



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**  
**POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

FACULTAD DE MEDICINA  
BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

**RESPUESTA *IN VITRO* DE LINFOCITOS T CD8<sup>+</sup> DE PACIENTES CON ADENOCARCINOMA  
PULMONAR A UN EPITOPO DE MUC1 PRESENTADO POR LA MOLÉCULA HLA-A2**

**TESIS**

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

**DOCTOR EN CIENCIAS**

PRESENTA:

**ATZIN MÉNDEZ JOSÉ AGUSTÍN**

**TUTOR PRINCIPAL DE TESIS:** DRA. PATRICIA SOFIA GOROCICA ROSETE  
FACULTAD DE MEDICINA, UNAM

**COMITÉ TUTORAL:** DR. RAÚL MANCILLA JIMÉNEZ  
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMEDICAS, UNAM  
DR. JOSÉ SULIVAN LÓPEZ GONZÁLEZ  
FACULTAD DE QUÍMICA, UNAM

**MÉXICO, CD. MX., MAYO, 2016**



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

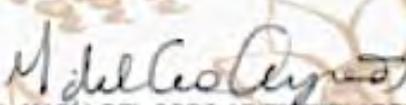
Dr. Isidro Ávila Martínez  
Director General de Administración Escolar, UNAM  
Presente

Me permito informar a usted que el Subcomité de Biología Experimental y Biomedicina del Posgrado en Ciencias Biológicas, en su sesión ordinaria del día 13 de abril de 2016, aprobó el jurado para la presentación del examen para obtener el grado de **DOCTOR EN CIENCIAS** del alumno **ATZÍN MÉNDEZ JOSÉ AGUSTÍN** con número de cuenta **508019548** con la tesis titulada **"RESPUESTA IN VITRO DE LINFOCITOS T CD8<sup>+</sup> DE PACIENTES CON ADENOCARCINOMA PULMONAR A UN EPÍTOPO DE MUC1 PRESENTADO POR LA MOLÉCULA HLA-A2"**, realizada bajo la dirección de la **DRA. PATRICIA SOFÍA GOROCICA ROSETE**.

Presidente: DR. FEDERICO ÁVILA MORENO  
Vocal: DRA. LAURA CECILIA BONIFAZ ALFONZO  
Secretario: DR. JOSÉ SULLIVAN LÓPEZ GONZÁLEZ  
Suplente: DR. ANDRÉS ELIÚ CASTELL RODRÍGUEZ  
Suplente: DR. RAFAEL SIMITRÍO SAAVEDRA DURAN

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

**ATENTAMENTE**  
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"  
Cd. Universitaria, Cd. Mx., a 13 de abril de 2016

  
**DRA. MARÍA DEL CORO ARIZMENDI ARRIAGA**  
COORDINADORA DEL PROGRAMA



## **Agradecimientos**

Al posgrado en Ciencias Biológicas, UNAM por el apoyo y facilidades otorgadas para la realización de mis estudios de Doctorado.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), por el apoyo brindado en el programa de becarios (245173).

Al proyecto de salud 2012-01-180516.

A los miembros del comité tutorial, por la paciencia y los aportes realizados a mi trabajo de investigación

Dra. PATRICIA SOFIA GOROCICA ROSETE

Dr. RAÚL MANCILLA JIMÉNEZ

Dr. JOSÉ SULIVAN LÓPEZ GONZÁLEZ

Especial agradecimiento a:

**Sra. Rosa Peña Nieto**

**I.S.C. Julio Cesar Miranda Amador**

**M.E. Ana Leticia Escudero Rojas**

**Dr. Rafael Wong Michell**

**Dr. José Sullivan López**

**Dr. Ricardo Lascurain Ledesma**

**Dra. María del Carmen Arenas del Ángel**

Debido a que su apoyo fue esencial para la consolidación de este trabajo

## **Dedicatorias**

A mi madre, Rosio Méndez Vazquez

A mi familia, Ana Leticia Cuevas Escudero e Iztly

## ÍNDICE

|  |    |
|--|----|
| <b>ABREVIATURAS</b>  | i  |
| <b>1. RESUMEN</b>  | 1  |
| <b>2. ABSTRACT</b>   | 3  |
| <b>3. INTRODUCCIÓN</b>   |    |
| 3.1. Epidemiología del cáncer pulmonar                                   | 5  |
| 3.2. Factores del riesgo en el cáncer de pulmón                          | 5  |
| 3.3. Clasificación histológica del cáncer de pulmón                      | 6  |
| 3.4. Características generales del adenocarcinoma pulmonar               | 6  |
| 3.5. Alteración de la expresión de mucinas en el adenocarcinoma pulmonar | 6  |
| 3.6. MUC1  | 7  |
| 3.7. MUC1 y cáncer   | 8  |
| 3.8. Respuesta inmune contra el cáncer mediada por CTLs                  | 9  |
| 3.9. Evasión de la respuesta inmune mediada por los CTLs por el cáncer   | 12 |
| 3.10. Activación de CTLs para la terapia adaptativa                      | 15 |
| 3.11. Activación de CTLs específicos de MUC1 para la terapia adaptativa  | 17 |
| <b>4. ANTECEDENTES</b>   | 18 |
| <b>5. JUSTIFICACIÓN</b>  | 20 |
| <b>6. HIPÓTESIS</b>  | 21 |
| <b>7. OBJETIVOS</b>  |    |
| 7.1. Objetivo general  | 22 |
| 7.2. Objetivos particulares  | 22 |
| <b>8. MATERIAL Y MÉTODOS</b>   |    |
| 8.1. Línea celular T2  | 23 |
| 8.2. Separación de células mononucleares de sangre periférica            | 23 |
| 8.3. Anticuerpos monoclonales  | 24 |
| 8.4. Citometría de flujo   | 25 |
| 8.5. Péptidos  | 25 |
| 8.6. Ensayo de estabilización de la molécula HLA-A2 mediante MUC1-8 mer  | 26 |

|  |    |
|--|----|
| 8.7. Microscopia confocal  | 27 |
| 8.8. Obtención de la muestra sanguínea   | 29 |
| 8.9. Genotipificación de la molécula HLA-A2  | 29 |
| 8.10. Obtención de linfocitos T CD8 <sup>+</sup>   | 31 |
| 8.11. Activación policlonal de linfocitos T CD8 <sup>+</sup>   | 32 |
| 8.12. Ensayo de activación de linfocitos T CD8 <sup>+</sup> específicos del péptido MUC1-8 mer   | 33 |
| 8.13. Tinción de linfocitos T CD8 <sup>+</sup> con succimidil ester de carboxifluoresceína   | 34 |
| 8.14. Expansión policlonal de linfocitos T CD8 <sup>+</sup>  | 34 |
| 8.15. Ensayo de expansión de linfocitos T CD8 <sup>+</sup> específicos del MUC1-8 mer  | 35 |
| 8.16. Análisis estadístico   | 36 |
| <b>9. RESULTADOS</b>   |    |
| 9.1. Cinética de crecimiento de células T2   | 37 |
| 9.2. Titulación de los mAb   | 37 |
| 9.3. Teóricamente el péptido MUC1-8 mer se une a la molécula HLA-A2  | 39 |
| 9.4. MUC1-8mer, OVA-8 mer, IVMP-9 mer y la $\beta_2$ -m incrementan las moléculas<br>HLA-A2 en células T2  | 40 |
| 9.5. El incrementa de moléculas HLA-A2 en células T2 es dependiente de la<br>concentración de péptido MUC1-8 mer   | 46 |
| 9.6. La molécula HLA-A2 con el péptido MUC1-8 mer co-localizan en la membrana de<br>células T2   | 47 |
| 9.7. Características clínicas del grupo de estudio   | 51 |
| 9.8. Pureza de linfocitos T CD8 <sup>+</sup>   | 53 |
| 9.9. Cinética de linfocitos T CD8 <sup>+</sup> activados policlonalmente   | 54 |
| 9.10. Linfocitos T CD8 <sup>+</sup> CD25 <sup>+</sup> 7AA-D <sup>-</sup> de personas sanas HLA-A2 <sup>+</sup> se incrementan al ser<br>estimulados con nuestro sistema de activación                        | 57 |
| 9.11. Linfocitos T CD8 <sup>+</sup> CD25 <sup>+</sup> 7AA-D <sup>-</sup> de pacientes HLA-A2 <sup>+</sup> con adenocarcinoma<br>pulmonar se incrementan al ser estimulados con nuestro sistema de activación | 63 |
| 9.12. El incremento de linfocitos T CD8 <sup>+</sup> CD25 <sup>+</sup> 7AA-D <sup>-</sup> de pacientes HLA-A2 <sup>+</sup> con<br>adenocarcinoma pulmonar inducido con nuestro sistema de activación no esta |    |

|  |     |
|--|-----|
| restringido al estadio tumoral   | 69  |
| 9.13. Cinética de la expansión policlonal de linfocitos T CD8 <sup>+</sup> de pacientes HLA-A2 <sup>+</sup> con adenocarcinoma pulmonar  | 71  |
| 9.14. Linfocitos T CD8 <sup>+</sup> específicos del péptido MUC1-8 mer de pacientes HLA-A2 <sup>+</sup> con adenocarcinoma pulmonar se expanden <i>in vitro al ser</i> estimulados con nuestro sistema de activación | 73  |
| <b>10. DISCUSIÓN</b>   | 77  |
| <b>11. CONCLUSIONES</b>  | 84  |
| <b>12. LITERATURA CITADA</b>   | 85  |
| <b>13. ANEXO</b>   |     |
| 13.1 Artículo requisito  | 102 |

## Abreviaturas

- Antígeno T o Thomsen-Friedenreich (1Gal $\beta$ -3GalNAc $\alpha$ -Ser/Thr /).
- Antígeno Tn (3GalNAc $\alpha$ -Ser/Thr)
- Antígenos Asociados a Tumor (TAAs).
- Carcinomas pulmonares de células no pequeñas (NSCLC)
- Carcinomas pulmonares de células pequeñas (SCLC)
- Células dendríticas (DC)
- Células mononucleares de sangre periférica (PBMCs)
- Complejo principal de histocompatibilidad clase I (MHC-I)
- Factor de necrosis tumoral alfa (TNF- $\alpha$ )
- Glicoproteína mucina 1 (MUC1)
- Glicosiltransferasas (GTs)
- Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias (INER)
- Interferon-gamma (IFN-  $\gamma$ ).
- Linfocitos T citotóxicos (CTL)
- N-acetilgalactosamina (GalNAc)
- N-acetilglucosamina (GlcNAc)
- Organización mundial de la salud (OMS).
- Repetición en tándem de número variable (VNTR)
- Retículo Endoplásmico (RE).
- Sitio de unión de carbohidratos con la cadena peptídica (núcleo o *core*)

## 1. RESUMEN

El adenocarcinoma pulmonar es la primera causa de muerte por cáncer a nivel mundial. Esta neoplasia sobreexpresa la glicoproteína mucina 1 (MUC1), la cual se considera un antígeno asociado a tumor (TAA). La secuencia peptídica SAPDTRPA de la MUC1 (MUC1-8 mer) es un epítipo que se expone debido a la hipoglicosilación asociada a la progresión del tumor. MUC1-8 mer puede ser presentado por la molécula H-2k<sup>b</sup> de ratón o por el HLA-A2. En modelo murino, MUC1-8 mer es inmunodominante para inducir la generación de linfocitos T citotóxicos (CTLs). En líneas celulares, se han utilizado las células T2 que expresan HLA-A2 (en forma inestable) para activar linfocitos T CD8<sup>+</sup> de pacientes con cáncer de mama mediante la presentación de diversos TAAs. Nuestro objetivo fue activar y expandir linfocitos T CD8<sup>+</sup> de pacientes con adenocarcinoma pulmonar por medio de MUC1-8 mer presentado por las células T2. Los linfocitos T CD8<sup>+</sup> se aislaron mediante anticuerpos acoplados a perlas magnéticas a partir de la sangre venosa de 9 pacientes y 10 personas sanas. Asimismo, las células T2 fueron incubadas con MUC1-8 mer y  $\beta_2$ -microglobulina para estabilizar la expresión de moléculas HLA-A2. La afinidad de MUC1-8 mer para unirse a la molécula HLA-A2 fue predicha mediante el uso del programa NetMHC versión 3.4. Por lo que se estableció un cocultivo del complejo células T2 con MUC1-8 mer y linfocitos T CD8<sup>+</sup> suplementado con anticuerpos anti-CD2 y anti-CD28 e IL-2. Los resultados mostraron que la unión de MUC1-8 mer a la molécula HLA-A2 fue dependiente de la dosis. Los complejos HLA-A2 con MUC1-8 mer en la membrana de las células T2 se confirmaron por colocalización mediante microscopia confocal

(coeficiente de Manders de 0.04-1). El péptido MUC1-8 mer activó linfocitos T CD8<sup>+</sup> de pacientes HLA-A2<sup>+</sup>; el porcentaje de linfocitos T CD8<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> fue tres veces mayor que las células no estimuladas ( $P = 0.018$ ). Además, los linfocitos T CD8<sup>+</sup> de los pacientes HLA-A2<sup>+</sup> mostraron mayor porcentaje de células CD25 positivas al compararlas con los de los donadores sanos HLA-A2<sup>+</sup> ( $P = 0.04$ ). Por otra parte, linfocitos T CD8<sup>+</sup> específicos de MUC1-8 mer alcanzaron el 77.6% de expansión celular en 10 días de cultivo después de una segunda estimulación a los 7 días con células T2 conteniendo el complejo HLA-A2 con MUC1-8 mer. Además, se observó que independientemente del estadio III o IV de progresión del cáncer, los linfocitos T CD8<sup>+</sup> respondieron de igual forma al estímulo antigénico. En conclusión, la expansión de linfocitos T CD8<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> específicos del péptido MUC1-8 mer presentado por las células T2 y la coestimulación, puede ser utilizada para el desarrollo de inmunoterapia adoptiva contra cáncer.

## 2. ABSTRACT

Lung adenocarcinoma is the leading cause of cancer death worldwide. This tumor overexpresses tumor-associated antigens (TAAs) derived from the glycoprotein mucin 1 (MUC1). It has been shown that MUC1-derived SAPDTRPA peptide sequence (MUC1-8 mer) is exposed in the region of variable number of tandem repeats, due to hypoglycosylation associated with tumor progression. MUC1-8 mer is presented by the mouse class I major histocompatibility complex H-2K<sup>b</sup> or human leukocyte antigen (HLA)-A2. In murine model, the MUC1-8 mer is immunodominant for the generation of cytotoxic T lymphocytes. In cell lines, the T2 cells have been used to activate CD8<sup>+</sup> T cells from breast cancer patients by means of diverse TAAs. Our objective was to activate and expand CD8<sup>+</sup> T cells from lung adenocarcinoma patients by MUC1-8 mer-presenting T2 cells. For this, CD8<sup>+</sup> T cells were isolated from peripheral blood mononuclear cells from 9 lung cancer patients and 10 healthy volunteers by magnetic beads-coupled antibodies. Moreover, T2 cells were incubated with MUC1-8 mer and  $\beta_2$ microglobulin to stabilize expression of HLA-A2 molecules on cell surface. The binding affinity of MUC1-8 mer peptide for HLA-A2 molecule was predicted by NetMHC software version 3.4. Thus, a coculture was established with MUC1-8 mer-loaded T2 cells and CD8<sup>+</sup> T cells in the presence of beads-coupled anti-CD2 and anti-CD28 antibodies plus IL-2. The results showed that HLA-A2-specific binding of the MUC1-8 mer peptide occurred in a dose-dependent manner. The MUC1-8 mer-HLA-A2 complex on T2 cell surface was confirmed by colocalization using confocal microscopy (Manders coefficient: 0,04-1). The MUC1-8 mer peptide activated

CD8<sup>+</sup> T cells from HLA-A2<sup>+</sup> patients; the percentage of CD25<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> T cells was 3-fold higher than those non-stimulated cells ( $P = 0.018$ ). Likewise, CD8<sup>+</sup> T cells from HLA-A2<sup>+</sup> patients showed a greater proportion of cells positive to CD25 than those from HLA-A2<sup>+</sup> healthy donors ( $P = 0.04$ ). Moreover, 77.6% of CD8<sup>+</sup> T cells specific to MUC1-8 mer proliferated after 10 days of culture in response to a second stimulation at day 7 with peptide MUC1-8 mer-loaded T2 cells. Furthermore, the CD8<sup>+</sup> T cells reached a same number of CD25<sup>+</sup> cells after stimulated by MUC1-8 mer-loaded T2 cells in the presence of anti-CD2 and anti-CD28 mAbs plus IL-2, independently of the stage III or IV tumor progression. In conclusion, the expansion of CD25<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> T cells by MUC1-8 mer-loaded T2 cells and costimulatory signal through CD2, CD28 and IL-2 can be useful in adoptive immunotherapy.

### **3. INTRODUCCIÓN**

#### **3.1. Epidemiología del cáncer pulmonar**

Estudios epidemiológicos reportados por GLOBOCAN en el 2012, indican que 14.1 millones de personas presentan casos nuevos de cáncer a nivel mundial. Se ha estimado que 32.6 millones de personas viven afectadas por algún tipo de cáncer y 8.2 millones de personas murieron a causa de algún tipo de cáncer (1). El cáncer de pulmón tienen una incidencia del 12% y mortalidad de 18% en relación a los demás tipos de cáncer y se presenta en ambos generos (2-5). En México, el Instituto Nacional de Estadística y Geografía (INEGI), en el periodo 1998-2010, registró un aumento constante en la tasa de mortalidad por cáncer (de 55,000 a 74,800 decesos) representando el cáncer de pulmón el 21% (6). En la actualidad, el cáncer de pulmón es un grave problema de salud pública de pobre pronóstico (7-12).

#### **3.2. Factores del riesgo en el cáncer de pulmón**

El cáncer de pulmón, se desarrolla a partir de células pulmonares y bronquiales, siendo más frecuente el localizado en las vías aéreas centrales comparado con las vías aéreas periféricas (13). Los factores de riesgo extrínsecos asociados a esta patología son: el tabaquismo (activo o pasivo), la asbestosis, inhalación de humo de leña y sustancias químicas (arsénico, cloruro de vinilo, cromato de níquel, clorometil metil éter, etc.), contaminación ambiental y la exposición a radiación. Los factores de riesgo intrínsecos son las enfermedades pulmonares de obstrucción crónica (EPOC), fibrosis pulmonar idiopática y tuberculosis (13).

### **3.3. Clasificación histológica del cáncer de pulmón**

El cáncer de pulmón, se clasifica en cáncer pulmonar de células pequeñas (CPCP) y cáncer pulmonar de células no pequeñas (CPCNP) (11). El CPCP, representa el 25% de los cánceres pulmonares, su proliferación es muy rápida y muestra mayor asociación con el tabaquismo (98% de los pacientes CPCP son fumadores). Por otro lado, El CPCNP registra el 75% de todos los tipos de cáncer pulmonar y se divide en tres subtipos histológicos: carcinoma de células escamosas o epidermoide, carcinoma de células grandes y el adenocarcinoma. Siendo este último el más frecuente (14).

### **3.4. Características generales del adenocarcinoma pulmonar**

El adenocarcinoma pulmonar es diagnosticado en más del 80% de los pacientes con CPCNP, se origina de células epiteliales, con mayor frecuencia no asociado a pacientes fumadores, se detecta principalmente por la invasión hacia ganglios hiliares, cerebro y glándulas suprarrenales (poco tiempo después del diagnóstico) y es de difícil diagnóstico por ser asintomático (15). Además, comprende un grupo de tumores con origen, morfología y patogénesis molecular heterogénea, por lo que es subclasificado en: acinar, broncoalveolar, papilar, así como bien diferenciado, moderado y poco diferenciado. Una característica adicional es: la secreción de material viscoso conocido como mucina.

### **3.5. Alteración de la expresión de mucinas en el adenocarcinoma pulmonar**

El término “mucina” se refiere al revestimiento de gel viscoelástico presente en las superficies de las glándulas epiteliales que revisten las vías aéreas pulmonares

(16). En su mayoría, la mucina está integrada por glicoproteínas altamente glicosiladas que se expresan en la parte apical de las células de tipo glandular de la submucosa (SMG) y por las células secretoras de mucina conocidas como “goblet cell” (17). Las mucinas se definen por cumplir las siguientes características: 1) tener una columna peptídica integrada por la región de número variable de repeticiones en tándem (VNTR); 2) el gran contenido de O-oligosacáridos en su región VNTR que le da un alto peso molecular (>50% de su peso); y 3) por cumplir una función protectora en los tejidos epiteliales (17,18).

A partir de los años 70's, la generación de anticuerpos monoclonales (mAb) condujo a la descripción de las mucinas o epítomos de éstas como antígenos asociados a tumor (TAAs), que en la actualidad se sabe están asociadas a múltiples tipos de cáncer (19). Las mucinas como TAAs, se caracterizan por las siguientes modificaciones: 1) están sobreexpresadas en toda la membrana celular, 2) tienen una pérdida de unidades sacarídicas (hipoglicosilación) y 3) exponen neoepítomos sacarídicos como los antígenos: Tn, T y Sialil Tn (20,21). Algunos TAAs derivados de mucinas, son utilizados para el diagnóstico y pronóstico de los pacientes con cáncer y que se les asocia con la oncogénesis, evasión de la respuesta inmune y la metástasis (22-24), tal es el caso de la mucina 1 o MUC1 (25).

### **3.6. MUC1**

En humanos, el gen MUC1 se ubica en el locus 1q21-24, el cual contiene siete exones que producen siete variantes de empalme alternativo. La forma de MUC1

que más se expresa es la que utiliza los siete exones (26,27). Esta forma de MUC1 se integra de dos subunidades, que son derivadas proteolíticamente de un péptido precursor común. La primera es la subunidad C terminal corta (MUC1-C), la cual tiene un dominio citoplásmico carboxilo-terminal de 72 residuos de aminoácidos, seguido de un dominio transmembranal de 31 aminoácidos y una pequeña porción extracelular. La otra subunidad es la N terminal larga (MUC1-N), que corresponde al segmento extracelular, integrada en su mayor parte por la secuencia GSTAPPAHGVTSAPDTRPAP, la cual se repite de 25 a 125 veces, para conformar a la región VNTR densamente O-glicosilada (26,27). MUC1 se expresa normalmente en la parte apical de las células epiteliales glandulares o luminal de la glándula mamaria, esófago, estómago, duodeno, páncreas, útero, próstata, pulmones, así como en células hematopoyéticas (26,27). Además de proteger a los epitelios, se le asocia con procesos de diferenciación celular, señalización intracelular y coestimulación de linfocitos T (28). Así mismo, la sobreexpresión de MUC1 se asocia con la progresión del tumor, confirmando su papel de TAA (29,30).

### **3.7. MUC1 y cáncer**

El TAA MUC1, se sobreexpresa en la membrana plasmática de las células tumorales de origen epitelial o adenocarcinomas y se puede detectar en sangre debido a la disociación de la subunidad MUC1-N (29,30). Además, se identifica por estar hipoglicosilado, por lo que exponen O-oligosacáridos truncados denominados núcleos o “cores” como Tn, T y sialil-Tn. También, se ha demostrado que MUC1 puede perder la totalidad de sus cadenas sacarídicas, lo que expone

neoepítomos de la columna peptídica que estaban ocultos por la glicosilación (29,30). Investigaciones recientes consideran al TAA MUC1 un oncogen, ya que su expresión se asocia con el mal pronóstico del paciente, la oncogénesis, la metástasis y la evasión de la respuesta inmune (30,31). En cambio, algunos neoepítomos que expresa el TAA MUC1, activan la respuesta inmune mediada por los linfocitos T CD8<sup>+</sup> activados o CTLs contra el cáncer (32-34).

### **3.8. Respuesta inmune contra cáncer mediada por CTLs**

Si bien datos clínicos y experimentales respaldan la teoría de la inmunovigilancia que consiste en detectar y eliminar células propias que han sido transformadas por alteraciones genéticas (35). Sin embargo, TAA como el derivado de MUC1, los fenotipos y funciones de los linfocitos T CD4<sup>+</sup> y el infiltrado de CTLs en el tumor determinarán la progresión o la eliminación de las células tumorales (36). Con respecto a estas dos poblaciones de linfocitos T, los CTLs son considerados indispensables en la defensa contra procesos malignos en ratones y humanos (37,38).

La activación de CTLs específicos contra el tumor se inicia con el reconocimiento de péptidos antigénicos de origen tumoral a través del receptor de linfocitos T (TCR). Los péptidos antigénicos son presentados por las células dendríticas (DCs) mediante las moléculas del complejo principal de histocompatibilidad (MHC) de clase I expresadas en su membrana celular (39). El proceso es conocido como “presentación cruzada” y consiste en lo siguiente: 1) las DCs fagocitan el material celular neoplásico generado por la actividad de las células NK y los macrófagos,

también internalizan a los TAA secretados por el tumor; 2) los proteasomas de las DCs procesan el material proteico obteniendo diferentes fragmentos peptídicos; 3) las proteínas transportadoras de antígenos (TAPs), introducen los fragmentos peptídicos en la luz del retículo endoplasmático (RE) donde se ensamblan a las moléculas MHC de clase I; 4) los complejos MHC clase I con un fragmento peptídico de 8 a 11 residuos de aminoácidos se exportan a la membrana de las DCs para la interacción con el TCR de los linfocitos T CD8<sup>+</sup> específicos.

Establecida la presentación antigénica, la activación continúa con la unión de la molécula CD8 a la región no polimórfica de la molécula MHC clase I. Lo anterior induce la activación de la proteína tirosina cinasa Lck, que se encuentra en la porción citoplasmática de los linfocitos T CD8<sup>+</sup>. Por proximidad, la proteína Lck interacciona con la proteína tirosina cinasa ZAP70, la cual está unida a las fosfotirosinas de los inmunorreceptores con motivos de activación basados en tirosinas (ITAM) de la cadena  $\zeta$  del complejo CD3. La proteína Lck, al tener función enzimática, activa a ZAP70 (al fosforilar sus tirosinas). A su vez, ZAP70 fosforila a las proteínas LAT (*Linker for Activation of T cells*) y SLP-76 (SH2 domain-containing leukocyte protein of 76 kDa) que reclutan otras enzimas. Estas reacciones enzimáticas resultan en la transmisión de señales intracelulares que promueven la expresión de genes asociados a la activación de los CTLs (39).

Posterior a las señales intracelulares de la activación, se lleva a cabo la segunda señal o coestimulación. Dentro de la superfamilia de receptores tipo inmunoglobulina (Ig), dos correceptores llevan a cabo la coestimulación: el CD28 (ligando de CD80 o CD86) que es el más caracterizado e importante para la

activación de todos los tipos de CTLs; y el CD2 (ligando de CD58) que además de coestimular a los linfocitos T CD8<sup>+</sup> estabiliza la sinapsis inmunológica. Las señales generadas por estos correceptores, estimulan la producción de la interleucina 2 (IL-2) y del receptor de la IL-2 (CD25) para promover la expansión clonal de los linfocitos T CD8<sup>+</sup> de manera autócrina; así como inducen la producción del interferón gamma (IFN-γ), el cual regula positivamente la expresión de moléculas MHC clase I en las células neoplásicas y en las DCs, induce la generación de señales proinflamatorias de parte del tumor y del tejido circundante y promueve la apoptosis en las células tumorales (39).

Los linfocitos T CD8<sup>+</sup> específicos de tumor que se expanden regularmente, adquieren la función efectora denominándose CTLs, los cuales son reclutados a los sitios del tumor para eliminar a las células neoplásicas (39,40). Los CTLs llevan a cabo la citotoxicidad mediante la vía dependiente de secreción de gránulos y de receptores de muerte como Fas/FasL (CD95/CD95L). La citotoxicidad dependiente de secreción de gránulos, se caracteriza por la liberación de granzima y perforina capaces de perforar la membrana de la célula tumoral. La citotoxicidad mediada por Fas/FasL, se basa en la interacción de Fas (expresado en la célula tumoral) con FasL expresado por el linfocito T, lo que promueve la apoptosis mediada por la vía de las caspasas (caspasa 8 y 9) (39,40). La eliminación del tumor mediante los mecanismos efectores de los CTLs es de gran efectividad. Sin embargo, conforme el tumor progresa, adquiere mecanismos que permiten evadir este tipo de respuesta inmune (40).

### **3.9. Evasión de la respuesta inmune mediada por los CTLs por el cáncer**

Los mecanismos del cáncer para evadir la respuesta inmune mediada por CTLs, se basan en la utilización del microambiente inflamatorio crónico a su favor, la adquisición de un fenotipo que le permite evadir la respuesta inmune mediada por los CTLs y el acondicionamiento de un microambiente tumoral inmunosupresor (41). Además, siendo el tumor heterogéneo, la supervivencia de ciertas células tumorales correlaciona con la presión selectiva ejercida por el sistema inmunológico o inmunoedición (42,43).

Respecto al infiltrado de células de la respuesta inmune y el microambiente de citocinas que éstas generan en la lesión tumoral, cambian de acuerdo al estadio clínico, dirigiendo el tipo de respuesta de los CTLs contra el tumor: la inmunidad o la tolerancia (44,45); como se describe a continuación:

- La presencia de linfocitos T reguladores (Treg CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>) en el tumor, es mal pronóstico para el tratamiento del cáncer (46). Se ha identificado que el factor de crecimiento tumoral beta (TGF- $\beta$ ) producido por las Treg, suprime la transcripción de genes que promueven la supervivencia y la función efectora de los CTLs (47). La sobreexpresión de CD25 en las Tregs disminuye la IL-2 del microambiente, afectando la activación y función efectora de los CTLs (48). Además, las DCs que entran en contacto con los Treg se vuelven tolerogénicas (49,50).

- Los macrófagos M2 presentes en tumores establecidos, producen las citocinas anti-inflamatorias IL-4, IL-10, IL-13 y hormonas glucocorticoides, que ejercen un

efecto negativo sobre la activación y función efectora de las células T y NK, promueven la progresión tumoral e inducen la angiogénesis y la metástasis (51, 52). Estas células también expresan el transportador 2B de aminoácidos catiónicos y sobreexpresan la enzima argininasasa I (ARGI), por lo que disminuyen la arginina en el microambiente tumoral (56,57). La deficiencia en la concentración de arginina afecta la activación y proliferación de linfocitos T infiltrantes del tumor, debido a que disminuye la expresión del TCR (56,57). Además de inhibir la activación de linfocitos T, se afecta la síntesis de óxido nítrico (NO) y de especies reactivas de oxígeno; y se promueve la diferenciación de linfocitos Treg mediante la producción de IL-10 y TGF- $\beta$  (58,59).

- Los fenotipos inmaduros de DCs (iDC) que entran en contacto con linfocitos T, regularmente les inducen un estado de anergia o promueven su apoptosis (60), mientras que las DCs plasmocitoides (pDCs), promueven la diferenciación de los Treg ya que producen TGF- $\beta$  e IL-10 (61). Por otro lado, la hipoxia en el microambiente tumoral promueve que las DCs maduras presentes en la lesión neoplásica expresen: el receptor de adenosina, el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), la ARG1 y la endomila 2,3 dioxigenasa (IDO); condiciones que promueven la diferenciación de los Treg (62-64).

Respecto al fenotipo que adquiere el tumor para escapar de su eliminación mediante CTLs, se ha demostrado que tiene origen en la alteración de la expresión de ciertos genes, por ejemplo:

- El silenciamiento de p53, lo que promueve la división celular incontrolada y la evasión la lisis celular y apoptosis mediada por granzimas y FasL, respectivamente (65,66).
- La sobreexpresión de los genes que traducen la actina, como *efrina A1*, se ve reflejada en la desorganización del citoesqueleto en células tumorales resistentes a lisis (67).
- La inhibición del gen de la molécula de adhesión intercelular 1 (ICAM 1), fundamental junto con su ligando LFA-1 para la activación de linfocitos T y para dirigir los gránulos citolíticos hacia las células tumorales (68-70).
- La expresión de genes asociados a la hipoxia como HIF1 y STAT3, los cuales proporcionan resistencia a la lisis en las células tumorales (71).
- La sobreexpresión de los genes que traducen a los receptores PD-L1 y CTLA-4, moléculas que regulan negativamente la activación de CTLs (72-74).
- La inhibición de la expresión de genes reguladores de la presentación antigénica; como el de las moléculas MHC clase I, TAP1, TAP2 y  $\beta_2m$  (75).
- La inhibición de los genes que codifican al receptor de muerte Fas (75).

Las células neoplásicas también generan un microambiente tumoral que ocasiona inmunosupresión, el cual se integra de citocinas liberadas por el tumor (VEFG, IL6, IL-10, IDO y TGF- $\beta$ ), las cuales tienen un efecto inhibitorio en la activación y función efectora de los CTLs. También promueven la diferenciación de los linfocitos Treg e inducen la producción de metabolitos de esterol, capaces de inhibir la migración de DCs a los ganglios linfáticos y de los CTLs al sitio del tumor mediante la inhibición de la expresión del receptor CCR7 (75).

A pesar de este panorama, el infiltrado de CTLs en el tumor se correlaciona con la regresión del tumor, por lo que conocer los mecanismos del cáncer para evadir la respuesta inmune mediada por los CTLs ha permitido desarrollar la inmunoterapia contra cáncer (76-82). Ésta incluye el uso de adyuvantes para potenciar las funciones de las DCs, el uso de citocinas para promover la función de los CTLs y de los anticuerpos para neutralizar las actividades de las moléculas implicadas en los puntos de control inmunológico así como la activación de CTLs específicos de antígenos tumorales para la terapia adoptiva.

### **3.10. Activación de CTLs para la terapia adaptativa**

La terapia adoptiva es la activación *in vitro* de CTLs específicos del tumor para ser transferidos al paciente con cáncer (83). Múltiples grupos de estudio trabajan en la consolidación de este tipo de inmunoterapia, considerando los siguientes aspectos: 1) diseñar sistemas que activen CTLs en el menor tiempo posible y que sean reproducibles, 2) evaluar antígenos tumorales con relevancia inmunogénica y que se expresen en la mayor parte de los tipos de cáncer, 3) identificar el TAA que

puedan ser presentados por las moléculas MHC clase I que se expresan en la mayor parte de la población humana, y 4) demostrar que el aumento de CTLs en los pacientes refleje mejoría clínicamente comprobable (84).

Los sistemas de activación *in vitro* de CTLs para la terapia adoptiva, tienen los siguientes enfoques: tomar la resección quirúrgica para la activación de CTLs infiltrados en el tumor mediante altas dosis de IL-2; optimizar la presentación de antígenos de origen tumoral *in vitro* o *in vivo*; diferenciar monocitos a DCs para la presentación antigénica; usar tetrámeros para la activación de CTLs específicos del tumor; y transfectar genes TCR que reconozcan epítopos derivados de TAA (84). Sin embargo, estos sistemas presentan múltiples complicaciones en la obtención de material biológico de la lesión, en la diferenciación de DCs a partir de monocitos debido a que los pacientes regularmente son leucopénicos; así como en el limitado número de tetrámeros comerciales que activan CTLs específicos de antígenos tumorales (84). Las limitaciones en los sistemas de activación, llevó a utilizar células presentadoras de antígeno artificiales (aAPC) capaces de formar el complejo MHC-péptido-TCR, que optimicen la presentación antigénica, aseguren la coestimulación y promuevan la expansión de CTLs mediante la producción de interleucinas (85-87). Bajo estos requerimientos, múltiples líneas celulares han sido modificadas para esta finalidad (85-87).

