

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE MEDICINA



**“EVALUACIÓN DEL EFECTO ANTITUMORAL DE UNA FUSOQUINA
COMPUESTA POR IP10 Y LINFOTACTINA EN UN MODELO MURINO DE
CÁNCER DE CÉRVIX”**

Por:

Biól. Olivia Abigail Robles Rodríguez

**Como requisito parcial para obtener el título de
Maestro en Ciencias con Orientación en Morfología**

Julio del 2015

**“EVALUACIÓN DEL EFECTO ANTITUMORAL DE UNA FUSOQUINA
COMPUESTA POR IP10 Y LINFOTACTINA EN UN MODELO MURINO DE
CÁNCER DE CÉRVIX”**

Aprobación de Tesis:



**Dra. María de Jesús Loera Arias
Director**



**Dr. Roberto Montes de Oca Luna
Co-Director**



**Dra. Odila Saucedo Cárdenas
Comisión de Tesis**



**Dr. med. Gerardo E. Muñoz Maldonado
Subdirección de Estudios de Posgrado**

Monterrey, Nuevo León

Julio 2015

**“EVALUACIÓN DEL EFECTO ANTITUMORAL DE UNA FUSOQUINA
COMPUESTA POR IP10 Y LINFOTACTINA EN UN MODELO MURINO DE
CÁNCER DE CÉRVIX”**

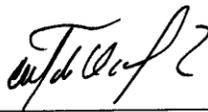
Presentado por

Biól. Olivia Abigail Robles Rodríguez

El presente trabajo fue elaborado en el Laboratorio de Biología Celular y Molecular del Departamento de Histología, Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Nuevo León, bajo la dirección de la Dra. María de Jesús Loera Arias y la codirección del Dr. Roberto Montes de Oca Luna.



Dra. María de Jesús Loera Arias
Director



Dr. Roberto Montes de Oca Luna
Co-Director

Este trabajo fue financiado por el Programa de Apoyo a la Investigación Científica y Tecnológica (PAICYT) de la UANL con el proyecto “Evaluación del efecto antitumoral de la proteína de fusión IP10 y Linfotactina mediante el uso de un vector adenoviral”, con el número de clave: CS959-11. Así mismo quiero agradecer al fondo SEP-CONACYT a través del proyecto No. 158509 titulado “Análisis del efecto antitumoral de un nuevo sistema adyuvante de la respuesta inmune celular”.

RESUMEN

Biól. Olivia Abigail Robles Rodríguez

Fecha de Graduación: Julio 2015

Universidad Autónoma de Nuevo León

Facultad de Medicina

Título del Estudio: “EVALUACIÓN DEL EFECTO ANTITUMORAL DE UNA FUSOQUINA COMPUESTA POR IP10 Y LINFOTACTINA EN UN MODELO MURINO DE CÁNCER DE CÉRVIX”

Número de páginas:

**Candidato para el grado de Maestría en
Ciencias con Orientación en Morfología**

Área de Estudio: Morfología.

Propósito y Método de Estudio:

El término “fusoquina” se utiliza para denominar a las proteínas de fusión compuestas por dos diferentes citocinas. Las citocinas son una familia de proteínas y glicoproteínas solubles que controlan la activación, proliferación e incluso la muerte celular programada de células del sistema inmune. Debido a su participación natural como inmunomoduladores se ha investigado su importancia en la regulación de microambiente tumoral. Dos de las quimiocinas que se han estudiado son IP10 y linfotactina. En nuestro equipo de trabajo se construyó previamente un vector adenoviral que expresa la fusión de estas quimiocinas. Por lo que el propósito de este trabajo fue evaluar el efecto antitumoral y antiangiogénico de este adenovirus. Para esto se produjeron las partículas virales a gran escala, se purificaron y cuantificaron por el método de punto final en placa. El modelo *in vivo* que se utilizó fue la cepa de ratón C57BL/6 y la línea tumoral de pulmón TC-1. Para determinar si el Ad-FIL incrementa el efecto antitumoral de la vacuna de DNA CRT/E7, los ratones fueron sensibilizados con ésta vacuna y posteriormente se les administraron los tratamientos Ad-Vacío, Ad-IP10, Ad-LPTN, Ad-IP10 + Ad-LPTN o Ad-FIL. Para la evaluación del efecto antiangiogénico los ratones fueron sacrificados y se obtuvieron los tumores, estos fueron procesados por la técnica histológica y se llevó a cabo una inmunohistoquímica para el marcador de vasos CD31. Finalmente se realizó un ensayo antitumoral empleando las mismas construcciones en un contexto de vacunas de DNA, para esto se emplearon dos grupos de ratones, uno de los grupos de ratones recibieron ambas vacunas de DNA (CRT/E7 + quimiocinas) mientras que el otro grupo de ratones recibieron solamente las quimiocinas.

Conclusiones y Contribuciones:

La fusoquina FIL compuesta por IP10 y Linfotactina no presentó efecto antitumoral en el modelo estudiado; sin embargo, si presentó un efecto antiangiogénico significativo. Se deberá estudiar esta fusoquina en otros modelos y condiciones para continuar evaluando su efecto biológico, así como su utilidad al administrarla en combinación con otros tratamientos.

Director: Dra. María de Jesús Loera Arias

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer a mi familia por todo el apoyo y cariño que me brindan día a día, por su compañía tanto en los momentos de felicidad como en los más difíciles. A mis padres, a mis hermanos, a mis sobrinos, simplemente gracias por su amor constante.

A la Dra. María de Jesús Loera Arias a la cual estoy muy agradecida por todas las enseñanzas que me ha compartido y toda la paciencia y apoyo que me ha brindado durante mi formación académica.

Al Dr. Roberto Montes de Oca Luna por sus consejos, enseñanzas y apoyo desde que llegue a su laboratorio hasta la realización de esta etapa académica.

A la Dra. Odila Saucedo Cárdenas por ser parte de mi comisión y sus consejos en la realización de esta tesis.

A mis compañeros de laboratorio: Sheila, Marcela, Mayra, Dahana, José Juan, Alberto, Rodolfo, Arnulfo, David, Elvis, Katia, Juan Antonio, Alejandro, Carlos porque de alguna forma han contribuido en esta etapa de mi vida, les agradezco el apoyo y todos los momentos compartidos fuera y dentro del laboratorio.

A mis amigos de muchos años Concepción Jordán, Alejandro González, Raúl González, Salvador Narváez, Paulo Razo, Raúl Rodríguez, Teresa Campos, Anwar Mediana, Patricia Guerrero y Dayra Silva por su amistad, las palabras de ánimo, los momentos de alegría y diversión, por su tiempo y su apoyo gracias.

A gracias CONACYT por el apoyo económico que me brindo, con el número de becario 296354 para la realización de la maestría.

Finalmente gracias a la familia, a los amigos y a los maestros que de alguna forma han contribuido en mi formación académica y en mi crecimiento personal, soy afortunada de habérmelos conocido.

CONTENIDO TEMÁTICO

CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN.....	1
CAPÍTULO 2. ANTECEDENTES.....	3
2.1. QUIMIOCINAS.....	3
2.2. QUIMIOCINAS Y CÁNCER.....	3
2.3. ENFOQUES TERAPÉUTICOS CONTRA EL CÁNCER. . .	4
2.4. FUSOQUINAS.....	6
2.5. IP10.....	7
2.6. RECEPTOR CXCR3.....	7
2.7. LPTN.....	8
2.8. RECEPTOR XCR1.....	9
2.9. VECTORES ADENOVIRALES.....	10
2.10. VACUNAS DE ADN.....	11
2.11. DEFINICIÓN DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACIÓN.....	12
2.12. HIPÓTESIS.....	12
2.13. OBJETIVO GENERAL.....	13
2.14. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	13
CAPÍTULO 3. MATERIAL Y MÉTODOS.....	14
3.1. PLAN DE TRABAJO.....	14
3.2. MATERIAL.....	15
3.2.1. MATERIAL BIOLÓGICO.....	15
3.2.2. REACTIVOS ESPECIALES.....	15
3.2.3. MEDIOS DE CULTIVO.....	16
3.2.4 EQUIPO.....	16
3.3. MÉTODOS.....	18
3.3.1. OBTENCIÓN DE PARTÍCULAS ADENOVIRALES.....	18
3.3.2. PURIFICACIÓN DE PARTÍCULAS ADENOVIRALES.....	18

3.3.3. CUANTIFICACIÓN DE PARTÍCULAS ADENOVIRALES.....	19
3.3.4. PRODUCCIÓN DE LAS VACUNAS DE ADN.....	19
3.3.5. EVALUACIÓN DEL EFECTO ANTITUMORAL DEL AD-FIL.....	19
3.3.6. EVALUACIÓN DEL EFECTO ANTIANGIOGÉNICO DEL AD-FIL.....	21
3.3.7. EVALUACIÓN DEL EFECTO ANTITUMORAL DE LA VACUNA DE ADN FIL.....	22
3.3.8 ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	23
CAPÍTULO 4. RESULTADOS.....	24
4.1. PRODUCCIÓN DE PARTÍCULAS ADENOVIRALES.....	24
4.2. CUANTIFICACIÓN DE LAS PARTÍCULAS VIRALES.....	24
4.3. LA ADMINISTRACIÓN DE AD-FIL NO INCREMENTÓ EL EFECTO DE LA VACUNA DE ADN CRT/E7.....	25
4.4. EL AD-FIL POSEE UN POTENE EFECTO ANTIANGIOGÉNICO.....	26
4.5. LA FUSOQUINA IP-10/LPTN ADMINISTRADA POR MEDIO DE BIOBALÍSTICA NO MOSTRO EFECTO ANTITUMORAL.....	28
CAPÍTULO 5. DISCUSIÓN.....	30
CAPÍTULO 6. CONCLUSIONES.....	35
CAPÍTULO 7. PERSPECTIVAS.....	36
CAPÍTULO 8. LITERATURA CITADA.....	37

ÍNDICE DE FIGURAS, TABLAS Y GRÁFICAS

FIGURAS.

Figura 1. Esquema de inmunización para ensayo con partículas adenovirales.....	20
Figura 2. Esquema de inmunización para ensayo con partículas de ADN.....	20
Figura 3. Efecto citopático inducido por la infección con adenovirus.....	24
Figura 4. Ensayo antitumoral.....	26
Figura 5. Inmunohistoquímica para el marcador de vasos CD31.....	27
Figura 6. Efecto antiangiogénico del AD-FIL.....	27
Figura 8. Ensayo antitumoral con vacunas de ADN.....	29

TABLAS.

