al.*, 2012), debido a esto ha surgido la hoy llamada terapia de células T adoptiva, desarrollada como una terapia transfusional autóloga cuyo objetivo es aumentar de manera específica la respuesta del sistema inmunológico propio del paciente contra procesos de evolución tumoral, llevando a cabo para esto una capacitación *ex vivo* de las células T, principalmente del linaje CD8, bajo los estímulos de diferentes factores solubles pleiotrópicos (citocinas), antigénicos y moleculares (Rosenberg *et al.*, 2008; Restifo *et al.*, 2012).

Nuestro trabajo se enfocó principalmente, en la estandarización y establecimiento de los protocolos *in vitro* de este tipo de terapia en nuestro laboratorio para lograr la capacitación específica de células T del tipo CD8 utilizando células dendríticas restringidas a la

presentación del antígeno específico WT1 y bajo estímulos de las proteínas solubles IL-2, IL-15 e IL-21, con el fin de buscar diferencias en cuanto a la funcionalidad adquirida en concreto a la citotoxicidad celular específica mediada contra el cáncer de mama de los linfocitos cultivados en estas condiciones, esto con referencia a la información presentada por [Rochman et al. en 2009](#) que expone las diferentes vías de diferenciación y capacitación de linfocitos por citocinas que pertenecen a la familia de la cadena  $\gamma_c$ , siendo esto de gran importancia para la TCA cuyo éxito radicarán en que se logre mejorar las características efectoras y de permanencia de los LT CD8<sup>+</sup> después de su transfusión en el organismo de los pacientes, procurando evadir cualquier influencia de tipo reguladora ([Antony and Restifo, 2005](#)) y de muerte celular por activación, la cual se puede alcanzar mediante la adquisición de un fenotipo de memoria ([Bolesta et al., 2006](#)).

Como primera parte de este trabajo se tipificó el alelo de histocompatibilidad HLA-A tanto para la línea tumoral MCF-7, como de 6 donadores sanos previo consentimiento informado, en busca de el alelo específico HLA-A\*02<sup>+</sup> el cual es importante para desarrollar el trabajo *in vitro* bajo las condiciones adecuadas para la evaluación y estudio de una TCA como lo reporta [Gatz et al. en su trabajo de 2000](#) el cual sostiene la importancia de la tipificación de este tipo de alelo para estudios inmunoterapéuticos de respuesta específica restringida a antígenos ligados al CMH I; mientras que por su parte [Hawkins et al. en 2007](#) reafirma la importancia de la identificación de péptidos ligados a esta molécula para la inmunoterapia enfocada al cáncer de mama. Los resultados obtenidos tras la secuenciación de este alelo específico arrojaron que de los 6 donadores sanos evaluados, solo dos presentaron el alelo de histocompatibilidad HLA-A\*02, siendo heterocigotos en la expresión de esta molécula en particular, y siendo la supertipificación más probable del mismo HLA-A\*0201 que como lo reporta [Pelte et al. en 2004](#) es el alelo más frecuente para la molécula HLA-A\*02 en la población caucásica, y según información del departamento de hematología del Hospital Universitario Dr. José Eleuterio González en Monterrey, N.L., uno de los alelos que con mayor frecuencia se presentan en las muestras analizadas en el mismo. Por su parte, la tipificación de la línea tumoral MCF-7 resultó ser HLA-A\*02<sup>+</sup> con la supertipificación más probable HLA-A\*0201 lo cual concuerda con la literatura reportada para la misma, así como con los trabajos que postulan el uso de esta

línea para desarrollo de trabajos experimentales que emplean inmunoterapias basadas en la utilización de células T (Carlsson *et al.*, 2007).

Estos resultados nos dieron razón para continuar el trabajo experimental *in vitro* con la certeza de contar con un modelo adecuado para evaluar la respuesta citotóxica específica de linfocitos T CD8<sup>+</sup> contra la línea tumoral MCF-7 en un contexto propio de inmunoterapia celular adoptiva.

El siguiente aspecto considerado fue detectar la presencia de la proteína de WT1 en la línea tumoral MCF-7 mediante la técnica de Western Blot. Los resultados indicaron que la línea tumoral efectivamente expresa la proteína de WT1 como ya se había reportado previamente (Zapata *et al.*, 2002). Este resultado mostró que la proteína de WT1 puede ser utilizada como blanco específico para este estudio, considerando el hecho de su sobreexpresión en la línea MCF-7, y la característica de que adicionalmente se puede incrementar a pasajes celulares elevados (Wang and Wang, 2009), además, considerando que mas allá de que existen reportes de su presencia en aproximadamente el 90% de los casos de pacientes con cáncer de mama, esta proteína también tiene la particularidad de que al ser procesada para su presentación en el CMH I da origen a un péptido antigénico de 9 aminoácidos que esta restringido particularmente al alelo HLA-A\*0201 (Novellino *et al.*, 2004), el cual elegimos para desarrollar este trabajo debido a que se ajustó a las características de restricción de HLA-A de nuestro modelo *in vitro*, y que además ha sido ampliamente utilizado en estudios inmunoterapéuticos, ya sea en su secuencia nativa que comprende los aminoácidos del 126-134 (RMFPNAPYL) o modificada en un solo aminoácido (YMFPNAPYL) para tratar de aumentar su antigenicidad (Borbulevych *et al.*, 2010), se ha evaluado adicionalmente la utilidad del mismo y otros péptidos relacionados a WT1 asociados a diferentes alelos tanto de CMH clase I y clase II en diversos trabajos enfocados a la inmunoterapia celular específica (Oka *et al.*, 2000; Stauss *et al.*, 2007; Oka and Sugiyama, 2010; Ochsenreither *et al.*, 2010; Shirakata *et al.* 2012; Driessche *et al.*, 2012).

