



# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

## FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA

ACTIVACIÓN *IN VITRO* DE CLONAS ESPECÍFICAS DE  
LINFOCITOS T CD8+ AL PÉPTIDO SAPDTRPA DERIVADO  
DE MUC1 EN SANGRE PERIFÉRICA DE DONADORES  
SANOS CON UN SISTEMA DE ACTIVACIÓN ARTIFICIAL

**TESIS**  
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

**BIÓLOGO**

PRESENTA:  
SAÚL ARTEAGA CRUZ

DIRECTOR DE TESIS:  
Vo.Bo. DRA. PATRICIA SOFÍA GOROCICA ROSETE

ASESOR INTERNO:  
Vo.Bo. DRA. MARÍA DE LOURDES MORA GARCÍA

CIUDAD DE MÉXICO, JUNIO 2016



**FES**  
**ZARAGOZA**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**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.







# **UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

## **FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA**

El siguiente trabajo fue realizado en el Laboratorio de Bioquímica, perteneciente a la Unidad de Investigación del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias Ismael Cosío Villegas (INER), bajo la dirección de la Dra. Patricia Sofía Gorocica Rocete.

Asimismo, este proyecto contó con el apoyo financiero de CONACYT- PROYECTO SALUD-2012-01-180516. Igualmente se reconoce la beca otorgada por el Programa de Becas de Inicio a la Investigación (PROBEI), de la Comisión Coordinadora de los Institutos Nacionales de Salud y Hospitales de Alta Especialidad.

Agradezco al Dr. Gerardo Corzo Burgete del Instituto de Biotecnología de la UNAM, por la síntesis de los péptidos.

**Ciudad de México, Junio 2016.**



# ÍNDICE

GLOSARIO	23
RESUMEN	27
1. INTRODUCCIÓN	29
1.1. Características de las mucinas asociadas al cáncer	34
1.2. Respuesta inmune antitumoral	41
1.3. Activación de Linfocitos T CD8+	47
1.4. Antecedentes	50
2. JUSTIFICACIÓN	52
3. HIPÓTESIS	53
4. OBJETIVO GENERAL	53
5. OBJETIVOS PARTICULARES	53
6. MATERIAL Y MÉTODO	54
6.1. Tipo de proyecto: Experimental	54
6.2. Criterios de inclusión	54
6.3. Línea celular T2	54
6.4. Cinética de proliferación de la línea celular linfoblástica de origen tumoral T2	55
6.5. Péptido SAPDTRPA (MUC1-8 mer)	55
6.6. Estabilización de la molécula HLA-A*0201 de la línea celular T2	56
6.7. Separación de células mononucleares por gradiente de densidad	57
6.8. Fenotipificación de HLA mediante citometría de flujo	57
6.9. Purificación de linfocitos T CD8+ por separación magnética (selección negativa)	58
6.10. Evaluación de pureza para los Linfocitos T CD8+ mediante citometría de flujo	59



6.11. Activación específica de clonas de linfocitos T CD8+ puras usando el péptido MUC1-8 mer	60
6.12. Activación de linfocitos T CD8+ controles con estímulos policlonales, usando el Kit de perlas acopladas a mAb anti CD2, CD28, CD3	61
6.13. Ensayos de proliferación (CFSE)	61
6.14. Tinción para citometría de flujo	62
7. RESULTADOS	64
7.1. Cinética de proliferación de la línea celular linfoblástica de origen tumoral T2	64
7.2. Estandarización de los mAb específicos a CD3, CD4, CD8	64
7.3. Tipificación del antígeno leucocitario humano del alelo A*0201 (HLA-A*0201)	67
7.4. Evaluación de la pureza para los linfocitos T CD8+/HLA-A*0201+ aislados mediante perlas magnéticas por selección negativa	67
7.5. Estandarización de la tinción con Carboxyfluorescein Succinimidil Ester (CFSE) en Linfocitos T CD8+	70
7.6. Activación de Linfocitos T CD8+ específicos al péptido SAPDTRPA (MUC1-8 mer)	72
7.7. Expansión de CTLs específicos al péptido SAPDTRPA (MUC1-8 mer)	79
8. DISCUSIÓN	84
9. CONCLUSIONES	91
10. PERSPECTIVAS DEL TRABAJO	92
11. LITERATURA CITADA	94





## GLOSARIO

- **$\alpha$** : Alfa.
- **$\alpha$ 3-FucT**:  $\alpha$ 3-Fucosil-transferasa.
- **$\alpha$ 4-FucT**:  $\alpha$ 4-Fucosil-transferasa.
- **$\beta$** : Beta.
- **$\beta$ 2-m**: Beta 2 microglobulina.
- **$\beta$ 4-Gal**:  $\beta$ 4-Galactosa.
- **$\beta$ 4-GalT**:  $\beta$ 4-Gal-transferasa.
- **aa**: Aminoácidos.
- **AET**: Antígeno específico de tumor.
- **APC**: Células presentadoras de antígeno.
- **ATS**: Sociedad Americano del Tórax.
- **BSA**: Bovine serum albumin (Albumina de suero bovino).
- **CTL**: Linfocitos T con función citotóxica.
- **DC**: Dendritic cell (Célula dendrítica).
- **EDTA**: Ácido etilendiaminotetracético.
- **ERS**: Sociedad Europea Respiratoria.
- **Fuc**: Fucosa.
- **Gal**: Galactosa.
- **Gal-GT**: Glicosil transferasas para la galactosa.
- **GalNAc**: N-acetil galactosamina.
- **GalNAc $\alpha$ 1-Ser/Thr**: Antígeno TN.
- **Gal $\beta$ 1-3-GalNAc $\alpha$ 1-Ser/Thr**: Antígeno T.
- **GT**: Glicosil-transferasas.
- **GT-Fuc**: Glicosil transferasa para fucosa.

- **HLA-A\*0201:** Human leukocyte antigen A2 allele (Antígeno leucocitario humano alelo A2).
- **IASLC:** Asociación Internacional para el Estudio del Cáncer.
- **IFN $\gamma$ :** Interferón gamma.
- **IL-10:** Interleucina 10.
- **IL-12:** Interleucina 12.
- **IL-15:** Interleucina 15.
- **IL-2:** Interleucina 2.
- **IL-7:** Interleucina 7.
- **LT CD8+:** Linfocito T CD8+.
- **mAb:** Monoclonal antibody (Anticuerpo monoclonal).
- **MHC-I:** Major histocompatibility complex I  
(Complejo mayor de histocompatibilidad I).
- **MHC-II:** Major histocompatibility complex II  
(Complejo mayor de histocompatibilidad II).
- **mRNA:** Ácido Ribonucleico mensajero.
- **MUC1:** Mucina tipo 1.
- **MUC1-8 mer:** SAPDTRPA.
- **NK:** Natural killers (Asesinas naturales).
- **OMS:** Organización Mundial de la Salud.
- **PD-1L:** Programmed death-ligand 1 (Proteína de muerte programada ligando 1).
- **PFD:** Paraformaldehído.
- **RER:** Retículo endoplasmático rugoso.
- **rIL-2:** Interleucina 2 recombinante.
- **Ser:** Serina.
- **SFB:** Suero fetal bovino.

- **SLex**: Sialil lewis X.
- **SMG**: Glándula de la submucosa.
- **ST3Gal**: 3 $\alpha$ sialil-transferasa.
- **ST6GalNAc**:  $\alpha$ -6-sialil-transferasas.
- **TA**: Temperatura ambiente.
- **TAA**: Tumor-associated antigen (Antígeno asociado a tumor).
- **TCR**: T cell receptor (Receptor de célula T).
- **TGF- $\beta$** : Transforming growth factor beta (Factor de crecimiento transformante beta).
- **Thr**: Treonina.
- **TLR**: Receptores tipo toll.
- **TNF**: Tumor necrosis factor (Factor de necrosis tumoral).
- **TR**: Repeticiones tándem.
- **UICC**: Unión Internacional Contra el Cáncer.
- **VNTR**: Variable Number of tandem repeats  
(Número variable de repeticiones en tándem).



## RESUMEN

Las células del epitelio bronquial sano de la mayoría de los mamíferos están recubiertas por mucinas como parte de sus barreras físicas y químicas, pero en células de adenocarcinomas pulmonar, las mucinas tipo 1 (MUC1) pueden presentar alteraciones en el tipo o el grado de glicosilación. MUC1 es considerado un antígeno tumoral con epítopes inmunodominantes como el octapéptido SAPDTRPA (MUC1-8 mer), que es reconocido por los linfocitos T y B. Éste péptido tiene una gran capacidad de unión al antígeno leucocitario humano alelo A2 (HLA-A\*0201) en las células presentadoras de antígeno.

Las células de la línea celular linfoblástica de origen tumoral T2 expresan y presentan moléculas HLA-A\*0201, inestables y vacías en su superficie, por ello han sido utilizadas para unir una serie de péptidos exógenos de manera estable. En trabajos previos hemos evaluado la estabilización del complejo HLA-A\*0201 con  $\beta 2$  microglobulina ( $\beta 2$ -m) y el péptido MUC1-8 mer en las células T2, y estandarizado el sistema de activación in vitro de linfocitos T CD8+ (LT CD8+) provenientes de pacientes con adenocarcinoma pulmonar.

En el presente trabajo se evaluó la capacidad de LT CD8+ provenientes de sangre periférica de donadores sanos HLA-A\*0201, para activarse específicamente con el péptido MUC1-8 mer, la proliferación mediante ensayos de división celular y la producción de Interferón gamma (IFN $\gamma$ ), así como del aumento en la expresión de la molécula CD25. Se encontró una tendencia en los análisis estadísticos, que denota un incremento en la expresión del marcador de activación CD25 en la superficie de las células, la expresión de la citocina IFN $\gamma$ , así como su proliferación.



Estos resultados abren la posibilidad de utilizar sistemas más simplificados para expandir *in vitro*, clonas específicas de LT CD8+ a antígenos como MUC1-8 mer y en consecuencia un posible uso futuro en la inmunoterapia adoptiva.

## 1. INTRODUCCIÓN

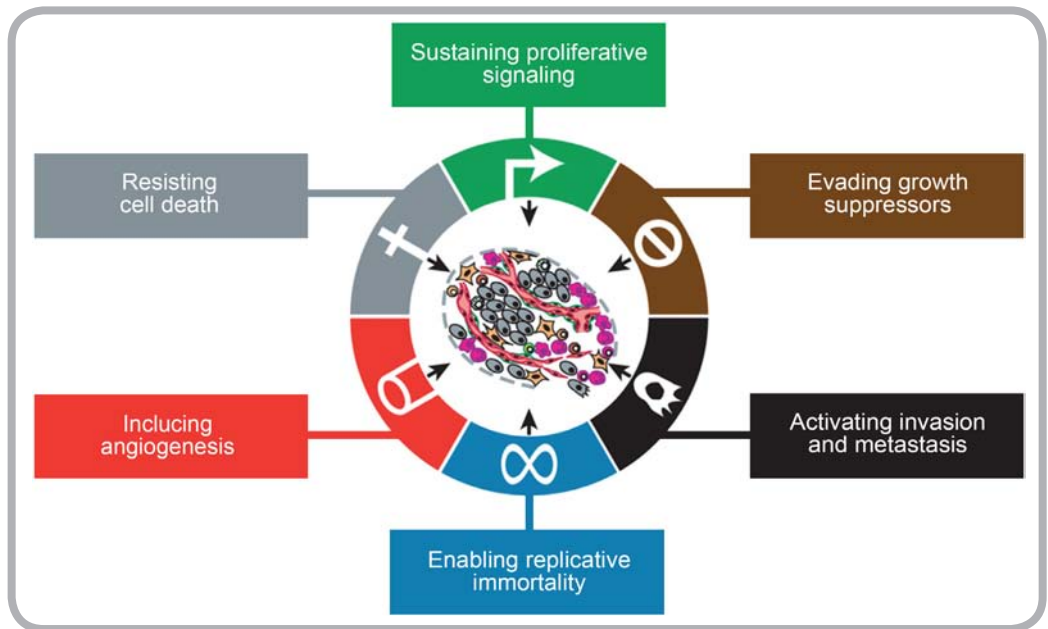
El cáncer representa un gran problema de salud pública mundial. Los reportes de GLOBOCAN en el año 2012 revelan un surgimiento de 14.1 millones de nuevos casos, 8.2 millones de muertes y 32.6 millones de personas que viven afectadas por algún tipo de cáncer, siendo el cáncer de pulmón aquel con mayor mortalidad en el mundo (GLOBOCAN, 2012). Los reportes de GLOBALCAN en el año 2012 estiman el surgimiento de 1.8 millones de nuevos casos (12.9 % del total), el 58% de las cuales ocurrieron en regiones en vías de desarrollo.

En México, el 12.9% de las defunciones están relacionadas con cáncer y de acuerdo a la Unión Internacional Contra el Cáncer (UICC), es la tercera causa de muerte. Se estima que cada año se detectan 128 mil casos nuevos, en los varones el 16.6% y en las mujeres el 7.7% de los casos de muerte son debidos a cáncer de tráquea, bronquios y pulmón (INEGI, 2007).

El desarrollo del cáncer es multifactorial, participan factores tanto endógenos como factores exógenos (Bor-Ching, 2008). Para el caso concreto del cáncer pulmonar existen factores exógenos, entre los que se encuentran los factores físicos como la radiación ultravioleta y la radiación ionizante; los factores químicos como la exposición al asbesto, al humo de leña o al humo del tabaco y los factores biológicos, como las infecciones crónicas causadas por determinados virus o bacterias. Entre los factores endógenos más importantes están el envejecimiento, las patologías que cursan con procesos inflamatorios crónicos como la obesidad, el sobrepeso y diabetes, así como la predisposición genética (Alice, 2009; Bor-Ching, 2008).

El cáncer se define como un conjunto de más de 100 enfermedades, las cuales se caracterizan por el crecimiento incontrolado de células anormales con capacidad para invadir diferentes tejidos (American Cancer Society).

La transformación maligna de una célula se produce por la acumulación de mutaciones en genes específicos de su ADN. Para que una célula transformada sea considerada como maligna, las mutaciones adquiridas deben presentarse en más de la mitad del número total de genes que controlan el crecimiento y la división de la célula. Todas estas alteraciones del genoma les confieren nuevas propiedades a las células, como un incremento en su capacidad de replicación, dando lugar a células inmortales llamadas neoplásicas que adquieren la capacidad para dividirse incontroladamente hasta formar una masa tumoral *in situ* (Figura 1). Otras de las consecuencias de las alteraciones genéticas se manifiestan en cambios moleculares, que pueden generar alteraciones en el comportamiento de las células que facilitan su capacidad de migración para invadir tejidos adyacentes y no adyacentes, es el fenómeno conocido como metástasis. Estas alteraciones genéticas también pueden afectar sus características antigénicas (Cheng, 2009; Douglas, 2011).



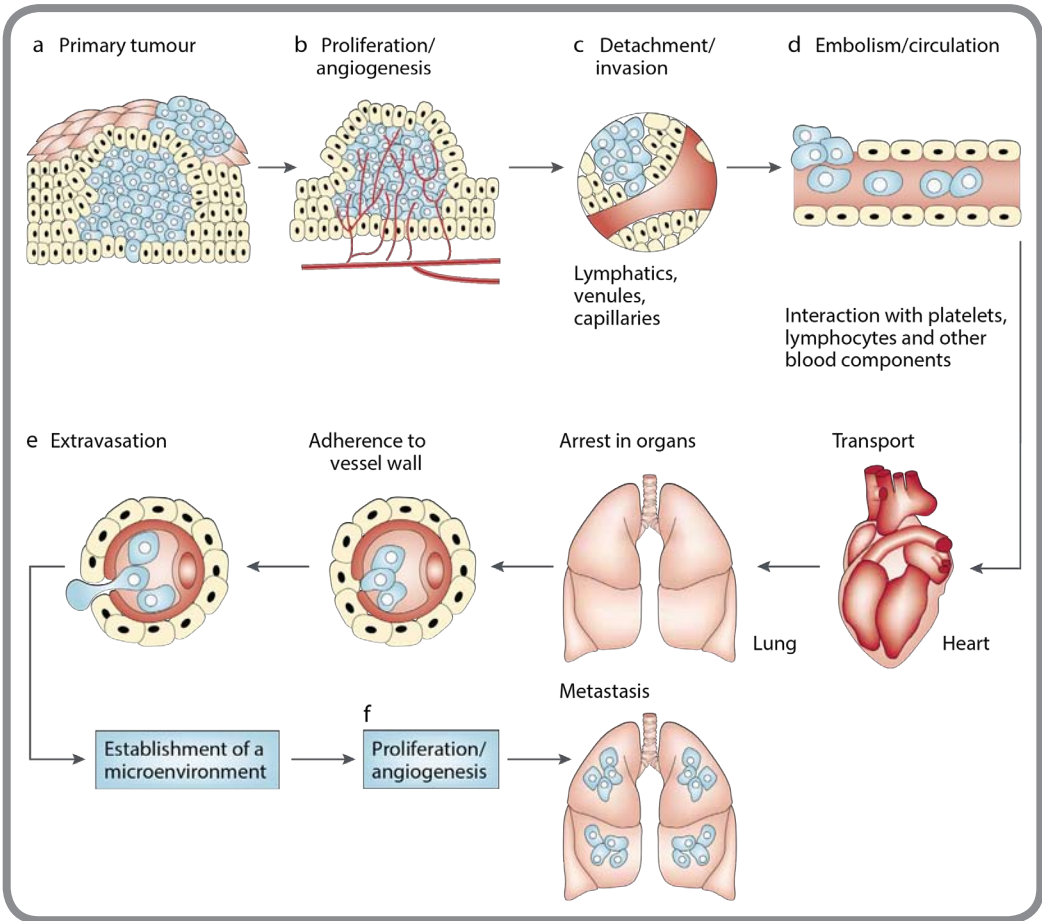
**Figura 1. Características del cáncer.**

*Seis características propuestas que adquieren las células en su transformación al cáncer (Douglas, 2011).*

La invasión de tejidos y la metástasis se debe principalmente a las alteraciones en las moléculas de adhesión intercelular y a la interacción con la matriz extracelular. En la mayoría de las células malignas se inhibe la expresión de moléculas de adhesión intercelular, como la E-cadherina, o se incrementa la expresión de moléculas que favorecen la migración celular y la inflamación, como la N-cadherina y algunas moléculas como las mucinas; estas últimas presentan además cambios importantes en la glicosilación, tal como sucede con la mucina tipo 1 (MUC1) (Douglas, 2011).

Las neoplasias pueden tener dos tipos de crecimiento: uno lento y localizado, conocido como benigno, que puede transformarse en una masa tumoral de crecimiento rápido y de fácil diseminación, llamado tumor maligno (Isaiah, 2002).

El crecimiento de las células neoplásicas también depende del desarrollo de una red vascular que las alimente y la falta de participación del sistema inmune para controlarla (Figura 2).