Algunas de las aAPC capaces de activar eficientemente a los CTLs provienen de líneas celulares que se acompañan de la coestimulación mediada por mAb solubles o acoplados a perlas de poliestireno (88-92). Un ejemplo es la línea celular T2 derivada de linfoblastos humanos. Estas células expresan el alelo del

antígeno leucocitario humano más común a nivel mundial \*0201 o HLA-A2, molécula que se exporta a la membrana celular vacía, debido a que no tienen moléculas TAP (93, 94); por lo que puede ser “cargada” con péptidos de manera exógena para ser utilizada como aAPC y poder evaluar la activación de linfocitos T CD8<sup>+</sup> específicos de antígeno. Utilizando las células T2 como aAPC de diversos epítomos derivados de los TAA NY-ESO-1, WT1, TERT y gp100 y mAb anti-CD3 y anti-CD28 acoplados a perlas de poliestireno, se ha evidenciado la generación de CTLs de personas sanas HLA-A2<sup>+</sup> (95). Por otro lado, con las células T2 presentando epítomos del TAA mamaglobulina A y mAb solubles anti-CD28, se ha logrado activar linfocitos T CD8<sup>+</sup> de pacientes HLA-A2<sup>+</sup> con cáncer de mama (96).

### **3.11. Generación de CTLs específicos de MUC1 para la terapia adaptativa**

De los diferentes TAAs evaluados mediante el uso de aAPC, el derivado de MUC1 es considerado un blanco para el diseño de inmunoterapia contra cáncer ya que tiene la capacidad de generar CTLs específicos del tumor a partir de la estimulación con múltiples epítomos (32-34). De los diferentes epítomos de MUC1, el péptido SAPDTRPA (MUC1-8 mer), así como su forma hipoglicosilada (SAPDT<sup>GalNAc</sup>RPA) son considerados inmunodominantes debido al reconocimiento de más de 16 mAbs (97). Además, se ha demostrado que otro gran número de mAbs reconocen secuencias adyacentes al péptido MUC1-8 mer como APDTR, PDTRPA, DTR, PDTRP y RPAP (97). Debido a que en la progresión del cáncer se expone este epítomo inmunodominante, se han realizado múltiples estudios para determinar su capacidad de generar CTLs.

#### 4. ANTECEDENTES

Apostolopoulos y cols., en 1997, utilizando ratones transgénicos HLA-A2<sup>+</sup>, identificaron que el péptido MUC1-8 mer generó CTLs, los cuales lisaron células cancerosas de tejido mamario (línea celular MCF-7) que expresaron al TAA MUC1 en la molécula HLA-A2 (98).

Apostolopoulos y cols., nuevamente en 2003 demostraron que el péptido MUC1-8 mer y su forma hipoglicosilada (SAPDT<sup>GalNAc</sup>RPA) se unen a la molécula H2-K<sup>b</sup> con diferente afinidad. En modelo murino, la forma hipoglicosilada demostró mayor afinidad y capacidad de activar linfocitos T CD8<sup>+</sup> *in vitro* e *in vivo* (99).

Quinlin y cols., en 2007, al estimular células mononucleares de sangre periférica (PBMCs) de pacientes con adenocarcinoma con seis secuencias peptídicas que contienen el motivo PDTRP, observaron que las células adquieren la capacidad de lisar células de la línea MCF-7 (100).

Ninkovic y cols., en 2009 encontraron que el glicopéptido denominado SAP10 (SAPDT<sup>GalNAc</sup>RPAPG) derivado de la región VNTR de MUC1 se une con gran fuerza a la molécula HLA-A2 mediante ensayos de unión que se realizaron en células T2 y en DCs de donadores sanos HLA-A2<sup>+</sup>. Además, estos autores utilizaron células T2 como células diana para evaluar la funcionalidad de los CTLs específicos del glicopéptido (101).

Lazoura y cols., en 2010, evaluaron la unión del péptido MUC1-8 mer y sus variantes SAPDFRPA, SAPDTRPL y SAPDFRPL a la molécula H-2K<sup>b</sup> expresada por las células de la línea RMA-S/TAP, concluyendo que al modificar un par de

aminoácidos se aumenta la fuerza de unión entre estas moléculas y que los CTLs generados a partir de estos péptidos eliminaron tumores en ratones transgénicos HLA-A2 (102).

Koido y cols., en 2014, al inmunizar ratones H2k<sup>b</sup> con DCs transfectadas con el gen MUC1 tumoral, identificaron que se generan principalmente linfocitos T CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> específicos al péptido MUC1-8 mer. La generación de estos linfocitos fue crucial para mantener la inmunidad antitumoral en un tiempo prolongado (103).

## 5. JUSTIFICACIÓN

El adenocarcinoma pulmonar es la primer causa de muerte por cáncer, a pesar de la existencia de algunos tratamientos basados en secuencias peptídicas derivadas de MUC1. Para superar los mecanismos inmunosupresores del tumor, sistemas de activación *in vitro* que incluye el uso de aAPC parecen ser una alternativa para la eliminación del cáncer. Activar *in vitro* linfocitos T CD8<sup>+</sup> específicos del péptido MUC1-8 mer de pacientes HLA-A2 con adenocarcinoma pulmonar, utilizando células T2 como presentadoras del péptido MUC1-8 mer y coestimulación mediada por mAb anti-CD2 y anti CD28, podría ser un sistema de activación para ser usado en la terapia adoptiva.

## **6. HIPÓTESIS**

El péptido MUC1-8 mer presentado por las células T2 activa específicamente linfocitos T CD8<sup>+</sup> de pacientes HLA-A2 con adenocarcinoma pulmonar.

## **7. OBJETIVOS**

### **7.1. Objetivo general**

Determinar si el péptido MUC1-8 mer presentado por las células T2 activa *in vitro* linfocitos T CD8<sup>+</sup> de pacientes HLA-A2 con adenocarcinoma pulmonar.

### **7.2. Objetivos particulares**

1. Evaluar la estabilización de la molécula HLA-A2 por el péptido MUC1-8 mer en la membrana de las células T2.
2. Identificar el complejo HLA-A2-péptido MUC1-8 mer en la membrana de las células T2.
3. Analizar la activación *in vitro* de los linfocitos T CD8<sup>+</sup> específicos del péptido MUC1-8 mer de personas sanas HLA-A2.
4. Analizar la reactividad *in vitro* de los linfocitos T CD8<sup>+</sup> específicos del péptido MUC1-8 mer de pacientes HLA-A2 con adenocarcinoma pulmonar.
5. Demostrar la expansión *in vitro* de los linfocitos T CD8<sup>+</sup> específicos del péptido MUC1-8 mer de pacientes HLA-A2 con adenocarcinoma pulmonar.

## **8. MATERIAL Y MÉTODOS**

### **8.1. Línea celular T2**

Para el desarrollo de este trabajo de tesis se utilizó la línea celular T2 clave CRL-1992TM (American Type Culture Collection, Manassas, VA). Las células T2 se propagaron en botellas de cultivo (12.5 mL) en medio RPMI-1640 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) suplementado con 20% de suero fetal bovino (SFB) inactivado por calor, 100µg/mL de estreptomicina, 100UI/mL de penicilina y 2 mM L-glutamina (Gibco-life Technologies, Rockville, MD) a 37°C en atmósfera de CO<sub>2</sub> al 5%. Para los ensayos biológicos las células se cosecharon cada 72 h, tomando una muestra para evaluar la concentración celular por mL y la viabilidad (>95%) mediante la prueba de exclusión del colorante azul de tripano en cámara de Neubauer y se lavaron con medio de cultivo RPMI-1640 (1mL) centrifugando a 800 rpm/5 min a temperatura ambiente.

### **8.2. Separación de PBMCs**

La separación de los PBMCs se realizó en base al protocolo propuesto por Boyum (109), la sangre heparinizada fue diluida 1:2 con solución amortiguadora PBS conteniendo fosfato sódico al 0.01 M, cloruro de sodio al 0.15 M a pH 7.2 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) y centrifugada a 1700 rpm/30 min a 10°C en Ficoll Hypaque con una densidad de 1.077 (Axis-Shield PoC As, Oslo, NO) en proporción 1:3. Las PBMCs recuperadas de la interfase del ficoll se lavaron con PBS (10 mL) centrifugando a 1500 rpm/ 5 min a 4°C y descartando el sobrenadante. El botón celular obtenido fue resuspendido en medio de cultivo RPMI-1640 (10 mL)

suplementado con 10% de SFB inactivado por calor, 100 µg/mL de estreptomicina, 100UI/mL de penicilina y 2 mM de *L*-glutamina. Luego, se tomó una muestra para conocer la concentración celular por mL y la viabilidad celular (>95%) mediante la prueba de exclusión del colorante azul de tripano en cámara de Neubauer.

### 8.3. Anticuerpos monoclonales (mAb)

En el presente trabajo se utilizaron los siguientes anticuerpos monoclonales:

Tabla 1. **Características de mAb de diferentes laboratorios comerciales.**

| mAb    | Marca      | Clona  | Reactividad | Fluorocromo Acoplado | Control Isotipo |
|--------|------------|--------|-------------|----------------------|-----------------|
| CD3    | Biolegend  | SK7    | Humano      | PerCP-Cy5.5          | Mouse IgG1,k    |
| CD4    | Biolegend  | OKT4   | Humano      | PE                   | Mouse IgG2b,k   |
| CD8    | Biolegend  | SK1    | Humano      | FITC                 | Mouse IgG1,k    |
| CD25   | Bioscience | M-A251 | Humano      | PE                   | Mouse IgG1,k    |
| HLA-A2 | Biolegend  | BB7.2  | Humano      | FITC                 | Mouse IgG2b,k   |
| 7-AAD  | Bioscience | 559925 | Humano      | Fluorescente         | -               |

PerCP-Cy5.5= Proteína peridina clorofila-cianina 5.5; PE=Ficoeritrina; FITC= Isotiocianato de fluoresceína; 7-AAD= 7-amino-actinomicina D.

Seguendo el protocolo convencional de inmunofluorescencia (109), se determinó la concentración óptima de los mAbs para los ensayos biológicos. A partir de concentrados leucocitarios de personas sanas (5 mL) proporcionados por el banco de sangre del INER, se obtuvieron PBMCs mediante el método descrito.

Para la inmunofluorescencia, se colocaron  $1 \times 10^6$  PBMCs en tubos eppendorf y se incubaron con 1mL de albúmina de suero bovino fracción V (BSA) al 0.5% y

azida de sodio al 2 mM (Sigma-Aldrich St. Louis, MO) en PBS para evitar la unión inespecífica de los anticuerpos. Luego, el botón celular fue incubado con los mAbs durante 30 min a 4°C (utilizando diferentes concentraciones). Al final de la incubación, las células se lavaron con PBS (1mL) y se fijaron con 150 µL de paraformaldehído (PFD) al 1% (Sigma-Aldrich St. Louis, MO) siguiendo el mismo protocolo. La concentración óptima del mAb anti HLA-A2-FITC fue determinada en células T2.

#### **8.4. Citometría de flujo**

El análisis de células con fluorescencia se realizó con el citómetro de flujo FACScalibur (Becton Dickinson, San Jose, CA). Para esto, se diseñaron las regiones de estudio basadas en las propiedades físicas de las células y se registró la inmunofluorescencia amplificada de las moléculas de la superficie celular mediante la adquisición de 25,000 eventos por dispersión frontal (FSC) y dispersión lateral (SSC). Para interpretar los resultados se utilizó el programa FlowJo versión 8.7.7. (Tree Star Inc. Ashland, Oregón) y se presentaron como histogramas para una sola variable o gráfica de puntos para dos o más variables. Células incubadas con los mAb control de isotipo fueron utilizadas para evaluar la inmunofluorescencia de fondo.

#### **8.5. Péptidos**

Los péptidos: SAPDTRPA derivado de MUC1 (MUC1-8 mer), GILGFVFTL derivado de la matriz de la proteína 1 del virus de influenza A 158-66 (IVMP1-9-mer) y SIINFEKL derivado de ovoalbumina de pollo 257-264 (OVA-8-mer) (104-

107) fueron sintetizados en el Instituto de Biotecnología (IBT) de la Universidad Nacional Autónoma de México campus Cuernavaca. Para su elaboración se utilizó un sintetizador de péptidos múltiple 430A (Applied Biosystems, San Diego, CA), siguiendo los protocolos del fabricante. La afinidad de estos péptidos por la molécula HLA-A2 fue confirmada mediante el programa NetMHC versión 3.4 (108). La pureza de los péptidos (>95%), fue evaluada a través de los pesos moleculares obtenidos por cromatografía líquida de alta resolución y por espectrometría de masas. Los péptidos se disolvieron en dimetilsulfóxido (10 mg/mL) y se almacenaron a -70°C hasta su uso.

#### **8.6. Ensayo de estabilización de la molécula HLA-A2 mediante MUC1-8 mer**

En las células T2, la afinidad de un péptido es proporcional a su capacidad de estabilizar las moléculas HLA-A2. Debido a que la  $\beta_2m$  exógena optimiza la estabilización de las moléculas HLA-A2, se incluyó en estos ensayos. Las células T2 ( $2 \times 10^5$ ) con viabilidad mayor al 95% fueron resuspendidas en medio de cultivo RPMI-1640 (200 $\mu$ L) suplementado con SFB al 10%, péptido MUC1-8 mer (20-100  $\mu$ g/mL) y  $\beta_2m$  (5-20 $\mu$ g/mL) (Fitzgerald, Acton, MA) utilizando el método de Jaramillo y cols. (96). Las células fueron incubadas en cajas de fondo plano de 96 pozos (Thermo Scientific Nunc, Roskilde, Dinamarca) durante 24h a 37°C en atmósfera de CO<sub>2</sub> al 5%. Como controles positivos del ensayo las células T2 fueron incubadas ya sea con el péptido IVMP1-9-mer (100 $\mu$ g/mL) o con el péptido OVA-8-mer (100 $\mu$ g/mL) en presencia de  $\beta_2m$  a una concentración de 20 $\mu$ g/mL (106,107). Como control negativo se utilizaron células T2 cultivadas sin péptido y sin  $\beta_2m$ . El incremento de las moléculas HLA-A2 fue identificado mediante la

inmunofluorescencia con el mAb anti-HLA-A2 conjugado a FITC (0.8µg/10µL de PBS), la cual fue analizada por citometría de flujo. La expresión de la molécula HLA-A2 en las células T2 se interpretó a través de la intensidad media de fluorescencia (MFI), calculando la diferencia entre el MFI de las células incubadas con el péptido MUC1-8 mer y las células sin el péptido.

### **8.7. Microscopia confocal**

Para dentificar la co-localización de la molécula HLA-A2 con el péptido MUC1-8 mer en la membrana de las células T2, se utilizó la técnica de microscopia confocal. La técnica consiste en registrar una secuencia de cortes ópticos de imágenes bidimensionales para identificar los sitios donde se localizan las moléculas inmunofluorescentes de nuestro interés. La emisión de fluorescencia proveniente de los mAbs puede ser co-localizada mediante el análisis de superposición de imágenes, evaluadas por el coeficiente de Manders o coeficiente de coincidencia. Coeficiente que consiste en la detección de una señal en el mismo voxel o volumen de píxeles a partir de dos fluorocromos diferentes desde una zona de la misma muestra, los valores que considera este coeficiente van de 0 a 1, siendo 1 la colocalización más alta y 0 ninguna de las intensidades de fluorescencia presentes.

Las células T2 ( $2 \times 10^5$ ) resuspendidas en medio de cultivo RPMI-1640 suplementado con: SFB al 10% (200µL), péptido MUC1-8 mer (100µg/mL) y  $\beta_2m$  (20µg/mL), se incubaron por cada microcámara de un portaobjetos (Bioscience, Bedford, MA) durante 24h a 37°C en atmósfera de CO<sub>2</sub> al 5% siguiendo el metodo

descrito por Bolt y Cordelieres (221) y se lavaron dos veces con PBS (500 $\mu$ L). Para la inmunofluorescencia indirecta del péptido MUC1-8 mer, se bloquearon los sitios de unión inespecíficos lavando las células con PBS-BSA al 0.5% y azida de sodio al 2 mM (500 $\mu$ L). Posteriormente, las células T2 se incubaron con el mAb que reconoce al péptido (1 $\mu$ g/500 $\mu$ L de PBS) que corresponde a IgG de ratón anti-CA27-29 (Fitzgerald, Acton, MA) durante 30 min a 4°C. Después de lavar con PBS (500 $\mu$ L), se continuó con la incubación del anticuerpo secundario obtenido en cabra anti-IgG de ratón acoplado a Alexa Fluor 594 (0.1 $\mu$ g/500 $\mu$ L PBS) (Molecular Probes-Life Technologies, Eugene, OR) durante 2h a 4°C. Finalizando la incubación, las células T2 se lavaron con PBS (500 $\mu$ L). Para la co-localización del péptido con la molécula HLA-A2, se utilizó el mAb anti-HLA-A2 acoplado a FITC (0.8 $\mu$ g/10 $\mu$ L de PBS). Las células T2 incubadas con el anticuerpo secundario conjugado a Alexa Fluor 594 o con el mAb control de isotipo mouse IgG2b,k acoplado a FITC se utilizaron como controles negativos.

Para el análisis de co-localización de las emisiones de fluorescencia proveniente de los anticuerpos, las células T2 se fijaron con PFD al 1% (500 $\mu$ L) en los portaobjetos y se cubrieron con medio de montaje Vectashield-4'6 diamidinofenyl-indol (DAPI) previamente diluido en PBS (50 $\mu$ L) (Vector Laboratories, Burlingame, CA). Las imágenes de fluorescencia se adquirieron con un microscopio confocal Zeiss LSM-510 (Carl Zeiss, Oberkochen, DE) utilizando una lente de objetivo 63X. Todas las imágenes fueron tomadas bajo la misma exposición, ampliación e intensificación. Las imágenes fueron procesadas por el programa ImageJ (Wayne Rasband, NIH, Bethesda, MA) y se analizaron utilizando el coeficiente de Manders

(111). Además, para conocer la intensidad de esta co-localización se integró una imagen tridimensional. Para clarificar las imágenes se utilizó el programa Adobe Photoshop CS2 (Adobe Systems, Bianza, IT).

### **8.8. Obtención de la muestra sanguínea**

Autorizado el protocolo de investigación B37-11 por el comité de bioética del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias "Ismael Cosío Villegas", se integró el grupo de estudio a partir de pacientes con adenocarcinoma pulmonar hospitalizados en la Unidad de Oncología. Los criterios de inclusión consideraron a pacientes con adenocarcinoma pulmonar sin previo tratamiento (radioterapia o quimioterapia) o de cirugía, con diagnóstico establecido en historia clínica, exploración física, radiografía de tórax, histopatología y clasificación de acuerdo con criterios estándar basados en los datos del tumor, nódulos y metástasis (TNM) (14). El grupo control se integró de personas sanas clínicamente, sin antecedentes de cáncer y edades similares a los pacientes. Posterior a la recepción de los consentimientos firmados, una muestra de sangre periférica fue obtenida de cada uno de los pacientes antes del tratamiento y de las personas sanas (20mL).

### **8.9. Genotipificación de la molécula HLA-A2**

La genotipificación del HLA-A2 se realizó con el kit FasType HLA-DNA Typing System SSP (Bio-Synthesis, Lewisville, TX), basado en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), utilizando 24 cebadores de secuencia específica (SSP), modalidad de baja resolución. Siguiendo las instrucciones del fabricante, se aisló el DNA de los leucocitos de los participantes mediante el kit Blood DNA isolation

(Bio-Synthesis, Lewisville, TX). La concentración total de ADN se cuantificó por espectrofotometría a 260 y 280 nm usando el espectrofotómetro ASP-2680 (ACT-Gen Inc., Piscataway, NJ). Este material biológico se resuspendió en solución amortiguadora de elución (100µL) y se congeló a -20°C hasta su uso.

Para las amplificaciones de PCR, el ADN genómico (1.8µg) fue resuspendido en el volumen de reacción o Master Mix (24µL que contiene KCl a 50 mM, Tris-Cl a 10 mM, MgCl<sub>2</sub> a 1.5 mM y 60 µM de cada dNTP's con pH 8.3) (110). La mezcla fue sometida a 20 ciclos para la desnaturalización (94°C/20 seg), 20 ciclos para el alineamiento o unión del cebador (61°C/50 seg) y 20 ciclos para la extensión o elongación de la cadena (72°C/30 seg) utilizando un termociclador automatizado modelo Gene Amp PCR System 9700 (Applied Biosystems, Foster, CA). Una retención adicional (94°C/20seg) y 10 ciclos fueron adicionados a la etapa de desnaturalización antes del primer ciclo (65°C/1min). Después del último ciclo, la etapa de extensión recibió un ciclo adicional (72°C/5min). Las amplificaciones se lograron utilizando Taq ADN polimerasa recombinante (Gibco-Life Technologies, Rockville, MD).

La integridad de los productos de PCR SSP se evaluó mediante electroforesis en gel de agarosa (2%) y tinción con bromuro de etidio (0.01mg/mL) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO). Cada muestra de ADN se visualizó con luz ultravioleta intensidad dual transiluminador (UVP Inc., Upland, CA) y se analizó con el sistema de documentación de gel de Kodak EDAS-290 (Kodak, Rochester, NY). La migración electroforética de la muestra de ADN se comparó con el control interno de cebadores específicos para el gen de la glicerol 3 fosfato deshidrogenasa humana

(G3PDH) (Bio-Synthesis). Los resultados fueron interpretados siguiendo las instrucciones de las hojas de tipificación de la guía de procedimiento.

#### **8.10. Obtención de linfocitos T CD8<sup>+</sup>**

A partir de la sangre heparinizada (20mL) obtenida de los pacientes o de personas sanas, se obtuvieron PBMCs mediante centrifugación en Ficoll-Hypaque (Axis-Shield PoC As). Las células fueron lavadas y la viabilidad celular (>95%) fue determinada mediante la prueba de exclusión del colorante azul de tripano en cámara de Neubauer.

Para el aislamiento de linfocitos T CD8<sup>+</sup> se utilizó un kit de selección magnética negativa (Miltenyi Biotec, Bergisch, DE). Para esto, las PBMCs ( $40 \times 10^6$ /mL) fueron suspendidas en 160µL de PBS-BSA 0.5% y 2 mM de ácido etilendiamino tetraacético (EDTA) (Sigma-Aldrich, St.Louis, MO) e incubadas con la mezcla de mAbs biotinados contra: CD4, CD15, CD16, CD19, CD34, CD36, CD56, CD123, TCR-γδ y CD235a (40 µL), durante 10 min/4°C. Después de adicionar la solución amortiguadora del kit (120 µL), una segunda incubación se realizó con los mAbs IgG 1 de ratón anti-biotina acoplados a perlas magnéticas y mAb IgG2a de ratón anti-CD14 (80 µL) durante 15 min/4°C y se continuó con un lavado y resuspensión de las células en solución amortiguadora (1mL).

La separación de los linfocitos T CD8<sup>+</sup> inició con la colocación de la columna de separación LS (Miltenyi Biotec, Gladbach, DE) en el campo magnético generado por un imán que la sostiene sobre una placa de metal. Para esto, se hidrató la columna de separación con la solución amortiguadora (3 mL), se adicionó la

suspensión celular en la columna, para que las células marcadas con los anticuerpos conjugados a perlas magnéticas quedaran atrapadas en la columna. El eluyente que contenía a los linfocitos T CD8<sup>+</sup> se colectó y la columna se lavó con solución amortiguadora (1mL). La fracción de linfocitos T CD8<sup>+</sup>, fue resuspendida en medio de cultivo AIM-V (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) suplementado con SFB al 10% inactivado por calor, 100µg/mL de estreptomicina, 100UI/mL de penicilina y 2 mM de *L*-glutamina. La concentración y viabilidad celular (>95%) fue evaluada azul tripano en cámara de Neubauer. Para los ensayos biológicos, la pureza de estos linfocitos debe ser >95%, por lo que una fracción de estos linfocitos ( $2 \times 10^5$ ) fue incubada con los mAbs anti-CD3-PECy5.5 (0.4µg/10µL de PBS), anti-CD4-PE (0.5µg/10µL de PBS) y anti-CD8-FITC (0.8µg/10µL de PBS) siguiendo el método convencional de inmunofluorescencia y análisis mediante citometría de flujo.

### **8.11. Activación policlonal de linfocitos T CD8<sup>+</sup>**

La activación de los linfocitos T CD8<sup>+</sup> aislados mediante selección magnética negativa se realizó con el kit de activación y expansión de linfocitos T (Miltenyi Biotec, Gladbach, DE). Siguiendo las indicaciones del fabricante, se incubaron los mAb biotinados anti-CD2, anti-CD3 y anti-CD28 (25µg/100µL para cada mAb) con las microperlas MACS anti-biotina ( $1 \times 10^8$ /500µL), en PBS-BSA al 0.5% y EDTA al 2mM (200µL) a una temperatura de 4°C y en movimiento. Los linfocitos T CD8<sup>+</sup> ( $4 \times 10^5$ ) se resuspendieron en medio de cultivo AIM-V (200µL), se colocaron en cada pozo de una placa de fondo plano (96 pozos) y se incubaron con los mAb acoplados a las microperlas MACS ( $8 \times 10^5$ /4µL) e IL-2 recombinante humana

(rhIL-2, 20UI/mL) durante 72h a 37°C en atmósfera de CO<sub>2</sub> al 5%. Para la expansión, cada 72h las células se disgregaron y se adicionó nuevamente rhIL-2. Finalmente, se realizó un reestímulo con los mAb acoplados a las microperlas MACS (8X10<sup>5</sup>/4μL) al día 7 de la expansión. La activación y viabilidad celular fue evaluada en una fracción de estos linfocitos (2X10<sup>5</sup>) mediante la incubación con los mAbs anti-CD8-FITC (0.8μg/10μLPBS), anti-CD25-PE (0.5μg/10μLPBS) y 7-AAD (0.1μg/2μL), siguiendo el método convencional de inmunofluorescencia y análisis mediante citometría de flujo.

#### **8.12. Ensayo de activación de linfocitos T CD8<sup>+</sup> específicos de MUC1-8 mer**

La activación de linfocitos T CD8<sup>+</sup> específicos de MUC1-8 mer se evaluó siguiendo el método propuesto por *Jaramillo et al.*, (96). Primero, se conjugaron los mAb biotinados anti-CD2 y anti-CD28 (30μg para cada mAb) con las microperlas MACS anti-biotina (1X10<sup>8</sup>/500μL) en la solución amortiguadora (500μL) a 4°C y en movimiento. Por otra parte, los linfocitos T CD8<sup>+</sup> (4X10<sup>5</sup>) se resuspendieron en medio de cultivo AIM-V (200μL) y se colocaron en cada pozo de una placa de fondo plano (96 pozos). Luego se adicionaron las células T2 fijadas con PFD al 1% (2X10<sup>5</sup>) con las moléculas HLA-A2 estabilizadas por el péptido MUC1-8 mer. También se adicionaron los mAbs anti-CD2 y anti-CD28 conjugados a microperlas MACS (8X10<sup>5</sup>/4μL) más la rhIL-2 (20UI/mL) cada 72 h. El cultivo se llevó a cabo durante 6 días a 37°C en atmósfera de CO<sub>2</sub> al 5%. Los controles negativos del ensayo fueron los linfocitos T CD8<sup>+</sup> cultivados con células T2 que presentan el péptido MUC1-8 mer y los linfocitos T CD8<sup>+</sup> cultivados con los mAb anti-CD2 y anti-CD28 acoplados a microperlas MACS. Como control positivo se utilizaron

linfocitos T CD8<sup>+</sup> activados policlonalmente con mAb anti-CD3, anti-CD2 y anti-CD28. La viabilidad y activación celular fue determinada en una fracción de los linfocitos ( $2 \times 10^5$ ) por medio de la incubación con los mAbs anti-CD8-FITC (0.8µg/10µLPBS), anti-CD25-PE (0.5µg/10µLPBS) y 7-AAD (0.1µg/2µL) siguiendo el método convencional de inmunofluorescencia y análisis por citometría de flujo.

### **8.13. Tinción de linfocitos T CD8<sup>+</sup> con succimidil ester de carboxifluoresceína (CFSE)**

Para evaluar la expansión policlonal, los linfocitos T CD8<sup>+</sup> de los pacientes fueron incubados con CFSE siguiendo el protocolo propuesto por *Quah y Parish* (113). El CFSE (Invitrogen, Camarillo, CA) se preparó a una concentración de 200 nM (10µL de CFSE + 90µL de RPMI 1640). Después de preparar el CFSE, los linfocitos T CD8<sup>+</sup> de pacientes HLA-A2<sup>+</sup> con adenocarcinoma pulmonar ( $4 \times 10^5$ ) fueron resuspendidos en medio de cultivo AIM-V (200µL) y colocados en placa de cultivo de fondo plano (96 pozos) se incubaron con CFSE (6µL) durante 15 min a 37°C en oscuridad y movimiento. Para detener la reacción del CFSE, los linfocitos se lavaron dos veces con medio de cultivo RPMI-1640 suplementado con SFB 10% (1mL). La viabilidad celular se evaluó mediante la prueba de exclusión del colorante azul tripano en cámara de Neubauer. En una fracción de linfocitos T CD8<sup>+</sup> ( $2 \times 10^5$ ) fue evaluada la tinción con CFSE por citometría de flujo.

### **8.14. Expansión policlonal de linfocitos T CD8<sup>+</sup>**

Linfocitos T CD8<sup>+</sup>CFSE<sup>+</sup> ( $4 \times 10^5$ ) se resuspendieron en medio de cultivo AIM-V (200µL) por pozo en placa de fondo plano (96 pozos), siguiendo las instrucciones

del kit de activación y expansión de células T de Miltenyi. Los linfocitos se activaron policlonalmente con los mAb anti-CD2, anti-CD3 y anti-CD28 acoplados a las microperlas MACS ( $8 \times 10^5/4\mu\text{L}$ ) y se incubaron durante 10 días a  $37^\circ\text{C}$  en atmosfera de  $\text{CO}_2$  al 5%. Cada 72h se disgregaron los linfocitos y se adicionó rhIL-2 (20UI/mL), al día 7 se realizó un segundo estímulo con los mAb anti-CD2, anti-CD3 y anti-CD28 acoplados a las microperlas MACS ( $8 \times 10^5/4\mu\text{L}$ ). La expansión policlonal fue observada a través de la disminución o perdida de CFSE y analizada en los días 3, 6 y 10 de incubación, mediante citometría de flujo.

#### **8.15. Ensayo de expansión de linfocitos T $\text{CD8}^+$ específicos de MUC1-8 mer**

Para la activación específica de antígeno, los linfocitos T  $\text{CD8}^+\text{CFSE}^+$  de pacientes  $\text{HLA-A2}^+$  con adenocarcinoma pulmonar ( $2 \times 10^5$ ), se resuspendieron en medio de cultivo AIM-V (200 $\mu\text{L}$ ) por pozo en placa de fondo plano (96 pozos) y se incubaron con células T2 fijadas con PFD al 1% ( $2 \times 10^5$ ) y con moléculas  $\text{HLA-A2}$  estabilizadas por el péptido MUC1-8 mer. Al cultivo se adicionaron los mAbs anti-CD2 y anti-CD28 acoplados a microperlas MACS ( $8 \times 10^5/4\mu\text{L}$ ) más rhIL-2 (20UI/mL); todo esto se incubó durante 10 días a  $37^\circ\text{C}$  en atmósfera de  $\text{CO}_2$  al 5%. Cada 72h se disgregaron los linfocitos y se adicionó rhIL-2 (20UI/mL) y al día 7 se realizó un segundo estímulo con células T2 fijadas con PFD al 1% ( $2 \times 10^5$ ) que expresaban moléculas  $\text{HLA-A2}$  estabilizadas por el péptido MUC1-8 mer. Linfocitos T  $\text{CD8}^+\text{CFSE}^+$  sin estímulo fueron el control negativo y linfocitos T  $\text{CD8}^+$  activados policlonalmente fueron el control positivo. La expansión de los linfocitos T  $\text{CD8}^+$  específicos del péptido MUC1-8 mer fue indicada por la disminución o perdida de CFSE, analizada mediante citometría de flujo en los días 3, 6 y 10 de

incubación.

### **8.16. Análisis estadístico**

El análisis general se realizó mediante el programa STATA<sup>TM10</sup> y la prueba de Shapiro-Wilk para identificar distribuciones de la población. Dado que las variables fueron distribuidas asimétricamente, una prueba de suma de rangos de Wilcoxon (Mann-Whitney) se llevó a cabo para su comparación. Los valores se muestran como mediana (md) y rangos intercuartiles (RIC). Algunos datos mostraron simetría; por lo tanto, se analizaron mediante la prueba “t” de Student y los valores se muestran como media  $\pm$  desviación estándar. Las diferencias entre los grupos se consideraron estadísticamente significativas a  $P < 0.05$ .

## 9. RESULTADOS

### 9.1. Cinética de crecimiento de células T2

En el proceso de propagación de las células T2, se observó que la viabilidad máxima que alcanzan estas células es de 98% a las 72h (Fig. 1-A), mientras que la concentración óptima que mantiene esta viabilidad fue de  $8 \times 10^5$  /mL (figura 1-B). Por lo tanto, las células T2 que fueron cosechadas bajo estas condiciones, se utilizaron en los ensayos biológicos.

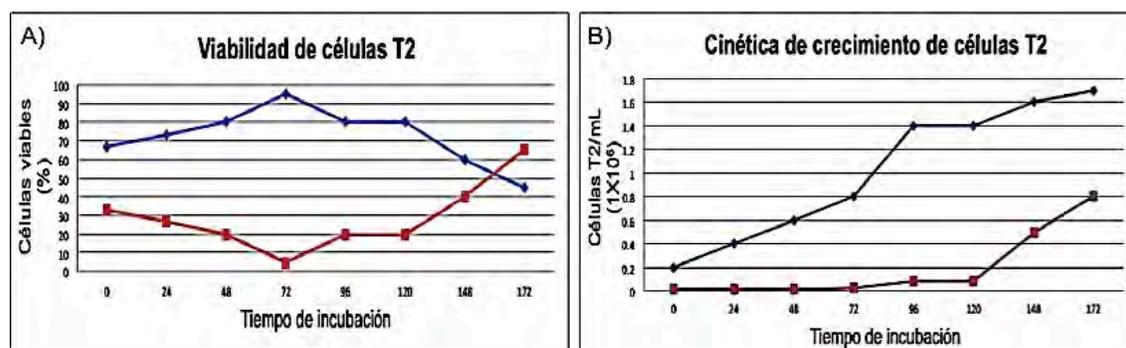
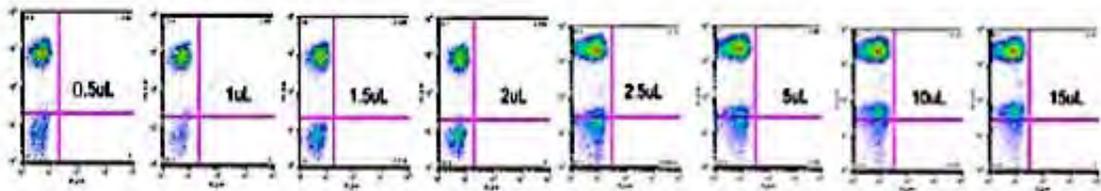


Figura 1. **Cinética de crecimiento de la línea celular T2.** A) Perfil cinético de la viabilidad de las células T2 en relación al tiempo de incubación. B) Perfil cinético de la concentración de células T2 por mL en relación al tiempo de incubación; células vivas (color azul) y células muertas (color rojo), n = 3.