Para continuar con el trabajo secuencial de nuestro modelo, se realizó la estandarización del protocolo de maduración de células dendríticas a partir de monocitos de sangre periférica de

nuestros donadores sanos en un periodo de 48 hrs. Los resultados mostraron que la diferenciación tanto morfológica como fenotípica y funcional de las células dendríticas generadas a partir de monocitos de sangre periférica de los donadores sanos HLA-A\*02<sup>+</sup> fue la adecuada para que éstas células fungieran como presentadoras de antígeno con los fines propuestos en nuestro trabajo. Por su parte, la diferenciación morfológica fue la esperada en base a lo reportado por [Landi \*et al.\* en 2007](#), donde se evalúa la diferenciación de monocitos a células dendríticas, y donde podemos encontrar diferencias visuales mínimas debido a que en este trabajo se reporta un protocolo de estimulación de 72 horas, mientras que el utilizado para este trabajo fue el protocolo reportado por el equipo de [Dauer \*et al.\* en 2003 y 2005](#) en donde la diferenciación en un lapso de 48 hrs demostró ser suficiente para que las células tuvieran capacidades fenotípicas y efectoras propias de una célula presentadora de antígeno, de esta forma logramos eficientizar los tiempos de cultivo para nuestro trabajo, sin embargo, dadas estas diferencias morfológicas mínimas, se confirmó la total maduración de nuestras células dendríticas mediante una fenotipificación por citometría de flujo en donde los marcadores de linaje monocítico CD14 y HLA-DR muestran un patrón de expresión consistente con la maduración celular observando que la expresión de CD14 se pierde tras la maduración y HLA-DR aumenta y se homogeniza como se reporta en trabajos como los de [Jarnjak-Jankovic \*et al.\* en 2007](#) y de [Bürdek \*et al.\* en 2010](#), por su parte los marcadores claves de activación CD80 y CD83 presentan una expresión sostenida de aproximadamente entre 70 y 80% durante el tiempo de maduración, situación que difiere de los trabajos antes mencionados, ya que estas dos moléculas de superficie tienden a no estar presentes en etapas inmaduras de las células dendríticas y en monocitos, sin embargo esta expresión que se detecta desde etapas inmaduras puede deberse a la interacción con plaquetas residuales que pudieron estar en contacto con las células desde el momento de su separación en el gradiente de densidad, la incubación para la separación por adherencia al plástico, así como durante todo el periodo de maduración de 48 horas, este efecto sobre la expresión de estos dos marcadores de superficie específicos está reportado en el trabajo de [Martinson \*et al.\* de 2004](#), donde la interacción del ligando de CD40 (CD40L) presente en plaquetas activadas autólogas, con células precursoras de células dendríticas incrementa la expresión de CD80, CD83 y CD86

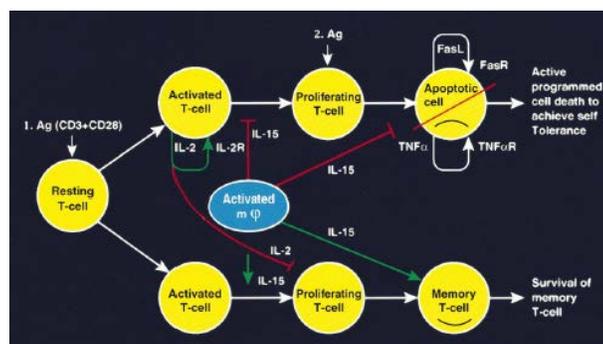
hasta en un 80% en cortos periodos de tiempo. Sin embargo, el hecho de que en nuestro trabajo se hayan detectado las expresiones desde etapas inmaduras de las células, esto no interfiere con su maduración ni con la adquisición de sus funciones inmunológicas efectoras de presentación antigénica, como lo reportan en el trabajo antes mencionado y como lo pudimos observar en nuestros experimentos.

Finalmente el ensayo de funcionalidad de fagocitosis se realizó para corroborar la capacidad de nuestras células dendríticas para captar antígenos solubles, como sería el caso de nuestro péptido de 9 aa de WT1, para esto utilizamos el reactivo FITC-Dextran. Los resultados demuestran que las CDM obtenidas después de 48 hrs de estimulación son capaces de fagocitar exitosamente antígenos solubles, lo cual concuerda con trabajos reportados con anterioridad donde este ensayo es utilizado para evaluar esta característica particular de las células dendríticas (von Euw *et al.*, 2007; Bürdek *et. al.*, 2010).

Esta serie de resultados fue de gran utilidad para estandarizar el protocolo de maduración y caracterización fenotípica de las células dendríticas bajo las condiciones de nuestro laboratorio, además, en base a ellos se nos facilitó determinar el mejor tiempo para la pulsación de nuestro antígeno soluble de 9aa de WT1, que fue en la etapa inmadura de las CD, que como se reporta, es la etapa donde nuestras células tienen mayor capacidad fagocítica (Platt *et al.*, 2010).

Continuando con el siguiente punto en la secuencia de nuestro trabajo, una vez que contamos con la población tanto de células presentadoras de antígeno, como con los linfocitos de sangre periférica, proseguimos a generar linfocitos antígeno-específicos contra WT1, realizando para esto co-cultivos de CD y LSP, y evaluando la activación de nuestros linfocitos por un ensayo de ELISA para IFN- $\gamma$ . Los resultados muestran que fue posible obtener una activación de los LSP mediante un co-cultivo con CD, y que esta activación esta acompañada por la producción de IFN- $\gamma$  como lo refiere Wilde *et al.* en 2009 y Bürdek *et al.* en 2010. Los niveles detectados de esta citocina producida por linfocitos activados después de llevar acabo el proceso de presentación antigénica concuerdan con los reportados por estos trabajos, en el caso particular de los LSP estimulados con IL-2 e IL-15 se obtiene una producción muy elevada de IFN- $\gamma$  en