**Figura 2. Metástasis.**

Etapas por las que debe pasar una neoplasia para finalmente concluir en la invasión de tejidos lejanos al de origen, iniciando desde a formación del tumor primario y hasta la colonización: ésta etapa final se le conoce como metástasis (Isaiah, 2003).

El cáncer pulmonar se clasifica de acuerdo a varios criterios: el histológico, el radiológico, el clínico, el molecular y el quirúrgico; propuestos por la International Association for the Study of Lung Cancer, American Thoracic Society y la European Respiratory Society (IASLC/ATS/ERS). De acuerdo a la clasificación histológica de la OMS en el año 2004, los tumores de pulmón se incluyen en 4 tipos: carcinoma escamoso o epidermoide, adenocarcinoma, carcinoma de células no pequeñas y carcinomas de células pequeñas o microcíticos (Natasha, 2013).

La frecuencia de los adenocarcinomas se incrementó notablemente sobre los otros tipos de carcinoma, constituyendo hoy el carcinoma pulmonar más frecuente en pacientes fumadores y no fumadores. El adenocarcinoma de pulmón es un grupo heterogéneo de tumores caracterizados por diversos patrones de crecimiento (Marco, 2010). El adenocarcinoma es la forma más heterogénea y puede desarrollarse de diferentes células epiteliales del aparato respiratorio. De acuerdo a lo anterior mencionado, podemos dividirlo en dos tipos fundamentales: los originados en la vía aérea distal y los originados en el epitelio bronquial.

## 1.1. Características de las mucinas asociadas al cáncer

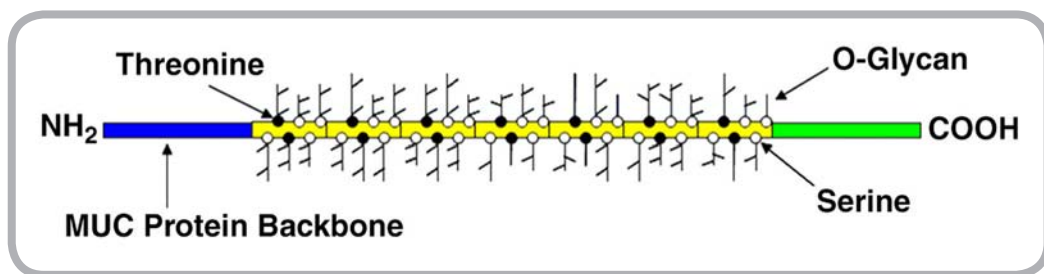
Las células del epitelio bronquial sano de la mayoría de los mamíferos están recubiertas por diversos tipos de mucinas, que forman una barrera física y química en el epitelio para su protección y evita la unión de bacterias a estas células.

Las mucinas son una familia de glicoproteínas de alto peso molecular, altamente glicosiladas, éstas sólo se expresan en la parte apical de las células epiteliales, pero pueden ser secretadas por las células de tipo glandular de la submucosa (SMG) y por las *globet cell* para formar un recubrimiento sobre ellas. Las estructuras de algunas mucinas en los epitelios, pueden presentar alteraciones, sobretodo en la parte glicosilada de la molécula cuando las células sanas son transformadas a células neoplásicas.

En humanos existen aproximadamente 20 genes MUC que codifican para la parte proteica de las mucinas. La expresión de cada gen es específica para el órgano, tejido y tipo celular (Albrecht, 2011).

La estructura característica para las Mucinas en epitelios sanos (*Figura 3*) está compuesta por una columna peptídica conocida como apomucina, la cual está dividida en 3 regiones. La primera es la región NH<sub>2</sub>-terminal, la segunda es la región central formada por secuencias de repeticiones tándem (TR) que son altamente conservadas, las cuales son ricas en los aminoácidos (aa) serina (Ser) y treonina (Thr) y por último la región COOH-terminal que puede ser extracelular o citoplasmática. Estos dos aminoácidos forman parte de la región de repeticiones en tándem que es variable en número para cada tipo de mucina, esta región es conocida como VNTR por sus siglas en inglés.

La biosíntesis de las mucinas es compleja y con frecuencia presentan alteraciones durante la carcinogénesis, sobre todo en la longitud o ramificaciones de los carbohidratos (Stepensky, 2006). Las Ser y Thr presentes en los VNTR son los sitios para la glicosilación de estas glicoproteínas que se lleva a cabo dentro del aparato de Golgi (Albrecht, 2011).



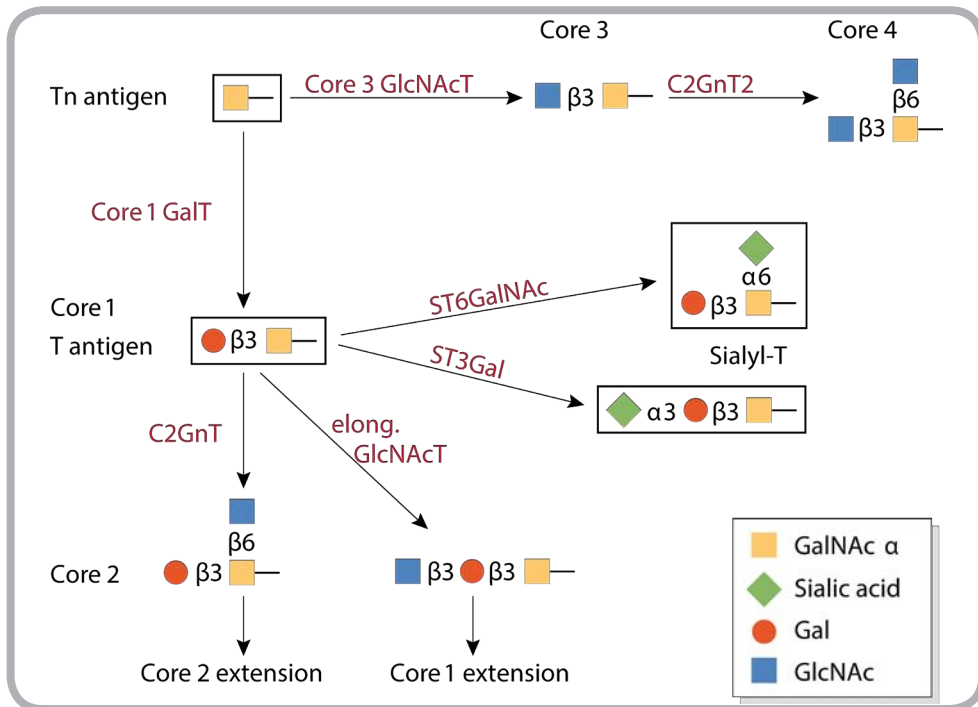
**Figura 3. Glicoproteína tipo mucina.**

Dominio NH<sub>2</sub>-terminal (azul), dominio central o VNTR (amarillo), y un dominio COOH-terminal (verde). Numerosos O-glicanos están unidos a Thr o Ser con heterogeneidad de tamaño (Albrecht, 2011).

La región VNTR forma un gran grupo de O-glicanos que corresponde al 80% del peso total de la mucina (Christine, 2008). La región O-glicosilada de las mucinas es la región más antigénica de las moléculas. La Ser o la Thr presentes en la secuencia peptídica dentro de la región VNTR forma un enlace de tipo “ $\alpha$ ” con un residuo de N-acetil galactosamina (GalNAc), y ésta unión genera una estructura conocida como antígeno Tn (GalNAc $\alpha$ 1-Ser/Thr) (Ju, 2011).



A partir del antígeno Tn se lleva a cabo la elongación y ramificación de los carbohidratos para formar estructuras cada vez más complejas (Figura 4).



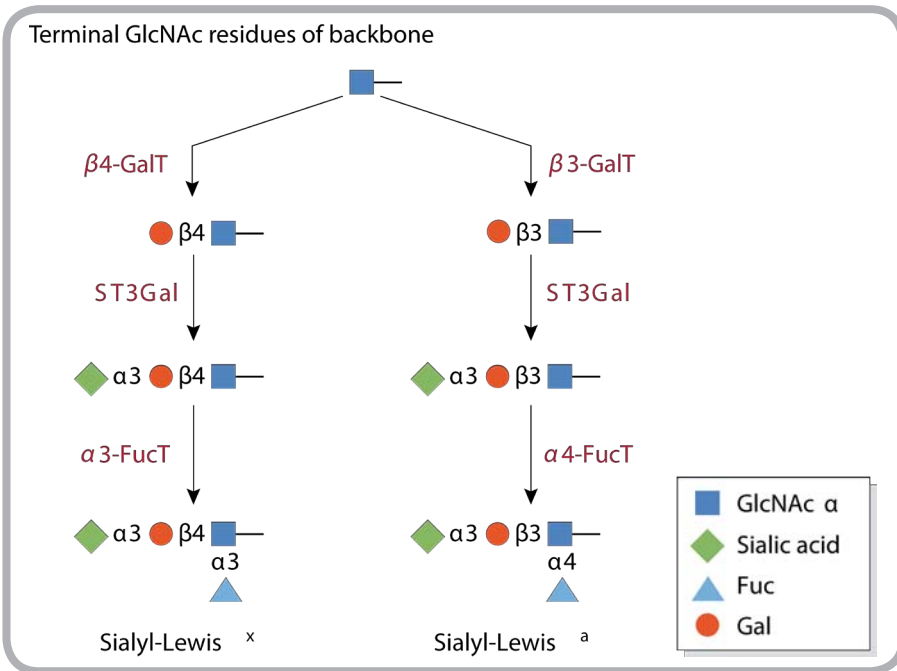
**Figura 4. Núcleos o "Cores" de la O-glicosilación.**

Biosíntesis del antígeno Tn (GalNAc-Ser/Thr) convertido al core 1 por la  $\beta 3$ -Gal-transferasa o al core 3 por la  $\beta 3$ -GlcNAc transferasa, que puede estar ramificado por la C2GnT2 para formar el core 4. El core 1 se puede convertir en el antígeno sialil T a través de la  $3\alpha$  sialil-transferasas (ST3Gal) o por  $\alpha 6$ -sialil-transferasas (ST6GalNAc). Alternativamente, el core 1 puede presentar una extensión por la  $\beta 3$ -GlcNAc-transferasa o puede estar ramificado por C2GnT para formar el core 2 (Inka, 2009).

La GalNAc presente en el antígeno Tn, sirve como sustrato para que las enzimas glicosil-transferasas (GT) que transportan residuos de carbohidratos específicos continúen con la elongación y ramificación de la cadena de glicano. Estas GT son las responsables de la N-glicosilación de proteínas en el retículo endoplásmico y/o la O-glicosilación en el aparato de Golgi de

todas las células. Cuando la GT específica para galactosa (Gal-GT) adiciona un residuo de Gal haciendo un enlace  $\beta 1-3a$  con el GalNAc presente en el antígeno Tn, se forma otra estructura llamada antígeno T (Gal $\beta 1-3$ GalNAc $\alpha 1$ -Ser/Thr), posteriormente puede unirse un residuo de fucosa (Fuc) con una Fuc-GT dando lugar a otra estructura conocida como antígeno Lewis (*Figura 5*) (Ajit, 2009).

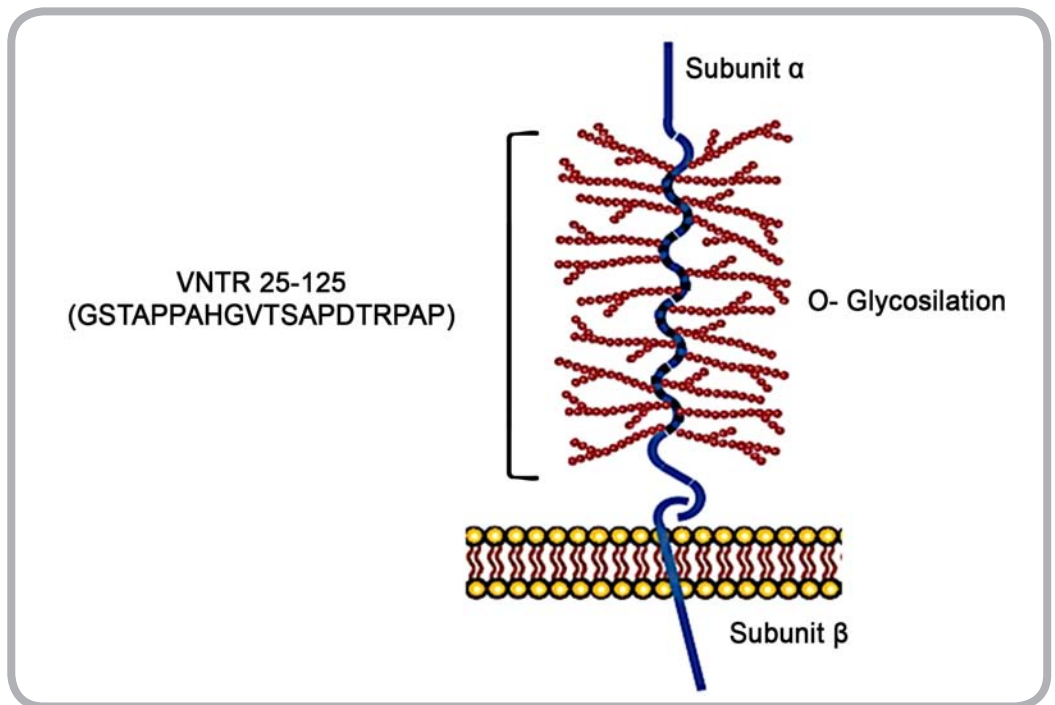
En ocasiones la síntesis para la elongación o ramificación de cadenas glicanos se ve trunca, principalmente en procesos patológicos como el cáncer, ya que las señales intracelulares se ven alteradas, se induce la expresión de las GT o bien se expresan enzimas como las sialil-transferasas, que generan señales para detenerse al adicionar residuos de ácidos siálicos al glicano en síntesis, por los que se generan estructuras cortas de glicanos como los antígenos Tn, T y Lewis; estas tres estructuras son características en varias neoplasias por lo que se le conocen como antígenos tumorales.



**Figura 5. Antígenos Lewis.**

Residuos de N-acetilglucosamina (GlcNAc) y especialmente cores 2 pueden ser utilizado como la base para la unión de antígenos Lewis. Sialil-Lewis x (sLex) se sintetiza a partir de la adición de un  $\beta 4$ -Galactosa ( $\beta 4$ -Gal) a GlcNAc (cadena tipo2) por  $\beta 4$ -Gal-transferasa ( $\beta 4$ -GalT), seguido por la adición de  $\alpha 3$ -ácido siálico a Gal por  $\alpha 3$ -sialiltransferasa (ST3Gal) y de  $\alpha 3$ -Fuc a GlcNAc por  $\alpha 3$ -Fuc-transferasa ( $\alpha 3$ -FucT). Las cadenas de tipo 1 son sintetizados por las cadenas  $\beta 3$ -Gal-transferasa ( $\beta 3$ -GalT). ST3Gal y  $\alpha 4$ -Fuc transferasa- ( $\alpha 4$ -FucT) y luego montar el antígeno sialil-Lewis (Inka, 2009).

Entre las mucinas que tienen mayor asociación con el cáncer pulmonar está la mucina tipo 1 (MUC1), que es expresada como un heterodímero con un largo dominio extracelular llamado subunidad alfa ( $\alpha$ ) el cual está unido de manera no covalente a un pequeño dominio transmembranal y un dominio citoplásmico, que junto con la parte transmembranal forman una subunidad beta ( $\beta$ ) (Figura 6) (Christine, 2008; Pankaj, 2006). Existen al menos setenta y ocho isoformas del mRNA para MUC1, originadas principalmente por *splicing* alternativo, que se da de manera específica en cada tejido, pero también las isoformas se encuentran en diferentes neoplasias.



**Figura 6. MUC1.**

La subunidad  $\beta$  está representada por una porción citoplasmática, dominio transmembranal y una pequeña porción extracelular (azul), la O-glicosilación está representada en color rojo y la subunidad  $\alpha$  extracelular está en color azul y negro, lo que representa cada TR, que está contenida en la VNTR (Choi, 2005).

En la subunidad  $\alpha$  es donde se encuentran los VNTR ampliamente glicosilados. La región VNTR de MUC1 puede tener de 1000 a 2000 aa, dependiendo de la isoforma. Cada región VNTR contiene veinte aa con la secuencia conservada GSTAPPAHGVTSAPDTRPAP. Las variaciones en la región VNTR de la MUC1 hacen a esta región muy inmunogénica, por lo que el sistema inmune identifica a esa región como un epítopo antigénico y es capaz de destruirla (Figura 6) (Fiana, 2005).

La región VNTR además de ser inmunogénica, también es la responsable en parte de la evasión a la respuesta inmune y de la metástasis de las células, debido a que compite con las interacciones E-caderina/ $\beta$ -catenina que mantiene las células de los epitelios unidas entre ellas, ya que forma un obstáculo estérico cuando se sobreexpresa en la superficie de toda la membrana de la célula tumoral. Lo anterior promueve la migración de la célula tumoral. La subunidad  $\alpha$  de la MUC1 también interactúa con moléculas de adhesión expresadas en las células endoteliales, como la selectina y otras moléculas de adhesión intercelular (Michelle, 2012).

La sobreexpresión de las mucinas y cambios en la glicosilación pueden proporcionar ciertas ventajas a la célula tumoral, favoreciendo la oncogénesis, evasión de la respuesta inmune y la metástasis (Teresa, 2013).

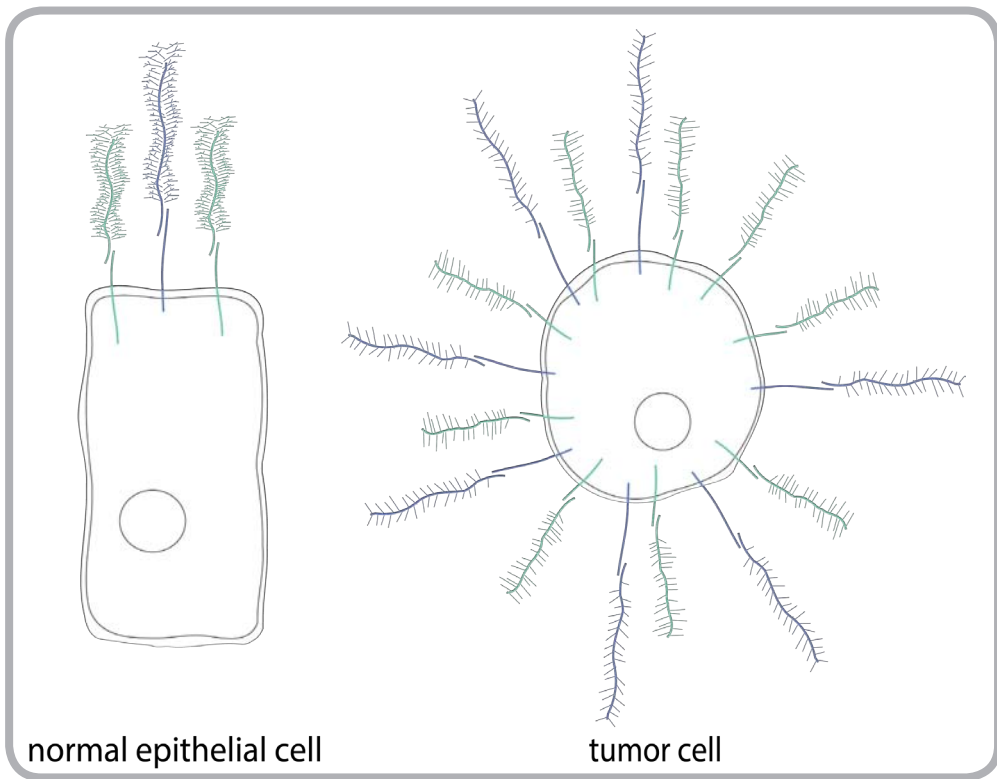
## 1.2 Respuesta inmune antitumoral

Los cambios moleculares que sufren las células tumorales determinan un cambio en las propiedades antigénicas de las células por lo que se consideran antígenos tumorales; estos cambios inducen una pérdida en la tolerancia inmunológica hacia las células propias, por lo que el sistema inmune las reconoce como extrañas, haciendo posible que se active una respuesta inmunológica contra ellas para eliminarlas.

