



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA

Activación de linfocitos T citotóxicos y respuesta inmune antitumoral en ratones BALB/c utilizando el epítipo GLMEEMSAL de la proteína hMena sobre-expresada en cáncer de mama

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

DOCTORA EN CIENCIAS

PRESENTA:

CHRISTIAN AZUCENA DON LÓPEZ

TUTORA PRINCIPAL DE TESIS: DRA. MARÍA DE LOURDES MORA GARCÍA
LABORATORIO DE INMUNOBIOLOGÍA DE LA UNIDAD DE DIFERENCIACIÓN CELULAR Y CÁNCER, UMIEZ, F.E.S ZARAGOZA, UNAM.

COMITÉ TUTOR: DR. ALBERTO MONROY GARCÍA
LABORATORIO DE INMUNOLOGÍA Y CÁNCER DE LA UIMEO, H.ONCOLOGÍA CMN SXXI IMSS.

COMITÉ TUTOR: DRA. LETICIA ROCHA ZA VALETA
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS, UNAM.

CD.MX.

Junio 2018



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
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA

Activación de linfocitos T citotóxicos y respuesta inmune antitumoral en ratones BALB/c utilizando el epítipo GLMEEMSAL de la proteína hMena sobre-expresada en cáncer de mama

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

DOCTORA EN CIENCIAS

PRESENTA:

CHRISTIAN AZUCENA DON LÓPEZ

TUTORA PRINCIPAL DE TESIS: DRA. MARÍA DE LOURDES MORA GARCÍA
LABORATORIO DE INMUNOBIOLOGÍA DE LA UNIDAD DE DIFERENCIACIÓN CELULAR Y CÁNCER, UMIEZ, F.E.S ZARAGOZA, UNAM.

COMITÉ TUTOR: DR. ALBERTO MONROY GARCÍA
LABORATORIO DE INMUNOLOGÍA Y CÁNCER DE LA UIMEO, H.ONCOLOGÍA CMN SXXI IMSS.

COMITÉ TUTOR: DRA. LETICIA ROCHA ZA VALETA
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS, UNAM.

MÉXICO, CD.MX.

Junio 2018


Lic. Ivonne Ramírez Wence
Directora 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 30 de abril de 2018, aprobó el jurado para la presentación del examen para obtener el grado de **DOCTORA EN CIENCIAS** de la alumna **DON LÓPEZ CHRISTIAN AZUCENA** con número de cuenta **405079922** con la tesis titulada **"ACTIVACIÓN DE LINFOCITOS T CITOTÓXICOS Y RESPUESTA INMUNE ANTITUMORAL EN RATONES BALB/c UTILIZANDO EL EPITOPE GLMEEMSA DE LA PROTEÍNA hMena SOBRE-EXPRESADA EN CÁNCER DE MAMA"**, bajo la dirección del Tutor Principal: **DRA. MARÍA DE LOURDES MORA GARCÍA**.

Presidente: DR. BENNY WEISS STEIDER
Vocal: DR. VIANNEY FRANCISCO ORTIZ NAVARRETE
Secretario: DRA. LETICIA ROCHA ZAVALETA
Suplente: DRA. REBECA LÓPEZ MARURE
Suplente: DRA. MARÍA ISABEL SOTO CRUZ

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

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"
Cd. Universitaria, Cd. Mx., a 02 de mayo de 2018.


DR. ADOLFO GERARDO NAVARRO SIGÜENZA
COORDINADOR DEL PROGRAMA



c.c.p. Expediente del (la) interesado (a)

Agradecimientos Institucionales

Al Posgrado en Ciencias Biológicas de la UNAM por permitirme la realización de esta tesis y la obtención de un grado académico más.

El presente trabajo se desarrolló en el Laboratorio de Inmunobiología de la UMIEZ de la FES-Zaragoza, UNAM y fue realizado gracias al apoyo financiero de los proyectos DGAPA-PAPIIT (No. IN217013 y IN226516) e Instituto Mexicano del Seguro Social, IMSS (No. 1258, 1314 y 1383). Además de la Beca CONACYT con número CVU 385009

A la tutora principal

Dra. María de Lourdes Mora García del Laboratorio de Inmunobiología de la Unidad de Diferenciación Celular y Cáncer, UMIEZ, F.E.S Zaragoza, UNAM.

A los miembros del comité tutor

Dr. Alberto Monroy García del Laboratorio de Inmunología y Cáncer de la UIMEO, H. Oncología CMN SXXI IMSS.

Dra. Leticia Rocha Zavaleta del Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM.

Por sus recomendaciones y apoyo para la conclusión de este trabajo

Agradecimientos a título personal

A la Dra. María de Lourdes Mora García por su invaluable apoyo en todo momento, por dejarme formar parte de su grupo de trabajo y por sus comentarios que fueron de gran ayuda para mejorar mi trabajo.

A los miembros del jurado

Dr. Benny Weiss Steider

Dr. Vianney Francisco Ortiz Navarrete

Dra. Leticia Rocha Zavaketa

Dra. María Isabel Soto Cruz

Dra. Rebeca López Marure

Por sus valiosas recomendaciones y aportaciones a este trabajo.

Al Dr. Alberto Monroy García por su apoyo y asesoría durante todo este tiempo.

Al Dr. Jorge Hernández Montes por su asesoría, su apoyo, sus consejos y agradable compañía.

Agradezco también a todos los integrantes del laboratorio de Inmunobiología, por su apoyo y por hacer tan agradable la estancia en el mismo.

A Fructuoso, Ma. Nieves y Javier por su ayuda y consejos.

A Juan Antonio Díaz Ramos, por el tiempo, el apoyo y consejos para continuar en este camino. El amor es la única cosa que crece cuando se reparte.

A Yahir y Yahel, que sin saberlo todos los días me enseñan algo más para seguir adelante. Son la forma en que el mundo me dice que bonita es la vida.

A Yahir y Yahel

*No necesitas saber a detalle
que hay en tu futuro
pero si quien lo sostiene*

*Lo único imposible
es aquello que no intentas*

Índice

Abreviaturas de uso frecuente	
Resumen.....	1
Abstract.....	2
1. Introducción.....	3
2. Marco Teórico.....	5
2.1.Cáncer.....	5
2.2.Cáncer de mama y cérvico-uterino.....	5
2.3.Antígenos Asociados a Tumor (AATs).....	7
2.4.Proteínas de la familia Ena/VASP.....	9
2.5.hMena.....	11
2.6.hMena y su sobre-expresión en diversos tumores.....	14
2.7.Respuesta inmune hacia hMena.....	16
3. Justificación.....	18
3.1.Importancia y Trascendencia del estudio.....	18
4. Hipótesis.....	20
5. Objetivos.....	20
6. Materiales y métodos.....	22
7. Resultados.....	28
7.1.El péptido GLMEEMSAL común en las isoformas hMena/hMena ^{11a} y hMena/hMena Δ V6 induce linfocitos T CD8 ⁺	28
7.2.Linfocitos T CD8 ⁺ estimulados con el péptido GLMEEMSAL son capaces de lisar células tumorales positivas para la expresión de hMena/hMena ^{11a} y hMena/hMena Δ V6.....	30
7.3.La inmunización de ratones BALB/c con el péptido GLMEEMSAL activa células T específicas.....	34
7.4.La inmunización de ratones BALB/c con el péptido GLMEEMSAL inhibe el crecimiento tumoral.....	39
7.5.La inmunización con el péptido GLMEEMSAL incrementa la sobrevida de los ratones ante el reto tumoral.....	40
8. Discusión.....	42
9. Conclusiones.....	46
10. Bibliografía.....	47
11. Anexo.....	53

Abreviaturas de uso frecuente

AAT- Antígeno Asociado a Tumor

CDMs- Células Dendríticas Maduras

CPA- Célula Presentadora de Antígeno

CDs- Células Dendríticas

LTCs- Linfocitos T Citotóxicos

CMSP- Células Mononucleares de Sangre Periférica

MC- Medio Completo

CDIs- Células Dendríticas Inmaduras

ACF- Adyuvante completo de Freund

AIF- Adyuvante Incompleto de Freund

SEM- Error Estándar

IFN- γ - Interferón gamma

GM-CSF- Factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos

CaMa- Cáncer de Mama

CaCu- Cáncer Cérvico-uterino

NIC- Neoplasia Intraepitelial Cervical

VPH- Virus de Papiloma Humano

HLA- Antígeno Leucocitario Humano

IgG- Inmunoglobulina tipo G

Resumen

En años recientes se ha reportado que la proteína hMena es sobre-expresada en diversos tipos de tumores y se ha encontrado que tiene un papel importante en la regulación de la dinámica de actina del citoesqueleto. Además, se ha encontrado que mediante “splicing” alternativo se generan isoformas de hMena asociadas con la progresión (hMena^{11a}) o la invasión y metástasis tumoral (hMena Δ V6). La expresión alternativa de isoformas de hMena, hMena/hMena^{11a} y hMena/hMena Δ V6 se ha reportado asociada con invasividad y con tumores con alto potencial metastásico. Por ello, el identificar epítopes comunes entre las isoformas de esta proteína puede permitir evaluar su potencial anti-tumor contribuyendo a la eliminación de células con potencial metastásico.

En este trabajo se evaluó la capacidad del péptido GLMEEMSAL, un epítipo común entre las isoformas de hMena, para generar respuesta antitumoral mediante un sistema de vacunación *in vitro* empleando células dendríticas maduras (CDMs) cargadas con este péptido, o bien, *in vivo* mediante un modelo tumoral empleando la línea celular JC de adenocarcinoma mamario (haplotipo H2-Kd) para inducir tumores en ratones hembra de la cepa BALB/c (haplotipo H2-Kd).

La activación *in vitro* de células mononucleares de sangre periférica (CMSP) fue inducida con CDMs cargadas con GLMEEMSAL, esto indujo la activación de células T CD8⁺ que fueron capaces de proliferar y lisar específicamente células de cáncer de mama (CaMa) y cáncer cérvico-uterino (CaCu) que expresaran alguna de las isoformas de hMena (hMena 11^a o hMena Δ V6). Aunado a esto, *in vivo*, la inmunización con GLMEEMSAL tuvo un efecto protector y terapéutico al disminuir la tasa de crecimiento tumoral en un 50 a 70% comparado con el grupo que no recibió inmunización, lo cual incrementó la sobrevida de los ratones inmunizados.

Por lo anterior, los hallazgos de este trabajo son de gran relevancia para sugerir el uso de epítopes comunes dentro de las isoformas de hMena como, GLMEEMSAL, para desarrollar protocolos de inmunoterapia que generen una adecuada respuesta antitumor que frene el crecimiento y potencial metastásico en tumores con sobre-expresión de hMena.

Abstract

In recent years the hMena protein has been reported to be overexpressed in different tumors and playing an important role in regulating the dynamics of cytoskeleton actin. Additionally, it was reported that alternative splicing generate hMena isoforms related with tumoral progression (hMena^{11a}) or invasion and metastasis (hMena $\Delta V6$). The alternative expression of hMena isoforms, was reported associated with high metastatic potential. For this reason, identify common epitopes among hMena isoforms allow to evaluate the anti-tumor potential to contribute to eliminate cells with metastatic potential.

In this study we evaluated the GLMEEMSAL capacity to generate anti-tumor immune response through, either by an *in vitro* vaccination system using mature dendritic cells (MDCs) loaded with GLMEEMSAL peptide, or well through an *in vivo* tumoral model employing the tumor cell line JC of mammary adenocarcinoma (haplotype H2-Kd) for tumor induction in BALB/c mice (haplotype H2-Kd).

Peripheral mononuclear blood cells (PMBC) *in vitro* activation were induced with MDCs loaded with GLMEEMSAL peptide to induce the activation of CD8+ T cells. These effector cells were capable to specifically lyse breast cancer and cervical cancer cell lines that express any hMena isoforms (hMena^{11a} or hMena $\Delta V6$). Added to this, *in vivo* the immunization with the GLMEEMSAL peptide, showed protective and therapeutic effect against tumors induced by the inoculation of JC cells (Mena+) in BALB/c mice to diminish 50-70% the growth rate compared with the no immunized mice, which increased the survival.

For all that, the findings of this study are relevant to suggest the use of common epitopes included in the hMena isoforms, such as the GLMEEMSAL peptide, to develop immunotherapy protocols that generate an adequate antitumor immune response that revert the growth and the metastatic potential of tumors that overexpress hMena.

1. Introducción

El CaCu y CaMa continúan siendo un importante problema de salud pública a pesar de las estrategias de prevención como las vacunas contra el VPH (Virus de Papiloma Humano), los programas de cribaje y promoción del autocuidado. Con el surgimiento de las vacunas, se tenía la expectativa de que éstas ayudarían a reducir la incidencia de CaCu hasta en un 70% de los casos, sin embargo, hasta la fecha las vacunas no protegen contra todos los tipos de VPH de alto riesgo por lo que un 30% de casos aún continuarán presentándose (Jemal *et al.*, 2011).

Por otra parte, para el caso de CaMa los programas de prevención la mayoría de las veces permiten la identificación de la enfermedad en etapas tardías y para su resolución los tratamientos deben ser personalizados dada la heterogeneidad de los tumores, por lo que un sólo tratamiento resulta ser efectivo para un bajo porcentaje de las pacientes. Posterior al tratamiento, sobre todo en pacientes con grados avanzados de CaMa, resulta común que sea poco el tiempo libre de enfermedad, debido a que cuando se realiza el tratamiento, los tumores ya han hecho metástasis a otros sitios del cuerpo, de tal manera que, la metástasis resulta ser frecuentemente la principal causa de muerte en las pacientes (Phillipar *et al.*, 2008; Roussos *et al.*, 2011).

Por lo anterior, la identificación de antígenos asociados a tumor (AAT) que permitan beneficiar a un mayor número de pacientes, y que además tengan potencial para evitar la metástasis sería de gran utilidad. Es por ello que, en años recientes se ha puesto especial interés en proteínas que participan en la progresión y metástasis tumoral. En este contexto se ha identificado a hMena, una proteína asociada con un alto riesgo de progresión y metástasis en diferentes tipos tumorales, principalmente en CaMa y CaCu (Di Modugno *et al.*, 2004; Gurzu *et al.*, 2008; Pino *et al.*, 2008; Toyoda *et al.*, 2009; Gurzu *et al.*, 2009; Gurzu *et al.*, 2012). Esta proteína pertenece a la familia de Ena/VASP, se encarga de regular la dinámica de los filamentos de actina y por tanto de la motilidad celular, por lo que su sobre-expresión se ha asociado con un alto riesgo de metástasis (Gertler *et al.*, 1996; Bear *et al.*, 2000; Urbanelli *et al.*, 2006; Oudin *et al.*, 2016).

Esta proteína se ha propuesto como un AAT al cumplir con las características para tal efecto, ya que en pacientes con CaMa se ha detectado respuesta inmune humoral y celular hacia epítopes de hMena y se ha encontrado asociada con diversos tipos de tumores en las diferentes etapas de desarrollo de éstos (Di Modugno *et al.*, 2004). Por lo que resulta importante la evaluación de ésta para conocer su posible valor terapéutico.

2. Marco Teórico

2.1. Cáncer

El cáncer es la proliferación sin control de células anormales en el cuerpo humano, lo cual sucede como consecuencia de la falta de control de los mecanismos que regulan el crecimiento y diferenciación celular. Esta pérdida de control fisiológico de la proliferación celular deriva de la expresión anómala del material genético (oncogenes y genes supresores) que es la que le confiere a las células tumorales su autonomía de crecimiento, capacidad de invadir y generar metástasis (Sánchez, 2014).

El cáncer es una enfermedad crónica evitable, curable en un elevado número de casos, con una historia natural que se aparta de los modelos habituales de las enfermedades agudas (Senra, 2002). Actualmente, el cáncer es la principal causa de muerte en países económicamente desarrollados y la segunda causa de muerte en países en vías de desarrollo. La mayor mortalidad en países económicamente desarrollados se ha visto relacionada con poblaciones de mayor edad y adopción de hábitos de riesgo como el tabaquismo, inactividad física e inadecuada alimentación (Jemal *et al.*, 2011). Globocan en el 2012 reportó 14.1 millones de nuevos casos, 8.2 millones de muertes por cáncer y 32.6 millones de personas viviendo con cáncer alrededor del mundo. Además se indica que en países subdesarrollados existen 8 millones de nuevos casos (57%), y 5.3 millones de muertes por cáncer (65%) (Globocan 2012).

2.2. Cáncer de mama y cérvico-uterino

Dentro de las principales causas de muerte por cáncer en mujeres encontramos al CaMa y al CaCu, ubicándose en el segundo y cuarto lugar de incidencia en la población, respectivamente. Para el año 2012, se estimaron 1.67 millones de nuevos casos CaMa, lo que corresponde al 25% de todos los casos de cáncer. La incidencia varía de manera importante a nivel mundial, con rangos de 27 casos por cada 100,000 mujeres en algunas zonas de África y el este de Asia, hasta 96 casos por cada 100,000 mujeres en Europa occidental. Ese mismo año, se reportaron más muertes por CaMa que por CaCu, de tal manera, que a nivel mundial se ha posicionado como la segunda causa de muerte por cáncer en mujeres de entre 30-50 años afectando todos los niveles socioeconómicos.

A partir de 1990, se detectó una baja en la tasa de mortalidad por CaCu y un alza en la tasa de mortalidad por CaMa, encontrándose que para el 2006 la tasa de muertes por CaMa era muy superior a la de muertes por CaCu. Sin embargo, ambos tipos de cáncer continúan siendo las dos principales causas de muerte por cáncer en mujeres de entre 30 a 54 años (Knaul *et al.*, 2008).

En México, el CaMa ocupa el primer lugar en incidencia de neoplasias malignas en mujeres y representa 11.34% de todos los casos de cáncer, siendo su incidencia de 17,741 nuevos casos por año. A pesar de esto, aún no se le ha dado la prioridad que requiere y se siguen detectando sólo un 10% de casos en estados tempranos de la enfermedad comparado con el 50% que se detectan en esta etapa en Estados Unidos (Knaul *et al.*, 2008; Globocan 2012).

Según cifras del Instituto Nacional de Estadística y Geografía (INEGI), para el año 2012, se reportó una incidencia de 26.64 casos por cada 100,000 mujeres mayores de 20 años, y corresponde a la segunda causa de muerte por cáncer en ese mismo grupo de edad, representando el 15.4% (Maffuz *et al.*, 2016). Es el tercer tipo de cáncer más diagnosticado y la cuarta causa de muerte por cáncer en mujeres alrededor del mundo representando un 9% de los casos de cáncer y un 7% de las muertes por cáncer en mujeres en 2008. Más del 85% de las muertes por CaCu ocurren en países en vías de desarrollo (Jemal *et al.*, 2011).

A nivel mundial el CaCu es responsable de una alta mortalidad y morbilidad en mujeres jóvenes y a pesar de la mejora en los sistemas de cribaje para la identificación de lesiones pre-cancerosas, para el año 2016 la Sociedad Americana del Cáncer reportó la detección de 12,990 nuevos casos y 4,120 muertes sólo para ese año.

Con el surgimiento de las vacunas Gardasil® (brinda protección contra los tipos de VPH-16, 18, 6 y 11) y Cervarix® (brinda protección contra los tipos de VPH-16 y 18), se tenía la expectativa de que al estar dirigidas para brindar protección contra los principales tipos de VPH de alto riesgo, es decir el VPH tipo 16 y 18 los cuales son detectados hasta en un 70% de los casos de CaCu, éstas ayudarían a reducir la incidencia de este tipo de cáncer. Sin embargo, las vacunas no disminuirían la incidencia del 30% restante de los casos de CaCu con un tipo de VPH distinto al VPH-16 y 18, por lo que continúa siendo un problema de salud pública importante (Jemal *et al.*, 2011).

De tal manera que, la identificación de AATs para su uso en inmunoterapia ha ganado importancia retomándose la idea hasta hace algunos años en desuso de que el sistema inmune tiene un papel importante en la respuesta antitumoral.

2.3. *Antígenos Asociados a Tumor (AATs)*

Durante años se ha observado que la respuesta inmune es capaz de evitar la progresión tumoral hacia estados más avanzados, por lo cual, la medicina actual ha puesto especial interés en la identificación de AATs que sean reconocidos tanto por anticuerpos como por células T, lo cual los ubicaría como blanco adecuado para inmunoterapia (Lollini *et al.*, 2003).

Dentro de los antígenos tumorales que pueden identificarse en un tumor, encontramos: antígenos específicos de la diferenciación de tejidos, antígenos presentados específicamente por tumores, y antígenos presentados únicamente por tumores. Sin embargo, la gran mayoría de antígenos tumorales identificados corresponde a antígenos propios no mutados expresados por el tumor (Wang y Rosenberg, 1999).

Los primeros AATs que fueron identificados, se obtuvieron generando tumores con carcinógenos o con virus. Sin embargo, la baja antigenicidad de tumores surgidos espontáneamente estuvo a punto de dejar de lado el uso de AATs, abandonando la creencia de que la inmunidad adaptativa hacia estos antígenos podría evitar el crecimiento tumoral. Poco después, la identificación de AATs volvió a tomar auge y se comenzaron a identificar AATs acoplados a moléculas del complejo principal de histocompatibilidad en células tumorales, corroborando el reconocimiento de sus péptidos con el uso de células T citotóxicas específicas hacia los péptidos, capaces de eliminar células tumorales. Ésto continuó siendo así, hasta el advenimiento de la técnica de expresión clonal serológica (SEREX), la cual se basa en el uso de suero de pacientes para la búsqueda de antígenos en bases de datos de DNA complementario (cDNA) de muestras tumorales (Lollini *et al.*, 2003).

Con la técnica SEREX se identifican los AATs reconocidos por altos títulos de anticuerpos, implicando de esta manera la activación de las células T y el cambio de isotipo en las células B para la producción de anticuerpos, de tal manera que los AATs identificados por SEREX usualmente incluyen epítopes para células las T y B (Lollini *et al.*, 2003).

Para poder demostrar que un AATs identificado por SEREX es realmente un antígeno para las células T, es necesario generar Linfocitos T citotóxicos (LTCs) *in vitro* usando péptidos derivados de tumor y demostrar que estos LTCs pueden reconocer células tumorales. Para ello, pueden utilizarse varias estrategias, usando células mononucleares de sangre periférica (CMSP) o células dendríticas (CDs) pulsadas con péptidos o con proteínas purificadas como estimuladores. En muchos de los casos se ha encontrado que estos LTCs reconocen el péptido utilizado durante la estimulación pero no reconoce células tumorales. Existen muchas explicaciones para el no reconocimiento de células tumorales, incluyendo la baja afinidad de los LTCs y la posibilidad de que el péptido utilizado en el sistema *in vitro* no sea naturalmente procesado y presentado en la superficie de células tumorales o puede ser presentado en la superficie pero no a un nivel suficiente como para ser reconocido por las células T (Wang y Rosenberg, 1999). Sin embargo, el uso de células presentadoras de antígeno (CPAs) como CDs cargadas con péptidos o proteínas puede ayudar a superar estos posibles problemas.

La identificación de antígenos que favorezcan el rechazo tumoral provee nuevas oportunidades de desarrollar estrategias terapéuticas contra el cáncer (Wang y Rosenberg, 1999). Sin embargo, resulta necesario para la adecuada elección de AATs saber primero si es posible generar una respuesta inmune significativa y segundo, y quizá más importante, saber si no existe el riesgo de provocar una respuesta autoinmune. Con respecto a lo anterior, hallazgos recientes sugieren que receptores biológicamente importantes pueden ser usados como blanco inmunoterapéutico con mínimos efectos colaterales como es el caso del uso prolongado de anticuerpos dirigidos contra HER-2, en donde los mayores efectos tóxicos han sido observados al utilizar terapias pasivas de HER-2 en pacientes que utilizan a su vez tratamientos cardiotóxicos como las antraciclinas (Lollini *et al.*, 2003).

Para que un antígeno pueda ser elegido como AAT debe de cumplir con ciertas características, como:

1. Ser expresado ampliamente por la gran mayoría de los tipos de cáncer humano
2. Su expresión debe ser inducida desde los inicios de la tumorigénesis
3. Jugar un papel esencial en la carcinogénesis o la tumorigénesis
4. Tener numerosos epítopes inmunogénicos potenciales con alta afinidad hacia los HLA más comunes en la población

5. Epítopes de alta afinidad hacia los HLA deben ser generados por el proteosoma de la célula tumoral.
6. Deben ser reconocidos dichos epítopes por células T citotóxicas y que esto se refleje en una eficiente respuesta anti-tumor.

Como se mencionó anteriormente, el método de identificación de AATs mediante SEREX resulta efectivo y mediante este, se ha identificado un amplio número de proteínas capaces de desencadenar respuesta inmune en pacientes con cáncer y la mayoría de los antígenos definidos por SEREX son proteínas sin ninguna modificación estructural o mutaciones, sólo algunos de los antígenos tumorales muestran expresión restringida en tejidos normales y se ha visto que la sobre-expresión de proteínas normales en los tumores podría tener gran importancia en iniciar una respuesta inmune tumoral específica y el hecho de que estos antígenos sean identificados por la presencia de altos títulos de anticuerpos IgG en el suero de los pacientes implica que existe reconocimiento por parte de las células T CD4+ y CD8+ (Sahin *et al.*, 1995; Nishikawa *et al.*, 2001).