comparación con aquellos que no se vieron sometidos a una activación específica con el antígeno de 9aa de WT1 y que fueron tomados como control, ya que las células dendríticas con que se co-cultivaron no fueron pulsadas con ningún antígeno. Estos niveles de producción de IFN- $\gamma$  están asociados a la similitud que existe en las vías de señalización de estas dos citocinas que pertenecen a la familia de la cadena  $\gamma_c$  como lo reporta el trabajo de [Hinrichs et al. en 2008](#) en donde especifica que la estimulación de linfocitos T CD8 con cualquiera de estas dos citocinas incrementará la producción de IFN- $\gamma$ , granzima B y perforina debido a que utilizan a las proteínas activadoras de transcripción STAT5a y STAT5b, y aunque ambas utilizan la misma vía, IL-2 es la única citocina que estimula la supervivencia, proliferación y expansión clonal de las células T reguladoras ([Rochman et al.,2009](#)) mientras que IL-15 fomenta solamente la expansión y funciones efectoras de linfocitos antígeno específicos, a su vez que estimula la adquisición de un fenotipo de memoria caracterizado por la expresión del marcador de superficie CD44, lo cual confiere a las células un mayor tiempo de sobrevivencia, mientras que estímulos de IL-2 inducirán la muerte celular inducida por activación, disminuyendo el tiempo de vida de linfocitos activados y por ende la duración de sus capacidades efectoras ([Waldmann et al. 2001](#)) (**Fig. 19**).



**Figura 19.** Diferencias en el ciclo de vida y muerte celular entre IL-2 e IL-15 ([Waldmann et al., 2001](#))

Por otro lado pese a que trabajos como los de [Skak et al. en 2008](#) indican que la estimulación con IL-21 aumenta la producción de IFN- $\gamma$ , el comportamiento observado en nuestros experimentos de los LSP estimulados con IL-21 o la combinación IL-15/IL-21, muestran una producción de IFN- $\gamma$  significativamente menor que los LSP estimulados ya sea con IL-2 o IL-15 por separado. Por su parte, nuestro resultado concuerda con lo reportado por [Parmigiani et al. en 2011](#) en el cual reporta que la citotoxicidad mediada por linfocitos estimulados con IL-21 es independiente de la producción de IFN- $\gamma$  y consecuencia del aumento en la producción de perforina y granzima B la cual es inducida por la activación de las vías STAT1 y STAT3, ya que a pesar de que IL-2 e IL-15 también promueven la activación de los genes de expresión de estos gránulos, solo IL-21 aumenta la concentración de estos a nivel de proteína, para los trabajos que reportan que IL-21 aumenta la producción de IFN- $\gamma$ , el grupo de trabajo de [Skak et al.](#) menciona que este aumento puede estar más bien relacionado con el aumento de la cantidad de células productoras de IFN- $\gamma$  más que por el aumento en la producción de esta citocina por las células, mientras que [Sivakumar et al. reporta en 2004](#) que los estímulos de IL-21 previenen la expresión desmedida de IFN- $\gamma$  como mecanismo de regulación de la respuesta inmune, este argumento propone una explicación para nuestro resultado en el que una sinergia de estímulos entre IL-15 e IL-21 no aumenta la producción de IFN- $\gamma$ , ni en comparación con estímulos de IL-21 sola, ni tampoco con el control de LSP activados con CD sin antígeno, por lo que hipotetizamos que mientras IL-15 estimula la proliferación de células efectoras de memoria caracterizadas por la expresión de CD44 y su producción de IFN- $\gamma$ , IL-21 funge como reguladora impidiendo que esta producción sea mayor a la normal, manteniendo así la homeostasis de la respuesta inmunológica y fomentando a su vez el fenotipo de memoria central caracterizado por la expresión conservada del marcador CD28 el cual le permite reaccionar de manera potente en recaídas tumorales ([J.S Yi et al., 2010](#)). Finalmente como lo reporta [Collins et al. en 2003](#), los efectos de IL-21 sobre la producción de IFN- $\gamma$  variarán dependiendo del estado de diferenciación de las células que responden.

Estos resultados pese a la complejidad molecular de los mismos, nos indican que los estímulos de citocinas utilizados en este trabajo, son capaces de activar a los LSP de manera

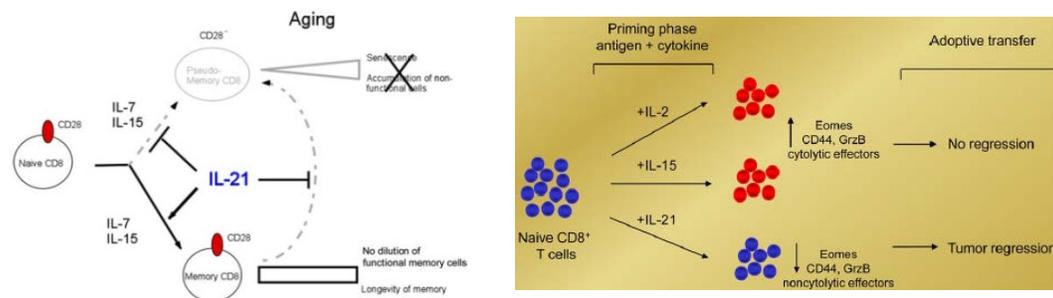
específica contra un antígeno tumoral, y que de esta activación en donde participan IL-2, IL-15 e IL-21 dependerá las características fenotípicas de los mismos así como sus capacidades efectoras que pueden afectar a varios niveles la calidad y eficacia de la respuesta anti-tumoral en un TCA.