Tabla 1. Características generales de las quimiocinas IP10 y LPTN.....	10
Tabla 2. Cuantificación de partículas virales.....	25

LISTA DE ABREVIATURAS

aa	Aminoácidos
Ad	Adenovirus
ADN	Ácido desoxirribonucleico
°C	Centígrados
CO ₂	Dióxido de carbono
CPE	Efecto citopático (cytopathic effect)
DC	Células dendríticas
FIL	Fusoquina IP10/LPTN
g	Gravedades
GM-CSF	Factor granulocitario estimulante de colonias
IFN- γ	Interferón gamma
IL-15	Interleucina 15
IP10	Proteína inducible por interferón 10
Kb	Kilo base
kDa	kilo Dalton
LPTN	Linfotactina
min	Minutos
ml	Mililitros
MOI	Multiplicidad infectiva (multiplicity of infection)
nm	Nanómetros
NK	Células asesinas naturales (<i>Natural Killer</i>)
μ l	Microlitros

µm	Micrómetros
pfu	Unidad formadora de placa (plaque forming units)
PVP	Polivinilpirrolidona

CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN.

Las citocinas son una familia de proteínas y glicoproteínas solubles que controlan desde el mantenimiento de la homeostasis hasta la activación, proliferación e incluso la muerte celular programada de células del sistema inmune. Esto las convierte en un blanco para su manipulación y empleo en el tratamiento clínico contra el cáncer (Ng y Galipeau, 2014). Debido a su participación natural como inmunomoduladores, muchas citocinas han sido identificadas como candidatos para tratamientos terapéuticos contra enfermedades infecciosas, inflamatorias, autoinmunes y malignas (Vazquez-Lombardi *et al.*, 2013).

Las quimiocinas son una subfamilia de citocinas solubles de bajo peso molecular (8-15 kDa) secretadas principalmente por leucocitos, células endoteliales, células epiteliales y fibroblastos. Éstas inducen la quimioatracción y modulación de las propiedades funcionales de diferentes células del sistema inmune durante la inflamación (Vazquez-Lombardi *et al.*, 2013; (Billottet *et al.*, 2013).

La proteína inducible por interferón 10 (IP10) es capaz de atraer células T activadas y células NK (natural killer) que expresan el receptor CXCR3. IP10 puede generar una respuesta antitumoral dependiente de linfocitos T mediante el reclutamiento de células NK, neutrófilos y monocitos en el sitio del tumor (Guo *et al.*, 2004). Así mismo, se ha demostrado que es un potente inhibidor de

la angiogénesis por lo que es un buen candidato para el tratamiento de tumores (Mei *et al.*, 2008).

La linfotactina (LPTN) atrae específicamente a una subpoblación células dendríticas CD8⁺ que expresan el receptor XCR1. Por lo que la LPTN tiene un papel importante en la activación de la respuesta inmune celular a través de la participación de esta población de células dendríticas (DC) en la expansión, supervivencia y diferenciación de los linfocitos T CD8⁺ citotóxicos (KroczeK y Henn, 2012; Dorner *et al.*, 2009)

Las fusoquinas son proteínas quiméricas generadas mediante el acoplamiento físico de dos citocinas en un único polipéptido, resultando en proteínas con actividades pleiotrópicas potenciales para el tratamiento de cáncer y enfermedades autoinmunes (Pennati *et al.*, 2014).

Debido a lo anterior nuestro grupo de trabajo diseñó una fusoquina compuesta por IP10 y LPTN (FIL). La actividad biológica de esta fusoquina se estudió en ensayos *in vitro* e *in vivo* comprobando que posee mejor actividad quimiotáctica que el uso de estas quimiocinas por separado (Sanchez-Lugo *et al.*, 2014).

En este trabajo se analizó el efecto antitumoral de la fusoquina FIL en un modelo murino de cáncer de cérvix.

CAPÍTULO 2. ANTECEDENTES.

2.1. QUIMIOCINAS.

En el sistema inmune las comunicaciones intercelulares son facilitadas por las quimiocinas. Las quimiocinas son una subfamilia de citocinas solubles de bajo peso molecular (8-15 kDa) que se subdividen en los siguientes cuatro grupos de acuerdo a su estructura: CX3C, CXC, CC y C. Algunas citocinas son expresadas constitutivamente y están involucradas principalmente en la organización del tejido linfoide mientras que otras participan en la respuesta inflamatoria. Las quimiocinas inflamatorias son secretadas principalmente por leucocitos, células endoteliales, células epiteliales y fibroblastos. Éstas inducen quimioatracción y modulan las propiedades funcionales de diferentes células del sistema inmune durante la inflamación (Vazquez-Lombardi *et al.*, 2013; Dorner *et al.*, 2009).

2.2. QUIMIOCINAS Y CÁNCER.

La inflamación es un componente clave del microambiente tumoral y se ha propuesto que representa un de las características distintivas del cáncer. Existen dos vías que conectan la inflamación y el cáncer: las condiciones de inflamación crónica selectivas y eventos genéticos que causan transformación neoplásica e inducen la producción de mediadores inflamatorios (Mantovani *et al.*, 2010).

2.3. ENFOQUES TERAPÉUTICOS CONTRA EL CÁNCER.

Debido a la complejidad del proceso de progresión tumoral es necesario un enfoque integral contra el cáncer que tenga como blanco distintos aspectos del microambiente tumoral con el objetivo de generar el mayor beneficio en las terapias (Wang *et al.*, 2010).

La angiogénesis es la formación de nuevos vasos y tiene un papel importante el crecimiento del tumor facilitando el suministro de oxígeno y nutrientes por lo que es considerada otra de las características distintivas del cáncer. Ésta es principalmente causada por cambios en la regulación de la actividad pro-angiogénica en las células. Los tumores pueden dirigir la formación de nuevos vasos mediante la liberación o inducción de factores angiogénicos (Yao *et al.*, 2002).. La terapia antiangiogénica tiene como blanco inhibir la formación de nuevos vasos con el objetivo impedir el crecimiento y metástasis del tumor (Wang *et al.*, 2010; Fagiani *et al.*, 2015) .

Se ha demostrado que IP10 tiene la capacidad de inhibir la movilidad de las células endoteliales y la formación de nuevos vasos e induce la disociación de vasos mediante la unión y activación del receptor CXCR3 (Yates-Binder *et al.*, 2012). Por lo que, la actividad antiangiogénica de IP10 se ha combinado con agentes terapéuticos como la Gemcitabina así como con otros inhibidores de angiogénesis como la vasostatina para potenciar el efecto antitumoral. (Yao *et al.*, 2002; Mei *et al.*, 2008).

Además de la formación de nuevos vasos, otro de los mecanismos para la progresión del tumor es la evasión del sistema inmune. La combinación de la terapia antiangiogénica y la terapia inmune celular podría resultar en un efecto sinérgico (Wang *et al.*, 2010).

La Inmunoterapia con linfocitos T CD8⁺ citotóxicos específicos para antígenos de tumor representa un enfoque prometedor para el tratamiento de enfermedades infecciosas y cáncer (Wang *et al.*, 2014). Entre las quimiocinas que se han investigado en inmunoterapia se encuentra ITAC (CXCL11), esta tiene la capacidad de inhibir el crecimiento tumoral y potenciar la respuesta inmune mediante el reclutamiento de linfocitos T CD8⁺ (Chu *et al.*, 2007). Por lo que Wang y cols., diseñaron una proteína quimérica con los motivos funcionales de IP10 e ITAC (ITIP), al probar la actividad antitumoral de ITIP *in vivo* encontraron que la fusión de estas quimiocinas tiene un efecto antitumoral superior a las quimiocinas administradas de manera individual o combinada (Wang *et al.*, 2010). También se ha fusionado IP10 a antígenos específicos de tumor, un ejemplo es el antígeno de glioma EGFRvIII (IP10-scFv), para activar linfocitos CD8⁺ citotóxicos específicos e inhibir el crecimiento tumoral mediante la actividad citotóxica e infiltración de linfocitos en el tumor (Wang *et al.*, 2013).

La linfotactina se ha empleado para activar y atraer linfocitos T y células NK al sitio del tumor en combinación con IL-10 (Zhang *et al.*, 2011).

Huang y Xiang utilizaron este enfoque terapéutico al combinar dos vectores adenovirales que expresan la proteína inducible por interferón 10 (IP10) y linfotactina (LPTN). Los resultados que obtuvieron fue que a los ratones con

tumores bien establecidos a los que se les administró la combinación de estos adenovirus tuvieron una regresión del 87.5% mientras que los grupos de ratones que recibieron los Ad-IP10 y Ad-LPTN tuvieron un 25% y 37.5% de regresión tumoral, respectivamente (Huang y Xiang, 2004). Por lo anterior, es importante evaluar el efecto de estas citocinas en el contexto de una proteína de fusión.

2.4. FUSOQUINAS.

Las fusoquinas son proteínas de fusión compuestas por dos citocinas con diferente actividad biológica (Williams *et al.*, 2010). Con el objetivo de mejorar sus funciones en la respuesta inmune, Galipeau y cols., han sido pioneros en el desarrollo de fusoquinas. Entre sus trabajos destaca la creación de las moléculas inmunomoduladoras GIFTs (GM-CSF Interleukin Fusion Transgene). Una de las ventajas del uso de las fusoquinas es que pueden administrarse dos ligandos diferentes que impulsan el agrupamiento de dos receptores en un mismo tiempo y espacio. En este sentido, es posible diseñar fusoquinas que tengan como blanco únicamente poblaciones celulares en las que se quiera tener un efecto. Esto se ve reflejado en una transducción única que confiere nuevos efectos biológicos en las poblaciones celulares y un efecto sinérgico que no puede garantizarse con las citocinas combinadas (Ng y Galipeau, 2014).

2.5. IP10.

La proteína inducible por interferón 10 (IP10) denominada en la nomenclatura sistemática como CXCL10, es un polipéptido de 98 aa secretado por leucocitos, neutrófilos activados, eosinófilos, monocitos, células epiteliales, células endoteliales, fibroblastos y queratinocitos en respuesta al interferón gamma (IFN- γ) (Liu *et al.*, 2011). Es miembro de la subfamilia de quimiocinas CXC que no presentan el motivo ERL. Las quimiocinas que no presentan este motivo se caracterizan por atraer células mononucleares. En el caso de IP10 es capaz de atraer células T activadas, monocitos y células NK mediante el receptor CXCR3. Pertl y cols., reportaron que IP10 está directamente involucrada en la generación de una respuesta inmune antitumoral dependiente de linfocitos T CD8 específicos durante la fase temprana de inmunización (Guo *et al.*, 2004; Pertl *et al.*, 2001; Liu *et al.*, 2011).