De esta manera, en estudios hechos por Di Modugno en 2004 mediante SEREX se ha logrado identificar a la proteína hMena perteneciente a la familia Ena/VASP, proteínas encargadas de regular la dinámica de actina del citoesqueleto (Di Modugno *et al.*, 2004) y se ha propuesto como buena candidata para su uso como AAT.

2.4. Proteínas de la familia Ena/VASP

Esta familia consiste de las proteínas de vertebrados Mena, EVL, VASP y Ena de *Drosophila*. Estructuralmente, muestran dominios altamente conservados, un extremo N-terminal denominado EVH1 (Ena/VASP homology), que funciona como módulo de localización para las proteínas en las adhesiones focales al unirse a aquellas que contengan la secuencia consenso D/EFPPPPXD/E (abreviado como FPPPP), la cual se encuentra en muchas proteínas de adhesiones focales como zyxina y vinculina o ActA en *Listeria monocytogenes* (Lanier *et al.*, 1999; Gertler y Condeelis, 2011).

La porción central de las proteínas Ena/VASP contiene un dominio de 60 a 90 residuos rico en prolina que se puede enlazar a tres tipos de proteínas: Profilina, proteínas con dominios SH3 de tirosinas cinasas (Abl, Arg y Src) o WW (Gertler *et al.*, 1996; Lanier *et al.*, 1999;

Bear *et al.*, 2000; Bear *et al.*, 2002; Gertler y Condeelis, 2011). La Profilina se une a la vez con los monómeros de actina y con las proteínas Ena/VASP a través de un sitio de alta afinidad para Profilina llamado “sitio de carga” (Ferron *et al.*, 2007). El complejo Profilina: actina muestra una más alta afinidad por el sitio de carga que la Profilina sola de tal manera que una vez que se transfirió el monómero de actina a la punta de elongación del filamento de actina, la unión de un nuevo complejo Profilina: actina se ve favorecida (Zimmermann *et al.*, 2002; Chereau y Domínguez, 2006).

El tercio C-terminal corresponde al dominio EVH2, tiene regiones que *in vitro* se unen directamente a F y G actina, de tal manera que es gracias a éste que se lleva a cabo la oligomerización, siendo los últimos 45 aminoácidos del extremo C-terminal los que se han implicado en la tetramerización. Además, se ha visto que bajo ciertas condiciones *in vitro*, las proteínas Ena/VASP pueden nuclear la polimerización de actina, pero en general sólo regulan la motilidad sin crear nuevos extremos para la nucleación de filamentos de actina, más bien sólo mantienen la polimerización de éstos bajo condiciones fisiológicas. Otra de las propuestas es que las proteínas Ena/VASP mantienen la polimerización compitiendo por los extremos de filamentos de actina con las proteínas de “capping”, previniendo así la unión de éstas, y evitando la despolimerización que es llevada a cabo por las proteínas de “capping”, y si a esto agregamos el hecho de que se ha reportado que VASP es capaz de incrementar ligeramente y por un breve período (30 segundos) la tasa de polimerización de actina (Bear *et al.*, 2000; Bear *et al.*, 2002; Barzik *et al.*, 2005; Gertler y Condeelis, 2011), podemos comprender un poco por qué tienen estas proteínas una estrecha relación con la motilidad celular.

El dominio EVH1 y EVH2 muestran regiones homólogas entre las proteínas pertenecientes a la familia Ena/VASP, difiriendo en su región central tanto en longitud como contenido de prolinas y en el número de nucleótidos en los sitios de fosforilación dependientes de cinasa. Para esto, encontramos que VASP y hMena tienen tres y dos sitios de fosforilación, respectivamente, mientras que EVL sólo tiene un sitio. Son estas características estructurales las que sugieren que estas tres proteínas tienen funciones traslapadas, y que pueden tener también propiedades y mecanismos de regulación únicos (Lambrechts *et al.*, 2000).

Debido a las características señaladas y a su localización, se ha sugerido que estas proteínas tienen un papel importante en regular la dinámica de actina y/o la adhesión (Bear *et al.*, 2000) controlando el movimiento y la morfología de células como fibroblastos, células epiteliales, células endoteliales y neuronas. Además de ser requeridas para una variedad de respuestas quimiotácticas, como es el caso de la estimulación con EGF que hace más frecuente la aparición de lamelipodios permitiendo la locomoción (Gertler y Condeelis, 2011). La aseveración anterior surge del hecho que es posible detectar a las proteínas de la familia Ena/VASP en las orillas de los lamelipodios, las puntas de los filopodios, adhesiones focales, uniones célula-célula y para el caso de algunos tipos celulares se localizan en un patrón sarcomérico a lo largo de las fibras de estrés (Krause *et al.*, 2003), estabilizando de esta manera el contacto con las células vecinas durante la adhesión intercelular (Lambrechts *et al.*, 2000; Bear *et al.*, 2002; Gertler y Condeelis, 2011). Además, se ha encontrado que al depletar fibroblastos de las proteínas Ena /VASP se observa acumulación de actina formando fibras de actina gruesas y cortas mientras que al enriquecer fibroblastos con este tipo de proteínas, se detectan fibras de actina largas y delgadas formando filopodios en la membrana plasmática (Barzik *et al.*, 2005).

Asimismo, se ha correlacionado directamente la tasa de protrusión de lamelipodios con la acumulación de las proteínas Ena/VASP en el frente de migración de las células, sugiriendo que estas proteínas promueven la protrusión del frente de migración (Bear *et al.*, 2002). Su identificación no sólo ha sido posible en el frente de migración de células tumorales, si no también, se ha identificado un ligando para EVH1, FYB/SLAP, que permite el reclutamiento de Ena/VASP en las sinapsis inmunológicas de las células T y en procesos de fagocitosis en los macrófagos, encontrándose que una acumulación local de proteínas pertenecientes a la familia ayuda para llevar a cabo la polimerización local de fibras de actina permitiendo la protrusión de pseudopodios para la fagocitosis de partículas (Coppolino *et al.*, 2001).

2.5.hMena

Mena (mammalian enabled) fue identificado como un homólogo en mamíferos, de Ena en *Drosophila*, y es referida también como ENAH por la base de datos del comité de nomenclatura HUGO, fue identificado originalmente como un supresor genético de fenotipos

causado por mutaciones en el homólogo de tirosinas cinasas c-Abl en la *Drosophila* (Gertler *et al.*, 1996; Urbanelli *et al.*, 2006; Gertler y Condeelis 2011).

hMena (homólogo humano de la proteína Mena murina) es requerida para un desarrollo neural normal y es miembro de la familia Ena/VASP, por lo que al igual que los demás miembros de la familia Ena/VASP se ha relacionado con la dinámica de los filamentos de actina y por tanto con la motilidad celular. Esto gracias a que se acumula en las adhesiones focales, las cuales funcionan como sitios de señalamiento bidireccional entre el citoesqueleto y la matriz extracelular (Gertler *et al.*, 1996; Bear *et al.*, 2002). Se ha logrado detectar que hMena en la mayoría de los contactos focales se encuentra en la región proximal a regiones de fosfotirosina en los extremos de fibras de estrés de F-actina. Además, a pesar de que las proteínas de la familia Ena/VASP muestran un alto grado de homología, hMena tiene características que VASP y EVL no poseen; como una región repetitiva de 70 residuos con la secuencia consenso [LM]-E-[QR]-[EQ]-[QR] (abreviada como LERER), se ha predicho que dicha secuencia forma una estructura de hélice extendida y esto puede favorecer la interacción de hMena con otras proteínas y la formación de sitios de oligomerización adicionales. Se ha visto que el extremo C-terminal de hMena es capaz de interactuar con la integrina $\alpha 5 \beta 1$, ésta interacción se ha observado en fibroblastos y células tumorales de CaMa, en donde hMena regula la señalización hacia el interior y exterior de las células en las adhesiones focales, lo anterior entre otras cosas ha hecho suponer que hMena puede tener una función importante en la invasión y migración celular en los tumores (Gertler *et al.*, 1996; Urbanelli *et al.*, 2006; Oudin *et al.*, 2016).

El gen *MENA* codifica los 570 aa que constituyen hMena y se ha reportado que hMena sufre “splicing” alternativo dando lugar a diferentes isoformas alternativas de la proteína, cuya expresión se ha visto que es tejido específica en humano y ratón. (Di Modugno *et al.*, 2012). De esta manera, hMena cuenta con 14 exones constitutivos y 5 exones alternativos, de entre los exones alternativos que posee hMena, encontramos el exón 11^a el cual es expresado en células tumorales que constituyen una mayoría en los tumores primarios como es el caso de tumores pancreáticos y de mama pero es indetectable en células de tumores invasivos, además de ser expresado en células epiteliales pero no encontrarse en células mesenquimales (Gertler y Condeelis, 2011). El exón alternativo 11^a codifica 21 aminoácidos que son

insertados en el dominio EVH2 entre la secuencia FAB y el dominio de tetramerización. El sitio de inserción de 11^a es adyacente a los sitios de unión a F y G-actina, y es susceptible de ser fosforilado, por lo que se cree que la inclusión del exón 11^a, afecta la forma en la cual hMena interactúa con los extremos de polimerización de actina, al adicionar sitios de fosforilación en hMena (Gertler y Condeelis, 2011). Además, se ha encontrado que hMena 11^a es fosforilada río abajo de HER-2 y EGFR después del estímulo con EGF y NRG1 en células luminales de CaMa (Di Modugno *et al.*, 2012) (Figura 1).

Otros estudios definen a las isoformas de Mena con 3 exones alternativos, el exón más largo denominado “+” da lugar a una proteína de 798 residuos, mientras que la isoforma de hMena más comúnmente expresada (Mena Classic) consta de 541 aminoácidos, esta isoforma inserta junto a la región rica en prolina una secuencia que hace de ésta una isoforma bastante rica en prolina, esta gran cantidad de prolina en tejidos murinos hace que la isoforma + y Mena clásica en geles de SDS-PAGE corran a una altura de 140 kDa y 80 kDa respectivamente, mientras que en tejidos humanos adultos, sólo se encuentra Mena de 140 kDa en cerebro. Los otros dos exones son más cortos y son identificados como “++” y “+++”, codificando para 4 y 19 residuos respectivamente, ambos exones se insertan de igual modo entre el extremo C-terminal del dominio EVH1 y la secuencia consenso LERER, no se ha reportado que estos exones sean tejido-específicos, pero se han detectado en células tumorales circulantes en sangre, por lo que se sugiere que pueden tener una implicación importante en la progresión metastásica, esto aunado a que se ha encontrado que las isoformas ++ y +++ sólo se expresan cuando disminuye la expresión de Mena 11^a y a que Mena +++ (Mena^{INV}) promueve la invasión de células de carcinoma en geles de colágeno tridimensionales, incrementando su motilidad *in vivo*, sensibilizándolas a estímulos quimiotácticos (señales de EGF) e incrementando su actividad proteasa. El efecto estimulador de Mena^{INV} requiere de la escisión de cofilina la cual precede a la acumulación de Arp 2/3 en los lamelipodios concluyendo en la elongación de las fibras de actina lo cual es de suma importancia para iniciar la protrusión invasiva durante la quimiotaxis y para mantener la motilidad de las células (Gertler *et al.*, 1996; Goswami *et al.*, 2009; Rousos *et al.* 2011; Gertler y Condeelis, 2011) (Figura 1). Podemos encontrar también gracias al “splicing” alternativo, una variante neuronal caracterizada por un exón 6 extendido Mena-140 y una variante específica de bazo

de ratón que ha perdido la región central rica en prolinas Mena –S (Urbanelli *et al.*, 2006; Tani *et al.*, 2003; Di Modugno *et al.*, 2012).

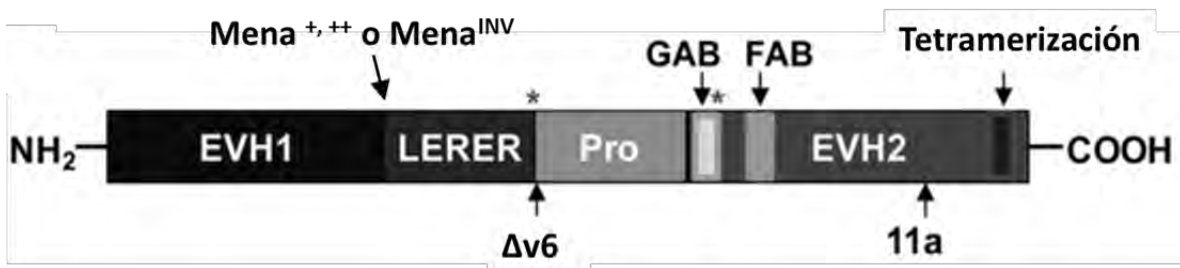


Figura. 1. Esquema de los dominios estructurales y motivos de hMena. Se muestran los dominios estructurales EVH1, EVH2, la región central rica en prolinas junto con la secuencia consenso LERER, los dominios de unión a actina fibrilar FAB o globular GAB y por último el dominio de Tetramerización; también se indican los sitios de inserción de las secuencias codificadas por los exones alternativos INV y 11^a o el sitio donde el exón 6 es deletado ($\Delta v6$), los * indica los sitios de fosforilación (Tomada y modificada de Di Modugno *et al.*, 2012).

Recientemente, se ha implicado a la actividad de factores de “splicing” como ESRP1 y ESRP2 presente en células epiteliales o Fox2 en células de ovario como coordinadores centrales de la red de “splicing” alternativo base de la transición epitelio mesénquima (TEM) en CaMa a través de la desregulación de muchos genes, entre ellos *MENA* involucrándose de esta manera el “splicing” de *MENA* en la progresión del CaMa. Así mismo, se ha reportado que TGF- β puede ser uno de los factores clave para la regulación diferencial de los genes de “splicing” y a su vez de hMena, ya que se ha visto que la presencia de hMena $\Delta V6$ sólo puede ocurrir después de la pérdida de hMena 11^a lo cual es un proceso crucial en la TEM mediada por TGF- β 1 (Gertler y Condeelis 2011; Di Modugno *et al.*, 2012; Melchionna *et al.*, 2016).

Las isoformas de hMena son indetectables en tejido normal de mama, y son progresivamente expresadas en lesiones de mama premalignas, sugiriendo que su presencia puede ser usada como un marcador temprano de neoplasias de mama en mujeres con un alto riesgo de desarrollar CaMa (Di Modugno *et al.*, 2012).

2.6. hMena y su sobre-expresión en diversos tumores

La proteína hMena se ha aceptado como un AAT, al encontrarse sobre-expresada en diversos tumores de mama, cervix, páncreas, colon y glándulas salivales (Di Modugno *et al.*, 2004; Gurzu *et al.*, 2008; Pino *et al.*, 2008; Toyoda *et al.*, 2009; Gurzu *et al.*, 2009; Gurzu *et al.*,

2012). La aceptación de hMena como un AAT ha derivado de los hallazgos de diversos trabajos, entre ellos los hechos por Di Modugno y colaboradores en 2006, quienes encontraron que el tejido mamario normal no expresa hMena y sólo un 9% de lesiones de mama benignas de bajo riesgo la expresan, mientras que en un 67% de aquellas lesiones benignas con un alto riesgo de transformación se encuentra un progresivo incremento de expresión de la proteína y el porcentaje de pacientes con lesiones positivas para hMena incrementa conforme incrementa el grado de lesión, de tal manera, que encontramos un 72% de los tumores *in situ*, 93% de los tumores invasivos y 91% de los tumores metastásicos de mama positivos para la sobre-expresión de hMena.

En cuanto a los tumores de cérvix, Gurzu en 2009 analizó, 30 tejidos de pacientes con neoplasia intraepitelial cervical (NIC) de grados 1, 2, 3; y 10 tejidos de carcinoma escamoso, encontrando que hMena no se encuentra expresada en el epitelio escamoso normal del cérvix pero si se detecta en las lesiones cervicales y la expresión de ésta va incrementando conforme incrementa el grado de lesión intraepitelial, encontrándose la mayor expresión en la transición de NIC 2 a NIC 3 y en carcinoma (Gurzu *et al.*, 2009). En 2008, Gurzu y colaboradores analizaron la expresión de hMena en lesiones colorectales y gástricas para lo cual reportaron que ni en la mucosa colorectal normal ni en los pólipos adenomatosos se encontró expresión inmunohistoquímica; sin embargo, en pólipos con displasia de alto grado se encontró hMena sobre-expresada. En carcinomas colorectales, se encontró sobre-expresión de hMena en 80% de los casos analizados. Además, se correlacionó la presencia de marcadores de angiogénesis, HER-2 o p53, encontrándose la misma correlación que en CaMa, hecha por Di Modugno y colaboradores en donde también se reporta que hMena es fosforilada río abajo de HER-2 y EGFR después del estímulo con EGF y NRG1 en células luminales de CaMa (Gurzu *et al.*, 2008; Di Modugno *et al.*, 2010).

Además, *MENA* se ha identificado como uno de los genes desregulados en lo que se llama “firma de invasión” (Goswami *et al.*, 2009; Roussos *et al.*, 2010), en la cual se puede identificar un determinado perfil de expresión de genes, caracterizado por la disminución de genes asociados con proliferación y apoptosis, y el incremento de genes relacionados con la motilidad celular (Wang *et al.*, 2004). Lo anterior es de gran relevancia, ya que la metástasis es la principal causa de muerte en pacientes con cáncer (Phillipar *et al.*, 2008; Roussos *et al.*,

2011), debido a que las células que se establecen en sitios distantes al tumor principal son resistentes a la quimioterapia permitiendo la recurrencia de la enfermedad (Mohme *et al.*, 2016). Sin embargo, existen pocos marcadores moleculares para predecir el riesgo metastásico en los pacientes, haciendo difícil predecir el riesgo de recaídas después de la remoción del tumor primario, es entonces hMena una proteína importante que podría ayudar a evitar la metástasis y por lo tanto la recurrencia de la enfermedad.

2.7. Respuesta inmune hacia hMena

Por otro lado, el papel de hMena como un antígeno capaz de inducir respuesta inmune humoral y celular fue inicialmente reportado por el equipo de investigación de Di Modugno, quien al utilizar suero autólogo de pacientes con CaMa identificó 6 cDNA correspondientes a 3 diferentes genes incluyendo el gen localizado en el cromosoma 1 que codifica para hMena, una proteína de la familia Ena/VASP involucrada en la regulación de la motilidad y la adhesión celular. Se analizó también mediante inmunohistoquímica y Western Blot la expresión de la proteína hMena en líneas celulares de CaMa, encontrándose sobre-expresada hasta en 75% de los tumores primarios evaluados. Y posteriormente, se logró demostrar que existía una respuesta inmune humoral restringida a pacientes con CaMa, encontrándose que 18 de 93 pacientes tenían anticuerpos IgG en suero mientras que ninguno de los donadores normales mostró presencia de anticuerpos.

Al ver lo anterior, se analizó si existían en estos pacientes células T CD8⁺ específicas hacia 3 epítopes de hMena (GLMEEMSAL, TMNGSKSPV e ILDEMRKEL) restringidos al alelo HLA-A2 y comunes entre las isoformas de hMena, encontrándose que 9 de 12 pacientes con CaMa dieron respuesta positiva al producir IFN- γ y dicha respuesta correspondió con una respuesta inmune mediada por anticuerpos en 4 pacientes. Así mismo, ellos lograron establecer una línea de LTCs específicos al epítope TMNGSKSPV (502-510) de la proteína completa de hMena, con capacidad efectora para reconocer y lisar células tumorales de CaMa y melanoma HLA-A2⁺/hMena⁺ concluyendo que dicho epítope es naturalmente procesado y presentado por moléculas HLA-A2⁺ en células tumorales hMena⁺ (Di Modugno *et al.*, 2004).

No obstante, se desconoce si estos epítopes comunes entre las isoformas de hMena/hMena^{11a} o hMena/MenaΔV6 podrían inducir LTCs en donadores normales y si estos tendrán la capacidad de reconocer y lisar a células tumorales que expresen dichas isoformas. En este estudio damos evidencia de que LTCs inducidos a partir de un sistema de vacunación *in vitro*, empleando células dendríticas maduras (MDCs) cargadas con el péptido GLMEEMSAL (443-451), común entre las isoformas hMena/hMena^{11a} y hMena/MenaΔV6, muestran actividad lítica contra líneas celulares de CaMa y CaCu con positividad a alguna de las isoformas de hMena antes mencionadas.

3. *Justificación*

El CaMa y el CaCu continúan siendo las principales causas de muerte por cáncer en mujeres de nuestro país colocándose en el segundo y tercer lugar de incidencia respectivamente. A pesar de que existen terapias antitumorales efectivas para el tratamiento de dichas enfermedades éstas son efectivas en un bajo porcentaje de pacientes, cuyos tumores deben cumplir con ciertas características para ser responsivos a los tratamientos. Aunado a lo anterior, la metástasis continúa siendo la principal causa de muerte en pacientes con cáncer, permitiendo la recurrencia de la enfermedad y una menor sobrevida de los pacientes.

Es por esto que, la identificación de antígenos asociados a tumor que se encuentren además asociados a un alto riesgo de sufrir metástasis como es el caso de la proteína hMena abre la posibilidad de generar terapias coadyuvantes a las ya existentes, que podrían ayudar a reducir el riesgo de metástasis y por lo tanto de recurrencia de la enfermedad. Por tanto, en este estudio se propuso el uso del epítotope GLMEEMSAL, común entre las isoformas de hMena reportadas hMena^{11a} (NP_001008493.1, aa 443-451) y hMena Δ V6 (ABY78022.1, aa 406-414) en humanos; e isoforma 1 (NP_034265.2, aa 667-685), isoforma 2 (NP_032706.2, aa 662-670), isoforma 3 (NP_001076589., aa 658-666) e isoforma 4 (NP_001076590.1,aa 414-422) de ratón (recuperado de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein>), Di Modugno *et al.*, 2004), para conocer si linfocitos específicos hacia este epítotope eran capaces de ejercer función efectora contra líneas tumorales de CaMa y CaCu. Además, se evaluó si la inmunización de ratones BALB/c con el péptido GLMEEMSAL tenía un efecto protector o terapéutico ante el reto tumoral con células JC de carcinoma mamario, los hallazgos son de gran relevancia ya que podría no sólo ser aplicable a tumores de mama o cérvix, si no a muchos otros que sobre-expresan cualquiera de las isoformas de hMena y además podría tener impacto tanto en etapas tempranas como tardías del desarrollo tumoral.

3.1. *Importancia y Trascendencia del Estudio.*

Actualmente los tratamientos dirigidos al control de uno de los tipos de CaMa se enfocan en el desarrollo de anticuerpos que bloquean la actividad funcional de HER-2, y aunque muchas veces se obtienen resultados alentadores, se limitan a tan sólo un 20-30% de las pacientes. Para el caso del CaCu, las terapias antitumorales actuales se basan muchas veces en la

respuesta inmune hacia las proteínas oncogénicas E6 y E7, sin embargo, este tipo de terapia no es eficaz en tumores que carecen de la expresión de éstas. De tal manera que, la búsqueda de nuevos marcadores tumorales ha llevado a proponer a la proteína hMena como un AAT, debido a que su expresión se encuentra exacerbada en tumores de mama, colon, cérvix, glándulas salivales, páncreas entre otros. Por ello, el desarrollo de tratamientos basados en el uso de esta proteína, podría tener una amplia utilidad para prevenir la progresión, metástasis y recurrencia de diferentes tipos tumorales. En consecuencia, resulta relevante el desarrollo de estrategias terapéuticas como la que se propone en este proyecto de investigación.

4. Hipótesis

La secuencia GLMEEMSAL es un epítoto común entre las isoformas de Mena humana y murina. Por lo tanto, si utilizamos un sistema de vacunación *in vitro* empleando CMSP de donadores normales para activar linfocitos T CD8+ específicos, estos tendrán la capacidad de lisar células tumorales de CaCu y de CaMa que sobre-expresen cualquiera de las isoformas de la proteína hMena. Además, al inmunizar ratones de la cepa BALB/c con el péptido, se favorecerá *in vivo* la activación de linfocitos T citotóxicos capaces de reconocer y lisar células tumorales de adenocarcinoma mamario de ratón lo cual tendrá efecto protector y terapéutico ante el reto tumoral en los ratones inmunizados.

5. Objetivos

Objetivo General

Evaluar *in vitro* e *in vivo* la capacidad inmunogénica del epítoto GLMEEMSAL, común entre las isoformas hMena^{11a} y hMena Δ V6 de la proteína Mena humana, para inducir la activación de linfocitos T citotóxicos.

Objetivos Particulares

- 1.- Analizar la afinidad del epítoto GLMEEMSAL de hMena por las moléculas HLA-A2 humanas y H2-Kd de ratón.
- 2.- Analizar la expresión de Mena en las líneas celulares humanas y murinas de CaCu y CaMa.
- 3.- Evaluar la activación de linfocitos T CD8+ específicos inducidos mediante vacunación *in vitro* empleando CMSP de donadores normales e *in vivo* mediante inmunización de ratones de la cepa BALB/c con el epítoto GLMEEMSAL de hMena
- 4.- Evaluar la actividad funcional de los linfocitos T activados *in vitro* e *in vivo* con el epítoto GLMEEMSAL de hMena contra líneas tumorales humanas de cáncer de mama y cérvico-uterino; y contra una línea tumoral murina de adenocarcinoma mamario.

5.- Evaluar el efecto protector y terapéutico de la inmunización con GLMEEMSAL ante el reto tumoral con una línea tumoral murina de adenocarcinoma mamario en ratones de la cepa BALB/c.