El criterio final a evaluar en este trabajo fue la actividad citotóxica de los LT CD8<sup>+</sup> antígeno-específicos estimulados bajo la influencia de IL-2, IL-15, IL-21 e IL-15/IL-21. Los resultados mostraron que la citotoxicidad mediada por estas células restringidas a un antígeno único de WT1 es del 100% y además contiene el crecimiento desmedido de la línea tumoral MCF-7, pese a que los LT CD8<sup>+</sup> obtenidos de la activación con CD sin antígeno mostraron una citotoxicidad de entre 40 y 60%, éstos fueron incapaces de controlar el crecimiento de la línea tumoral MCF-7, por lo que concuerda con lo reportado en el trabajo de [Kim et al. en 2002](#) y [Wilde et al. en 2009](#) en donde se reporta que puede manifestarse un porcentaje de aloreactividad, lo cual corresponde a una respuesta no específica pero activada por los estímulos tanto de las citocinas como de la interacción con las CD y sus moléculas co-estimuladoras, sin embargo, esta aloespecificidad va en decremento conforme pasa el tiempo, lo que confirma el hecho de que nuestras células no específicas no tuvieron la capacidad de detener el crecimiento de la línea tumoral MCF-7 tras un periodo de 48 hrs dado que nuestros donadores sanos resultaron ser heterocigotos en la expresión de sus alelos HLA-A, no siendo el alelo HLA-A\*02 el único expresado en sus células, esta reacción por lo tanto era de esperarse, como se logro percibir en la estimulación de LT CD8<sup>+</sup> frescos solo bajo los estímulos de las citocinas, donde se presentaron niveles de citotoxicidad inespecífica bajos y que debido al estímulo activador de las CD por consecuencia se vio aumentado tras la incubación con las mismas, pese a que no presentaban el antígeno de WT1.

Por su parte se demostró que los LT CD8<sup>+</sup> antígeno-específicos estimulados con la combinación IL-15/IL-21 pese a no incrementar su producción de IFN- $\gamma$  notablemente, si adquirieron capacidades citotóxicas específicas siendo capaces de eliminar a las células tumorales e impedir su proliferación tras un periodo de 48 hrs.

Al finalizar podemos concluir que tanto IL-15 como IL-21 dadas sus capacidades de estimulación pueden ser usadas para promover la citotoxicidad de las células destinadas para llevar a cabo una terapia de células T adoptiva contra el cáncer, siendo WT1 un antígeno prometedor para usarse como blanco en particular contra tumores sólidos como el cáncer de mama. Es de vital importancia asimismo tomar en consideración las probables implicaciones favorables de ambas citocinas para futuros trabajos no solo en el aspecto de función efectora citotóxica sino también en el aspecto de diferenciación celular y evasión de respuestas inmunes reguladoras como un futuro importante dentro de las mejoras en la TAC, por ser potenciales precursoras de fenotipos de memoria con capacidades efectoras conservadas y su baja influencia en promover el fenotipo regulador en el proceso del cáncer (Hinrichs *et al.*, 2008; Neela and Carson III, 2009).

Finalmente, tras los resultados obtenidos y la sustentación bibliográfica acerca del conocimiento de IL-21, habrá que poner particular atención a la funcionalidad de esta citocina que más allá de fungir como potenciadora de la función efectora anti-tumoral, es también un posible regulador de la respuesta inmunológica, utilizando como probable mecanismo el retraso de la adquisición de un fenotipo efector de los LT CD8<sup>+</sup> sin interrumpir su diferenciación, lo cual le hará adquirir capacidades de células de memoria central que en teoría inhibirá la senescencia celular prolongando su permanencia en el organismo logrando efectos anti-tumorales mayores tras la transfusión adoptiva y en probables reincidencias (Fig. 20).



**Figura 20. Potencial fenotípico y efector de células estimuladas con IL-21 (Tagaya, 2009; Darcy, 2008)**

## 8. CONCLUSIONES

- Se lograron detectar 2 pacientes con el alelo de histocompatibilidad HLA-A\*02 indicado para ensayos de inmunoterapia celular adoptiva.
- Se estandarizó el método de maduración de células dendríticas en un periodo de 48 hrs., a partir de monocitos de los donadores HLA-A\*02.
- Se comprobó la maduración de monocitos a células dendríticas in vitro por medio de fenotipificación y ensayo de función fagocítica utilizando citometría de flujo, lo cual permitió estandarizar el mejor tiempo para que éstas fagociten un antígeno soluble.
- Se desarrollaron cultivos de linfocitos T CD8<sup>+</sup> antígeno específicos contra el antígeno WT1 mediante co-cultivo con células dendríticas en un periodo de 8 días.
- Se comprobó la eficacia citotóxica de los LTCD8<sup>+</sup> antígeno específicos estimulados con IL-2, IL-15, IL-21 e IL-15/IL-21 contra la línea tumoral MCF-7.
- Se comprobó que la proteína de WT1, en específico el péptido de 9 aminoácidos comprendido en la región 126-134 de la proteína (RMFPNAPYL) es un blanco terapéutico específico de gran potencial para ser usado en terapia celular adoptiva contra cáncer de mama.

## 9. PERSPECTIVAS

- La capacidad de las citocinas IL-15 e IL-21, así como su combinación, confieren capacidades citotóxicas similares a los linfocitos estimulados con IL-2, lo cual sugiere que podrían usarse en sustitución de esta última en la estimulación *ex vivo* de la TCA.
- Futuros trabajos deberán enfocarse en evaluar si los estímulos con IL-15 e IL-21 confieren a los LTCD8<sup>+</sup> un fenotipo de memoria que les permita perdurar más en el organismo y combatir futuras recaídas, lo cual sumado al potenciamiento de la citotoxicidad justificaría el uso de estas citocinas en sustitución de la IL-2 comúnmente utilizada en estos procesos.