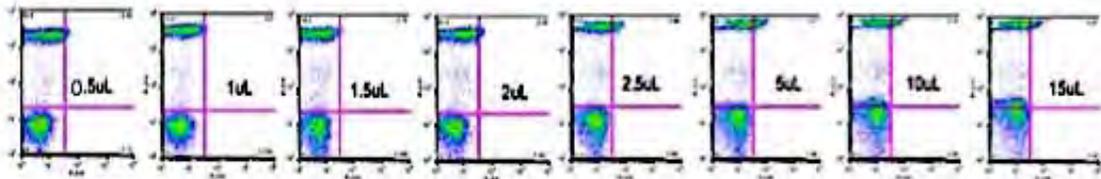
### 9.2. Titulación de los mAb

Respecto a la titulación de los mAb para utilizar en las pruebas biológicas, ésta se realizó mediante citometría de flujo como se muestra en la figura 2, donde se observa que la concentración óptima del mAb anti-CD3-PerCP-Cy5.5 fue de 2 $\mu$ L, para el mAb anti-CD4-PE fue de 2 $\mu$ L, para el mAb anti-CD8-FITC fue de 10 $\mu$ L, para el mAb anti-CD25-PE de 2 $\mu$ L y para el mAb anti-HLA-A2-FITC de 2 $\mu$ L. Con respecto al uso de 7-AAD se utilizaron células incubadas a 57°C por 15 min para inducir el 100% de muerte celular detectada a una concentración de 2 $\mu$ L.

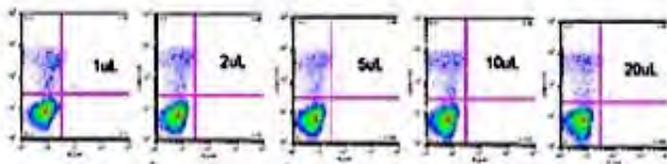
### CD3- PerCP-Cy5.5



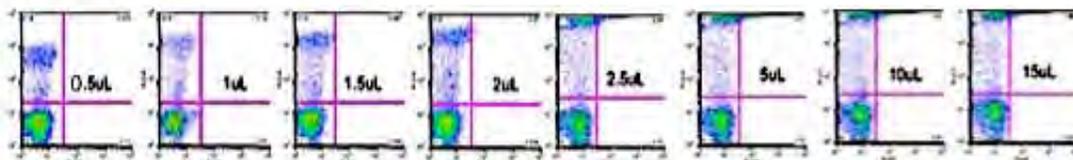
### CD4-PE



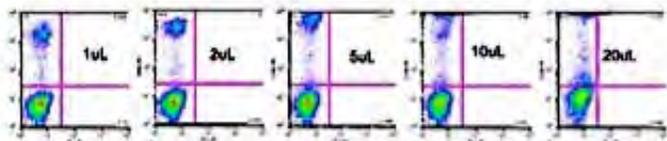
### CD8- FITC



### CD25-PE



### HLA-A2-FITC



### 7-AA-D

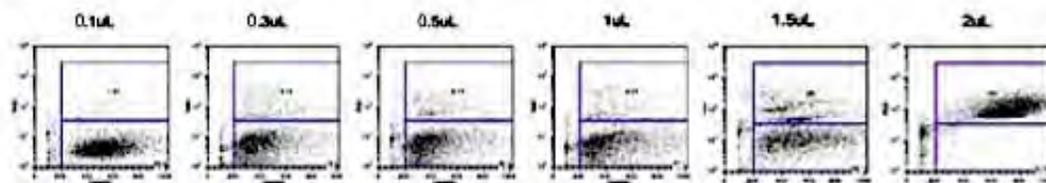


Figura 2. Titulación de mAb en PBMCs analizada mediante citometría de flujo. En las ventanas de análisis trazadas sobre la región para PBMCs, se observa la concentración del mAb utilizada y el porcentaje de células positivas a la fluorescencia; n = 3.

### 9.3. Teóricamente el péptido MUC1-8 mer se une a la molécula HLA-A2

Tres péptidos fueron seleccionados para este estudio; MUC1-8 mer, IVMP1-9-mer y OVA-8-mer. La capacidad de unión teórica de estos péptidos a la molécula HLA-A2 fue confirmada mediante el programa NetMHC 3.4 (108). Este programa predice la afinidad de unión de péptidos de 8-11 aminoácidos a las diferentes moléculas HLA de clase I basándose en el uso de redes neuronales artificiales (ANN), que ocupa las bases de datos de epítomos inmunogénicos, análisis de recursos (IEDB) y de péptidos eluidos SYFPEITHI. Como se muestra en la tabla 2, la interacción de los aminoácidos con la molécula HLA-A2 define un puntaje de afinidad (valor máximo de 1), mientras que la capacidad de unión teórica a la molécula HLA-A2 es calculada en unidad nanomolar (nM), considerando que la capacidad de unión fuerte tiene un límite 50 nM y la capacidad de unión débil tiene un límite de 500 nM (Tabla 2).

Tabla 2. **Capacidad de unión teórica de péptidos a la molécula HLA-A2 evaluada mediante el programa Net MHC 3.4**

| Péptido    | Secuencia | Puntaje | Afinidad (nM) | Capacidad de unión |
|------------|-----------|---------|---------------|--------------------|
| MUC1-8mer  | SAPDTRPA  | 0.073   | 22609         | Media              |
| OVA-8mer   | SIINFEKL  | 0.206   | 5377          | Media              |
| IVMPI-9mer | GILGFVFTL | 0.769   | 5377          | Fuerte             |

[www.cbs.dtu.dk/services/NetMHC](http://www.cbs.dtu.dk/services/NetMHC)

De los péptidos evaluados dos tienen 8 aminoácidos y 1 tiene nueve, tamaño comparable con los péptidos que presenta la molécula HLA-A2 de manera natural. El análisis de unión teórica de los péptidos a la molécula HLA-A2, confirmó que los péptidos tienen diferentes afinidades por dicha molécula. El péptido MUC1-8 mer y el OVA-8 mer presentan valores que indican una capacidad de unión media por esta molécula, mientras que los valores del péptido IVMP-9 indican una capacidad de unión fuerte. Estos péptidos fueron sintetizados en el IBT de la UNAM para evaluar experimentalmente su capacidad de unión a la molécula HLA-A2 y para ser utilizados en los ensayos biológicos.

#### **9.4. MUC1-8 mer, OVA-8 mer, IVMP-9 mer y la $\beta_2m$ incrementan las moléculas HLA-A2 en células T2**

La estabilidad del complejo MHC-péptido es crucial para la inmunogenicidad de un péptido, por lo que la capacidad de unión teórica de los péptidos fue confirmada mediante tres experimentos independientes. Para esto, las células T2 se incubaron con cada uno de los péptidos durante 24 h y se analizó la expresión de la molécula HLA-A2 mediante citometría de flujo utilizando el mAb anti-HLA-A2 acoplado a FITC. Los resultados obtenidos se presentan en la figura 3, donde se observa que el incremento de moléculas HLA-A2 en las células T2 es dependiente de la concentración de péptido; ya que al utilizar 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  del péptido MUC1-8 mer se identificó que el promedio de las células T2 que incrementaron la expresión de moléculas HLA-A2 fue de 3%, el cual alcanzó el 33.6% al utilizar 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ; con 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  del péptido OVA-8 mer, el 5% de las células T2 incrementaron sus moléculas HLA-A2, lo cual alcanzó el 36.6% con 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ; mientras que 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$

del péptido IVMP1-9-mer indujo que el 6% de células T2 incrementaran sus moléculas HLA-A2 alcanzando un máximo de 63.1% con 100µg/mL. Para todos los péptidos el punto de saturación fue la concentración de 200µg/mL, con esta concentración los promedios de células T2 que incrementaron moléculas HLA-A2 fueron 33.6%, 36.6% y 63.1% con MUC1-8 mer, OVA-8 mer y IVMP1-9 mer, respectivamente.

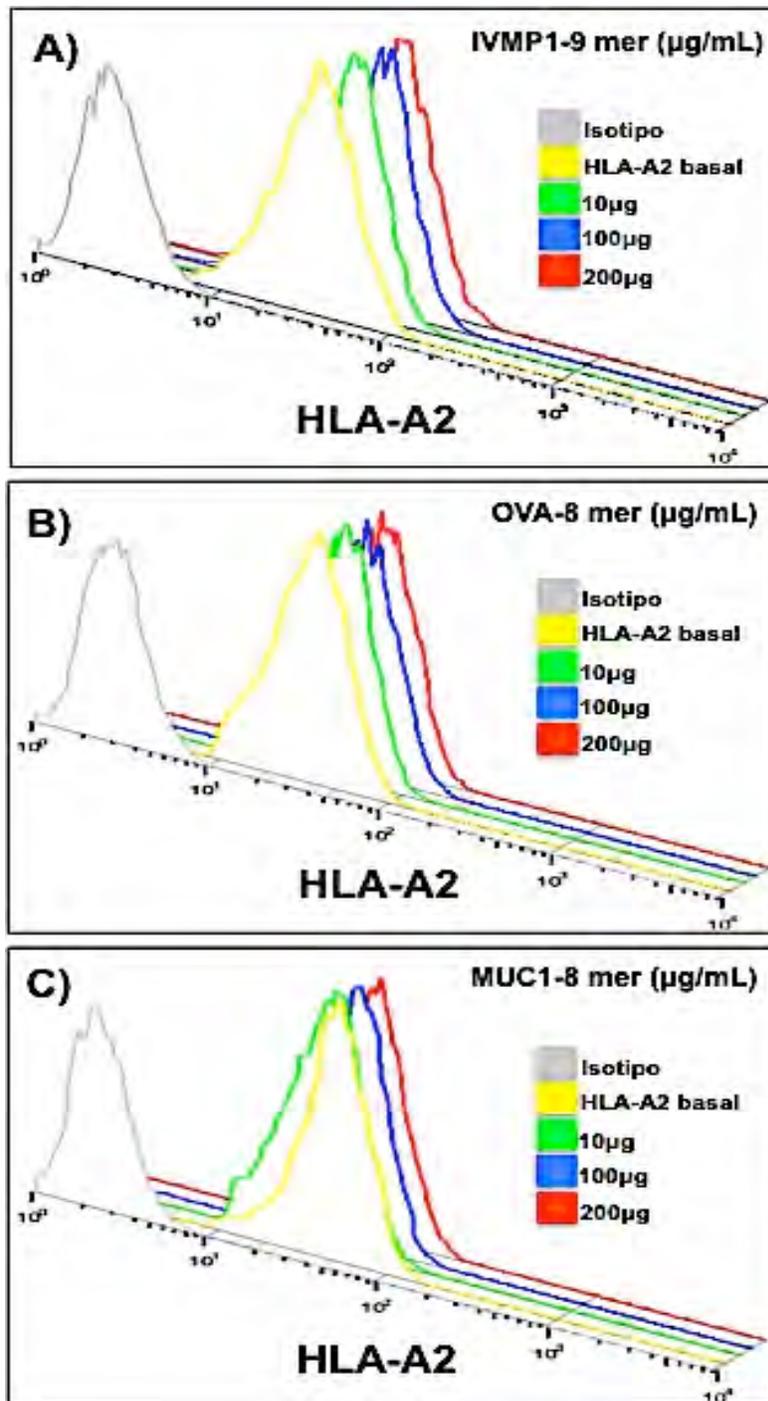


Figura 3. **Incremento de moléculas HLA-A2 en las células T2 dependiente de la concentración de péptido.** Las células T2 cultivadas 24 h con cada uno de los péptidos, fueron analizadas mediante citometría de flujo después de incubar con el mAb anti-HLA-A2-FITC. Los histogramas muestran en el eje de las X, la fluorescencia del control de isotipo IgG2b,k (gris); la expresión basal de la molécula HLA-A2 (amarillo) y el incremento de moléculas HLA-A2 por los péptidos. A) IVMP1-9-mer, B) OVA-8-mer y C) MUC1-8 mer utilizando la concentración de 10 (verde), 100 (azul) y 200 (rojo)  $\mu\text{g/mL}$ ,  $n=3$ .

Los resultados de los tres ensayos independientes de estabilización de la molécula HLA-A2 con  $\beta_2m$ , demuestran que el incremento de moléculas HLA-A2 también es dependiente de la concentración de  $\beta_2m$  utilizada. En la figura 4 se observa que el promedio de las células T2 que incrementaron moléculas HLA-A2 con  $1\mu\text{g/mL}$  fue de 12.5%, el cual incrementó a 89.7% con  $20\mu\text{g/mL}$  y 89.5% con  $40\mu\text{g/mL}$ ; considerada el punto de saturación.

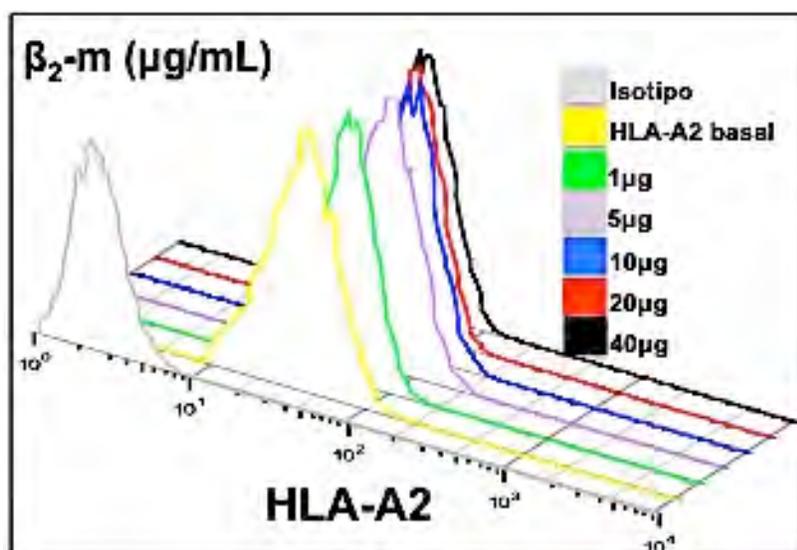


Figura 4. **Incremento de moléculas HLA-A2 en las células T2 dependiente de la concentración de  $\beta_2m$ .** Las células T2 cultivadas por 24h con  $\beta_2m$ , fueron incubadas con el mAb anti-HLA-A2-FITC y analizadas mediante citometría de flujo. Los histogramas muestran en el eje de las X, la fluorescencia del control de isotipo IgG2b,k (gris); la expresión basal de la molécula HLA-A2 (amarillo) y el incremento de molécula HLA-A2 por la  $\beta_2m$  utilizando la concentración de 1 (verde), 5 (lila), 10 (azul), 20 (rojo) y 40 (negro)  $\mu\text{g/mL}$ ; n = 3.

Utilizando la concentración óptima de  $100\mu\text{g/mL}$  de cada péptido y  $20\mu\text{g/mL}$  de  $\beta_2m$ , se realizaron tres ensayos independientes de estabilización de las moléculas HLA-A2. La inmunofluorescencia se realizó con el mAb anti-HLA-A2-FITC y se analizó la expresión de las moléculas HLA-A2 mediante citometría de flujo. Bajo estas condiciones, en los histogramas de la figura 5 se observa que el promedio

de las células T2 que incrementaron moléculas HLA-A2 fue de 81.8, 89.8 y 90.8% con el péptido MUC1-8 mer, OVA-8 mer e IVMP1-9 mer, respectivamente. Además, se observa que la intensidad de fluorescencia del mAb que detecta a la molécula HLA-A2 es diferente para cada péptido, lo que refleja la capacidad de unión teórica de cada uno de los péptidos a la molécula HLA-A2, resultado que es consistente con lo reportado por el programa NetMHC versión 3.4.

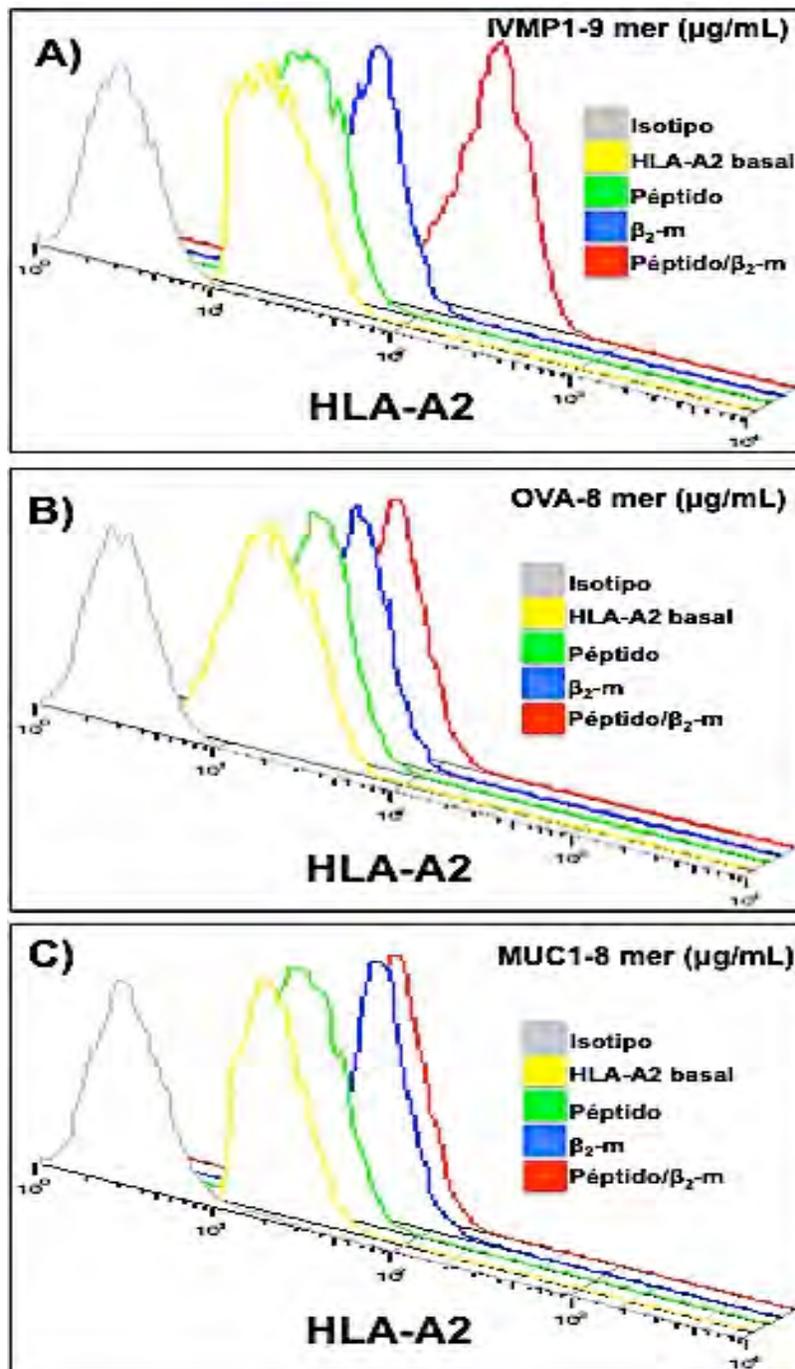


Figura 5. Incremento de moléculas HLA-A2 en las células T2 dependiente de péptido y  $\beta_2m$ . Las células T2 fueron cultivadas por 24h con 100  $\mu\text{g/mL}$  de los siguientes péptidos: A) IVMP1-9-mer, B) OVA-8-mer y C) MUC1-8 mer más 20 $\mu\text{g/mL}$  de  $\beta_2m$ . Luego, las células T2 fueron incubadas con el mAb anti-HLA-A2-FITC y la expresión de HLA-A2 analizada mediante citometría de flujo. Los histogramas muestran en el eje de las X, la fluorescencia del control de isotipo IgG2b,k (gris), la expresión basal de la molécula HLA-A2 (amarillo) y el incremento de molécula HLA-A2 por cada uno de los péptidos (verde), por la  $\beta_2m$  (azul) y por cada péptido más  $\beta_2m$  (rojo); n = 3.

### **9.5. El incremento de moléculas HLA-A2 en células T2 es dependiente de la concentración de péptido MUC1-8 mer**

Para analizar la estabilización de moléculas HLA-A2 con el péptido MUC1-8 mer se realizaron tres experimentos independientes utilizando las condiciones óptimas. La inmunofluorescencia se realizó con el mAb anti-HLA-A2-FITC y el análisis de la expresión de HLA-A2 fue por medio de citometría de flujo. Los histogramas de la figura 6 representan la estabilización de moléculas HLA-A2 dependiente de la concentración del péptido MUC1-8 mer. En el análisis, la IMF de estas moléculas mostró que la expresión basal tiene un valor de  $31,6 \pm 12,7$ ; al incubarlas con  $1\mu\text{g/mL}$  de péptido MUC1-8 mer el valor aumentó a  $40,3 \pm 18,9$ ; mientras que al utilizar  $10\mu\text{g/mL}$ , el valor fue de  $77,1 \pm 32,3$  y finalmente con  $100\mu\text{g/mL}$  incrementó a  $123 \pm 52$ , lo cual indica un incremento de moléculas HLA-A2 de 3.8 veces más en comparación con la expresión basal, en el 99.8% de las células T2. Estos resultados indican la unión del péptido MUC1-8 mer a la molécula HLA-A2.

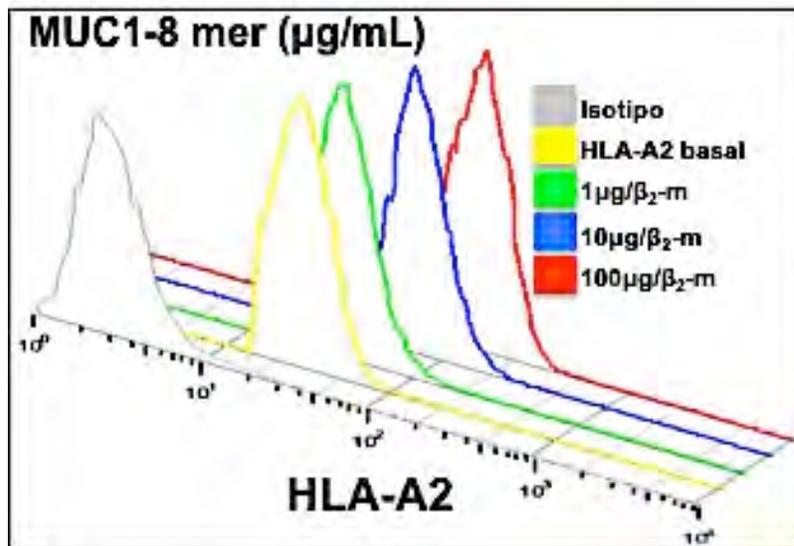
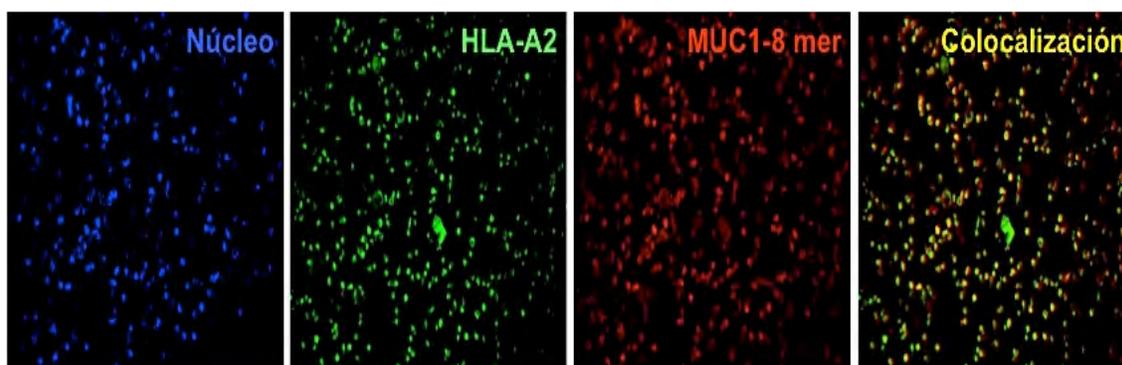


Figura 6. **Incremento de moléculas HLA-A2 en las células T2 dependiente del péptido MUC1-8 mer y  $\beta_2m$ .** Las células T2 fueron cultivadas por 24h con péptido MUC1-8 mer (1-100 $\mu$ g/mL) en presencia  $\beta_2m$  (20 $\mu$ g/mL). Luego, se incubaron con el mAb anti-HLA-A2-FITC y se analizaron mediante citometría de flujo. Los histogramas muestran en el eje de las X, la fluorescencia del control de isotipo IgG2b,k (gris); la expresión basal de la molécula HLA-A2 (amarillo) y el incremento de la molécula HLA-A2 por el péptido MUC1-8 mer utilizando la concentración de 1 (verde),10 (azul) y 100 (rojo)  $\mu$ g/mL en presencia de  $\beta_2m$  (20 $\mu$ g/mL); n = 3.

### 9.6. La molécula HLA-A2 con el péptido MUC1-8 mer co-localizan en la membrana de células T2

Considerando que identificar la presencia de complejos MHC-péptido en la membrana de la aAPC es el predictor más fiable de su eficacia *in vitro* o *in vivo*. Nosotros utilizamos la concentración óptima de péptido MUC1-8 mer y de la  $\beta_2m$  para estabilizar moléculas HLA-A2 en la superficie de las células T2. También, realizamos la detección de las moléculas HLA-A2 con el mAb anti-HLA-A2-FITC y del péptido MUC1-8 mer con los mAbs anti-CA27-29 y anti-IgG de ratón-Alexa-594. Luego, con el uso de un microscopio confocal, registramos las imágenes con fluorescencia proveniente de los mAb para indentificar su distribución, co-localización e intensidad. La figura 7 y 8 representan los resultados obtenidos de

tres experimentos independientes, en la que se observa células T2 con el núcleo teñido con DAPI (canal azul), las cuales son positivas a la expresión de la molécula HLA-A2 (canal verde) y a la presencia del péptido MUC1-8 mer (canal rojo). El análisis de las emisiones de fluorescencia de los mAbs que reconocen la molécula HLA-A2 y el péptido MUC1-8 mer muestra que colocalizan en la membrana de todas las células T2 (color amarillo).



**Figura 7. Expresión de la molécula HLA-A2, presencia del péptido MUC1-8 mer y su colocalización en las células T2 (10X).** Las células T2 ( $2 \times 10^5$ ) se cultivaron con péptido MUC1-8 mer ( $100 \mu\text{g}/\text{mL}$ ) y  $\beta_2\text{m}$  ( $20 \mu\text{g}/\text{mL}$ ) en portaobjetos con microcámaras durante 24h a  $37^\circ\text{C}$  en atmósfera de  $\text{CO}_2$  al 5%. Para la inmunofluorescencia indirecta del péptido MUC1-8 mer las células se incubaron con el mAb anti-CA 27-29 ( $1 \mu\text{g}/500 \mu\text{LPBS}$ ) durante 30 min a  $4^\circ\text{C}$  y posteriormente con el anticuerpo anti-IgG de ratón-Alexa Fluor 594 ( $0.1 \mu\text{g}/500 \mu\text{L}$  de PBS) durante 2h a  $4^\circ\text{C}$ . La inmunofluorescencia directa de la molécula HLA-A2 se realizó con el mAb anti-HLA-A2-FITC ( $0.8 \mu\text{g}/10 \mu\text{LPBS}$ ). Después, las células se fijaron con PFD al 1% y se cubrieron con medio de montaje Vectashield con DAPI. Las imágenes se adquirieron con un microscopio confocal y se realizó el análisis de colocalización con el programa ImageJ. En la imagen se observan células T2 con núcleos teñidos con DAPI en color azul, expresión de la molécula HLA-A2 en color verde, la presencia del péptido MUC1-8 mer en color rojo y la colocalización de las emisiones de fluorescencia en color amarillo;  $n = 3$ .

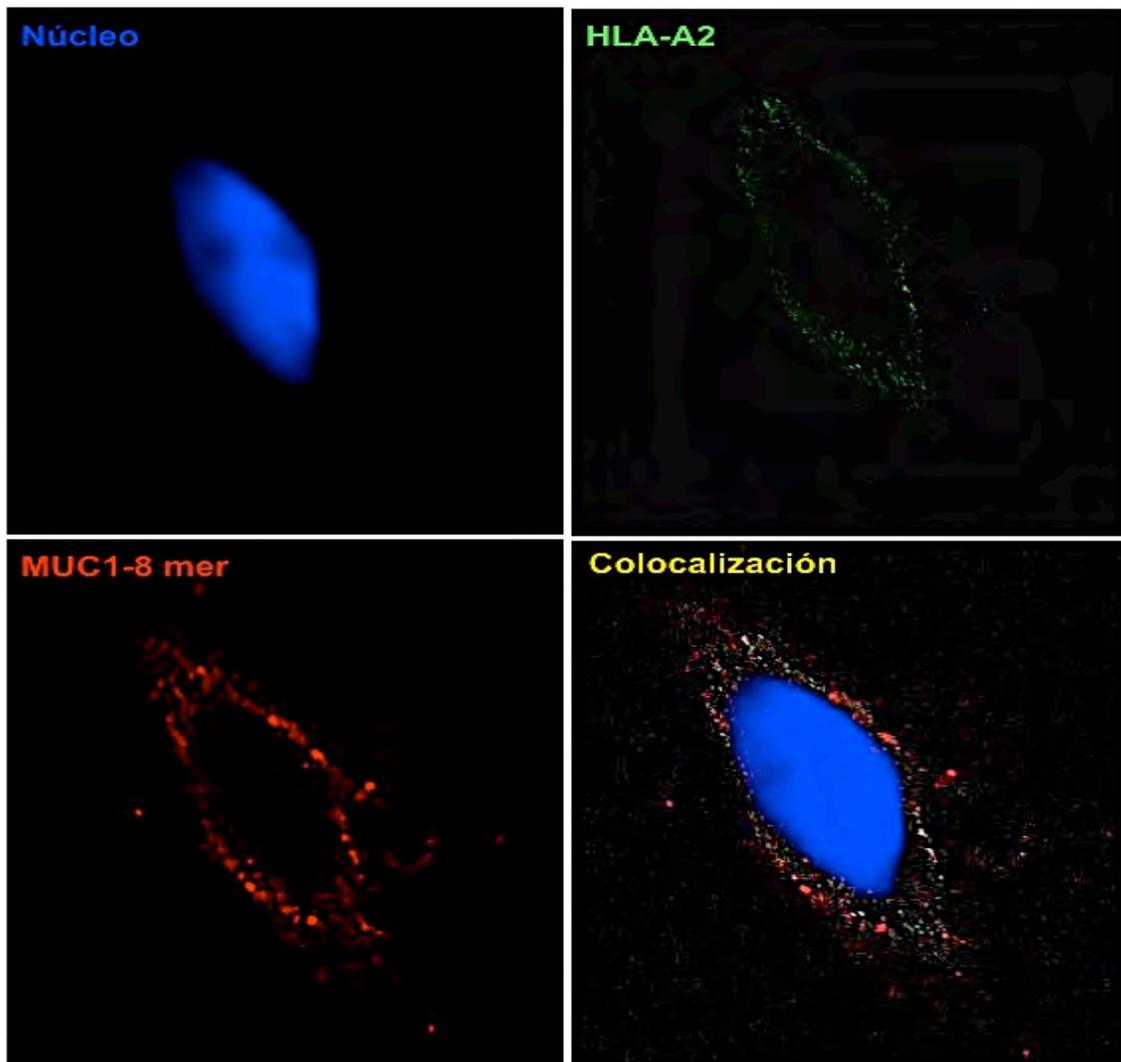


Figura 8. **Colocalización de la molécula HLA-A2 con el péptido MUC1-8 mer en la membrana de las células T2.** Después de estabilizar las moléculas HLA-A2 con el péptido MUC1-8 mer en la membrana de las células T2, estas células fueron incubadas con los mAb anti-CA 27-29, posteriormente con el anticuerpo de cabra anti-IgG de ratón conjugado con Alexa 594 y finalmente con el anti-HLA-A2-FITC para el análisis de microscopía confocal. Los resultados demuestran la tinción del núcleo de la célula T2 en color azul (A); la expresión de la moléculas HLA-A2 en color verde (B); la presencia del péptido MUC1-8 mer en la membrana celular en color rojo (C); y la co-localización de las emisiones de fluorescencia de los mAb que identifican a la molécula HLA-A2 y al péptido MUC1-8 mer en color amarillo (D).

Como lo muestra la figura 9, al evaluar el coeficiente Manders en tres células T2 por separado, las zonas de colocalización mostraron valores significativos que van

de 0.4 a 1 a través de toda la membrana de la célula T2, siendo los valores de 1 más representativos en los polos de estas células.

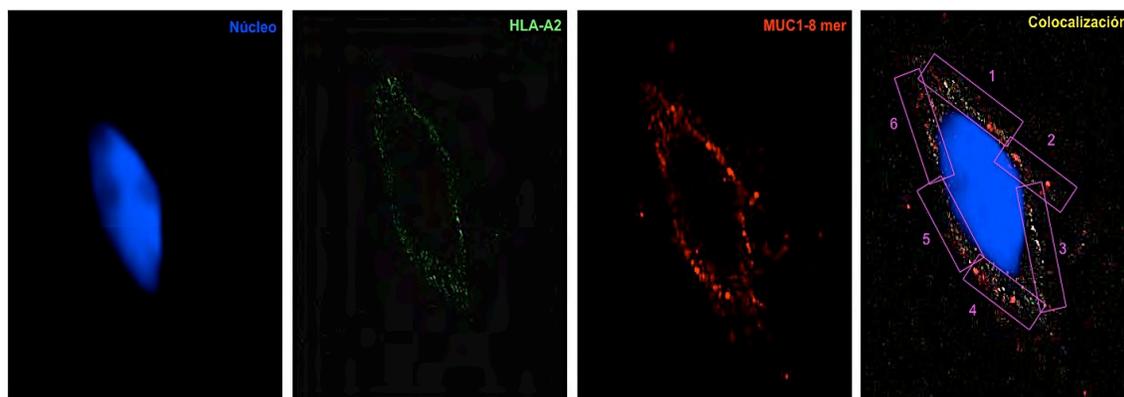


Figura 9. **Coefficiente Manders identificado en la membrana de la célula T2.** En el primer panel de izquierda a derecha se observa la célula T2 con el núcleo teñido con DAPI (color azul); en el segundo panel se observan moléculas HLA-A2 expresadas en la membrana celular (canal verde). En el tercero, la presencia del péptido MUC1-8 en la membrana de las células T2 (color rojo) y en el último, la colocalización de las intensidades de fluorescencia de los mAbs que reconocen a las moléculas HLA-A2 y al péptido MUC1-8 mer (color amarillo), así como la regiones de estudio seleccionadas para evaluar el coeficiente Manders (magenta), n = 3.

Respecto al análisis de distribución de las intensidades de fluorescencia de los mAb y su co-localización realizado en tres células T2 de manera independiente, la figura 10 muestra 8 cortes bidimensionales integrados en una sola imagen tridimensional, las cuales confirman que la expresión de la molécula HLA-A2 y la presencia del péptido MUC1-8 mer colocalizan en toda la membrana celular, pero con mayor intensidad en los polos de las células T2. En conjunto, estos resultados sugieren la formación de complejos HLA-A2-péptido MUC1-8 mer- $\beta_2$ -m en la membrana de las células T2, los cuales serán utilizados para activar linfocitos T CD8<sup>+</sup> específicos del péptido MUC1-8 restringidos a la molécula HLA-A2 tanto en pacientes con adenocarcinoma pulmonar como de personas sanas.

