



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

“Evaluación del efecto antitumoral de inmunógenos basados
en bibliotecas de epítomos variables (BEVs)
en modelo murino de melanoma”

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

Maestro en Ciencias

PRESENTA:

RODOLFO SERVÍN BLANCO

TUTOR PRINCIPAL:

DR. KAREN MANOUTCHARIAN AIRAPETIAN
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS

COMITÉ TUTOR

DRA. LETICIA ROCHA ZAVALA
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS

DR. LUIS A. VACA DOMÍNGUEZ
INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA CELULAR

MÉXICO, D. F. Noviembre, 2013



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

JURADO ASIGNADO

PRESIDENTE: Dr. Fernando López Casillas

VOCAL: Dr. Juan Miranda Ríos

VOCAL: Dra. Elizabeth Langley McCarron

VOCAL: Dr. Alfonso Dueñas González

SECRETARIO: Dra. Marcela Lizano Soberón

SITIO DONDE SE DESARROLLO EL TEMA: Este trabajo de Tesis se realizó en el Laboratorio de Biología Molecular y Biotecnología 3 del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la Universidad Nacional Autónoma de México.

TUTOR PRINCIPAL:

DR. KAREN MANOUTCHARIAN AIRAPETIAN

SUSTENTANTE:

RODOLFO SERVÍN BLANCO

Agradecimientos

El sustentante Rodolfo Servín Blanco, desea agradecer:

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) y DGAPA-UNAM por el apoyo financiero brindado para realizar este trabajo. CONACyT: proyecto 166600; DGAPA-UNAM: proyecto IN216110-3.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por el otorgamiento de la beca de maestría para el desarrollo del presente trabajo.

Al Consejo Mexiquense de Ciencia y Tecnología (COMECyT) por el otorgamiento de la beca para tesis de posgrado.

Agradecimientos

A la Universidad Nacional Autónoma de México que me ha permitido desarrollarme personal y profesionalmente.

Al Dr. Karen Manoutcharian Airapetin por permitirme estar en su grupo de investigación durante el tiempo que cursé la maestría y por abrirme las puertas para estudiar el doctorado. También agradezco sus consejos y ejemplo de que el desarrollo científico y humano deben ir de la mano.

A la Dra. Leticia Rocha Zavaleta y al Dr. Luis Vaca Domínguez por sus observaciones y guía en el desarrollo del proyecto.

A los miembros del jurado: Dr. Fernando López Casillas, Dr. Juan Miranda Ríos, Dra. Elizabeth Langley McCarron, Dr. Alfonso Dueñas González y Dra. Marcela Lizano Soberón, por examinar ya haber contribuido al enriquecimiento del presente trabajo.

A la M. en C. María Elena Munguía Zamudio por la orientación y ayuda que me brindó en los experimentos de Biología Molecular.

Dedicatoria

A Dios por otorgarme vida y permitir que realizara mis estudios de Maestría de la forma en la que fueron.

A mis padres Rosa María y Rodolfo que me han dado todo lo necesario para que mi educación y crecimiento espiritual. Este es un fruto más de todo su esfuerzo y apoyo incondicional. Los amo.

A mi hermano Diego que le brinda alegría a mi vida, porque siempre me ayuda a ser mejor y por su apoyo, cariño y confianza. Te amo hermano.

A mis amigos y ya hermanos que aunque poco nos veamos siempre han mostrado su apoyo y guía: Carlos Olivares, Jorge Alegía, Juan Ortíz, Mario Silverio, Angélica Méndez, Pablo Lechuga, Miguel Mayorga. Gracias por su amistad sincera.

A mis amigos del laboratorio Eréndira, Cecilia, Valeria, Geraldine, Gorette, Roxana, Allan, Gabriel, Fernando, Francisco y Joselo, con quienes he compartido incontables horas de trabajo y sobre todo momentos invaluable. Agradezco especialmente a la M. en C. Lucia Cerrillo por el ejemplo de tenacidad y compromiso humano y espiritual con la sociedad. Gracias a todos por su amistad.

ÍNDICE

RESUMEN	1
1. INTRODUCCIÓN	2
Cáncer.....	2
Respuesta inmune.....	4
Respuesta inmune en cáncer.....	5
Inmunoedición.....	6
Mecanismos de evasión tumoral.....	8
Melanoma.....	9
Terapia en cáncer.....	9
Vacunas.....	9
Problemas de las vacunas contra enfermedades y patógenos antigénicamente variables.....	10
Mucina.....	11
Survivina.....	12
Phage-display.....	13
2. ANTECEDENTES	16
BEVs.....	16
Uso de péptidos y mimótopos en vacunas contra el cáncer.....	17
Muc-1 y Survivina como blancos terapéuticos en cáncer.....	18
3. HIPÓTESIS	20
4. OBJETIVO GENERAL	21

5. OBJETIVOS PARTICULARES	21
6. MATERIALES Y MÉTODOS	22
Construcción de los inmunógenos.....	23
Rescate de bibliotecas en fago M13 y obtención de antígenos.....	26
Extracción de ADN plasmídico para inmunización.....	26
Inmunización de ratones B6 y evaluación del efecto antitumoral de BEV.....	26
Ensayo de proliferación celular mediante tinción con CFSE.....	27
Análisis de los ensayos de proliferación por citometría de flujo.....	28
7. RESULTADOS	31
Construcción de los inmunógenos (BEVs y nominales).....	31
Evaluación de la inmunogenicidad de las BEVs.....	33
Evaluación del Efecto antitumoral de BEVs y Nominales.....	36
- Proliferación de esplenocitos CD8+ en experimentos terapéuticos.....	36
- Efecto de la inmunización en el crecimiento tumoral.....	38
- Efecto de la inmunización profiláctica en el crecimiento tumoral.....	46
8. DISCUSIÓN	48
9. CONCLUSIONES	54
10. PERSPECTIVAS	55
11. REFERENCIAS	56