*"A la piel le añado marcas nuevas,  
a los ojos futuros distintos.  
Hoy soy todo, incluso eso que no he vivido."*

*Edel Juárez*

## 10. LITERATURA CITADA

1. Abdolamir Landi, Lorne A. Babiuk, and Sylvia van Drunen Littel-van den Hurk. 2007. High transfection efficiency, gene expression, and viability of monocyte-derived human dendritic cells after nonviral gene transfer. *Journal of Leukocyte Biology*.
2. Abul K. Abbas, Andrew H. Lichtman and Shiv Pillai. 2008. *Inmunología Celular y Molecular*. Elsevier: España, pp. 397-417.
3. Adam D. Judge, Xiaohong Zhang, Hideki Fujii, Charles D. Surh, and Jonathan Sprent. 2002. Interleukin 15 Controls both Proliferation and Survival of a subset of Memory-Phenotype CD8<sup>+</sup> T Cells. *J. Exp. Med.*; 7: 935-946.
4. Adrianna Moroz, Cheryl Eppolito, Qingsheng Li, Jianming Tao, Christopher H. Clegg, and Protul A. Shirkant. 2004. IL-21 Enhances and Sustains CD8<sup>+</sup> T Cell Responses to Achieve Durable Tumor Immunity: Comparative Evaluation of IL-2, IL-15 and IL-21. *The Journal of Immunology*; 173: 900-909.
5. Alexander Batista Duharte, 2003. Función del sistema inmune en la defensa contra tumores malignos. *MEDISAN* 7: 75-88.
6. Alicia Santos Savia. 2006. Interleucina-15: una citocina relevante en la homeostasis linfoide y en enfermedades autoinmunes. *Biotecnología Aplicada* 23: 79-86.
7. Angela M. Crawley, Tanya Katz, Karl Parato and Jonathan B. Angel. 2008. IL-2 receptor  $\gamma$  chain cytokines differentially regulate human CD8<sup>+</sup> CD127<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> CD127<sup>-</sup> T cell division and susceptibility to apoptosis. *International Immunology* 21: 29-42.

8. Anita Parmigiani, Maria F. Pallin, Helena Schmidtmayerova, Mathias G. Liohtenheld, Savita Pahwa. 2011. Interleukin-21 and cellular activation concurrently induce potent cytotoxic function and promote antiviral activity in human CD8 T cells. *Human immunology*; 72: 115-123.
9. Ann Van Driessche, Swi N. Berneman, Viggo F.I. van Tendeloo. 2012. Active Specific Immunotherapy targeting the Wilms' Tumor Protein 1 (WT1) for patients with hematological malignancies and solid tumors: Lessons from Early Clinical Trials. *The Oncologist*; 17: 250-259.
10. Bioarrayanes Centro de Estudios Médicos y Enfermedades Gastroenterológicas, 2001. Investigación Básica. Inmunología del Cáncer [Internet]. Disponible en: <http://www.bioarrayanes.cl/tbasico.html> [Revisado el 15 de Junio de 2012].
11. Björn Carlsson, Ole Forsberg, Mats Bengtsson, Thomas H. Tötterman and Magnus Essand, 2007. Characterization of Human Prostate and Breast Cancer Cell Lines for Experimental T Cell-Based Immunotherapy. *The Prostate* 67: 389-395.
12. C. Yee, J.A. Thompson, D. Byrd, S.R. Riddell, P. Roche, E. Celis and P.D. Greenberg. 2002. Adoptive T cell therapy using antigen-specific CD8<sup>+</sup> T cell clones for the treatment of patients with metastatic melanoma: *In vivo* persistence, migration, and antitumour effect of transferred T cells. *PNAS* 99: 16168-16173.
13. Carl H. June. 2007 a. Principles of adoptive T cell cancer therapy. *The Journal of Clinical Investigation* 117: 5.
14. Carl H. June. 2007 b. Adoptive T cell therapy for cancer in the clinic. *The Journal of clinical Investigation* 117.
15. Carolina Berger, Michael C. Jensen, Peter M. Lansdorp, Mike Gough, Carole Elliott and Stanley R. Riddell. 2008. Adoptive transfer of effector CD8<sup>+</sup> T cells derived from

central memory cells establishes persistent T cell memory in primates. *The Journal of Clinical Investigation* 118: 294-305.

16. Christian DeJaco, Christina Dftner and Michael Schirmer. 2006. Induction of tolerance in autoimmune diseases rather than cure of cancer by interleukin-2 therapy. *Journal of Clinical Oncology* 24: p e34.
17. Christian Pelte, Gregory Cherepnev, Yanjun Wang, Constanze Shoenemann, Hans-Dieter Volk and Florian Kern, 2004. Random Screening of Proteins for HLA-A\*0201-Binding Nine-Amino Acid Peptides Is Not Sufficient for Identifying CD8 T Cell Epitopes Recognized in the Context of HLA-A\*0201. *The Journal of Immunology* 172: 6783-6789.
18. Christian S. Hinrichs, Rosanne Spolski, Chrystal M. Paulos, Luca Gattinoni, Keith W. Kerstann, Douglas C. Palmer, Christopher A. Klebanoff, Steven A. Rosenberg, Warren J. Leonard and Nicholas P. Restifo. 2008. IL-2 and IL-21 confer opposing differentiation programs to CD8<sup>+</sup> T cells for adoptive immunotherapy. *Blood*; 111.
19. Christopher A. Klebanoff, Luca Gattinoni, Nicholas P. Restifo. 2006. CD8<sup>+</sup> T cell memory in tumor immunology and immunotherapy. *Immunol Rev* 211: 214-224.
20. Christopher A. Klebanoff, Luca Gattinoni, Parizad Torabi-Parizi, Keith Kerstann, Adela R. Cardones, Steven E. Frinkelstein, Douglas C. Palmer, Paul A. Antony, Sam T. Hwang, Steven A. Rosenberg, Thomas A. Waldmann and Nicholas P. Restifo. 2005. *PNAS* 102: 9571-9576.
21. Craig D. Platt, Jessica K. Ma, Cécile chalouni, Melanie Ebersold, Hani Bou-Reslan, Richard A.D. Carano, Ira Mellman, and Lélia Delamarre. 2010. Mature dendritic cells use endocytic receptors to capture and present antigens. *PNAS*; 107: 4287-4292.