6. Materiales y métodos

6.1. Muestras biológicas.

Se colectó sangre periférica de donadores normales (5 mujeres, 3 hombres, n=8; edad 21-30 años) bajo consentimiento informado de todos los individuos, utilizando un formato autorizado por el Comité de Ética de la UMAE del Hospital de Oncología, CMN SXXI del IMSS, para el protocolo 3026-24 de investigación en salud. Las muestras de sangre fueron colectadas en tubos vacutainer que contenían ACD como anticoagulante (Becton Dickinson Broken Bow, NE, USA). Las células mononucleares de sangre periférica (CMSP) fueron obtenidas mediante centrifugación utilizando un gradiente de densidad con Ficoll-Histopaque (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA).

Las muestras positivas para HLA-A2 fueron identificadas mediante citometría de flujo, para ello se utilizó el anticuerpo monoclonal derivado del hibridoma PA2.1 (ATCC, USA) el cual reconoce a la molécula HLA-A2. El anticuerpo anti-mouse IgG (Fab specific)- FITC (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) se utilizó como anticuerpo secundario y el análisis se llevó a cabo en el equipo FACS ARIA II (BD Biosciences, San José, CA, USA).

6.2. Líneas celulares

Para la realización de este trabajo se utilizaron las siguientes líneas celulares: CaSki (VPH-16+, HLA-A2+, hMena/hMena^{11a+}) y C33A (VPH-, HLA-A2+, hMena/hMena Δ V6+) de CaCu; y MCF-7 (HLA-A2+, hMena/hMena^{11a+}) y MDA-MB-231 (HLA-A2+, hMena/hMena Δ V6+) de CaMa, así como la línea celular murina de adenocarcinoma mamario JC (haplotipo H2-Kd) derivada de un tumor espontaneo de ratones BALB/c (Chao *et al.*, 1989). Todas las líneas celulares fueron mantenidas en medio de cultivo RPMI (SIGMA- Aldrich, USA) suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB) (GIBCO) a una temperatura de 37°C con un 5% de CO₂ y humedad saturante.

6.3. Análisis de expresión de Mena

La expresión de Mena en las líneas celulares empleadas en este trabajo excepto la línea murina JC, ha sido previamente reportada (Di Modugno *et al.*, 2007; Di Modugno *et al.*, 2012). Sin embargo, en este trabajo se corroboró la expresión de Mena mediante citometría

de flujo utilizando un anticuerpo monoclonal Anti-Mena clon A351F7D9 (Millipore, Temecula, CA, USA) y el anticuerpo secundario anti-mouse IgG (Fab specific)- FITC (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). El análisis se llevó a cabo en el equipo FACS ARIA II (BD Biosciences, San Jose, CA, USA) para el análisis de los resultados se adquirieron 10,000 eventos en cada determinación por triplicado.

6.4. Ensayo de estabilización de moléculas MHC I murinas y humanas

Se analizó la estabilización de moléculas HLA-A2, utilizando la línea celular linfoblástica T2, la cual expresa moléculas HLA-A2 vacías en su superficie (Hosken *et al.*, 1990), con ésta se evaluó la afinidad de diferentes concentraciones (25 to 200 µg/ml) de péptido sintético. Para llevar a cabo lo anterior, se incubaron las células con diferentes concentraciones de péptido, a 37°C en presencia de 5 µg/ml β2-microglobulina (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)). Los péptidos utilizados para este ensayo (sintetizados por Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) fueron: GLMEEMSAL (secuencia 443-451) derivado de la proteína hMena, KIFGSLAFL (secuencia 369-377) derivado de la proteína HER-2 y KLPQLCTEL (secuencia 18-26), los cuales fueron empleados como control positivo debido a que ya se ha reportado anteriormente su afinidad para las moléculas HLA-A2 (Di Modugno *et al.*, 2004; Fisk *et al.*, 1995; Kast *et al.*, 1994). El péptido TPTLHEYML (secuencia 5-13) derivado de proteína E7 (VPH-16) fue empleado como control negativo debido a su baja afinidad para las moléculas HLA-A2 (Kast *et al.*, 1994). Por otra parte, para evaluar la afinidad de estos péptidos por las moléculas H2-Kd, se empleó la línea celular de mastocitoma P815 previamente tratada por elución ácida y posteriormente incubada con diferentes concentraciones de péptido (0 a 200 µg/ml). La unión de cada uno de los péptidos a las moléculas HLA-A2 y H2-Kd se analizó mediante citometría de flujo, posterior al marcaje con el anticuerpo anti HLA-A2 derivado del hibridoma PA 2.1 o el anti-H2Kd derivado del hibridoma SF-1.1.10 (ATCC, USA) respectivamente, en conjunto con el anticuerpo secundario anti-mouse IgG (Fab specific)- FITC (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), para el análisis de los resultados se adquirieron 10,000 eventos en cada determinación por triplicado.

6.5. Generación de Células Dendríticas Maduras (CDMs)

Las CDMs fueron generadas de acuerdo al protocolo previamente descrito (Mora-García *et al.*, 2006) con algunas modificaciones. Después de la obtención de las CMSP, se sembraron 2,500,000 en placas de 6 pozos en un volumen final de 2 ml de medio de cultivo. Transcurridas 2 horas de iniciado el cultivo, se procedió a colectar la fracción no adherente y ésta fue criopreservada (-70° C) para su posterior uso. La fracción adherente fue cultivada durante 5 días en medio completo (MC) compuesto por IMDM (Gibco, USA) suplementado con 10% de suero autólogo humano, 100 unidades/ml de penicilina, 100 µg/ml de estreptomicina (Gibco, USA), 4 mM L-glutamina (Gibco, USA), 1mM de piruvato de sodio (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA) 1X de solución de aminoácidos no esenciales (Sigma-Aldrich, USA) y 20 µM de 2-mercaptoetanol (Gibco, USA). Para la generación de células dendríticas se suplementó el MC con 40 ng/ml de IL-4 (PeproTech Rocky Hill, NJ, USA) y 60 ng/ml de GM-CSF (PeproTech Rocky Hill, NJ, USA). Al día 5, se procedió a añadir citocinas y péptidos antigénicos al cultivo a una concentración de 20 µg/ml de Poly I: C (SIGMA- Aldrich, USA), 10,000 U/ml de IFN- α (Roferon- α , F. Hoffmann-la Roche, SA Basilea, Switzerland) y 10 µg/ml de péptido GLMEEMSAL, KIFGSLAFL, y el péptido KLPQLCTEL (secuencia 18-26) derivado de la proteína E7 (VPH-16) el cual fue utilizado como control positivo. El fenotipo de las CDMs fue analizado al día 7 mediante citometría de flujo utilizando los anticuerpos monoclonales anti-hHLA- A, B, C (derivado del hibridoma W6/32, ATCC) y anti-hCD83 (R&D Systems, USA) en conjunto con el anticuerpo secundario anti-mouse IgG (Fab specific)- FITC (SIGMA- Aldrich, USA), además de los anticuerpos conjugados anti-hHLA-DR, DP, DQ-FITC (BD Pharmingen, USA), anti-hB7-1/CD80-PE (R&D Systems, USA), anti-hB7-2/CD86-APC(R&D Systems, USA). La expresión de cada marcador fue comparada con la expresión de Células Dendríticas Inmaduras (CDIs) obtenidas del cultivo de la fracción adherente de las CMSP en presencia de sólo GM-CSF e IL-4. Un total de 10,000 eventos fueron adquiridos en cada caso para su análisis, mediante citometría de flujo.

6.6. Identificación de células T activadas productoras de IFN- γ .

Para la activación *in vitro* de linfocitos T, 250,000 CMSP fueron co-cultivadas con CDMs cargadas con 10 µg/ml de péptido GLMEEMSAL en proporción 5:1 (CMSP:CDMs);

mientras que para el modelo *in vivo* se extrajeron células de bazo de ratones inmunizados con tres dosis intraperitoneales de 100 µg del péptido GLMEEMSAL. Ambos cultivos fueron mantenidos durante 72 horas en una placa de 24 pozos (Corning, Pittston, PA, USA) con 1 ml de MC. Durante las últimas 12 horas de cultivo, se adicionaron 10 µg/ml de Brefeldina A (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) y 50 µg/ml Monensina A (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), para poder determinar el porcentaje de células T productoras de IFN-γ. Finalizado el tiempo de co-cultivo, se colectaron las células y se incubaron por 30 minutos a 4°C con el anticuerpo monoclonal anti-CD8-APC o anti-CD4-PE (R & D Systems, Inc., Minneapolis, MN, USA) para humano o ratón según fuera el caso y posteriormente se realizaron 3 lavados con PBS/2% SFB. Después las células fueron fijadas y permeadas usando el kit Cytofix/Cytoperm (BD Biosciences, San Jose, CA, USA) e incubadas con el anticuerpo monoclonal anti-IFN-γ-FITC (R & D Systems, Inc, Minneapolis, MN, USA) para humano o ratón según fuera el caso durante 30 minutos a 4°C y se realizaron 3 lavados con PBS/2% SFB. Un total de 50,000 eventos fueron adquiridos y analizados con el software Flowing 2.5 para determinar el porcentaje de células T CD8⁺/IFN-γ⁺ y CD4⁺/IFN-γ⁺.

6.7. Ensayos de citotoxicidad

La actividad citotóxica de células T CD8⁺ estimuladas con los péptidos antigénicos fue determinada por la expresión de la molécula CD107 en las células efectoras después de su degranulación (Betts *et al.*, 2003) o por el porcentaje de células blanco lisadas, positivas a la inclusión de la solución de viabilidad celular 7AAD (BD Biosciences, San Diego, CA, USA).

En el primer caso las células blanco (T2, CaSki, C33A, MCF-7 y MDA-MB-231) fueron co-cultivadas con CMSP (previamente estimuladas con 3 rondas de CDMs cargadas con péptido) en proporción 1:5 durante 4 horas en 50 µL de MC adicionando al inicio del ensayo 2µL del anticuerpo monoclonal anti-hLAMP-1/CD107a-FITC (R & D Systems, Inc, Minneapolis, MN, USA). Una hora después de iniciado el ensayo se agregaron 5 µL al cultivo de una mezcla de 10 µg/ml de Brefeldina A (Sigma-Aldrich, USA) y 50 µg/ml de Monensina A (Sigma-Aldrich, USA). Terminado el tiempo de co-cultivo, se procedió a realizar una tinción con el anticuerpo monoclonal anti-hCD8-APC (R & D Systems, Inc, Minneapolis, MN, USA) y posteriormente se analizaron las células CD8⁺CD107a⁺ en un FACS ARIA II

(BD Biosciences). Después de descartar fragmentos celulares, se analizó un total de 25,000 eventos para cada determinación.

Por otra parte, para evaluar la especificidad de la respuesta, se determinó la actividad citotóxica de las células efectoras sobre las células blanco utilizando las proporciones 1:20, 1:10 y 1:5 (Blanco: Efectora) y la solución de viabilidad celular 7AAD (BD Biosciences, San Diego, CA, USA). Para determinar la lisis total de las células blanco, se utilizó peróxido de hidrógeno para permearlas (control positivo de técnica). El porcentaje de lisis específica se calculó de acuerdo a la fórmula: % citotoxicidad = $100 \times [(lisis\ experimental\ (7AAD+) - lisis\ basal\ (7AAD+) / (lisis\ total\ (7AAD+) - lisis\ basal\ (7AAD+)]$. Para inhibir el reconocimiento específico de células T CD8⁺ a través de moléculas HLA-A2 se agregaron 10 µg/ml del anticuerpo monoclonal anti-HLA-A2 (derivado del hibridoma PA2.1, ATCC) a las células CaSki y MDA-MB-231.

Modelo tumoral e inmunización con el péptido GLMEEMSAL

6.8. Ratones

Se emplearon ratones hembra de la cepa BALB/c (haplotipo H2-Kd) de 6 a 8 semanas de edad, estos fueron mantenidos bajo condiciones estándar de bioterio en la FES- Zaragoza UNAM con agua y alimento *ad libitum*. Todos los procedimientos empleados en el modelo *in vivo* fueron llevados a cabo conforme a las reglas institucionales, cumpliendo con las normas nacionales e internacionales.

6.9. Modelo de protección anti-tumoral

Grupos de 5 ratones hembra BALB/c, fueron inmunizados con 3 inyecciones intraperitoneales con un periodo de separación entre una y otra de 10 días (día 0, 10 y 20). Cada inmunización consistió de 100 µg de péptido GLMEEMSAL emulsionado en proporción 1:1 con 50 µl de adyuvante completo de freund (ACF) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) para la 1^a inmunización (día 0), o con adyuvante incompleto de freund (AIF) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) para la 2^a y 3^a inmunización (días 10 y 20). El grupo control recibió inmunizaciones con el mismo volumen de PBS en proporción 1:1 con el adyuvante correspondiente. Para analizar la inducción de linfocitos T citotóxicos (LTCs), 10

días después de la última inmunización (día 30) los ratones fueron sacrificados para obtener las células de bazo, estas fueron cultivadas en RPMI en presencia o ausencia de 10 µg/ml del péptido GLMEEMSAL. Dos días después de la estimulación *ex vivo*, las células de bazo fueron co-cultivadas en placas de 96 pozos fondo U con 50 µl de MC en proporciones 20:1, 10:1 y 5:1 (Efectora: Blanco) con 60,000 células tumorales JC (Blanco). Después de 4 horas de co-cultivo, la actividad citotóxica fue determinada como se indicó previamente.

Para analizar si la inmunización con GLMEEMSAL tenía efecto protector contra el reto tumoral, al día 30 de iniciada la inmunización, se procedió a inocular 1×10^6 células tumorales JC por vía subcutánea en el lomo de los ratones previamente inmunizados.

6.10. Modelo Terapéutico

Para el análisis del efecto terapéutico de la inmunización con el péptido GLMEEMSAL, 1,000,000 células tumorales JC fueron inoculadas por vía subcutánea en el lomo de los ratones BALB/c al día 0. Cuando el tamaño de los tumores fue de 0.5-0.7cm de largo y ancho, los ratones se inmunizaron intraperitonealmente con 100 µg/ml del péptido GLMEEMSAL emulsionado en proporción 1:1 con 50 µl de AFC al día 13 o con AIF al día 19. El tamaño tumoral fue monitoreado cada 3 días con la ayuda de un vernier y se calculó el volumen tumoral empleando la fórmula $V = (0.4)(ab^2)$, donde (a) y (b) son el largo y ancho del tumor, respectivamente (Attia *et al.*, 1966). Además, se observó la sobrevida de los ratones durante 31 días.

6.11. Análisis estadístico

Los datos numéricos fueron expresados como el promedio \pm el error estándar (SEM) de los experimentos llevados a cabo por triplicado a menos que se indique lo contrario. La media de los grupos fue comparada utilizando la prueba de U de Mann Whitney para datos no paramétricos. Se consideró una diferencia estadísticamente significativa con $P < 0.05$ y $P < 0.01$.

7. Resultados

7.1. El péptido GLMEEMSAL induce la activación de linfocitos T CD8⁺ específicos.

Al analizar la secuencia de ambas isoformas de hMena, mediante los sistemas de predicción por algoritmos SYFPEITHI (Rammensee *et al.*, 1999) y BIMAS (Parker *et al.*, 1994) el péptido GLMEEMSAL fue el nanopeptido que mostró más alta afinidad a las moléculas HLA-A2. Para corroborar lo anterior, se analizó la afinidad del péptido hacia las moléculas HLA-A2, empleando la línea celular T2 la cual presenta moléculas HLA-A2 vacías en su superficie, por lo que es posible cargarlas con péptido para su análisis. A manera de control positivo, se emplearon los péptidos inmunogénicos KIFGSLAFL (secuencia 369-377) derivado de la proteína HER-2 y KLPQLCTEL (secuencia 18-26) derivado de la proteína E6 de VPH-16, los cuales han sido reportados altamente afines a la molécula HLA-A2 (Kast *et al.*, 1994; Fisk *et al.*, 1995; Rensing *et al.*, 1995; Rongcun *et al.*, 1999; Disis *et al.*, 2002; Baxevanis *et al.*, 2006). El péptido TPTLHEYML (secuencia 5-13) de la proteína E7 de VPH-16 fue usado como control negativo debido a su baja afinidad por las moléculas HLA-A2 (Kast *et al.*, 1994).

Como resultado de lo anterior, se encontró que el péptido GLMEEMSAL fue el que presentó la mayor afinidad por las moléculas HLA-A2 a partir de una concentración de 50 µg/ml (Figura 2), esto con respecto a la expresión basal de estas moléculas en células T2 sin adición de péptido, la cual fue normalizada a un valor de 1. El péptido KIFGSLAFL presentó una menor estabilización de las moléculas HLA-A2, ya que requirió de una concentración 4 veces más alta (200 µg/ml) que la requerida con péptido GLMEEMSAL para obtener la máxima estabilización de las moléculas HLA-A2. En contraste, sólo se observó una ligera estabilización de las moléculas HLA-A2 utilizando una concentración mayor a 200 µg/ml del péptido TPTLHEYML (Figura 2).

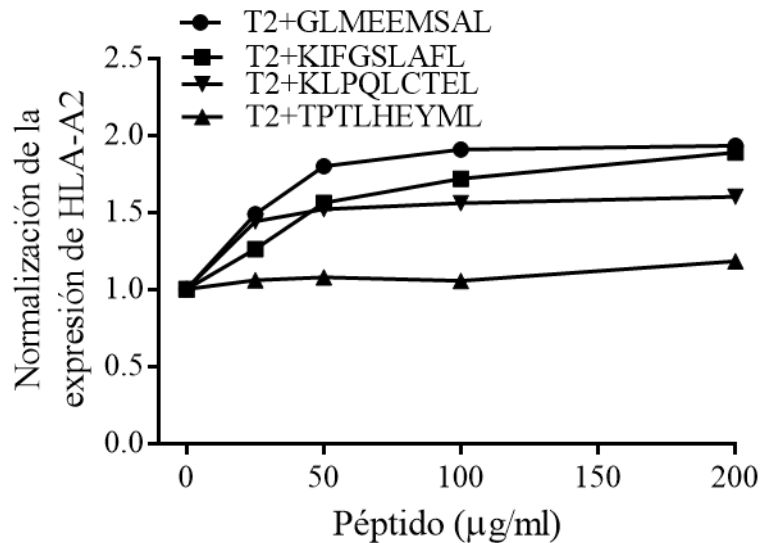


Figura 2. El péptido GLMEEMSAL derivado de la proteína hMena estabiliza eficientemente moléculas HLA-A2. La línea celular linfoblástica T2 que expresa moléculas HLA-A2 vacías en su superficie fue incubada con diferentes concentraciones (25-200 µg/ml) de los péptidos: GLMEEMSAL de hMena, KIFGSLAFL de HER-2 (control positivo), KLPQLCTEL de la proteína E6 de VPH-16 (control positivo) y TPTLHEYML de la proteína E7 de VPH-16 (control negativo). Se muestran las veces de incremento en la expresión de HLA-A2 en células T2 incubadas con cada péptido con respecto a la expresión basal de HLA-A2 en células T2 incubadas sin adición de péptido, lo cual fue normalizado con valor de 1. Los datos muestran un experimento representativo de 3 o más experimentos independientes con resultados similares.

Con la finalidad de analizar la activación de células T CD4⁺ y CD8⁺ con el péptido GLMEEMSAL, se llevó a cabo un ensayo de vacunación *in vitro* empleando CDMs cargadas con 10 µg/ml de GLMEEMSAL. Las CDMs fueron generadas a partir de CMSP de donadores normales HLA-A2⁺ de acuerdo a un protocolo previamente descrito por nuestro grupo de trabajo (Mora-García *et al.*, 2006) con algunas modificaciones como se describió en Material y Método. Las CDMs cargadas con péptido GLMEEMSAL fueron utilizadas como células presentadoras de antígeno (CPAs) en los co-cultivos con CMSP en una proporción de 1:5 (CDM: CMSP) durante 72 horas. Al terminar el tiempo de co-cultivo las células fueron incubadas con anticuerpos para determinar el porcentaje de células T CD4⁺ y CD8⁺ productoras de IFN-γ. Con esta estrategia pudimos detectar 18% de células T CD4⁺/IFN-γ⁺ y 25% de células T CD8⁺/IFN-γ⁺, cuando las CMSP fueron estimuladas con

las CDMs cargadas con el péptido GLMEEMSAL, mientras que en ausencia del péptido los porcentajes de células activadas fueron prácticamente nulos (Figura 3).

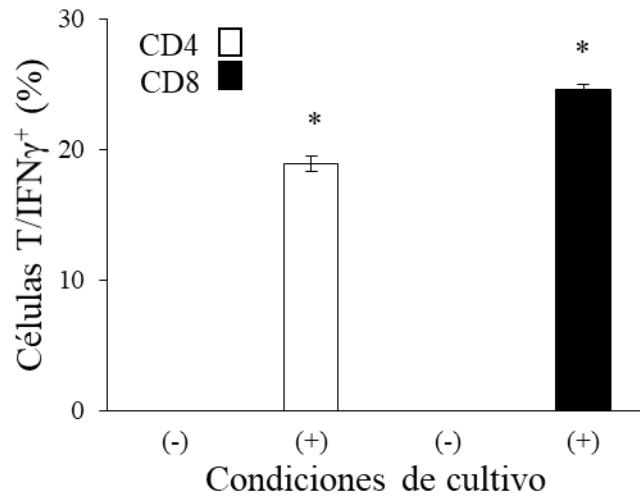


Figura 3. El péptido GLMEEMSAL activa células T CD4⁺ y CD8⁺. Los datos indican el incremento en el porcentaje de linfocitos T CD4⁺/IFN- γ ⁺ y CD8⁺/IFN- γ ⁺ obtenidos después de co-cultivar durante 72 horas CMSP con CDMs cargadas (+) o no (-) con péptido GLMEEMSAL. * Indica diferencia significativa (P<0.05) en comparación con los co-cultivos con CMSP sin estímulo. Los valores representan el promedio \pm SEM de las muestras por triplicado. Los datos son representativos de 3 o más experimentos independientes con resultados similares.

7.2. Linfocitos T CD8⁺ estimulados con el péptido GLMEEMSAL son capaces de lisar células tumorales positivas para la expresión de hMena/hMena^{11a} y hMena/hMena Δ V6.

Linfocitos T CD8⁺ obtenidos mediante la estimulación de CMSP por el método de vacunación *in vitro* con CDMs cargadas con los péptidos GLMEEMSAL, KLPQLCTEL o KIFGSLAFL fueron co-cultivados con células T2 cargadas con cada uno de los péptidos (Células Blanco) en una proporción 5:1 y después de 4 horas se analizó el porcentaje de linfocitos T CD8⁺/CD107⁺. El porcentaje de células T CD8⁺/CD107⁺ obtenido del co-cultivo de CMSP sin estimular (control negativo) con las células blanco fue de (0.1-0.2%); mientras que el porcentaje de linfocitos T CD8⁺/CD107⁺ obtenido de CMSP estimuladas con el péptido GLMEEMSAL fue de aproximadamente 8 veces mayor respecto al control negativo; y el de CMSP estimuladas con los péptidos KLPQLCTEL y KIFGSLAFL (controles

positivos) fueron de 5 y 6 veces mayor que el del control negativo, respectivamente (Figura 4).

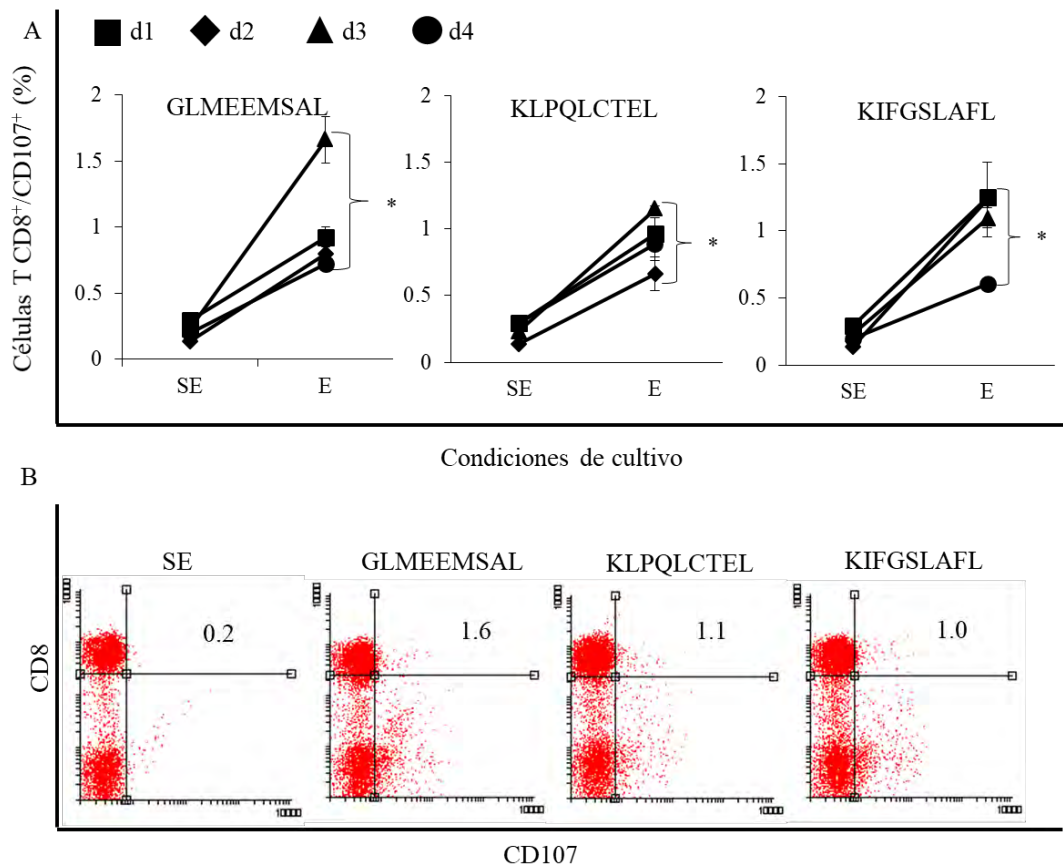


Figura 4. Linfocitos T CD8⁺ estimulados con el péptido GLMEEMSAL muestran degranulación específica restringida a HLA-A2. (A) Los datos representan el incremento en el porcentaje de linfocitos T CD8⁺/CD107⁺ obtenido del reto de células T2 (HLA-A2⁺) cargadas con péptido contra CMSP de 4 donadores normales (d1, d2, d3 y d4) estimuladas (E) previamente con CDMs cargadas con péptido GLMEEMSAL (hMena), KIFGSLAFL (HER-2) o KLPQLCTEL (proteína E6 de VPH-16). El porcentaje basal fue obtenido del reto de células T2 cargadas con péptido contra CMSP no estimuladas (SE). (B) Se muestran los dot plots representativos de linfocitos T CD8⁺/CD107⁺ después de retar células T2 cargadas con cada péptido contra CMSP SE o E de un donador normal. *Indica diferencias significativas (P<0.05) en comparación con los cocultivos empleando CMSP sin estímulo previo. Los valores representan el promedio ± SEM de las muestras por triplicado de 3 o más experimentos independientes con resultados similares.