Los antígenos tumorales se clasifican en: A) antígenos específicos de tumores (AET), que son aquellos que se expresan únicamente en las células tumorales, pero no en las células normales. B) Antígenos asociados a tumores (TAA), que son aquellos antígenos que están presentes en células normales, pero que tienen una expresión aberrante cuando las células normales se transforman en neoplásicas, como sucede en algunas mucinas (Abul, 2009).

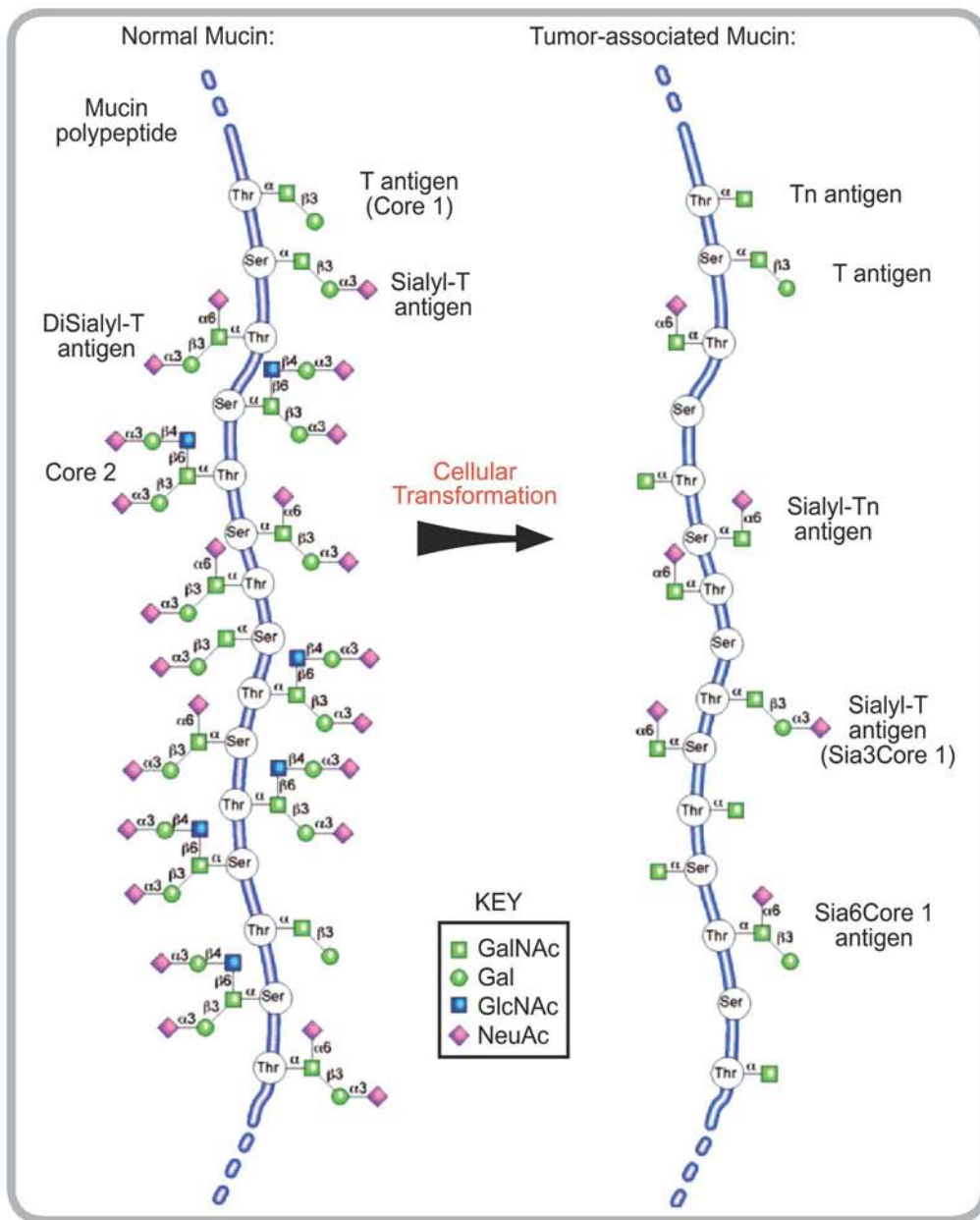
MUC1 es un TAA también llamado antígeno CA15-3, Episialin, PEM, EMA, CD227, aunque se encuentra expresado en la superficie de las células en tejidos normales, la forma alterada de la estructura de la molécula está presente en varios tipos de tumores. MUC1 también se puede encontrar en circulación en pacientes con diversos adenocarcinomas (*Figura 7*). Este tipo de TAAs genera una respuesta inmune, pero que en muchas ocasiones no genera protección al paciente; sin embargo, desde el punto de vista diagnóstico son ampliamente utilizados para tamizaje en la población de riesgo, diagnóstico diferencial, evaluación de la progresión de tumor, diagnosticar recaídas, evaluar respuestas terapéuticas, entre otros importantes usos (Leonardo, 2014).

La MUC1 asociada a tumores expresa cadenas cortas de glicanos, la síntesis se trunca y por lo tanto sólo se expresan los carbohidratos iniciales de la glicosilación (antígenos Tn, T o algún tipo de antígeno Lewis) por lo que La MUC1 queda hipoglicosilada por la síntesis incompleta de la cadena de glicanos (*Figura 8*). Estos antígenos pueden activar linfocitos T y B autólogos (Brockhausen. 2009).



**Figura 7. Expresión normal y alterada de una mucina.**

Del lado izquierdo la célula epitelial representa la expresión normal de la MUC1 (verde) y MUC4 (azul) en la parte apical de la célula, mientras que en la célula tumoral de la derecha se observa la expresión alterada de MUC1 y MUC4, presente en toda la membrana de la célula tumoral (Callaghan, 2006).



**Figura 8. Expresión de los antígenos sacarídicos expuestos a partir de la hipoglicosilación presente en las células tumorales.**

En las mucinas normales, los residuos GalNac1-O-Ser/Thr se modifican para contener diferentes oligosacáridos en la región central de la apomucina o VNTR. Sin embargo, la hipoglicosilación en la célula tumoral expone neoepitopos como el antígeno Tn, T, sialil Tn y sialil T (Ju, 2011).



El sistema inmune tiene la capacidad de reconocer y eliminar células tumorales, a esta propiedad se le denomina vigilancia inmunológica. Aunque la respuesta inmunitaria innata juega un papel importante para el control y eliminación de masas tumorales, interviniendo linajes celulares como son los linfocitos Natural Killers (NK), macrófagos, Linfocitos T y B, etc.

La respuesta adaptativa tiene mayor relevancia debido a sus mecanismos antitumorales, principalmente por linfocitos T CD8+ (LT CD8+) con función citotóxica (CTLs). Los CTLs realizan la función de vigilancia inmunológica, son capaces de reconocer y destruir a las células en proceso de carcinogénesis y a las células neoplásicas que expresan antígenos tumorales de naturaleza proteica. La activación de estas células efectoras está condicionada a que péptidos derivados de antígenos tumorales proteicos, sean procesados por células presentadoras de antígeno (APC) y presentados a los LT CD8+ (Abul, 2009).

Cuando los LT CD8+ son vírgenes, es decir que jamás hayan entrado en contacto con los antígenos tumorales, requieren que las APC las activen, ya sea una célula dendrítica (DC), que expresan las moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad tanto de tipo I como de tipo II (MHC-I y MHCII) o todas las moléculas coestimuladoras que se requieren para completar su activación, como CD28. En cambio, cuando los LT CD8+ son de memoria, es decir que ya fueron previamente activados, las APC pueden ser las propias células tumorales y se dan las señales que las diferencian en CTLs con funciones antitumorales.

Los linfocitos T CD4<sup>+</sup> (LT CD4<sup>+</sup>) también participan en la capacitación de los LT CD8<sup>+</sup> en su función citotóxica, pues le proporcionan al microambiente citocinas como TNF e IFN $\gamma$  que ayudan al desarrollo de CTLs eficaces; además estas citocinas influyen en la sobreexpresión de moléculas MHC-I en las APC por lo que se amplifica las respuestas.

Los CTLs son capaces de reconocer y destruir a las células tumorales de una manera eficiente, siempre y cuando hayan sido correctamente activadas con todas las señales que requieren.

Sin embargo, estas respuestas antitumorales a menudo no son suficientes para controlar el crecimiento del tumor, ya sea porque los antígenos que expresan los tumores no son lo suficientemente inmunogénicos para romper las tolerancias hacia células propias, o bien las células tumorales activan mecanismos de evasión del sistema inmune (Abul, 2009).

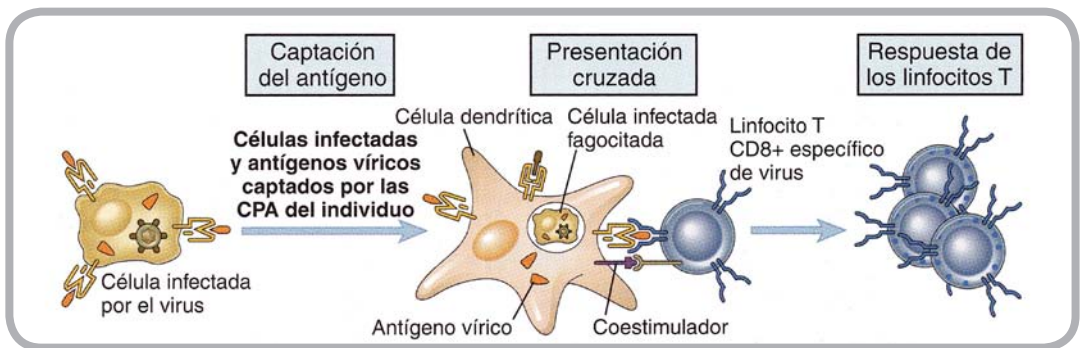
Entre estos mecanismos especializados encontramos la capacidad de las células tumorales para generar un microambiente tolerante, la activación de los puntos de control, reguladores negativos en el microambiente del tumor y la secreción de citocinas inmunosupresoras como la IL-10 y TGF- $\beta$  y factores inhibidores de la función de los linfocitos T como la galectina 1 o el PD1-L (Gabriel, 2007).

Estos mecanismos han sido englobados dentro del concepto “Inmunoedición”, y constan de 4 fases principalmente. La primera es la fase de eliminación y esencialmente se refiere al proceso de inmunovigilancia contra las células neoplásica, en el que las células del sistema inmune innata y adaptativa (NK, células T  $\alpha\beta$  y  $\gamma\delta$ , etc.) y moléculas inmunoregulatoras (IFN $\gamma$ , IL-12, perforina, TRAIL, etc.) reconocen y destruyen células malignas.

La segunda fase se basa en la tolerancia a los antígenos tumorales inducida por las células malignas, como se mencionó anteriormente, donde las células T entran en un proceso de anergia, y por tanto las células tumorales podrían escapar del efecto citotóxico de las células T. La tercera fase implicada en la inmunooedición, se basa en las estrategias inmunosupresoras empleadas por los tumores para evadir las respuestas de los linfocitos T, principalmente causando alteraciones en los componentes de la maquinaria encargada de la presentación de antígeno, defectos en la señalización de los receptores de células T (TCR), secreción de citocinas inmunosupresoras y factores proapoptóticos, activación de vías de regulación negativa y el reclutamiento específico de poblaciones de células reguladoras, propiciando así un fuerte microambiente inmunosupresor (Gabriel, 2007).

### 1.3. Activación de Linfocitos T CD8+

La respuesta citotóxica de estos linfocitos se inicia cuando el antígeno tumoral soluble es capturado por endocitosis mediante alguna APC y es procesado para finalmente expresarlo en su superficie unido a una molécula MHC-I (*Figura 9*).



**Figura 9 Presentación de antígeno por APC a linfocitos T CD8+.**

Las células infectadas o los antígenos tumorales solubles son ingeridos por las células dendríticas, donde, los antígenos son procesados y presentados a los LT CD8+, asociados a moléculas de MCH-I (Abul, 2009).

La activación, proliferación y la diferenciación de los LT CD8+ vírgenes requieren como primera señal la interacción entre las moléculas TCR de la superficie del linfocito T con las moléculas MHC-I de la superficie de la APC. Posteriormente se requiere de una segunda señal, proporcionada por moléculas coestimuladoras de la superficie de las APC, y finalmente las señales inducidas por citocinas, principalmente la IL-12. En ausencia de señales coestimuladoras, los linfocitos T que entran en contacto con antígenos, no responden y mueren mediante apoptosis o entran en un estado de ausencia de reactividad denominado anergia.

La vía coestimuladora mejor caracterizada para la activación de los linfocitos T, es la que se da entre el CD28 expresado en los linfocitos T y la molécula B7-1 (CD80) y B7-2 (CD86) que se expresan sobre las APC. La interacción CD28/B7 produce varias respuestas de los linfocitos T como la supervivencia celular, la producción de citocinas como IL-2 y la diferenciación de los linfocitos T vírgenes en efectores y de memoria. Las moléculas CD80 y CD86 se expresan principalmente en las APC, como células dendríticas, macrófagos y linfocitos B. Están ausentes o se expresan a concentraciones bajas en las APC en reposo y son inducidas por diversos estímulos.

La expresión de las moléculas coestimuladoras está regulada y garantiza que la respuesta de los linfocitos sea iniciada en el momento y lugar correctos. La expresión de los coestimuladores aumenta por productos microbianos que se unen a receptores de tipo toll (TLR) y por citocinas como el IFN $\gamma$  que se produce durante las reacciones inmunitarias frente a los microorganismos.

Las células dendríticas maduras expresan el mayor número de moléculas coestimuladoras y en consecuencia son las células estimuladoras más potentes de los linfocitos T vírgenes. Los linfocitos T efectores y de memoria activados previamente, dependen menos de la coestimulación por la vía de CD80, CD86-CD28 que los linfocitos vírgenes. Esta propiedad de los linfocitos efectores y de memoria les permite responder a los antígenos presentados por diversas APC que pueden residir en tejidos no linfáticos y pueden expresar concentraciones nulas o bajas de moléculas coestimuladoras.

El reconocimiento del antígeno por el TCR inicia una secuencia de señales bioquímicas en forma coordinada en los linfocitos T que producen la activación transcripcional de genes particulares y la entrada de las células en el ciclo celular. Los genes que se expresan en los linfocitos T después del reconocimiento del antígeno, codifican muchas de las proteínas que median las respuestas biológicas de estos linfocitos.

La sinapsis puede garantizar la liberación específica de gránulos efectores y señales a las APC adecuadas o a otras células específicas.

Las señales coestimuladoras suministradas por los receptores, como CD28, cooperan con las señales del TCR para potenciar la activación de los factores de transcripción (Abul, 2009).

Antes de la exposición al antígeno, la frecuencia de CD8+ vírgenes específicos para cualquier antígeno es de 1 de cada  $10^5$  a  $10^6$  linfocitos. Después de la exposición al antígeno, el número de linfocitos T CD8+ específicos para ese antígeno puede aumentar hasta llegar a ser de 1 de cada 10. Varias citocinas pueden actuar como factores de crecimiento para dirigir la expansión clonal de los linfocitos T CD8+; entre ellas están IL-12, IL-15, IL-2 e IL-7 (Abul, 2009).

## 1.4 Antecedentes

La relevancia del sistema inmune en el control de las células neoplásicas ha generado varias líneas de investigación a nivel mundial, para manipular la respuesta inmune con fines terapéuticos. El uso potencial de los péptidos derivados de antígenos tumorales se han estudiado por diversos autores. Apostolopoulos *et al*, observaron que el péptido glicosilado SAPDTGalNAcRPA derivado de la VNTR de MUC1 se une con mayor fuerza a la molécula de ratón H2-Kb en comparación con la forma no glicosilada y aumenta la activación de CTLs *in vitro* e *in vivo*. Otras investigaciones encontraron en pacientes con mieloma múltiple (Garetto, 2009) y en pacientes con cáncer gastrointestinal (Sandra, 2001) LT CD8+, que se activan de manera específica con los péptidos antígenos LLLTLVLTV y STAPPVHNV derivados de MUC1. Los dos péptidos anteriores presentan una alta afinidad para la molécula HLA-A\*0201, el cual se presenta en la mayoría de población caucásica mundial, y las clonas de CTLs mostraron reactividad a células de mieloma múltiple y líneas tumorales de mama, páncreas y renales HLA-A\*0201.

En otros estudios publicados, se incubaron células de la línea celular murina RMA-S que carecen de las moléculas transportadoras TAP y por lo tanto expresa las moléculas MHC clase I murina (H-2Kb) vacía, que es análoga a la HLA-A\*0201 del humano, con los péptido SAPDTRPA (MUC1-8 mer), SAPDFRPA, SAPDTRPL y SAPDFRPL, encontrándose una gran afinidad al surco de la (H-2Kb).

Se concluyó que el cambio de un aminoácido de la secuencia SAPDTRPA a SAPDFRPL aumenta la fuerza de unión a la molécula H-2Kb y son capaces de activar a CTLs aislados de ratones transgénicos para eliminar a las células tumorales generadas en ellos (Sandra, 2001).

La línea celular linfoblástica humana T2 ha sido utilizada como células presentadoras de antígeno en modelos experimentales, ya que expresan moléculas MHC clase I con alelo A\*0201 (HLA-A\*0201), de manera inestable en su superficie, debido a la ausencia de la  $\beta$ 2-m que se requiere para su estabilización; también carece de moléculas transportadoras TAP, así como de moléculas coestimuladoras. Varios autores lograron cargar el glicopéptido SAP10 (SAPDTGalNAcRPAPG) derivado de la VNTR de MUC1 de manera exógena en las moléculas HLA-A\*0201 (Ninkovic, 2009) y se evaluó la reactividad de los CTLs específicos para este glicopéptido (tGerloni, 2005).