22. Dong-Kyu Kim, Jong-Hwa Kim, Young-Tae Kim, Jae-Wook Kim, and Constantine G. Ioannides. 2002. The comparison of cytotoxic T-Lymphocyte effects of dendritic cells stimulated by the folate binding protein peptide cultured with IL-15 and IL-2 in solid tumor. *Yansei Medical Journal*; 43: 691-700.
23. Douglas Hanahan and Robert A. Weinberg, 2000. The Hallmarks of cancer. *Cell* 100: 57-70.
24. Douglas Hanahan and Robert A. Weinberg. 2011. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*; 144.
25. Douglas J. Schwartzentruber. 2001. Guidelines for the Safe Administration of High-Dose Interleukin-2. *Journal of Immunotherapy*; 24: 287-293.
26. Elizabeth Bolesta, Aleksandra Kowalczyk, Andrzej Wierzbicki, Cheryl Eppolito, Yutaro Kaneko, Masafumi Takiguchi, Leonidas Stamatatos, Protul A. Shrikant and Danuta Kozbor. 2006. Increased level and Longevity of protective immune responses induced by DNA vaccine expressing the HIV-1 Env glycoprotein when combined with IL-21 and IL-15 gene delivery. *J Immunol*; 177: 177-191.
27. Elizabeth Bolesta, Aleksandra Kowalczyk, Andrzej Wierzbicki, Cheryl Eppolito, Yutaro Kaneko, Masafumi Takiguchi, Leonidas Stamatatos, Protul A. Shrikant, and Danuta Kozbor. 2006. Increased Level and Longevity of Protective Immune Responses Induced by DNA Vaccine Expressing the HIV-1 Env Glycoprotein when combined with IL-21 and IL-15 Gene Delivery. *J Immunol.*; 177: 177-191.
28. Erik L Brincks and David L Woodland. 2010. Novel roles for IL-15 in T cell survival. *F1000 Biology Reports*; 2: 67.
29. Erika M. von Euw, Maria M. Barrio, David Furman, Michele Bianchini, Estrella M Levy, Cassian Yee, Yongqing Li, Rosa Wainstok and José Mordoh. 2007. Monocyte-

derived dendritic cells loaded with a mixture of apoptotic/necrotic melanoma cells efficiently cross-present gp100 and MART-1 antigens to specific CD8<sup>+</sup> T lymphocytes. *Journal of Translational Medicine*; 5: 19.

30. Hae-Young Park, Lalage M. Wakefield and Mizuko Mamura, 2009. Regulation of tumor immune surveillance and tumor immune subversion by TGF- $\beta$ . *Immune network* 9: 122-126.
31. Hans J. Stauss, sharyn Thomas, Michela Cesco-Gaspere, Daniel P. Hart, Shao-An Xue, Angelika Holler, Judy King, Graham Wright, Mario Perro, Constantina Pospori, Emma Morris. 2007. WT1-specific T cell receptor gene therapy: Improving TCR function in transduced T cells. *Blood cells, molecules and diseases*; 40: 113-116.
32. Haruo sugiyama. 2010. WT1 (Wilms' Tumor Gene 1): Biology and cancer immunotherapy. *Jpn J clin Oncol*; 40: 377-387.
33. Jian-Qing Gao, Naoki Okada, Tadanori Mayumi and Shinsaku Nakagawa. 2008. Immune Cell Recruitment and Cell-Based system for cancer therapy. *Pharmaceutical Research* 25.
34. John M. Kirkwood, Lisa H. Butterfield, Ahmad a. Torhini, Hassane Zarour, Powel Kalinski, Soldano Ferrone. 2012. Immunotherapy of cancer in 2012. *Ca Cancer J Clin*; 00: 000-000.
35. John S. Yi, Maureen A. Cox, Allan J. Zajac. 2010. Interleukin-21: a multifunctional regulator of immunity to infections. *Microbes and Infection*; 12: 1111-1119.
36. Johua Zhou and Yin Zhong. 2004. Breast cancer immunotherapy. *Cellular and molecular immunology*; 1: 247-255.

37. Jolanta M. Dzik, 2010. The ancestry and cumulative evolution of immune reactions. *Acta ABP Biochimica Polonica* 57: 443-466.
38. Jose Carlos Jaime Perez, 2001. Biología del sistema de antígenos leucocitarios humanos (HLA) y su importancia en el trasplante. *Medicina Universitaria* 3: 149-52.
39. Juhua Zohou and Yin Zhong, 2004. Breast Cancer Immunotherapy. *Cellular and Molecular Immunology*, 1: 247-255.
40. Kresten Skak, Michael Kragh, Diana Hausman, Mark J. Smyth and Pallavur V. Sivakumar. 2008. Interleukin-21: combination strategies for cancer therapy. *Nature Reviews Drug Discovery*; 7.
41. Lei Wang and Zhao-Yi Wang. 2009. The Wilms' tumor suppressor WT1 induces estrogen-independent growth and anti-estrogen insensitivity in ER- positive breast cancer MCF7 cells. *Oncology reports*; 23: 1109-1117.
42. Luca Gattinoni, Daniel J. Powell Jr., Steven A. Rosenberg and Nicholas P. Restifo. 2006. Adoptive immunotherapy for cancer: building on success. *Nature Reviews Immunology*; 6.
43. Luisa Novellino, Chiara Castelli, Giorgio Parmiani. 2005. A listing of human tumor antigens recognized by T cells: March 2004 update. *Cancer Immunol Immunother*; 54: 187-207.
44. M. Hickey, M. Peate, C.M. Saunders and M. Friedlander. 2009. Breast cancer in young women and its impact on reproductive function. *Human Reproduction update* 15: 323-339.
45. M. Montes, N. Rufer, V. Appay, S. Reynard, M.J. Pittet, D.E. Speiser, P. Guillaume, J.C. Cerottini, P. Romero and S. Leyvraz. 2005. Optimum *in vitro* expansion of human