Por otra parte, al considerar que el péptido GLMEEMSAL forma parte de la secuencia de las isoformas hMena/hMena11a y hMena/hMenaΔV6 (Di Modugno *et al.*, 2004; Di Modugno *et al.*, 2012) se procedió a analizar si los linfocitos T CD8⁺ estimulados con GLMEEMSAL

eran capaces de reconocer células tumorales que sobre-expresaran cualquiera de las 2 isoformas de hMena. Para ello, las líneas celulares de CaCu, CaSki (VPH-16+, HLA-A2+, hMena/hMena11a-positiva), C33A (VPH-, HLA-A2+, hMena/hMenaΔV6-positiva) así como las líneas celulares de CaMa, MCF-7 (HLA-A2+, hMena/hMena11a-positiva) y MDA-MB-231 (HLA-A2+, hMena/hMenaΔV6-positiva) fueron empleadas como células blanco para el co-cultivo con linfocitos T CD8⁺. La expresión de hMena en estas líneas celulares fue corroborada por citometría de flujo (Figura 5).

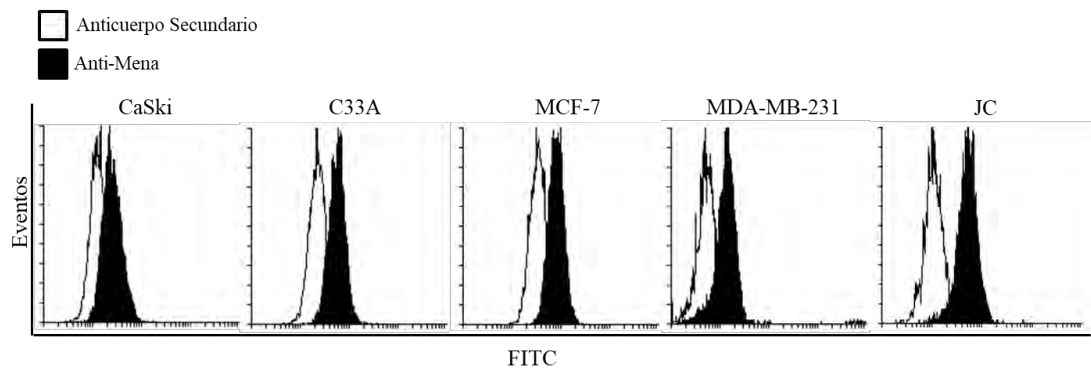


Figura 5. Expresión de hMena en líneas celulares de CaMa y CaCu. Se muestra la detección mediante citometría de flujo de la proteína hMena (histogramas en negro) en las líneas celulares CaSki y C33A de CaCu, así como en las líneas MCF-7, MDA-MB-231 y JC (murina) de CaMa. La tinción con el anticuerpo secundario empleado (histograma blanco) fue incluida como control negativo para cada línea celular. Los datos muestran un experimento representativo de 3 experimentos independientes con resultados similares.

El porcentaje de linfocitos T CD8⁺/CD107⁺ obtenido después del reto de cada línea celular con CMSP no estimuladas fue considerado como basal. De forma interesante, después del reto de células CaSki, C33A, MDA-MB-231 y MCF-7 con CMSP de donadores normales HLA-A2⁺ estimuladas con el péptido GLMEEMSAL se observó incremento en el porcentaje de linfocitos T CD8⁺/CD107⁺ de 4.1, 2.2, 3.7 y 2.1 veces con respecto al reto con CMSP sin estímulo (Figura 6). CMSP estimuladas con el péptido KLPQLCTEL derivado de la proteína E6 de VPH-16 mostró actividad citotóxica únicamente contra las células CaSki, resultando en aproximadamente 5 veces de incremento con respecto al reto con CMSP sin estímulo.

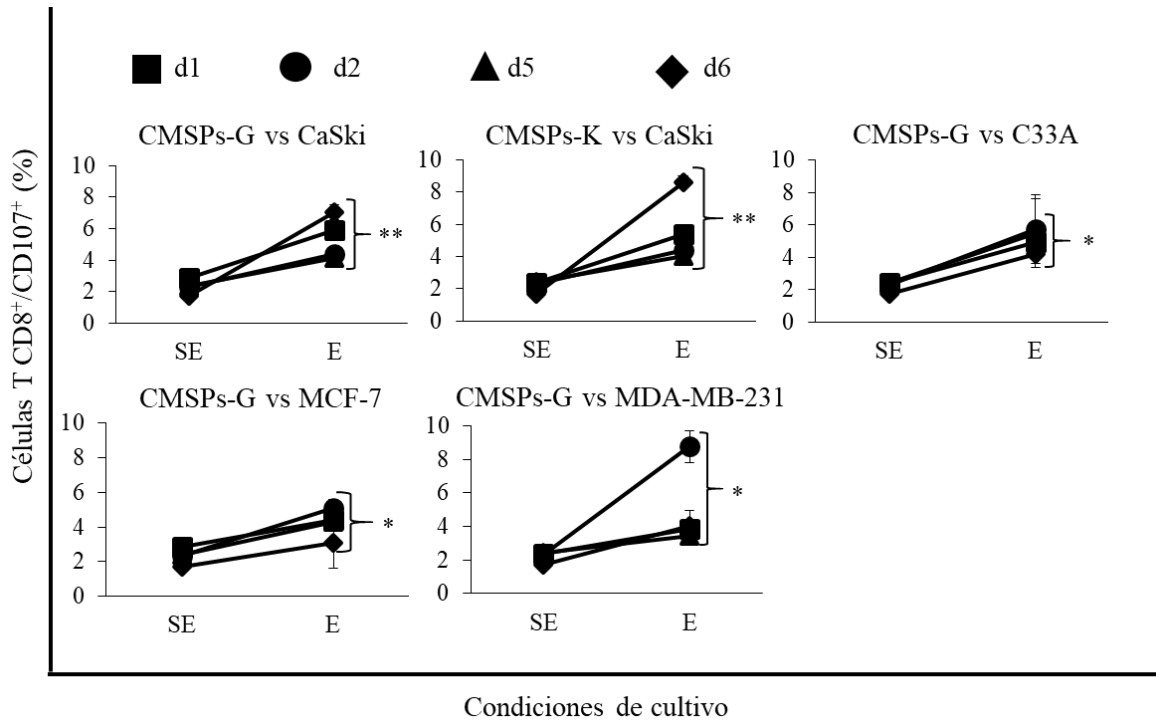


Figura 6. Linfocitos T CD8⁺ estimulados con el péptido GLMEEMSAL reconocen células tumorales positivas para la sobre-expresión de hMena/hMena^{11a} o hMena/hMena Δ V6. CMSP derivadas de 4 donadores normales (d1, d2, d5 y d6) fueron previamente estimuladas mediante vacunación *in vitro* empleando CDMs cargadas con GLMEEMSAL (CMSPs-G) o KLPQLCTEL de la proteína E6 de VPH-16 (CMSPs-K) para utilizarlas en el reto contra CaSki (VPH-16⁺, HLA-A2⁺, hMena/hMena^{11a}-positiva) y C33A (VPH-, HLA-A2⁺, hMena/hMena Δ V6-positiva) de CaCu así como MCF-7 (HLA-A2⁺, hMena/hMena^{11a}-positiva) y MDA-MB-231 (HLA-A2⁺, hMena/hMena Δ V6-positiva) de CaMa en proporción 5:1 (E:B). Los datos muestran el incremento en el porcentaje de linfocitos T CD8⁺/CD107⁺ después del reto de CMSP estimuladas (E) previamente con el péptido contra cada una de las células tumorales empleadas. El porcentaje basal de linfocitos T CD8⁺/CD107⁺ fue determinado retando las diferentes células tumorales con CMSP no estimuladas (SE). Las diferencias significativas *(P < 0.05) y ** (P < 0.01) fueron obtenidas al comparar los porcentajes del reto de células tumorales contra CMSP estimuladas con respecto al empleo de CMSP no estimuladas contra las mismas líneas celulares. Los valores representan el promedio \pm SEM de las muestras por triplicado de 3 o más experimentos independientes con resultados similares.

Para determinar, si el reconocimiento inmune de los linfocitos T CD8⁺ era mediado específicamente por las moléculas HLA-A2 presentes en la superficie de las células tumorales CaSki (VPH-16⁺, HLA-A2⁺, hMena/hMena^{11a}-positiva) y MDA-MB-231 (HLA-A2⁺, hMena/hMena Δ V6-positiva), estas líneas celulares fueron cultivadas con diferentes proporciones de CMSP (1:5, 1:10, 1:20) las cuales fueron previamente estimuladas en 3

ocasiones con CDMs cargadas con el péptido GLMEEMSAL. Subsecuentemente, se analizó el porcentaje de linfocitos T CD8⁺/CD107⁺ y la lisis específica de células blanco, para lo cual se encontró incremento proporcional en el porcentaje de linfocitos T CD8⁺/CD107⁺ (Figura 7A) y lisis de las células blanco empleadas (Figura 7B) que correlacionó con el incremento de células efectoras en el co-cultivo. Además, al añadir el anticuerpo monoclonal anti-HLA A2 a los co-cultivos se pudo observar la inhibición del incremento en el porcentaje de linfocitos T CD8⁺/CD107⁺ y de la lisis de las células blanco. Aunado a esto, CMSP de donadores normales HLA-A2 negativos no mostraron incremento en la actividad citotóxica contra estas células blanco (Figura 8).

7.3. La inmunización de ratones BALB/c con el péptido GLMEEMSAL activa células T específicas.

De acuerdo a los sistemas de predicción por algoritmos SYFPEITHI (Rammensee *et al.*, 1999) y BIMAS (Parker *et al.*, 1994) el péptido GLMEEMSAL tiene afinidad media por las moléculas H2-Kd. De tal manera que para evaluar dicha afinidad *in vitro*, se empleó la línea celular de mastocitoma P815 la cual expresa moléculas H2-Kd y se trató con una elución ácida para eliminar los péptidos propios acoplados a sus moléculas H2-Kd y después se cultivó en presencia del péptido GLMEEMSAL encontrándose que a una concentración de 200 µg/ml del péptido, este fue capaz de estabilizar moléculas H2-Kd de forma similar a la obtenida con los péptidos KLPQLCTEL, KIFGSLAFL y TPTLHEYML (Figura 9).

Para analizar la inmunogenicidad *in vivo* del péptido GLMEEMSAL, ratones de la cepa BALB/c fueron inmunizados intraperitonealmente con 3 dosis de 100 µg de péptido GLMEEMSAL emulsionado con 50 µl de ACF (día 0) o AIF (días 10 y 20) en proporción 1:1. Diez días después de la última inmunización los ratones fueron sacrificados y las células de bazo fueron extraídas y cultivadas durante 72 horas en presencia o ausencia de 10 µg/ml de péptido. Transcurrido este tiempo se analizó la cantidad de células T CD4⁺ y CD8⁺ productoras de IFN-γ observándose incremento de 33% a 50% de células T CD4⁺/IFN-γ⁺ y de 57% a 70% de células T CD8⁺/IFN-γ⁺ cuando el péptido GLMEEMSAL estuvo presente (Figura 10).

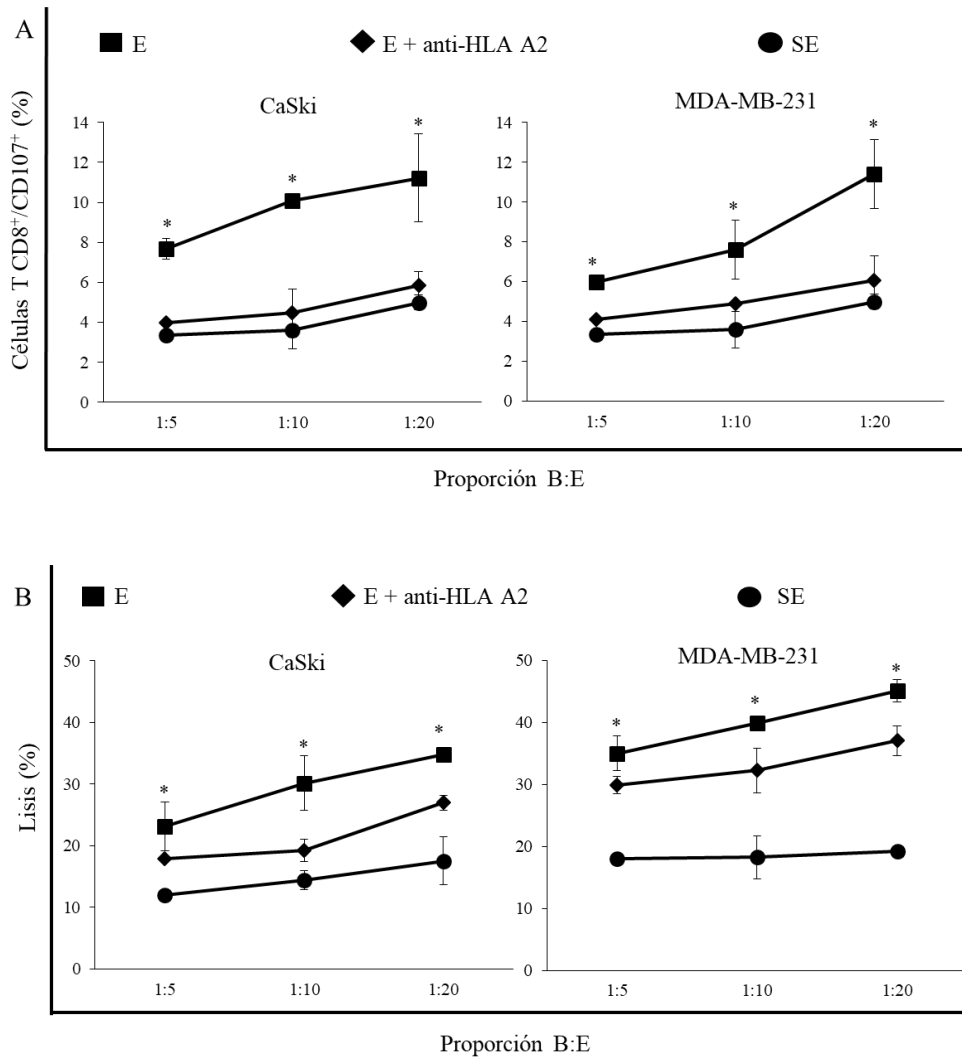


Figura 7. Linfocitos T CD8⁺ estimulados con el péptido GLMEEMSAL muestran actividad citotóxica específica restringida a HLA-A2 ante el reto contra células tumorales positivas para las isoformas hMena/hMena^{11a} o hMena/hMena Δ V6. CMSP derivadas de donadores normales HLA-A2⁺ estimuladas previamente (E) mediante vacunación *in vitro* usando CDMs cargadas con el péptido GLMEEMSAL fueron empleadas como células efectoras en un co-cultivo con células blanco (B) CaSki (VPH-16⁺, HLA-A2⁺, hMena/hMena^{11a}-positiva) o MDA-MB-231 (HLA-A2⁺, hMena/hMena Δ V6-positiva) a diferentes proporciones (B:E) 1:5, 1:10 y 1:20. Con la finalidad de inhibir el reconocimiento de las células blanco por parte de los linfocitos T CD8⁺ se agregaron 10 μ g/ml de mAb anti HLA-A2. (A) El porcentaje de linfocitos T CD8⁺/CD107⁺ y (B) la actividad citotóxica de estos sobre células tumorales fue determinada como se describió en la sección de materiales y métodos. El porcentaje basal de linfocitos T CD8⁺/CD107⁺ así como de la actividad citotóxica fue determinado retando las diferentes líneas celulares con CMSP sin estimular (SE). * Indica diferencia significativa (P < 0.05) con respecto a los co-cultivos empleando CMSP sin estimular. Los valores representan el promedio \pm SEM de las muestras por triplicado. Los datos son representativos de 3 o más experimentos independientes con resultados similares.

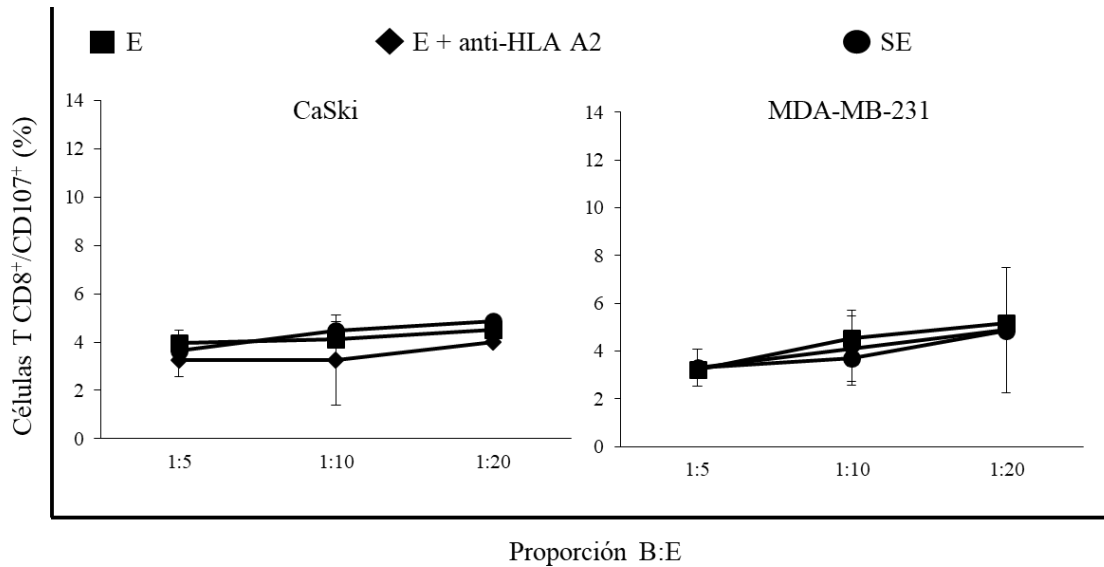


Figura 8. Linfocitos T CD8⁺ derivados de donadores normales HLA-A2 negativos estimulados con el péptido GLMEEMSAL no son capaces de reconocer células tumorales CaSki y MDA-MB-231. CMSP derivadas de donadores normales HLA-A2 negativos fueron estimuladas previamente mediante vacunación *in vitro* utilizando CDMs cargadas con 10µg/ml del péptido GLMEEMSAL y fueron empleadas como células efectoras (E) en un co-cultivo contra células tumorales CaSki (VPH-16⁺, HLA-A2⁺, hMena/hMena^{11a}-positiva) o MDA-MB-231 (HLA-A2⁺, hMena/hMenaΔV6-positiva) usadas como células blanco (B) a diferentes proporciones (B:E) 1:5, 1:10, 1:20. Los datos representan el porcentaje de linfocitos T CD8⁺/CD107⁺ después del reto de CMSP estimuladas (E) con el péptido antigénico. El porcentaje basal de linfocitos T CD8⁺/CD107⁺ fue determinado retando las líneas celulares con CMSP sin estimular (SE). Los valores representan el promedio ± SEM de las muestras por triplicado. Los datos son representativos de 3 o más experimentos independientes con resultados similares.

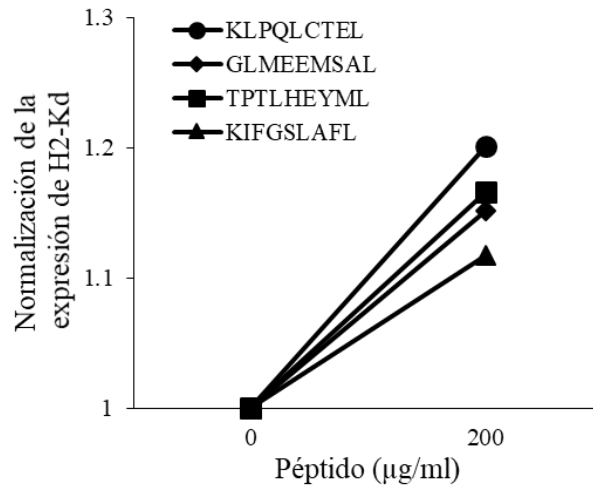


Figura 9. El péptido GLMEEMSAL de la proteína hMena estabiliza moléculas H2-Kd. La línea celular de mastocitoma P815 (H2-Kd⁺) fue tratada mediante elución ácida para eliminar los péptidos propios acoplados a las moléculas H2-Kd y después se incubó en presencia de 200 µg/ml de péptidos exógenos: GLMEEMSAL de la proteína hMena, KIFGSLAFL de HER-2, KLPQLCTEL de la proteína E6 de VPH-16 y TPTLHEYML de la proteína E7 de VPH-16. Se muestra la normalización de la expresión de moléculas H2-Kd en células P815 después de la elución ácida incubadas sin péptido, la cual fue normalizado con valor de 1; y el de las células P815 estabilizadas con cada uno de los péptidos como se mencionó anteriormente. Los datos muestran un experimento representativo de 3 o más experimentos independientes con resultados similares.

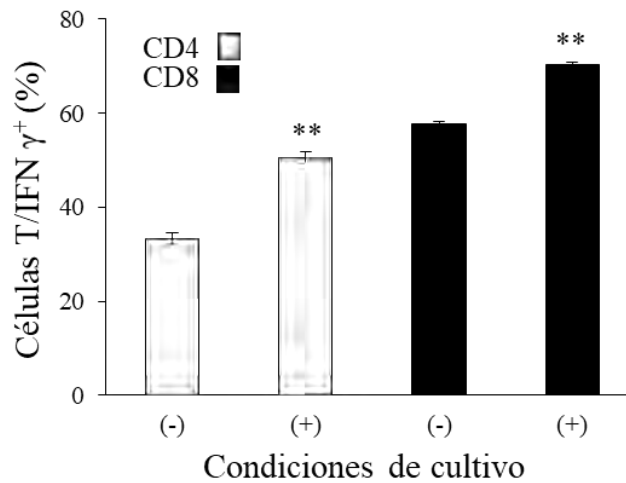


Figura 10. La inmunización de ratones BALB/c con el péptido GLMEEMSAL activa células T CD4⁺ y T CD8⁺. Los datos indican el incremento en el porcentaje de linfocitos T CD4⁺/IFN-γ⁺ y CD8⁺/IFN-γ⁺ obtenido después del cultivo *in vitro* de células de bazo, de ratones BALB/c inmunizados con el péptido GLMEEMSAL, en presencia (+) o ausencia (-) de péptido como se indicó en la sección de materiales y métodos. Los valores representan el promedio \pm SEM de las muestras por triplicado. ** Indica diferencia significativa (P<0.01). Los datos muestran un experimento representativo de 3 o más experimentos independientes con resultados similares.

Para analizar la actividad citotóxica de linfocitos T CD8⁺ generados después de la inmunización de ratones con el péptido GLMEEMSAL, las células de bazo de ratones inmunizados fueron cultivadas en presencia o ausencia de 10 µg/ml de péptido GLMEEMSAL o TPTLHEYML y posteriormente fueron retadas contra células tumorales JC (H2-Kd⁺, Mena⁺) (Figura 4) en proporciones 20: 1, 10: 1 y 5: 1 (E: B). Los linfocitos T CD8⁺ estimulados con el péptido GLMEEMSAL fueron capaces de lisar de 15 a 20% de las células tumorales JC, mientras que las células de bazo de estos ratones re-estimuladas con el péptido TPTLHEYML o sin péptido (PBS/ vehículo control) mostraron una actividad lítica más baja (Figura 11).