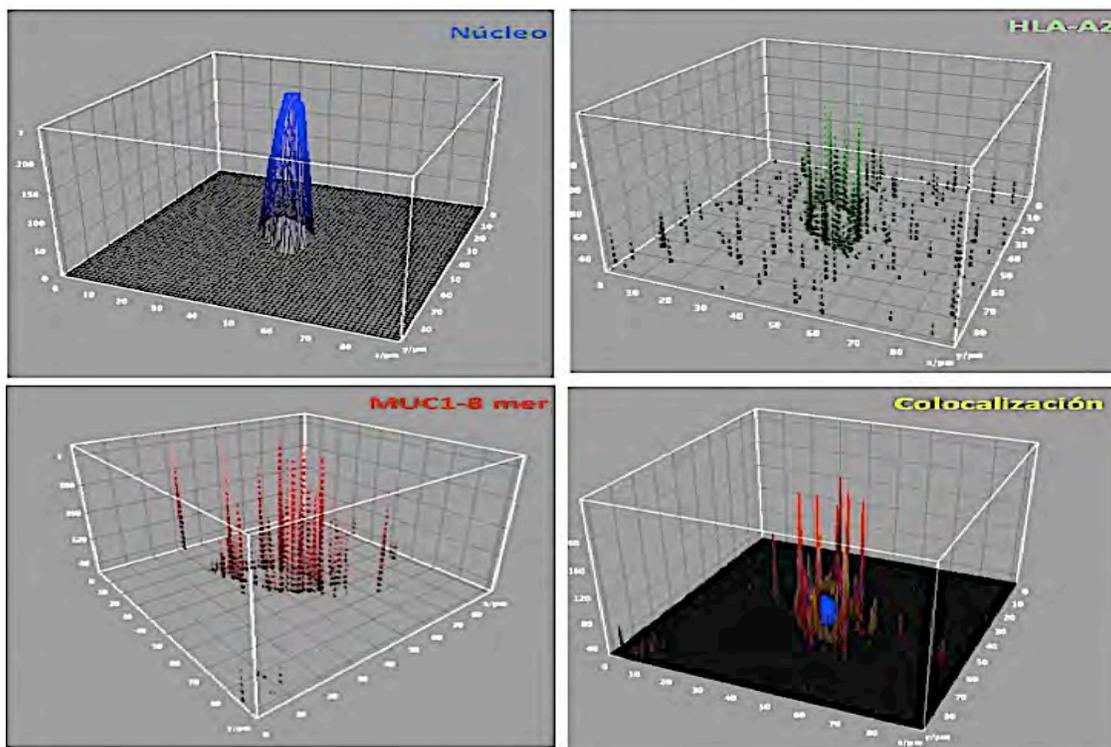


Figura 10. **Distribución, intensidad y colocalización de la fluorescencia proveniente de los mAb que reconocen a la molécula HLA-A2 y al péptido MUC1-8 mer en la membrana de la célula T2.** Cortes bidimensionales integrados en una sola imagen 3D que representan la intensidad de fluorescencia del núcleo en el canal azul (teñido con DAPI); la expresión de la molécula HLA-A2 en el canal verde (mAb anti HLA-A2-FITC), la presencia del péptido MUC1-8 mer en el canal color rojo (mAb anti-IgG1 de ratón-Alexa 594 y mAb anti-CA27-29) y colocalización de estos fluorocromos (color amarillo), n=3.

### 9.7. Características clínicas del grupo de estudio

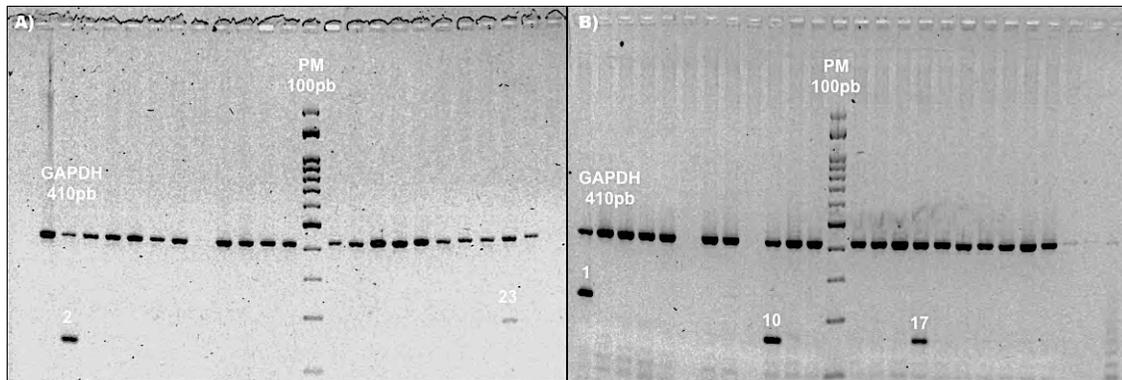
Considerando los criterios de inclusión, los pacientes con adenocarcinoma pulmonar hospitalizados en la unidad de oncología del INER y personas sanas de la unidad de investigación de la misma Institución fueron seleccionados para este estudio. La edad media del grupo de pacientes con adenocarcinoma pulmonar fue de  $63,67 \pm 10,7$  años (rango: 51-74 años); entre estos, 4 fueron hombres (44%) y 5 fueron mujeres (56%). Cuatro de los pacientes tenían metástasis; 6 de los 9 pacientes totales mostraron estadio tumoral IV, mientras que los 3 restantes estadio tumoral III (Tabla 3). En el grupo de personas sanas, la edad media fue de

59,1 ± 9.3 años (rango: 34-64 años), 6 mujeres y 4 hombres. Mediante la genotipificación de la molécula HLA-A2, se determinó que siete pacientes son HLA-A2<sup>+</sup> y dos pacientes son HLA-A2<sup>-</sup>; así como cinco personas sanas son HLA-A2<sup>+</sup> y cinco personas sanas son HLA-A2<sup>-</sup> (Figura 11).

**Tabla 3. Datos generales de los pacientes con adenocarcinoma pulmonar y de personas sanas.**

| Participantes | Genero/Edad | HLA-A2 | Estadio/Clasificación | Histopatología MUC1 |
|---------------|-------------|--------|-----------------------|---------------------|
| CS1           | H/38        | -      | -                     | -                   |
| CS2           | H/59        | -      | -                     | -                   |
| CS3           | M/34        | -      | -                     | -                   |
| CS4           | M/62        | -      | -                     | -                   |
| CS 5          | H/59        | -      | -                     | -                   |
| CS6           | M/62        | +      | -                     | -                   |
| CS7           | M/59        | +      | -                     | -                   |
| CS8           | H/64        | +      | -                     | -                   |
| CS9           | H/51        | +      | -                     | -                   |
| CS10          | H/63        | +      | -                     | -                   |
| P1            | M/74        | -      | T4N3M3                | +                   |
| P2            | H/53        | -      | T4N3M0                | +                   |
| P3            | M/62        | +      | T4N3M0                | +                   |
| P4            | M/74        | +      | T4N3M1                | +                   |
| P5            | H/53        | +      | T4N2M0                | +                   |

CS= Control sano; P= Pacientes; H= Hombre; M= Mujer; TNM= Tumor, Nódulo, Metastasis; + Estudio histopatológico que indica la sobreexpresión de MUC1.



**Figura 11. Genotipificación de la molécula HLA-A2.** A) Gel de agarosa con banda en el carril 2 (HLA-A\*0201) y 23 (HLA-A\*0201), correspondiente a un individuo HLA-A2<sup>+</sup> homocigoto. B) Gel de agarosa con banda en el carril 1 y 10 (HLA-A\*01) y 17 (HLA-A\*29), correspondiente a individuo HLA-A2<sup>-</sup>. Como control positivo se utilizó gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH), la cual presentó 410 pares de bases (pb).

Obtenido el consentimiento informado de cada uno de los participantes, se obtuvo la muestra sanguínea para aislar los linfocitos T CD8<sup>+</sup> y realizar los ensayos subsecuentes.

### 9.8. Pureza de linfocitos T CD8<sup>+</sup>

Los linfocitos T CD8<sup>+</sup> de pacientes con adenocarcinoma pulmonar y personas sanas que fueron obtenidos mediante selección magnética negativa, fueron analizados mediante una gráfica de tamaño contra granularidad (figura 12-A), delimitándola como región 1 (R1). Las células de la R1 se analizaron en relación a la autofluorescencia y a la reacción inespecífica de mAb del mismo isotipo utilizados como controles negativos de las moléculas CD3 y CD8 (Fig. 12-B). Para evaluar la pureza de los linfocitos T CD8<sup>+</sup>, una fracción de esta población fue incubada con los mAbs anti-CD3, anti-CD4 y anti-CD8. La Fig.12-C muestra tres gráficas de las células que corresponden a linfocitos T CD3<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup> y CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> que presentaron una pureza >95% en los tres experimentos independientes.

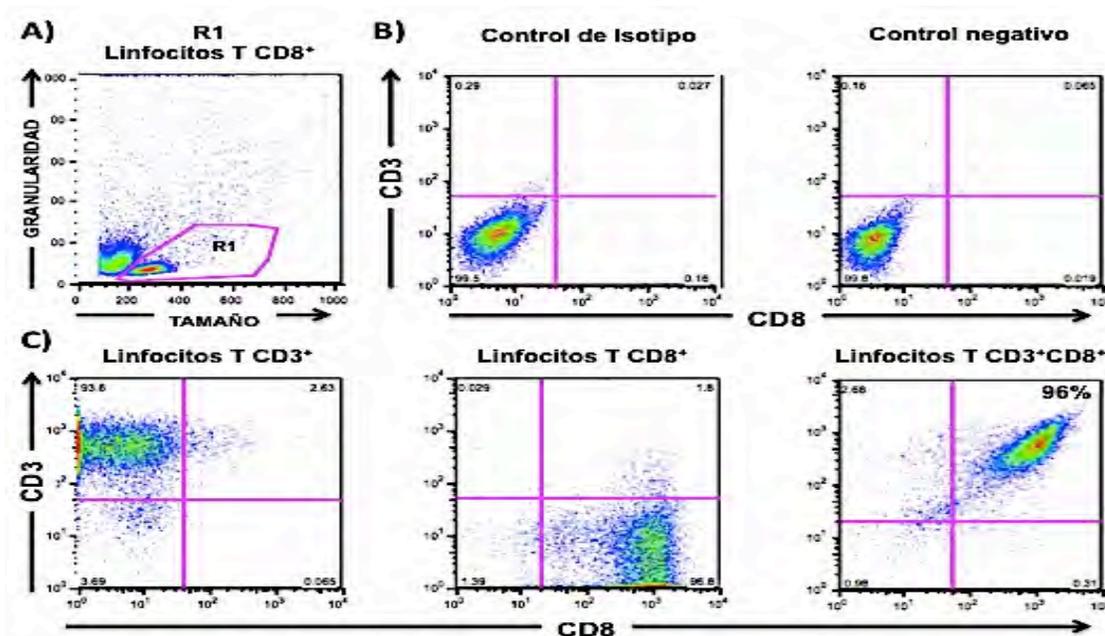


Figura 12. **Pureza de linfocitos T CD8<sup>+</sup> >95%**. Linfocitos T CD8<sup>+</sup> de pacientes y de personas sanas fueron obtenidos mediante selección magnética negativa, su pureza fue analizada mediante citometría de flujo. A) Gráfica correspondiente al tamaño contra granularidad celular para obtener la región 1 (R1), la cual fue analizada en: B) Gráfica de fluorescencias (FL-3 contra FL-1) que muestra el control negativo y el control de isotipo; C) gráficas de FL3 vs FL1, que muestra linfocitos T CD3<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup> y CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>, n=3.

Conocida la pureza de los linfocitos T CD8<sup>+</sup> obtenidos de los pacientes y personas sanas, se continuó con la estandarización de la activación policlonal de estos linfocitos para ser utilizados como control positivo de activación.

### 9.9. Cinética de linfocitos T CD8<sup>+</sup> activados policlionalmente

Siguiendo las instrucciones del kit de activación y expansión de células T de Miltenyi, se realizaron tres ensayos de activación policlonal de linfocitos T CD8<sup>+</sup> con diferentes concentraciones de mAb anti-CD2, anti-CD3 y anti-CD28 acoplados a las microperlas MACS; y para su expansión se adicionó rhIL-2 cada 72h. La activación de los linfocitos fue evaluada mediante el fenotipo de activación y de viabilidad CD8<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>7AA-D<sup>-</sup>, identificado con inmunofluorescencia y análisis por

citometría de flujo, al día 3 y 6 del cultivo. La figura 13-C presenta el fenotipo de activación basal de los linfocitos sin estímulo. Los linfocitos activados proliferaron en relación al incremento de la concentración de mAbs, ya que con 0.15µg tuvieron un incremento promedio de 67.2%, con 0.22µg de 81.8%, con 0.3µg de 84.8% y con 0.5µg de 82.8%. La viabilidad de esta población fue evaluada mediante 7AA-D. Sin embargo, los linfocitos estimulados por tres días pierden viabilidad en relación al incremento de la concentración de mAbs anti-CD3, anti-CD2 y anti-CD28, ya que con 0.15µg de estos mAbs, el promedio de linfocitos no viables fue de 13%, con 0.22µg se incrementó a 19%, con 0.3µg alcanzó un 20.8% y con 0.5µg a 24.1% (figura 13-E). Aun así en el día seis de cultivo, sólo los linfocitos que fueron incubados con 0.3µg de los mAbs anti-CD3, anti-CD2 y anti-CD28 presentaron en promedio 96.4% de linfocitos con el fenotipo de activación con viabilidad del 98%, siendo ésta la condición óptima para la activación policlonal.

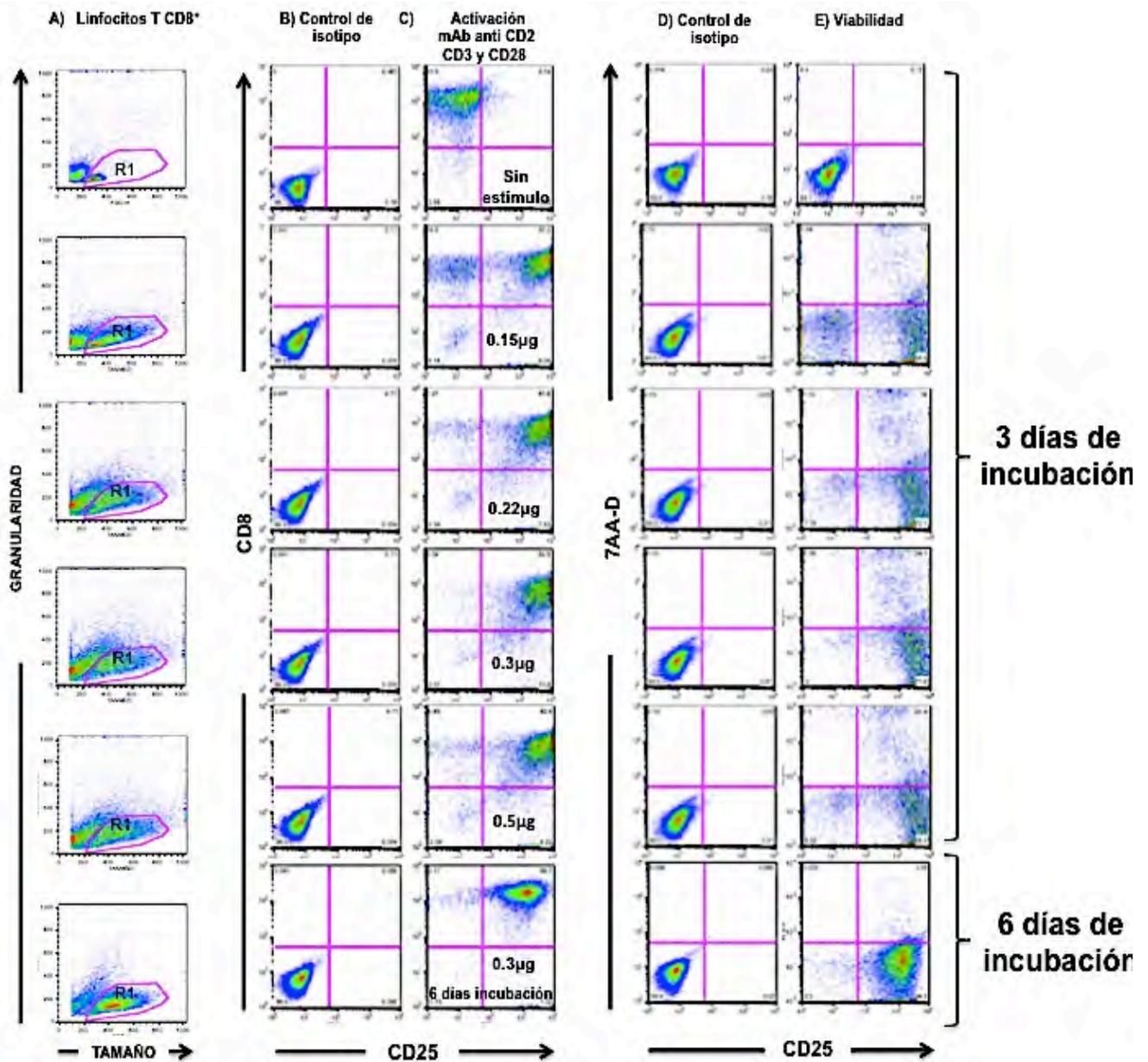


Figura 13. Proliferación de linfocitos T  $CD8^+CD25^+7AA-D^-$  estimulada con los mAb anti-CD2, anti-CD3 y anti-CD28. Los linfocitos T  $CD8^+$  de personas sanas fueron estimulados con diferentes concentraciones de mAb anti-CD2, anti-CD3 y anti-CD28 acoplados a las microperlas MACS durante 3 y 6 días para analizar el fenotipo de activación y viabilidad  $CD8^+CD25^+7AAD^-$  por citometría de flujo. A) Gráficas de tamaño contra granularidad celular para obtener la región 1 (R1), la cual fue analizada en: B) gráficas de fluorescencias (FL-1 contra FL-2) que muestra controles de isotipo de CD8 y CD25; C) gráficas de FL1 vs FL2, mostrando la proliferación de linfocitos T  $CD8^+CD25^+$  estimulada con diferentes concentraciones de los mAbs anti-CD2, anti-CD3 y anti-CD28 acoplados a las microperlas MACS; D) graficas de fluorescencias (FL-2 contra FL-3) que muestra controles de isotipo para CD25 y 7AA-D; y E) gráficas de FL2 vs FL3, mostrando la viabilidad de los linfocitos  $CD25^+7AA-D^-$ . SE= Sin Estimulo; n=3.

### **9.10. Linfocitos T CD8<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>7AA-D<sup>-</sup> de personas sanas HLA-A2<sup>+</sup> se incrementan al ser estimulados con nuestro sistema de activación**

Para analizar la activación *in vitro* de los linfocitos T CD8<sup>+</sup> específicos del péptido MUC1-8 mer, se obtuvieron linfocitos T CD8<sup>+</sup> mediante selección magnética negativa de 5 personas sanas HLA-A2<sup>+</sup> y de 5 personas sanas HLA-A2<sup>-</sup>. Nuestro sistema de activación consistió en cultivar: a) linfocitos T CD8<sup>+</sup> más células T2 que presentan el péptido MUC1-8 mer y mAbs coestimuladores anti-CD2 y anti-CD28 acoplados a microperlas MACS; b) linfocitos T CD8<sup>+</sup> más mAb anti-CD2 y anti-CD28 acoplados a microperlas MACS; c) linfocitos T CD8<sup>+</sup> más células T2 que presentan el péptido MUC1-8 mer (complejo HLA-A2/péptido MUC1-8 mer) sin anticuerpos coestimuladores; y d) linfocitos T CD8<sup>+</sup> activados con mAbs anti-CD2, anti-CD3 y anti-CD28 acoplados a microperlas MACS (kit de activación policlonal de linfocitos T). Todos los cultivos se realizaron adicionando rhlL-2 cada tercer día durante 6 días. La figura 14 representa los resultados de una persona sana HLA-A2<sup>+</sup> y la figura 15 los de una persona sana HLA-A2<sup>-</sup>. El fenotipo de activación CD8<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>7AA-D<sup>-</sup> se identificó con inmunofluorescencia por citometría de flujo. El incremento de linfocitos con el fenotipo de activación generado en cada condición fue analizado a través de la prueba bioestadística de WILCOXON, siendo las variables, el porcentaje de linfocitos con el fenotipo de activación basal (sin estímulo) y el incremento de esta población después del estímulo.

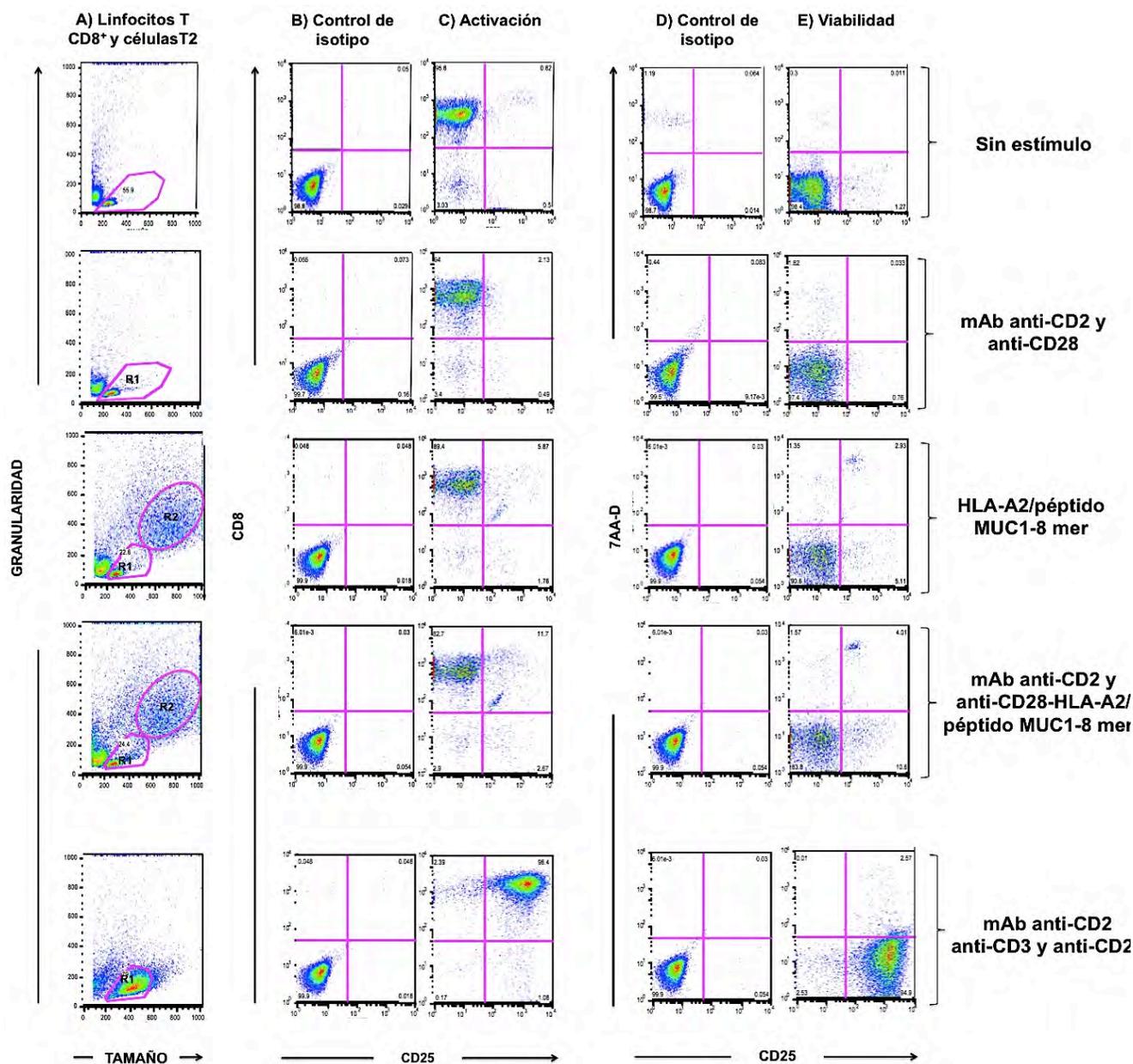


Figura 14. Incremento de linfocitos T CD8<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>7AA-D<sup>-</sup> de persona sana HLA-A2<sup>+</sup> inducida con diferentes estímulos. Los linfocitos T CD8<sup>+</sup> de donador sano HLA-A2<sup>+</sup> fueron incubados durante 6 días bajo diferentes condiciones e IL-2 (20U/ml) cada 72h y el fenotipo de activación y viabilidad CD8<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>7AA-D<sup>-</sup> evaluados por citometría de flujo. En la figura se muestra la región de linfocitos en proliferación de acuerdo a su tamaño y granulabilidad. (A) Control de isotipo para CD8 y CD25. (B) Porcentaje de linfocitos T CD8<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> sin estímulo (0.8%), estimulados con mAb anti-CD2 y anti-CD28 (2.1%), cultivados con células T2 que presentan el péptido MUC1-8 mer (5.8%), cultivados con el complejo HLA-A2-MUC1-8 mer y los mAb anti-CD2 y anti-CD28 (11.7%) y estimulados con los mAbs anti-CD2, anti-CD3 y anti-CD28 (96.4%). La viabilidad de los linfocitos T CD8<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> en todas las condiciones de cultivo fue >98%; n = 3.

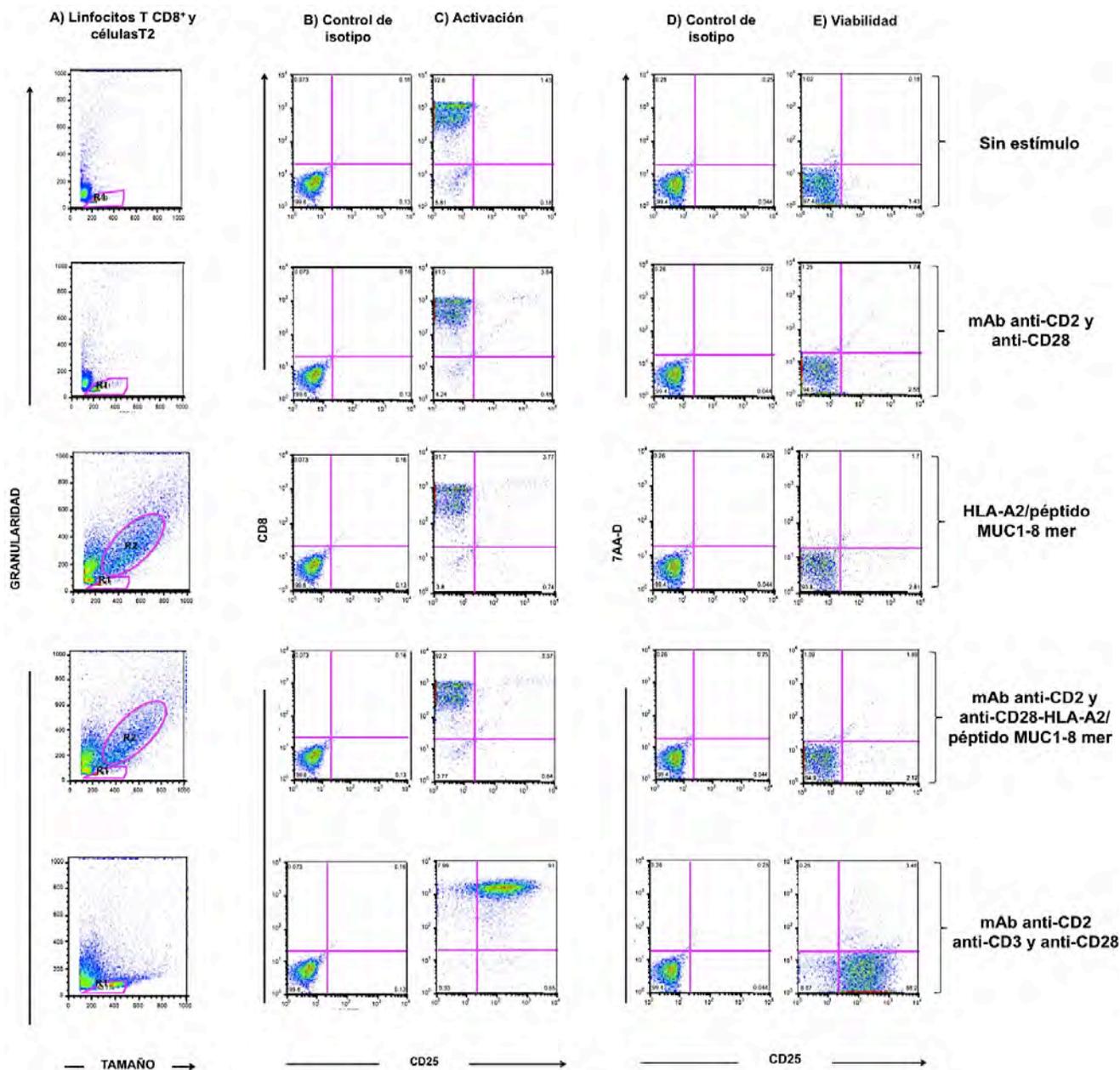


Figura 15. **Incremento de linfocitos T CD8<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>7AA-D<sup>-</sup> de persona sana HLA-A2<sup>-</sup> inducida con diferentes estímulos.** Los linfocitos T CD8<sup>+</sup> de donador sano HLA-A2<sup>-</sup> fueron incubados durante 6 días bajo diferentes condiciones e IL-2 (20U/ml) cada 72 h. El fenotipo de activación y viabilidad CD8<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>7AA-D<sup>-</sup> fue analizado por citometría de flujo. En la figura se muestra la región de linfocitos en proliferación de acuerdo a su tamaño y granularidad. (A) Control de isotipo para CD8 y CD25. (B) Porcentaje de linfocitos T CD8<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> sin estímulo (1.4%), estimulados con mAbs anti-CD2 y anti-CD28 (3.8%), cultivados con células T2 que presentan el péptido MUC1-8 mer (3.7%), cultivados con el complejo HLA-A2-MUC1-8 mer en presencia de los mAb anti-CD2 y anti-CD28 (3.3%) y estimulados con los mAbs anti-CD2, anti-CD3 y anti-CD28 (91%). La viabilidad de los linfocitos T CD8<sup>+</sup>CD25 en todas las condiciones de cultivo fue >98%.

En la figura 16 se observa que en forma basal, los linfocitos con fenotipo de activación en los donadores HLA-A2<sup>-</sup> representan del 1.4 al 4.2% y en los donadores sanos HLA-A2<sup>+</sup> representan del 1.4 al 4.4%. Al estimular los linfocitos T CD8<sup>+</sup> con nuestro sistema de activación, en las personas sanas HLA-A2<sup>-</sup>, los linfocitos fenotipo de activación incrementaron de 2 a 4.8%, diferencia que no fue estadísticamente significativa ( $p = 0.180$ ). En el caso de personas sanas HLA-A2<sup>+</sup>, los linfocitos con fenotipo de activación incrementaron de 9.6 a 12%, diferencia estadísticamente significativa en relación a los valores basales ( $p = 0.018$ ). Este último incremento, resultó ser estadísticamente significativo al compararlo con el de las personas sanas HLA-A2<sup>-</sup> ( $p = 0.04$ ). La prueba estadística valida la activación de linfocitos T CD8<sup>+</sup> específicos del péptido MUC1-8 mer en las personas sanas HLA-A2<sup>+</sup>.

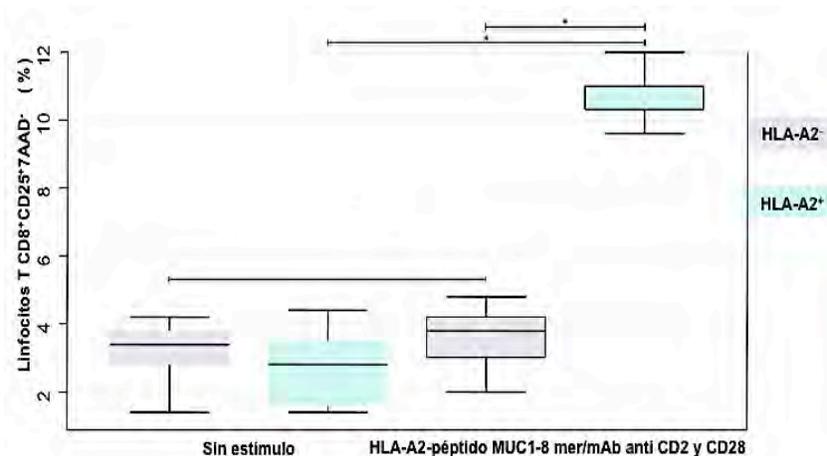
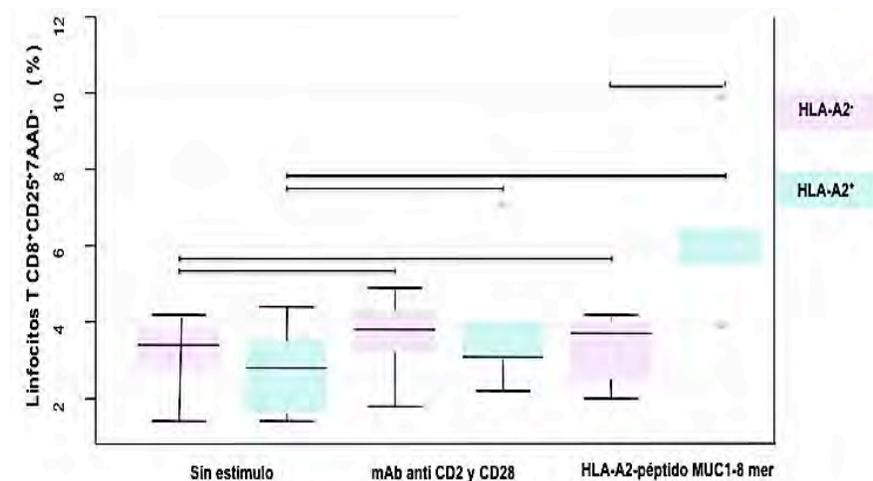


Figura 16. **Incremento de linfocitos T CD8<sup>+</sup> específicos al péptido MUC1-8 mer de personas sanas HLA-A2<sup>+</sup>.** Después de incubar los linfocitos T CD8<sup>+</sup> de personas sanas HLA-A2<sup>-</sup> (color morado) durante 6 días con el complejo HLA-A2-péptido MUC1-8 mer y mAb anti-CD2 y anti-CD28, el fenotipo CD8<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>7AAD<sup>-</sup> basal de 1.4-4.2% incrementó de 2-4.8%, la diferencia no fue estadísticamente significativa (p=0.180); mientras que los linfocitos T CD8<sup>+</sup> de las personas sanas HLA-A2<sup>+</sup> presentaron este fenotipo de manera basal de 1.4-4.4% (color turquesa) y al recibir el mismo estímulo incrementó a 9.6-12%, diferencia estadísticamente significativa (p=0.04). Al analizar este último incremento en relación al registrado en los linfocitos de las personas sanas HLA-A2<sup>-</sup>, la diferencia también fue estadísticamente significativa (p=0.04). El análisis fue realizado mediante la prueba estadística de WILCOXON. \* P <0.05

Respecto a los linfocitos T CD8<sup>+</sup> que fueron cultivados en condiciones consideradas como controles de la activación específica de antígeno, la figura 17 muestra que basalmente los linfocitos con fenotipo de activación en los donadores HLA-A2<sup>-</sup> representan del 1.4 al 4.2% y en los donadores sanos HLA-A2<sup>+</sup> representan del 1.4 al 4.4%. Al estimular los linfocitos T CD8<sup>+</sup> HLA-A2<sup>-</sup> y HLA-A2<sup>+</sup> con anticuerpos anti-CD2 y anti-CD28, los linfocitos con el fenotipo de activación incrementaron de 1.8 a 4.9% en las personas sanas HLA-A2<sup>-</sup> y de 2.2 a 6.9% en las personas sanas HLA-A2<sup>+</sup>, diferencias que no fueron estadísticamente representativas (p = 0.655 y p = 0.063, respectivamente). Al incubar los linfocitos T CD8<sup>+</sup> con células T2 que presentaban el péptido MUC1-8 mer, los linfocitos con el fenotipo de activación incrementaron de 2 a 4.2% en las personas sanas HLA-A2<sup>-</sup>

y de 4 a 9.4% en las personas sanas HLA-A2<sup>+</sup>, diferencias que tampoco fueron estadísticamente representativas en relación a los valores basales ( $p = 0.317$  y  $p = 0.050$ , respectivamente). Esta prueba estadística muestra que el incremento de linfocitos con el fenotipo de activación generado por coestimulación con anticuerpos o por las células T2 y el péptido MUC1-8 mer, no es significativo. Los linfocitos T CD8<sup>+</sup> que fueron activados en forma policlonal (control positivo de activación), presentaron el fenotipo de activación en >90% de la población celular.