Para el uso la línea celular T2 como APC para activar LT CD8+ heterólogos, se usaron perlas recubiertas de anticuerpos monoclonales (mAb) dirigidos a CD28, generando las señales coestimuladoras (Hall, 2013). En un trabajo publicado recientemente, se estandarizó el sistema de presentación de antígeno con las células T2 utilizando el péptido MUC1-8 mer en conjunto con la proteína  $\beta$ 2-m para estabilizar al HLA-A\*0201 en la superficie celular de la línea celular (J.A., 2015). Se evaluó la capacidad para activar de manera específica a los LT CD8+ aislados de pacientes con adenocarcinoma pulmonar con alelo HLA-A\*0201, pero no se evaluó la capacidad de proliferación ni su posible funcionalidad, por lo que este trabajo es continuación del mismo.



## 2. JUSTIFICACIÓN

Aunque el cáncer pulmonar representa un gran problema de salud pública a nivel mundial, no ha sido posible controlarlo con los tratamientos convencionales, que generalmente, van asociados con muchos efectos colaterales adversos y sólo en un porcentaje bajo tienen efecto curativo.

Utilizar el efecto antitumoral del sistema inmune como un apoyo a la terapia convencional, podría ayudar a disminuir los efectos colaterales e incrementar el éxito de los tratamientos.

La inmunoterapia adoptiva, al reactivar las propiedades defensivas del sistema inmunológico del paciente, ha demostrado ser una de las opciones más eficientes, además de específicas para combatir el cáncer. Por esta razón, en el laboratorio de Bioquímica de la Unidad de Investigación del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias Ismael Cosío Villegas (INER), se evaluó la capacidad de activación *in vitro* de clones específicas al péptido MUC1-8 mer de LT CD8+ restringidos al alelo HLA-A\*0201, así como su capacidad de proliferación y su función biológica, con el sistema estandarizado que consta de células T2, más la proteína  $\beta$ 2-m, más el péptido sintético MUC1-8 mer y las señales coestimuladoras proporcionadas por perlas acopladas a anticuerpos antiCD2 y antiCD28, obteniendo un sistema que represente menos desventajas, y pueda ser utilizado en la inmunoterapia adoptiva en pacientes con adenocarcinoma pulmonar.

### 3. HIPÓTESIS

El sistema de activación artificial, que consta de células T2, más la proteína  $\beta$ 2-m, más el péptido MUC1-8 mer y las perlas acopladas a anticuerpos antiCD2/ antiCD28 (sistema coestimulador), permitirá obtener clonas de LT CD8+ que responden *in vitro* al estímulo con dicho péptido, derivado del antígeno tumoral MUC1.

### 4. OBJETIVO GENERAL

Determinar si el péptido MUC1-8 mer presentado por las células T2 activa *in vitro* a linfocitos T CD8+ de donadores sanos HLA-A\*0201.

### 5. OBJETIVOS PARTICULARES

1. Activar *in vitro* los LT CD8+ con un sistema artificial (que incluye a las células T2, más la proteína  $\beta$ 2-m, más el péptido MUC1-8 mer y las señales coestimuladoras).
2. Evaluar el aumento en la expresión de CD25, así como la producción de INF $\gamma$  de los LT CD8+ específicos al péptido MUC1-8 mer.
3. Demostrar la expansión *in vitro* de los LT CD8+ específicos del péptido MUC1-8 mer de donadores sanos HLA-A\*0201+.

## 6. MATERIAL Y MÉTODO

### 6.1. Tipo de proyecto: Experimental

Se trabajó con sangre periférica de donadores sanos, proveniente del personal del departamento de Bioquímica del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias (INER), los cuales, aceptaron previamente participar en el estudio, dando su consentimiento por escrito.

### 6.2. Criterios de inclusión

Muestras de donadores sanos, HLA-A\*0201+, con grupo sanguíneo O+, de entre 20 y 30 años de edad, ambos sexos.

### 6.3. Línea celular T2

Se utilizó la línea celular linfoblástica de origen tumoral denominada T2, de la colección de American Type Culture Collection (ATCC) CRL-1992TM (Manassas, VA). Las células T2 se expandieron para formar un banco de células, que se mantuvieron en congelación a  $-70^{\circ}\text{C}$  hasta su uso. Para los ensayos biológicos, estas células se mantuvieron en cultivo ya que fueron utilizadas durante todo el trabajo.

## 6.4. Cinética de proliferación de la línea celular linfoblástica de origen tumoral T2

Se determinó la cinética de proliferación de las células en cultivo antes de iniciar los ensayos biológicos, utilizando botellas de cultivo T-75 estériles, con medio de cultivo RPMI-1640 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) suplementado con 20% de suero fetal bovino (Gibco) inactivado por calor (SFB), 100 µg/mL de estreptomycin, 100 U/mL de penicilina, y 2 mM L-glutamina (Gibco-life Technologies, Rockville, MD) a 37°C en atmósfera de CO<sub>2</sub> 5%.

El inóculo inicial de células fue de 1X10<sup>6</sup> en 10 mL de medio suplementado. Se cosecharon las células cada 24 hrs, posteriormente se tomó una muestra para evaluar la concentración celular por mL y la viabilidad celular esperada (>95%) mediante la prueba de exclusión del colorante azul de tripano en una cámara de Neubauer, y se lavaron centrifugando a 1000 rpm/5 min a temperatura ambiente con medio de cultivo sin suplementar con SFB (1 mL).

## 6.5. Péptido SAPDTRPA (MUC1-8 mer)

El péptido SAPDTRPA derivado de MUC1 (MUC1-8 mer) fue sintetizado 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 este péptido por la molécula HLA-A2 fue confirmada mediante el programa NetMHC versión 3.4 (Lundegaard, 2008). La pureza del péptido (>95%), fue evaluada a través

del peso molecular obtenido por cromatografía líquida de alta resolución y por espectrometría de masas. El péptido se disolvió en dimetilsulfóxido (10 mg/mL) y se almacenaron a  $-70^{\circ}\text{C}$  hasta su uso.

## 6.6. Estabilización de la molécula HLA-A\*0201 de la línea celular T2

$1 \times 10^6$  células T2 con una viabilidad del 99% fueron sembradas en placas de cultivo celular de 96 pozos con fondo plano (Thermo Scientific Nunc, Roskilde, Dinamarca) con medio de cultivo RPMI 1640 suplementado con SFB (Gibco-life Technologies, Rockville, MD) al 10%. Se adicionó al cultivo  $100 \mu\text{g}$  del péptido sintético MUC1-8 mer por cada  $1 \times 10^6$  células y  $500 \mu\text{g}$  de  $\beta 2\text{-m}$  por cada  $1 \times 10^6$  células. Se incubaron 24h a  $37^{\circ}\text{C}$  en una atmósfera de  $\text{CO}_2$  al 5%. Previamente a estos ensayos se estandarizó la dosis óptima de péptido y de  $\beta 2\text{-m}$ , que iban a ser utilizadas para incorporar el péptido en las células T2 para los ensayos biológicos (J.A., 2015). Una vez transcurrido el tiempo de incubación, las células se contaron y lavaron (1000 rpm/ 5 minutos/ TA), se les adicionó solución fijadora de paraformaldehído (PFD) al 1% ( $150 \mu\text{L}/ 1 \times 10^6$  células) para posteriormente lavar 3 veces (1000 rpm/5 minutos/ TA) en tubos de 15 mL (Axygen scientific), con medio de cultivo RPMI 1640 (5 mL). El sobrenadante fue decantado para adicionar medio de cultivo AIMV suplementado con SFB al 10% ( $200 \mu\text{L}/ .2 \times 10^6$  células). Este procedimiento ya había sido previamente estandarizado en otro trabajo (J.A., 2015).

## 6.7. Separación de células mononucleares por gradiente de densidad

Se obtuvieron 30 mL de sangre periférica de donadores sanos, la cual fue diluida con medio de cultivo RPMI 1640 (1:1) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO). En tubos de 15 mL (Axygen scientific), se colocaron 3 mL de Ficoll-Hypaque (1.007 de densidad) y posteriormente se fue adicionando lentamente por las paredes del tubo 10 mL de la sangre diluida, para evitar mezclar ambas fases, finalmente se centrifugó a 1700 rpm/ 30 minutos/ 10°C. Una vez finalizado el tiempo de centrifugación, el anillo celular que se formó fue recuperado con pipeta volumétrica de 5 mL (ExactaCruz). Las células recuperadas del anillo se lavaron con 10 mL de medio de cultivo RPMI 1640, centrifugando a 1500 rpm/ 10 minutos/ 10°C. Las células se cuantificaron en un hemocitómetro y se evaluó su viabilidad por medio de la técnica de exclusión del colorante azul de Tripano.

## 6.8. Fenotipificación de HLA mediante citometría de flujo

Se realizó una inmunotinción para determinar el fenotipo de HLA del donador sano. A partir de  $4 \times 10^6$  células mononucleares de sangre periférica, las células se lavaron con 1 mL de buffer PBS 1X (fosfato sódico 0,01 M, cloruro de sodio 0,15 M, pH 7,2) suplementada con 0,5% de BSA y 2mM de EDTA, a una velocidad de 1500 rpm/ 10 minutos/ 10°C. El sobrenadante se decantó procurando mantener un volumen de 100  $\mu$ L del PBS 1X. Se adicionaron 10  $\mu$ L del mAb anti HLA-A\*0201/FITC de la marca Biolegend en la suspensión celular y se incubó en obscuridad a 4°C/ 20 minutos.

Pasado el tiempo, las células se lavaron con PBS 1X y se decantó el sobrenadante. Las células se resuspendieron en 400  $\mu\text{L}$  de la solución facs flow (BD bioscience) para adquirirlas en el citómetro de flujo Facs Calibur, BD Bioscience. Los resultados fueron analizados mediante el software FlowJo 8.7.

### 6.9. Purificación de linfocitos T CD8+ por separación magnética (selección negativa)

Linfocitos T CD8+ fueron aisladas por separación magnética a partir  $40 \times 10^6$  células mononucleares de sangre periférica obtenida de donadores sanos con HLA-A\*0201+, utilizando el kit de selección negativa magnética (Miltenyi Biotec), de acuerdo al siguiente procedimiento: Se adicionó la solución buffer PBS 1X (120  $\mu\text{L}$ /  $40 \times 10^6$  células) y 100  $\mu\text{L}$  del coctel de mAb biotinados del kit de aislamiento de LT CD8+ (Miltenyi Biotec). Las células se incubaron en oscuridad 10 minutos/  $4^\circ\text{C}$ . Una vez transcurrido el tiempo, se incubaron las células con solución formada por 200  $\mu\text{L}$  de la mezcla de mAb antibiotina acoplados a perlas magnéticas del kit de aislamiento de LT CD8+ por selección negativa, resuspendidos en 1 mL de PBS 1X. La suspensión celular se incubó 15 minutos/  $4^\circ\text{C}$ / Oscuridad. Una vez transcurrido el tiempo de incubación las células se lavaron con 2 mL de la solución PBS 1X y se resuspendió en 3 mL de medio RPMI 1640.

La suspensión celular marcada con los mAb fue colocada en condiciones de esterilidad en una columna de separación magnética (Miltenyi Biotec), previamente hidratada con RPMI (3 mL) y equilibrada, para hacerla pasar por un campo magnético generado por un imán.

Para separar los LT CD8+, se eluyó la columna con medio de cultivo RPMI 1640. En la fracción eluyente del medio de cultivo se encontraban los LT CD8+ que fueron recuperados en un tubo de 15 mL. Posteriormente se contaron las células purificadas y se evaluó la viabilidad con azul de tripano.

#### 6.10. Evaluación de pureza para los Linfocitos T CD8+ mediante citometría de flujo

Se verificó la pureza de los LT CD8+ por citometría de flujo mediante la siguiente técnica. Las células purificadas por el sistema Miltenyi Biotec se lavaron con 1mL de PBS (1500 rpm/ 5 minutos/TA), posteriormente se adicionó la mezcla de anticuerpos anti CD8/FITC (5  $\mu$ L), CD4/PE (.2 $\mu$ L) y CD3/PerCP-Cy 5.5 (2 $\mu$ L). Las células fueron resuspendidas e incubadas (20 minutos/ 4°C/ Oscuridad), tras el término del tiempo de incubación las células fueron lavadas con buffer PBS 1X, El sobrenadante se decantó y el botón celular se resuspendió en 400  $\mu$ L de la solución FACS Flow (BD Bioscience) para evaluarlos por citometría de flujo en el citómetro FACS Calibur, BD Bioscience. Los resultados obtenidos fueron analizados mediante el software FlowJo 8.7.



### 6.11. Activación específica de clonas de linfocitos T CD8+ puras usando el péptido MUC1-8 mer

Los LT CD8+ purificados fueron activados mediante las células de la línea linfoblástica T2, a la cual ya se le había incorporado previamente el péptido sintético MUC1-8 mer como se describió anteriormente en la estabilización de la molécula HLA-A\*0201. Una vez cargadas las células T2 con el péptido sintético, se sembraron  $0.4 \times 10^6$  de estas células con  $0.2 \times 10^6$  LT CD8+ purificados por selección negativa, en una placa de cultivo de 96 pozos con 400  $\mu\text{L}$  de medio de cultivo AIMV suplementado con SFB al 10%. A este cocultivo, se les adicionaron 2  $\mu\text{L}$  del kit de perlas acopladas a mAb anti CD2-CD28 del sistema coestimulador en ausencia del mAb anti-CD3 de la marca Miltenyi Biotec. Este cocultivo se incubó por 6 horas, 3, 6 y 10 días/  $37^\circ\text{C}$ / 5%  $\text{CO}_2$ . Para mantener las condiciones óptimas para la proliferación, se adicionó al cocultivo de células cada 3 días, 20 UI/mL de IL-2 recombinante (rIL-2). Se hizo re-estimulación con la célula presentadora cargada ( $0.2 \times 10^6$ ) cada 7 días. En cada punto de corte (6 horas, 3, 6 y 10 días) se evaluó la expresión de CD25 e IFN $\gamma$  en estas células T por citometría de flujo, ya que este es uno de los fenotipos de activación de los linfocitos T, marcando con anticuerpos monoclonales, como se describe más adelante.

## 6.12. Activación de linfocitos T CD8+ controles con estímulos policlonales, usando el Kit de perlas acopladas a mAb anti CD2, CD28, CD3

Se sembraron  $0.4 \times 10^6$  LT CD8+ purificados, en un pozo de una caja de cultivo de 96 pozos con 400 mL de medio de cultivo AIMV suplementado con SFB al 10%. Se colocaron 2  $\mu$ L por cada  $0.4 \times 10^6$  células del estímulo policlonal que sustituye el péptido por anticuerpo CD3 acoplado a perlas contenido en el Kit comercial de la marca Miltenyi Biotec, (mAb antiCD2, antiCD3, antiCD28). Las células se incubaron en las mismas condiciones del punto anterior (6 horas, 3, 6 y 10 días/ 37°C/ 5% CO<sub>2</sub>) haciendo el estímulo de IL-2 en las mismas condiciones y evaluando los marcadores de activación mencionados en el punto anterior. Estas células fueron consideradas el control positivo de técnica para la activación.

## 6.13. Ensayos de proliferación (CFSE)

Antes de los ensayos de proliferación se estandarizó la técnica y se definió la concentración óptima de Carboxifluorescein Succimidil Ester (CFSE) para evaluar la proliferación de los linfocitos T por citometría de flujo, después de la activación por el sistema descrito.  $2.4 \times 10^6$  LT CD8+ purificados, se lavaron en tubos eppendorf de 1.5 mL a 1500 rpm/5 minutos/ TA, con 1.5 mL de medio de cultivo RPMI 1640 sin SFB. Al término, se eliminó por decantación el sobrenadante, conservando 240  $\mu$ L del volumen del medio de cultivo y se adicionaron diferentes volúmenes de una solución 200 mM de CFSE para determinar la concentración óptima.

Las células se resuspendieron y se incubaron por 15 minutos en movimiento y oscuridad. Al término del tiempo, se inactivó el CFSE con 2 mL de medio de cultivo RPMI 1640 suplementado al 10% con SFB y las células se lavaron a 1500 rpm/10 minutos/ TA.

Finalmente, con estas células marcadas con CFSE se hicieron los ensayos de activación mencionados en los 2 puntos anteriores, sólo para incorporar las mediciones de proliferación posterior a la activación con el sistema mencionado. Los resultados de la proliferación fueron adquiridos por citometría de flujo, en un citómetro Facs Calibur, Miltenyi Biotec, a los 3, 6 y 10 días y analizados con el software FlowJo 8.7.

#### 6.14. Tinción para citometría de flujo

Una vez concluidos los ensayos biológicos, se evaluaron los marcadores de activación y el número de divisiones celulares en las células activadas con el péptido y con el estímulo policlonal.

Las células se cosecharon de la placa manualmente con micro pipetas y se colocaron en tubos eppendor de 1.5 mL para lavarlas con 1 mL de PBS 1X a 1500rpm/ 5 minutos/ TA. El sobrenadante se decantó y el botón celular se incubó con los mAb anti CD25/PE, de la marca Biolegend (3 $\mu$ L/ 0.4X10<sup>6</sup> células) a 4°C/ 30 minutos/ Oscuridad. Al término del tiempo, se lavaron las células con 1mL de la solución buffer PBS 1X a 1500rpm/ 5 min/ TA. Después de decantar el sobrenadante, el botón se lavó dos veces con 1mL de la solución 1X de lavado y permeabilización de la marca Biolegend, a 1500 rpm/10 minutos/TA para hacer el marcaje intracelular para identificar la producción de IFN $\gamma$  en las células activadas. Inmediatamente después se

agregó 500  $\mu\text{L}$  de la solución fijadora de PFD al 4% para incubarlas 20 min/ TA/ Oscuridad. Al término de la incubación, se lavó con 1 mL de la misma solución de lavado y permeabilización 1X. Posteriormente se incubaron las células con 5  $\mu\text{L}/0.4 \times 10^6$  células de mAb anti IFN $\gamma$ / FITC de la marca Biolegend por 20 minutos/ TA/ Oscuridad. Finalmente, las células se lavaron en dos ocasiones y se resuspendieron en 400  $\mu\text{L}$  de la solución Facs Flow para analizarlas por citometría de flujo y FlowJo 8.7.