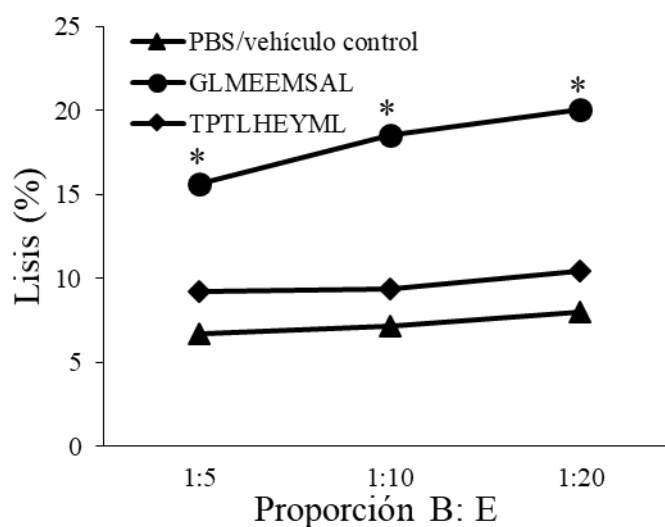


Figura 11. Linfocitos T CD8⁺ derivados de ratones BALB/c inmunizados con el péptido GLMEEMSAL muestran actividad citotóxica contra las células tumorales murinas JC. Células de bazo derivadas de ratones inmunizados (n=5) con el péptido GLMEEMSAL fueron re-estimulados *ex vivo* durante 2 días con 10 µg/ml del péptido GLMEEMSAL o TPTLHEYML para después utilizarlas como células efectoras (E) en el co-cultivo con células blanco (B) JC (H2-Kd, Mena⁺, Figura 4) a diferentes proporciones (B:E) 1:5, 1:10 y 1:20. La lisis de células blanco por células T CD8⁺ fue determinada como se indicó en la sección de materiales y métodos. El porcentaje de lisis basal se determinó retando las células de bazo del grupo control (PBS/vehículo control) contra células tumorales JC. Los valores representan el promedio \pm SEM de las muestras por triplicado. *Indica diferencia significativa ($P < 0.05$) en comparación al grupo PBS/vehículo control. Los datos son representativos de 3 o más experimentos independientes con resultados similares.

7.4 La inmunización de ratones BALB/c con el péptido GLMEEMSAL inhibe el crecimiento tumoral.

Debido a que, la inmunización de ratones BALB/c con el péptido GLMEEMSAL indujo la activación de LTCs capaces de lisar células tumorales JC, se procedió a analizar la capacidad protectora y terapéutica de este péptido ante el reto tumoral. Para tal propósito, se inmunizaron ratones BALB/c con 3 dosis, vía intraperitoneal (día 0, 10, y 20) de 100 µg de péptido GLMEEMSAL emulsificado con 50 µl de ACF (día 0) o AIF (Días 10 y 20) en proporción 1:1. Para analizar el efecto protector, 10 días después de la última inmunización se inocularon subcutáneamente en el dorso de los ratones 10^6 células tumorales JC, mientras que para evaluar el efecto terapéutico, las células tumorales JC fueron previamente inoculadas en el dorso de los ratones y 13 días después, cuando los tumores fueron palpables (0.5-0.7 cm de largo y ancho) se administró la primera inmunización y la segunda dosis se aplicó al día 19. El grupo control (PBS/vehículo control) fue inoculado únicamente con 10^6 células tumorales JC. Con el esquema empleado, se pudo apreciar diferencia significativa en el crecimiento tumoral (**P<0.01) con respecto al grupo control. En el grupo donde se evaluó el efecto protector, los tumores fueron de tamaño muy reducido comparado con los tumores encontrados en el grupo control (0.6 vs 2 cm³), al finalizar el experimento se encontró una disminución de hasta 30% en el crecimiento tumoral. Por otra parte, al analizar el efecto terapéutico de la inmunización con GLMEEMSAL se encontró que 6 días después de la primera inmunización el crecimiento tumoral fue significativamente menor comparado con el grupo control (*P<0.05) (0.5 vs 1.3 cm³) y al finalizar el experimento se observó reducción del crecimiento tumoral de hasta 50% (Figura 12). La inmunización con el péptido GLMEEMSAL, sin importar si era bajo un esquema protector o terapéutico mostró reducción de la tasa de crecimiento tumoral comparado con el grupo control. Los ratones que recibieron un esquema de inmunización protectora, requirieron 15 días más para alcanzar volúmenes tumorales de 2 cm³ y cuando se inmunizaron ratones con el esquema terapéutico, estos tardaron 10 días en desarrollar tumores de ese mismo volumen, lo cual se tradujo en un mayor tiempo de supervivencia de los ratones en esos grupos experimentales.

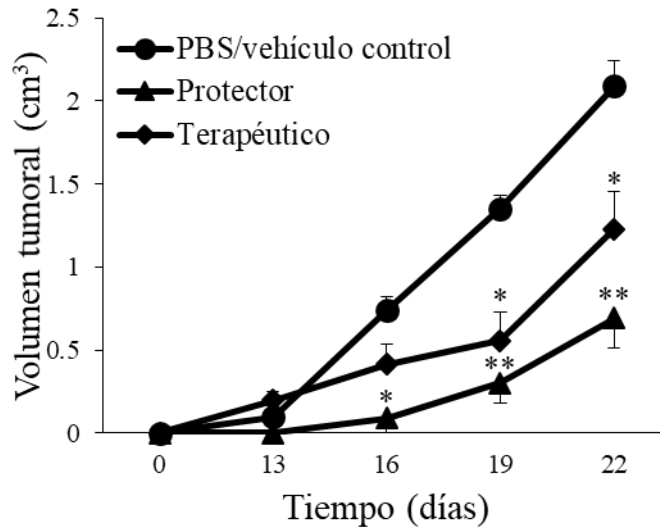


Figura 12. Efecto antitumoral de la inmunización con el péptido GLMEEMSAL en un modelo tumoral con ratones BALB/c. Ratones de la cepa BALB/c fueron inmunizados intraperitonealmente con 3 dosis (día 0, 10 y 20) de 100 µg de péptido GLMEEMSAL emulsificado con 50 µl de ACF (día 0) o AIF (días 10 y 20) en proporción 1:1. Para evaluar el efecto protector, 10 días después de la última inmunización se inocularon 10^6 células tumorales JC subcutáneamente en el dorso de los ratones. Para evaluar el efecto terapéutico, las células JC fueron inoculadas subcutáneamente en el dorso de los ratones y cuando los tumores fueron palpables (día 13) se aplicó la primera inmunización y al día 19 se administró la segunda dosis. El grupo control (PBS/vehículo control) fue inoculado con 10^6 células tumorales JC. Se muestra el promedio de crecimiento tumoral de los 5 ratones de cada grupo \pm SEM. El volumen tumoral en todos los casos fue determinado como se describió en la sección de materiales y métodos. * $P < 0.05$, ** $P < 0.001$, después de realizar una prueba de U de Mann Whitney comparado con el grupo control (PBS/vehículo control). Los datos son representativos de 2 experimentos independientes con resultados similares.

7.5 La inmunización con el péptido GLMEEMSAL incrementa la sobrevida de los ratones ante el reto tumoral.

En conjunto con la inhibición de crecimiento tumoral observada después de cualquiera de los dos esquemas de inmunización con el péptido GLMEEMSAL en ratones BAB/c, fue posible observar un mayor porcentaje de sobrevida que los grupos inmunizados con el esquema protector y terapéutico, encontrándose un 100% y 60% de sobrevida respectivamente, mientras que los animales no inmunizados con el péptido murieron antes del día 22 (Figura 13).

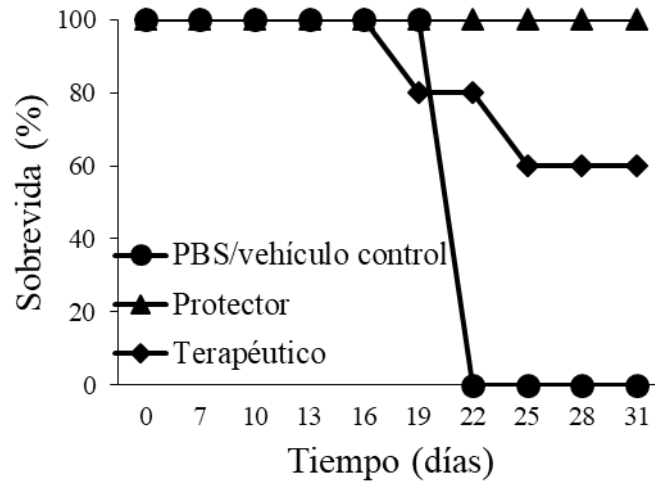


Figura 13. La inmunización con el péptido GLMEEMSAL incrementa la supervivencia ante el reto tumoral en ratones BALB/c. Para analizar el efecto protector de la inmunización con GLMEEMSAL, ratones BALB/c fueron inmunizados intraperitonealmente con 100 µg de péptido GLMEEMSAL al día 0, 10 y 20 para después ser inoculados subcutáneamente en el dorso con 10^6 células tumorales JC al día 30. Para el efecto terapéutico, 10^6 células JC fueron inoculadas en el dorso y cuando los tumores fueron palpables (día 13) se comenzó con las inmunizaciones con GLMEEMSAL a los días 13 y 19. El grupo control (PBS/vehículo control) fue inoculado con 10^6 células tumorales JC en el dorso. La supervivencia fue monitoreada diariamente a lo largo del experimento. Se muestran los porcentajes de supervivencia de los 5 ratones de cada grupo. Los datos son representativos de 2 experimentos independientes con resultados similares.

8. Discusión

Es bien conocida la participación de hMena en la motilidad y adhesión celular mediante la regulación de la dinámica de actina del citoesqueleto (Krause *et al.*, 2003). Además, se ha reportado que el incremento en la expresión de hMena durante la progresión de lesiones benignas a malignas (Gurzu *et al.* 2013; Gurzu *et al.*, 2009; Goswami *et al.*, 2009; Di Modugno *et al.*, 2010; Robinson *et al.*, 2009; Roussos *et al.*, 2010) junto con la expresión alternativa de las isoformas hMena/hMena^{11a} y hMena/hMena Δ V6 regulan la invasividad y potencial metastásico de las células tumorales (Di Modugno *et al.*, 2012). Por esta razón, hMena podría ser usada como marcador para diferenciar lesiones benignas de lesiones malignas con alto potencial metastásico (Bria *et al.*, 2014) y tener una repercusión importante en la predicción de progresión tumoral y en la búsqueda de terapias específicas que frenen el crecimiento tumoral. En este contexto, se desconoce la capacidad inmunogénica de hMena para inducir respuesta inmune antitumoral. Por ello, en el presente trabajo analizamos la capacidad del péptido GLMEEMSAL de hMena (secuencia 443-451), conservado entre las isoformas hMena/hMena^{11a} y hMena/hMena Δ 6, para generar LTC con capacidad efectora. Inicialmente se analizó la capacidad de GLMEEMSAL para ser procesado y presentado naturalmente por moléculas HLA-A2, uno de los alelos ampliamente distribuidos en la población mundial y Mexicana, lo cual se pudo corroborar al emplear el sistema de algoritmos PAPProC (Gritzapis *et al.*, 2008). De hecho, el péptido demostró tener gran afinidad por moléculas HLA-A*0201 de manera comparable a la afinidad mostrada por los péptidos KIFGSLAFL secuencia 369-377 de la proteína HER-2 y KLPQLCTEL de la proteína E6 de VPH-16 previamente reportados en la literatura (Kast *et al.*, 1994; Fisk *et al.*, 1995; Rensing *et al.*, 1995; Rongcun *et al.*, 1999; Dissis *et al.*, 2002; Baxevanis *et al.*, 2006). En nuestro estudio encontramos que CMSP estimuladas mediante un sistema de vacunación *in vitro* con CDMs fueron capaces de reconocer y lisar a células T2 cargadas con este péptido y líneas celulares tumorales de CaCu y de HLA-A2+ que sobre-expresan las isoformas hMena^{11a} o hMena Δ V6.

Nuestros resultados coinciden con lo reportado por el grupo de Nístico en 2004, quienes encontraron que hasta un 20% de pacientes con CaMa tienen respuesta de IgG específica a epítopes de hMena y respuesta mediada por células T CD8+ hacia esos mismos epítopes de

hMena en 75% (9/12) de las pacientes HLA-A2⁺, lo cual sugirió que la respuesta inmune contra esta proteína es posible. En nuestro estudio, demostramos que fue posible generar células T CD8⁺ efectoras al activar CMSP de donadores sanos con el péptido GLMEEMSAL. Además, evidenciamos que dicha función efectora fue específica al alelo HLA-A2, al ser bloqueada con anticuerpos anti HLA-A2, o prácticamente anulada al utilizar líneas celulares HLA-A2 negativas como células blanco. Estos resultados nos permiten sugerir, que este epítotope es un candidato adecuado para utilizarse como coadyuvante a las terapias antitumorales actuales, ya que podría ser eficaz para generar respuesta de linfocitos T citotóxicos en pacientes con CaMa (Di modugno *et al.*, 2006) o CaCu (Gurzu *et al.*, 2009), y podría beneficiar también a pacientes con tumores colorectales (Gurzu *et al.*, 2008), de glándulas salivales (Gurzu *et al.*, 2012) y pancreáticos (Pino *et al.*, 2008), en donde se ha reportado la sobre-expresión de hMena. Además, dado que el epítotope inmunogénico GLMEEMSAL de hMena (433-451) es conservado en las diferentes isoformas de hMena reportadas, hMena 591aa posición 443-451 (NP_001008493.1), hMena 570aa posición 443-451 (NP_060682.2) y hMena 533aa posición 406-414 (ABY78022.1) según la base de datos Protein (recuperado de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein>), su potencial de aplicación podría ampliarse a las neoplasias que sobre-expresaran alguna de éstas.

Es importante señalar que los linfocitos T citotóxicos específicos mostraron actividad efectora contra la línea celular C33A, la cual es una línea celular negativa para VPH. Este dato es relevante, si consideramos que las inmunoterapias antitumorales actuales para CaCu están basadas en la generación de una respuesta inmune hacia las proteínas tardías, E6 y E7 del VPH, lo cual es útil en pacientes positivas a infección con el VPH del mismo genotipo (Lee *et al.*, 2016).

De manera interesante en nuestro estudio se pudo detectar la activación de linfocitos T CD8⁺ y CD4⁺ al cultivar CMSP con CDMs de donadores normales, y también al inmunizar ratones BALB/c con el péptido GLMEEMSAL. Sin embargo, la activación de linfocitos T CD4⁺ puede ser debida al efecto de citocinas producto de la activación de linfocitos T CD8⁺, como el IFN- γ , lo cual tendrá que ser analizado en futuros experimentos.

Trabajos realizados por Phillipar y colaboradores y por el grupo de Nístico y colaboradores en 2004, reportaron una relación entre la expresión de hMena y el potencial metastásico, al

identificar diferentes isoformas de hMena, como hMena^{11a}, asociada con un alto índice proliferativo en etapas tempranas del desarrollo del CaMa; y la proteína hMena INV detectada en tumores invasivos (Phillipar *et al.*, 2008; Di modugno *et al.*, 2010). Pero no sólo se ha relacionado a hMena con un alto índice metastásico sino que también se ha observado una asociación entre la elevada expresión de hMena y el tamaño de los tumores (Toyoda *et al.*, 2011). Por lo que, generar una respuesta inmune contra esta proteína podría tener impacto en varios aspectos del desarrollo tumoral, principalmente al disminuir su potencial metastásico para prevenir la recurrencia en pacientes libres de la enfermedad o incrementar la sobrevida de los pacientes al evitar la metástasis, considerada la principal causa de muerte en los pacientes con cáncer.

No obstante, el principal problema para generar estrategias de vacunación efectivas dirigidas contra autoantígenos como hMena es romper la tolerancia inmune. Para descartar dicho fenómeno, se empleó un modelo tumoral *in vivo* utilizando ratones de la cepa BALB/c inmunizados con el péptido GLMEEMSAL. Resulta importante mencionar que de acuerdo con la base de datos del National Center for Biotechnology Information, USA, el péptido GLMEEMSAL se encuentra también conservado entre las isoformas murinas de Mena isoforma 1 (NP_034265.2, secuencia 667–685), isoforma 2 (NP_032706.2, secuencia 662–670), isoforma 3 (NP_001076589., secuencia 658–666) e isoforma 4 (NP_001076590.1, secuencia 414–422) y de acuerdo a nuestros resultados el péptido fue capaz de unirse a moléculas H2-Kd. Al inmunizar ratones BALB/c con el péptido GLMEEMSAL se encontró, que hay activación de LTCs que reconocieron y lisaron células tumorales JC (H2-Kd, Mena⁺). Además, en este trabajo se muestra por primera vez que el uso de un esquema protector o terapéutico de inmunización con el péptido GLMEEMSAL, provee respuesta inmune anti-tumoral capaz de inhibir el crecimiento tumoral y prolongar la sobrevida. A pesar de ello, será importante considerar un incremento en el número de inmunizaciones o la dosis de cada una de ellas en el esquema terapéutico para ver si la tasa de crecimiento tumoral disminuye, o también sería relevante la inclusión de otros epítopes conservados entre las isoformas de hMena/hMena^{11a} y hMena /hMena Δ V6.

Por tanto, el análisis de la inmunogenicidad del epítope de hMena (433-451) es de gran importancia puesto que abre la posibilidad de que una estrategia terapéutica basada en éste,

pueda reflejarse en una respuesta clínica en los pacientes, debido a la capacidad de este péptido para generar células T CD8+ específicas capaces de eliminar células tumorales que sobre-expresen hMena y sus isoformas; y además, podría incrementar la sobrevida de los pacientes.

9. Conclusiones

Considerando que se ha detectado respuesta inmune humoral y celular hacia epítopes de hMena en pacientes con CaMa y una vez que se ha demostrado en este trabajo que se puede inducir respuesta celular inmune tanto *in vitro* como *in vivo* hacia epítopes conservados de las isoformas hMena/hMena^{11a} y hMena /hMena $\Delta V6$ como el péptido GLMEEMSAL, el uso de epítopes de hMena puede ser una importante alternativa para ser considerada en el desarrollo de estrategias inmunoterapéuticas que ayuden a disminuir el crecimiento tumoral.

Perspectivas

- Ajustar el esquema de dosis o de intervalo de inmunizaciones para ver si mejora la actividad terapéutica
- Cuantificar la metástasis antes y después de la inmunización con el péptido.
- Integrar el péptido GLMEEMSAL en cVLPs para ver si se mejora la respuesta inmune hacia el epítope.
- Analizar la actividad inmunogénica de otros epítopes conservados de hMena en conjunto con el péptido GLMEEMSAL

10. Bibliografia

- Attia M.A, Weiss D.W. Immunology of spontaneous mammary carcinomas in mice V. Acquired tumor resistance and enhancement in strain a mice infected with mammary tumor virus. *Cancer research*. 26: 1787–1800, 1966.
- Barzik M, Kotova T. I, Higgs H. N, Hazelwood L, Hanein D, Gertler F. B, Schafer D. A.. Ena/VASP proteins enhance actin polymerization in the presence of barbed end capping proteins. *Journal biological chemical* 280: 28653-28662, 2005.
- Baxevanis C.N, Sotiriadou N.N, Gritzapis A.D, Sotiropoulou P.A, Perez S.A, Cacoullos N.T, Papamichail M: Immunogenic HER-2/neu peptides as tumor vaccines. *Cancer immunology immunotherapy* 55: 85-95, 2006.
- Bear J.E, Loureiro J.J, Libova I, Fässler R, Wehland J, and Gertler F.B. Negative Regulation of Fibroblast Motility by Ena/VASP Proteins. *Cell*. 101: 717–728, 2000
- Bear J.E, Svitkina T.M, Krause M, Schafer D.A, Loureiro JJ, Strasser GA, Maly IV, Chaga O.Y, Cooper J.A, Borisy G.G, *et al*: Antagonism between Ena/VASP proteins and actin filament capping regulates fibroblast motility. *Cell* 109:509-521, 2002.
- Betts M.R, Brenchley J.M, Price D.A, De Rosa S.C, Douek D.C, Roederer M, Koup R.A: Sensitive and viable identification of antigen-specific CD8+ T cells by a flow cytometric assay for degranulation. *Journal of immunology methods*. 281: 65-78, 2003.
- Bria E, Di Modugno F, Sperduti I, Iapicca P, Visca P, Alessandrini G, Antoniani B, Pilotto S, Ludovini V, Vannucci J, *et al*: Prognostic impact of alternative splicing-derived hMENA isoforms in resected, node-negative, non-small-cell lung cancer. *Oncotarget* 5:11054-11063, 2014.
- Bria E, Di Modugno F, Sperduti I, Iapicca P, Visca P, Alessandrini G, Antoniani B, Pilotto S, Ludovini V, *et al*. Prognostic impact of alternative splicing-derived hMENA isoforms in resected, node-negative, non-small-cell lung cancer. *Oncotarget*. 5: 11054-11063, 2014.
- Chao T and Chu T.M. Characterization of a new spontaneously developed murine mammary adenocarcinoma in syngeneic BALB/c hosts. *In vitro cellular and developmental biology*. 25: 621-626, 1989.

- Chereau D, Dominguez R. Understanding the role of the G-actin-binding domain of Ena/VASP in actin assembly. *Journal of structural biology*. 155: 195–201, 2006.
- Coppolino M.G, Krause M, Hagendorff P, Monner D.A, Trimble W, Grinstein S, Wehland J and Sech A.S. Evidence for a molecular complex consisting of Fyb/SLAP, SLP-76, Nck, VASP and WASP that links the actin cytoskeleton to Fcγ receptor signalling during phagocytosis. *Journal of cell science*. 114: 4307-4318, 2001.
- Di Modugno F, Bronzi G, Scanlan M.J, Del Bello D, Cascioli S, Ventura I, Botti C, Nicotra M.R, Mottolese M, *et al.* Human Mena protein, a serex-defined antigen overexpressed in breast cancer eliciting both humoral and CD8+ T-cell immune response, *International journal of cancer*, 109 (2004) 909-918.
- Di Modugno F, DeMonte L, Balsamo M, Bronzi G, Nicotra MR, Alessio M, Jager E, Condeelis JS, Santoni A, Natali PG, *et al.*: Molecular cloning of hMena (ENAH) and its splice variant hMena+11a: epidermal growth factor increases their expression and stimulates hMena+11a phosphorylation in breast cancer cell lines. *Cancer research* 67: 2657-2665, 2007.
- Di Modugno F, DeMonte L, Balsamo M, Bronzi G, Nicotra M.R, Alessio M, Jager E, Condeelis J.S, Santoni A, *et al.* Molecular cloning of hMena (ENAH) and its splice variant hMena+11a: epidermal growth factor increases their expression and stimulates hMena+11a phosphorylation in breast cancer cell lines. *Cancer research*. 67: 2657-2665, 2007.
- Di Modugno F, Iapicca P, Boudreau A, Mottolese M, Terrenato I, Perracchio L, Carstens RP, Santoni A, Bissell MJ, and Nisticò P: Splicing program of human MENA produces a previously undescribed isoform associated with invasive, mesenchymal-like breast tumors. *PNAS*. 47: 19280–19285, 2012.
- Di Modugno F, Mottolese M, DeMonte L, Trono P, Balsamo M, Conidi A, Melucci E, Terrenato I, Belleudi F, Torrisi MR, *et al.*: The cooperation between hMena overexpression and HER-2 signalling in breast cancer. *PLoS One* 5:e15852, 2010.
- Disis M.L, Gooley T.A, Rinn K, Davis D, Piepkorn M, Cheever M.A, Knutson K.L and Schiffman K: Generation of T-cell immunity to the HER-2/neu protein after

active immunization with HER-2/neu peptide-based vaccines. *Journal of clinical oncology*. 20:2624-2632, 2002.

- Ferron F, Rebowski G, Lee SH and Dominguez R. Structural basis for the recruitment of profilin–actin complexes during filament elongation by Ena/VAS. *EMBO journal*. 26: 4597–4606, 2007.
- Fisk B, Blevins T.L, Wharton J.T, and Ioannides C.G: Identification of an Immunodominant Peptide of HER-2/neu Protooncogene Recognized by Ovarian Tumor-specific Cytotoxic T Lymphocyte Lines. *Journal of Experimental Medicine*. 181: 2109-2117, 1995.
- Gertler F and Condeelis J. Metastasis: tumor cells becoming MENAcing. *Trends cell biology*. 21: 81–90, 2011.
- Gertler F.B, Niebuhr K, Reinhard M, Wehland J and Soriano P: Mena, a relative of VASP and Drosophila Enabled, is implicated in the control of microfilament dynamics. *Cell* 87:227-39, 1996.
- Goswami S, Philippar U, Sun D, Patsialou A, Avraham J, Wang W, Di Modugno F, Nistico P, Gertler F.B and Condeelis J.S: Identification of invasion specific splice variants of the cytoskeletal protein Mena present in mammary tumor cells during invasion *in vivo*. *Clinical experimental metastasis* 26:153-159, 2009.
- Gritzapis A.D, Voutsas I.F, Lekka E, Tsavaris N, Missitzis I, Sotiropoulou P, Perez S, Papamichail M, Baxevanis C.N. Identification of a novel immunogenic HLA-A*0201-binding epitope of HER-2/neu with potent antitumor properties. *Journal of immunology* 181:146-154, 2008.
- Gurzu S, Ciortea D, Ember I and Jung I: The possible role of Mena protein and its splicing-derived variants in embryogenesis, carcinogenesis, and tumor invasion: a systematic review of the literature. *Biomedical research international* 2013: 1-6, 2013.
- Gurzu S, Jung I, Prantner I, Chira L and Ember I: The immunohistochemical aspects of protein Mena in cervical lesions. *Morphol and Embryol* 50: 213–216, 2009.
- Gurzu S, Jung I, Prantner I, Ember I, Pávai Z and Mezei T: The expression of cytoskeleton regulatory protein Mena in colorectal lesions. *Journal of morphology and embryology* 49:345-349, 2008.