**Figura 17. Incremento de linfocitos T CD8<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>7AA-D inducida por mAb anti-CD2 y anti-CD28 o por el complejo HLA-A2-péptido MUC1-8 mer en células T2.** Después de incubar los linfocitos T CD8<sup>+</sup> de las personas sanas HLA-A2<sup>-</sup> (color morado) durante 6 días con mAbs anti-CD2 y anti-CD28, el fenotipo CD8<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>7AA-D<sup>-</sup> basal de 1.4 a 4.2% incrementó de 1.8 a 4.9% y al ser estimulados con el complejo HLA-A2-péptido MUC1-8 mer alcanzó de 2 a 4.9%, diferencias que no fueron estadísticamente significativas ( $p=0.655$  y  $p=0.0317$ , respectivamente). Los linfocitos T CD8<sup>+</sup> de las personas sanas HLA-A2<sup>+</sup> presentaron este fenotipo de manera basal de 1.4 a 4.4% (color turquesa), que al ser estimulados con mAb anti-CD2 y anti-CD28 incrementó de 2.2 a 6.9% y al ser estimulados con el complejo HLA-A2-péptido MUC1-8 mer llegó de 2 a 9.9%, diferencias que no fueron estadísticamente significativas ( $p=0.063$  y  $p=0.051$ , respectivamente). El análisis fue realizado mediante la prueba estadística de WILCOXON.

### **9.11. Linfocitos T CD8<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>7AA-D<sup>-</sup> de pacientes HLA-A2<sup>+</sup> con adenocarcinoma pulmonar se incrementan al ser estimulados con nuestro sistema de activación**

Para evaluar la activación de linfocitos T CD8<sup>+</sup> específicos del péptido MUC1-8 mer de pacientes con adenocarcinoma pulmonar, se aislaron linfocitos T CD8<sup>+</sup> de dos pacientes HLA-A2<sup>-</sup> y de siete pacientes HLA-A2<sup>+</sup>. Nuestro sistema de activación consistió en cultivar: a) linfocitos T CD8<sup>+</sup> sin estímulo; b) linfocitos T CD8<sup>+</sup> con mAbs coestimuladores anti-CD2 y anti-CD28; c) linfocitos T CD8<sup>+</sup> solo con células T2 y el péptido MUC1-8 mer; d) linfocitos T CD8<sup>+</sup> con células T2 y el péptido MUC1-8 mer mas los mAbs coestimuladores anti-CD2 y anti-CD28; y e) linfocitos T CD8<sup>+</sup> activados en forma policlonal con los mAbs anti-CD2, anti-CD3 y anti-CD28 acoplados a microperlas MACS. Los resultados de un paciente HLA-A2<sup>+</sup> se muestran en la figura 18 y de un paciente HLA-A2<sup>-</sup> en la figura 19. El fenotipo de activación CD8<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>7AA-D<sup>-</sup> se identificó por inmunofluorescencia y citometría de flujo. El incremento de linfocitos con fenotipo de activación generado en cada condición de estímulo fue analizado a través de la prueba bioestadística de WILCOXON.

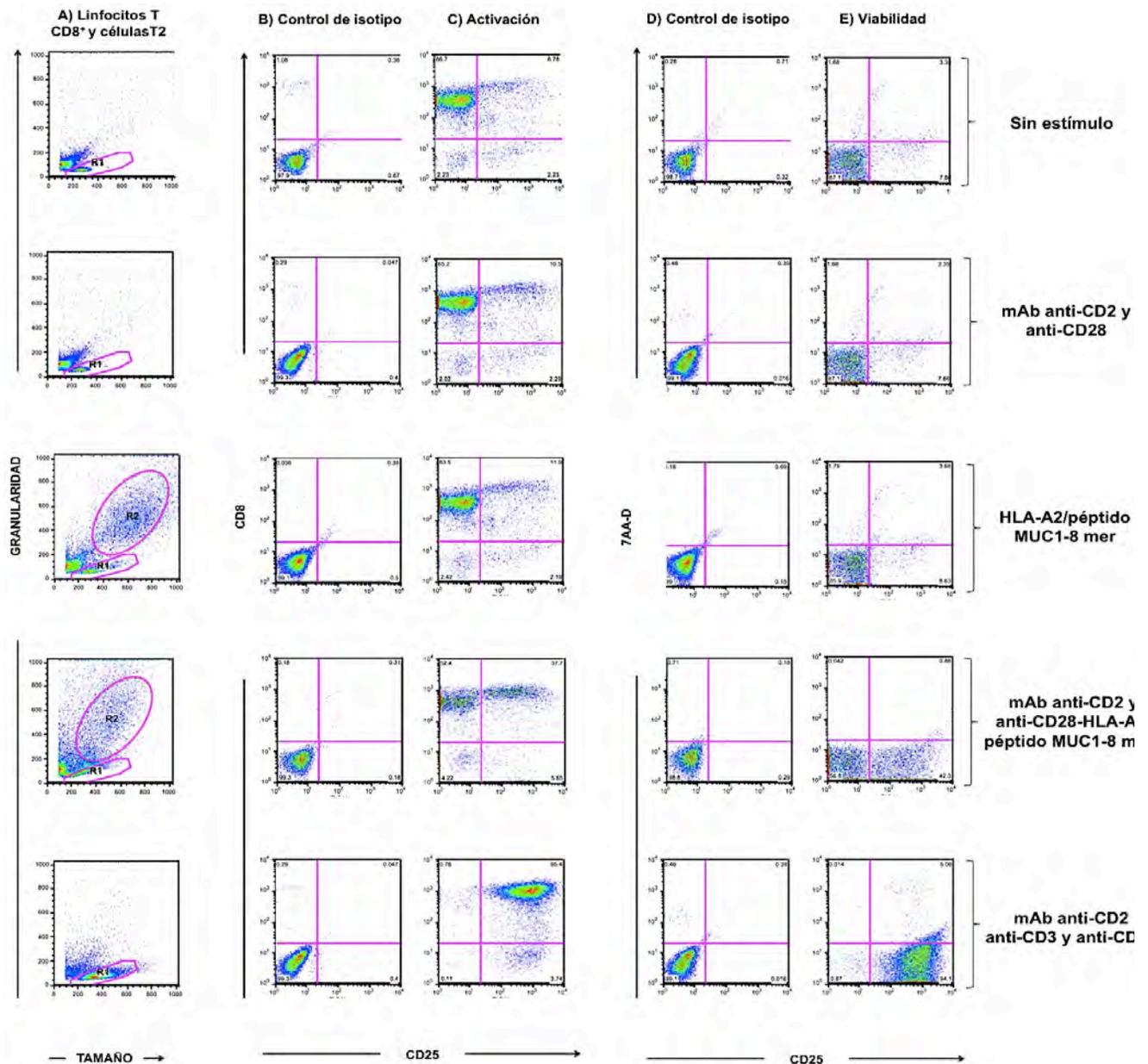


Figura 18. Incremento de linfocitos T  $CD8^+CD25^+7AA-D^-$  de paciente  $HLA-A2^+$  con adenocarcinoma pulmonar inducida con diferentes estímulos. Los linfocitos T  $CD8^+$  de paciente  $HLA-A2^+$  con adenocarcinoma pulmonar fueron incubados durante 6 días bajo diferentes condiciones e IL-2 (20UI/ml) cada 72h, para evaluar el fenotipo de activación y viabilidad  $CD8^+CD25^+7AA-D^-$  mediante citometría de flujo. La figura muestra la región de linfocitos en proliferación de acuerdo a su tamaño y granularidad. (A) Control de isotipo para CD8 y CD25. (B) Porcentaje de linfocitos T  $CD8^+CD25^+$  sin estímulo (8.7%), estimulados con mAbs anti-CD2 y anti-CD28 (10.5%), cultivados con células T2 y el péptido MUC1-8 mer (11.9%), cultivados con el complejo HLA-A2-MUC1-8 mer y los mAbs anti-CD2 y anti-CD28 (30.4%) y estimulados con los mAbs anti-CD2, anti-CD3 y anti-CD28 (95.4%). La viabilidad de los linfocitos T  $CD8^+CD25^+$  en todas las condiciones de cultivo fue >98%.

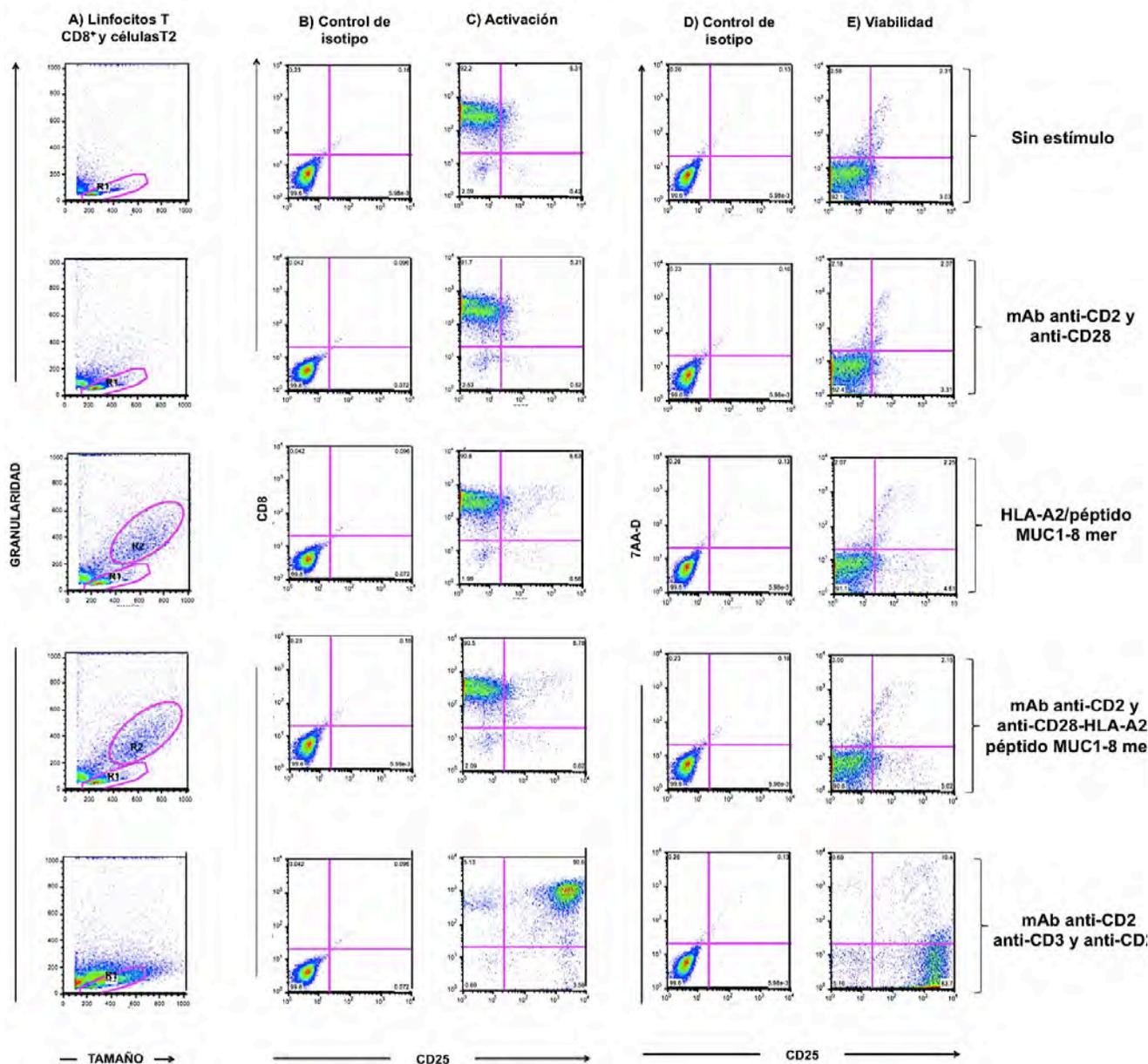


Figura 19. Incremento de linfocitos T  $CD8^+CD25^+7AA-D^-$  de paciente HLA-A2<sup>-</sup> con adenocarcinoma pulmonar inducida con diferentes estímulos. Los linfocitos T  $CD8^+$  de paciente HLA-A2<sup>-</sup> con adenocarcinoma pulmonar fueron incubados durante 6 días bajo diferentes condiciones e IL-2 (20U/mL) cada 72h para evaluar el fenotipo de activación y la viabilidad  $CD8^+CD25^+7AA-D^-$  mediante citometría de flujo. La figura muestra la región de linfocitos en proliferación de acuerdo a su tamaño y granularidad. (A) Control de isotipo para CD8 y CD25. (B) Porcentaje de linfocitos T  $CD8^+CD25^+$  sin estímulo (5.3%), estimulados con mAbs anti-CD2 y anti-CD28 (5.2%), cultivados con células T2 y el péptido MUC1-8 mer (6.6%), cultivados con el complejo HLA-A2-MUC1-8 mer y los mAbs anti-CD2 y anti-CD28 (6.7%) e incubados con los mAbs anti-CD2, anti-CD3 y anti-CD28 (90.6%). La viabilidad de los linfocitos T  $CD8^+CD25^+$  en todas las condiciones de cultivo fue >98%.

Los resultados del incremento de linfocitos con fenotipo de activación inducido por nuestro sistema se representan en la figura 20, donde observa que en forma basal, los linfocitos con fenotipo de activación en los pacientes HLA-A2<sup>-</sup> representan desde el 5 hasta el 5.3% y en los pacientes HLA-A2<sup>+</sup> representan desde el 2.7 hasta el 15%. Al estimular los linfocitos T CD8<sup>+</sup> con nuestro sistema de activación, en los pacientes HLA-A2<sup>-</sup>, los linfocitos con el fenotipo de activación incrementaron de 5.3 a 6.7%, diferencia que no fue estadísticamente significativa ( $p=0.180$ ) y en los pacientes HLA-A2<sup>+</sup> los linfocitos con el fenotipo de activación incrementaron de 22 a 30%, diferencia estadísticamente significativa en relación a los valores basales ( $p=0.018$ ). Este último incremento fue estadísticamente significativo al compararlo con el obtenido en los pacientes HLA-A2<sup>-</sup> ( $p=0.18$ ). El análisis muestra que en las células de los pacientes HLA-A2<sup>+</sup> con adenocarcinoma pulmonar se induce un mayor porcentaje de activación de linfocitos T CD8<sup>+</sup> específicos del péptido MUC1-8 mer.

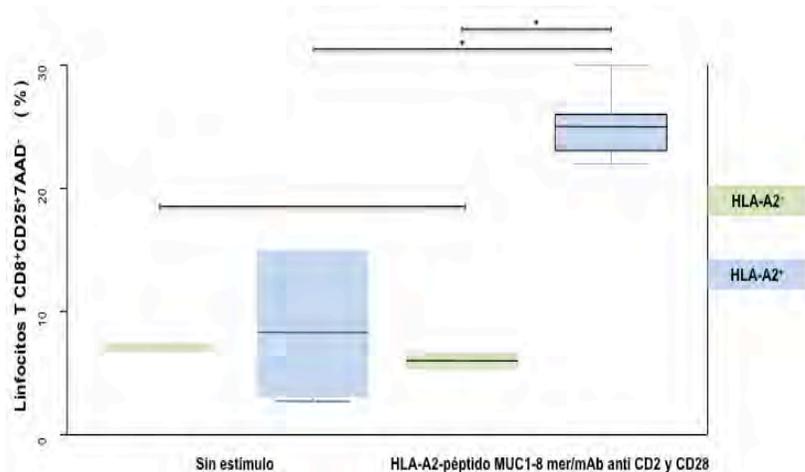


Figura 20. **Incremento de linfocitos T CD8<sup>+</sup> específicos al péptido MUC1-8 mer de pacientes HLA-A2<sup>+</sup> con adenocarcinoma pulmonar.** Después de incubar los linfocitos T CD8<sup>+</sup> de los pacientes HLA-A2<sup>-</sup> con adenocarcinoma pulmonar (color verde) durante 6 días con el complejo HLA-A2-péptido MUC1-8 mer y mAb anti-CD2 y anti-CD28, el fenotipo CD8<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>7AAD<sup>-</sup> basal de 5 a 5.3% incrementó de 5.3 a 6.7%, la diferencia no fue estadísticamente significativa ( $p=0.180$ ). Los linfocitos T CD8<sup>+</sup> de las personas sanas HLA-A2<sup>+</sup> presentaron este fenotipo de manera basal de 2.7 a 15% (color azul), que al recibir el mismo estímulo incrementó de 2.7 a 30%, con una diferencia estadísticamente significativa ( $p=0.04$ ). Al analizar este último incremento en relación al registrado en los linfocitos de las personas sanas HLA-A2<sup>+</sup>, la diferencia también fue estadísticamente significativa ( $p=0.04$ ). El análisis realizado mediante la prueba estadística de WILCOXON. \* $P < 0.05$ .

Respecto a los linfocitos T CD8<sup>+</sup> que fueron cultivados en las condiciones consideradas como controles de la activación específica de antígeno, la figura 21 muestra que en forma basal, los linfocitos de pacientes HLA-A2<sup>-</sup> con el fenotipo de activación, van del 5 al 5.3% y en las personas sanas HLA-A2<sup>+</sup> presentan desde 2.7 hasta 15%. Al estimular los linfocitos T CD8<sup>+</sup> con los mAbs anti-CD2 y anti-CD28, los linfocitos con fenotipo de activación se incrementaron de 5.2 a 5.5% en los pacientes HLA-A2<sup>-</sup> y de 3.2 a 19% en las personas HLA-A2<sup>+</sup>, diferencias que no fueron estadísticamente representativas ( $p=0.655$  y  $p=0.663$  respectivamente). Al incubar los linfocitos T CD8<sup>+</sup> con células T2 que presentaban el péptido MUC1-8 mer, los linfocitos con fenotipo de activación incrementaron de 5 a 6.6% en los pacientes HLA-A2<sup>-</sup> y de 3.9 a 21% en las personas sanas HLA-A2<sup>+</sup>; diferencias

que no fueron estadísticamente representativas en relación a los valores basales ( $p=0.063$  y  $p=0.051$ , respectivamente). Esta prueba estadística valida que el incremento de linfocitos con fenotipo de activación generado por la coestimulación o por las células T2 que presentan el péptido MUC1-8 mer no es significativo. Los linfocitos T CD8<sup>+</sup> que fueron activados en forma policlonal para ser el control positivo de activación, presentaron fenotipo de activación >90% de la población.

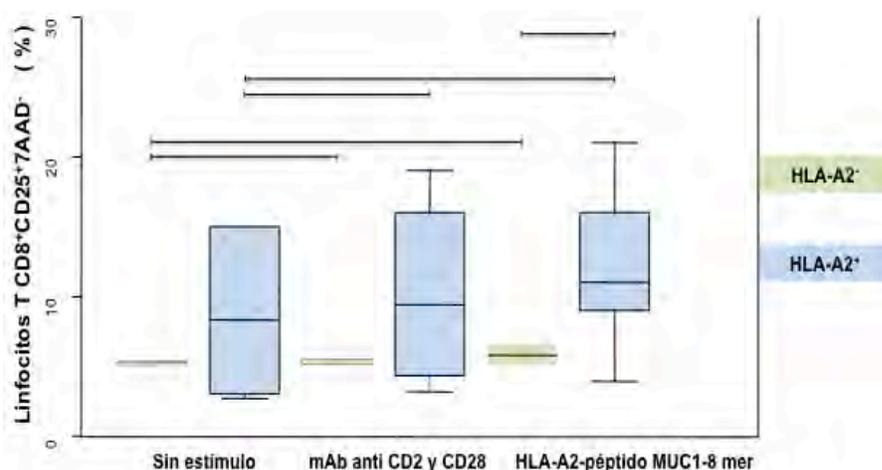


Figura 21. Incremento de linfocitos T CD8<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>7AAD<sup>-</sup> inducido por mAbs anti-CD2 y anti-CD28 o por el complejo HLA-A2-péptido MUC1-8 mer. Después de cultivar los linfocitos T CD8<sup>+</sup> de los pacientes HLA-A2<sup>-</sup> con adenocarcinoma pulmonar (color verde) durante 6 días con mAbs anti-CD2 y anti-CD28, el fenotipo CD8<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>7AAD<sup>-</sup> basal de 5 a 5.3% incrementó de 5.2 a 5.5% y al ser estimulados con el complejo HLA-A2-péptido MUC1-8 mer aumentó de 5 a 6.6%, diferencias que no fueron estadísticamente significativas ( $p=0.655$  y  $p=0.063$ , respectivamente). Los linfocitos T CD8<sup>+</sup> de las personas sanas HLA-A2<sup>+</sup> presentaron este fenotipo de manera basal de 2.7 a 15% (color azul), que al ser estimulados con mAb anti-CD2 y anti-CD28 incrementó de 3.2 a 19% y al ser estimulados con el complejo HLA-A2-péptido MUC1-8 mer aumentó de 3.9 a 21%, diferencias que no fueron estadísticamente significativas ( $p=0.317$  y  $p=0.051$ , respectivamente). Análisis realizado mediante la prueba estadística de WILCOXON. \*  $P < 0.05$

### **9.12. El incremento de linfocitos T CD8<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>7AA-D<sup>-</sup> de pacientes HLA-A2<sup>+</sup> con adenocarcinoma pulmonar inducido con nuestro sistema de activación no está restringido al estadio tumoral**

Después de evaluar la activación de los linfocitos T CD8<sup>+</sup> específicos al péptido MUC1-8 mer de los pacientes HLA-A2<sup>+</sup> con adenocarcinoma pulmonar, nuestra siguiente pregunta fue conocer si la activación estaba restringida al estadio tumoral. Por lo tanto, las muestras de estos pacientes se dividieron de acuerdo a la clasificación TNM para su análisis estadístico (14). La figura 22 muestra que los linfocitos no estimuladas de pacientes en estadio III exhibieron una mayor proporción de linfocitos con fenotipo de activación que las células no estimuladas de pacientes en estadio IV (md 15%, iqr 10-15 contra md 3.2%, iqr 2.7-8.3; P = 0,03) y que la proporción de este fenotipo fue similar en ambos grupos de pacientes después de estimular sus linfocitos T CD8<sup>+</sup> con nuestro sistema de activación (md 24% , iqr 22-30 contra md 25.5%, iqr 23-26, respectivamente). Por lo que se concluye que la activación de los linfocitos específicos al péptido MUC1-8 mer no está restringida al estadio tumoral.

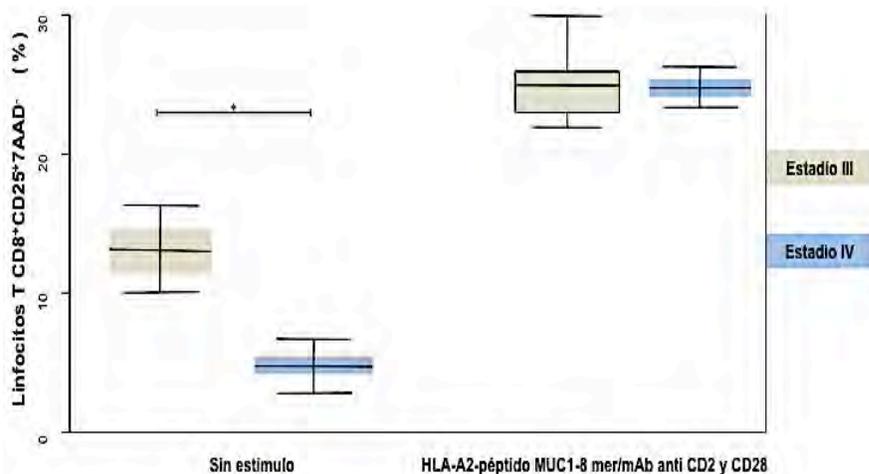


Figura 22. **Incremento similar de linfocitos T CD8<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>7AA-D<sup>-</sup> de pacientes HLA-A2<sup>+</sup> en estadio III o IV después de ser estimulados con el complejo HLA-A2-péptido MUC1-8 mer y mAb anti-CD2 y anti-CD28.** Los linfocitos T CD8<sup>+</sup> de pacientes estadio III (color café) y estadio IV (color azul) se cultivaron con células T2 que presentaban el péptido MUC1-8 mer y mAbs anti-CD2 y anti-CD28, además de IL-2 cada 3 días durante 6 días. Los linfocitos se cosecharon, se lavaron, se incubaron con los mAb anti-CD8 acoplado FITC y anti-CD25 acoplado a PE y se analizaron usando citometría de flujo. Una incubación adicional con 7-AAD se realizó para excluir del análisis a las células dañadas. \* P <005.

Como era de esperarse, al estimular a los linfocitos T CD8<sup>+</sup> con nuestro sistema de activación, el porcentaje de linfocitos con fenotipo de activación de pacientes HLA-A2<sup>+</sup> fue 2.3 veces mayor que el registrado en las personas sanas HLA-A2<sup>+</sup> (md 25%, iqr 22-30 vs. md 11%, iqr 9,6-12); diferencia estadísticamente significativa (p=0.04), mostrada en la figura 23.

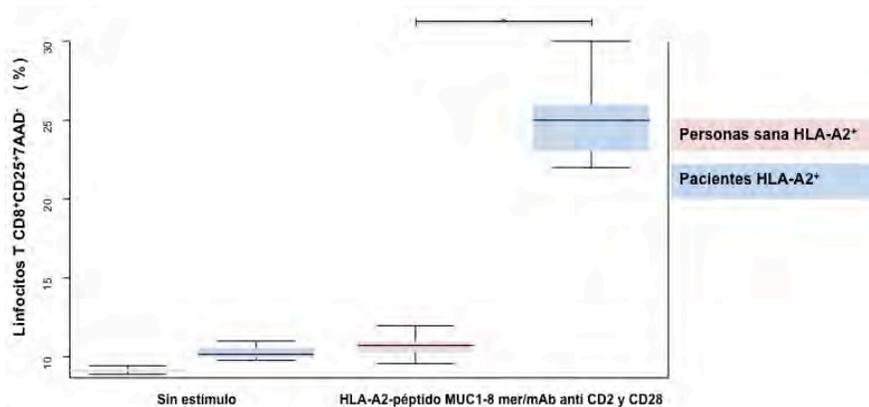


Figura 23. **Proliferación significativa de linfocitos T específicos al péptido MUC1-8 mer de pacientes HLA-A2<sup>+</sup> con adenocarcinoma de pulmón.** Después de cultivar los linfocitos T CD8<sup>+</sup> de las personas sanas HLA-A2<sup>+</sup> (color rosa) con el complejo HLA-A2-péptido MUC1-8 mer y los mAb anti-CD2 y anti-CD28 e IL-2; el fenotipo CD8<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>7AAD<sup>-</sup> basal de 1.4 a 4.4% incrementó de 9.4 a 12%; mientras que los linfocitos T CD8<sup>+</sup> de los pacientes HLA-A2<sup>+</sup> presentaron este fenotipo de manera basal de 2.7 a 15% (color azul), que al recibir el mismo estímulo incrementó de 22 a 30%. Al analizar este último incremento en relación al registrado en los linfocitos de las personas sanas HLA-A2<sup>+</sup>, la diferencia fue estadísticamente significativa (\*p=0.04).

### 9.13. Cinética de la expansión policlonal de linfocitos T CD8<sup>+</sup> de pacientes HLA-A2<sup>+</sup> con adenocarcinoma pulmonar

Para evaluar la expansión policlonal, los linfocitos T CD8<sup>+</sup> de tres pacientes HLA-A2<sup>+</sup> con adenocarcinoma pulmonar se marcaron con CFSE, luego se estimularon con mAb anti-CD2, anti-CD3 y anti-CD28 en presencia de rhIL-2 cada tercer día durante 10 días realizando una reestimulación el día 7 de cultivo con los mismos mAbs. La división celular fue analizada los días 3, 6 y 10 mediante citometría de flujo. Los histogramas de la figura 24 muestran la expansión policlonal de linfocitos T CD8<sup>+</sup>CFSE<sup>+</sup> de un paciente HLA-A2<sup>+</sup> con adenocarcinoma pulmonar. En la figura 24 se observan 10 divisiones celulares durante el periodo de cultivo, basándose en la pérdida secuencial de la intensidad de fluorescencia de CFSE en relación al día 3, 6 y 10. La división celular también se observa en la gráfica de puntos.

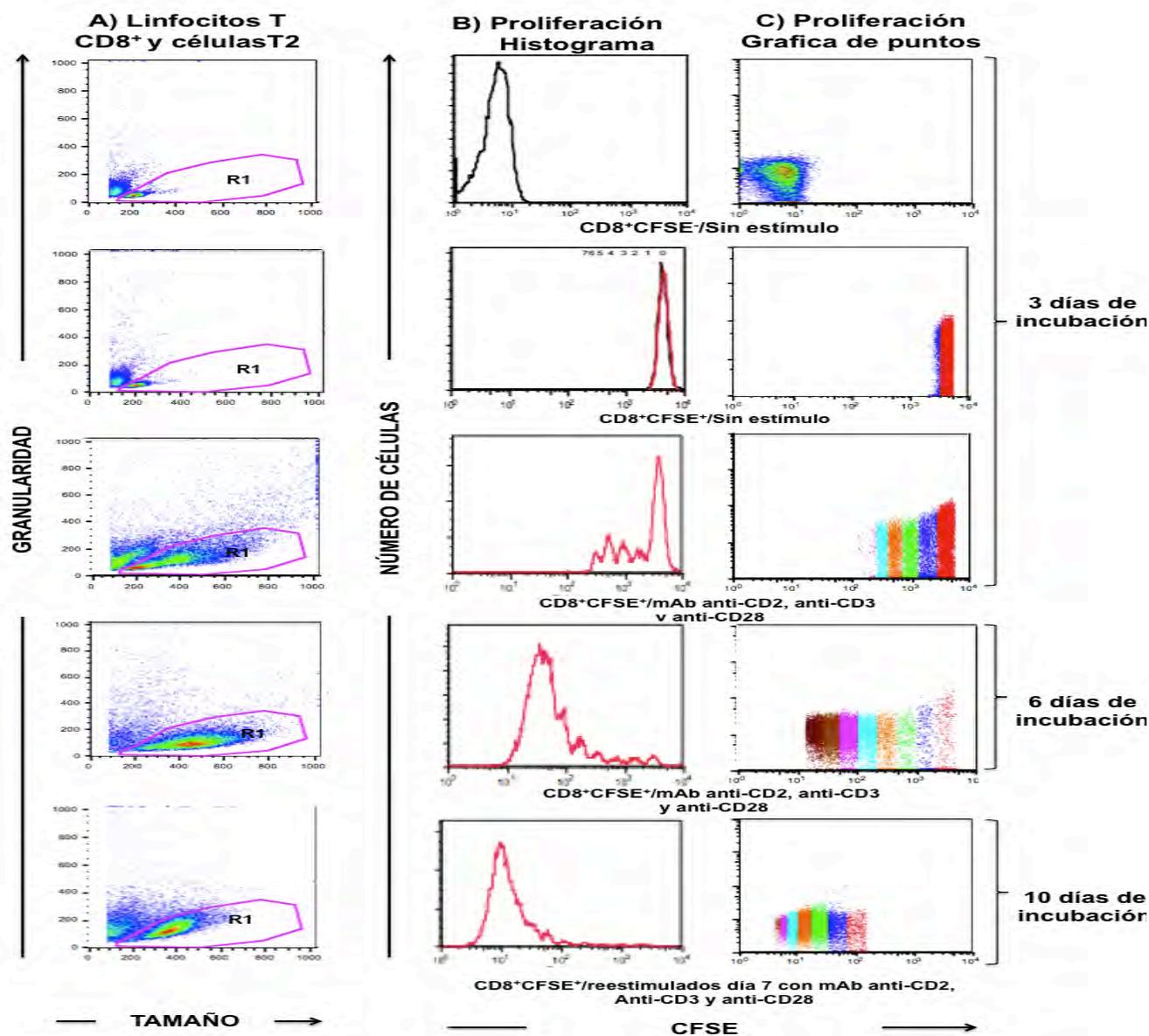


Figura 24. **Expansión policlonal de linfocitos T CD8<sup>+</sup> de paciente HLA-A2<sup>+</sup> con adenocarcinoma pulmonar.** Los linfocitos T CD8<sup>+</sup>CFSE<sup>+</sup> de paciente HLA-A2<sup>+</sup> con adenocarcinoma pulmonar se incubaron con los mAbs anti-CD2 y anti-CD28 e IL2 cada tercer día durante 10 días. La reestimulación se realizó con los mismos mAbs el día 7 de cultivo. La expansión policlonal fue analizada mediante la pérdida de CFSE en los días de incubación 3, 6 y 10 mediante citometría de flujo. En la figura se observa la región de linfocitos T CD8<sup>+</sup> en proliferación de acuerdo a su tamaño y granularidad (A). Histogramas de los linfocitos T CD8<sup>+</sup>CFSE<sup>+</sup> que no proliferaron por falta de estímulo y linfocitos T CD8<sup>+</sup>CFSE<sup>+</sup> que al ser estimulados con los mAbs anti-CD2, anti-CD3 y anti-CD28 e IL-2 se desplazan a la izquierda. En los histogramas, se observan picos que corresponden a las divisiones celulares basándose en la pérdida de la intensidad de fluorescencia de CFSE asociada al tiempo de incubación (B). Grafica de puntos que muestran 10 divisiones celulares representadas en barras de diferentes colores (C); n =3.

#### **9.14. Linfocitos T CD8<sup>+</sup> específicos del péptido MUC1-8 mer de pacientes HLA-A2<sup>+</sup> con adenocarcinoma pulmonar se expanden *in vitro* al ser estimulados con nuestro sistema de activación**

Para evaluar la respuesta proliferativa de los linfocitos T CD8<sup>+</sup> específicos del péptido MUC1-8 mer de pacientes HLA-A2<sup>+</sup> con adenocarcinoma pulmonar, los linfocitos T CD8<sup>+</sup> de tres pacientes fueron estimulados de manera individual con nuestro sistema de activación. Los linfocitos se cultivaron durante 10 días con células T2 que presentan el péptido MUC1-8 mer y mAbs anti-CD2 y anti-CD28 en presencia de rhIL-2 cada tercer día. Una reestimulación con células T2-péptido MUC1-8 mer y anticuerpos coestimuladores se realizó después de 7 días de cultivo. Al finalizar el cultivo (día 10), las células fueron cosechadas y fijadas y la expansión específica de antígeno se determinó por la pérdida de la fluorescencia del CFSE. La Figura 25 muestra la respuesta proliferativa de linfocitos T CD8<sup>+</sup> específicos del péptido MUC1-8 mer de un paciente HLA-A2<sup>+</sup> con adenocarcinoma pulmonar medida por la disminución de CFSE. Se observan dos picos separados que pertenecen a dos tipos de poblaciones celulares en un lapso de 10 días de cultivo. El pico de la derecha son linfocitos T CD8<sup>+</sup> que no sufrieron división celular, mientras que el pico de la izquierda son linfocitos T CD8<sup>+</sup> que proliferaron y que corresponden a los específicos de MUC1-8 mer (Fig. 25). La respuesta proliferativa de los linfocitos de los pacientes se muestra en la figura 26, en la cual se observa un incremento en promedio de 77.6% después de la reestimulación con las células T2-péptido MUC1-8 mer y coestimulación, en comparación con el

incremento promedio de 26.7% que se observó en los linfocitos T CD8<sup>+</sup> que fueron estimulados con nuestro sistema de activación.