Así mismo, trabajos recientes han demostrado que las quimiocinas de la familia CXC son potentes agentes angiogénicos y angiostáticos. Dentro de los agentes angiostáticos IP10 está incluida como un potente inhibidor de la angiogénesis (Billottet *et al.*, 2013).

2.6. RECEPTOR CXCR3.

El receptor CXCR3 está conformado por una porción extracelular amino terminal, seis bucles asociados a membrana divididos por siete dominios transmembranales y un segmento carboxilo terminal citoplasmático (Billottet *et*

al., 2013). Es predominantemente expresado en linfocitos T activados (Th1), células NK, células dendríticas, macrófagos y células B (Liu *et al.*, 2011).

Estudios bioquímicos han revelado que existen al menos tres variantes de CXCR3: CXCR3-A, CXCR3-B y CXCR3-alt. La existencia de estas variantes soporta la idea de que los ligandos del receptor CXCR3 tienen diferentes papeles biológicos y explica la diversidad en el comportamiento celular al ser activadas por el receptor CXCR3. Las funciones de las tres variantes de este receptor son las siguientes:

- CXCR3-A: Induce proliferación, quimiotaxis, migración e invasión en varios tipos celulares.
- CXCR3-B: Inhibe la migración y proliferación, tiene efectos angiostáticos y proapoptóticos.
- CXCR3-alt: se desconocen sus funciones específicas (Billottet *et al.*, 2013).

2.7. LPTN.

La linfotactina (LPTN), también denominada sistemáticamente XCL1, es un polipéptido de 93 aa secretado por células T CD8⁺ y CD4 Th1, así como células NK y NKT. Esta citocinas posee dos isoformas, denominadas XCL1 y XCL2, que difieren únicamente en dos aminoácidos (Dorner *et al.*, 2009; Lei y Takahama, 2012). Es miembro de la subfamilia C de quimiocinas, la cual carece del primer y tercer residuos de cisteínas presente en todas las otras subfamilias.

La linfotactina estimula la migración de los linfocitos T, células NK y células dendríticas CD8⁺ (Wang *et al.*, 2002; Dorner *et al.*, 2009; Tuinstra *et al.*, 2007).

2.8. RECEPTOR XCR1.

El receptor XCR1 tiene propiedades únicas, como lo son unirse a los ligandos XCL1 y XCL2, específicos para este receptor. Esta alta especificidad sugiere que la relación XCL1(2)-XCR1 podría ser un buen blanco terapéutico para procesos dependientes de esta vía de señalización (Tuinstra *et al.*, 2007). Diversos estudios han demostrado que este receptor es únicamente expresado en una subpoblación de células dendríticas CD8⁺ y que estas son específicamente quimioatraídas por XCL1 de manera potente. Las células dendríticas CD8⁺ están críticamente involucradas en la presentación cruzada de antígenos a linfocitos T CD8⁺, la cual es muy importante para el reconocimiento de antígenos de tumor y la regulación de la inmunidad citotóxica (Dorner *et al.*, 2009; Kim *et al.*, 2012).

NOMBRE	IP-10 (CXCL10)	LINFOTACTINA (XCL1)
Familia	CXC	C
Peso Molecular	10 kDa	10.2 kDa
Secretada	Leucocitos Neutrófilos activos Eosinófilos Monocitos Células epiteliales Células endoteliales Fibroblastos y queratinocitos en respuesta a IFN- γ .	Células T Células NK Células NKT
Receptor	CXCR3	XCR1
Quimiotaxis	células T activadas, monocitos, mastocitos, células NK y células dendríticas.	células T activadas, células NK y células dendríticas.

Tabla 1. Características generales de las quimiocinas IP10 y LPTN.

2.9. VECTORES ADENOVIRALES.

Los Adenovirus pertenecen a la familia Adenoviridae. Son virus de ADN lineal no envueltos, con un genoma de alrededor de 36 kb y una cápside icosaédrica de 70 nm constituida por 252 subunidades o capsómeros. Son los virus mejor descritos y más utilizados para la transferencia de genes (principalmente los tipos 2 y 5). Es adecuado para utilizarse como vectores de transferencia génica debido a su facilidad para infectar tejidos. Los adenovirus recombinantes son fáciles de manipular y pueden ser obtenidos *in vitro* a concentraciones altas (10^{10} - 10^{11} partículas virales/ml). Además, poseen una capacidad para integrar DNA foráneo mayor a 8.5 kb, lo cual es suficiente para la mayoría de los genes terapéuticos (Gardlík et al., 2005)

2.10. VACUNAS DE ADN.

Las vacunas de ADN han ganado atención como tratamiento potencial en enfermedades infecciosas y adquiridas ya que son seguras, estables, y relativamente fácil y económicas de producir (Bower y Prather, 2012). La vacuna de ADN CRT/E7 ha sido empleada desde hace varios años en diversos estudios para la activación de linfocitos T CD8⁺ específicos para potenciar la respuesta inmune en un modelo murino de cáncer de cérvix (Kim *et al.*, 2004). Como ya se mencionó, IP10 y LPTN son capaces de atraer linfocitos T activados, por lo que en este trabajo se utilizó esta vacuna para activar los linfocitos en un modelo murino de cáncer de cérvix.

2.11. DEFINICIÓN DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACIÓN.

En la actualidad se están investigando terapias basadas en el uso de quimiocinas con actividad antitumoral.

Estudios recientes han demostrado que las quimiocinas IP-10 y Linfotactina presentan un efecto sinérgico antitumoral.

Por tal motivo, es importante evaluar el efecto que podrían tener en el contexto de una fusoquina.

2.12. HIPÓTESIS.

La fusoquina IP-10/LPTN presenta un mejor efecto antitumoral que las quimiocinas administradas de manera individual o combinada en un modelo murino de cáncer de cérvix.

2.13. OBJETIVO GENERAL.

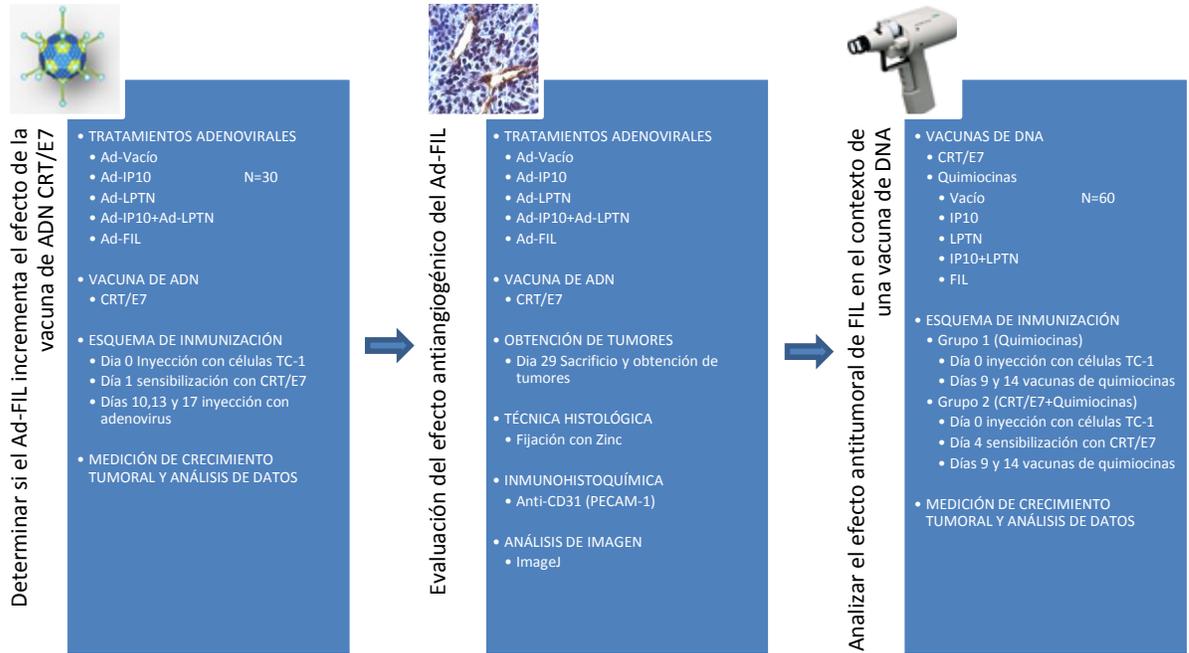
Analizar el efecto antitumoral de la fusosquina IP-10/LPTN en un modelo murino de cáncer de cérvix.

2.14. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.

1. Obtener, purificar y cuantificar los adenovirus Ad-FIL, Ad-IP10, Ad-LPTN y Ad-vacío.
2. Determinar si el Ad-FIL incrementa el efecto de la vacuna de DNA CRT/E7.
3. Evaluar el efecto antiangiogénico del Ad-FIL en un modelo murino de cáncer de cérvix.
4. Analizar el efecto antitumoral de las vacunas de DNA FIL y CRT/E7 en un modelo murino de cáncer de cérvix.

CAPÍTULO 3. MATERIAL Y MÉTODOS.

3.1. PLAN DE TRABAJO.



3.2. MATERIAL.

3.2.1. MATERIAL BIOLÓGICO.

- Líneas celulares
 - HEK293 (QBI-293A, ATCC), Línea de células embrionarias humanas de riñón generadas por la transfección con el Adenovirus 5.
 - TC-1 (CRL-2785, ATCC), Línea de células epiteliales de pulmón de la cepa de ratón C57BL/6 co-transfectadas con los genes E6 y E7 del HPV16 y oncogén c-Ha-Ras.
- Animales de laboratorio
 - Ratones hembra de la cepa C57BL/6 de 6-8 semanas de edad (Adquiridos en la Unidad de Producción y Experimentación de Animales de Laboratorio de la Universidad Autónoma de Metropolitana, DIV.CBS. Xochimilco).
- Anticuerpos
 - Anti-CD31(sc-1508, Santa Cruz, Biotechnology)
 - Anticuerpo secundario anti-goat biotinilado (sc-2774, Santa Cruz, Biotechnology)

3.2.2. REACTIVOS ESPECIALES.

- Kit Plasmid Midi Kit (Qiagen, EUA)
- ViraBind™ Adenovirus Purification Kit (Cell Biolabs Inc., EUA)

- Dako Envision+ System-HRP (Dako, EUA)
- Target Retrieval Solution (Dako, EUA)
- Microcarries de oro 1 μ m (BioRad, EUA)

3.2.3. MEDIOS DE CULTIVO.

- Medio Eagle Modificado de Dubelcco (DMEM) (Gibco, EUA).
- Medio Roswell Park Memorial Institute (RPMI) (Gibco, EUA).