- Gurzu S, Krause M, Ember I, Azamfirei L, Gobel G, Feher K and Jung I: Mena, a new available marker in tumors of salivary glands?. *European journal of histochemistry* 56:39-44, 2012.
- Hosken A.N and Bevan M.J: Defective presentation of endogenous antigen by a cell line expressing class-I molecules. *Science* 248: 367-370, 1990.
- Jemal A, Bray F, Ferlay J, Ward E, Forman D. Global Cancer Statistics. *CA Cancer journal clinical*. 61:69–90, 2011.
- Kast W.M, Brandt R.M, Sidney J, Drijfhout J.W, Kubo R.T, Grey H.M, Melief C.J and Sette A: Role of HLA-A motifs in identification of potential LTC epitopes in human papillomavirus type 16 E6 and E7 proteins. *Journal of immunology* 152: 3904-3912, 1994.
- Knaul F, Nigenda G, Lozano R, Arreola-Ornelas H, Langer A, Frenk J. Breast cancer in Mexico: a pressing priority. *Reproductive Health Matters*. 16: 113–123, 2008.
- Krause M, Dent E.W, Bear J.E, Loureiro J.J and Gertler F.B: Ena/VASP proteins: regulators of the actin cytoskeleton and cell migration. *Annual review of cell and developmental biology* 19: 541–564, 2003.
- Lambrechts A, Kwiatkowski A.V, Lanier L.M, Bear J.E, Vandekerckhove J, Ampe C and Gertler F.B. cAMP-dependent Protein Kinase Phosphorylation of EVL, a Mena/VASP Relative, Regulates Its Interaction with Actin and SH3 Domains. *Biological chemistry*. 275: 36143-36151, 2000.
- Lanier L.M, Gates M.A, Witke W, Menzies A.S, Wehman A.M, Macklis J.D, Kwiatkowski D, Soriano P and Gertler F.B: Mena Is Required for Neurulation and Commissure Formation. *Neuron* 22: 313–325, 1999.
- Lee S.J, Yang A, Wu T.C and Hung C.F: Immunotherapy for human papillomavirus-associated disease and cervical cancer: review of clinical and translational research. *Journal of gynecol oncology* 27: 1-17, 2016.
- Lollini P and Forni G. Cancer immunoprevention: tracking down persistent tumor antigens. *Trends in immunology*. 24: 62-66, 2003.
- Maffuz-Aziz A, Labastida-Almendaro S, Espejo-Fonseca A y Rodríguez-Cuevas S. Características clinicopatológicas del cáncer de mama en una población de mujeres en México. *Cirugia y cirujanos*. 253: 1-7, 2016.

- Melchionna R, Iapicca P, Di Modugno F, Trono P, Sperduti I, Fassan M, Cataldo I, Rusev B.C, Lawlor R.T, *et al.* The pattern of hMENA isoforms is regulated by TGF- β 1 in pancreatic cancer and may predict patient outcome. *Oncoimmunology*. 5: e1221556, 2016.
- Mohme M, Riethdorf S and Pantel K. Circulating and disseminated tumour cells — mechanisms of immune surveillance and escape. *Clinical oncology*. 14: 155-167, 2016.
- Mora-García M de L, Duenas-González A, Hernández-Montes J, De la Cruz-Hernández E, Pérez-Cárdenas E, Weiss-Steider B, Santiago-Osorio E, Ortiz-Navarrete VF, Rosales VH, Cantú D, *et al*: Up-regulation of HLA class-I antigen expression and antigen-specific LTC response in cervical cancer cells by the demethylating agent hydralazine and the histone deacetylase inhibitor valproic acid. *Journal of translational medicine* 4: 1- 14, 2006.
- Nishikawa H, Tanida K, Ikeda H, Sakakura M, Miyahara Y, Aota T, Mukai K, Watanabe M, Kuribayashi K, Old L.J, and Shiku H. Role of SEREX-defined immunogenic wild-type cellular molecules in the development of tumor-specific immunity. *PNAS*. 98: 14571–14576, 2001
- Oudin M.J, Hughes S.K, Rohani N, Moufarre M.N, Jones J. G, Condeelis J.S, Lauffenburger D.A, Gertler F.B. Characterization of the expression of the prometastatic MenaINV isoform during breast tumor progression. *Clinical experimental metastasis*. 33: 249–261, 2016.
- Parker K.C, Bednarek M.A and Coligan J.E: Scheme for ranking potential HLA-A2 binding peptides based on independent binding of individual peptide side-chains. *Journal of immunology* 152:163–175, 1994.
- Philippar U, Roussos E.T, Oser M, Yamaguchi H, Kim H.D, Giampieri S, Wang Y, Goswami S, Wyckoff J.B, Lauffenburger D.A, *et al*: A Mena Invasion Isoform Potentiates EGF-Induced Carcinoma Cell Invasion and Metastasis. *Developmental cell* 15: 813–828, 2008.
- Pino M.S, Balsamo M, Di Modugno F, Mottolese M, Alessio M, Melucci E, Milella M, McConkey D.J, Philippar U, Gertler F.B, *et al*: Human Mena+11a isoform serves as a marker of epithelial phenotype and sensitivity to epidermal growth factor

receptor inhibition in human pancreatic cancer cell lines. *Clinical cancer research* 14:4943-4950, 2008.

- Rammensee H, Bachmann J, Emmerich N.P, Bachor O.A and Stevanović S: SYFPEITHI: database for MHC ligands and peptide motifs. *Immunogenetics* 50: 213–219, 1999.
- Rensing M.E, Sette A, Brandt R.M, Ruppert J, Wentworth P.A, Hartman M, Oseroff C, Grey H.M, Melief C.J and Kast W.M: Human LTC epitopes encoded by human papillomavirus type 16 E6 and E7 identified through *in vivo* and *in vitro* immunogenicity studies of HLA-A* A0201-binding peptides. *Journal of immunology* 154: 5934-5943, 1995.
- Robinson BD, Sica G.L, Liu Y.F, Rohan T.E, Gertler F.B, Condeelis J.S and Jones J.G: Tumor microenvironment of metastasis in human breast carcinoma: a potential prognostic marker linked to hematogenous dissemination. *Clinical cancer research* 15:2433-2441, 2009.
- Rongcun Y, Salazar-Onfray F, Charo J, Malmberg K.J, Evrin K, Maes H, Kono K, Hising C, Petersson M, Larsson O, *et al*: Identification of New HER2/neu-Derived Peptide Epitopes That Can Elicit Specific LTC Against Autologous and Allogeneic Carcinomas and Melanomas. *Journal of immunology* 163:1037-1044, 1999.
- Roussos E.T, Goswami S, Balsamo M, Wang Y, Stobezki R, Adler E, Robinson B.D, Jones J.G, Gertler F.B, Condeelis JS, *et al*: Mena invasive (MenaINV) and Mena11a isoforms play distinct roles in breast cancer cell cohesion and association with TMEM. *Clinical experimental metastasis* 28:515–527, 2011.
- Roussos E.T, Wang Y, Wyckoff J.B, Sellers R.S, Wang W, Li J, Pollard J.W, Gertler F.B and Condeelis J.S: Mena deficiency delays tumor progression and decreases metastasis in polyoma middle-T transgenic mouse mammary tumors. *Breast cancer research* 12: 1-16, 2010.
- Sahin U, Tureci O, Schmitz H, Cochlovius B, Johannes T, Schmits R, Stenner F, Luo G, Schobert I, and Pfreundschuh M. Human neoplasms elicit multiple specific immune responses in the autologous host. *PNAS USA*. 92: 11810-11813, 1995.
- Sánchez A.P. *Fundamentos de oncología*. Ed. Autor editor, 2014.

- Senra A. El cáncer epidemiología, etiología, diagnóstico y prevención Ed. Harcourt, Elsevier. pp.179, 2002.
- Tani K, Sato S, Sukezane T, Kojima H, Hirose H, Hanafusa H and Shishido T. Abl Interactor 1 Promotes Tyrosine 296 Phosphorylation of Mammalian Enabled (Mena) by c-Abl Kinase. *Journal of biological chemistry*. 278: 21685–21692, 2003
- Toyoda A, Kawana H, Azuhata K, Yu J, Omata A, Kishi H, Higashi M and Harigaya K. Aberrant expression of human ortholog of mammalian enabled (hMena) in human colorectal carcinomas: Implications for its role in tumor progression. *International journal of oncology*.34: 53-60, 2009.
- Toyoda A, Yokota A, Saito T, Kawana H, Higashi M, Suzuki Y, Tanaka T, Kitagawa M and Harigaya K: Overexpression of human ortholog of mammalian enabled (hMena) is associated with the expression of mutant p53 protein in human breast cancers. *International journal of oncology* 38: 89-96, 2011.
- Urbanelli L, Massini C, Emiliani C, Orlacchio A, Bernardi G. Characterization of human Enah gene. *Biochemical Biophysical. Acta*. 1759: 99-107, 2006.
- Wang R and Rosenberg S. Human tumor antigens for cancer vaccine development. *Immunological reviews*. 170: 80-100, 1999.
- Wang W, Goswami S, Lapidus K, Wells A.L, Wyckoff J.B, Sahai E, Singer R.H, Segall J.E, and Condeelis J.S. Identification and Testing of a Gene Expression Signature of Invasive Carcinoma Cells within Primary Mammary Tumors. *Cancer research*. 64: 8585–8594, 2004.
- Zimmermann J, Labudde D, Jarchau T, Walter U, Oschkinat H, and Bal L.J. Relaxation, Equilibrium Oligomerization, and Molecular Symmetry of the VASP (336-380) EVH2 Tetramer. *Biochemistry*. 41: 11143-11151, 2002.

11. Anexo

Artículo publicado



Contents lists available at ScienceDirect

International Immunopharmacology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/intimp

GLMEEMSAL epitope common in different isoforms of hMena elicits *in vitro* activation of cytotoxic T cells and stimulates specific antitumor immunity in BALB/c mice



Christian Azucena Don-López^{a,b}, Alberto Monroy-García^{a,c}, Benny Weiss-Steider^a,
Leticia Rocha-Zavaleta^d, Jorge Hernández-Montes^a, Rosario García-Rocha^a,
María de Lourdes Mora-García^{a,*}

^a Immunobiology Laboratory, Cellular Differentiation and Cancer Unit, FES-Zaragoza, UNAM, Mexico City, Mexico

^b Postgraduate Program in Biological Sciences, UNAM, Mexico City, Mexico

^c Immunology and Cancer Laboratory, Oncology Research Unit, Oncology Hospital, National Medical Center, IMSS, Mexico City, Mexico

^d Department of Molecular Biology and Biotechnology, Institute of Biomedicine, UNAM, Mexico City, Mexico

ARTICLE INFO

Keywords:
Breast cancer
Cervical cancer
hMena isoforms
Metastasis
T cell epitopes
Antitumor immunity

ABSTRACT

Background: Alternative expression of human ortholog of murine Mena (hMena) hMena/hMena^{11a} and hMena/hMenaΔv6 isoforms regulate the invasiveness and metastatic potential of tumor cells. It is then important to identify epitopes of these proteins that can elicit antitumor immune response to contribute to the elimination of cells with metastatic potential.

Methods: We assayed the capacity of the peptide GLMEEMSAL, common in hMena/hMena^{11a} and hMena/hMenaΔv6 isoforms, to generate an antitumor immune response through an *in vitro* vaccination system with mature dendritic cells (MDC) loaded with this peptide and *in vivo* immunization using a tumor model with the mammary adenocarcinoma JC cell line to induce tumors in BALB/c mice.

Results: MDC loaded with the peptide GLMEEMSAL elicited strong proliferation and activation of CD8⁺ T lymphocytes. The CTLs generated with this system were capable to lyse specifically BrCa and CeCa cell lines expressing either hMena/hMena^{11a} or hMena/hMenaΔv6. Immunization with GLMEEMSAL provided protective and therapeutic antitumor activity as well as increased survival in BALB/c mice.

Conclusion: These results are highly relevant for the use of common peptides among the different isoforms of hMena to develop immunotherapy protocols to counteract the growth and metastatic potential of tumors with over-expression of hMena.

1. Introduction

Metastasis is the primary cause of death in patients with cancer due to the ability of tumor cells to evade immune recognition and migrate to sites distal to the primary tumor and propagate the disease [1,2]. It has been proposed that the over-expression of proteins regulating cytoskeletal dynamics plays an important role in the invasive capacity of tumor cells and escape immune recognition [3,4]. As a consequence it is important to identify whether epitopes derived from these proteins are capable of inducing a specific cellular immune response that contributes to the elimination of cells with metastatic potential.

The main function of the hMena protein is the regulation of cytoplasmic actin assembly and dynamics and also plays an important role in the migration and invasive capacity of tumor cells [5]. hMena is significantly over-expressed in a high percentage of benign breast lesions with a high risk of malignant transformation as well as in > 70% of primary breast cancers [4,6]. hMena has also been observed to be over-expressed in colorectal cancer [7], metastatic pancreatic carcinoma [8], malignant lesions of the salivary glands [9] and both pre-malignant and malignant lesions of the cervix [10].

hMena belongs to the Ena/VASP (enabled/VASP) family which consists of the vertebrate proteins hMena, EVL, and VASP as well as

Abbreviations: hMena, human ortholog of murine Mena; HPV, Human Papillomavirus; MHC, Major Histocompatibility Complex; PBMC, Peripheral Blood Mononuclear Cells; Poly I:C, Polyinosinic:Polycytidylic acid; IL-4, Interleukin-4; GM-CSF, Granulocyte Macrophage-Colony Stimulating Factor; IFN γ , Interferon gamma; DCs, Dendritic Cells; MDCs, Mature Dendritic Cells; HLA, Human Leukocyte Antigen; APC, Antigen Presenting Cell; MFI, Mean Fluorescent Intensity; CeCa, Cervical Cancer; BrCa, Breast Cancer

* Corresponding author at: Oriente 170 No. 160 Colonia Moctezuma 2a Sección, Delegación Venustiano Carranza, C.P., 15530 México City, México.

E-mail address: mog@unam.mx (M.d.L. Mora-García).

<https://doi.org/10.1016/j.intimp.2018.01.043>

Received 1 January 2018; Received in revised form 26 January 2018; Accepted 28 January 2018
1567-5769/ © 2018 Published by Elsevier B.V.

Drosophila Ena and is coded by the *mena* gene located on chromosome 1 [4]. Structurally is composed of highly conserved NH₂- and COOH-terminal domains called Ena-VASP homology 1 and 2 (EVH 1 and EVH 2) they flank a central proline rich domain. The EVH 1 domain mediates subcellular targeting by binding to the D/EFPPPP motif, which is found in the focal adhesion proteins Zyxin and Vinculin. The EVH 2 domain contains a predicted coiled coil-like sequence and is thought to mediate oligomerization. The central proline-rich domain mediates direct interactions with the actin-binding protein Profilin thereby regulating the polymerization of cytoskeletal actin [11,13]. In this manner hMena plays an important role in controlling the movement and morphology of fibroblasts, epithelial cells, endothelial cells and neurons [11,12]. A relationship between hMena and metastatic potential has been corroborated based on its accumulation in focal adhesions and regions of dynamic actin remodeling in the lamellipodium forming part of the migration front of cells [1,12–14].

Recently it has been reported that different isoforms of hMena generated by alternative splicing play an important role in the proliferation and metastatic capacity of tumor cells [15]. The presence of the hMena/hMena^{11a} isoform has been associated with the proliferative properties of cells transformed in the early stages of cancer development [16], meanwhile the isoform hMena/MenaΔv6 is strongly associated with the invasive capacity of malignant cells [1,5,6].

On the other hand the role of hMena as an antigen capable of inducing an immune cell response was initially reported by the Nistico group [4]. They analyzed T-lymphocyte stimulation with three epitopes derived from the hMena protein restricted to allele HLA-A2 (TMNGSKSPV (502–510), GLMEEMSAL (443–451) and ILDEMRKEL (562–570)) and found that 9 of 12 patients with breast cancer (BrCa) showed a positive response by producing IFN-γ. They also established a line of CTLs specific to the epitope TMNGSKSPV (502–510) of the complete hMena protein; these cells were able to recognize and lyse BrCa and melanoma HLA-A2⁺/hMena⁺ tumor cells. These results suggest that hMena derived peptides may be naturally processed and presented by the HLA-A2+ allele in tumors other than breast cancer. However, it is not known if hMena derived epitopes are capable to elicit *in vivo* antitumor immune response. In this study we provide evidence that *in vitro* stimulation of CD8⁺ T cells with the antigenic peptide GLMEEMSAL (443–451), common in the hMena/hMena^{11a} and hMena/MenaΔv6 isoforms, is capable to generate CTLs with lytic activity against human BrCa and cervical cancer (CeCa) cell lines. We also show for the first time that immunization with the GLMEEMSAL peptide elicited a strong antitumor immune response in Balb/c mice bearing tumors induced by the inoculation of the primary mammary adenocarcinoma JC cell line (hMena⁺). These results may contribute to establish a new strategy for the use of hMena derived epitopes for protocols of immunotherapy against cancer.

2. Materials and methods

2.1. Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) and HLA typing

Peripheral blood samples were collected from healthy donors ($n = 8$). All donors signed an informed consent format approved by the local IMSS Committee on Health Research; protocol 3026–24. The blood samples were collected in vacutainer tubes with anticoagulant ACD (Becton Dickinson, Broken Bow, NE, USA). PBMCs were obtained through centrifugation using a density gradient with Ficoll (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) followed by re-suspension in PBS supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS; Gibco, Carlsbad, CA, USA). Samples positive for HLA-A2 were identified with flow cytometry using the monoclonal antibody PA2.1 obtained from the American Type Culture Collection (ATCC, USA) which recognizes the HLA-A2 molecule, and an anti-mouse IgG (Fab specific)-FITC secondary antibody (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) on a FACS ARIA II (BD Biosciences, San Jose, CA, USA).

2.2. Cell lines

CaSki (HPV-16⁺, HLA-A2⁺, hMena/hMena^{11a}-positive) and C33A (HPV⁻, HLA-A2⁺, hMena/hMenaΔv6-positive) CeCa cells, MCF-7 (HLA-A2⁺, hMena/hMena^{11a}-positive) and MDA-MB-231 (HLA-A2⁺, hMena/hMenaΔv6-positive) BrCa cells were used. Positive expression of hMena isoforms in these cell lines was previously reported [6,17]. On the other hand, the primary mammary adenocarcinoma JC cell line (H2-Kd), derived from along the milk line of BALB/c mice [18], was used to establish the murine tumor model. Mena protein expression in human derived cell lines (CaSki, C33A, MCF-7 and MDA-MB-231) (Suppl. Fig. 1) and in JC cell line (Suppl. Fig. 2) was determined by flow cytometry and/or immunocytochemical staining according to protocols previously reported by our working group [19] using Anti-Mena mAb clone A351F7D9 (Millipore, Temecula, CA, USA). All cell lines were maintained in culture medium (CM) composed by RPMI-1640 media (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) supplemented with 10% FBS (Gibco, Carlsbad, CA, USA) and 100 units/ml of penicillin and 100 μg/ml of streptomycin (Gibco, Carlsbad, CA, USA) at 37 °C and 5% CO₂.

2.3. Test to stabilize human and mouse MHC class I molecules

The lymphoblast cell line T2 which expresses empty HLA-A2 molecules on the cell surface [20] was used to test the affinity of different concentration (25 to 200 μg/ml) of each synthetic peptide after an incubation of two hours at 37 °C in the presence of 5 μg/ml β2-microglobulin (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). The following antigenic peptides (synthesized by Invitrogen Carlsbad, CA, USA) were used in this study: GLMEEMSAL (sequence 443–451) derived from the protein hMena, KIFGSLAFL (sequence 369–377) derived from the protein HER2 and KLPQLCTEL (sequence 18–26) derived from the protein E6 (HPV-16) which have been tested for specific binding with the HLA-A2 allele [4,21,22]. The peptide TPTLHEYML (sequence 5–13) derived from the protein E7 (HPV-16) was used as a negative control due to its low affinity for the HLA-A2 allele [22]. On the other hand, to test the affinity of the peptides to H2-Kd molecules, we used the mastocytoma derived P815 cell line previously treated by acid elution and then incubated with different concentrations (25 to 200 μg/ml) of the peptides. The stabilization of HLA-A2 and H2-Kd molecules with each peptide was determined by flow cytometry using either anti-HLA-A2 mAb derived from the hybridoma PA 2.1 (ATCC, USA) or anti-H2-Kd mAb derived from the hybridoma SF1–1.1.10 (ATCC, USA) respectively. Anti-mouse IgG (Fab specific)-FITC was used as secondary antibody.

2.4. Determination of IFN-γ levels in activated T cells

A total of 2.5×10^5 PBMCs were co-cultured with Mature Dendritic Cells (MDCs) loaded with 10 μg/ml of GLMEEMSAL peptide, which were generated according to our previously described protocol [23] at ratio of 1:5; as well as for the *in vivo* model, where splenic cells from mice immunized with 3 doses of 100 μg/ml of GLMEEMSAL were cultured with 10 μg/ml of GLMEEMSAL for 72 h in a 24-well plate (Corning, Pittston, PA, USA) containing 1 ml of Opti-MEM culture medium with 10% dialyzed FBS. During the final 12 h of culture, Brefeldin-A (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) and Monensin A (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) were added at final concentration of 10 μg/ml and 50 μg/ml respectively to determine the intracellular level of IFN-γ. At the end of the 72 h the cells were collected and incubated for 30 min at 4 °C with monoclonal anti-hCD8-APC or anti-hCD4-PE antibodies (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) and then washed three times with PBS. Subsequently the cells were fixed and permeated using a Cytotfix/Cytoperm kit (BD Biosciences, San Diego, CA, USA) incubated for 30 min at 4 °C with monoclonal anti-hIFN-γ-FITC antibody (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) and finally washed three times with PBS. A total of 2.5×10^4 events were acquired using Flowing 2.5 software to analyze the percentage of CD8⁺/IFN-γ⁺ and

CD4⁺/IFN- γ ⁺ T cells.

2.5. Cytotoxic tests

Cytotoxic activity of CD8⁺ T-lymphocytes stimulated with the antigenic peptides was determined either by membrane expression of the CD107 molecule on effector cells caused by degranulation [24] and/or by using a cell viability solution (7AAD; BD Biosciences, San Diego, CA, USA) to determine target cell lysis percentage. In the first case target cells (T2, CaSki, C33A, MDA-MB-231 and MCF 7) were co-cultured during 4 h at a 1:5 ratio with PBMCs that had undergone three previous rounds of stimulation with MDCs loaded with peptide in 50 μ l of CM containing 2 μ l of monoclonal anti-hLAMP-1/CD107a-FITC antibody (R & D Systems, Minneapolis, MN, USA). One hour later Brefeldin-A and Monensin A (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) were added at final concentration of 10 μ g/ml and 50 μ g/ml, respectively. At the end of 4 h of co-culture CD8⁺ T lymphocytes were marked with monoclonal anti-hCD8-APC antibody (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) and the percentage of degranulated CD8⁺ T lymphocytes (CD8⁺/CD107⁺) was determined by flow cytometry. After discarding cellular fragments a total of 2.5 \times 10⁴ events were analyzed in each test. In the second one target cells (CaSki, MDA-MB-231 and JC) were labeled with 5(6)-carboxyfluorescein diacetate N-succinimidyl ester (CFSE) (Sigma-Aldrich), and CTLs were labeled with CD8-APC antibody (BD Bioscience). The cytotoxic activity of effector cells on target cells was determined in the proportions 1:20, 1:10 and 1:5 (Target:Effector) using the cell viability solution 7AAD. Viable cells were analyzed in a FACS ARIA II (BD Biosciences, San Jose, CA, USA) by collecting a minimum of 100,000 events by determining the percentage of positive target cells for CFSE/7AAD. A total of 5% hydrogen peroxide was used to determine the total lysis of target cells (positive control). The percentage of lysis was calculated according to the following formula: % cytotoxicity = 100 \times [(experimental lysis (CFSE+, 7AAD+) – basal lysis (CFSE+, 7AAD+)]/(total lysis (CFSE+, 7AAD+) – basal lysis (CFSE+, 7AAD+)).

To inhibit the specific recognition of CD8⁺ T lymphocytes through HLA-A2 molecules on CaSki and MDA-MB-231 tumor cells 10 μ g/ml of anti-HLA-A2 mAb (derived from hybridoma PA2.1, ATCC) was added and the percentage of lysis of target cells determined.

2.6. Mice

Female BALB/c mice (H-2^d haplotype, 6–8 weeks old) were used and kept under pathogen-free conditions at the FES-Zaragoza UNAM Animal Care Department with *ad libitum* sterile standard powdered rodent diet. All procedures involving animals and their care were conducted in conformity with institutional guidelines, which are in compliance with national and international laws and guidelines.