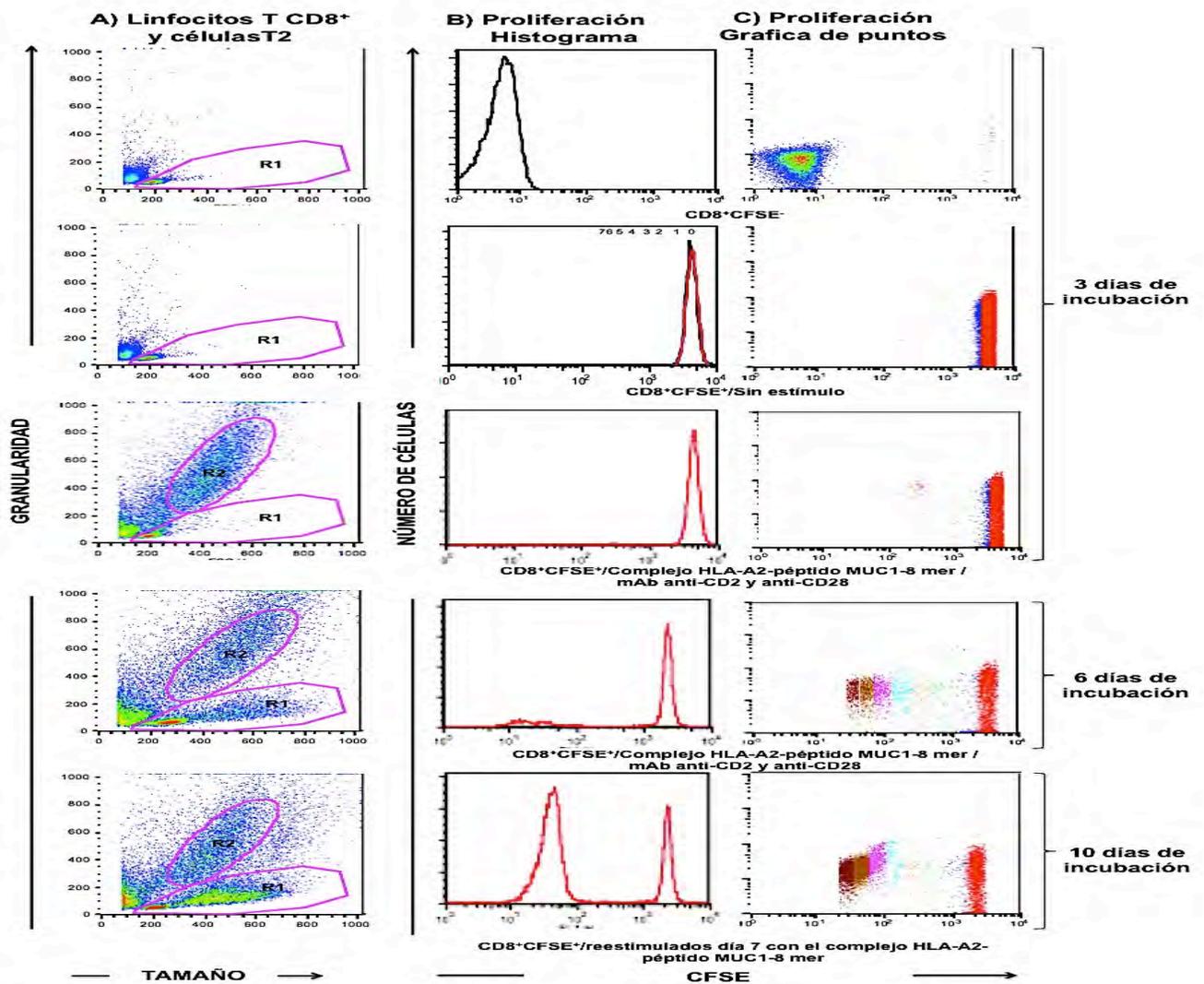


Figura 25. **Expansión de linfocitos T CD8<sup>+</sup> específicos del péptido MUC1-8 mer de pacientes HLA-A2<sup>+</sup> con adenocarcinoma pulmonar.** Los linfocitos T CD8<sup>+</sup>CFSE<sup>+</sup> de pacientes HLA-A2<sup>+</sup> con adenocarcinoma pulmonar se incubaron con el complejo HLA-A2-péptido MUC1-8 mer y mAbs anti-CD2 y anti-CD28 e IL2 cada tercer día durante 10 días. Al día 7 se realizó una reestimulación con el complejo HLA-A2-péptido MUC1-8 mer y mAbs anti-CD2 y anti-CD28. La expansión específica de antígeno fue analizada por la pérdida de CFSE en los días de incubación 3, 6 y 10 mediante citometría de flujo. En la figura se observa en la región R1, linfocitos T CD8<sup>+</sup> en proliferación de acuerdo a su tamaño y granularidad. La región R2 corresponde a las células T2 (A). Histograma de linfocitos T CD8<sup>+</sup>CFSE<sup>-</sup> así como de linfocitos T CD8<sup>+</sup>CFSE<sup>+</sup> que no proliferaron por ausencia de estímulo y linfocitos T CD8<sup>+</sup>CFSE<sup>+</sup> que al ser estimulados con el complejo HLA-A2- péptido MUC1-8 mer y mAbs anti-CD2 y anti-CD28 se expanden específicamente. Dos picos se observan por la pérdida de fluorescencia de CFSE asociada al tiempo de incubación de 10 días. Un pico corresponde a células que no se dividieron, mientras que el otro son células que sufrieron expansión clonal (B). Gráfica de puntos que muestra las divisiones celulares representadas en barras de diferentes colores (C); n = 3.

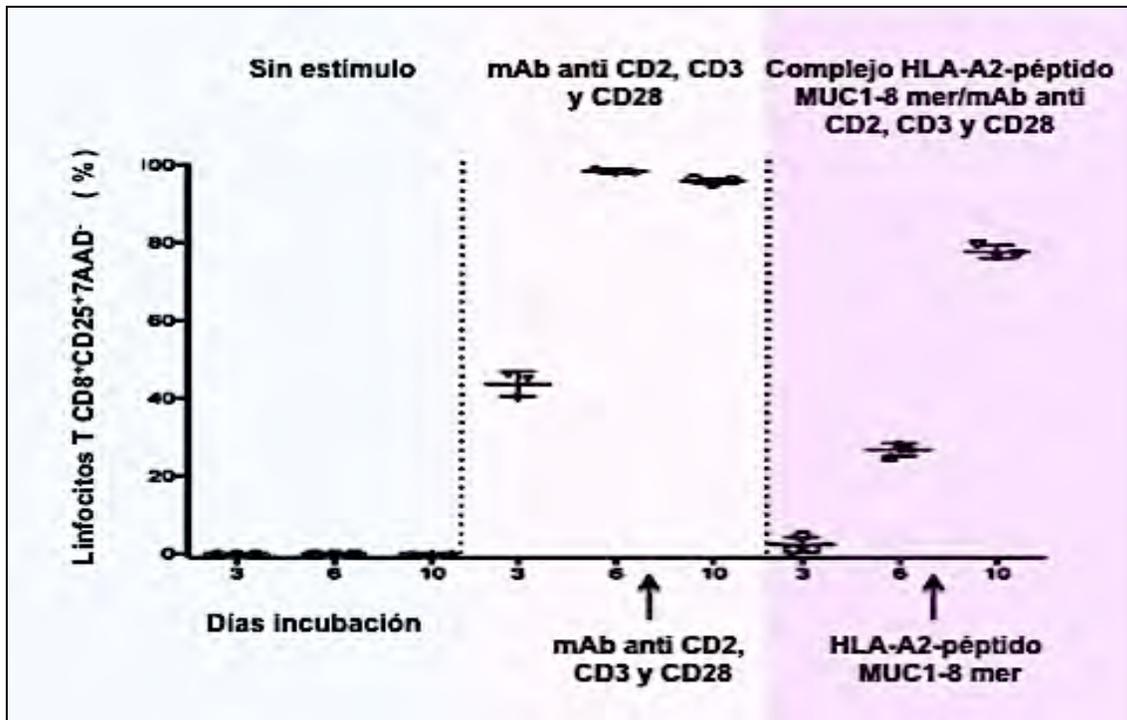


Figura 26. Expansión de linfocitos T CD8<sup>+</sup> específicos del péptido MUC1-8 mer de pacientes HLA-A2<sup>+</sup> con adenocarcinoma pulmonar después de la reestimulación con el complejo HLA-A2-peptido MUC1-8 mer y coestimulación. La grafica muestra la expansión de linfocitos T CD8<sup>+</sup> durante 10 días de cultivo. Linfocitos sin estímulo (panel de la izquierda). Linfocitos estimulados en forma policlonal con mAbs anti-CD3, anti-CD2 y anti-CD28 (panel de enmedio). Linfocitos T CD8<sup>+</sup> específicos del péptido MUC1-8 reestimulados con el mismo complejo HLA-A2-peptido MUC1-8 mer y mAbs anti-CD2 y anti-CD28, donde el incremento fue de 2.9 veces (panel de la derecha).

## 10. DISCUSIÓN

La terapia adoptiva de linfocitos T citotóxicos (CTLs) ha mostrado resultados prometedores como estrategia de tratamiento para los pacientes con cáncer (82, 83). El reto al que se enfrenta este tipo de terapia es a la activación *ex vivo* y expansión de CTLs a partir de pacientes leucopénicos con células dendríticas (DCs) no funcionales (86). Por lo que seleccionar epítomos inmunogénicos derivados de antígenos asociados a tumor (TAA) y células presentadoras de antígeno (APC) que sustituyan a las DCs es crucial para activar linfocitos T CD8<sup>+</sup> específicos de tumores (36, 38, 85 y 86). Respecto a esto, se ha demostrado que la línea celular T2 de linfoblastos humanos ha sido utilizada como APC artificial para activar linfocitos T CD8<sup>+</sup> específicos del tumor (95, 96). Por otro lado, se ha identificado que el TAA derivado de la MUC1 es uno de los de mayor importancia en adenocarcinomas, debido a que algunos de sus epítomos activan linfocitos T CD8<sup>+</sup> de manera específica (32-34), siendo el epítomo SAPDTRPA de MUC1 (MUC1-8 mer) inmunodominante al activar linfocitos T CD8<sup>+</sup> específicos del tumor en modelo murino (37,103).

En nuestros resultados, confirmamos la afinidad del péptido MUC1-8 mer por la molécula HLA-A2 mediante la herramienta informática NetMHC versión 3.4 (108). La capacidad de unión teórica la comprobamos experimentalmente mediante los ensayos de estabilización de la molécula HLA-A2 con el péptido MUC1-8, ya que observamos que la expresión de moléculas HLA-A2 en la membrana de las células T2 fue dependiente de la concentración de péptido MUC1-8 mer utilizada (siendo la concentración de 100µg/mL de péptido la que estabiliza el máximo de

moléculas HLA-A2 y 200µg/mL el punto de saturación). Esto permite concluir que la unión del péptido MUC1-8 mer estabiliza a la molécula HLA-A2, por lo que su expresión aumenta en la membrana de las células T2. Lo cual fue comparable con los ensayos de estabilización de la molécula HLA-A2 con variantes del péptido SAPDTRPA que incluyen: la adición del carbohidrato N-Acetil-D-galactosamina (GalNAc) en la Treonina (SAPDT<sup>GalNAc</sup>RPA) o la sustitución de la Treonina y Alanina por Fenilalanina e Isoleucina (SAPDFRPL) o la adición de Prolina y GalNAc (SAPDT<sup>GalNAc</sup>RPAP) para incrementar la afinidad por la molécula HLA-A2 (99-101,102). Sin embargo, Bossi *et al.*, en 2013 sugieren que para utilizar células T2 como APC artificiales, se deben utilizar péptidos derivados del procesamiento de antígeno y sólo modificar la concentración del péptido utilizada en un rango de  $10^{10}$ - $10^8$ M, debido a que la presentación de epítopos en una cantidad fisiológica podría reflejar la sensibilidad natural de los CTLs (95). También mencionan que se debe considerar que la respuesta de los CTLs podría variar de acuerdo al número de epítopos antigénicos encontrados en la membrana de las células T2, por lo que se debe definir una condición óptima para iniciar la activación de linfocitos T CD8<sup>+</sup> específicos para cada antígeno, ya que niveles subóptimos de la presentación de antígenos, tal como ocurren en la regulación negativa de moléculas de MHC de clase I por las células cancerosas, podría no ser suficiente para activar a los linfocitos T CD8<sup>+</sup>. Considerando estos aspectos y que evaluar la presencia de complejos MHC-péptido en la membrana de la APC es el predictor más fiable de su eficacia *in vitro* o *in vivo* (123,124). Nosotros demostramos mediante microscopía confocal, la expresión de la molécula HLA-A2 y la presencia del péptido MUC1-8 mer en la membrana de las célula T2 e identificamos que la

fluorescencia de los mAb anti-HLA-A2-FITC y el CA27-29 junto con el anti-IgG de ratón-Alexa 594, colocalizan y se distribuyen en la membrana de las células T2 de manera polarizada y con diferentes intensidades. Los resultados indican la formación y distribución del complejo HLA-A2-péptido MUC1-8 mer en la membrana de las células T2, con mayor presencia en los polos. Lo cual fue comparable con la identificación de complejos HLA-A2-péptidos del antígeno específico de próstata en la membrana de las células T2, mediante microscopía confocal. Estos complejos activaron eficientemente linfocitos T CD8<sup>+</sup> específicos del tumor (123).

Una correcta presentación antigénica no siempre correlaciona con la capacidad para activar linfocitos T CD8<sup>+</sup> (125). Esto se ha demostrado en péptidos derivados de diferentes TAA con capacidad unión alta a diferentes moléculas MHC de clase I, ya que pacientes con melanoma que fueron inmunizados con estos péptidos presentaron una mínima regresión del tumor (126), mientras que péptidos de mediana o baja afinidad por las moléculas MHC de clase I, han sido seleccionados por su capacidad para activar eficientemente linfocitos T CD8<sup>+</sup> específicos de tumor (127). Tal fue el caso del péptido MUC1-8 mer, ya que nuestros resultados indican que los linfocitos T CD8<sup>+</sup> se activan específicamente con el complejo HLA-A2-β<sub>2</sub>m-péptido MUC1-8 mer y mAbs anti-CD2 y anti-CD28 acoplados a perlas MACs e rhIL-2. Nosotros también identificamos en las personas sanas HLA-A2<sup>+</sup>, la preexistencia de linfocitos T CD8<sup>+</sup> específicos del péptido MUC1-8 mer, lo cual señala la existencia de una población de linfocitos T CD8<sup>+</sup> que reconocen al péptido MUC1-8 mer en individuos sanos. De igual manera se han identificado en

personas sanas HLA-A2<sup>+</sup>, linfocitos T CD8<sup>+</sup> específicos de antígenos tumorales como el TAA mamaglobulina A (96), antígeno específico de próstata (128), melanoma A (129), NY-ESO-1(130), WT1 y CEA (131), COX-2 (132), XBP1 US, XBP1 SP, CD138 y CS1 (133), gp100 y TERT (95) y EML4-ALK (134).

Cabe mencionar que en los pacientes HLA-A2<sup>+</sup> con adenocarcinoma pulmonar también se identificó la reactividad de linfocitos T CD8<sup>+</sup> específicos del péptido MUC1-8 mer. Este resultado fue similar a la activación de los linfocitos T CD8<sup>+</sup> específicos de los epitopos LLLLTVLTV y STAPPVHNV de MUC1 de pacientes HLA-A2<sup>+</sup> con adenocarcinoma gastrointestinal o de mama, respectivamente (117, 119, 120). Diversos estudios han mostrado evidencia de que el péptido MUC1-8 mer es inmunodominante, por ejemplo Apostolopoulos y cols., en 1997 y en 2003, activan *in vitro* e *in vivo* linfocitos T CD8<sup>+</sup> mediante el péptido MUC1-8 mer y su forma glicosilada SAPDT<sup>GalNAc</sup>RPA en modelo murino (99). Quinlin y cols., en 2007, activan linfocitos T CD8<sup>+</sup> con la secuencia GSTAPPAHGVTSAPDTRPAP a partir de PBMCs de pacientes con adenocarcinoma de mama, los cuales eliminan células de la línea MCF-7 (100). Además, Lazoura y cols., en 2007 demuestran que la activación de linfocitos T CD8<sup>+</sup> específicos del péptido MUC1-8 mer puede amplificarse con la variante del péptido SAPDFRPL, ya que tiene mayor afinidad por la molécula HLA-A2 (102), mientras las secuencias TSAPDTRPAP, SAPDTRPAPG, SAPDT<sup>GalNAc</sup>RPAPG y la transfección del gen MUC1 activan linfocitos T CD8<sup>+</sup> y linfocitos Th4 (102,103 y 140). La activación de los linfocitos Th4 es de suma importancia, ya que intervienen en el rechazo del tumor mediante:

- 1) activación de eosinófilos y macrófagos, capaces de eliminar células tumorales

por medio de especies reactivas de oxígeno y óxido nítrico; 2) liberación de IFN- $\gamma$ , el cual promueve la expansión de CTLs por tiempo prolongado; 3) modulación del microambiente tumoral, liberando citocinas proinflamatorias; y 4) lisis de las células tumorales, mediante la liberación de granzimas y perforinas (135). Esta cualidad inmunogénica también ha sido identificada en epítopos de los antígenos tumorales NY-ESO y HER-2 (136 y 137). Como era de esperarse, los linfocitos T CD8<sup>+</sup> de personas sanas HLA-A2<sup>-</sup> y de pacientes HLA-A2<sup>-</sup> que fueron estimulados con nuestro sistema de activación, no presentaron una respuesta estadísticamente significativa.

Cabe destacar que los linfocitos T CD8<sup>+</sup> de los pacientes HLA-A2<sup>+</sup> y de las personas sanas HLA-A2<sup>+</sup> respondieron específicamente a nuestro sistema de activación. Lo cual se refleja en la diferencia del incremento de los linfocitos con el fenotipo de activación entre estos dos grupos de estudio y en el cultivo de linfocitos T CD8<sup>+</sup> con células T2 que presentaron el péptido MUC1-8 mer más la coestimulación de los anticuerpos anti-CD2 y anti-CD28, ya que el incremento de estos linfocitos con fenotipo de activación fue estadísticamente significativo.

Respecto a la expansión *in vitro* de los linfocitos T CD8<sup>+</sup> específicos del péptido MUC1-8 mer de pacientes HLA-A2<sup>+</sup> con adenocarcinoma pulmonar, nosotros demostramos que esta población prolifera al ser estimulada con nuestro sistema de activación (hasta 3 veces más) y con la reestimulación al día 7 con el complejo HL-A2-péptido MUC1-8 mer. En un estudio similar, otros autores activaron linfocitos T CD8<sup>+</sup> específicos del TAA Mamaglobulina A de pacientes HLA-A2<sup>+</sup> con cáncer de mama, utilizando un sistema de activación integrado por células T2

presentando los péptidos de TAA Mamaglobulina A, mas mAbs solubles anti-CD28 e rhIL-2. Sin embargo, este sistema de activación y expansión de CTLs necesitó varios reestímulos semanales para mantener la función citotóxica contra diversas líneas celulares de origen tumoral (96). Mientras que con nuestro sistema de activación sólo se realizó un reestímulo a la semana, lo cual podría tener origen en la coestimulación adicional generada por los mAbs anti-CD2 y anti-CD28 acoplados a las perlas, ya que la interacción de los mAb con las moléculas coestimuladoras induce la formación de filamentos de actina entre las perlas y la superficie de los linfocitos T CD8<sup>+</sup>, mimetizando la sinápsis inmunológica entre APC y los CTLs (70, 85, 86 y 116). Además, se debe considerar que nuestro trabajo tuvo como objetivo demostrar la capacidad proliferativa en porcentaje y no se consideró la función citotóxica.

Nuestros resultados también demuestran que la proporción de linfocitos T CD8<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>7AA-D<sup>-</sup> no estimulados de los pacientes estadio III y IV fueron significativamente diferentes, pero después de la estimulación con el complejo péptido HLA-A2-MUC1-8 mer y mAb anti-CD2 y anti-CD28, la proporción de estos linfocitos fue la misma. Lo cual indica que la reactividad de los linfocitos T CD8<sup>+</sup> específicos del péptido MUC1-8 mer no es dependiente del estadio tumoral o de la baja expresión de CD25 de los linfocitos de pacientes en estadio IV (121). La gama de posibles explicaciones incluye la falta del microambiente tumoral, integrado principalmente por IL-6, IL-10, VEGF y TGF- $\beta$  (38,40,41); el rescate del mecanismo de señalización celular, mediante el contacto directo y continuo con el anticuerpo anti-CD28 que sobrepasa la señal inhibitoria mediada por CTLA-4

observada en los linfocitos Th4 (72,73); la falta de contacto con los linfocitos Treg y la terapia anti-tumoral, debido a que los experimentos se realizaron *in vitro* (38,42,122).

## 11. CONCLUSIONES

- Las células T2 presentan el péptido MUC1-8 mer.
- Las células T2 como APC del péptido MUC1-8 mer mas la coestimulación de los mAb anti-CD2 y anti-CD28 e rHL-2 activan a los linfocitos T CD8<sup>+</sup> específicamente.
- Los linfocitos T CD8<sup>+</sup> específicos del péptido MUC1-8 mer de personas sanas HLA-A2<sup>+</sup> pueden ser activados *in vitro*.
- Los linfocitos T CD8<sup>+</sup> específicos del péptido MUC1-mer de pacientes HLA-A2<sup>+</sup> con adenocarcinoma pulmonar pueden ser activados y expandidos *in vitro*.
- La reactividad de los linfocitos T CD8<sup>+</sup> específicos del péptido MUC1-8 de pacientes HLA-A2<sup>+</sup> con adenocarcinoma pulmonar no está restringida al estadio tumoral.

## 12. LITERATURA CITADA

1. Siegel RL, Miller KD and Jemal A. Cancer Statistics 2015. *CA Cancer J Clin* 65: 5-29,2015.
2. Nakamura H and Saji H. Worldwide trend of increasing primary adenocarcinoma of the lung. *Surg Today* 44: 1004-1012, 2014.
3. Suda K and Mitsudomi T. Successes and limitations of targeted cancer therapy in lung cancer. *Prog Tumor Res* 41: 62-67, 2014.
4. Wangari TJ and Hopper BE. Drug resistance mechanisms in Non- Small Cell Lung Carcinoma. *J Can Res Updates* 2: 265-282, 2013.
5. Kroemer G, Zitvogel L, Galluzi L, et al. Victories and deceptions in tumor immunology Stimuvax®. *Oncolmunology* 2: e23687-1-2, 2013.
6. <http://www3.inegi.org.mx/sistemas/sisept/Default.aspx?t=mdemo107&s=est&c=2> 3587.
7. Mellstedt H, Vansteenkiste J, Thatcher N, et al. Vaccines for the treatment of non-small cell lung cancer: investigational approaches and clinical experience. *Lung Cancer* 73: 11-17, 2011.
8. Hall R, Gray E, Chiappori A, et al. Beyond the standart of care: A review of novel immunotherapy trial for the treatment of lung cáncer. *Cancer Control* 20: 22-31, 2013.
9. Sundar R, Soong R, Chul CB, et al. Immunotherapy in the treatment of non-small cell lung cancer. *Lung Cancer* 85:101-109, 2014.
10. Thatcher N and Heighway J. Maintenance and consolidation therapy in patients with unresectable Stage III/IV Non-Small Cell Lung Cancer. *Oncologist* 15:1034–1042, 2010.

11. Ronan J. and Giaccone G. Lung cancer vaccine. *Cancer J* 17: 302-308,2011.
12. Jäger E, Jäger D and Knuth A. Clinical cancer vaccine trials. *Curr Opin Immunol* 2: 178-182m, 2002.
13. Molina JR, Yang P and Cassivi SD. Non-small cell lung cancer: epidemiology, risk factors, treatment, and survivorship. *Clin Proc* 83: 584.594, 2008.
14. Sobin LH, Gospodarowicz MK and Witterkind C. The TNM classification of malignant tumours. 7<sup>th</sup> ed. Oxford, UK: Wiley-Blackwell; 2009.
15. Gardiner N, Jogai S and Wallis A. The revised lung adenocarcinoma classification-an imaging guide. *J Thorac Dis* 5: S537-S546,2014.
16. Callaghan M and Voynow J. Respiratory tract mucin genes and mucin glycoproteins in health and disease. *Physiol Rev* 86:245-287, 2006.
17. Bennett E, Mandel U, Clausen H, et al. Control Of mucin-type O-glycosilation A classification of the polypeptide GalNAc-transferasa gene family. *Glicobiology* 22: 736-756, 2012.
18. McGuckin M, Linden SK, Sutton P, et al. Mucin dynamics and enteric pathogens. *Nat Rev Microbiol* 4: 265-278, 2011.
19. Paracaula R, Barrabes S, Sarrats A, et al. Altered glycosylation in tumour focused to cancer diagnosis. *Dis Markers* 25: 207-218, 2008.
20. Yamada N, Kitamoto S, Yokoyama S, et al. Epigenetic regulation of mucin genes in human cancer. *Clin Epigenetics* 2: 85H96, 2011.
21. Bafna S, Kaur S, Batra SK, et al. Membrana bound mucins: The mechanistic

basis for alteration in the growth and survival of cancer cell. *Oncogene* 20: 2893-2904, 2010.

22. Donal W. Mucins in cancer : function, prognosis and therapy. *Nat Rev Cancer* 12: 874-885, 2009.

23. Rachagani S, Torres P, Moniaux N, et al. Current status of mucin in the diagnosis and therapy of cancer. *Biofactors* 6: 509-527, 2009.

24. Yonesawa S, Higashi M, Yamada N, et al. Mucins in human neoplasms: Clinical pathology, gene expression and diagnostic application. *Pathol Int* 12: 697-716, 2011.

25. Baldus E, Hanisch F, Engelmann K, et al. MUC1 and the MUCs: A family of human mucins with impact in cancer biology. *Crit Rev Clin Lab Sci* 2: 189-231, 2004.

26. Gendler J Sandra. MUC1 the renaissance molecule. *J Mammary Gland Biol and Neoplasia* 3: 339-353, 2001.

27. Albrecht H, Kermit L, Carraway E, et al. MUC1 and MUC4 : Switching the emphasis from large to small. *Cancer Biother Radiopharm* 26: 261-271, 2011.

28. Konomalchuk J and Agrawal B. MUC1 is a novel coestimulatory molecule of human T cell and functions in an AP-1 dependent manner. *Hum Immunol* 73: 448-455, 2012.

29. Levitin F, Stern O, Weiss M, et al. The MUC1 SEA module is a self-cleaving domain. *J Biol Chem* 39: 33374-33386, 2005.

30. Kufe DW. Functional targeting of the MUC1 oncogen in human cancers. *Cancer Biol Ther* 13: 1197-1203, 2009.
31. Sritama N and Mukherjee P. MUC1: a multifaceted oncoprotein with a key role in cancer progression. *Trends Mol Med* 6: 332-342, 2014.
32. Hanisch F and Ninkovic T. Immunology of O-glycosylated proteins: Approaches to the design of a MUC1 glycopeptide-based tumor vaccine. *Curr Protein Pept Sci* 4:307-315, 2006.
33. Singh R and Bandyopadhyay D. MUC1 A target molecule for cancer therapy. *Cancer Biol Ther* 4: 481-486, 2007.
34. Roulois D, Grégoire M and Fonteneau JF. MUC1-specific cytotoxic T lymphocytes in cancer therapy: induction and challenge. *Biomed Res Int* 2013: 871936, 2013.
35. Vesely MD, Kershaw MH, Schreiber RD, et al. Natural innate and adaptive immunity to cancer. *Annu Rev Immunol* 29: 235-271, 2011.
36. Kessler H and Melief CJ. Identification of T-cell epitopes of cancer immunotherapy. *Leukemia* 21: 1859-1874, 2007.
37. Finn OJ, Kira R, Andrew J, et al. Importance of MUC1 and spontaneous mouse tumor model for understanding the immunobiology of human adenocarcinomas. *Immunol Res* 50: 261-268, 2011.
38. Hwang I and Nguyen N. Mechanisms of tumor- induced T cell immune suppression and therapeutics to counter those effects. *Arch Pharm Res* 30: s12272, 2015.
39. Abbas AK, Lichtman AH and Pillai S. Cellular and molecular immunology. Elsevier Saunders (8<sup>th</sup>). Philadelphia, pp109-220, 2015.

40. Disis ML. Immune regulation of cancer. *J Clin Oncol* 28: 4531-4538, 2010.
41. Hamai A, Benlalam H, Meslin F, et al. Immune surveillance of human cancer: if the cytotoxic T-lymphocytes play the music, does the tumoral system call the tune?. *Tissue Antigens* 75: 1-8, 2010.
42. Finn OJ. Cancer Immunology. *N Engl J Med* 358: 2704-2715, 2008.
43. Ravinovich A, Gabrilovich D, Sotomayor M, et al. Immunosuppressive strategies that are mediated by tumor cells. *Annu Rev Immunol* 56: 267-296, 2007.
44. Fridman WH, Pages F, Galon J, et al. The immune contexture in human tumours: Impact on clinical outcome. *Nat Rev Cancer* 4: 298–306, 2012.
45. Dennis KL, Blatner NR, Gounari F, et al. Current status of interleukin-10 and regulatory T-cells in cancer. *Curr Opin Oncol* 25: 637–645, 2013.
46. Nishikawa H and Sakaguchi S. Regulatory T cells in cancer immunotherapy. *Curr Opin Immunol* 27: 1–7, 2014.
47. Akhurst RJ and Hata A. Targeting the TGF beta signalling pathway in disease. *Nat Rev Drug Discov* 11: 790–811, 2012.
48. Shevach EM. Mechanisms of foxp3<sup>+</sup>T regulatory cell- mediated suppression. *Immunity* 5: 636–645, 2009.
49. Raimondi G, Turner MS and Morel PA. Naturally occurring regulatory T cells: Recent insights in health and disease. *Crit Rev Immunol* 1: 61–95, 2007.
50. Maldonado RA and Andrian UH. How tolerogenic dendritic cells induce regulatory T cells. *Adv Immunol* 108: 111–165, 2010.
51. Lin EY, Li JF, Gnatovskiy L, et al. Macrophages regulate the angiogenic switch in a mouse model of breast cancer. *Cancer Res* 66: 11238–11246, 2006.

52. Zheng Y, Cai Z, Wang S, et al. Macrophages are an abundant component of myeloma microenvironment and protect myeloma cells from chemotherapy drug-induced apoptosis. *Blood* 114: 3625–3628, 2009.
53. Gabrilovich DI, Bronte V, Chen SH, et al. The terminology issue for myeloid-derived suppressor cells. *Cancer Res* 1: 425; author reply 426.
54. Youn JI, Nagaraj S, Collazo M, et al. Subsets of myeloid-derived suppressor cells in tumor-bearing mice. *J Immunol* 181: 5791–5802, 2008.
55. Dolcetti L, Peranzoni E, Ugel S, et al. Hierarchy of immunosuppressive strength among myeloid-derived suppressor cell subsets is determined by GM-CSF. *Eur J Immunol* 40: 22–35, 2010.
56. Talmadge JE. Pathways mediating the expansion and immunosuppressive activity of myeloid-derived suppressor cells and their relevance to cancer therapy. *Clin Cancer Res* 13: 5243–5248, 2007.
57. Rodriguez PC, Quiceno DG, Zabaleta J, et al. Arginase I production in the tumor microenvironment by mature myeloid cells inhibits T-cell receptor expression and antigen-specific T-cell responses. *Cancer Res* 64: 5839–5849, 2004.
58. Gabrilovich DI, Rosenberg S and Bronte V. Coordinated regulation of myeloid cells by tumours. *Nat Rev Immunol* 12: 253–268, 2012.
59. Huang B, Pan BY, Li Q, et al. Gr-1<sup>+</sup> CD115<sup>+</sup> immature myeloid suppressor cells mediate the development of tumor-induced T regulatory cells and T-cell

anergy in tumor-bearing host. *Cancer Res* 66: 1123–1131, 2006.

60. Guerder S, Joncker N, Mahiddine K, et al. Dendritic cells in tolerance and autoimmune diabetes. *Curr Opin Immunol* 25: 670–675, 2013.

61. Novitskiy SV, Ryzhov S, Zaynagetdinov R, et al. Adenosine receptors in regulation of dendritic cell differentiation and function. *Blood* 112: 1822–1831, 2008.

62. Mancino A, Schioppa T, Larghi P, et al. Divergent effects of hypoxia on dendritic cell functions. *Blood* 112: 3723–3734, 2008.

63. Elia AR, Cappello P, Vanni C, et al. Human dendritic cells differentiated in hypoxia down-modulate antigen uptake and change their chemokine expression profile. *J Leukoc Biol* 84: 1472–1482, 2008.

64. Yang M, Ma C, Liu S, et al. HIF-dependent induction of adenosine receptor A2b skews human dendritic cells to a Th2-stimulating phenotype under hypoxia. *Immunol Cell Biol* 88: 165–171, 2010.

65. Thiery J, Abouzahr S, Dorothee G et al. p53 potentiation of tumor cell susceptibility to CTL involves Fas and mitochondrial pathways. *J Immunol* 175: 871-878, 2005.

66. Thiery J, Dorothee G, Haddada H et al. Potentiation of a tumor cell susceptibility to autologous CTL killing by restoration of wild-type p53 function. *J Immunol* 170: 5919-5926, 2003.

67. Abouzahr S, Bismuth G, Gaudin C et al. Identification of target actin content and polymerization status as a mechanism of tumor resistance after cytolytic T lymphocyte pressure. *Proc Natl Acad Sci USA* 103: 1428-1433, 2006.
68. Kuhn JR and Poenie M. Dynamic polarization of the microtubule cytoskeleton during CTL-mediated killing. *Immunity* 16: 111-121, 2002.
69. Stinchcombe JC, Bossi G, Booth S, et al. The immunological synapse of CTL contains a secretory domain and membrane bridges. *Immunity* 15: 751-761, 2001.
70. Van der Merwe PA. Formation and function of the immunological synapse. *Curr Opin Immunol* 14: 293-8, 2002.
71. Hussain SF, Kong LY, Jordan J, et al. A novel small molecule inhibitor of signal transducers and activators of transcription 3 reverses immune tolerance in malignant glioma patients. *Cancer Res* 67: 9630-9636, 2007.
72. Wing K, Yamaguchi T and Sakaguchi S. Cell-autonomous and -non-autonomous roles of CTLA-4 in immune regulation. *Trends Immunol* 32: 428-433, 2011.
73. Simpson TR, Li F and Montalvo-Ortiz M. Fc-dependent depletion of tumor-infiltrating regulatory T cells co-defines the efficacy of anti-CTLA-4 therapy against melanoma. *J Exp Med* 210: 1695-1710, 2013.
74. Ahmad SM, Larsen SK, Svane IM, et al. Harnessing PD-L1-specific cytotoxic T cells for anti-leukemia immunotherapy to defeat mechanisms of immune escape mediated by the PD-1 pathway. *Leukemia* 28: 236-238, 2014.