3.2.4 EQUIPO.

- Micropipetas de volúmenes de 0.5 μ l a 10 μ l, 20 μ l a 200 μ l, 200 μ l a 1000 μ l
- Incubadora de CO₂
- Campana de seguridad Nivel II
- Cámara MicroPublisher 5.0 RTV.(QImaging)
- Microscopio invertido
- Microscopio óptico (Leica)
- Microcentrífuga refrigerada
- Refrigerador (4°C)
- Congelador (-20°C)
- Ultra refrigerador (-80°C)
- Tanque de Nitrógeno
- Tanque de Helio

- Tubing Prep Station (BioRad)
- Helios GeneGun (BioRad)
- Micrótomó (Leica)

3.3. MÉTODOS.

3.3.1. OBTENCIÓN DE PARTÍCULAS ADENOVIRALES.

Se sembraron 10 cajas T-75 con 2×10^6 de la línea celular HEK-293, estas cajas se dejaron incubando a 37°C con 5% de CO₂ hasta observar entre un 80-90% de confluencia. Después estas cajas se infectaron con los tratamientos Ad-FIL, Ad-IP10, Ad-LPTN, Ad-Vacío a un MOI 5 (multiplicity of infection) y se dejaron incubando hasta observar un efecto citopático completo (CPE). En ese momento se cosecharon con una espátula estéril y se colocaron en tubos tipo Falcon de 50 ml. Las células se centrifugaron a 600 g por 5 minutos, del sobrenadante se dejaron 2 ml por caja para el extracto crudo.

Las células fueron sometidas a tres ciclos de congelación y descongelación para liberar las partículas virales al sobrenadante. Los extractos crudos se guardaron a -80°C hasta su purificación.

3.3.2. PURIFICACIÓN DE PARTÍCULAS ADENOVIRALES.

Las partículas virales se purificaron mediante el kit ViraBind Adenovirus Purification Kit (Cell Biolabs, San Diego CA, USA) siguiendo el protocolo y recomendaciones del fabricante. Se hicieron 20 alícuotas de 150 µl de cada adenovirus, estas se almacenaron a -80°C hasta su posterior uso.

3.3.3. CUANTIFICACIÓN DE PARTÍCULAS ADENOVIRALES.

Se sembraron 1×10^3 células HEK-293 en 100 μ l de medio DMEM al 2% en cajas de 96 pozos, estas células se dejaron incubando 1 día a 37°C con 5% CO₂. Al día siguiente se hicieron 10 diluciones seriadas de los diferentes adenovirus (10^{-1} - 10^{10}). Después se infectaron 4 columnas por tratamiento siendo un total de 4 repeticiones por dilución. Las células se dejaron incubando 1 semana a 37°C y se registraron los pozos que iban presentando CPE.

Se realizó el cálculo de las unidades formadoras de placa (pfu/ml) de cada adenovirus con la siguiente formula: $T=10^{1+d(S-0.5)}$, donde d= Log 10 de la dilución (siendo 1 para 10 diluciones).

3.3.4. PRODUCCIÓN DE VACUNAS DE ADN.

Para la producción de las vacunas de ADN se siguió el protocolo del sistema Helios Gene Gun System (BioRad). Se emplearon 25 mg de microcarries de oro del tamaño de 1 μ m recubiertos con 50 μ g de los plásmidos pShCRT/E7 (proporcionado por el MC José Juan Pérez Trujillo), pShVacío, pShIP10, pShLPTN, pShIP10 + pShLPTN (25 μ g de cada plásmido) ó pShFIL. El ADN se purificó con el kit Plasmid Midi Kit (Qiagen, EUA).

3.3.5. EVALUACIÓN DEL EFECTO ANTITUMORAL DEL AD-FIL.

El modelo experimental que se utilizó consiste en la cepa de ratón C57BL/6 y la línea celular singénica TC-1 (Lin *et al.*, 1996). Para la realización de este

objetivo se utilizaron 30 ratones hembra de 6-8 semanas, estos se dividieron en 5 grupos de 6 ratones. Los ratones recibieron una inyección subcutánea con 5×10^4 células TC-1 en el costado derecho. Al día siguiente fueron sensibilizados con 1 μg de la vacuna de ADN CRT/E7 administrado mediante biobalística en el abdomen rasurado de los ratones para activar células T CD8⁺ específicas para el antígeno E7 (Kim *et al.*, 2004). Los ratones fueron inyectados con 3 dosis de 1.2×10^8 pfu de los tratamientos Ad-Vacío, Ad-IP10, Ad-LPTN, Ad-IP10+Ad-LPTN y Ad-FIL a los días 10, 13 y 17 (Figura 1). El crecimiento del tumor se midió cada tercer día con un calibre de Vernier y se calculó el volumen tumoral con la formula $V=0.52 \text{ ab}^2$. Los ratones fueron sacrificados al día 29 para obtener los tumores y procesarlos por la técnica histológica.

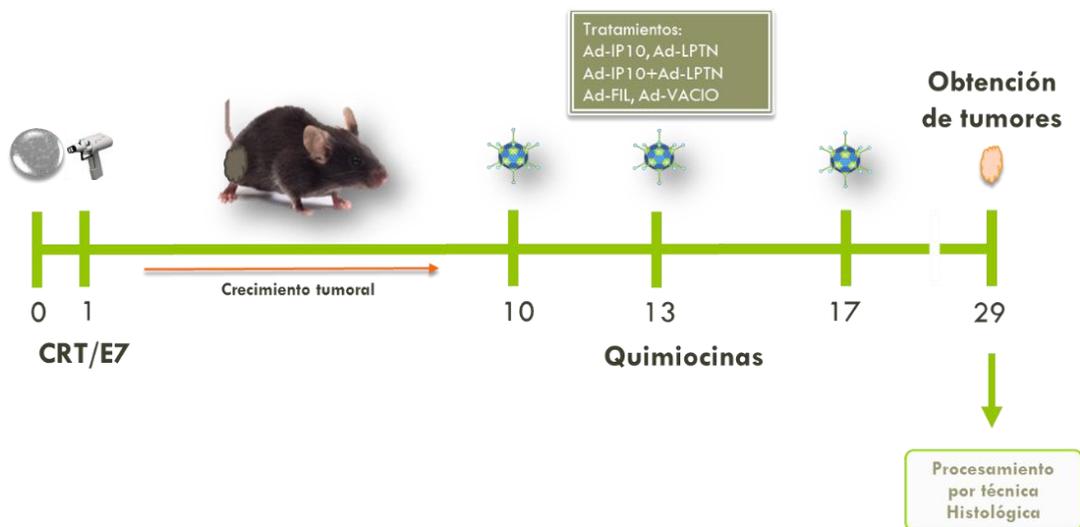


Figura 1. Esquema de inmunización para el ensayo con partículas adenovirales. Ratones de la cepa C57BL/6 fueron inyectados con 4×10^5 células de la línea tumoral TC-1 y sensibilizados con 1 μg de la vacuna de ADN CRT/E7. Los tratamientos adenovirales se administraron peritumoralmente a los días 10, 13 y 17 (1.2×10^8 pfu) después de la inducción del tumor. Los ratones se sacrificaron el día 29 y se obtuvieron los tumores para evaluar el efecto antiangiogénico.

3.3.6. EVALUACIÓN DEL EFECTO ANTIANGIOGÉNICO DEL AD-FIL.

Para este ensayo se utilizaron los tumores obtenidos en el objetivo anterior. Los tumores se fijaron con Zinc (Tris 0.1 M pH 7,4; Acetato de calcio 3 mM; acetato de zinc 0.25 M; cloruro de zinc 0.4 M) (Patricia García *et al.*, 2006) y se procesaron por la técnica histológica de rutina. Después se obtuvieron cortes de 5 µm con el micrótopo y se rehidrataron con series de etanol y agua para realizar la inmunohistoquímica contra el marcador de vasos CD31. Los cortes se incubaron por 20 minutos en la solución precalentada Target Retrieval Solution pH 9 (Dako), y otros 20 min a temperatura ambiente. Después los tejidos se dejaron incubando con suero de caballo al 3% durante 1 hr a 4°C. Cuando finalizó el bloqueó de proteínas los tejidos se incubaron con una solución de peróxido de hidrógeno al 3% durante 15 minutos a 37°C para eliminar la peroxidasa endógena.

Los tejidos se incubaron con el anticuerpo primario anti-CD31 (Dilución 1:100 en TBST 1X; PECAM-1, goat polyclonal IgG, Santa Cruz, Biotechnology) toda la noche a 4°C. Lo siguiente fue incubar los cortes con el anticuerpo secundario biotinilado (Dilución 1:100 en TBST 1X; rabbit anti-goat IgG, Santa Cruz, Biotechnology) durante 1 hr a 37°C. Para amplificar la señal los cortes se incubaron con el sistema Envision + (Dako) por 1 hr a 4°C. Finalmente la señal se reveló con Diaminobencidina (DAB plus chromogen solution, Dako) por 10 minutos y los núcleos se contrastaron con hematoxilina. Para cuantificar la señal de los vasos se capturaron 8 campos por corte con la cámara MicroPublisher 5.0 RTV (QImaging, USA).

El análisis de imagen se realizó con el programa de procesamiento de imagen digital ImageJ de dominio público desarrollado por NIH (National Institute Health). Las variables que se analizaron fueron número de vasos, área total de los vasos y área de los vasos relativa (Weidner et al., 1991; Mylona *et al.*, 2007).

3.3.7. EVALUACIÓN DEL EFECTO ANTITUMORAL DE LA VACUNA DE ADN FIL.

Para este ensayo se emplearon dos grupos de 30 ratones. Uno de los grupos de ratones recibieron ambas vacunas de DNA (CRT/E7 + quimiocinas) mientras que el otro grupo de ratones recibió solamente las quimiocinas. Los ratones recibieron una inyección subcutánea con 4×10^4 células TC-1 en el costado derecho al día cero. Al día siguiente uno de los grupos fue sensibilizado con 1 μg la vacuna de ADN CRT/E7 mediante biobalística para activar células T CD8⁺ específicas para el antígeno E7 (Kim *et al.*, 2004). Ambos grupos fueron inyectados con 2 dosis de 1.2×10^8 pfu de los tratamientos Ad-Vacío, Ad-IP10, Ad-LPTN, Ad-IP10+Ad-LPTN y Ad-FIL al día 9 y 14 (Figura 2). El crecimiento del tumor se midió cada tercer día con un calibre de Vernier y se calculó el volumen tumoral con la fórmula $V=0.52 ab^2$.