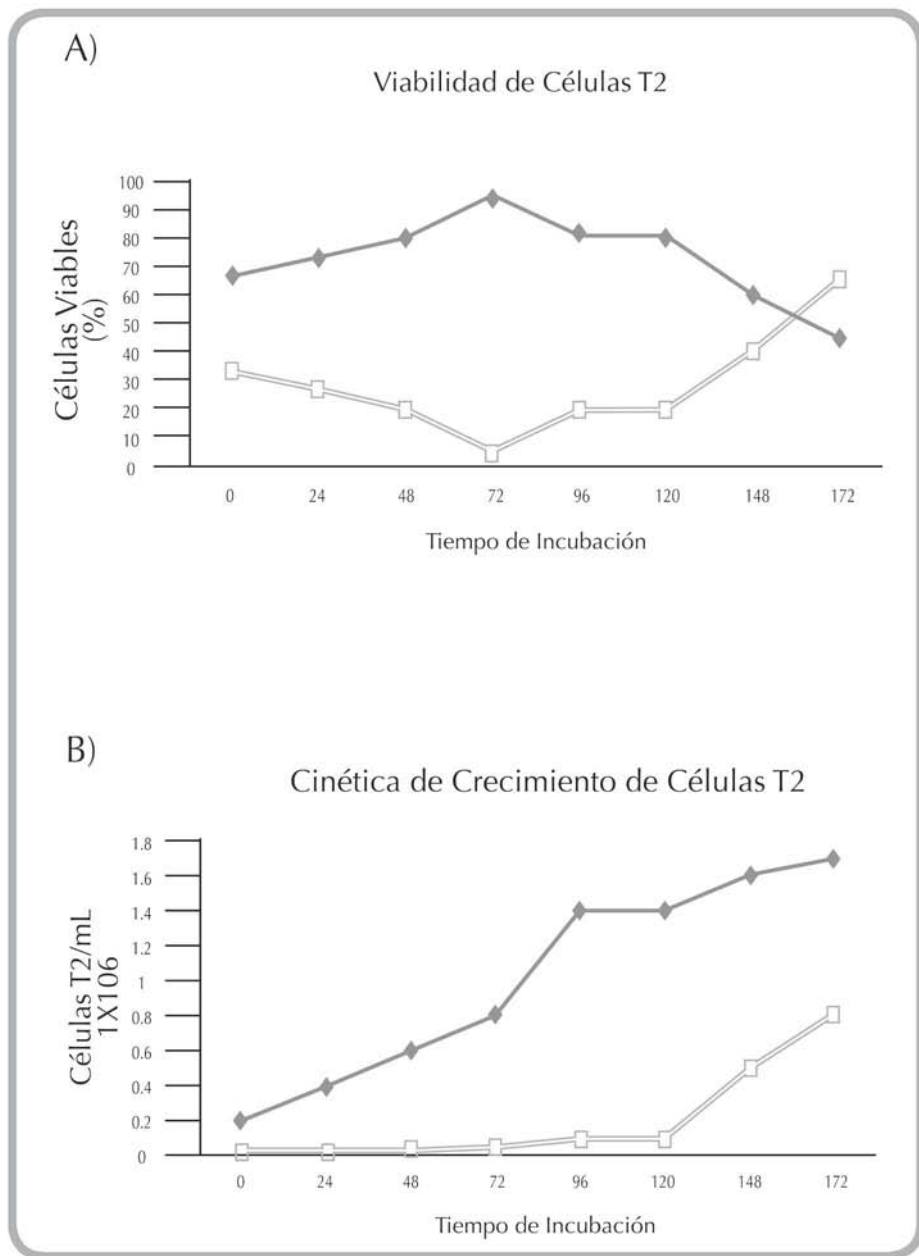
## 7. RESULTADOS

### 7.1. Cinética de proliferación de la línea celular linfoblástica de origen tumoral T2

Se identificó que las células de la línea celular T2 requieren un tiempo de duplicación de 24 horas bajo las condiciones anteriormente descritas. El máximo porcentaje de viabilidad (99%) se obtuvo a las 72 horas. Este porcentaje de viabilidad del 99% se mantiene con una concentración máxima de  $1 \times 10^6$  células/ mL: Pasado este tiempo, la viabilidad de estas células comienza a bajar proporcionalmente (*Figura 10*).

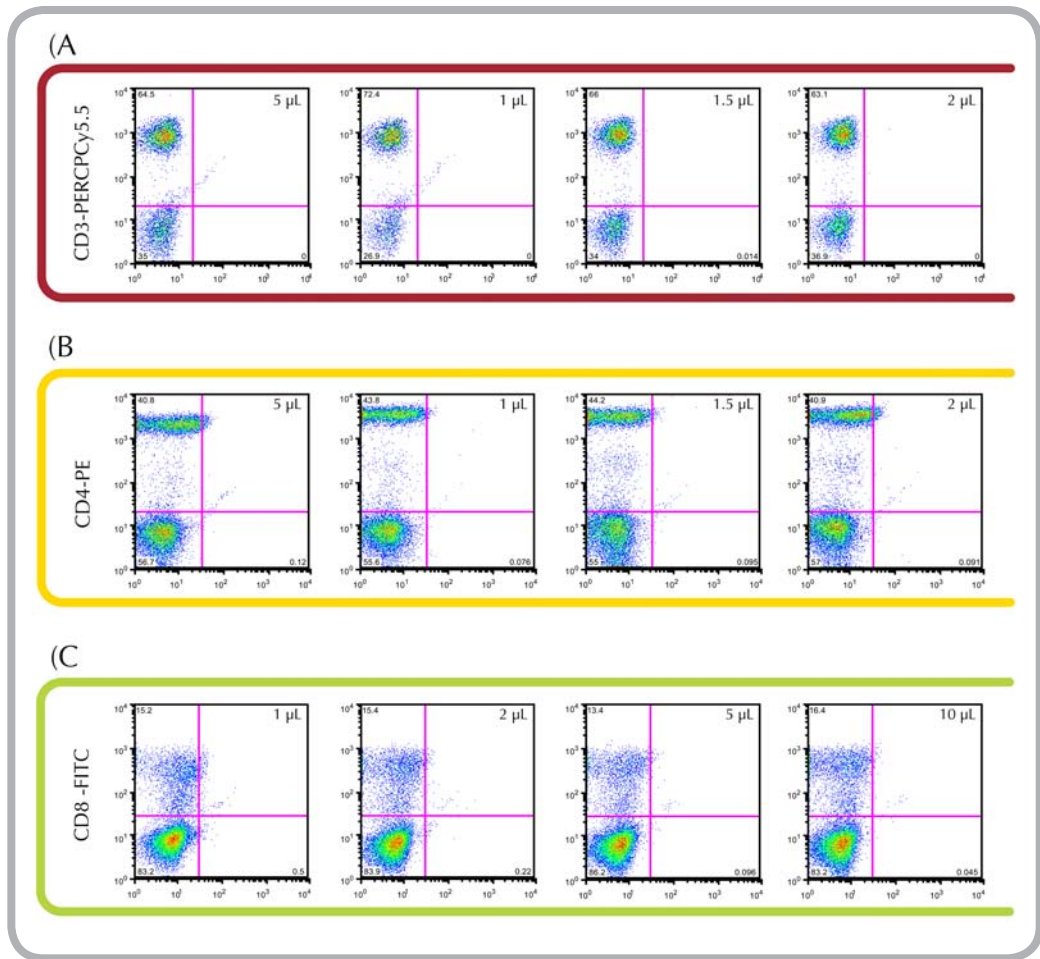
### 7.2. Estandarización de los mAb específicos a CD3, CD4, CD8

Antes de iniciar las evaluaciones de las células se hicieron las titulaciones de los mAb con  $1 \times 10^6$  células mononucleares para obtener las cantidades óptimas que se muestran en la (*Figura 11*). Se obtuvieron 1, 1.5 y 10  $\mu$ L como las cantidades óptimas a utilizar de los mAb antiCD3/ PerCPCy5.5, antiCD4/ PE y antiCD8/ FITC, respectivamente.



**Figura 10. Cinética de proliferación 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 (gris) y células muertas (blanco),  $n = 3$ .



**Figura 11. Estandarización de mAb CD4/PE, CD3/PerCPCy5.5, CD8/FITC.**

A) Se muestran los Dot Plot de cuatro volúmenes distintos utilizados, de los cuales, se obtuvo el mayor porcentaje de células mononucleares de sangre periférica teñidas (72.4%) con 1 µL/  $1 \times 10^6$  células del mAb anti CD3/PerCPCy5.5. B) Se muestran los Dot Plot de cuatro volúmenes distintos utilizados, de los cuales, se obtuvo el mayor porcentaje de células teñidas (44.2%) con 1.5 µL/  $1 \times 10^6$  células del mAb anti CD4/PE. C) Se muestran los Dot Plot de cuatro volúmenes distintos utilizados, de los cuales, se obtuvo el mayor porcentaje de células teñidas (16.4%) con 10 µL/  $1 \times 10^6$  células del mAb anti CD8/FITC.

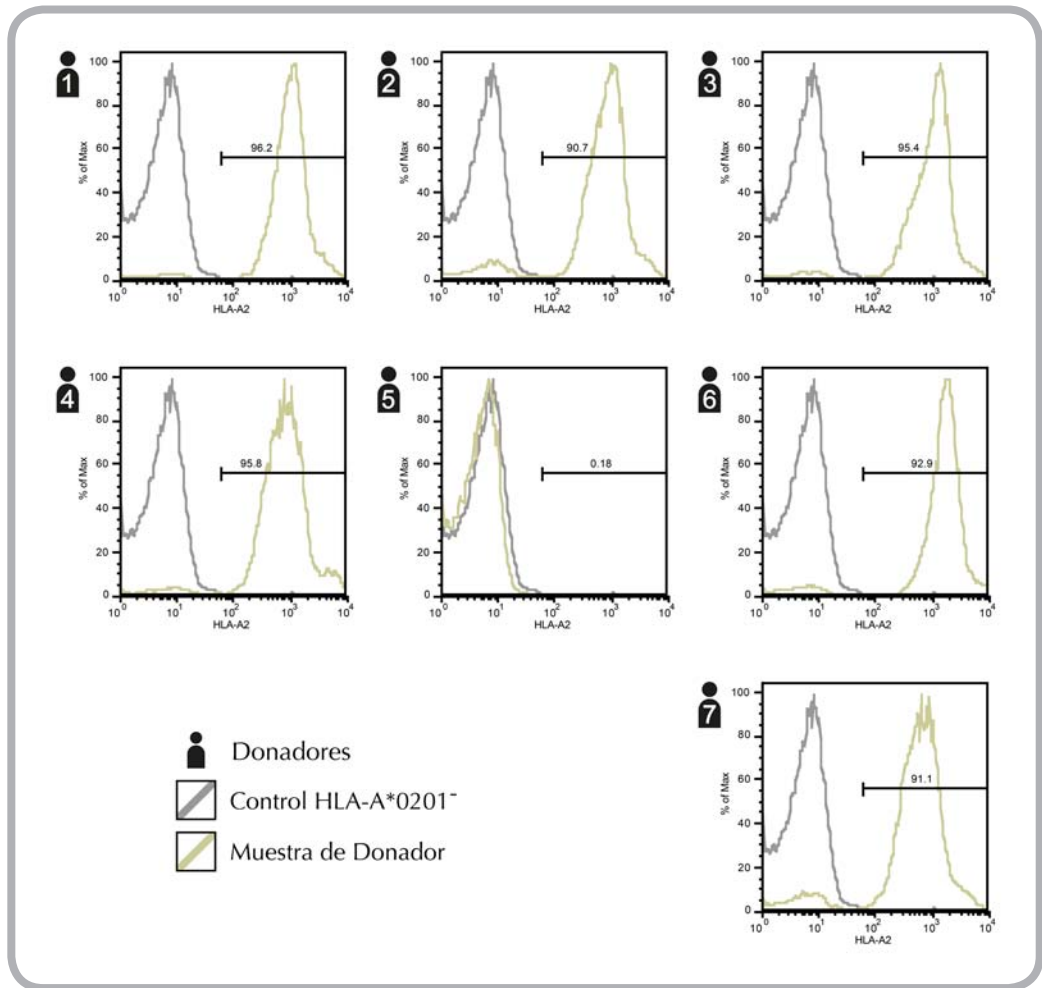
### 7.3. Tipificación del antígeno leucocitario humano del alelo A\*0201 (HLA-A\*0201)

Las siete muestras de sangre periférica obtenidas de los donadores sanos fueron marcadas con un Anticuerpo monoclonal (mAb) dirigido a la molécula HLA-A\*0201 acoplado al fluorocromo PE de la marca Biolegend. Seis de las siete muestras de los donadores sanos resultaron positivas para la molécula HLA-A\*0201 (*Figura 12*).

### 7.4. Evaluación de la pureza para los linfocitos T CD8+/HLA-A\*0201+ aislados mediante perlas magnéticas por selección negativa

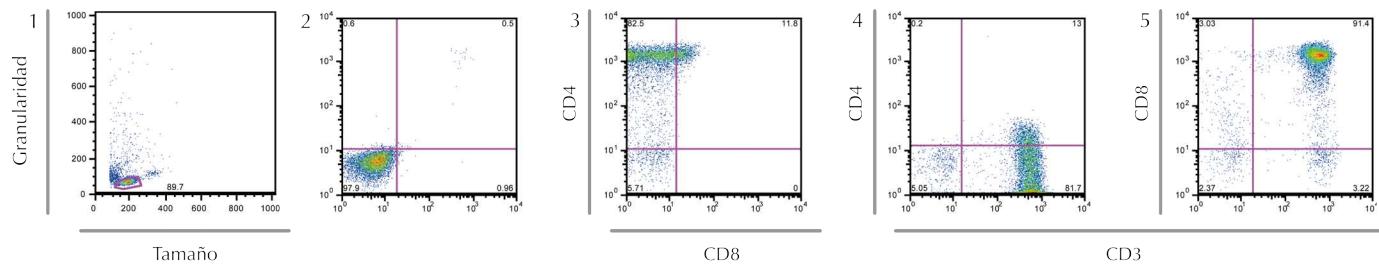
Después de purificar los LT CD8+/ HLA-A\*0201+ de sangre periférica de los donadores sanos, con el Kit de purificación por selección negativa, se procedió a evaluar la pureza de estas células. Para esto se incubaron con los mAb antiCD3, antiCD4 y antiCD8, acoplados a los fluorocromos PerCp-Cy5.5, PE y FITC respectivamente, todos de la marca Biolegend. Al realizar el análisis de la citometría de flujo con el software FlowJo 8.7, se obtuvo un 91.4% de las células positivas para CD3 y CD8 por lo que obtuvimos una pureza óptima de éstas, para realizar los experimentos posteriores (*Figura 13*).





**Figura 12. Tipificación de moléculas HLA de las muestras de sangre periférica de los donadores sanos.**

Los histogramas en color gris representan el control negativo para la molécula HLA-A\*0201, mientras que los histogramas en color dorado representan las muestras de sangre periférica de los donadores sanos. Las muestras de los donadores 1, 2, 3, 4, 6 y 7 resultaron positivas para la molécula HLA-A\*0201 al ubicarse sus histogramas en la región positiva (contraria al control negativo), mientras que la única muestra, la del donador 5, empata con el control negativo y por ello, resulta ser negativo para la molécula HLA-A\*0201.



**Figura 13. Evaluación de la pureza de los Linfocitos T CD8<sup>+</sup>/HLA-A\*0201.**

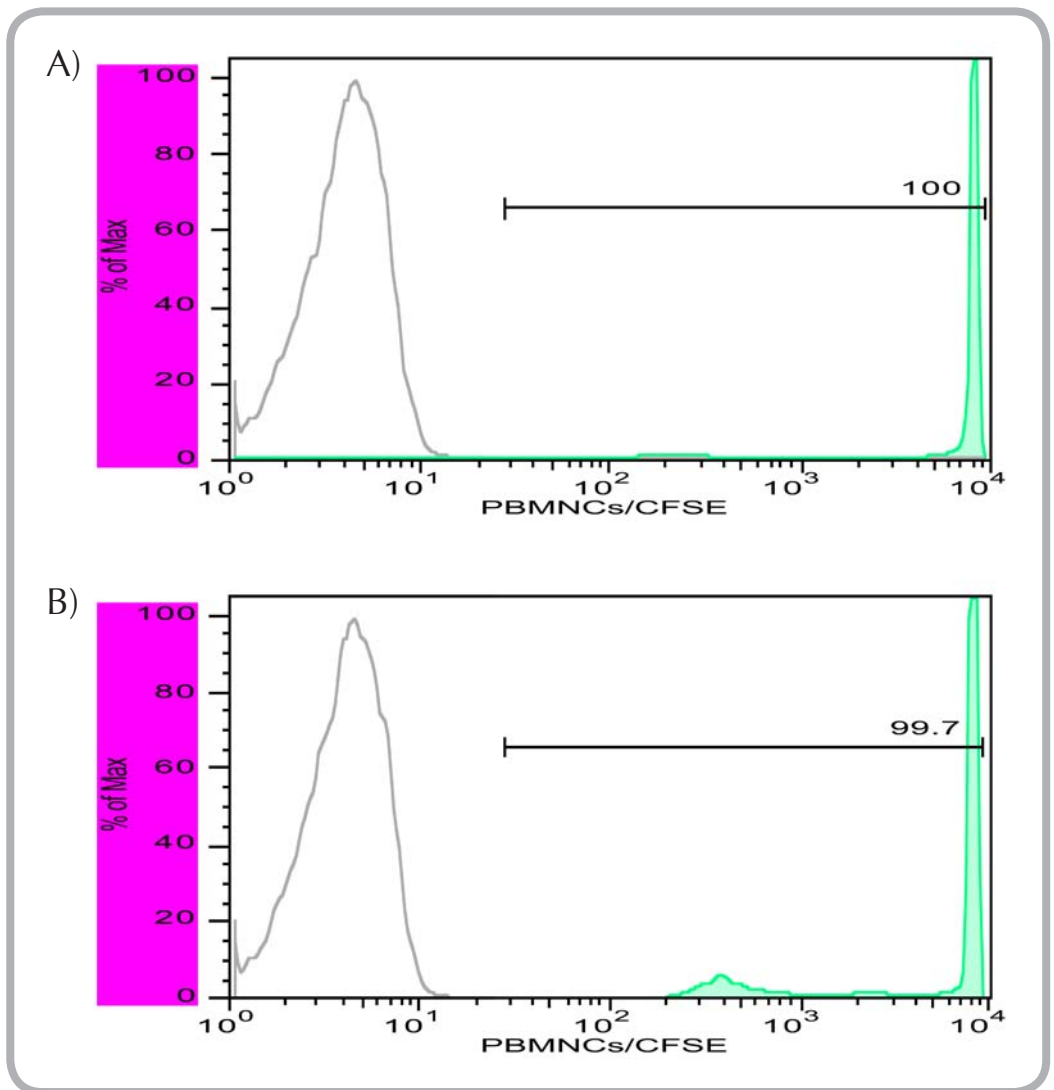
- (1) Se observa el tamaño contra granularidad de la población seleccionada para su evaluación.
- (2) Dot Plot para el control negativo (células sin marcaje).
- (3) Dot Plot con un valor de 0% en la región para CD4<sup>+</sup> y 85% en la región para CD8<sup>+</sup>.
- (4) Dot Plot con un valor de 0.2% CD4<sup>+</sup> y 81.7% en la región para CD3<sup>+</sup>.
- (5) Dot Plot con un valor de 91.4% en la región doble positiva para CD8, CD3.