2.7. Anti-tumor protection model

Groups of five mice were immunized with three intraperitoneal injections every 10–12 days (i.e., day 0, 10 and 20), each one consisting of 100 μ g/ml of peptides (GLMEEMSAL or TPTLHEYML) emulsified in proportion 1:1 with 50 μ l of Complete Freund's Adjuvant (CFA) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) at day 0 or Incomplete Freund's Adjuvant (IFA) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) at days 10 and 20. The control group received injections with the same volume of PBS with corresponding adjuvant. To analyze the induction of specific CTLs, 10 days following the last immunization (i.e. day 30) the mice were sacrificed and the splenic cells were cultivated in RPMI with or without 10 μ g of the peptides. Two days after *ex vivo* stimulation the splenic cells (effector cells) in 25 μ l of CM were placed in 96-well-U-bottom plates (Corning, Pittston, PA, USA) at the proportion 20:1, 10:1 and 5:1 (Effector:Target) and 6 \times 10⁴ JC tumor cells (target cell) were added to co-culture in 25 μ l of CM where the cytotoxic effect was determined as indicated previously. To analyze whether peptide immunization

protects against tumor challenge, on day 30, 1 \times 10⁶ viable JC cells in PBS were injected subcutaneously in to the backs of these pre-immunized mice.

2.8. Therapeutic model

For tumor reduction analysis JC cells were injected subcutaneously in to the backs of five mice at day 0 and 13. When the tumors size were approximately 0.5 cm in length and width they were injected intraperitoneally with 100 μ g/ml of the GLMEEMSAL peptide emulsified in proportion 1:1 with 50 μ l of CFA at day 13 or IFA at day 19. For these experiments measurements were taken when the first palpable tumors appeared. Tumor size was determined every 3 days using calipers and the tumor volume was calculated using the formula $V = (0.4)(ab^2)$, where (a) and (b) are the length and the width of the tumor, respectively [25]. Mice were observed for survival during the 31 days time course.

2.9. Statistical analysis

Results are expressed as the mean \pm standard error (SEM) of experiments performed in triplicate unless indicated otherwise. The non-parametrical Man-Whitney *U* test was used to compare the mean of groups. The difference was considered statistically significant at $P < 0.05$.

3. Results

3.1. The GLMEEMSAL peptide common in the hMena/hMena^{11a} and hMena/hMena Δ v6 isoforms induces strong stimulation of CD8⁺ T lymphocytes

To evaluate the response of CD8⁺ T cells to the hMena antigens, the GLMEEMSAL peptide derived from sequence 443–451 of the hMena^{11a} isoform or sequence 406–414 of the hMena Δ v6 isoform were synthesized. It is important to mention that when analyzing the sequence of both hMena isoforms this peptide showed the highest predicted affinity to the HLA-A2 molecule based on the SYFPEITHI [26] and BIMAS algorithms [27]. In addition we used the peptide KIFGSLAFL (sequence 369–377) from HER2 and KLPQLCTEL (sequence 18–26) derived from the protein E6 (HPV-16) as a positive control which has been reported to show a high affinity for the HLA-A2 molecule and be highly immunogenic [21,22,28–31]. The peptide TPTLHEYML (sequence 5–13) of the E7 protein of HPV-16 was used as a negative control due to its low affinity for the HLA-A2 molecule [22]. The T2 cell line, that expresses empty HLA-A2 molecules on its cell surface [20], was used to analyze the binding affinities of the peptides in the stabilization trials of these molecules.

The peptide GLMEEMSAL showed the highest affinity to HLA-A2 molecules at a concentration of 50 μ g/ml (Fig. 1). This was relative to the basal expression of these molecules in the membrane of T2 cells without the addition of exogenous peptides that was normalized to a value of 1. The KIFGSLAFL peptide showed a middle stabilization of HLA-A2 molecules and a concentration four times higher (200 μ g/ml) was required to obtain similar to that produced by GLMEEMSAL, while the KLPQLCTEL peptide even at high concentrations, induced a small increase in the expression of HLA-A2 molecules and TPTLHEYML peptide showed the lowest affinity to the HLA-A2 allele (Fig. 1).

In order to analyze the activation of CD4⁺ T cells and CD8⁺ T cells with the GLMEEMSAL peptide, an *in vitro* vaccination assay was performed using MDCs loaded with 10 μ g/ml of GLMEEMSAL. The MDCs were generated according to our previously described protocol from PBMCs of normal donors HLA-A2⁺ [23]. The MDCs loaded with GLMEEMSAL were used as antigen-presenting cells (APCs) in co-cultures with PBMCs in a 1:5 ratio for 72 h. At the end of the co-culture time the cells were incubated with antibodies to determine the

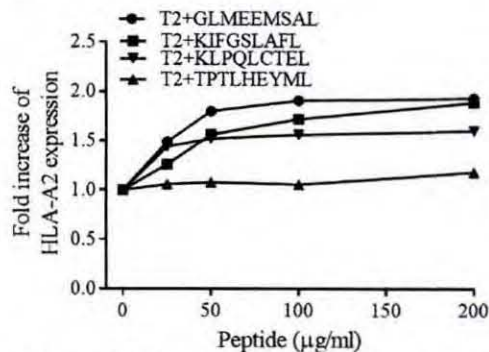


Fig. 1. GLMEEMSAL peptide derived from the hMena protein efficiently stabilizes the HLA-A2 allele. The T2 lymphoblastic cell line, which expresses empty HLA-A2 molecules on its cell surface, was incubated with different concentration (25–200 µg/ml) of the peptides: GLMEEMSAL from hMena, KIFGSLAFL from HER2 (positive control), KLPQLCTEL (positive control) from HPV-16 protein E6 and TPTLHEYML from HPV-16 protein E7 (negative control). Shown here is the fold-increase in the expression of HLA-A2 in T2 cells incubated with each peptide relative to the basal expression of HLA-A2 in T2 cells incubated without a peptide, which was normalized to 1. Data are representative of 3 or more independent experiments with similar results.

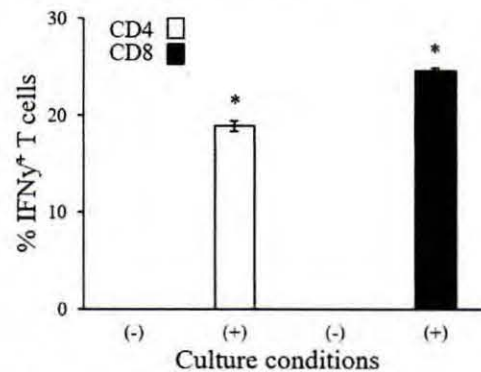


Fig. 2. Activation of CD4⁺ and CD8⁺ T lymphocytes with the GLMEEMSAL peptide. Data indicate the increase in the percentage of CD4⁺/IFN-γ⁺ and CD8⁺/IFN-γ⁺ T lymphocytes obtained either from co-culturing PBMCs with MDCs loaded with (+) or without (-) GLMEEMSAL peptide for 72 h. *Indicates significant differences ($P < 0.05$) in comparison to the co-cultures with unstimulated PBMCs. Values represent the means ± SEM from triplicate wells. Data are representative of 3 or more independent experiments with similar results.

percentage of CD4⁺ T cells and CD8⁺/IFN-γ⁺ T cells. We observed that activation of T lymphocytes via induction of IFN-γ production in PBMCs stimulated with GLMEEMSAL produced approximately 18% of CD4⁺ and 25% of CD8⁺ T cells (Fig. 2).

3.2. CD8⁺ T lymphocytes stimulated with the GLMEEMSAL peptide lyse tumor cells positive for hMena/hMena^{11a} and hMena/hMenaΔv6

To determine the specific cytotoxic effect of CD8⁺ T lymphocytes, PBMC stimulated through *in vitro* vaccination with GLMEEMSAL or KLPQLCTEL and KIFGSLAFL peptides were used to challenge T2 cells loaded with each peptide (target cells) in a 5:1 ratio and the percentage of CD8⁺/CD107⁺ T lymphocytes was then quantified. In all cases a

significant increase was observed in the percentage of CD8⁺/CD107⁺ T lymphocytes relative to the percentage of lymphocytes obtained when using unstimulated PBMCs (0.1–0.2%). PBMCs derived from normal donors stimulated with the peptide GLMEEMSAL increased the percentage of CD8⁺/CD107⁺ T lymphocytes up to eight-fold. Furthermore, PBMCs stimulated with the peptides KLPQLCTEL and KIFGSLAFL increased the percentage by five-fold and six-fold respectively (Fig. 3).

Because the sequence GLMEEMSAL forms part of the sequences of the hMena/hMena^{11a} and hMena/hMenaΔv6 isoforms [4,6] we analyzed whether CD8⁺ T lymphocytes stimulated with GLMEEMSAL were able to recognize tumor cells containing one of these hMena isoforms. For this purpose the CeCa cell lines CaSki (HPV-16⁺, HLA-A2⁺, hMena/hMena^{11a}-positive), C33A (HPV-, HLA-A2⁺, hMena/hMenaΔv6-positive) as well as the BrCa lines MCF-7 (HLA-A2⁺, hMena/hMena^{11a}-positive) and MDA-MB-231 (HLA-A2⁺, hMena/hMenaΔv6-positive) were used as target cells for CD8⁺ T lymphocytes. Mena protein expression in these cell lines was corroborated by flow cytometry (Suppl. Fig. 1). The percentage of CD8⁺/CD107⁺ T lymphocytes obtained after challenging each of the tumor cell lines with unstimulated PBMCs was used as basal. Interestingly upon challenging CaSki, C33A, MDA-MB-231 and MCF-7 cells with PBMCs derived from HLA-A2⁺ normal donors stimulated with the GLMEEMSAL peptide we observed increases in the percentage of CD8⁺/CD107⁺ T lymphocytes of 4.1, 2.2, 3.7, and 2.1-fold respectively relative to unstimulated PBMCs (Fig. 4). PBMCs stimulated with the peptide KLPQLCTEL derived from the E6 protein of HPV-16 showed uniquely cytotoxic activity against CaSki cells resulting in an approximately five-fold increase in the percentage of CD8⁺/CD107⁺ T lymphocytes relative to the unstimulated PBMCs (Fig. 4).

To determine whether the immune recognition of CD8⁺ T lymphocytes was specific by HLA-A2 molecules on tumor cells, the cell lines CaSki (HPV-16⁺, HLA-A2⁺, hMena/hMena^{11a}-positive) and MDA-MB-231 (HLA-A2⁺, hMena/hMenaΔv6-positive) were co-cultivated with different ratios (1:5, 1:10, 1:20) of PBMCs that had undergone three previous rounds of stimulation with MDCs loaded with the GLMEEMSAL peptide. Subsequently the percentage of CD8⁺/CD107⁺ T lymphocytes and the specific lysis on both target cells was analyzed. We found an increasing percentage of CD8⁺/CD107⁺ T lymphocytes (Fig. 5A) and in target cell lysis (Fig. 5B) on CaSki and MDA-MB-231 cell lines in relation to the increase of the effector cells in the co-cultures. Interestingly the addition of anti-HLA-A2 mAb in the cell co-cultures inhibited the percentage of CD8⁺/CD107⁺ T lymphocytes and tumor cell lysis. Is important to mention that PBMCs derived from HLA-A2 negative donors did not show any increase in cytotoxic activity against these target cells (Suppl. Fig. 3).

3.3. Immunisation with the GLMEEMSAL peptide elicits specific T cell activation in BALB/c mice

According to SYFPEITHI [26] and BIMAS algorithms [27] the GLMEEMSAL peptide shows middle predicted affinity to the H2-Kd molecule. To assay *in vitro* the affinity of this peptide for the H2-Kd molecules, the P815 mastocytoma cell line, which express this allele was treated by acid elution to eliminate the own peptides coupled to the Kd molecules and then cultured in the presence of this peptide. We observed that 200 µg/ml of the GLMEEMSAL peptide were able to stabilize H2-Kd molecules in a similar manner than that obtained with KLPQLCTEL, KIFGSLAFL and TPTLHEYML peptides (Fig. 6).

To analyze *in vivo* the immunogenic capacity of the GLMEEMSAL peptide, mice of the BALB/c strain (Haplotype H-2^d) were immunized with three intraperitoneal injections consisting of 100 µg of emulsified peptide GLMEEMSAL with 50 µl of CFA (day 0) or IPA (day 10 and 20) in a 1:1 ratio. Ten days after the last immunization the mice were sacrificed and the spleen cells were cultured for 72 h in the presence or absence of 10 µg of peptide. We observed an increase of 33% to 50% of

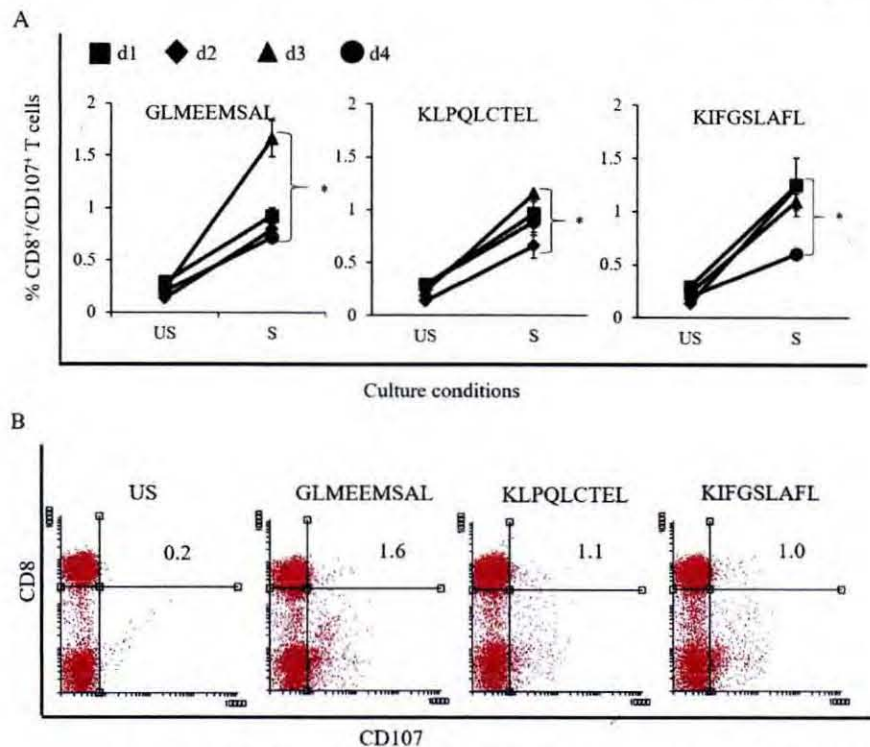


Fig. 3. HLA-A2-restricted specific cytotoxic activity of CD8⁺ T lymphocytes stimulated with GLMEEMSAL peptide. A) Data represent the increase in the percentage of CD8⁺/CD107⁺ T lymphocytes obtained by challenging T2 cells (HLA-A2⁺) loaded with each of the corresponding peptides with PBMCs stimulated (S) three times with MDCs and loaded with either GLMEEMSAL (hMena), KIFGSLAFL (HER2) or KLPQLCTEL (HPV-16 protein E6) of 4 normal donors. The basal value was derived from the percentage of CD8⁺/CD107⁺ T lymphocytes obtained by challenging T2 cells loaded with each of the corresponding peptides with unstimulated (US) PBMCs. D) Representative dot plots of CD8⁺/CD107⁺ T lymphocytes obtained after challenging T2 loaded with each peptide with either US or S PBMCs from a normal donor, are shown. *Indicates significant differences ($P < 0.05$) in comparison to the co-cultures with unstimulated PBMCs. Values represent the means \pm SEM from triplicate wells from 3 or more independent experiments with similar results.

CD4⁺/IFN- γ ⁺ and from 57% to 70% of CD8⁺/IFN- γ ⁺ T cells when the GLMEEMSAL peptide was present (Fig. 7).

To evaluate the specific cytotoxic activity of CD8⁺ T lymphocytes generated after immunization of BALB/c mice with the GLMEEMSAL peptide, spleen cells from immunized mice were cultured in the presence or absence of 10 μ g of either GLMEEMSAL or TPTLHEYML peptides and subsequently challenged against the JC tumor cells (H2-Kd⁺, Mena⁺, (Suppl. Fig. 2)) in a ratio of 20: 1, 10: 1 and 5: 1. CD8⁺ T lymphocytes stimulated with the GLMEEMSAL peptide were able to lyse (15–20%) the JC cells, while spleen cells stimulated with TPTLHEYML peptide or without peptide (control group) showed a significant lower lytic activity (Fig. 8).

3.4. Immunization with the peptide GLMEEMSAL inhibits tumor growth in BALB/c mice

Since the immunization of BALB/c mice with the peptide GLMEEMSAL elicited the activation of CTLs capable to lyse JC tumor cells, we proceeded to analyze the capability of this peptide to provide a protective and therapeutic antitumor effect. For this purpose, BALB/c mice were immunized with 3 intraperitoneal injections (day 0, 10 and 20) consisting of 100 μ g of GLMEEMSAL peptide emulsified with 50 μ l

of CFA (day 0) or IFA (day 10 and 20) in a ratio of 1: 1. To evaluate the protective effect, 10 days after the last immunization, 10⁶ JC tumor cells were inoculated subcutaneously on the back of the mice. To evaluate the therapeutic effect, JC tumor cells were previously inoculated and when tumors were palpated (day 13) the immunization was applied at day 13 and 19. The control group (PBS/control group) was inoculated with only 10⁶ JC tumor cells. Interestingly we observed that both immunization schemes were capable to provide a significant ($P < 0.01$) inhibition of the tumor growth in comparison with that observed in the control group. In the group where the protective effect was evaluated, the tumors were scarcely palpable during the monitoring of tumor growth, with < 30% of the tumor volume of the control group (0.6 cm³ vs 2 cm³) at the end of the experiment (Fig. 9). On the other hand when evaluating the therapeutic effect of the immunization with the GLMEEMSAL peptide six days after the first immunization we detected a significant ($P < 0.05$) tumor growth diminution compared to the control group (0.5 cm³ vs 1.3 cm³). At the end of the experiment we could observe the reduction of tumor growth up to 50% in comparison with that detected in the control group (Fig. 9). It is important to mention that using either protective or therapeutic schemes of immunization with the GLMEEMSAL peptide, we observed reduced tumor growth rates in comparison with that of the

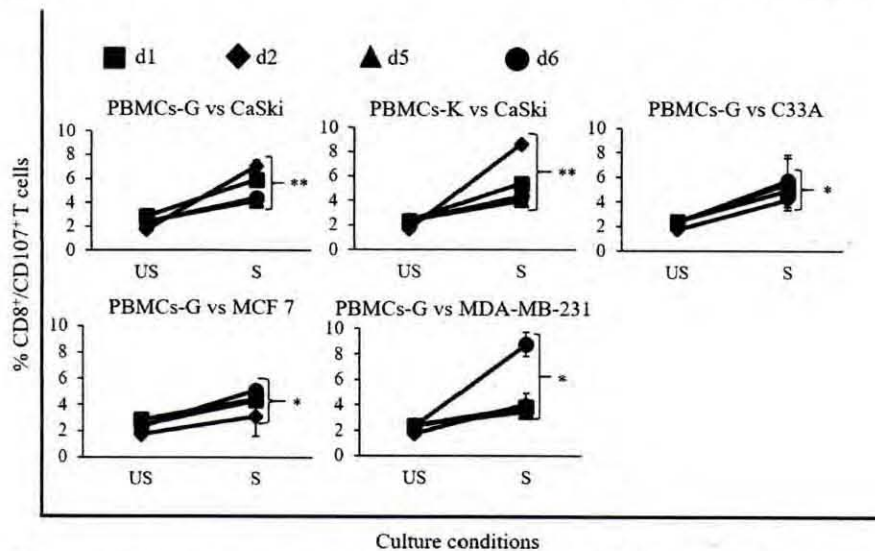


Fig. 4. CD8⁺ T lymphocytes stimulated with GLMEEMSAL peptide recognize tumor cells positive for either hMena/hMena^{11a} or hMena/hMena Δ v6. PBMCs derived from 4 normal donors (d1, d2, d5 and d6) were previously stimulated through *in vitro* vaccination using MDCs loaded with either hMena GLMEEMSAL (PBMCs-G) or HPV-16 E6 KLPQLCTEL (PBMCs-K) and then used to challenge CaSki (HPV-16⁺, HLA-A2⁺, hMena/hMena^{11a}-positive) and C33A (HPV-, HLA-A2⁺, hMena/hMena Δ v6-positive) CeCa cells as well as MCF-7 (HLA-A2⁺, hMena/hMena^{11a}-positive) and MDA-MB-231 (HLA-A2⁺, hMena/hMena Δ v6-positive) BrCa cells at a 5:1 ratio (E:T). Data represent the increase the percentage of CD8⁺/CD107⁺ T lymphocytes after challenge by PBMCs stimulated (S) with each of the antigenic peptides relative to the different tumor cells. The basal percentage of CD8⁺/CD107⁺ T lymphocytes was determined by challenging the different cells with unstimulated (US) PBMCs. Significant differences * ($P < 0.05$) and ** ($P < 0.01$) were obtained compared to unstimulated PBMCs. Values represent the means \pm SEM from triplicate wells from 3 or more independent experiments with similar results.

control group. Mice that received protective immunization took 15 days more to develop tumors of 2cm³, whereas in the mice where the therapeutic effect was evaluated there were about 10 days of delay to develop tumors of the same size (data not shown).

3.5. Immunization with the peptide GLMEEMSAL increase the survival of mice inoculated with JC tumor cells

In agreement with the inhibition of the tumor growth observed after the application of the immunization schemes with the GLMEEMSAL peptide in BALB/c mice, we observed that after 31 days of treatment the survival in the mice groups that received protective and therapeutic schemes was 100% and 60% respectively, while all animals not treated with the peptide GLMEEMSAL died before day 22 (Fig. 10).

4. Discussion

The function of hMena in motility and cellular adhesion through the regulation of assembly and dynamics of cytoplasmic actin networks is well known [3]. However, the steady increase of hMena expression during progression from benign to malignant lesions [5,10,15,16,32,33] and the alternative expression of the hMena/hMena^{11a} and hMena/hMena Δ v6 isoforms that regulate the invasiveness and metastatic potential of tumor cells [6] indicates that this protein can be used as a marker to differentiate premalignant epithelial lesions from malignant lesions with high metastatic potential [34]. This finding may have significant repercussions for predicting the progression of tumors or for directing specific therapies and arresting development of the disease [5,34]. In this context, pioneering studies conducted by the Nistico group have shown evidence of immunoreactivity against epitopes of the hMena protein in patients with BrCa whose

tumors showed over-expression of this protein. Approximately 20% of the patients expressed IgG antibodies specific to epitopes of hMena. Furthermore, 75% (9/12) of HLA-A2⁺ patients showed a specific response of CD8⁺ T lymphocytes to stimulation with hMena peptides attached to HLA-A2 molecules [4]. Taking into consideration that the peptide GLMEEMSAL, conserved in the hMena/hMena^{11a} (NP_001008493.1, aa 443–451) and hMena/hMena Δ v6 (ABY78022.1, aa 406–414) isoforms, has a high potential to be naturally processed and presented via HLA-A*0201 molecules according to PAPProC program [35] we first analyzed the capacity of this peptide to generate CTLs using a system of *in vitro* vaccination with MDCs (APCs) and PBMCs from healthy HLA-A2⁺ donors as cellular responders. Consistent with previous results describing the high affinity of GLMEEMSAL for the HLA-A2 molecule [4] our results show that more than just stabilizing HLA-A2 molecules, this peptide coupled with MDCs is capable of inducing activation of CD8⁺ T lymphocytes likewise previously reported peptides KLPQLCTEL and KIFGSLAFL [21,22,28–31]. In addition we also could detect activation of CD4⁺ T lymphocytes after culturing *in vitro* PBMC with peptide-loaded MDCs from normal donors as well as splenic cells derived from BALB/c mice immunized with the GLMEEMSAL peptide, probably due to cytokines, in addition to IFN- γ , derived from activated CD8⁺ lymphocytes during cell culture, which it will be of interest to evaluate in future experiments. Furthermore, the CTLs generated with this system were capable of specifically recognizing HLA-A2⁺ tumor epithelial cells belonging to cell lines derived from BrCa and CeCa which express either hMena/hMena^{11a} or hMena/hMena Δ v6. In the particular case of CeCa cell lines we observed that CD8⁺ T lymphocytes stimulated with the GLMEEMSAL peptide, in addition to having cytotoxic activity against C33A cells (HPV-, HLA-A2⁺, hMena/hMena Δ v6-positive), were also capable of lyse CaSki cells (HPV-16⁺, HLA-A2⁺, hMena/hMena^{11a}-positive) in a manner