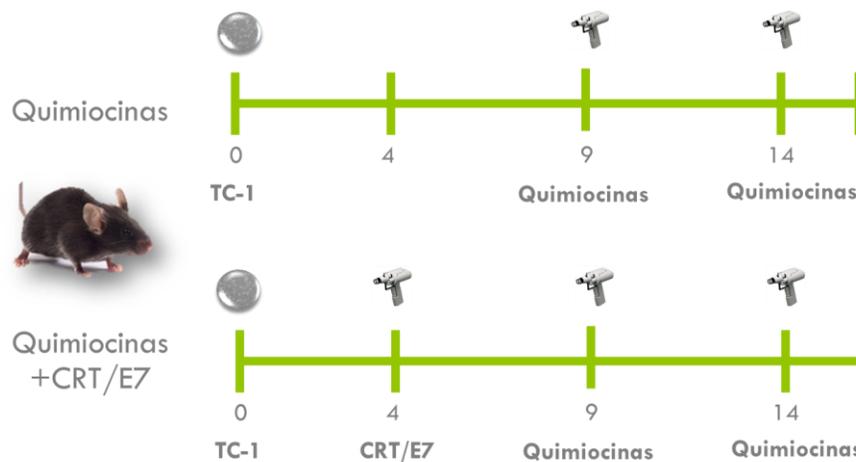


Figura 2. Esquema de inmunización para ensayo con partículas de ADN. Se emplearon dos grupos de ratones de la cepa C57BL/6 a los cuales se les inyectó 4×10^5 células de la línea tumoral TC-1. Un grupo de ratones recibieron solamente las quimiocinas mientras que el otro grupo de ratones recibieron ambas vacunas de ADN (CRT/E7 + quimiocinas).

3.3.8. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.

El análisis estadístico de los resultados se realizó con el programa GraphPad6, utilizando la prueba *t*-student. Los valores de los grupos Ad-IP10, Ad-LPTN, Ad-FIL y Ad-IP10 + Ad-LPTN fueron comparados con los valores del grupo negativo Ad-Vacío. Los valores de $p < 0.05$ fueron considerados como significativos. Se graficó el promedio del crecimiento tumoral de cada grupo \pm la desviación estándar.

CAPÍTULO 4. RESULTADOS.

4.1. PRODUCCIÓN DE PARTÍCULAS ADENOVIRALES.

Para la obtención de los adenovirus Ad-Vacío, Ad-IP10, Ad-LPTN y Ad-FIL se infectó la línea celular HEK-293 con los diferentes adenovirus. El efecto citopático se observó entre las 24 y 48 horas en todos los adenovirus (Figura 3). Las células de cada adenovirus se cosecharon cuando la mayoría presentaba CPE y menos del 50% de las células estuvieran desprendidas. A las células fueron sometidas a ciclos de congelación y descongelación para liberar las partículas virales al medio, estos sobrenadantes fueron los que se procedieron a purificar.

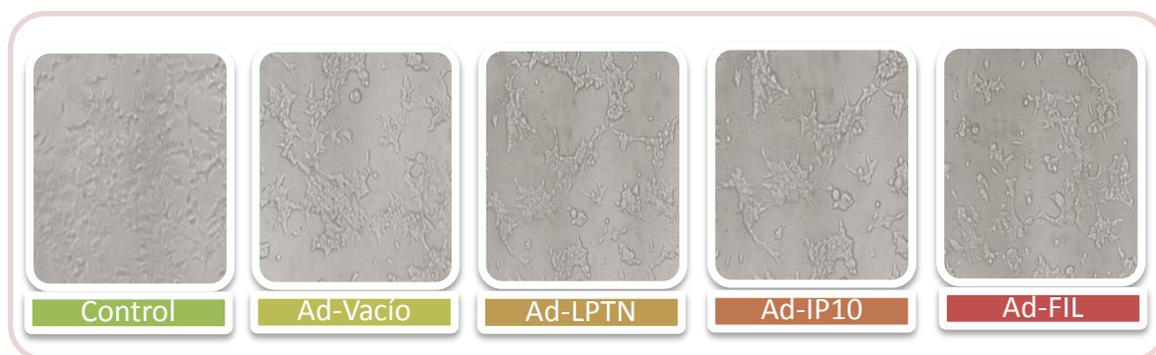


Figura 3. Efecto citopático inducido por la infección con los adenovirus. Imágenes representativas del efecto citopático en las células infectadas con los diferentes tratamientos a las 48 horas post-infección.

4.2. CUANTIFICACIÓN DE LAS PARTÍCULAS VIRALES.

Los sobrenadantes infectivos de los adenovirus Ad-Vacío, Ad-IP10, Ad-LPTN, Ad-FIL obtenidos de la producción a gran escala fueron purificados y cuantificados por el método biológico de punto final en placa para determinar

las unidades formadoras de placa (pfu/ml) (Tabla 2). En base a los títulos virales obtenidos se decidió utilizar una concentración de 1.2×10^8 pfu/ml de cada adenovirus para el ensayo de evaluación del efecto antitumoral *in vivo*, debido a la baja concentración de los tratamientos.

Adenovirus	pfu/ml
Ad-FIL	6.3×10^{10}
Ad-IP10	2×10^9
Ad-LPTN	2×10^9
Ad-vacío	6.3×10^9

Tabla 2. Cuantificación de partículas virales. La cuantificación de los diferentes tratamientos se realizó con el ensayo de punto final en placa. Se infectaron cajas de 96 pozos con diluciones seriadas de los adenovirus y la concentración de partículas virales se calculó con la fórmula $T=10^{1+d}(S-0.5)$.

4.3. LA ADMINISTRACIÓN DE AD-FIL NO INCREMENTÓ EL EFECTO DE LA VACUNA DE ADN CRT/E7.

Para determinar si el Ad-FIL incrementa el efecto de la vacuna de ADN CRT/E7 se realizó un ensayo *in vivo* utilizando la cepa de ratón C57BL/6 y la línea tumoral de pulmón TC-1. Los ratones fueron inyectados con la línea tumoral en el costado derecho y al día siguiente recibieron una sensibilización en el abdomen con la vacuna de DNA CRT/E7 mediante biobalística. Los ratones recibieron tres dosis (1.2×10^8) peritumorales de los adenovirus Ad-Vacío, Ad-IP10, Ad-LPTN, Ad-FIL. Como se puede observar en la Figura 4, los ratones a los cuales se les administró el Ad-FIL presentaron un volumen tumoral menor al de los ratones que se les administró el Ad-Vacío. En cambio, al comparar los tratamientos Ad-FIL y la combinación de los Ad-IP10+Ad-LPTN, los ratones con el Ad-FIL presentaron un mayor volumen tumoral. Por otro lado, los ratones que

recibieron los Ad-IP10 y Ad-LPTN mostraron el mayor crecimiento tumoral. Los resultados en ninguno de las comparaciones mostraron diferencia significativa ($p < 0.05$).

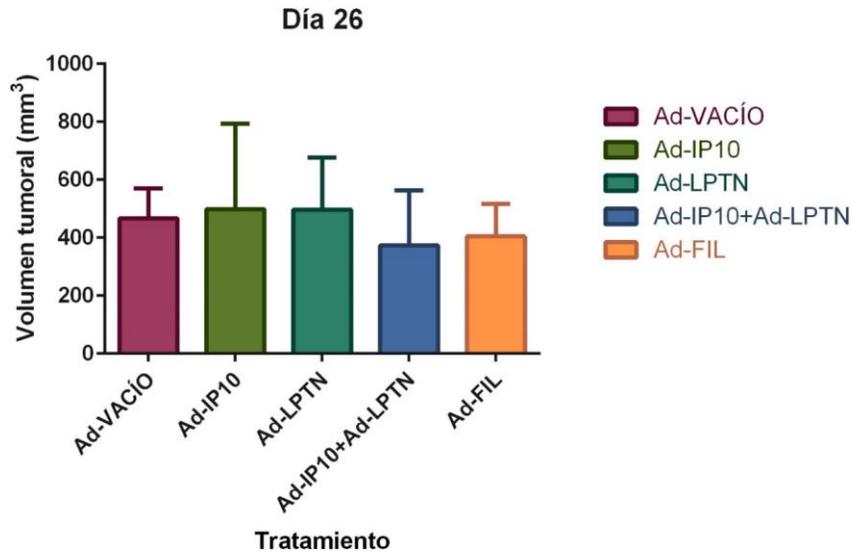
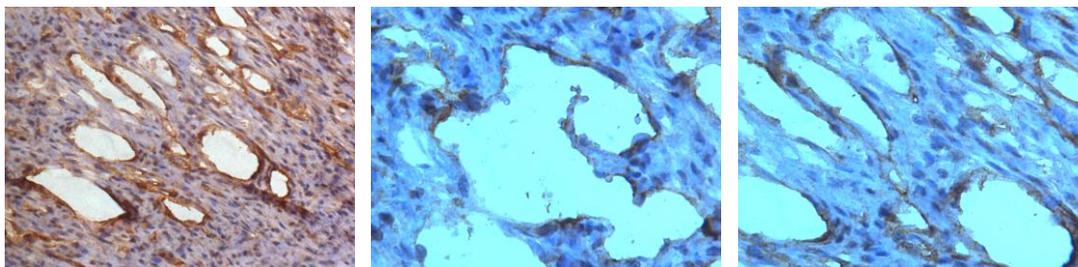


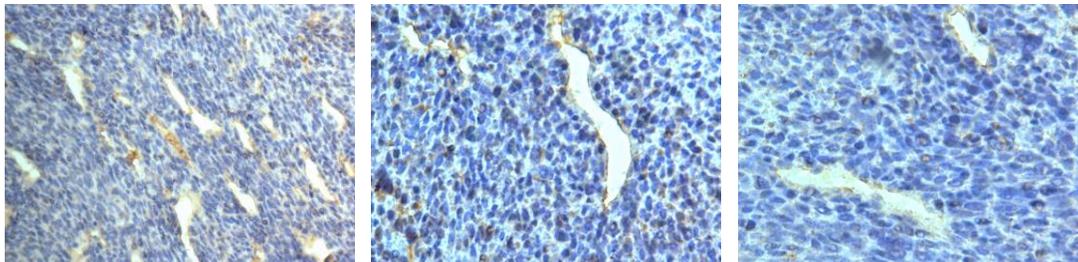
Figura 4. Ensayo antitumoral. Ratones de la cepa C57BL/6 fueron inyectados con 4×10^5 células de la línea tumoral TC-1. Los ratones fueron sensibilizados con $1 \mu\text{g}$ de la vacuna de ADN CRT/E7 y recibieron 3 dosis con 1.2×10^8 pfu de los diferentes tratamientos a los días 10, 13 y 17. La gráfica muestra el crecimiento tumoral al día 26.