- antigen-specific CD8<sup>+</sup> T cells for adoptive transfer therapy. *Clinical and Experimental Immunology* 142: 292-302.
46. M. Montes, N. Rufer, V. Appay, S. Reynard, M.J. Pittet, D.E. Speiser, P. Guillaume, J.-C. Cerottini, P. Romero and S. Leyvraz. 2005. Optimum in vitro expansion of human antigen-specific CD8<sup>+</sup> T cells for adoptive transfer therapy. *Clinical and Experimental Immunology*; 142: 292-302.
47. Maja Bürdek, Stefani Spranger, Sussane Wilde, Bernhard Frankenberger, Dolores J Schendel, Cristiane Geiger. 2010. Three-day dendritic cells for vaccine development: Antigen uptake, processing and presentation. *Journal of Translational Medicine*; 8: 90.
48. Marc Dauer, Bianca Obermaier, Jan Herten, Carola Haerle, Katrin Pohl, Simon Rothenfusser, Max Schnurr, Stefan Endres and Andreas Eigler. 2003. Mature Dendritic cells derived from human monocytes within 48 hours: A novel strategy for dendritic cell differentiation from blood precursors. *The Journal of Immunology*; 170: 4069-4076.
49. Marc Dauer, Katharina Schad, Jan Herten, Jona Junkmann, Christian Bauer, Rosemarie Kiefl, Stefan Endres and Andreas Eigler. 2005. FastDC derived from human monocytes within 48 h effectively prime tumor antigen-specific cytotoxic T cells. *Journal of Immunological Methods*; 302: 145-155.
50. Martinsen J., Bae J., Klingemann HG, Tam Y. 2004. Activated platelets rapidly up-regulate CD40L expression and can effectively mature and activate autologous *ex vivo* differentiated DC. *Cytotherapy*; 6: 487-97.
51. Mary Collins, Matthew J. Whitters and Deborah A. Young. 2003. IL-21 and IL-21 Receptor A new cytokine Pathway modulates innate and adaptive immunity. *Immunologic Research*; 28: 131-140.

52. Mercedes López, Alejandro Escobar, Jorge Alfaro, Miguel Fodor, Milton Larrondo, Carlos Ferrada, Flavio Salazar-Onfray. 2004. Avances en inmunoterapia celular contra el melanoma maligno. *Rev Méd Chile* 132: 1115-1126.
53. National Cancer Institute. 2007. Página principal, [Internet]. Disponible en: <http://www.cancer.gov> [Revisado el 10 de mayo de 2012]
54. National Institutes of Health (NIH) Clinical Center. 2012. Página principal, [Internet]. Tratamiento con Interleucina-2 por vía intravenosa. Publicaciones de información para el paciente. Disponible en: <http://clinicalcenter.nih.gov/> [Revisado el 30 de julio de 2012]
55. Neela S. Bhave and William E. Carson III. 2009. Immune Modulation with interleukin-21. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*; 1182: 39-46.
56. Nicholas P. Restifo, Mark E. Dudley and Steven A. Rosenberg. 2012. Adoptive immunotherapy for cancer: harnessing the T cell response. *Nature Reviews Immunology*; 12.
57. Oleg Y. Borbulevych, Priscilla Do, Brian M. Baker. 2010. Structures of native and affinity-enhanced WT1 epitopes bound to HLA-A\*0201: Implications for WT1-based cancer therapeutics. *Molecular Immunology*; 27: 2519-2524.
58. Olivera J. Finn. 2008. Cancer immunology. *N Engl J Med* 358: 270 4-15.
59. Oriana E. Hawkins, Rodney S. VanGundy, Annette M. Eckerd, Wilfried Bardet, Rico Buchli, Jon A. Weidanz and William H. Hildebrand, 2007. Identification of Breast Cancer Peptide Epitopes Presented by HLA-A\*0201. *Journal of Proteome Research* 7: 1445-1457.

60. Pallavur V. Sivakumar, Donald C. Foster and Christopher H. Clegg. 2004. Interleukin-21 is a T-helper cytokine that regulates humoral immunity and cell-mediated anti-tumour responses. *Immunology*; 112: 177-182.
61. Paul Andrew Antony and Nicholas P. Restifo. 2005. CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> T Regulatory cells, immunotherapy of cancer and interleukin-2. *J Immunother*; 28: 120-128.
62. Phillip K. Darcy. 2008. IL-21 priming enhances T-cell immunotherapy. *Blood*; 111.
63. Rebollo y A. Silva. 1994. Estructura y función del receptor de IL-2. *Inmunología* 13: 39-47.
64. Rong Zeng, Rosanne Spolski, Steven E. Finkelstein, SangKon Oh, Panu E. Kovanen, Christian S. Hinrichs, Cynthia A. Pise-Masison, Michael F. Radonovich, John N. Brady, Nicholas P. Restifo, Jay A. Berzofsky, and Warren J. Leonard. 2005. Synergy of IL-21 and IL-15 in regulating CD8<sup>+</sup> T cell expansion and function. *JEM*; 1: 139-148.
65. Roopinder Gillmore, Shao-An Xue, Angelika Holler, Jaspal Kaeda, Dimitri Hadjiminias, Vourneen Healy, Roberto Dina, Suzanne C. Parry, Ilaria Bellantuono, Yasmeen Ghani, R. Charles Coombes, Jonathan Waxman, and Hans J. Stauss, 2006. Detection of Wilms' Tumor Antigen-Specific CTL in Tumor-Draining Lymph Nodes of patients with early Breast Cancer. *Clin Cancer Research*, 12: 34-42.
66. Rosanne Spolski and Warren J. Leonard. 2008. Interleukin-21: Basic Biology and Implications for Cancer and Autoimmunity\*. *Annu. Rev. Immunol.*; 26: 57-79.
67. Rossane Spolski and Warren J. Leonard. 2008. The Yin and Yang of interleukin-21 in allergy, autoimmunity and cancer. *Curr Opin Immunol* 20: 295-301.