75. Rabinovich GA, Gabrilovich D and Sotomayor M. Immunosuppressive strategies that are mediated by tumor cells. *Annu Rev Immunol* 25: 267-296, 2007.
76. Gajewski TF. Cancer immunotherapy. *Mol Oncol* 6: 242–250, 2012.
77. Lichty BD, Breitbach CJ, Stojdl DF, et al. Going viral with cancer immunotherapy. *Nat Rev Cancer* 14: 559–567, 2014.
78. Ascierto PA, Addeo R, Carteni G, et al. The role of immunotherapy in solid tumors: report from the Campania Society of Oncology Immunotherapy. *J Trans Med* 12: 291-314, 2014.
79. Bullock TN, Mullins DW, Colella TA, et al. Manipulation of avidity to improve effectiveness of adoptively transferred CD8<sup>+</sup> T cell melanoma immunotherapy in human MHC class I- transgenic mouse. *J Immunol* 10: 5824-5831, 2001.
80. Gross DA, Opolon P, Cornet S, et al. High vaccination efficiency of low-affinity epitopes antitumoral immunotherapy. *J Clin Invest* 3: 425-433, 2004.
81. Disis ML. Mechanism of action of immunotherapy. *Semin Oncol* 2014: S3-S13, 2014.
82. Sundar R, Soong R, Chul Cho B, et al. Immunotherapy in the treatment of non-small cell lung cancer. *Lung Cancer* 85:101-109, 2014.
83. Dudley E and Rosenberg A. Adoptive-cell- transfer therapy for the treatment of patients with cancer. *Nat Rev Cancer* 3: 666-675, 2003.
84. Carl H. June. Principales of adoptive T cell cancer therapy. *Clin Invest*

117:1204-1212, 2007.

85. Turtle CJ and Riddell SR: Artificial antigen-presenting cells for use in adoptive immunotherapy. *Cancer J* 16: 374-381, 2010.

86. Perica K, Varela JC, Oelke M, et al. Linking form to function: Biophysical aspect of artificial antigen presenting cell design. *Biochim Biophys Acta* 1853: 781-790, 2015.

87. Obermann S, Petrykowska S, Manns P, et al. Peptide- $\beta$ 2-microglobulin-major histocompatibility complex expressing cell are potent antigen-presenting cells that can generate specific T cell. *Immunol* 1:90-97, 2007.

88. June CH: Principles of adoptive T cell cancer therapy. *J Clin Invest* 117: 1204-1212, 2007.

89. Sasawatari S, Tadaki T, Isogal M, et al. Efficient priming and expansion of antigen-specific CD8<sup>+</sup> T cell by a novel cell-based artificial APC. *Immunol Cell Biol* 84: 512-521, 2006.

90. Yoshikawa T, Takahara M, Tomiyama M, et al. Large-scale expansion of  $\gamma\delta$  T cell and peptide-specific cytotoxic T cell using zoledronate for adoptive immunotherapy. *Int J Oncol* 45: 1847-1856, 2014.

91. Zeng W, Su M, Anderson KS, et al. Artificial antigen-presenting cell expressing CD80, CD70, and 4-1BB ligand efficiently expand functional T cell specific to tumor-associated antigens. *Immunobiology* 219: 583-592, 2014.

92. Suhoski MM, Golovina TN, Aqui NA, et al. Engineering artificial antigen-presenting cells to express a diverse array of co-stimulatory molecules. *Mol Ther* 5: 981-988, 2007.
93. Alarcon G, Pacheco G, Moscoso J, et al. HLA genes in Mexican teeneks: HLA genetic relationship with other worldwide population. *Mol Immunol* 43: 790-799, 2006.
94. Luft T, Rizkalla M, Tai TY, et al. Exogenous peptides presented by transporter associated with antigen processing (TAP)-deficient and TAP-competent cells: intracellular loading and kinetics of presentation. *J Immunol* 167: 2529-2537, 2001.
95. Bossi G, Gerry AB, Paston SJ, et al. Examining the presentation of tumor-associated antigens on peptide-pulsed T2 cells. *Oncoimmunology* 11: e26840, 2013.
96. Jaramillo A, Narayanan K, Campbell GL, et al. Recognition of HLA-A2-restricted mammaglobin-A-derived epitopes by CD8<sup>+</sup> cytotoxic T lymphocytes from breast cancer patients. *Breast Cancer Res Treat* 88: 29-41, 2004.
97. Burchell J, Gendler S, Papadimitriou TJ, et al. Development and characterization of breast cancer reactive monoclonal antibodies directed to the core protein of the human milk mucin. *Cancer Res* 47: 5476-5482, 1987.
98. Apostolopoulos V, Karanikas V, Haurum JS, et al. Induction of HLA-A2-restricted CTLs to the mucin 1 human breast cancer antigen. *J Immunol* 11:5211-5218,1997.

99. Apostolopoulos V, Yuriev E, Ramsland P, et al. A glycopeptide in complex with MHC class I uses the GalNAc residue as an anchor. *Proc Natl Acad Sci* 100: 15029-15034.
100. Quinlin IS, Burnside JS, Dombrowski KE, et al. Context of MUC1 epitope: Immunogenicity. *Oncol Rep* 2: 453-456, 2007.
101. Ninkovic T, Kinarsky L, Engelmann K, et al. Identification of the O-glycosylated decapeptides within the MUC1 repeat domain as potential MHC class I (A2) binding epitopes. *Mol Immunol* 47: 131-140, 2009.
102. Lazoura E, Lodding J, Farrugia W, et al. Enhanced major histocompatibility complex class I binding and immune responses through anchor modification of the non canonical tumour associated mucin 1-8 peptide. *Immunology* 119: 306-316, 2006.
103. Koido S, Enomoto Y, Apostolopoulos V, et al. Tumor regression by CD4 T-cells primed with dendritic/tumor fusion cell vaccines. *Anticancer Res* 34: 3917-3924, 2014.
104. Apostolopoulos V, Yu M, Corper AL, et al. Crystal structure of a non-canonical high affinity peptide complexed with MHC class I: a novel use of alternative anchors. *J Mol Biol* 318: 1307-1316, 2002.
105. Madurga S, Belda I, Llorá X, et al. Design of enhanced agonists through the use of a new virtual screening method: Application to peptides that bind class I major histocompatibility complex (MHC) molecules. *ProteinSci* 14: 2069-2079, 2005.

106. Bednarek MA, Sauma SY, Gammon MC, et al. The minimum peptide epitope from the influenza virus matrix protein. Extra and intracellular loading of HLA-A2. *J Immunol* 12: 4047-4053, 1991.
107. Fremont DH, Stura EA, Matsumura M, et al. Crystal structure of an H-2K<sup>b</sup>-ovalbumin peptide complex reveals the interplay of primary and secondary anchor positions in the major histocompatibility complex binding groove. *Proc Natl Acad Sci USA* 7: 2479-2483, 1995.
108. Lundegaard C, Lamberth K, Harndahl M, et al. NetMHC-3.0: accurate web accessible predictions of human, mouse and monkey MHC class I affinities for peptides of length 8-11. *Nuclei Acids Res* 36: W509-512, 2008.
109. Boyum A. Isolation of lymphocytes, granulocytes and macrophages. *Scand J Immunol* 5: 9-15, 1976.
110. Tan J and Xie T. Comparison of HLA-Class I typing by serology with DNA typing in Chinese population. *Transplant Proc* 7: 1858-1861,2000.
111. Manders EMM, Verbeek JF and Aten JA. Measurement of co-localization of objects in dual-colour confocal images. *J Microscopy* 169: 375-382,1993.
112. Lecoeur H, Fevrier M, Garcia S, et al. A novel flow cytometric assay for quantitation and multiparametric characterization of cell-mediated cytotoxicity. *J Immunol Methods* 253: 177-187, 2001.
113. Quah JC and Parish CR. The use of carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester (CFSE) to monitor lymphocyte proliferationDetermination of

lymphocyte division by flow cytometry. JoVE.

44.<http://www.jove.com/details.php?id=2259>,doi: 10.3791/2259.

114. Suda K and Mitsudomi T. Successes and limitations of targeted cancer therapy in lung cancer. *Prog Tumor Res* 41: 62-67, 2014.

115. Wangari-Talbot J and Hopper-Borge E. Drug resistance mechanisms in Non-Small Cell Lung Carcinoma. *J Can Res Updates* 2: 265-282, 2013.

116. Skanland SS, Moltu K, Berge T, et al. T-cell co-stimulation through the CD2 and CD28 co-receptors induces distinct signalling responses. *Biochem J* 460: 399-410, 2014.

117. Dittmann J, Matschke KK, Weinschenk T, et al. CD8<sup>+</sup> T cell response against MUC1-derived peptides in gastrointestinal cancer survivors. *Cancer Immunol Immunother* 54: 750-758, 2005.

118. Choi C, Witzens M, Bucur M, et al. Enrichment of functional CD8 memory T cells specific for MUC1 in bone marrow of patients with multiple myeloma. *Blood* 105: 2132-2134, 2005.

119. Kokowsky K, Harnack U, Dorn DC et al. Quantification of the CD8<sup>+</sup> T cell response against a mucin epitope in patients with breast cancer. *Arch Immunol Ther Exp* 56:141-145, 2008.

120. Gückel B, Rentzsch C, Nastke MD, et al. Pre-existing T-cell immunity against mucin-1 in breast cancer patients and healthy volunteers. *J Cancer Res Clin Oncol* 132: 265-274, 2006.

121. Quinlin IS, Burnside JS, Dombrowski KE, et al. Context of MUC1 epitope:

Immunogenicity. *Oncol Rep* 2: 453-456, 2007.

122. Phillips JD, Knab LM, Blatner NR, et al. Preferential expansion of pro-inflammatory Tregs in human non-small cell lung cancer. *Cancer Immunol Immunother* 6: 1185-1191, 2015.

123. Garetto S, Sizzano F, Brusa D, et al. Binding of prostate-specific membrane antigen to dendritic cells: a critical step in vaccine preparation. *Cytotherapy*.(2009) 8:1090-1100.

124. Napoletano C, Rughetti A, Bennett EP, et al. Tumor-associated Tn-MUC1 glycoform is internalized through the macrophage galactose-type C-type lectin and delivered to the HLA-Class I and II compartment in dendritic cells. *Cancer Research*. (2007) 17:8358-8367.

125. Bullock TN, Mullins DW, Colella TA, et al. Manipulation of avidity to improve effectiveness of adoptively transferred CD8<sup>+</sup> T cell melanoma immunotherapy in human MHC class I- transgenic mouse. *Journal Immunology*. (2001) 10: 5824-5831.

126. Jager E, Jager D, Knuth A. Clinical cancer vaccine trials. *Current Opinion Immunology*. (2002) 2: 178-182.

127. Gross DA, Opolon P, Cornet S, et al. High vaccination efficiency of low-affinity epitopes antitumoral immunotherapy. *Journal Clinical Investigation*. (2004) 3: 425-433.

128. Elkord E, Williams PE, Kynaston H, et al. Differential CTLs specific for prostate-specific antigen in healthy donor and patients with prostate cancer. *International Immunology*. (2005) 10: 1315-1325.

129. Savage P, Millrain M, Dimakou S, et al. Expansion of CD8<sup>+</sup> cytotoxic T cells in vitro and in vivo using MHC class I tetramers. *Tumor Biology*. (2007) 28: 70-76.
130. Obermann S, Petrykowska S, Manns P, et al. Peptide-β2-microglobulin-major histocompatibility complex expressing cell are potent antigen-presenting cells that can generate specific T cell. *Immunology* (2007) 1: 90-97.
131. Koido S, Homma S, Hara E, et al. In vitro generation of cytotoxic regulatory T cell by fusions of human dendritic cell and hepatocellular carcinoma cells. *Journal of Translation Medicine*. (2008) 6:51.
132. Feng Gao Y, Qiang sun Z, Qi F, et al. Identification of a new broad-spectrum CD8<sup>+</sup> T cell epitope from over-expressed antigen COX-2 in esophageal carcinoma. *Cancer Letter*. (2009) 284: 55-61.
133. Bae J, Smith R, Daley J, et al. Myeloma-specific multiple peptides able to generate cytotoxic T lymphocytes: A potencial therapeutic application in multiple myeloma and other plasma cell disorders. *Clinical cancer research*. (2012) 17: 4850-4860.
134. Yoshimura M, Tada Y, Ofuzi K, et al. Identification of a novel HLA-A\*02:01-restricted cytotoxic T lymphocyte epitope derived from the EML4-ALK fusion gene. *Oncology Reports*. (2014) 32: 33-39.
135. Gerloni M, Castiglioni P, Zanetti M. The cooperation between two CD4 T cells induces tumor protective immunity in MUC1 transgenic mouse. *Journal Immunology*. (2005) 175: 6551-6559.

136. Knutson K.L. and M.L. Disis. Tumor antigen-specific T helper cell in cancer immunity and immunotherapy. *Cancer immunology immunotherapy* (2005) 54: 721-728.

137. Homma S, Komita H, Sagawa Y, et al. Antitumor activity mediated by CD4<sup>+</sup> cytotoxic T lymphocytes against MHC class II-negative mouse hepatocellular carcinoma induced by dendritic cell vaccine and interleukin-12. *Immunology*. (2005) 115: 451-461.

# Expansion of quiescent lung adenocarcinoma CD8<sup>+</sup> T cells by MUC1-8-mer peptide-T2 cell-β2 microglobulin complexes

J.A. ATZIN-MÉNDEZ<sup>1</sup>, J.S. LÓPEZ-GONZÁLEZ<sup>2</sup>, R. BÁEZ<sup>3</sup>, M.C. ARENAS-DEL ANGEL<sup>4</sup>,  
L.F. MONTAÑO<sup>5</sup>, D. SILVA-ADAYA<sup>6</sup>, R. LASCURAIN<sup>1,4</sup> and P. GOROCICA<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Research in Biochemistry, <sup>2</sup>Lung Cancer Laboratory and <sup>3</sup>Clinical Oncology and Pneumology, National Institute of Respiratory Diseases 'Ismael Cosío Villegas', Mexico, DF 14080; <sup>4</sup>Department of Biochemistry; <sup>5</sup>Immunobiology Laboratory, Department of Cell and Tissue Biology, Faculty of Medicine, National Autonomous University of Mexico, Mexico, DF 04510; <sup>6</sup>Experimental Laboratory for Neurodegenerative Diseases, National Institute of Neurology and Neurosurgery, Mexico, DF 14269, Mexico

Received July 8, 2015; Accepted August 21, 2015

DOI: 10.3892/or.2015.4328

**Abstract.** Adoptive immunotherapy requires the isolation of CD8<sup>+</sup> T cells specific for tumor-associated antigens, their expansion *in vitro* and their transfusion to the patient to mediate a therapeutic effect. MUC1 is an important adenocarcinoma antigen immunogenic for T cells. The MUC1-derived SAPDTRPA (MUC1-8-mer) peptide is a potent epitope recognized by CD8<sup>+</sup> T cells in murine models. Likewise, the T2 cell line has been used as an antigen-presenting cell to activate CD8<sup>+</sup> T cells, but so far MUC1 has not been assessed in this context. We evaluated whether the MUC1-8-mer peptide can be presented by T2 cells to expand CD25<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> T cells isolated from HLA-A2<sup>+</sup> lung adenocarcinoma patients with stage III or IV tumors. The results showed that MUC1-8-mer peptide-loaded T2 cells activated CD8<sup>+</sup> T cells from cancer HLA-A2<sup>+</sup> patients when anti-CD2, anti-CD28 antibodies and IL-2 were added. The percentage of CD25<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> T cells was 3-fold higher than those in the non-stimulated cells (P=0.018). HLA-A2<sup>+</sup> patient cells showed a significant difference (2.3-fold higher) in activation status than HLA-A2<sup>+</sup> healthy control cells (P=0.04). Moreover, 77.6% of MUC1-8-mer peptide-specific CD8<sup>+</sup> T cells proliferated following a second stimulation with MUC1-8-mer peptide-loaded T2 cells after 10 days of cell culture. There were significant differences in the percentage of basal CD25<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> T cells in relation to the cancer stage; this difference disappeared after MUC1-8-mer peptide stimulation. In conclusion, expansion of

CD25<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> T cells by MUC1-8 peptide-loaded T2 cells plus costimulatory signals via CD2, CD28 and IL-2 can be useful in adoptive immunotherapy.

## Introduction

Lung adenocarcinoma is the main cause of cancer-related mortality worldwide (1,2). The immune response against tumors requires activation of tumor-specific CD8<sup>+</sup> T cells to generate effector CD8<sup>+</sup> cytotoxic T lymphocytes (CTLs) with the ability to kill tumor cells (3). The antitumor CD8<sup>+</sup> T cells are activated by signals resulting from T cell receptor (TCR) recognition of specific tumor-derived peptide antigens presented by major histocompatibility complex class I (MHC-I) molecules on dendritic cells (DCs) (3,4). The CTL response to cancer is subordinated to the immunosuppressor environment that takes place during the progression of tumors (4). One treatment strategy is adoptive immunotherapy that involves the transfusion of autologous CD8<sup>+</sup> CTLs to remove the malignant cells (5). Efforts to activate and expand tumor-specific CTLs *in vitro* have been focused on in the search for immunogenic tumor-associated antigens (TAAs) as well as appropriate tumor antigen-presenting cells (APCs) (5,6). The most significant antigen expressed in the vast majority of adenocarcinomas is a hypoglycosylated isoform from human mucin 1 (MUC1) protein, which exhibits immunogenic peptide sequences (7,8). Among MUC1-derived peptides, the H-2k<sup>b</sup>-restricted MUC1-SAPDTRPA (MUC1-8-mer) peptide has proven to be the most immunogenic epitope for murine T cell activation (9,10). MHC-binding epitope prediction analysis showed that the MUC1-8-mer peptide is also restricted to HLA-A2 molecules (11). The T2 cell line expresses HLA-A2 molecules; therefore it has been used as an APC to activate distinctive TAA-specific CD8<sup>+</sup> T cells from healthy volunteers (12). Additionally, T2 cells have been used to activate cancer-patient CD8<sup>+</sup> T cells specific for TAA-derived peptides, but not MUC1-derived peptides (13). Our aim was to evaluate i) whether T2 cells can present the MUC1-8-mer peptide, and ii) to determine whether MUC1-8-loaded T2 cells activate

---

*Correspondence to:* Dr Patricia Gorocica, Departamento de Investigación en Bioquímica, Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias 'Ismael Cosío Villegas', Calzada de Tlalpan 4502, Colonia Sección XVI, Tlalpan, CP 14080, México  
E-mail: pgorocica@yahoo.com.mx

**Key words:** lung adenocarcinoma, MUC1-8-mer peptide, HLA-A2, T2 cells, CD8 T cells

and expand CD8<sup>+</sup> T cells isolated from lung adenocarcinoma HLA-A2<sup>+</sup> patients.

### Materials and methods

**Lung adenocarcinoma patients.** Nine adult patients with a diagnosis of non-small cell lung cancer established by clinical history, physical examination, chest X-rays, and histopathology were included. The patients were hospitalized at the Oncology Unit at the Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias 'Ismael Cosío Villegas' in Mexico City. The patient recruitment criteria included patients with a diagnosis of lung adenocarcinoma who had not undergone any previous cancer-associated surgery or medical treatment. Patients were classified as stage III and IV according to the standard criteria of the Tumor, Node and Metastasis (TNM) system (14). A peripheral blood sample was obtained from each patient before the start of anticancer chemotherapy or radiotherapy. Ten age-matched and clinically healthy volunteers with no history of cancer were included as controls. The Science and Bioethics Committee of our Institution in accordance with the Declaration of Helsinki approved the study, and patients and healthy volunteers provided informed consent for blood sampling after written information was provided.

**Monoclonal antibodies and reagents.** Peridinin chlorophyll protein complex-cyanine 5.5 (PerCP-Cy5.5)-labeled anti-human CD3 (clone SK7) monoclonal antibody (mAb), phycoerythrin (PE)-labeled anti-human CD4 (clone OKT4) mAb, fluorescein isothiocyanate (FITC)-labeled anti-human CD8 (clone SK1) and anti-HLA-A2 (clone BB7.2) mAbs, and PerCP-Cy5.5-, PE-, FITC-labeled isotype control (clone MOPC-21) mAbs, and human recombinant IL-2 were purchased from BioLegend, Inc. (San Diego, CA, USA). PE-labeled anti-human CD25 (clone M-A251) mAb and 7-amino-actinomycin-D (7-AAD) were acquired from BD Biosciences (San Jose, CA, USA). Alexa Fluor 594-labeled goat anti-IgG mouse antibody was obtained from Molecular Probes-Life Technologies (Eugene, OR, USA). Human  $\beta_2$  microglobulin ( $\beta_2m$ ) and mouse anti-CA 27-29 (clone M4021209, specific for SAPDTRPA) mAb were obtained from Fitzgerald Industries International (Acton, MA, USA). Blood DNA isolation and Fastype HLA-DNA SSP Typing system kits were provided by Bio-Synthesis Inc. (Lewisville, TX, USA). Lymphoprep™ (Ficoll 1.077 density) was from Axis-Shield PoC As (Oslo, Norway). CD8<sup>+</sup> T cell negative isolation kit in a magnetic antibody cell sorting (MACS) system containing biotin-labeled antibodies to human CD4, CD15, CD16, CD19, CD34, CD36, CD56, CD123, TCR- $\gamma\delta$ , CD235a (glycophorin A) and magnetic microbeads coated with mouse Abs against biotin and human CD14; as well as mAbs to human CD2, CD3 and CD28 from the T cell activation/expansion kit were from Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach, Germany). Fetal bovine serum (FBS; Performance Plus), penicillin, streptomycin, L-glutamine and recombinant *Taq* DNA polymerase were purchased from Gibco-Life Technologies (Rockville, MD, USA). Carboxyfluorescein succinimidyl ester (CFSE) was from Invitrogen (Camarillo, CA, USA). Vectashield mounting medium with DAPI was from Vector Laboratories, Inc. (Burlingame, CA, USA). RPMI-1640

culture medium, bovine serum albumin fraction V (BSA), ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA), dimethyl sulfoxide, agarose, ethidium bromide, trypan blue dyes, and salt reagents were obtained from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA).

**Peptides.** The SAPDTRPA-human mucin 1 (MUC1-8-mer peptide), GILGFVFTL-influenza A virus matrix protein-1<sub>58-66</sub> (IVMP1-9-mer peptide), and SIINFEKL-chicken ovalbumin<sub>257-264</sub> (OVA-8-mer peptide) (15-17) were synthesized by the Instituto de Biotecnología at the Universidad Nacional Autónoma de México in Cuernavaca (Morelos, Mexico) on a 430A multiple peptide synthesizer (Applied Biosystems, San Diego, CA, USA) according to commercially available manufacturer's protocols. The affinity of these peptides for the HLA-A2 molecule was confirmed by NetMHC 3.4 Server software (18). The purity of the peptides was >95%, and their molecular weights were assessed by high performance liquid chromatography and confirmed by mass spectrometry. The peptides were dissolved in dimethyl sulfoxide at a concentration of 10 mg/ml and stored at -70°C until required.

**Cells.** Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) were isolated from 20 ml heparinized whole blood by Ficoll density gradient centrifugation for 30 min at 360 g and 10°C (19). After centrifugation, the interface cells were collected, washed twice in RPMI-1640 medium, and counted in a Neubauer chamber to assess cell viability via the trypan blue dye exclusion test.

The human T2 cell line was obtained from the American Type Culture Collection (ATCC, CRL-1992™; Manassas, VA, USA). T2 cells express an HLA-A2 molecule that lacks TAP function, so it can easily be loaded with exogenous peptides for CD8<sup>+</sup> T cell recognition (20). The T2 cell line was cultured in RPMI-1640 medium supplemented with 20% heat-inactivated FBS, 100  $\mu$ g/ml streptomycin, 100 U/ml penicillin, and 2 mM L-glutamine (20% FBS supplemented-RPMI medium) at 37°C in a humidified atmosphere containing 5% CO<sub>2</sub>.

**Purification of CD8<sup>+</sup> T cells.** Cytotoxic CD8<sup>+</sup> T cells were isolated from PBMCs by a negative magnetic selection kit (Miltenyi Biotec). Briefly, PBMCs (1x10<sup>7</sup> cells) were suspended in 40  $\mu$ l phosphate-buffered saline (PBS: 0.01 M sodium phosphate, 0.15 M sodium chloride, pH 7.2) supplemented with 0.5% BSA and 2 mM EDTA and incubated with biotin-antibodies to human leukocyte phenotype molecules for 10 min at 4°C, followed by a second incubation with magnetic microbeads coated with mouse Abs against biotin and human CD14 for an additional 15 min at 4°C. The purity percentage for magnetically unlabeled CD8<sup>+</sup> T cells was always >95%, as determined by flow cytometry via incubation with PE-Cy5.5-anti-human CD3, PE-anti-CD4, and FITC-anti-CD8 mAbs for 30 min at 4°C. The magnetically labeled CD8<sup>+</sup> T cells were used to identify HLA-A2 alleles.

**DNA typing for the HLA-A2 allele.** Genomic DNA was extracted from CD8<sup>+</sup> T cells by a blood DNA isolation kit (Bio-Synthesis) according to the manufacturer's instructions. The total DNA concentration was quantified by spectrophotometry at 260 and 280 nm using an ASP-2680 spectrophotometer (ACTGene Inc., Piscataway, NJ, USA). The DNA was suspended in 100  $\mu$ l of the elution buffer and

stored at  $-20^{\circ}\text{C}$  until use. Molecular typing was performed with the polymerase chain reaction (PCR) sequence-specific primer (SSP) technique using a Fastype HLA-DNA SSP Typing system kit (Bio-Synthesis). For HLA-A typing, 24 primer pairs were used at a low-resolution modality. Briefly, PCR amplifications were carried out on  $1.8\ \mu\text{g}$  of genomic DNA in a  $24\text{-}\mu\text{l}$  reaction volume containing 50 mM KCl, 10 mM Tris-Cl, pH 8.3 and 1.5 mM  $\text{MgCl}_2$ ;  $60\ \mu\text{M}$  of each dNTP (21). Samples were subjected to 20 cycles at  $94^{\circ}\text{C}$  for 20 sec for denaturing, 20 cycles at  $61^{\circ}\text{C}$  for 50 sec for annealing, and 20 cycles at  $72^{\circ}\text{C}$  for 30 sec for extension using an automated thermal cycler (GeneAmp PCR system 9700; Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). An additional hold of  $94^{\circ}\text{C}$  for 20 sec and then 10 cycles at  $65^{\circ}\text{C}$  for 1 min were added to the denaturing step before the first cycle. After the last cycle, the extension step received an additional 5 min at  $72^{\circ}\text{C}$ . The amplifications were achieved using recombinant *Taq* DNA polymerase. The integrity of amplified PCR SSP products was assessed by submarine 2% agarose gel electrophoresis and staining with 0.01 mg/ml ethidium bromide for 40 min. Each DNA sample was then visualized in a dual intensity ultraviolet (UV) light transilluminator (UVP Inc., Upland, CA, USA) and analyzed with the Kodak EDAS-290 gel documentation system (Kodak, Rochester, NY, USA) according to the electrophoretic migration of the DNA sample compared with the internal control primer pair specific for the human G3PDH gene (Bio-Synthesis). The results were interpreted following the instructions on the typing sheets from the procedure guide.

*Peptide loading on the T2 cell line.* The HLA-A2-binding ability of the MUC1-8-mer peptide was assessed by HLA-A2 membrane stabilization on the T2 cell line according to a previously described method (13). In brief, T2 cells ( $2 \times 10^5$ ) were placed in flat-bottomed, 96-well cell culture plates (Thermo Scientific Nunc, Roskilde, Denmark) in 10% FBS supplemented-RPMI medium and incubated with both MUC1-8-mer peptide ( $100\ \mu\text{g}/\text{ml}$ ) and human  $\beta_2\text{m}$  ( $20\ \mu\text{g}/\text{ml}$ ) for 24 h at  $37^{\circ}\text{C}$  in 5%  $\text{CO}_2$  atmosphere. The optimal dose of both  $\beta_2\text{m}$  and the MUC1-8 peptide was previously obtained from different concentrations tested. The T2 cells incubated either with the HLA-A2 restricted IVMP1-9-mer or the OVA-8-mer peptides were used as positive controls (16,17), whereas cells cultured in the absence of the MUC1-8-mer peptide were considered to be the negative control. After incubation, T2 cells were washed twice with PBS containing 0.2% BSA and sodium azide (PBS-BSA buffer) and stained with FITC-anti-HLA-A2 mAb for 30 min at  $4^{\circ}\text{C}$ . Finally, the cells were analyzed by flow cytometry where the HLA-A2 expression on T2 cells was evaluated as the mean fluorescence intensity (MFI), which was calculated by obtaining the MFI difference between cells incubated in the presence or absence of the MUC1-8-mer peptide.

*Flow cytometry.* Cells were acquired using a FACScan flow cytometer (Becton Dickinson, San Jose, CA, USA) and analyzed with FlowJo software version 8.7.7. (Tree Star Inc., Ashland, OR, USA). To analyze the immunofluorescence staining of cell-surface molecules, 25,000 events were counted in linear mode for both forward scatter (FSC) and side scatter

(SSC). Cells were then gated by their physical properties (FSC and SSC) and analyzed with log amplification for immunofluorescence. Data are presented as histograms or two-dimensional dot-plots. Fluorescent staining-labeled isotype-matched control mAbs were used to assess background staining.

*Confocal microscopy.* T2 cells ( $2 \times 10^5$ ) were cultured in 8-well microchamber glass slides (BD Falcon™, Bedford, MA, USA) in 10% FBS supplemented-RPMI medium and incubated with MUC1-8 peptide plus  $\beta_2\text{m}$  for 24 h under the conditions as described above. After the culture, the cells were washed twice with PBS containing 1% BSA and 0.2% sodium azide and incubated with Alexa Fluor 594-labeled goat anti-mouse IgG mAb for 30 min after incubation with the anti-CA 27-29 mAb for 2 h at  $4^{\circ}\text{C}$ . A second staining was performed with FITC-labeled anti-HLA-A2 mAb for 30 min at  $4^{\circ}\text{C}$ . Cells incubated with the FITC-isotype control and the Alexa Fluor 594 secondary antibody, were used as controls. For colocalization analysis, the cells were fixed in 1% p-formaldehyde, and the slides were mounted in Vectashield with DAPI diluted 1:3 in PBS. Fluorescence images were acquired with an LSM-510 Zeiss confocal microscope (Carl Zeiss, Oberkochen, Germany) using a 63X objective lens. All images were captured under the same exposure, magnification and intensification. The digital images were processed by ImageJ software (Wayne Rasband, NIH, Bethesda, MA, USA) and analyzed using Mander's coefficient (22). Finally, the images were clarified by Adobe Photoshop CS2 software (Adobe Systems, Agrate Brianza, Italy).

*In vitro activation and expansion of CD8<sup>+</sup> T cells by MUC1-8-mer peptide-loaded T2 cells.* MUC1-8-mer peptide-loaded T2 cells were used as APCs to activate freshly obtained CD8<sup>+</sup> T cells from lung adenocarcinoma patients or healthy controls, using a modified method described by Jaramillo *et al* (13). In brief, T2 cells ( $2 \times 10^5$ ) were cultured with the MUC1-8-mer peptide plus  $\beta_2\text{m}$  for 24 h, as described above. Cells were then harvested, washed in the culture medium, and fixed in 1% p-formaldehyde for 30 min at  $4^{\circ}\text{C}$ . After washing, fixed T2 cells were cultured with CD8<sup>+</sup> T cells ( $4 \times 10^5$ ) in 96-well plates in 10% FBS-supplemented RPMI medium in the presence of  $2\ \mu\text{l}$  of bead particle-coupled anti-CD2 and anti-CD28 mAbs from a T cell activation/expansion system (Miltenyi Biotec) for 6 days at  $37^{\circ}\text{C}$  in a 5%  $\text{CO}_2$  atmosphere. Human recombinant IL-2 ( $20\ \text{U}/\text{ml}$ ) was added after 3 days of cell culture, when half of the culture medium supernatant was removed and the well was replenished with fresh 10% FBS-supplemented RPMI medium. CD8<sup>+</sup> T cells cultured with MUC1-8-mer peptide loaded-T2 cells, and CD8<sup>+</sup> T cells with anti-CD2 and anti-CD28 mAbs were used as the specific-antigen CD8<sup>+</sup> T cell stimulation control. CD8<sup>+</sup> T cells only activated with mAbs to CD3, CD2, and CD28 were used as the unspecific-antigen CD8<sup>+</sup> T cell stimulation positive control. At the end of the culture, CD8<sup>+</sup> T cells were harvested, washed in a PBS-BSA buffer, and stained with FITC-anti-CD8 and PE-anti-CD25 mAbs for 30 min at  $4^{\circ}\text{C}$ . To exclude dying cells before acquisition in a flow cytometer, cells were additionally incubated in a 7-AAD staining solution for 15 min at  $4^{\circ}\text{C}$ , washed in PBS-BSA buffer and analyzed by flow cytometry.

Table I. General data of the non-small cell lung adenocarcinoma patients and healthy controls.

| Participant | Gender/age (years) | HLA-A2 | Stage/classification | Histopathology for MUC1 |
|-------------|--------------------|--------|----------------------|-------------------------|
| HC1         | M/38               | -      | -                    | -                       |
| HC2         | M/59               | -      | -                    | -                       |
| HC3         | F/34               | -      | -                    | -                       |
| HC4         | F/62               | -      | -                    | -                       |
| HC5         | M/59               | -      | -                    | -                       |
| HC6         | F/62               | +      | -                    | -                       |
| HC7         | F/59               | +      | -                    | -                       |
| HC8         | M/64               | +      | -                    | -                       |
| HC9         | M/51               | +      | -                    | -                       |
| HC10        | M/63               | +      | -                    | -                       |
| P1          | F/74               | -      | T4N3M3               | +                       |
| P2          | M/53               | -      | T4N3M0               | +                       |
| P3          | F/62               | +      | T4N3M0               | +                       |
| P4          | F/74               | +      | T4N3M1               | +                       |
| P5          | M/53               | +      | T4N2M0               | +                       |
| P6          | M/71               | +      | T4N3M2               | +                       |
| P7          | M/51               | +      | T3N2M0               | +                       |
| P8          | F/69               | +      | T3N2M0               | +                       |
| P9          | F/66               | +      | T3N3M1               | +                       |

HC, healthy control; P, patient; M, male; F, female; TNM, tumor node metastasis; + abnormal overexpression of MUC1 in the histopathological study.

Table II. HLA-A2 peptide binding predictions of the NetMHC 3.4 Server software.

| Peptide name | Sequence  | Logscore | Affinity (nM) | Binding level |
|--------------|-----------|----------|---------------|---------------|
| MUC1-8-mer   | SAPDTRPA  | 0.073    | 22,690        | Medium        |
| OVA-8        | SIINFEKL  | 0.206    | 5,377         | Medium        |
| IVMPI-9      | GILGFVFTL | 0.769    | 12            | Strong binder |

Binding scores were estimated using NetMHC 3.4 software ([www.cbs.dtu.dk/services/NetMHC/](http://www.cbs.dtu.dk/services/NetMHC/)): Strong binder threshold, 50 nM; weak binder threshold, 500 nM (18).