4.4. EL Ad-FIL POSEE UN POTENTE EFECTO ANTIANGIOGÉNICO.

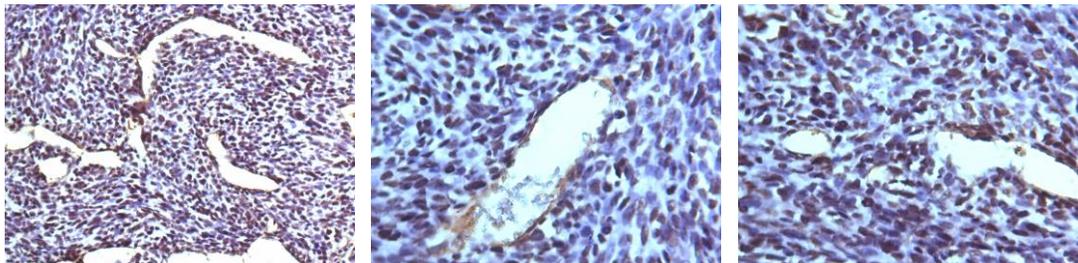
Después de procesar los tumores por la técnica histológica y realizar los cortes se hizo una inmunohistoquímica contra CD31 para observar la cantidad de vasos en los tumores de cada tratamiento (Figura 5). En los cortes de los ratones a los que se les administro el Ad-FIL se observó una menor cantidad de vasos y estos presentaban una luz de menor tamaño al ser comparados contra los demás tratamientos. Los asteriscos representan el grado de significancia, siendo el Ad-FIL el que obtuvo la mayor diferencia significativa al ser comparado con el Ad-Vacío (Figura 6).



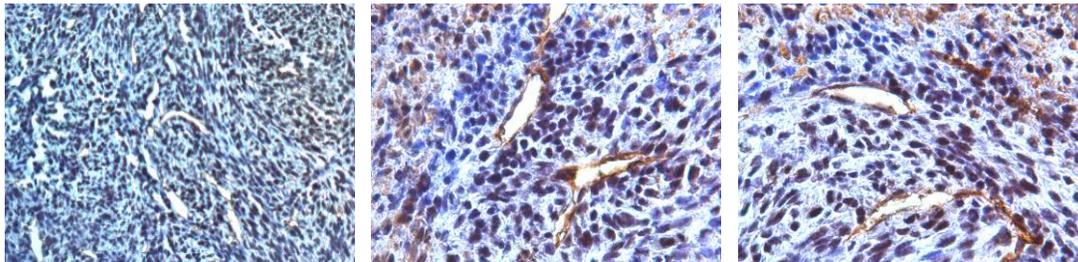
AD-VACÍO



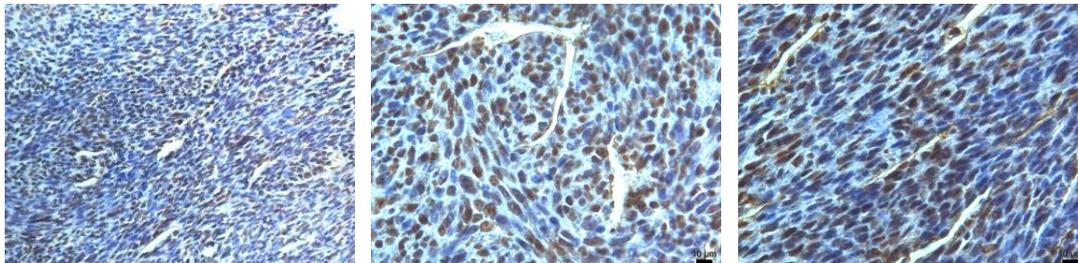
AD-IP10



AD-LPTN



AD-IP10 + Ad-LPTN



AD-FIL

Figura 5. Inmunohistoquímica para el marcador de vasos CD31. Imágenes representativas de la inmunohistoquímica con CD31 (presente en vasos, linfocitos CD8, células NK, macrófagos, plaquetas). Los ratones se sacrificaron y se obtuvieron los tumores para procesarlos por la técnica histológica e inmunohistoquímica.

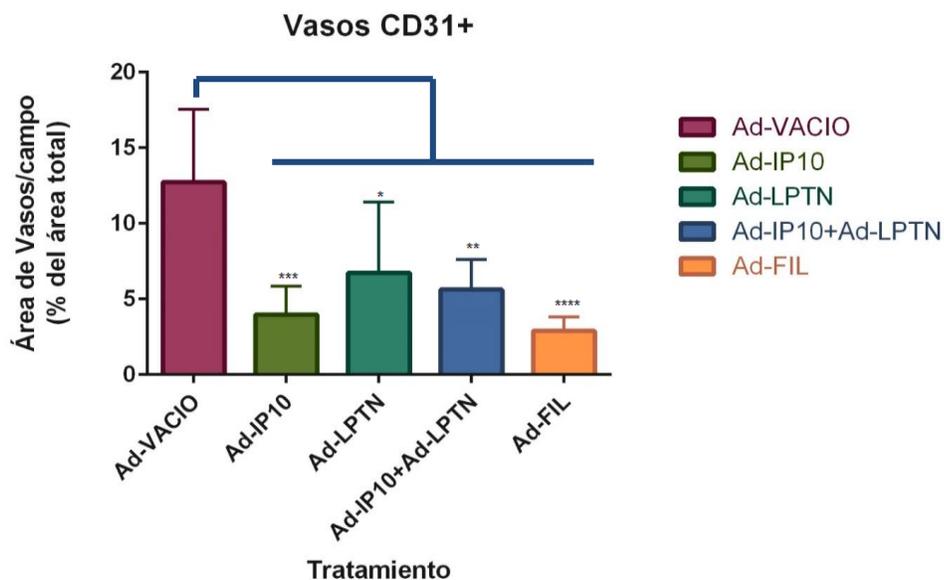


Figura 6. Efecto antiangiogénico del Ad-FIL. Ratones de la cepa C57BL/6 fueron inyectados con 4×10^5 células de la línea tumoral TC-1. Los ratones fueron sensibilizados con $1 \mu\text{g}$ de la vacuna de ADN CRT/E7 y recibieron 3 dosis con 1.2×10^8 pfu de los diferentes tratamientos a los días 10, 13 y 17. La gráfica muestra el área de vasos relativa al día 29.

4.5. LA FUSOQUINA IP-10/LPTN ADMINISTRADA POR MEDIO DE BIOBALÍSTICA NO MOSTRÓ EFECTO ANTITUMORAL.

Para analizar el efecto antitumoral de las vacunas de ADN FIL y CRT/E7 en un modelo murino de cáncer de cérvix se emplearon dos grupos de ratones de la cepa C57BL/6. A ambos grupos se les administró la línea tumoral TC-1 en el costado derecho. A uno de los grupos se les sensibilizó con la vacuna de DNA CRT/E7 en el abdomen. Después a los días 9 y 14, de la inyección con las TC-1, los dos grupos de ratones recibieron las vacunas de ADN en el abdomen de los tratamientos Vacío, IP10, LPTN, LPTN+IP10 y FIL.

En los ratones que solo recibieron las vacunas de DNA de las quimiocinas y la fusoquina se observó el doble de crecimiento tumoral en todos los tratamientos al compararlos con el grupo de ratones que recibió la sensibilización con la vacuna de DNA CRT/E7. No hubo diferencia significativa entre los distintos tratamientos (Figura 7).

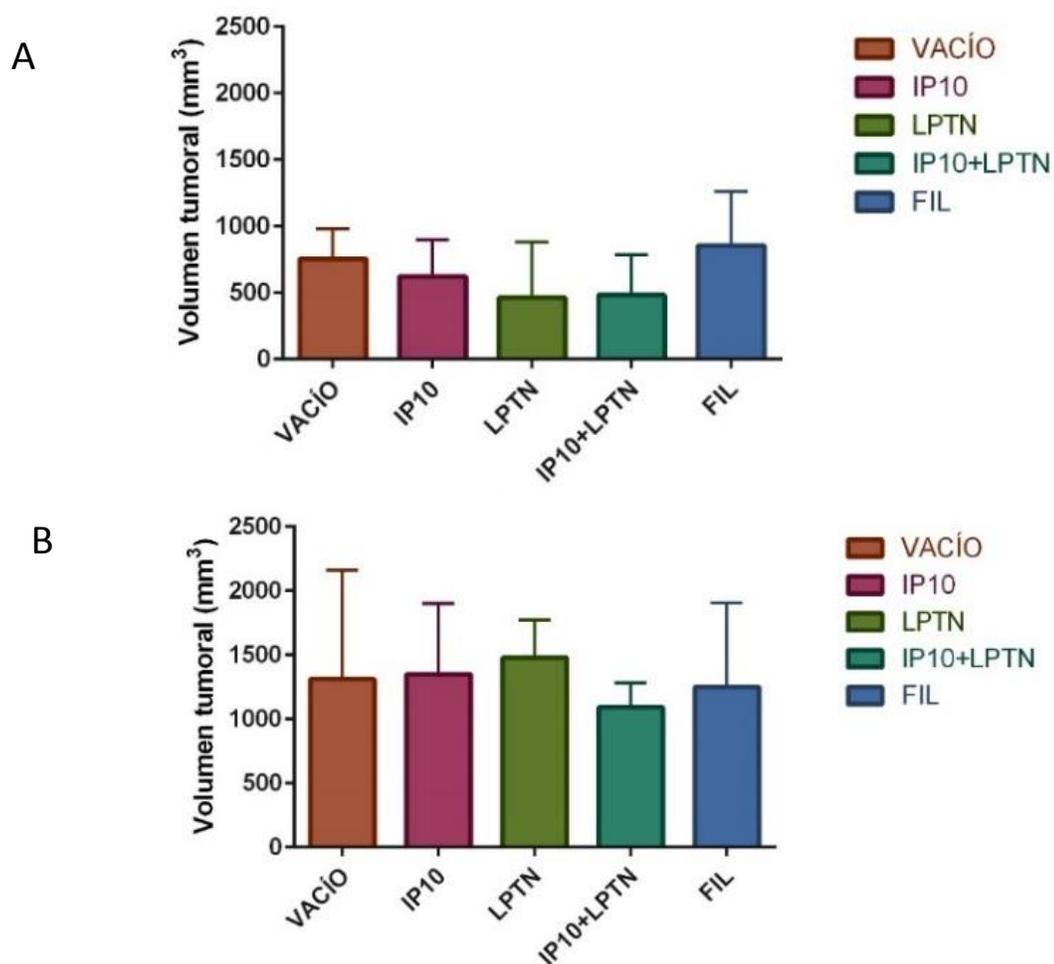


Figura 7. Ensayo antitumoral con vacunas de ADN. Ratones de la cepa C57BL/6 fueron inyectados con 4×10^5 de la línea tumoral TC-1, un grupo de ratones recibieron solamente las quimiocinas mientras que el otro grupo de ratones recibieron ambas vacunas de ADN (CRT/E7 + quimiocinas). Las gráficas muestran los resultados del crecimiento tumoral al día 31.