## 7.5. Estandarización de la tinción con Carboxyfluorescein Succinimidil Ester (CFSE) en Linfocitos T CD8+

El CFSE es un colorante ampliamente utilizado para estudios de proliferación celular por su facilidad de atravesar la membrana y una vez dentro de la célula, una esterasa escinde los grupos acetato y se produce la molécula de carboxifluoresceína (CFSE).

Fue importante hacer la estandarización de la tinción de células con CFSE, para hacer una evaluación correcta de los resultados de proliferación celular. Se hizo una evaluación de las fluorescencias en las células sin estímulo y tratadas con CFSE, utilizando 2 concentraciones partiendo de una solución stock a 200 mM, 1.5 y 2.5  $\mu\text{L}/1 \times 10^6$  células, es decir 0.03 mM y 0.05 mM respectivamente. Se observó que al usar la concentración de 0.03 mM de CFSE para  $1 \times 10^6$  células, se obtiene una tinción homogénea en el 100% de las células; con esta información se planearon los ensayos biológicos con los linfocitos de los controles sanos (*Figura 14*).





**Figura 14. Estandarización para la tinción con CFSE.**

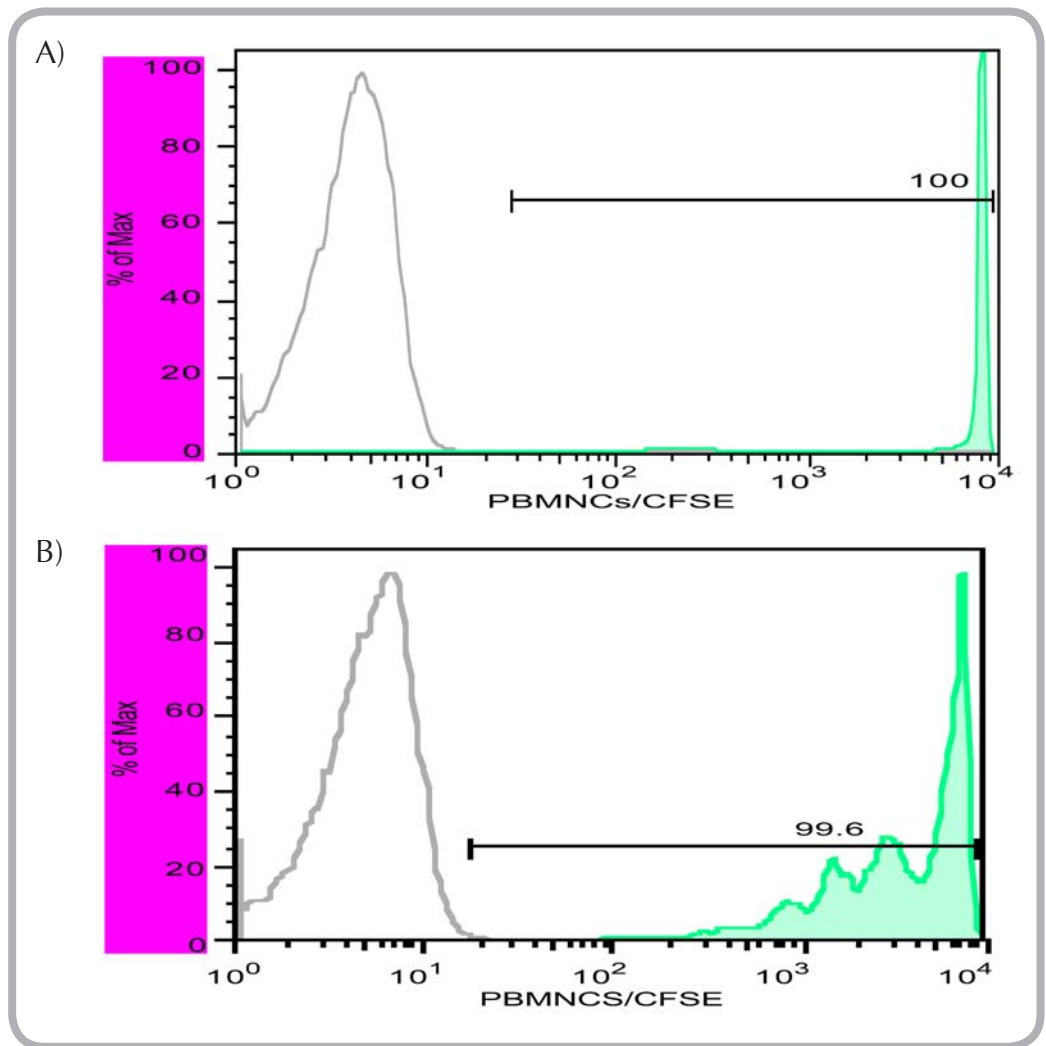
A) En color gris se muestra el histograma correspondiente al control negativo (células sin tinción con CFSE) y en verde se muestran las células teñidas con  $1.5 \mu\text{L}$  ( $.03 \text{ mM}$ ) de CFSE (para  $1 \times 10^6$  células), se obtuvo una tinción de manera muy homogénea en el 100% de las células. B) En color gris se muestra el histograma correspondiente al control negativo (células sin tinción con CFSE) y en verde se muestran las células teñidas con  $2.5 \mu\text{L}$  ( $0.05 \text{ mM}$ ) de CFSE (para  $1 \times 10^6$  células), en esta condición la tinción no fue tan homogénea, el 99.7% de las células fueron teñidas.

Después de definir la concentración óptima de CFSE para estos ensayos, se incubaron los LT CD8+ purificados con 1.5  $\mu$ L de CFSE 200 nM, se incubaron 15 minutos en oscuridad y se lavaron para posteriormente estimularlos con el Kit de activación policlonal completo (perlas acopladas a mAb antiCD2, antiCD3 y antiCD28). Por citometría de flujo, se evaluaron a las 72 horas después de la activación, en ese tiempo la división celular fue muy clara (*Figura 15*).

## 7.6. Activación de Linfocitos T CD8+ específicos al péptido SAPDTRPA (MUC1-8 mer)

Una vez estandarizadas las condiciones de evaluación con el CFSE y con los mAb titulados, se procedió a evaluar nuestro sistema de activación específicos utilizando el péptido sintético MUC1-8 mer, junto con el sistema de coestimulación (perlas acopladas a los anticuerpos antiCD2 y antiCD28).

En la Figura 16 y la Tabla 1 se muestra la expresión del marcador de activación CD25 y el IFN $\gamma$  intracelular para cada condición de activación (Sistema de activación específico con el péptido, control positivo con estímulo policlonal, control negativo sin estímulo) de los LT CD8+ en los diferentes tiempos del monitoreo (6, 72 y 168 hrs) en uno de los donadores.



**Figura 15. Activación con Kit policlonal (perlas acopladas a mAb anti CD2, CD3, CD8).**

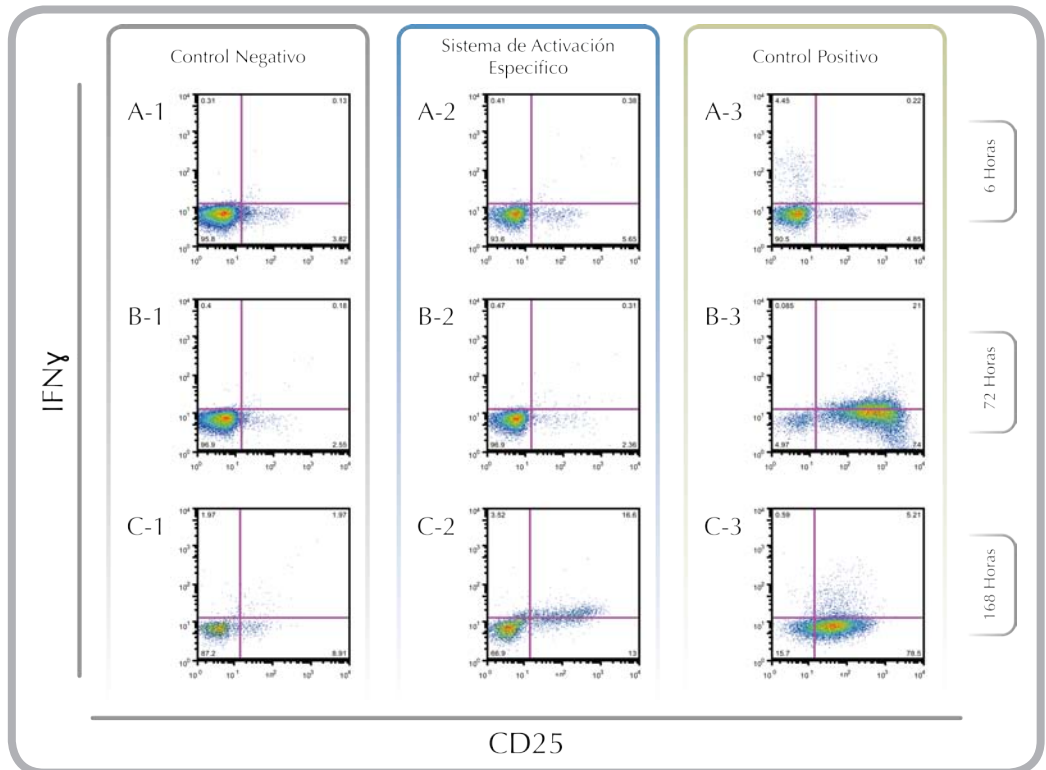
A) En color gris se muestra el control negativo (células sin tinción) y en verde se muestra la tinción inicial a las 0 hrs ( $1.5 \mu\text{L CFSE} / 1 \times 10^6$  células) con el estímulo de activación policlonal. B) En color gris se muestra el control negativo (células sin tinción) y en verde se muestran las células teñidas después de 72 hrs con el estímulo de activación policlonal, puede observarse un desplazamiento hacia la región negativa de un porcentaje de las células teñidas con CFSE, esto debido a la pérdida de la tinción por las divisiones celulares.

Tiempo (Horas)	Control Negativo (%)			Sistema de Activación Especifico (%)			Control Positivo (%)		
	CD25	IFN $\gamma$	CD25/IFN $\gamma$	CD25	IFN $\gamma$	CD25/IFN $\gamma$	CD25	IFN $\gamma$	CD25/IFN $\gamma$
6	3.82	0	0	5.65	0	0	4.85	4.45	0
72	2.61	0	0	2.36	0	0	74	0	21
168	8.91	0	0	13	3.52	16.6	78.5	0	5.21

**Tabla 1.**

Expresión de marcador de activación CD25 e IFN $\gamma$  en las diferentes condiciones de activación.

En la tabla 1 se puede observar que para las 6, 72 y 168 horas en las células estimuladas con el sistema de activación hay una expresión de 5.65%, 2.36%, 13% de CD25; 0%, 0%, 3.52% de IFN $\gamma$  y 0%, 0%, 16.6% de células con doble marcaje CD25/ IFN $\gamma$  respectivamente, en cambio para las en las células sin estímulo de activación (control negativo) hay una expresión de 3.82%, 2.55%, 8.91% de CD25; 0% de IFN $\gamma$  y 0% de células con doble marcaje CD25/ IFN $\gamma$ . Finalmente en las células activadas con estímulo policlonal (control positivo) se obtuvo 4.85%, 74%, 78.5% de CD25; 4.45%, 0%, 0% de IFN $\gamma$  y , 0%, 21%, 5.21% de células con doble marcaje CD25/IFN $\gamma$ .

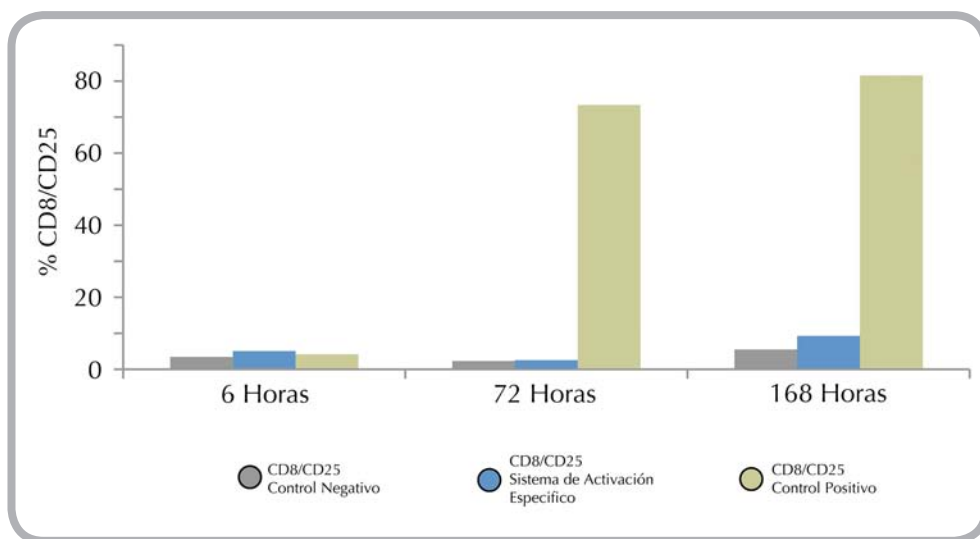


**Figura 16. Expresión de moléculas de activación CD25 e IFN $\gamma$ .**

Los Dot Plots muestran los porcentajes de expresión en las células para CD25, IFN $\gamma$  y la doble positivas para CD25/IFN $\gamma$  durante los tres tiempos en los que fueron evaluados (6, 72 y 168 horas). (A-1, B-1 y C-1) Control negativo, (A-2, B-2 y C-2) Sistema de activación específico al péptido MUC1-8 mer y (A-3, B-3 y C-3) Control positivo.

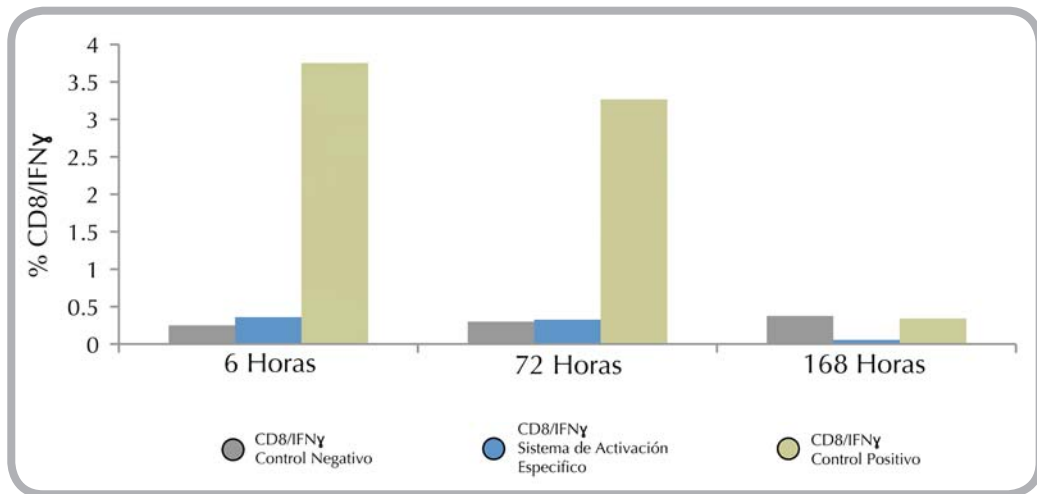


Al analizar estadísticamente los resultados de los cuatro donadores no se observan diferencias significativa entre ninguna de las tres condiciones experimentales (control negativo, sistema de activación y control positivo). Esto posiblemente se deba al bajo número de muestras con el que se trabajó, sin embargo, los datos parecen presentar cierta tendencia, estas tendencias fueron representadas gráficamente (*Figuras 17, 18 y 19*), las cuales nos indican una diferencia marcada entre las tres condiciones.



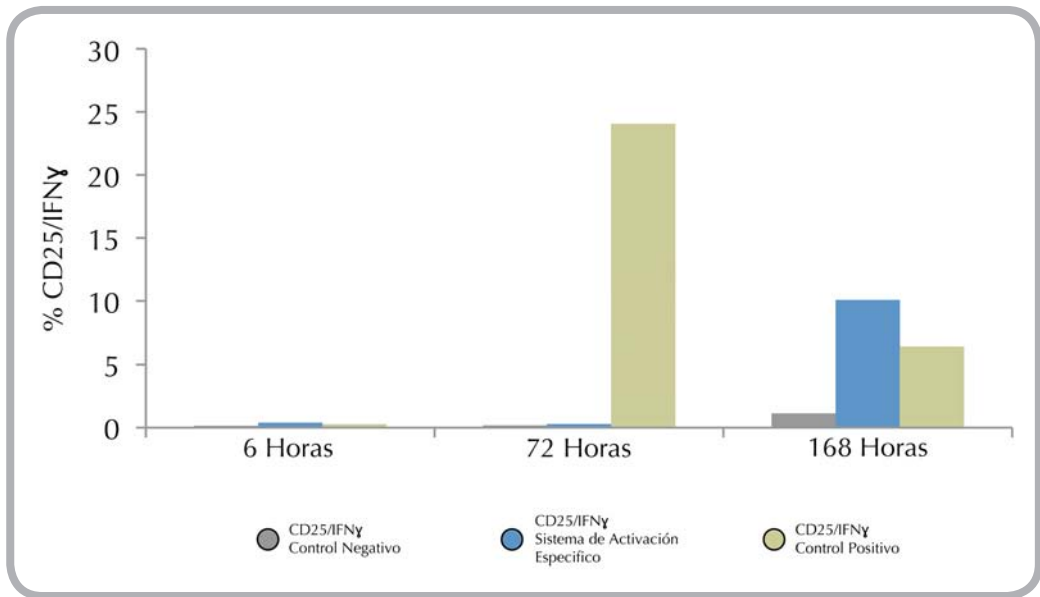
**Figura 17. Representación gráfica de las tendencias que siguen los porcentajes obtenidos para CD25, en los LT CD8+.**

Las tendencias durante los dos primeros tiempos (6 y 72 horas) parecen ser muy similares entre el control negativo y nuestro sistema de activación, sin embargo, a las 168 horas se observa una mayor expresión en el sistema de activación en comparación del control negativo. El control positivo muestra un crecimiento constante durante los tres tiempos siendo siempre el de mayor expresión para CD25.



**Figura 18. Representación gráfica de las tendencias que siguen los porcentajes obtenidos para IFN $\gamma$  en los LT CD8 $^{+}$ .**

Se observan porcentajes similares a las seis y 72 horas en la expresión del IFN $\gamma$  para el control negativo y el sistema de activación específico a MUC1-8 mer, a las 168 horas el control negativo mantiene sus valores, sin embargo, el sistema de activación específico disminuye. Por el contrario, el control positivo inicia con un porcentaje mayor al de las dos condiciones anteriores y conforme avanza el tiempo, a las 168 horas, disminuye su porcentaje.



**Figura 19. Representaciones gráficas de las tendencias que siguen los porcentajes obtenidos para CD25-IFN̳ en los LT CD8+.**

En los tiempos de seis y 72 horas, los porcentajes en la expresión de CD25 e IFN̳ en las células son de cero, tanto en el control negativo como en el sistema de activación específico al péptido MUC1-8 mer, el control negativo parece conservar este comportamiento hasta las 168 horas, en cambio el sistema de activación específico muestra un aumento significativo a las 168 horas. El control positivo denota un aumento considerable a las 72 horas, sin embargo, a las 168 horas disminuye su porcentaje de expresión.