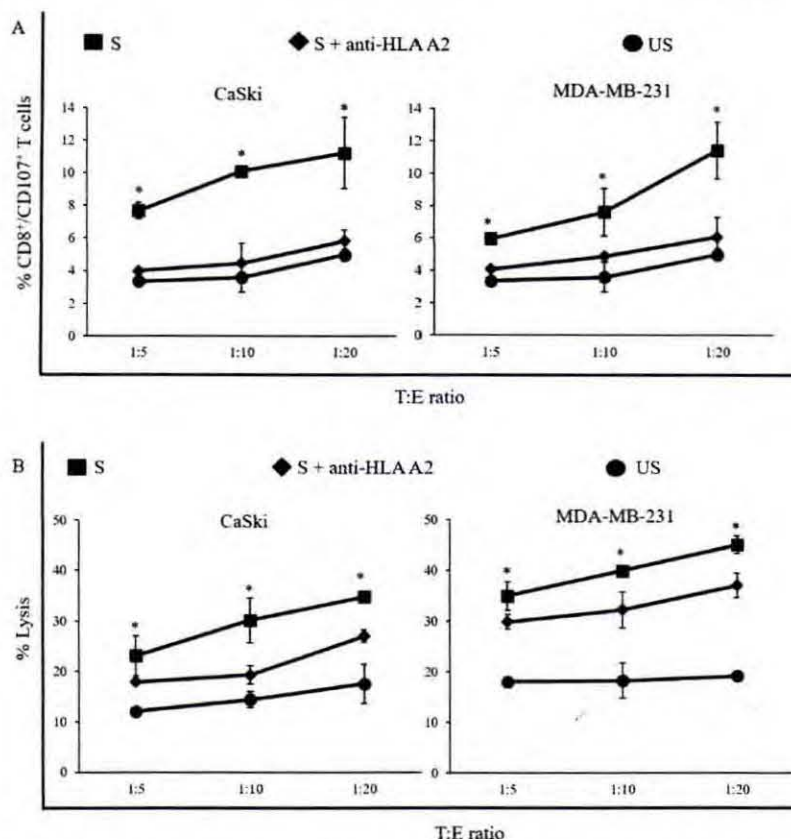


Fig. 5. HLA-A2-restricted specific cytotoxic activity of CD8⁺ T lymphocytes stimulated with GLMEEMSAL peptide on tumor cells positive for either hMena/hMena^{11a} or hMena/hMena Δ v6. PBMCs derived from HLA-A2⁺ a normal donor were previously stimulated (S) through *in vitro* vaccination using MDCs loaded with the GLMEEMSAL peptide and then used as effector cells (E) to challenge target cells (T) consisting of CaSki (HPV-16⁺, HLA-A2⁺, hMena/hMena^{11a}-positive) as well as MDA-MB-231 (HLA-A2⁺, hMena/hMena Δ v6-positive) cells at different cell ratios (T:E) of 1:5, 1:10 and 1:20. To inhibit T lymphocyte recognition 10 μ g/ml of the mAb anti-HLA-A2 was added. The percentage of CD8⁺/CD107⁺ T lymphocytes (A) and the cytotoxic activity of CD8⁺ T lymphocytes on tumor cells (B) was determined as indicated in Materials and methods section. The basal percentage of CD8⁺/CD107⁺ T lymphocytes as well as the basal cytotoxic activity of CD8⁺ T lymphocytes was determined by challenging the different tumor cells with unstimulated PBMCs (US). *Indicates significant differences ($P < 0.05$) in comparison to the co-cultures with unstimulated PBMCs. Values represent the means \pm SEM from triplicate wells. Data are representative of 3 or more independent experiments with similar results.

comparable to that achieved by CD8⁺ T lymphocytes stimulated with the KLPQLCTEL peptide derived from the E6 protein of HPV-16, which was previously reported such as immunogenic [22,31]. Previous reports have demonstrated that the over-expression of hMena in CeCa increases with disease progression [5,10]. Therefore, the ability of GLMEEMSAL and peptides common to the different isoforms of hMena to induce lytic activity of CTLs against CeCa cells, regardless of the presence of HPV, could provide greater potential for clinical application than the restricted use of epitopes derived from the oncoproteins E6 and E7 of high-risk HPV such as HPV-16 and HPV-18, which are present in over 70% of CeCa [36]. These latter epitopes have only been evaluated in patients with CeCa that are positive for infection by the same HPV genotypes [37]. Conversely, the over-expression of hMena in tumors of different histological types has been related not only to a higher metastatic index [1,7–9,16] but also to the size of the tumors [14], in which the alternative expression of hMena/hMena^{11a} and hMena/

Mena Δ v6 can play an important role in tumor growth and progression. However, effective vaccine strategies against autoantigens such as hMena, which is over-expressed in several tumors, must circumvent immune tolerance. To discard this phenomenon, we employed an *in vivo* tumor model in BALB/c mice for immunization with the peptide GLMEEMSAL. It is important to mention that in accord with the National Center for Biotechnology Information, USA, data base, this peptide is also conserved in several murine isoforms of Mena namely: isoform 1 (NP_034265.2, aa 667–685), isoform 2 (NP_032706.2, aa 662–670), isoform 3 (NP_001076589, aa 658–666) and isoform 4 (NP_001076590.1, aa 414–422), and accord with our results also binds to H2-Kd molecules. In addition, we also observed that the immunization of BALB/c with the peptide GLMEEMSAL was capable to induce the activation of CTLs that recognized and lysed JC tumor cells (H2-Kd, Mena⁺). In addition, this study shows for first time that using protective and therapeutic schemes of immunization *in vivo* with hMena

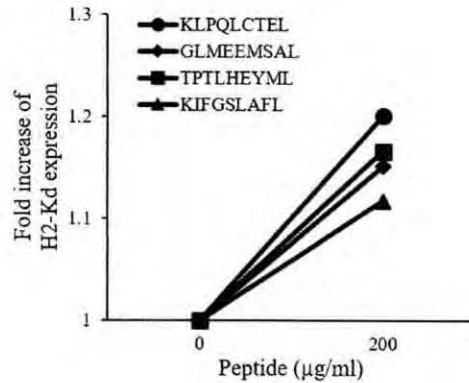


Fig. 6. GLMEEMSAL peptide derived from the hMena protein stabilizes the H2-Kd allele. P815 mastocytoma cell line (H2-Kd⁺) was treated by acid elution to eliminate the own peptides coupled to the H2-Kd molecules and then to treat them with 200 µg/ml of exogenous peptides: GLMEEMSAL from hMena, KIFGSLAFL from HER2, KLPQLCTEL from E6 protein of HPV-16 and TPTLHEYML from E7 protein of HPV-16. Shown here is the fold-increase in the expression of H2-Kd in P815 cells incubated with each peptide relative to the basal expression of H2-Kd in P815 cells after acid elution incubated without a peptide, which was normalized to 1. Data are representative of 3 or more independent experiments with similar results.

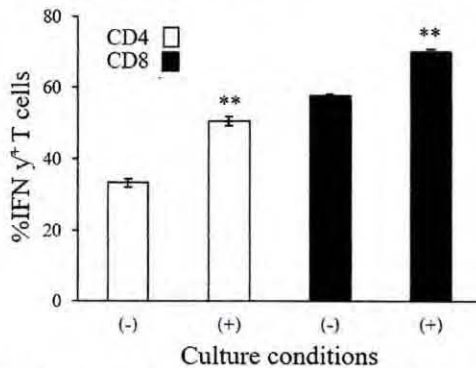


Fig. 7. Immunization with the GLMEEMSAL peptide elicits specific CD4⁺ and CD8⁺ T cell activation in BALB/c mice. Data indicate the increase in the percentage of CD4⁺/IFNγ⁺ and CD8⁺/IFNγ⁺ T lymphocytes obtained after culturing splenic cells derived from BALB/c mice immunized with the GLMEEMSAL peptide and restimulated *in vitro* in the presence (+) or absence (-) of either GLMEEMSAL peptide as indicated in Materials and method section. Values represent the means ± SEM from triplicate wells. *Indicates significant differences ($P < 0.05$). Data are representative of 3 or more independent experiments with similar results.

derived epitopes, such as the peptide GLMEEMSAL, provide antitumor immunity which inhibits tumor growth and prolongs mouse survival. However, to obtain a better tumor growth inhibition under therapeutic scheme it will be important to consider if tumor growth rate diminish by increasing the number of immunizations or by including conserved epitopes in between hMena/hMena11a and hMena/MenaΔv6 isoforms, other than GLMEEMSAL epitope.

Our results provide significant evidence on the antigenic capacity of the peptide GLMEEMSAL to elicit *in vitro* CTLs that recognize and lyse epithelial tumor cells carrying hMena isoforms associated with tumor progression. In addition the protective and therapeutic efficacy shown

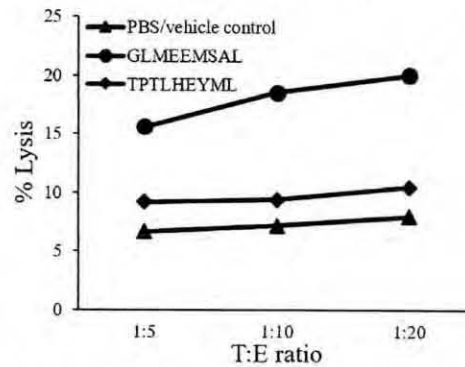


Fig. 8. Cytotoxic activity of CD8⁺ T lymphocytes derived from BALB/c mice immunized with the peptide GLMEEMSAL. Splenic cells derived from BALB/c mice ($n = 5$) immunized with the GLMEEMSAL were stimulated *ex vivo* during 2 days with 10 µg/ml of GLMEEMSAL (●) or TPTLHEYML (◆) peptides and then used as effector cells (E) to challenge target cells (T) consisting of JC (H2-Kd, Mena⁺, Fig. S1) cells at different cell ratios (T:E) of 1:5, 1:10 and 1:20. The lysis of CD8⁺ T lymphocytes on tumor cells was determined as indicated in Materials and methods section. The basal percentage of lysis was determined by challenging the tumor cells with splenic cells from control group (PBS/vehicle control, ▲). *Indicates significant differences ($P < 0.05$) in comparison to PBS/vehicle control. Values represent the means ± SEM from triplicate wells. Data are representative of 3 or more independent experiments with similar results.

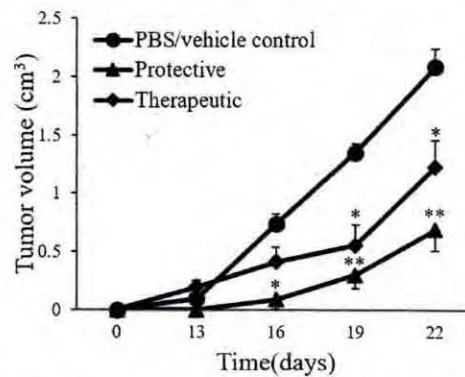


Fig. 9. Antitumor effect of the immunization with the GLMEEMSAL peptide in the BALB/c mice tumor model. BALB/c mice were immunized i.p. with 3 intraperitoneal injections (day 0, 10 and 20) consisting of 100 µg of the GLMEEMSAL peptide emulsified with 50 µl of CFA (day 0) or IFA (day 10 and 20) in a ratio of 1:1. To evaluate the protective effect (Protective), 10 days after the last immunization, 10⁶ JC tumor cells were inoculated subcutaneously on the back of the mice. To evaluate the therapeutic effect (Therapeutic), JC tumor cells were previously inoculated on the back of the mice and when tumors were palpated (day 13) the immunization was applied at day 13 and 19. The control group (PBS/vehicle control) was inoculated with 10⁶ JC tumor cells. The averages of tumor growth of the 5 mice of each group ± SEM are shown. The tumor volume in all cases was determined as described in the text. * $p < 0.05$, ** $p < 0.001$, Man-Whitney *U* test compared to PBS/vehicle control mice. Representative data from 2 independent experiments with similar results.

by the immunization with the peptide GLMEEMSAL to inhibit tumor growth in a mice model, makes this finding of great relevance to consider the potential of GLMEEMSAL for the development of immunotherapy protocols in tumors with increased expression of hMena.

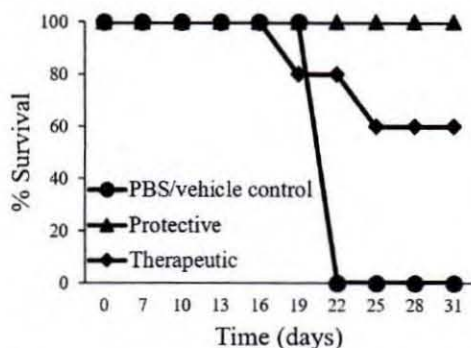


Fig. 10. Immunization with the peptide GLMEEMSAL increases survival in tumor challenged BALB/c mice. BALB/c mice were immunized i.p. with 100 μ g of the GLMEEMSAL peptide at day 0, 10 and 20 and inoculated with 10⁶ JC tumor cells in the back on day 30 to evaluate the protective effect of the immunization, while to evaluate the therapeutic effect, 10⁶ JC tumor cells were first inoculated and when the tumors were palpable (day 13) the immunizations were started with GLMEEMSAL on days 13, 16 and 19. The control group (PBS/vehicle control) was inoculated with 10⁶ JC tumor cells on the back. Survival was monitored daily throughout the experiment. Survival percentages of each group (5 mice) are shown. Representative data from 2 independent experiments with similar results.

5. Conclusion

Taking into consideration that humoral and cellular immune responses to hMena epitopes have been observed in BrCa patients [4] and that it is possible the induction *in vitro* and *in vivo* specific cellular immune responses to epitopes conserved of hMena/hMena^{11a} and hMena/Mena Δ v6 isoforms, such as that shown in this study by the GLMEEMSAL peptide, the use of hMena epitopes may represent an important alternative to be considered in the development of immunotherapy protocols for arresting growth and metastatic potential of tumors, to prevent recurrence in disease-free patients and increasing their survival.

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2018.01.043>.

Competing interests

The authors declare no conflict of interest.

Funding

We are indebted for DGAPA-PAPIIT support to MLMG (grant no IN217013 and IN226516); and Mexican Institute of Social Security, IMSS, support to AMG (grants no. 1258, 1314 and 1383). DLCHA was supported by a fellowship from CONACYT (CVU 385009) and this study is part of her doctoral thesis from the Postgraduate Program in Biological Sciences.

References

- U. Philippat, E.T. Roussos, M. Oser, H. Yamaguchi, H.D. Kim, S. Giampieri, Y. Wang, S. Guzwami, J.B. Wyckoff, D.A. Laufferburger, E. Sahai, J.S. Condeelis, F.B. Gertler, A Mena invasion isoform potentiates EGF-induced carcinoma cell invasion and metastasis, *Dev. Cell* 15 (2008) 813–828.
- E.T. Roussos, S. Guzwami, M. Balsamo, Y. Wang, R. Stubezki, E. Adler, B.D. Robinson, J.G. Jones, F.B. Gertler, J.S. Condeelis, M.H. Oktay, Mena invasive (Mena^{INV}) and Mena^{11a} isoforms play distinct roles in breast cancer cell cohesion and association with TMEM, *Clin. Exp. Metastasis* 28 (2011) 515–527.
- M. Krause, E.W. Dent, J.E. Bear, J.J. Loureiro, F.B. Gertler, Ena/VASP proteins: regulators of the actin cytoskeleton and cell migration, *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 19 (2003) 541–564.
- F. Di Modugno, G. Bronzi, M.J. Scanlon, D. Del Bello, S. Cascioli, I. Ventura, C. Botti, M.R. Nicotra, M. Mottolise, P.G. Natali, A. Santoni, E. Jager, P. Nistico, Human Mena protein, a serex-defined antigen overexpressed in breast cancer eliciting both humoral and CD8+ T-cell immune response, *Int. J. Cancer* 109 (2004) 909–918.
- S. Gurzu, D. Gortez, I. Ember, I. Jung, The possible role of Mena protein and its splicing-derived variants in embryogenesis, carcinogenesis, and tumor invasion: a systematic review of the literature, *Biomed. Res. Int.* 2013 (2013) 365192.
- F. Di Modugno, P. Iapicca, A. Boudreau, M. Mottolise, I. Terenziato, L. Ferracchio, R.P. Carstens, A. Santoni, M.J. Blasei, P. Nistico, Splicing program of human MFNA produces a previously undescribed isoform associated with invasive, mesenchymal-like breast tumors, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 109 (2012) 19280–19285.
- S. Gurzu, I. Jung, I. Prammer, I. Ember, Z. Paval, T. Menei, The expression of cytoskeleton regulator3 protein Mena in colorectal lesions, *Romanian J. Morphol. Embryol.* 49 (2008) 345–349.
- M.S. Pina, M. Balsamo, F. Di Modugno, M. Mottolise, M. Alessio, E. Melucci, M. Milella, D.J. McConkey, U. Philippat, F.B. Gertler, P.G. Natali, P. Nistico, Human Mena + 11a isoform serves as a marker of epithelial phenotype and sensitivity to epidermal growth factor receptor inhibition in human pancreatic cancer cell lines, *Clin. Cancer Res.* 14 (2008) 4943–4950.
- S. Gurzu, M. Krause, I. Ember, L. Atzmfrei, G. Gobel, K. Feher, I. Jung, Mena, a new available marker in tumors of salivary glands? *Eur. J. Histochem.* 56 (2012) e8.
- S. Gurzu, I. Jung, I. Prammer, I. Chira, I. Ember, The immunohistochemical aspects of protein Mena in cervical lesions, *Romanian J. Morphol. Embryol.* 50 (2009) 213–216.
- L.M. Lanier, M.A. Gates, W. Witke, A.S. Menzies, A.M. Wehman, J.D. Macklis, D. Kwiatkowski, P. Soriano, F.B. Gertler, Mena is required for neurulation and commissure formation, *Neuron* 22 (1999) 313–325.
- J.E. Bear, T.M. Svirkina, M. Krause, D.A. Schaefer, J.J. Loureiro, G.A. Strasser, I.V. Maly, O.Y. Chaga, J.A. Cooper, G.G. Borisy, F.B. Gertler, Antagonism between Ena/VASP proteins and actin filament capping regulates fibroblast motility, *Cell* 109 (2002) 509–521.
- F.B. Gertler, K. Niebuhr, M. Reinhardt, J. Wehland, P. Soriano, Mena, a relative of VASP and drophilin enabled, is implicated in the control of microfilament dynamics, *Cell* 87 (1996) 227–239.
- A. Toyoda, A. Yokota, T. Saito, H. Kawana, M. Higashi, Y. Suzuki, T. Taraka, M. Kitagawa, K. Harigaya, Overexpression of human antigen of mammalian enabled (hMena) is associated with the expression of mutant p53 protein in human breast cancers, *Int. J. Oncol.* 38 (2011) 89–96.
- S. Goswami, U. Philippat, D. Sun, A. Patsialou, J. Avraham, W. Wang, F. Di Modugno, P. Nistico, F.B. Gertler, J.S. Condeelis, Identification of invasion specific splice variants of the cytoskeletal protein Mena present in mammary tumor cells during invasion *in vivo*, *Clin. Exp. Metastasis* 26 (2009) 153–159.
- F. Di Modugno, M. Mottolise, L. DeMonte, F. Trono, M. Balsamo, A. Conidi, E. Melucci, I. Terenziato, F. Belleudi, M.R. Torrisi, M. Alessio, A. Santoni, P. Nistico, The cooperation between hMena overexpression and HER2 signalling in breast cancer, *PLoS One* 5 (2010) e15852.
- F. Di Modugno, L. DeMonte, M. Balsamo, G. Bronzi, M.R. Nicotra, M. Alessio, E. Jager, J.S. Condeelis, A. Santoni, P.G. Natali, P. Nistico, Molecular cloning of hMena (ENAH) and its splice variant hMena + 11a: epidermal growth factor increases their expression and stimulates hMena + 11a phosphorylation in breast cancer cell lines, *Cancer Res.* 67 (2007) 2657–2665.
- T. Chao, T.M. Chu, Characterization of a new spontaneously developed murine mammary adenocarcinoma in syngeneic BALB/c hosts, *In Vitro Cellular and Developmental Biology*, 25 1989, pp. 621–626.
- M.L. Mora-García, R. García-Bocha, O. Morales-Ramírez, J.J. Montesinos, B. Weiss-Stöcker, J. Hernández-Montes, L.R. Avila-Ibarra, C.A. Don-López, M.A. Velasco Velázquez, V. Gutiérrez-Serrano, A. Monroy-García, Mesenchymal stromal cells derived from cervical cancer produce high amounts of adenosine to suppress cytotoxic T lymphocyte functions, *J. Transl. Med.* 14 (2016) 302.
- N.A. Hadzen, M.J. Bevan, Defective presentation of endogenous antigen by a cell line expressing class I molecules, *Science* 248 (1990) 367–370.
- B. Fink, Y.L. Blevins, J.T. Whaczka, C.G. Inoué, Identification of an immunodominant peptide of HER-2/neu protooncogene recognized by ovarian tumor-specific cytotoxic T lymphocyte lines, *J. Exp. Med.* 181 (1995) 2109–2117.
- W.M. Kast, R.M. Brandt, J. Sidney, J.W. Drijfhout, R.T. Kido, H.M. Grey, C.J. Melief, A. Sette, Role of HLA-A motifs in identification of potential CTL epitopes in human papillomavirus type 16 E6 and E7 proteins, *J. Immunol.* 152 (1994) 3904–3912.
- I. Mora-García Mde, A. Duena-González, J. Hernández-Montes, E. De la Cruz-Hernández, E. Pérez-Gardenas, B. Weiss-Stöcker, E. Santiago-Osorio, V.F. Ortiz-Navarrete, V.H. Rosales, D. Canta, M. Lizano-Soberon, M.P. Rojo-Aguilar, A. Monroy-García, Up-regulation of HLA class-I antigen expression and antigen-specific CTL response in cervical cancer cells by the demethylating agent hydralazine and the histone deacetylase inhibitor valproic acid, *J. Transl. Med.* 4 (2006) 55.
- M.R. Beits, J.M. Brenzel, D.A. Price, S.C. De Rosa, D.C. Douk, M. Roederer, R.A. Kopf, Sensitive and viable identification of antigen-specific CD8+ T cells by a flow cytometric assay for degranulation, *J. Immunol. Methods* 281 (2003) 65–78.
- M.A. Attia, D.W. Weiss, Immunology of spontaneous mammary carcinomas in mice V. Acquired tumor resistance and enhancement in strain mice infected with mammary tumor virus, *Cancer Res.* 26 (1966) 1787–1800.
- H. Rammensee, J. Bachmann, N.P. Emmerich, O.A. Bucholt, S. Stevanovic, SYFPEITHI: database for MHC ligands and peptide motifs, *Immunogenetics* 50 (1999) 213–219.
- K.C. Parker, M.A. Bednarek, J.E. Goligan, Scheme for ranking potential HLA-A2

- binding peptides based on independent binding of individual peptide side-chains, *J. Immunol.* 152 (1994) 163–175.
- [28] Y. Rungcun, F. Salazar-Onfray, J. Charu, R.J. Malmberg, K. Evrin, H. Maes, K. Kono, C. Hsing, M. Peterson, O. Larsson, L. Lau, E. Appella, A. Sette, E. Celis, B. Kierling, Identification of new HER2/neu-derived peptide epitopes that can elicit specific CTL against autologous and allogeneic carcinomas and melanomas, *J. Immunol.* 163 (1999) 1037–1044.
- [29] M.L. Disis, T.A. Gooley, K. Rinn, D. Davis, M. Diepkorn, M.A. Cheever, K.L. Knutson, K. Schifman, Generation of T-cell immunity to the HER-2/neu protein after active immunization with HER-2/neu peptide-based vaccines, *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* 20 (2002) 2624–2632.
- [30] C.N. Baxevanis, N.N. Sotiriadou, A.D. Gritzapis, P.A. Sotiropoulou, S.A. Perez, N.T. Caraculou, M. Papanichail, Immunogenic HER-2/neu peptides as tumor vaccines, *Cancer Immunol. Immunother.* 55 (2006) 85–95.
- [31] M.E. Rensing, A. Sette, R.M. Brandt, J. Rupperi, P.A. Wentworth, M. Hartman, C. Oseroff, H.M. Grey, C.J. Melief, W.M. Kast, Human CTL epitopes encoded by human papillomavirus type 16 E6 and E7 identified through in vivo and in vitro immunogenicity studies of HLA-A*0201-binding peptides, *J. Immunol.* 154 (1995) 5934–5943.
- [32] B.D. Robinson, G.L. Sica, Y.F. Liu, T.E. Rohan, F.B. Gertler, J.S. Condeelis, J.G. Jones, Tumor microenvironment of metastasis in human breast carcinoma: a potential prognostic marker linked to hematogenous dissemination, *Clin. Cancer Res.* 15 (2009) 2433–2441.
- [33] E.T. Roukos, Y. Wang, J.B. Wyckoff, R.S. Sellers, W. Wang, J. Li, J.W. Pollard, F.B. Gertler, J.S. Condeelis, Mena deficiency delays tumor progression and decreases metastasis in polyoma middle-T transgenic mouse mammary tumors, *Breast Cancer Res.* 12 (2010) R101.
- [34] E. Bria, F. Di Modugno, I. Sperduti, P. Iapicca, P. Visca, G. Alessandrini, B. Antoniani, S. Pilotta, V. Ludovini, J. Vannucci, G. Bellezza, A. Sidoni, G. Tortora, D.C. Radisky, L. Crino, F. Cognetti, P. Faccolo, M. Mottolise, M. Milella, P. Nisticò, Prognostic impact of alternative splicing-derived hMENA isoforms in resected, node-negative, non-small-cell lung cancer, *Oncotarget* 5 (2014) 11054–11063.
- [35] A.D. Gritzapis, I.E. Voutsas, E. Lekka, N. Tsavaris, I. Mitsitzi, P. Sotiropoulou, S. Perez, M. Papanichail, G.N. Baxevanis, Identification of a novel immunogenic HLA-A*0201-binding epitope of HER-2/neu with potent antitumor properties, *J. Immunol.* 181 (2008) 146–154.
- [36] <https://www.cdc.gov/cancer/hpv/statistics/cases.htm>, (2017).
- [37] S.J. Lee, A. Yang, T.C. Wu, C.F. Hung, Immunotherapy for human papillomavirus-associated disease and cervical cancer: review of clinical and translational research, *J. Gynecol. Oncol.* 27 (2016) e51.