CAPÍTULO 5. DISCUSIÓN.

La fusión de citocinas es una estrategia que ha sido muy estudiada como tratamiento potencial en terapias contra el cáncer en los últimos años. En los trabajos con fusocinas destaca que, normalmente, cada citocina conserva su actividad biológica y presentan un efecto sinérgico al compararlas con la administración de las citocinas de manera individual o combinada (Ng y Galipeau, 2014). Entre las quimiocinas que se han estudiado por el papel que juegan en la regulación del microambiente tumoral, se encuentran IP10 y linfotactina (Zhang *et al.*, 2011; Wang *et al.*, 2014).

Huang y Xiang emplearon tanto terapia antiangiogénica como terapia inmune celular al combinar los vectores adenovirales que expresan IP10 y LPTN. Las conclusiones que obtuvieron fue que la expresión de las quimiocinas IP10 y LPTN estimulan la proliferación de las células T *in vitro*, la combinación de ambas puede quimioatraer más eficientemente células T CD8⁺ que éstas por separado al sitio del tumor. y que los adenovirus Ad-IP10 y Ad-LPTN presentan un efecto antitumoral sinérgico en un modelo de transferencia de linfocitos (Huang *et al.*, 2002). Por lo anterior la combinación de IP10 y LPTN representa una buena estrategia como terapia contra el cáncer.

Nuestro grupo de trabajo cuenta con vector adenoviral que expresa la fusión de IP10 y linfotactina. El Ad-FIL fue diseñado, construido y caracterizado por nuestro equipo de trabajo y se demostró que tiene capacidad quimioatrayente *in*

vitro e *in vivo* en un modelo murino de cáncer de cérvix (Sanchez-Lugo *et al.*, 2014).

En el presente trabajo se evaluó el efecto antitumoral y antiangiogénico del Ad-FIL en el mismo modelo animal. En cuanto al efecto antitumoral no se obtuvieron resultados positivos. Sin embargo, los resultados que obtuvimos con respecto al efecto antiangiogénico fue una disminución en la cantidad y tamaño de los vasos en los tumores de ratones que recibieron el Ad-FIL a comparación de los tratamientos administrados de manera individual o combinada, este resultado fue el más significativo al compararlo con el Ad-Vacío.

Uno de los factores que pudieron haber influenciado estos resultados es la dosis adenoviral que se administró (1.2×10^8 pfu) debido a la baja concentración de partículas virales que se obtuvieron en la purificación. En el ensayo de actividad antitumoral Huang y Xiang demostraron que la combinación de Ad-IP10 y Ad-LPTN tienen un mayor efecto antitumoral al administrar una dosis de 2×10^9 pfu en ratones con tumores inducidos con la línea celular EG7 (Huang y Xiang, 2004). En otro trabajo llevado a cabo por Zhang y cols., demostraron que al administrar el Ad-LPTN a una concentración 2×10^9 pfu en combinación con IL-10 a ratones con tumores de la línea celular EG7 presentaron una inhibición del crecimiento tumoral significativa (Zhang *et al.*, 2011). Así mismo, el efecto antitumoral del Ad-LPTN se comprobó al administrarlo de manera intratumoral en combinación con terapia de transferencia de linfocitos empleando la misma dosis (Huang *et al.*, 2005).

En los trabajos que reportan el efecto antitumoral de las quimiocinas IP10 y LPTN se utilizan líneas tumorales de células de melanoma, linfoma, cáncer de mama, glioma, entre otras (Yang *et al.*, 2006; Wang *et al.*, 2010; Wang *et al.*, 2014). Este es el primer trabajo donde se evalúa efecto antitumoral de las quimiocinas IP10 y LPTN tanto de manera individual y combinada así como de la fusoquina IP10/LPTN en la línea celular TC-1 mediante el uso de vectores adenovirales.

Dentro de las estrategias que se utilizan para generar una respuesta antitumoral específica para antígenos de tumor esta la transferencia de linfocitos, la cual consiste en activar *in vitro* los linfocitos provenientes de un ratón donador contra el antígeno de interés y transferirlos en los ratones que han desarrollado el tumor (Huang *et al.*, 2002). En este trabajo, para simplificar el sistema de activación de linfocitos, se utilizó la vacuna de ADN CRT/E7 con la finalidad de generar linfocitos T CD8⁺ específicos para el antígeno de tumor E7 (Kim *et al.*, 2004). Debido a que IP10 y LPTN son capaces de atraer linfocitos T CD8⁺ activados al sitio del tumor, esta estrategia podría potenciar la respuesta antitumoral de la vacuna CRT/E7.

Otro de los factores que podrían mejorarse para la obtención de un buen efecto antitumoral es el esquema de inmunización, por lo que será importante evaluar el efecto de estas citocinas reduciendo el intervalo de tiempo entre la administración de las dosis.

Por último, cabe destacar la posibilidad de que esta fusoquina pierda el efecto antitumoral que presentan las citocinas por separado debido a una baja estimulación de los receptores.

Rafei y cols., diseñaron una fusoquina (GIFT15) compuesta por el factor estimulante de colonias de granulocitos (GM-CSF) y la interleucina 15 (IL-15) debido a que GM-CSF tiene un acción directa en la respuesta inmune a través del potenciamiento de la presentación de antígenos, mientras que e IL-15 posee actividades como la activación de linfocitos T y estimulación de células NK. También se ha reportado que el tratamiento de células dendríticas precursoras con estas citocinas por separado genera una potente respuesta inmune Th1 *in vitro* e *in vivo* (Pulendran *et al.*, 2004; Rafei *et al.*, 2007). Por lo que GM-CSF e IL-15 representaban compañeros atractivos como parte de una fusoquina inmunoterapéutica. Sin embargo, GIFT15 se comportó de una manera contraria a la esperada debido a una señalización vía JAK/STAT asimétrica, estimulando la conversión de células CD19⁺ B a células reguladoras supresoras resultando en una fusoquina con propiedades inmunosupresoras y proangiogénicas (Rafei *et al.*, 2009).

Por lo anterior sería importante determinar la interacción biológica de la fusoquina IP10/LPTN en la señalización celular y su efecto en las distintas poblaciones celulares del sistema inmune. También sería interesante investigar la funcionalidad de los vasos y otros mecanismos de infiltración celular en el microambiente tumoral en los diferentes tratamientos debido a la reducción del

número y área de vasos en el ensayo antiangiogenico con el Ad-FIL el cual no fue reflejado en una reducción del tamaño tumoral.

Además, será importante estudiar esta fusoquina en otros modelos y condiciones para continuar evaluando su efecto biológico, así como su utilidad al administrarla en combinación con otros tratamientos.

CAPÍTULO 6. CONCLUSIONES.

1. La administración de Ad-FIL no incrementó el efecto de la vacuna de DNA CRT/E7 en las condiciones analizadas.
2. La administración del Ad-FIL posee un mejor efecto antiangiogénico con respecto a la administración de las citocinas de manera individual o combinada.
3. No se obtuvo un efecto antitumoral al administrar la fusoquina IP10/LPTN por medio de biobalística en las condiciones analizadas.

CAPÍTULO 7. PERSPECTIVAS.

- Probar dosis más altas de adenovirus.
- Analizar otros esquemas de inmunización con un menor intervalo de tiempo entre las dosis.
- Probar el efecto antitumoral en otros modelos tumorales.
- Analizar *in vitro* el efecto de la citocina sobre la activación y proliferación de linfocitos.
- Evaluar si esta fusosquina pudiera inducir un efecto inmunosupresor.

CAPÍTULO 8. LITERATURA CITADA.

- Billottet, C., Quemener, C., Bikfalvi, A., 2013. CXCR3, a double-edged sword in tumor progression and angiogenesis. *Biochim. Biophys. Acta* 1836, 287–295. doi:10.1016/j.bbcan.2013.08.002
- Bower, D.M., Prather, K.L., 2012. Development of new plasmid DNA vaccine vectors with R1-based replicons. *Microb. Cell Factories* 11, 107. doi:10.1186/1475-2859-11-107
- Chu, Y., Yang, X., Xu, W., Wang, Y., Guo, Q., Xiong, S., 2007. In situ expression of IFN-gamma-inducible T cell alpha chemoattractant in breast cancer mounts an enhanced specific anti-tumor immunity which leads to tumor regression. *Cancer Immunol. Immunother.* CII 56, 1539–1549. doi:10.1007/s00262-007-0296-1
- Dorner, B.G., Dorner, M.B., Zhou, X., Opitz, C., Mora, A., Güttler, S., Hutloff, A., Mages, H.W., Ranke, K., Schaefer, M., Jack, R.S., Henn, V., Kroczeck, R.A., 2009. Selective Expression of the Chemokine Receptor XCR1 on Cross-presenting Dendritic Cells Determines Cooperation with CD8+ T Cells. *Immunity* 31, 823–833. doi:10.1016/j.immuni.2009.08.027
- Fagiani, E., Bill, R., Pisarsky, L., Ivanek, R., Rüegg, C., Christofori, G., 2015. An immature B cell population from peripheral blood serves as surrogate marker for monitoring tumor angiogenesis and anti-angiogenic therapy in mouse models. *Angiogenesis*. doi:10.1007/s10456-015-9470-9