For clonal expansion detection, the CD8<sup>+</sup> T cells suspended in RPMI-1640 medium were stained with 15  $\mu$ l of 0.5 mM CFSE (prepared from a 5-mM stock solution dissolved in dimethyl sulfoxide) for 15 min at 37°C in darkness (23). After incubation, the cells were washed twice in 10 ml of 10% FBS-supplemented RPMI medium and the cell viability was evaluated by trypan blue dye exclusion test. CFSE-labeled CD8<sup>+</sup> T cells ( $4 \times 10^5$ ) were then cultured with fixed MUC1-8-mer peptide-loaded T2 cells ( $2 \times 10^5$ ) in the presence of costimulatory antibodies plus IL-2 (added every third day) for 10 days. An additional stimulation of CD8<sup>+</sup> T cells was carried out through adding fixed MUC1-8-mer peptide-loaded T2 cells ( $2 \times 10^5$ ) on day 7 of culture

after removing half of the culture medium supernatant and replenishing the well with fresh 10% FBS-supplemented RPMI medium.

*Statistical analysis.* The entire analysis was performed by STATA™ 10 software using a Shapiro-Wilk test to identify population distributions. Because the variables were asymmetrically distributed, a Wilcoxon rank-sum (Mann-Whitney) test was carried out for their comparison. Values are shown as median (md) and interquartile range (iqr). Some data showed symmetry; thus, they were analyzed using the Student's t-test, and the values are displayed as mean  $\pm$  standard deviation. Differences between groups were considered statistically significant at  $P < 0.05$ .

## Results

*Patient characteristics.* The mean patient group age was  $63.67 \pm 10.7$  years (range, 51-74 years); among these, 4 were male (44%) and 5 were female (56%); 7 out of 9 patients were HLA-A2<sup>+</sup>. Four of the patients had metastasis; 6 of the 9 total patients presented with tumor stage IV, whereas the remaining 3 had tumor stage III (Table I). The control group mean age was  $59.1 \pm 9.3$  years (range, 34-64 years); 6 were male and 4 female.

*MUC1-8-mer peptide plus  $\beta_2m$  increases the expression of HLA-A2 molecules on the T2 cell surface.* The HLA-A2-specific affinity of the MUC1-8-mer peptide to T2 cells was predicted by NetMHC 3.4 software (18), and compared to the affinity

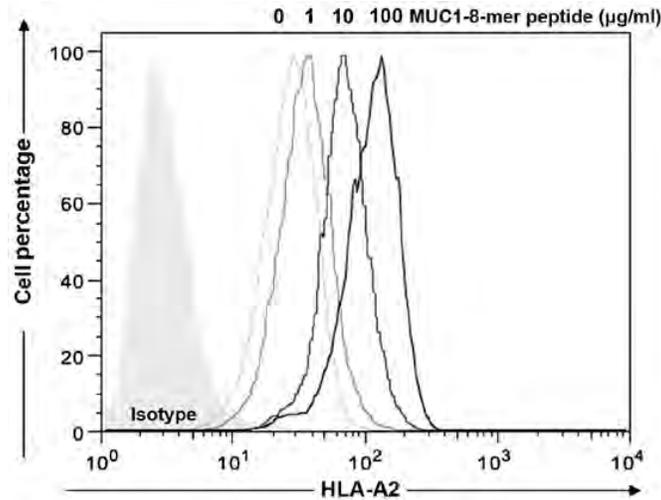


Figure 1. HLA-A2 expression on the T2 cell surface is dose-dependent on the MUC1-8 peptide concentration. T2 cells were incubated with MUC1-8-mer peptide concentrations ranging from 0 to 100  $\mu\text{g/ml}$  in the presence of  $\beta_2\text{m}$  (20  $\mu\text{g}$ ) for 24 h at 37°C in a 5%  $\text{CO}_2$  atmosphere. After peptide loading, the T2 cells were harvested, washed, and stained with FITC-labeled anti-HLA-A2 mAb for flow cytometry. A representative histogram was constructed where the x-axis denotes the HLA-A2 fluorescence intensity of the T2 cells, and the y-axis indicates the cell percentage.

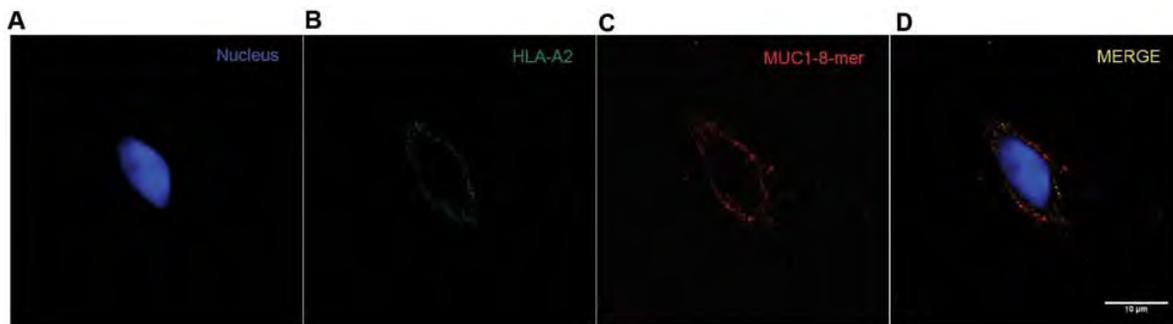


Figure 2. Colocalization of the HLA-A2 molecule with the MUC1-8-mer peptide on the T2 cell surface. T2 cells were loaded with the MUC1-8-mer peptide (100  $\mu\text{g}$ ) in the presence of  $\beta_2\text{m}$  (20  $\mu\text{g}$ ) for 24 h at 37°C in a 5%  $\text{CO}_2$  atmosphere. The T2 cells were then harvested, washed, stained with FITC-labeled anti-HLA-A2 and Alexa Fluor 594-labeled goat anti-mouse IgG mAb after anti-CA 27-29 mAb (specific for SAPDTRPA), and prepared for confocal microscopy. (A) Image from one cell with DAPI nuclear staining (blue), (B-D) Same images as (A) where the HLA-A2 molecule is stained green (B), the MUC1-8-mer peptide is stained red (C), and the image merged by triple immunofluorescence (D), revealing colocalization (yellow) between HLA-A2 molecule and MUC1-8-mer peptide. Images were visualized using an LSM-510 Zeiss confocal microscope. Data shown are representative of two individual experiments. Scale bar, 10  $\mu\text{m}$ .

of the well-recognized HLA-A2-specific IVMP1-9-mer and OVA-8-mer epitopes (Table II). T2 cells pulsed with the MUC1-8-mer peptide in the presence of  $\beta_2\text{m}$  showed an increase in HLA-A2 molecule expression in a dose-dependent manner (0, 1, 10 and 100  $\mu\text{g}$ ); the basal value was  $31.6 \pm 12.7$ ; for 1  $\mu\text{g/ml}$  peptide the value increased to  $40.3 \pm 18.9$ ; for 10  $\mu\text{g/ml}$ ,  $77.1 \pm 32.3$  and for 100  $\mu\text{g/ml}$ ,  $123 \pm 52$ , respectively (Fig. 1). Concentrations >100  $\mu\text{g/ml}$  of the MUC1-8-mer peptide did not increase HLA-A2 expression on the T2 cells. Therefore MUC1-8-mer peptide at 100  $\mu\text{g/ml}$  was considered as the optimal concentration for expression of HLA-A2 molecules and this was the concentration used in all the subsequent experiments.

*MUC1-8-mer peptide and the HLA-A2 molecule colocalize on the T2 cell surface.* To confirm the assembly of the MUC1-8-mer peptide-HLA-A2 complex onto the T2 cell

surface, an anti-CA 27-29 mAb (antibody specific for the SAPDTRPA peptide sequence) was used together with the anti-HLA-A2 mAb. The analysis of the overlap of fluorescent emissions from the green channel (HLA-A2) and the red channel (MUC1-8-mer peptide) on the T2 cell membrane showed significant values for the Mander's coefficient, which were from 0.04 to 1 (22). As shown in Fig. 2, one T2 cell is shown separately in the green and red channels; in the third image, both fluorescence emissions are merged (yellow color) and distributed along the cell membrane, indicating that the MUC1-8-mer peptide is found in the same place as the HLA-A2 molecule (22).

*MUC1-8-mer peptide-loaded T2 cells plus costimulatory antibodies induce activation and expansion of  $\text{CD8}^+$  T cells from HLA-A2 patients.* The percentage of  $\text{CD25}^+\text{CD8}^+$  T cells after stimulated with the T2 cell-MUC-1-8-mer complex and

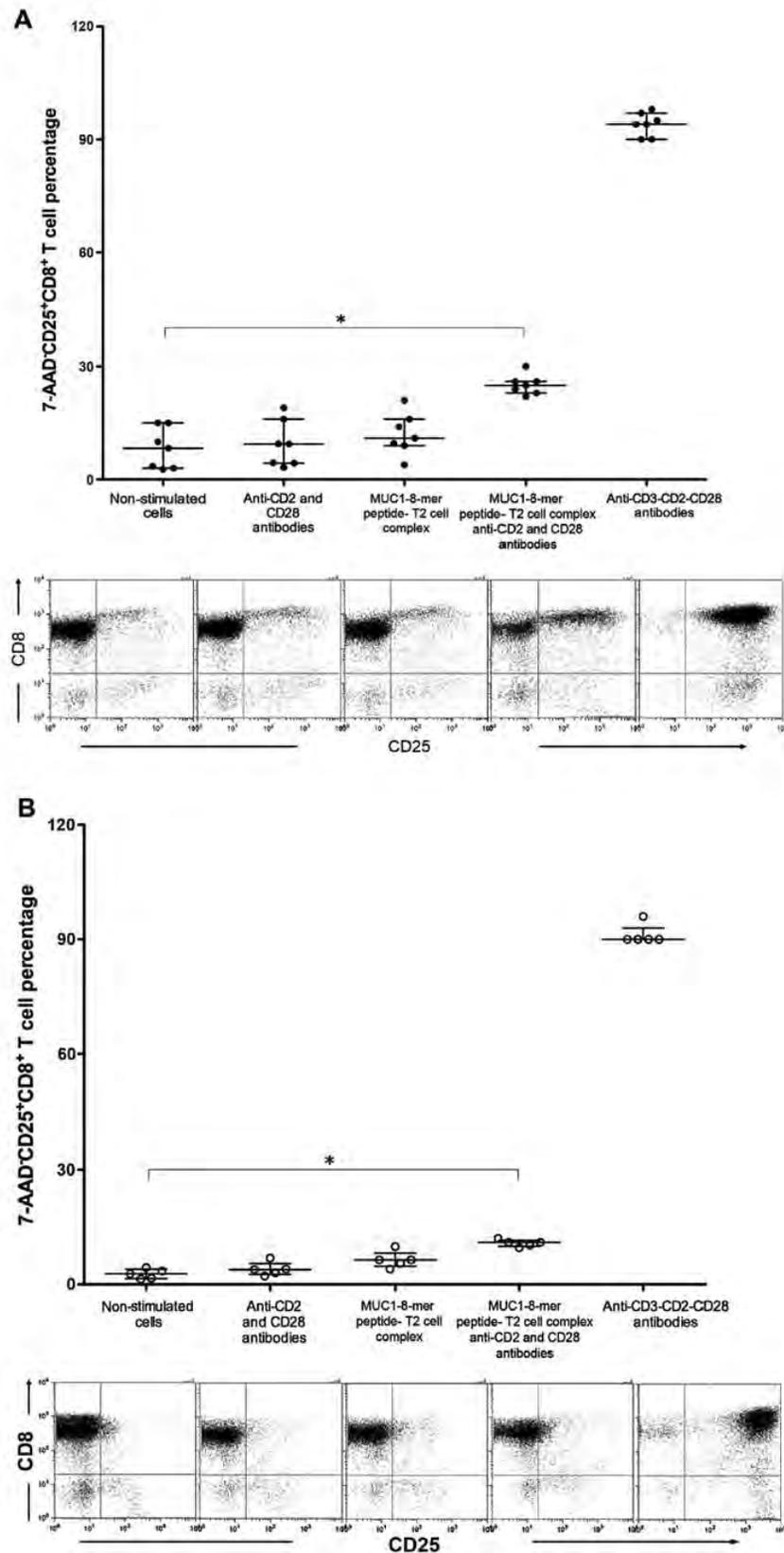


Figure 3. MUC1-8-mer peptide-T2 cell complex induces CD25 expression on CD8<sup>+</sup> T cells from HLA-A2<sup>+</sup> lung adenocarcinoma patients and healthy individuals. Purified CD8<sup>+</sup> T cells from patients (A) or healthy individuals (B) were cultured under the different indicated conditions over 6 days. Cells were harvested, stained with FITC-labeled anti-CD8 and PE-labeled anti-CD25 mAbs, and analyzed using flow cytometry (images are shown in panels below each condition). An additional incubation with 7-aminoactinomycin-D (7-AAD) was performed to exclude any dying cells. Each solid circle denotes a sample from one patient, whereas an open circle represents a sample from one healthy control. \*P<0.05.

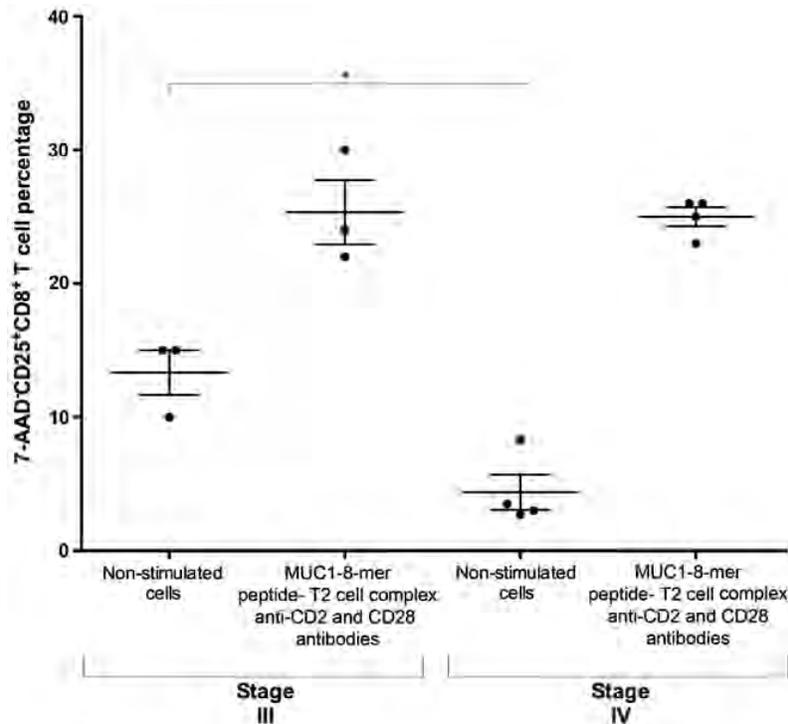


Figure 4. Similar increase in CD25<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> T cells from HLA-A2<sup>+</sup> patients with stage III or IV tumor disease progression after stimulation by the MUC1-8-mer peptide-T2 complex and costimulatory antibodies. Purified CD8<sup>+</sup> T cells from patients with stage III or IV were cultured with MUC1-8-mer peptide loaded-T2 cells and costimulatory antibodies to CD28 and CD2 plus IL-2 over 6 days. The cells were harvested, washed and stained with FITC-labeled anti-CD8 and PE-labeled anti-CD25 mAbs, and analyzed using flow cytometry. An additional incubation with 7-aminoactinomycin-D (7-AAD) was performed to exclude dying cells. Each circle denotes a sample from one patient. \*P<0.03.

anti-CD2 and CD28 was 4.2-fold higher in the HLA-A2<sup>+</sup> patients than those from the HLA-A2<sup>-</sup> patients (md 25%, iqr 22-30 vs. md 6%, iqr 5.3-6.7).

In the HLA-A2<sup>+</sup> patients, the percentage of CD25<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> T cells stimulated with anti-CD2 and anti-CD28 or the MUC1-8-mer-T2 cell complex was identical to that observed in the non-stimulated CD8<sup>+</sup> T cells; notably when the CD8<sup>+</sup> T cells were stimulated with the MUC-1-8-mer T2 cell complex and anti CD2-CD28 mAbs, there was a 3-fold increase compared to the non-stimulated cells (md 25.0%, iqr 22-30 vs. md 8.3%, iqr 3.7-15, P=0.018) (Fig. 3A). Similarly, the proportions of CD25-expressing CD8<sup>+</sup> T cells from HLA-A2<sup>+</sup> healthy controls showed an identical behavior but with lower values (md 11%, iqr 9.6-12 stimulated cells vs. md 2.8%, iqr 1.4-4.4 non-stimulated cells, P=0.018) (Fig. 3B). Non-stimulated CD8<sup>+</sup> T cells from HLA-A2<sup>+</sup> patients showed that there was dispersion in the percentages of CD25<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> T cells (Fig. 3A), therefore samples from cancer patients were divided according to their TNM classification (14). Fig. 4 shows that non-stimulated cells from patients with stage III cancer exhibited a higher proportion of CD25 expression than non-stimulated cells from patients with stage IV (md 15%, iqr 10-15 vs. md 3.2%, iqr 2.7-8.3, P=0.03). Notably, the proportion of CD25<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> T cells was similar in both patient groups after stimulation with the MUC1-8-mer peptide-T2 cell complex in the presence of anti-CD2 and anti-CD28 mAbs plus IL-2 (md 24%, iqr 22-30 vs. md 25.5%, iqr 23-26, respectively). In contrast, the polyclonal activation of CD8<sup>+</sup> T cells from healthy controls

and patients with anti-CD3, anti-CD28 and anti-CD2 showed similar activation values, but the expression intensity of CD25<sup>+</sup> cells was lower in the cancer patients (Fig. 3).

To evaluate the proliferative response of antigen-specific cells, restimulation of CD8<sup>+</sup> T cells with the MUC1-8-mer peptide-T2 complex was performed after 7 days of culture. Three days later, the cells were fixed and clonal expansion was determined by CFSE treatment. Fig. 5A shows the proliferative response of CFSE-labeled CD8<sup>+</sup> T cells specific to the MUC1-8-mer peptide. This cell population had a 77.6% increase after the restimulation in comparison to the 26.7% observed in CFSE-labeled CD8<sup>+</sup> T cells activated with the MUC1-8-mer peptide-T2 complex plus anti-CD2 and anti-CD28 antibodies (Fig. 5B).

## Discussion

Conventional treatments against lung cancer are unsatisfactory in most cases, thus a more effective therapy for the removal of tumor cells is urgent (24,25). Adoptive T cell therapy has shown promising results as a treatment strategy for cancer patients (5). However, the challenge that faces this type of therapy is the *ex vivo* activation and expansion of CTLs from a limited number of peripheral blood mononuclear cells from patients with advanced cancer (26). The identification of immunogenic TAA epitopes and selection of appropriated APCs are crucial to activate tumor-specific CTLs (6,27). Our results confirmed the binding of the MUC1-8-mer peptide into

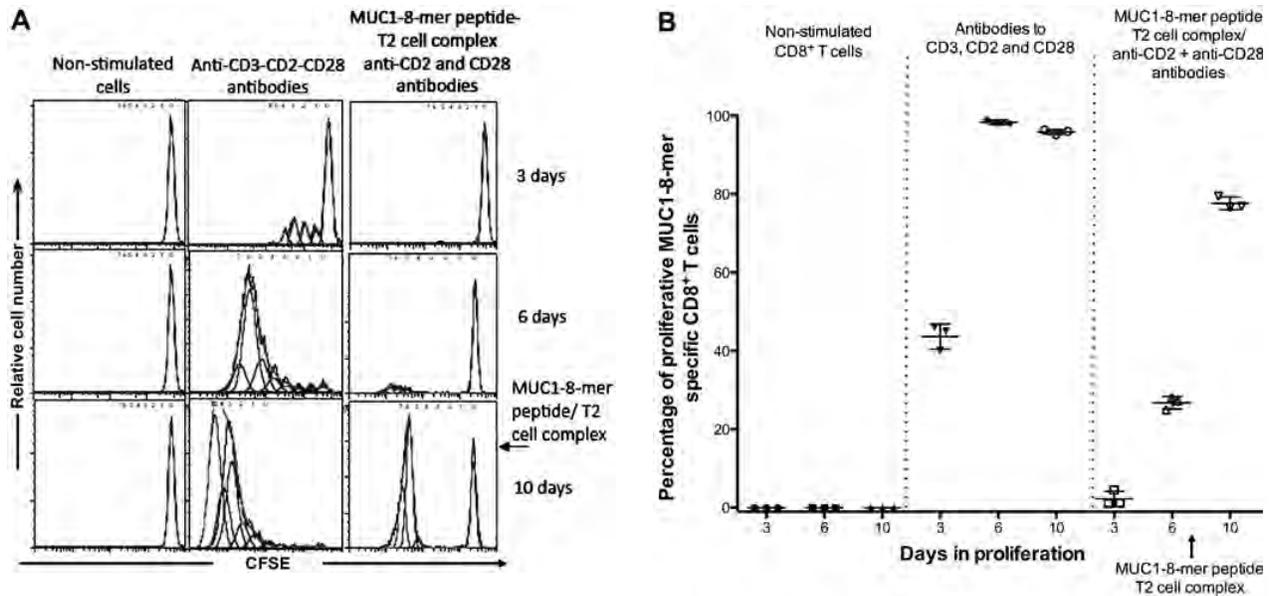


Figure 5. Expansion of antigen-specific CD8<sup>+</sup> T cells after restimulation by the MUC1-8-mer peptide-T2 complex. CFSE-labeled CD8<sup>+</sup> T cells from HLA-A2<sup>+</sup> patients were cultured for 10 days under the indicated times and conditions. (A) Histograms show the CFSE intensity of the non-divided cell population in the absence of stimulus (left panels), and cells that have divided numerous times based on sequential fluorescence intensity (middle panels), as well as antigen-specific cells restimulated with the MUC1-8-mer peptide-T2 complex (right panels). (B) Graphic image showing the CD8<sup>+</sup> T cell proliferation percentage on different days of culture under the conditions indicated.

$\beta_2m$  established T2 cells according to MHC-binding epitope predicting analysis (11). Type 1 mucin (MUC1) is an important TAA in adenocarcinomas; diverse MUC1-derived peptides have been used to induce a CD8<sup>+</sup> CTL response in patients with adenocarcinomas (6). Among MUC1-derived peptides, the MUC1-8-mer peptide SAPDTRPA has been shown to be an immunogenic epitope that activates murine T cells (10). The advantage of T2 cells is that they lack TAP function and consequently they have empty and unstable HLA-A2 molecules (20). This characteristic gives them a potential advantage as APC peptides can be loaded exogenously onto the HLA-A2 molecules to activate TAA-specific CTLs (12,13). The use of autologous monocyte-derived DCs as APCs would be ideal to generate efficient costimulatory and antigen-specific signals for activation of autologous T cells (11). However, the number of functional monocyte-derived DCs from cancer patients is low in long lasting cultures due to their limited replicative potential (5).

Our results indicated that the MUC1-8-mer peptide-T2 complex only induced activation of purified CD8<sup>+</sup> T cells when anti-CD28 and anti-CD2 antibodies plus IL-2 were added to the cell culture. The additional costimulation generated by beads coupled with anti-CD2 and anti-CD28 antibodies and recombinant IL-2 allowed clonal expansion of MUC1-8 peptide-specific CD8<sup>+</sup> T cells isolated from HLA-A2 adenocarcinoma patients. The antibodies to costimulatory molecules induce formation of actin filaments between the beads and CD8<sup>+</sup> T cell surface mimicking the immunological synapsis between APCs and T cells (28,29). Our results also showed that the activation of MUC1-8 peptide-specific CD8<sup>+</sup> T cells was similar to those from different activation systems using other MUC1-derived epitopes (30-33). This finding confirms

reports in which CD8<sup>+</sup> T cells from HLA-A2<sup>+</sup> healthy donors recognize distinct MUC1-derived peptides (11,31,33). Mammaglobulin A-derived peptides loaded into T2 cells stimulated with soluble anti-CD28 antibodies plus recombinant human IL-2 have been used to activate HLA-A2<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> T cells in breast cancer patients (13). However, in this system, expansion of CTLs required necessarily, several weekly restimulations to maintain the activity against diverse cell lines (13). Our results were similar but opposed to Jaramillo *et al* (13), as we evaluated the percentage of proliferative cells.

Notably, we observed the preexistence of CD8<sup>+</sup> T cells reactive to the MUC1-8 peptide in HLA-A2<sup>+</sup> patients as well as in HLA-A2<sup>+</sup> healthy controls; the latter could be because the MUC1-8 peptide has been shown to be highly immunogenic in a murine model (10), thus suggesting that there is a basal T cell population recognizing MUC1 in healthy individuals. The proportion of CD8<sup>+</sup> T cells from HLA-A2<sup>+</sup> healthy controls activated by MUC1-8 peptide-loaded T2 cells was significantly lower than those from HLA-A2<sup>+</sup> cancer patients after 6 days of culture. This suggests that MUC1-recognizing T cells in healthy individuals are capable of continuously limiting the development of a tumor whereas in adenocarcinoma patients this ability has been lost probably as a result of the immunosuppressive environment that has been well established (34-36).

Our results also showed that the proportions of CD25<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> non-stimulated T cells isolated from stage III and IV patients were significantly different, but that after stimulation with the MUC1-8-mer peptide T2 complex in the presence of anti-CD2 and CD28 antibodies the same amount of CD25<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> T cells was induced. This confirms that the potential to respond to APCs is maintained in both stages, but the amount

of CD25 expression in the stage IV cells was diminished, as possibly the cells keep their ability to respond to an external antigen-presenting system (37). The range of possible explanations include different cytokine environment (34-36); rescue of the cell signaling mechanism by the direct and continuous contact with the anti-CD28 antibody that surpasses the inhibitory signal mediated by CTLA-4 as observed in CD4<sup>+</sup> T cells (38); lack of contact with Treg cells as the experiments were performed *in vitro*, or tumor progression (35,36,39). Ongoing experiments are being performed in our laboratory to try to determine a possible mechanism.

Taken together, we modified an *in vitro* system that uses MUC1-8 peptide-pulsed T2 cells and improved it through the stimulation of CD8<sup>+</sup> T cell costimulatory molecules, such as CD2 and CD28. Under these conditions, we found that preexistent MUC1-specific CD8<sup>+</sup> T cells from HLA-A2<sup>+</sup> lung adenocarcinoma patients and HLA-A2<sup>+</sup> healthy controls were efficiently activated. The specificity of this system allowed us to distinguish between cancer patients and healthy individuals. Furthermore, clonal expansion of MUC1-specific CD8<sup>+</sup> T cells from cancer patients occurred independently of tumor disease progression. This activation system could be an innovative tool to induce and expand tumor-specific CTLs from HLA-A2<sup>+</sup> patients with adenocarcinoma.

#### Acknowledgements

We thank Dr Demetrio Bernal-Alcántara and Dr Raúl Mancilla for technical assistance and helpful discussions. We also thank Dr Rafael Wong Michell and Ing. Julio César Miranda Amador for substantial collaboration on the development of the project. This study was supported by Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) Project SALUD-2012-01-180516 and student scholarship 245173 from Red Temática Glicociencia en Salud 253596 del CONACYT, Mexico. This article is part of the requirements for obtaining the degree of PhD for José Agustín Atzin Méndez in the program of Doctorado en Ciencias Biológicas at the Facultad de Medicina of the Universidad Nacional Autónoma de México, Mexico.

#### References

- Nakamura H and Saji H: Worldwide trend of increasing primary adenocarcinoma of the lung. *Surg Today* 44: 1004-1012, 2014.
- Siegel RL, Miller KD and Jemal A: Cancer statistics, 2015. *CA Cancer J Clin* 65: 5-29, 2015.
- Abbas AK, Lichtman AH and Pillai S: Cellular and Molecular Immunology, 8th edition. Elsevier Saunders, Philadelphia, PA, pp109-220, 2015.
- Vesely MD, Kershaw MH, Schreiber RD and Smyth MJ: Natural innate and adaptive immunity to cancer. *Annu Rev Immunol* 29: 235-271, 2011.
- June CH: Principles of adoptive T cell cancer therapy. *J Clin Invest* 117: 1204-1212, 2007.
- Turtle CJ and Riddell SR: Artificial antigen-presenting cells for use in adoptive immunotherapy. *Cancer J* 16: 374-381, 2010.
- Roulois D, Grégoire M and Fonteneau JF: MUC1-specific cytotoxic T lymphocytes in cancer therapy: Induction and challenge. *Biomed Res Int* 2013: 871936, 2013.
- Singh R and Bandyopadhyay D: MUC1: A target molecule for cancer therapy. *Cancer Biol Ther* 6: 481-486, 2007.
- Madurga S, Belda I, Llorà X and Giralt E: Design of enhanced agonists through the use of a new virtual screening method: Application to peptides that bind class I major histocompatibility complex (MHC) molecules. *Protein Sci* 14: 2069-2079, 2005.

- Koido S, Enomoto Y, Apostolopoulos V and Gong J: Tumor regression by CD4 T-cells primed with dendritic/tumor fusion cell vaccines. *Anticancer Res* 34: 3917-3924, 2014.
- Ninkovic T, Kinarsky L, Engelmann K, Pisarev V, Sherman S, Finn OJ and Hanisch FG: Identification of O-glycosylated decapeptides within the MUC1 repeat domain as potential MHC class I (A2) binding epitopes. *Mol Immunol* 47: 131-140, 2009.
- Bossi G, Gerry AB, Paston SJ, Sutton DH, Hassan NJ and Jakobsen BK: Examining the presentation of tumor-associated antigens on peptide-pulsed T2 cells. *Oncoimmunology* 2: e26840, 2013.
- Jaramillo A, Narayanan K, Campbell LG, Benschoff ND, Lybarger L, Hansen TH, Fleming TP, Dietz JR and Mohanakumar T: Recognition of HLA-A2-restricted mammaglobin-A-derived epitopes by CD8<sup>+</sup> cytotoxic T lymphocytes from breast cancer patients. *Breast Cancer Res Treat* 88: 29-41, 2004.
- Sobin LH, Gospodarowicz MK and Witterkind C: The TNM Classification of Malignant Tumours, 7th edition. Wiley-Blackwell, Oxford, pp211-230, 2009.
- Apostolopoulos V, Yu M, Corper AL, Li W, McKenzie IF, Teyton L, Wilson IA and Plebanski M: Crystal structure of a non-canonical high affinity peptide complexed with MHC class I: A novel use of alternative anchors. *J Mol Biol* 318: 1307-1316, 2002.
- Bednarek MA, Sauma SY, Gammon MC, Porter G, Tamhankar S, Williamson AR and Zweerink HJ: The minimum peptide epitope from the influenza virus matrix protein. Extra and intracellular loading of HLA-A2. *J Immunol* 147: 4047-4053, 1991.
- Fremont DH, Stura EA, Matsumura M, Peterson PA and Wilson IA: Crystal structure of an H-2K<sup>b</sup>-ovalbumin peptide complex reveals the interplay of primary and secondary anchor positions in the major histocompatibility complex binding groove. *Proc Natl Acad Sci USA* 92: 2479-2483, 1995.
- Lundegaard C, Lamberth K, Harndahl M, Buus S, Lund O and Nielsen M: NetMHC-3.0: Accurate web accessible predictions of human, mouse and monkey MHC class I affinities for peptides of length 8-11. *Nucleic Acids Res* 36: W509-W512, 2008.
- Bøyum A: Isolation of lymphocytes, granulocytes and macrophages. *Scand J Immunol* 5 (Suppl 5): 9-15, 1976.
- Luft T, Rizkalla M, Tai TY, Chen Q, MacFarlan RI, Davis ID, Maraskovsky E and Cebon J: Exogenous peptides presented by transporter associated with antigen processing (TAP)-deficient and TAP-competent cells: Intracellular loading and kinetics of presentation. *J Immunol* 167: 2529-2537, 2001.
- Tan J, Tang X and Xie T: Comparison of HLA class I typing by serology with DNA typing in a Chinese population. *Transplant Proc* 32: 1859-1861, 2000.
- Manders EMM, Verbeek JF and Aten JA: Measurement of co-localization of objects in dual-colour confocal images. *J Microsc* 169: 375-382, 1993.
- Lyons AB and Parish CR: Determination of lymphocyte division by flow cytometry. *J Immunol Methods* 171: 131-137, 1994.
- Suda K and Mitsudomi T: Successes and limitations of targeted cancer therapy in lung cancer. *Prog Tumor Res* 41: 62-77, 2014.
- Wangari-Talbot J and Hopper-Borge E: Drug resistance mechanisms in non-small cell lung carcinoma. *J Can Res Updates* 2: 265-282, 2013.
- Dudley ME and Rosenberg SA: Adoptive-cell-transfer therapy for the treatment of patients with cancer. *Nat Rev Cancer* 3: 666-675, 2003.
- Disis ML: Immune regulation of cancer. *J Clin Oncol* 28: 4531-4538, 2010.
- Skånland SS, Moltu K, Berge T, Aandahl EM and Taskén K: T-cell co-stimulation through the CD2 and CD28 co-receptors induces distinct signalling responses. *Biochem J* 460: 399-410, 2014.
- Perica K, Kosmides AK and Schneck JP: Linking form to function: Biophysical aspects of artificial antigen presenting cell design. *Biochim Biophys Acta* 1853: 781-790, 2015.
- Dittmann J, Keller-Matschke K, Weinschenk T, Kratt T, Heck T, Becker HD, Stevanović S, Rammensee HG and Gouttefangeas C: CD8<sup>+</sup> T-cell response against MUC1-derived peptides in gastrointestinal cancer survivors. *Cancer Immunol Immunother* 54: 750-758, 2005.
- Gückel B, Rentsch C, Nastke MD, Marmé A, Gruber I, Stevanović S, Kayser S and Wallwiener D: Pre-existing T-cell immunity against mucin-1 in breast cancer patients and healthy volunteers. *J Cancer Res Clin Oncol* 132: 265-274, 2006.
- Kokowski K, Harnack U, Dorn DC and Pecher G: Quantification of the CD8<sup>+</sup> T cell response against a mucin epitope in patients with breast cancer. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)* 56: 141-145, 2008.

33. Choi C, Witzens M, Bucur M, Feuerer M, Sommerfeldt N, Trojan A, Ho A, Schirrmacher V, Goldschmidt H and Beckhove P: Enrichment of functional CD8 memory T cells specific for MUC1 in bone marrow of patients with multiple myeloma. *Blood* 105: 2132-2134, 2005.
34. Hamaï A, Benlalam H, Meslin F, Hasmim M, Carré T, Akalay I, Janji B, Berchem G, Noman MZ and Chouaib S: Immune surveillance of human cancer: If the cytotoxic T-lymphocytes play the music, does the tumoral system call the tune? *Tissue Antigens* 75: 1-8, 2010.
35. Finn OJ: Cancer immunology. *N Engl J Med* 358: 2704-2715, 2008.
36. Hwang I and Nguyen N: Mechanisms of tumor-induced T cell immune suppression and therapeutics to counter those effects. *Arch Pharm Res* 38: 1415-1433, 2015.
37. Quinlin IS, Burnside JS, Dombrowski KE, Phillips CA, Dolby N and Wright SE: Context of MUC1 epitope: Immunogenicity. *Oncol Rep* 17: 453-456, 2007.
38. Hamel ME, Noteboom E and Kruisbeek AM: Non-responsiveness of antigen-experienced CD4 T cells reflects more stringent co-stimulatory requirements. *Immunology* 93: 366-375, 1998.
39. Phillips JD, Knab LM, Blatner NR, Haghi L, DeCamp MM, Meyerson SL, Heiferman MJ, Heiferman JR, Gounari F, Bentrem DJ, *et al.*: Preferential expansion of pro-inflammatory Tregs in human non-small cell lung cancer. *Cancer Immunol Immunother* 64: 1185-1191, 2015.