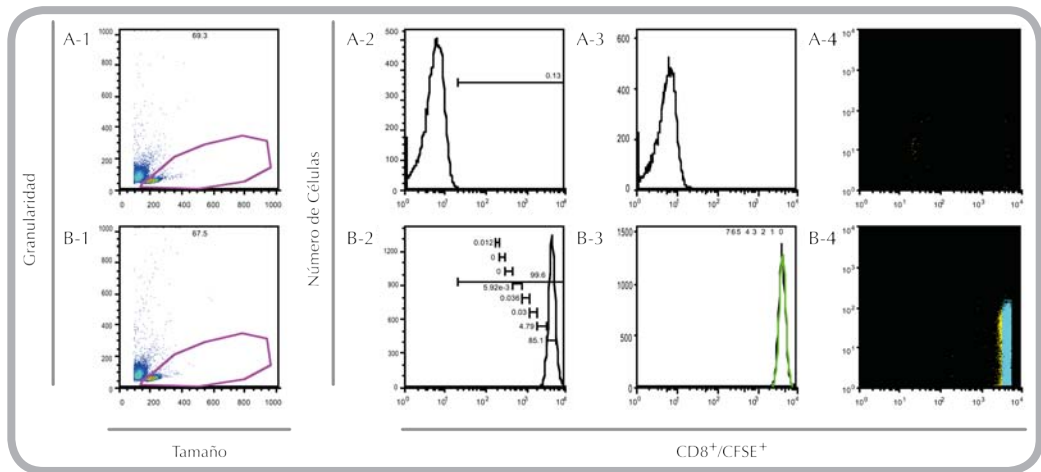
En las tres condiciones, se observa que durante los dos primeros tiempos de incubación, el sistema de activación específico al péptido MUC1-8 mer, parece no demostrar ningún efecto considerable, sin embargo en el tercer tiempo de incubación, se obtienen cambios en los porcentajes para la expresión de CD25, IFN̳ y CD25/IFN̳, incluso superando en el porcentaje de expresión para CD25/IFN̳ al control positivo (Figura 19).

## 7.7. Expansión de CTLs específicos al péptido SAPDTRPA (MUC1-8 mer)

Una vez evaluada la expresión de las moléculas de activación CD25 e IFN $\gamma$  en los LT CD8+, se llevaron a cabo ensayos de proliferación, utilizando la tinción con CFSE para evaluar las divisiones celulares posteriores al estímulo a los tres, seis y diez días. Todos los resultados fueron analizados por medio de citometría de flujo.

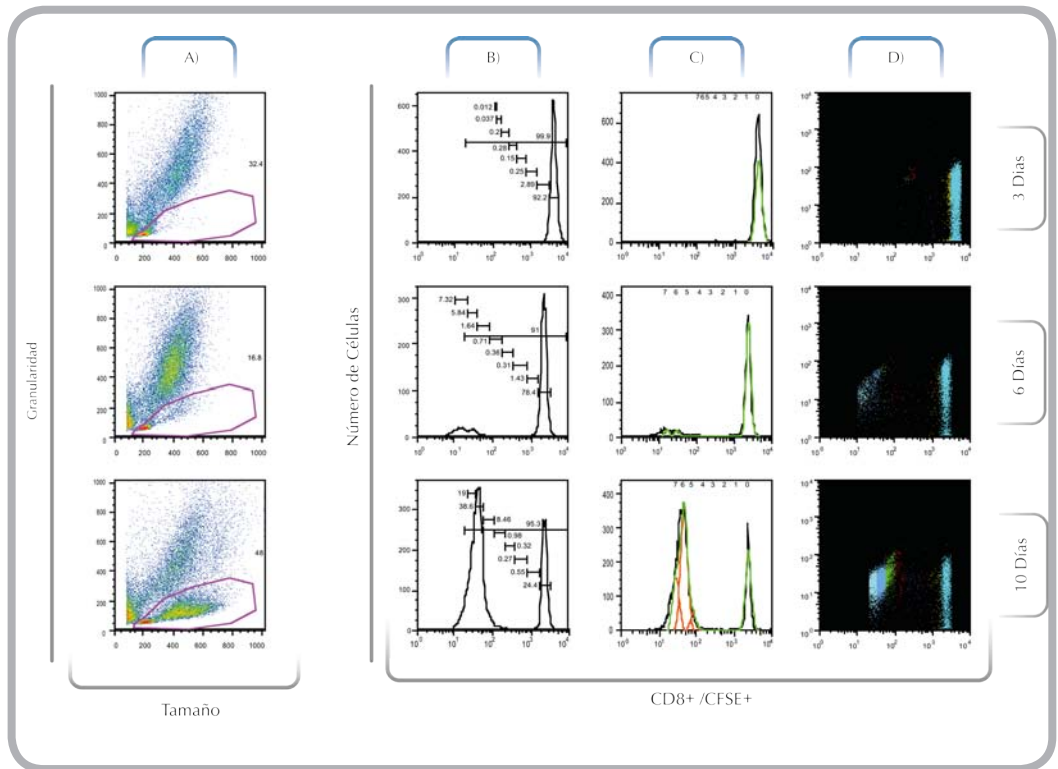
En un inicio la población total se encuentra en la región cero, esto significa que las células están teñidas en su totalidad y por lo tanto no han sufrido divisiones celulares (*Figura 20*).

Al transcurrir los tiempos de incubación, a partir del sexto día, una porción homogénea de la población total, ubicada en la región de división inicial, sufre un desplazamiento hacia la izquierda ubicándose en la región de división 6, este desplazamiento de derecha hacia la izquierda se observa en los histogramas, debido a la disminución en intensidad de fluorescencia por el CFSE, sin embargo, un porcentaje de la población total permanece en la región inicial, ya que no reacciona al estímulo del sistema de activación específico (*Figura 21*). Para el grupo control positivo, el desplazamiento se da en toda la población hasta la región de división 7 (*Figura 22*), contrario a las células estimuladas con nuestro sistema de activación específico.



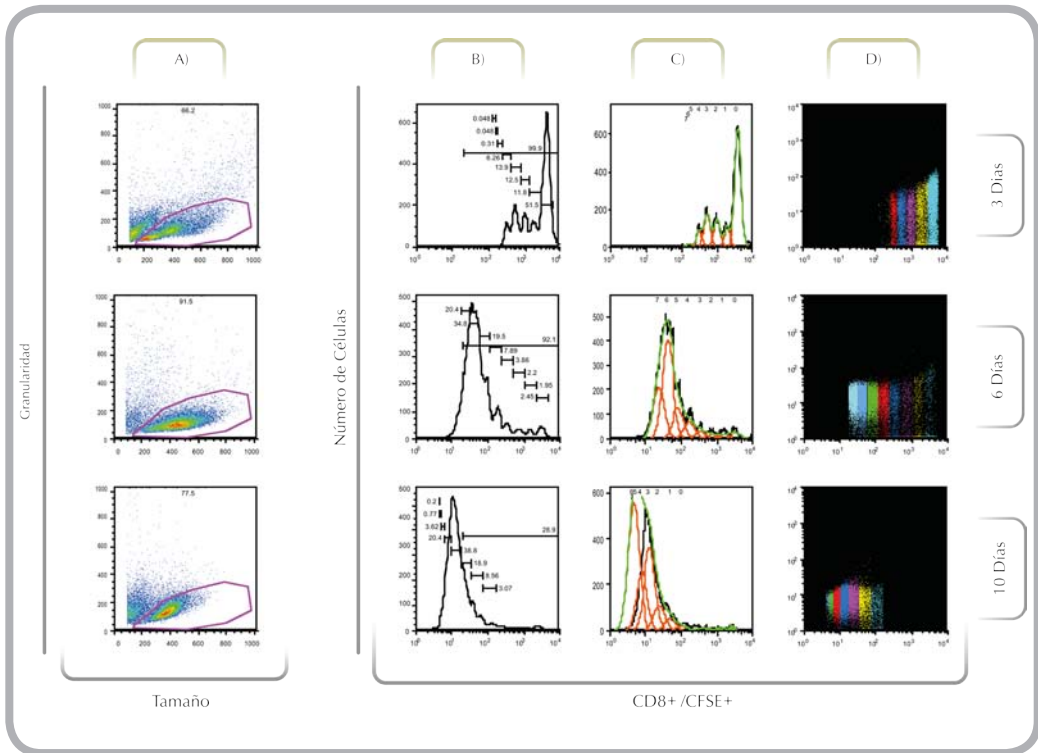
**Figura 20. Control de tinción con CFSE.**

A) Se muestran la población inicial de Linfocitos T CD8<sup>+</sup> teñidos homogéneamente sin tener ningún estímulo de activación. B) Células sin tinción; se encuentra a la población ubicada en el extremo izquierdo de los histogramas (B-2, B-3).



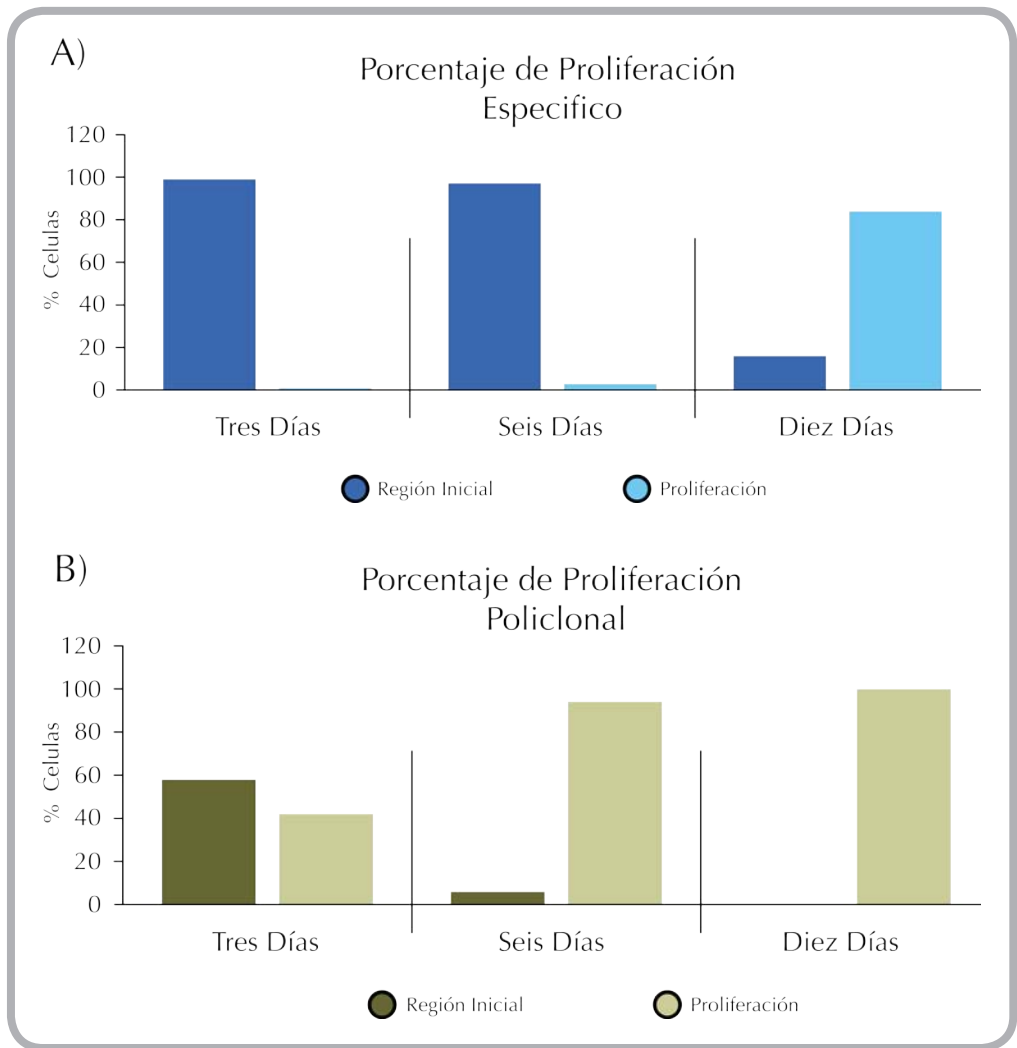
**Figura 21. Expansión policlonal de LT CD8+ de donadores sanos HLA-A\*0201+.**

A) Se observa en la región LT CD8+ en proliferación de acuerdo a su tamaño y granularidad. B) Histograma que muestra la delimitación de la región positiva y negativa a la tinción con CFSE. C) Histograma de LT CD8+CFSE- así como de linfocitos T CD8+CFSE+ que no proliferaron por ausencia de estímulo y linfocitos T CD8+CFSE+ que al ser estimulados con el sistema de activación específico al péptido MUC1-8 mer se expanden específicamente. Dos picos se observan por la pérdida de fluorescencia de CFSE asociada al tiempo de incubación de diez días. Un pico corresponde a células que no se dividieron, mientras que el otro son células que sufrieron expansión clonal. D) Gráfica de puntos que muestra las divisiones celulares representadas en barras de diferentes colores.



**Figura 22. Expansión policlonal de linfocitos T CD8+ de donadores sanos HLA-A\*0201+.** A) Se observa la región de LT CD8+ en proliferación de acuerdo a su tamaño y granularidad. B) Histograma que muestra la delimitación de la región positiva y negativa a la tinción con CFSE. C) Histogramas de los LT CD8+CFSE+ 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. D) Grafica de puntos que muestran las divisiones celulares representadas en barras de diferentes colores.

Todas las muestras de los donadores reflejan un comportamiento similar, mostrando en el control positivo de activación policlonal un número de divisiones mayores y en toda la población, en comparación con las células estimuladas por nuestro sistema de activación específico a MUC1-8 mer (Figura 23).



**Figura 23. Expansión de LT CD8+ estimulados con el sistema de activación específico al péptido MUC1-8 mer y con el control positivo de activación policlonal.**

A) El porcentaje de células estimuladas por nuestro sistema de activación específico es muy pequeña (.9%), el mayor porcentaje pertenece a las células ubicadas en la región inicial, a los seis días, el porcentaje en la región de proliferación incrementa hasta llegar a un 2.85%, finalmente a los diez días incrementa nuevamente, incluso hasta llegar a un 85% en la región de proliferación, conservándose siempre un porcentaje de células que no reaccionan al estímulo específico a MUC1-8 mer. B) Para el control positivo, se observa un elevado porcentaje de células que reaccionan al estímulo policlonal y se desplazan hacia la región de proliferación a partir de los tres días, este porcentaje en la región de proliferación incrementa hasta alcanzar el 94.05% a los seis días, para finalmente alcanzar el 100% a los diez días de incubación.



## 8. DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos muestran que existen clonas de LT CD8+ en sangre periférica de donadores sanos, que responden a la activación *in vitro* con el estímulo específico MUC1-8 mer. Así mismo indican que el complejo molecular formado entre el péptido MUC1-8 mer acoplado en la molécula HLA-A\*0201 de las células T2 induce la activación y la expansión clonal de LT CD8+ purificados, en presencia de las señales coestimuladoras dadas por los anticuerpos monoclonales (mAb) acoplados a perlas antiCD2 y antiCD28 en conjunto de IL-2 recombinante agregada al cultivo celular.

Es interesante encontrar clonas de LT CD8+ específicas para un péptido de un antígeno tumoral en personas sanas; esto se puede explicar porque MUC1 es una mucina constitutiva de los epitelios sanos, pero en pacientes con algún tipo de adenocarcinoma, se presentan cambios en la glicosilación, lo que ocasiona que el sistema inmune lo reconozca como un antígeno tumoral. En caso de los controles sanos es evidente que la presencia de las clonas se deben al reconocimiento antigénico de esta mucina, pero la activación de estas clonas está estrictamente controlada por los mecanismos de regulación del sistema inmune, que inducen un estado de tolerancia hacia antígenos propios como la MUC1. Posiblemente al retirar a los LT CD8+ de microambiente regulador o tolerogénico al que están sometidos en los donadores sanos, fue posible evitar el efecto de los mecanismos reguladores y así lograr la activación y expansión clonal con nuestro sistema *in vitro*.

Asimismo, de acuerdo con lo reportado por Casey Anderson en el 2005, durante procesos de inflamación crónica distintos al cáncer, como gastritis o colitis se expresan modificaciones estructurales en las mucinas, exponiendo las regiones VNTR, lo que confiere un reconocimiento antigénico. También reporta que las mujeres en etapa de lactancia presentan estas modificaciones durante la inflamación en los tejidos mamarios, permitiendo el reconocimiento antigénico, e incluso la capacidad de proporcionar esta memoria inmunogenica a los lactantes.

El uso de las células T2 para el sistema de activación, tiene la ventaja de que al no expresar las moléculas transportadoras TAPs en el Retículo endoplasmático rugoso (RER), las moléculas HLA-A\*0201 se exportan vacías a la membrana celular, además de tener una baja expresión de  $\beta 2$ -m. (Thomas, 2001). Estas características en las células T2 permiten unir de manera exógena el péptido MUC1-8 mer y utilizar este sistema como una célula presentadora de antígeno para activar clonas específicas de LT CD8+ en las condiciones óptimas (Giovanna, 2013).

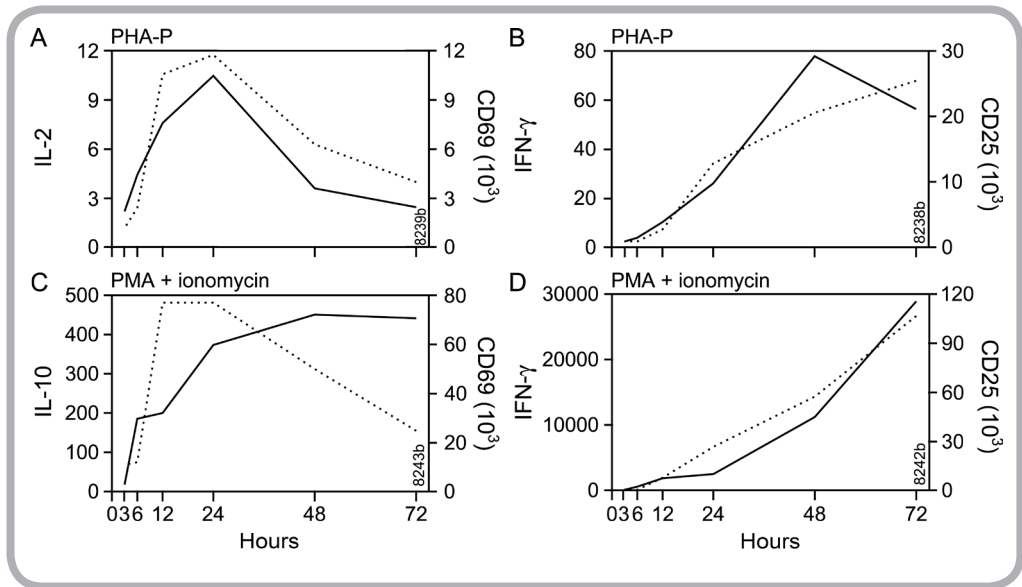
Lo anterior fue puesto en evidencia cuando se evaluaron los siguientes tres parámetros: el aumento en la expresión de la molécula CD25 en los LT CD8+, ya que es uno de los marcadores de activación temprana más aceptados; la producción de citocinas como el IFN $\gamma$ , lo cual nos habla de una funcionalidad en las células; por último, la capacidad de expansión clonal con el estímulo específico como resultado de las dos anteriores.