68. S.A. Gatz, H. Pohla and D.J. Schendel, 2000. A PCR-SSP method to specifically select HLA-A\*0201 individuals for Immunotherapeutic Studies. *Tissue Antigens* 55: 532-547.
69. S.A. Rosenberg. 2001. Progress in the development of immunotherapy for the treatment of patients with cancer. *J Intern Med*; 250: 462-475.
70. Schwartz RN, Stover L, Dutcher J. 2002. Managing toxicities of high-dose interleukin-2. *Oncology (Willinston Park)*; 16: 11-20.
71. Sebastian Ochsenreither, Alberto Fusi, Antonia Busse, Sandra Bauer, Carmen Scheibenbogen, David Stather, Eckhard Thiel, Ulrich Keilholz and Anne Letsch, 2011. "Wilms Tumor Protein 1" (WT1) Peptide Vaccination-induced Complete Remission in a Patient With Acute Myeloid Leukemia Is Accompanied by the Emergence of a Predominant T-cell Clone Both in Blood and Bone Marrow. *Journal of immunotherapy* 34: 85-91.
72. Shelley R. Starck and Nilab Shastri, 2011. Non-conventional Sources of peptides presented by MHC class I. *Cellular and Molecular Life Sciences* 68: 1471-1479.
73. Silvija Jarnjak-Jankovic, hege Hammerstad, Stein Saeboe-Larssen, Gunnar Kvalheim and Gustav Gaudernack. 2007. A full scale comparative study of methods for generation of functional dendritic cells for use as cancer vaccines. *BMC Cancer*; 7: 119.
74. Steven A. Rosenberg, James C. Yong, and Nicholas P. Restifo. 2004. Cancer Immunotherapy: moving beyond current vaccines. *Nat Med* 10: 909-915.
75. Steven A. Rosenberg, Nicholas P. Restifo, James C. Yang, Richard A. Morgan and Mark E. Dudley. 2008. Adoptive cell transfer: a clinical path to effective cancer immunotherapy. *Nature Reviews Cancer*; 8.

76. Steven A. Rosenberg. 2005. Cancer immunotherapy comes of age. *Nat Clin Pract Oncol* 2: 115.
77. Steven A. Rosenberg. 2008. Overcoming obstacles to the effective immunotherapy of human cancer. *PNAS* 105: 12643-12644.
78. Sussane Wilde, Daniel Summermeyer, Bernhard Frankenberg, Matthias Schiemann, Slavoljub Milosevic, Stefani Spranger, Heike Pohla, Wolfgang Uckert, Dirk H. Busch and Dolores J. Schendel. 2009. Dendritic cells pulsed with RNA encoding allogeneic MHC and antigen induce T cells with superior antitumor activity and higher TCR functional avidity. *Blood*; 114.
79. Thomas A. Waldmann, Sigrid Dubois, and Yutaka Tagaya. 2001. Contrasting roles of IL-2 and IL-15 in the life and death of lymphocytes: implications for immunotherapy. *Immunity*; 14: 105-110.
80. Toshiaki Shirakata, Yoshihiro Oka, Sumiyuki Nishida, Naoki Hosen, Akihiro Tsuboi, Yosuke Oji, Ayakaro Murao, Hidetaka Tanaka, Shin-Ichi Nakatsuko, Hidenori Inohara and Haruo Sugiyama. 2012. WT1 peptide therapy for patients with chemotherapy-resistant Salivary Gland Cancer. *Anticancer Research*; 32: 1081-1086.
81. Yongqing Li, Marie Bleakley, and Cassian Yee. 2005. IL-21 Influences the Frequency, Phenotype, and Affinity of Antigen-Specific CD8 T Cell Response. *The Journal of Immunology*; 175: 2261-2269.
82. Yoshihiro Oka and Haruo Sugiyama. 2010. WT1 peptide vaccine, one of the most promising cancer vaccines: it's present status and the future prospects. *Immunotherapy*; 2: 591-594.

83. Yoshihiro Oka, Keiko Udaka, Akihiro tsuboi, Olga A. Elisseeva, Hiroyasu Ogawa, Katsuyuki Aozasa, Tadamitsu Kishimoto, and Haruo Sugiyama. 2000. Cancer immunotherapy targeting Wilms' Tumor gene WT1 product. *The Journal of immunology*; 164: 1873-1880.
84. Yrina Rochman, Rossane Spolski and Warren J. Leonard, 2009. New insights into the regulation of T cells by  $\gamma_c$  family cytokines. *Nat Rev Immunol*; 9: 480.
85. Yutaka Tagaya. 2010. Memory CD8 T cells now join "Club 21". *J. Leukoc. Biol.* 87: 13-15.
86. Zapata-Benavides P, Tuna M, Lopez-Berestein G, Tari AM, 2002. Downregulation of Wilms' Tumor 1 protein inhibits breast cancer proliferation. *Biochem Biophys Res Commun* 295: 784-90.

## 11. RESUMEN BIOGRÁFICO

Luis Felipe Olguín Contreras

Candidato para el Grado de

Maestro en Ciencias con especialidad en Inmunobiología

**Tesis:** ACTIVIDAD CITOTÓXICA DE LINFOCITOS T CD8<sup>+</sup> ESTIMULADOS CON INTERLEUCINA 15 y 21 CONTRA LA LINEA TUMORAL DE CÁNCER DE MAMA MCF-7 *IN VITRO*.

**Campo de Estudio:** Ciencias de la Salud/Inmunología/Inmunoterapia del cáncer

**Datos personales:** Nacido en Durango, Durango, México el 7 de Octubre de 1985, hijo de Alma Rosa Contreras Treviño y Francisco Olguín Figueroa.

**Educación:** Egresado de la Universidad Juárez del Estado de Durango, obteniendo el grado de Químico Farmacéutico Biólogo y la medalla al mérito académico “Benito Juárez” en 2007.

**Experiencia Profesional:** Becario de la Academia Mexicana de las Ciencias y el Instituto Científico Pfizer durante el XVII Verano de la Investigación Científica del 25 de Junio de 2007 al 25 de Agosto de 2007 en el laboratorio de biología celular y molecular de la Facultad de Ciencias de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos, bajo la asesoría de la Dra. Angélica Santana en el proyecto “Cultivo y diferenciación de células inmunes de neonato para la evaluación del patrón inmunológico de respuesta al reto con la vacuna de la Tuberculosis BCG”.