- Gardlík, R., Pálffy, R., Hodosy, J., Lukács, J., Turna, J., Celec, P., 2005. Vectors and delivery systems in gene therapy. *Med. Sci. Monit. Int. Med. J. Exp. Clin. Res.* 11, RA110–121.
- Guo, J.-Q., Chen, L., Ai, H.-W., Jing, J.-N., Zhou, J.-Y., Zhang, C.-Y., You, S.-Y., 2004. A novel fusion protein of IP10-scFv retains antibody specificity and chemokine function. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 320, 506–513. doi:10.1016/j.bbrc.2004.05.193
- Huang, H., Bi, X.G., Yuan, J.Y., Xu, S.L., Guo, X.L., Xiang, J., 2005. Combined CD4+ Th1 effect and lymphotactin transgene expression enhance CD8+ Tc1 tumor localization and therapy. *Gene Ther.* 12, 999–1010. doi:10.1038/sj.gt.3302486
- Huang, H., Li, F., Gordon, J.R., Xiang, J., 2002. Synergistic enhancement of antitumor immunity with adoptively transferred tumor-specific CD4+ and CD8+ T cells and intratumoral lymphotactin transgene expression. *Cancer Res.* 62, 2043–2051.
- Huang, H., Xiang, J., 2004. Synergistic effect of lymphotactin and interferon gamma-inducible protein-10 transgene expression in T-cell localization and adoptive T-cell therapy of tumors. *Int. J. Cancer J. Int. Cancer* 109, 817–825. doi:10.1002/ijc.20043
- Kim, J.W., Hung, C.-F., Juang, J., He, L., Kim, T.W., Armstrong, D.K., Pai, S.I., Chen, P.-J., Lin, C.-T., Boyd, D.A., Wu, T.-C., 2004. Comparison of HPV DNA vaccines employing intracellular targeting strategies. *Gene Ther.* 11, 1011–1018. doi:10.1038/sj.gt.3302252

- Kim, M., Rooper, L., Xie, J., Rayahin, J., Burdette, J.E., Kajdacsy-Balla, A.A., Barbolina, M.V., 2012. The lymphotactin receptor is expressed in epithelial ovarian carcinoma and contributes to cell migration and proliferation. *Mol. Cancer Res. MCR* 10, 1419–1429. doi:10.1158/1541-7786.MCR-12-0361
- Kroczek, R.A., Henn, V., 2012. The Role of XCR1 and its Ligand XCL1 in Antigen Cross-Presentation by Murine and Human Dendritic Cells. *Front. Immunol.* 3, 14. doi:10.3389/fimmu.2012.00014
- Lei, Y., Takahama, Y., 2012. XCL1 and XCR1 in the immune system. *Microbes Infect. Inst. Pasteur* 14, 262–267. doi:10.1016/j.micinf.2011.10.003
- Lin, K.Y., Guarnieri, F.G., Staveley-O’Carroll, K.F., Levitsky, H.I., August, J.T., Pardoll, D.M., Wu, T.C., 1996. Treatment of established tumors with a novel vaccine that enhances major histocompatibility class II presentation of tumor antigen. *Cancer Res.* 56, 21–26.
- Liu, M., Guo, S., Stiles, J.K., 2011. The emerging role of CXCL10 in cancer (Review). *Oncol. Lett.* 2, 583–589. doi:10.3892/ol.2011.300
- Mantovani, A., Savino, B., Locati, M., Zammataro, L., Allavena, P., Bonecchi, R., 2010. The chemokine system in cancer biology and therapy. *Cytokine Growth Factor Rev.* 21, 27–39. doi:10.1016/j.cytogfr.2009.11.007
- Mei, K., Wang, L., Tian, L., Yu, J., Zhang, Z., Wei, Y., 2008. Antitumor efficacy of combination of interferon-gamma-inducible protein 10 gene with gemcitabine, a study in murine model. *J. Exp. Clin. Cancer Res. CR* 27, 63. doi:10.1186/1756-9966-27-63

- Mylona, E., Nomikos, A., Alexandrou, P., Giannopoulou, I., Keramopoulos, A., Nakopoulou, L., 2007. Lymphatic and blood vessel morphometry in invasive breast carcinomas: relation with proliferation and VEGF-C and -D proteins expression. *Histol. Histopathol.* 22, 825–835.
- Ng, S., Galipeau, J., 2014. Concise Review: Engineering the Fusion of Cytokines for the Modulation of Immune Cellular Responses in Cancer and Autoimmune Disorders. *Stem Cells Transl. Med.* sctm.2014–0145. doi:10.5966/sctm.2014-0145
- Patricia García, M., Felipe Benavente, M., Angélica Melo, A., Iván Roa, E., Juan Carlos Roa, S., 2006. Efecto de la fijación en la calidad del ADN: estudio controlado con cinco fijadores. *Rev. Esp. Patol.* 39, 175–179. doi:10.1016/S1699-8855(06)70034-4
- Pennati, A., Deng, J., Galipeau, J., 2014. Maltose-Binding Protein Fusion Allows for High Level Bacterial Expression and Purification of Bioactive Mammalian Cytokine Derivatives. *PLoS ONE* 9. doi:10.1371/journal.pone.0106724
- Pertl, U., Luster, A.D., Varki, N.M., Homann, D., Gaedicke, G., Reisfeld, R.A., Lode, H.N., 2001. IFN- γ -Inducible Protein-10 Is Essential for the Generation of a Protective Tumor-Specific CD8 T Cell Response Induced by Single-Chain IL-12 Gene Therapy. *J. Immunol.* 166, 6944–6951. doi:10.4049/jimmunol.166.11.6944
- Pulendran, B., Dillon, S., Joseph, C., Curiel, T., Banchereau, J., Mohamadzadeh, M., 2004. Dendritic cells generated in the presence of

- GM-CSF plus IL-15 prime potent CD8⁺ Tc1 responses in vivo. *Eur. J. Immunol.* 34, 66–73. doi:10.1002/eji.200324567
- Rafei, M., Hsieh, J., Zehntner, S., Li, M., Forner, K., Birman, E., Boivin, M.-N., Young, Y.K., Perreault, C., Galipeau, J., 2009. A granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and interleukin-15 fusokine induces a regulatory B cell population with immune suppressive properties. *Nat. Med.* 15, 1038–1045. doi:10.1038/nm.2003
- Rafei, M., Wu, J.H., Annabi, B., Lejeune, L., François, M., Galipeau, J., 2007. A GMCSF and IL-15 fusokine leads to paradoxical immunosuppression in vivo via asymmetrical JAK/STAT signaling through the IL-15 receptor complex. *Blood* 109, 2234–2242. doi:10.1182/blood-2006-07-037473
- Sanchez-Lugo, Y.E., Perez-Trujillo, J.J., Gutierrez-Puente, Y., Garcia-Garcia, A., Rodriguez-Rocha, H., Barboza-Quintana, O., Muñoz-Maldonado, G.E., Saucedo-Cardenas, O., de Oca-Luna, R.M., Loera-Arias, M.J., 2014. CXCL10/XCL1 fusokine elicits in vitro and in vivo chemotaxis. *Biotechnol. Lett.* doi:10.1007/s10529-014-1746-4
- Tuinstra, R.L., Peterson, F.C., Elgin, E.S., Pelzek, A.J., Volkman, B.F., 2007. An engineered second disulfide bond restricts lymphotactin/XCL1 to a chemokine-like conformation with XCR1 agonist activity. *Biochemistry (Mosc.)* 46, 2564–2573. doi:10.1021/bi602365d
- Vazquez-Lombardi, R., Roome, B., Christ, D., 2013. Molecular Engineering of Therapeutic Cytokines. *Antibodies* 2, 426–451. doi:10.3390/antib2030426

- Wang, P., Yang, X., Xu, W., Li, K., Chu, Y., Xiong, S., 2010. Integrating individual functional moieties of CXCL10 and CXCL11 into a novel chimeric chemokine leads to synergistic antitumor effects: a strategy for chemokine-based multi-target-directed cancer therapy. *Cancer Immunol. Immunother.* CII 59, 1715–1726. doi:10.1007/s00262-010-0901-6
- Wang, Q., Yu, H., Zhang, L., Ju, D., Pan, J., Xia, D., Yao, H., Zhang, W., Wang, J., Cao, X., 2002. Adenovirus-mediated intratumoral lymphotactin gene transfer potentiates the antibody-targeted superantigen therapy of cancer. *J. Mol. Med. Berl. Ger.* 80, 585–594. doi:10.1007/s00109-002-0345-3
- Wang, X., Lu, X.-L., Zhao, H.-Y., Zhang, F.-C., Jiang, X.-B., 2013. A novel recombinant protein of IP10-EGFRvIIIscFv and CD8(+) cytotoxic T lymphocytes synergistically inhibits the growth of implanted glioma in mice. *Cancer Immunol. Immunother.* CII 62, 1261–1272. doi:10.1007/s00262-013-1426-6
- Wang, X., Zhang, F.-C., Zhao, H.-Y., Lu, X.-L., Sun, Y., Xiong, Z.-Y., Jiang, X.-B., 2014. Human IP10-scFv and DC-induced CTL synergistically inhibit the growth of glioma in a xenograft model. *Tumour Biol.* 35, 7781–7791. doi:10.1007/s13277-014-1867-3
- Weidner, N., Semple, J.P., Welch, W.R., Folkman, J., 1991. Tumor angiogenesis and metastasis--correlation in invasive breast carcinoma. *N. Engl. J. Med.* 324, 1–8. doi:10.1056/NEJM199101033240101
- Williams, P., Rafei, M., Bouchentouf, M., Raven, J., Yuan, S., Cuerquis, J., Forner, K.A., Birman, E., Galipeau, J., 2010. A Fusion of GM-CSF and IL-

- 21 Initiates Hypersignaling Through the IL-21R α Chain With Immune Activating and Tumoricidal Effects In Vivo. *Mol. Ther.* 18, 1293–1301. doi:10.1038/mt.2010.49
- Yang, X., Chu, Y., Wang, Y., Zhang, R., Xiong, S., 2006. Targeted in vivo expression of IFN-gamma-inducible protein 10 induces specific antitumor activity. *J. Leukoc. Biol.* 80, 1434–1444. doi:10.1189/jlb.0306212
- Yao, L., Pike, S.E., Pittaluga, S., Cherney, B., Gupta, G., Jaffe, E.S., Tosato, G., 2002. Anti-tumor activities of the angiogenesis inhibitors interferon-inducible protein-10 and the calreticulin fragment vasostatin. *Cancer Immunol. Immunother. CII* 51, 358–366. doi:10.1007/s00262-002-0294-2
- Yates-Binder, C.C., Rodgers, M., Jaynes, J., Wells, A., Bodnar, R.J., Turner, T., 2012. An IP-10 (CXCL10)-derived peptide inhibits angiogenesis. *PLoS One* 7, e40812. doi:10.1371/journal.pone.0040812
- Zhang, J., Zhou, Z., Wang, C., Shen, J., Zheng, Y., Zhang, L., Wang, J., Xia, D., 2011. Reduced tumorigenesis of EG7 after interleukin-10 gene transfer and enhanced efficacy in combination with intratumorally injection of adenovirus-mediated lymphotactin and the underlying mechanism. *Cancer Immunol. Immunother. CII* 60, 559–573. doi:10.1007/s00262-010-0955-5