La correcta activación *in vitro* de los LT CD8+ específicos, se llevó a cabo mediante cultivos en presencia de la línea celular T2 con su molécula HLA-A\*0201 estabilizada con  $\beta 2$ -m (500  $\mu$ g/  $1 \times 10^6$  células) y el péptido sintético MUC1-8 mer (100  $\mu$ g/  $1 \times 10^6$  células) en proporciones

1:2 (respectivamente), el sistema coestimulador basado en perlas acopladas con a mAb antiCD2 y antiCD28, así como la administración al medio de cultivo de rIL-2 (20 U/ mL) cada tercer día y un reestímulo con las células T2 con su molécula HLA-A\*0201 estabilizada.

Siguiendo estas condiciones experimentales fue posible detectar un aumento a las 168 horas de incubación en los porcentajes de expresión del 3.71%, 3.65% y 8.94% para CD25, IFN $\gamma$  y CD25/IFN $\gamma$  respectivamente, comparados con el control negativo.

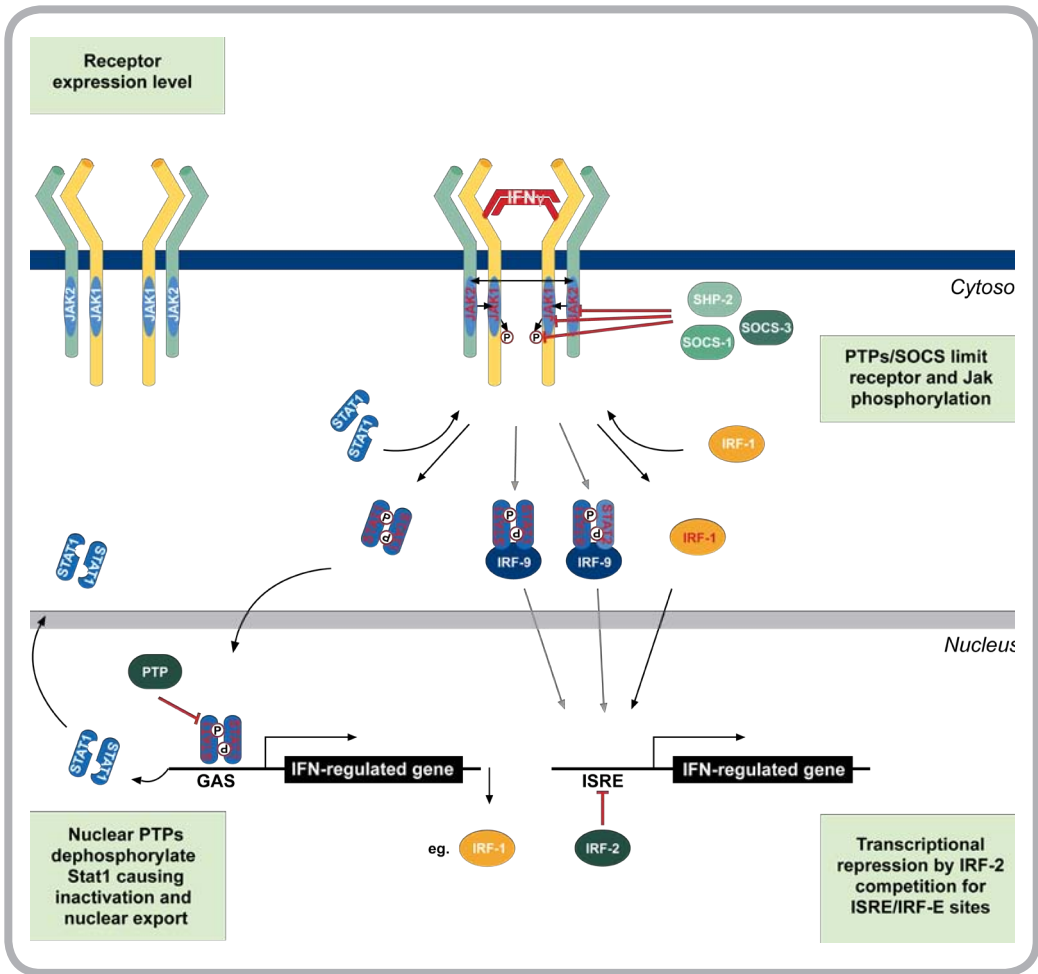
Se detectó una baja en el porcentaje de células dobles positivas para CD25/IFN $\gamma$  en nuestro control positivo después de las 72 horas, siendo a las 168 horas, incluso más bajo el porcentaje de expresión que el de las células activadas con nuestro sistema artificial. Lo anterior concuerda con lo reportado por Manjula Reddy et al, en el 2004, donde evaluaron la expresión de moléculas que presenta los linfocitos T en un fenotipo de activación, entre estas CD25 e IFN $\gamma$ . Estos ensayos se llevaron a cabo con distintos estímulos de activación policlonal y observaron entre los resultados que los tiempos para la expresión de moléculas de activación como CD69, CD71, CD25 y HLA-DR, así como las citocinas IL-2, IL-4, IL-5, IL-10, IFN $\gamma$  y TNF  $\alpha$ , depende del tipo de estímulo de activación. Ellos reportan en su cinética de proliferación, que al utilizar fitohemaglutinina (PHA) y un sistema de activación policlonal similar a nuestro control positivo, con mAb antiCD3 y antiCD28, observaron una tendencia del IFN $\gamma$  a disminuir después de las 48 horas. En contraste, encontraron que el CD25 aumentó constantemente hasta alcanzar a las 72 horas su pico más alto. Por lo tanto, ellos concluyen que la expresión de estas moléculas de activación depende del tiempo y del tipo de estímulo (*Figura 24*).



**Figura 24. Cinética de expresión dependiente del tiempo para CD25 e IFN $\gamma$ .**

Se muestra en línea continua los resultados de expresión del IFN $\gamma$  y en línea punteada los resultados obtenidos para CD25. Puede verse una disminución en la expresión del IFN $\gamma$  después de las 48 horas del primer estímulo, en contraste con el CD25 que parece tener un incremento constante (Manjula, 2004).

Es posible que la disminución de los niveles de IFN $\gamma$  observado en nuestros resultados después de las 72 horas pudiera deberse a la autorregulación en la síntesis del IFN $\gamma$  por la vía de señalización JAK-STAT-1. Se ha reportado que el factor de transcripción STAT-1 inhibe la señalización asociada a los receptores para IFN $\gamma$  en presencia de altas concentraciones de esta citocina (Figura 25), dando como resultado una regulación a la baja en la síntesis de IFN $\gamma$  y confiriendo así un equilibrio en el sistema (Kate, 2004).



### Figura 25 Regulación negativa de la señalización de IFN $\gamma$ .

Un número de factores limitan el alcance y la duración de la señal de transducción de IFN $\gamma$ . El receptor IFNGR2 (verde), su expresión está estrechamente regulada en algunos tipos de células, mientras que IFNGR1 (amarillo), su concentración superficial puede estar regulada por el grado de reciclaje siguiente: internalización del ligando. Proteína tirosina fosfatasas (PTP), tales como SH2 que contiene tirosina fosfataza-2 (SHP2), defosforilación de Jak1, Jak2, y IFNGR1, y supresores de la señalización de citosinas-1 (SOCS-1) y SOCS-3 que interfiere con la actividad de Jak para activarse fuera de señalización tras la unión del ligando. La activación de Stat1 es regulada por la defosforilación de Stat1 en el núcleo. IRF-2 antagoniza la activación transcripcional de muchos genes (IRF-1-inducible) que contienen ISRE o IRF-E, elementos promotores al competir por los sitios de unión sin promover la expresión génica. Las moléculas de señalización activadas por IFN $\gamma$  se representan en rojo (Kate Schroder, 2004).

Basados en nuestros resultados, a las 72 horas de activación, nuestras células del control positivo alcanzan una producción máxima de, lo que activa estos mecanismos de regulación. En cambio, las células continúan con la expresión del CD25 hasta las 168 horas.

Con el estímulo policlonal proporcionado a los linfocitos T con el kit de activación completo, (mAb antiCD2, antiCD3 y antiCD28) todos los linfocitos se activaron, en cambio con el estímulo específico con el péptido, se activaron sólo las clonas que son capaces de reconocerlo, por lo tanto, la cantidad de IFN $\gamma$  producido en ambas condiciones es muy diferente.

Una vez comprobado que nuestro sistema de activación específica funcionaba, se pensó en comprobar su funcionalidad, evaluando su capacidad de expansión clonal o proliferación. En los ensayos de proliferación se evaluaron las divisiones celulares por la pérdida de fluorescencia en las células teñidas con CFSE. Se observó que todas las células del control positivo, activadas con el estímulo policlonal, entraron en división, alcanzando siete divisiones, a los diez días, como el máximo registrado con la pérdida total la fluorescencia del CFSE.

Con nuestro sistema de activación con el péptido sólo las células que reconocían específicamente al péptido se activaron y entraron en división. El porcentaje inicial de células en proliferación es bajo, tal como se esperaba, por la especificidad del estímulo, sin embargo, al transcurrir de los días de incubación y mediante los estímulo con rIL-2 y los reestímulo con nuestro sistema de activación específico a MUC1-8 mer, esta pequeña población que reacciono, se incrementa.

Lo anterior concuerda con lo dicho por Abul K. Abbas en el 2006, él dice que antes de la expansión de linfocitos T CD8+ específicos al estímulo antigénico, el número de linfocitos T CD8+ específicos es de 1 de cada  $10^5$  a  $10^6$  linfocitos.

Es interesante observar que tanto en los ensayo de activación como en los ensayos de proliferación, el sistema de activación específico al péptido MUC1-8 mer, coincide en demostrar cambios en la expresión de moléculas de activación así como la separación significativa de una población en división, después de las 72 horas (tres días). Lo anterior nos indica que a partir de este tiempo, el sistema de activación específico y las condiciones adecuadas (estímulos con rIL-2 y reestímulos con la T2) confieren a la población las características y el número de células óptimo en su activación y expansión.

## 9. CONCLUSIONES

De acuerdo a los resultados obtenidos, mediante nuestro sistema de activación artificial encontramos:

1. Las células T2 como APC del péptido MUC1-8 mer más la coestimulación mediada por los mAb antiCD2 y antiCD28 e rhIL-2 activaron específicamente a los linfocitos T CD8+.
2. Los donante sanos HLA-A\*0201+ tiene un basal de linfocitos T CD8+ específicos al péptido MUC1-8 mer que pueden ser activados *in vitro*.
3. La expresión del CD25 y la producción de IFN $\gamma$  comprueban que los linfocitos T CD8+ en los donadores sanos se activaron.
4. Los linfocitos que respondieron a la activación con el péptido fueron capaces de dividirse, aumentando su población por cada día de incubación.



## 10. PERSPECTIVAS DEL TRABAJO

Una vez comprobada la existencia de linfocitos T CD8+ específicos al péptido sintético MUC1-8 mer, que estos se pueden activar mediante un sistema artificial (T2,  $\beta$ 2-m y el péptido MUC1-8 mer) y además expandirlos, se propone continuar con la evaluación de la funcionalidad específica de estos linfocitos T CD8+ mediante ensayos de citotoxicidad.



## 11. LITERATURA CITADA

- Abul k. Abbas, Andrew H. Lichtman, Shiv Pillai, *Inmunología Celular y Molecular*, Barcelona, 189-213 (2009).
- Ajit Varki, Richard D Cummings et al, *Essentials of Glycobiology*, 2nd edition, (2009).
- Albrecht H, Kermit L, Carraway E, et al, MUC1 and MUC4 : Switching the emphasis from large to small. *Cancer Biotherapy*, 26: 261-271, (2011).
- Alice T. Shaw, Beow Y. Yeap, John Iafrate, Clinical Features and Outcome of Patients With Non-Small-Cell Lung Cancer Who Harbor EML4-ALK, *Journal of Clinical Oncology*, 26: 4247-4253, (2009).
- American cancer society, (s.f), recuperado el 15-06-2015 de <http://www.cancer.org/>.
- Apostolopoulos V, Yuriev E, Ramsland P, et al, A glycopeptide in complex with MHC class I uses the GalNAc residue as an anchor. *Proceedings of the national academy of sciences*. 100: 15029-15034, (2003).
- Baldus SE, Engelmann K, Hanisch FG. MUC1 and the MUCs: A family of human mucins with impac in cancer biology. *Critical Review in clinical laboratory science*. 41: 189-231, (2004).
- Bernabei, P., Coccia, et al. Interferongamma receptor 2 expression as the deciding factor in human T, B, and myeloid cell proliferation or death. *J. Leukoc. Biol.* 70: 950-960, (2001).
- Bor-Ching Sheu, Wen-Hung Kou, et al, Clinical significance of tumor-infiltrating lymphocytes in neoplastic progression and lymph node metastasis of human breast cancer, *ScienceDirect*, 6: 604-610, (2008).

- Brockhausen Inka. Mucin type O-glycans in human colon and breast cancer: glycodynamics and function. *European Molecular Biology Organization Reports*. (2009) 7: 599-604.
- Callaghan M and Voynow J. Respiratory tract mucin genes and mucin glycoproteins in health and disease. *Physiol Review* 86:245-287, (2006).
- Casey Anderson Carlos, Human tumor antigen MUC1 as an inducer of dendritic cell migration and distorted maturation, *The Pennsylvania State University*, 1-108, (2005).
- Choi C, Witzens M, Bucur M, et al. Enrichment of functional CD8 memory T cell specific for MUC1 in bone marrow of patients with multiple myeloma. *Blood Journal*, 105: 2131-2134, (2005).
- Christine L. Hattrup and Sandra J. Gendler, Structure and Function of the Cell Surface (Tethered) Mucins, *Annual Review of Physiology*, 70: 431 a 457, (2008).
- D. Stepensky, E. Tzehoval, et al, O-glycosylated versus non-glycosylated, MUC1-derived peptides as potential targets for cytotoxic immunotherapy of carcinoma, *Clinical and Experimental Immunology*, 1: 139-149, (2005).
- Douglas Hanahan, Roberto A. Weinberg, Hallmarks of cancer: The next generation, *Elsevier*, 141: 646-669, (2011).
- Fiana Levitin, Omer Stern, et al, The MUC1 SEA Module Is a Self-cleaving Domain, *The Journal of Biological Chemistry*, 280: 33374-33386, (2005).
- Gabriel A. Rabinovich, et al, Immunosuppressive strategies that are mediated by tumor cells, *NIH Public Access Author Manuscript*, 25: 267–296, (2007).

- Garetto S, Sizzano F, Brusa D, et al, Binding of prostate-specific membrane antigen to dendritic cells: a critical step in vaccine preparation. *Cytotherapy*, 8:1090-1100, (2009).
- Gendler J Sandra. MUC1 the renaissance molecule. *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia*, 6: 339-353, (2001).
- Gerloni M, Castiglioni P, et al. The cooperation between two CD4 T cells induces tumor-protective immunity in MUC1 transgenic mouse. *Journal Immunology*, 175: 6551-6559, (2005).
- Giovanna Bossi, Andrew B Gerry, et al, Examining the presentation of tumor-associated antigens on peptide-pulsed T2 cells, *Oncolmmunology*, 11: e26840-1-e26840-6, (2013).
- GLOBOCAN (2012).
- Hailing Cheng, Pixu Liu, et al, SIK1 couples LKB1 to p53-dependent anoikis and suppresses metastasis, *NIH Public Access* 80: 1-22, (2009).
- 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).
- INEGI, 2007.
- Isaiah J. Fidler, The pathogenesis of cancer metastasis: the 'seed and soil' hypothesis revisited, *Nature Reviews Cancer*, 3: 453-458, (2003).
- J.A. Atzin-Méndez, P. Gorocica et al, Expansion of quiescent lung adenocarcinoma CD8+ T cells by MUC1-8-mer peptide-T2 cell- $\beta$ 2 microglobulin complexes, *Oncology Reports*, 1: 1-9, (2015).
- Ju T, Cummings R, Otto, et al. The Tn antigen-structural simplicity and biological complexity, *Carbohydrate Antigens*, 50: 1770-1790, (2011).

- Kate Schroder, Paul J., et al. Interferon- $\gamma$ : an overview of signals, mechanisms and functions, *Journal of Leukocyte Biology*, 75: 164-179, (2004).
- Leonardo Freire de Lima, Sweet and sour: the impact of differential glycosylation in cancer cells undergoing epithelial–mesenchymal transition, *Frontiers in Oncology*, 4: 1-7, (2014).
- Lundegaard C, Lamberth K, 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 Research* 36: W509-512, (2008).
- Manjula Reddy, Uma Prabhakar, et al. Comparative analysis of lymphocyte activation marker expression and cytokine secretion profile in stimulated human peripheral blood mononuclear cell cultures: an in vitro model to monitor cellular immune function, *Journald of Immunological Methods*, 293: 127– 142, (2004).
- Marco Chilosi, MD; Bruno Murer, MD, Mixed Adenocarcinomas of the Lung Place in New Proposals in Classification, Mandatory for Target Therapy, *Arch Pathol Lab Med*, 1: 55-65, (2010).
- Michelle E. Behrens, Paul M. Grandgenett, et al, The reactive tumor microenvironment: MUC1 signaling directly reprograms transcription of CTGF, *NIH Public Access Author Manuscript*, 42: 5667–5677, (2012).
- Natasha Gardiner, Sanjay Jogai, et al, The revised lung adenocarcinoma classification -an imaging guide, *Pioneer Bioscience Publishing Company*. All rights reserved, 5: S537-S546, (2013).
- Ninkovic T, Kinarsky L, et al. Identification of the O-glycosylated decapeptides within the MUC1 repeat domain as potential MHC class I (A2) binding epitopes. *Molecular immunology*. 47: 131-140, (2009).
- Pankaj K. Singh, et al. Hollingsworth, Cell surface-associated mucins in signal transduction, *Science Direct*, 6: 467-475, (2006).

- Teresa M. Horm and Joyce A., MUC1 and metastatic cancer Expression, function and therapeutic targeting, *Landes Bioscience*, 7: 187–198, (2013).
- Thomas Luft, Mark Rizkalla, et al, Exogenous peptides presented by transporter Associated with antigen processing (TAP)- deficient and TAP-competent cells: Intracelullar Loading and kinetics of presentation, *The journal of immunology*, 167:2529-2537, (2001).