RESUMEN

El melanoma es un tipo de cáncer de piel que involucra a los melanocitos, es decir, aquellas células con la capacidad de producir melanina. Los pacientes con melanoma detectado tempranamente tienen una supervivencia a 5 años del 95%, mientras que aquellos casos de detección tardía, dicha supervivencia es menor a 6%. Las terapias convencionales contra el cáncer, incluyendo cirugía, radiación y agentes quimioterapéuticos, son a menudo ineficaces en controlar el crecimiento y propagación de los tumores.

Actualmente existe un gran interés en el desarrollo de vacunas contra el cáncer, con las cuales se pretende estimular el sistema inmune de los pacientes para que este sea quien combata al tumor. Han sido muchos los inmunógenos y las estrategias empleados en el desarrollo de las vacunas; sin embargo, la combinación adecuada aun no ha sido desarrollada. Mucina (muc1) y Survivina han sido utilizadas en modelos murinos y en pruebas clínicas en diversos formatos (péptidos sintético, células dendríticas pulsadas con péptidos de dichas proteínas, etc). Recientemente se ha desarrollado un concepto novedoso para generar vacunas, dicha concepto se denomina Bibliotecas de Epítomos Variables (BEVs) y consiste en generar una gran cantidad de variantes de un epítipo silvestre o nominal inmunodominante. Las variantes del epítipo pueden expresarse por medio de Phage Display en la proteína pVIII del fago M13 o bien en contexto de plásmidos de expresión en eucariontes para ser usadas como vacunas de ADN.

BEVs de muc1 y survivina fueron generadas en contexto de fago M13 y ADN y utilizadas como vacuna terapéutica y profiláctica en un modelo murino de melanoma. Se observó que las BEVs son capaces de inducir un mayor repertorio de células T que los epítomos silvestres, además una de las bibliotecas de muc1 (BFM1) disminuyó la tasa de crecimiento tumoral en un esquema terapéutico. Por otra parte se observó que una sub-biblioteca de BFM1 (denominada pool negativo) generó protección contra el desarrollo tumoral en el 100% de los ratones inmunizados al ser utilizada como vacuna profiláctica. Los resultados sugieren que las BEVs son una estrategia adecuada en el desarrollo de vacunas contra el cáncer.

1. INTRODUCCIÓN

Cáncer

El cáncer es un problema de salud pública a nivel mundial y una de las principales causas de muerte. Sabemos que todos los procesos celulares están altamente regulados, la división celular (mitosis) no es la excepción. Existen una gran cantidad de mecanismos destinados para asegurar que la célula hija tenga una copia fiel e íntegra de la información genética de la célula progenitora, evitando con ello errores en el genoma que pudieran afectar su funcionamiento.

Durante la replicación del ADN es factible que puedan ocurrir errores espontáneos, o bien, inducidos por agentes carcinógenos (físicos, químicos o biológicos). Las células han desarrollado mecanismos de reparación para revertir el daño en el ADN antes de transmitirlo a la célula hija, si los mecanismos celulares no son capaces de revertir el daño, la célula entrará en apoptosis. Cuando una célula no repara el daño en su genoma y además evade la apoptosis, acumulará errores genéticos (mutaciones) que serán transmitidos a las células hijas. El cáncer es el resultado de la acumulación de dichos errores; las mutaciones pueden ocurrir en varios genes, y sus efectos son diversos, por ejemplo la activación de protooncogenes y la inactivación de genes supresores de tumores conllevan a la proliferación descontrolada y la formación de neoplasias [Blagosklonny, 2003 y 2005].

Durante el desarrollo del cáncer, las células involucradas adquieren seis propiedades fundamentales que caracterizan a las células transformadas. En conjunto, estas propiedades se nombran “marcas del cáncer” y son:

a) Autosuficiencia proliferativa: particularmente se asocian dos receptores codificados por protooncogenes, el receptor para el factor de crecimiento epidérmico (EGFR) y el receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico humano (HER2/neu). Ambos son receptores transmembranales con actividad de tirosín-cinasa. Cuando se unen a sus ligandos (factor de crecimiento epidérmico [EGF] y factor de crecimiento transformante-alfa [TGF- α], respectivamente) se inicia una cascada de señalización que promueve la proliferación epitelial [Hanahan, 2011].

b) Insensibilidad a las señales antiproliferativas: las alteraciones más comunes en genes supresores tumorales se relacionan con el gen *TP53* (eliminaciones, inserciones, mutaciones sin sentido). Este gen ayuda a mantener la integridad del genoma al evitar la división de una célula con daño en el ADN, inducido por radiaciones o carcinógenos [Hanahan, 2011].

c) Evasión de la apoptosis: el protooncogén *Bcl-2* codifica para una proteína con características antiapoptóticas (importante en la regulación de la vía intrínseca). [Hanahan, 2011] También se ha reportado la sobreexpresión de una proteína antiapoptótica que se expresa principalmente en el desarrollo embrionario, la survivina, la cual se retoma más adelante para el presente trabajo [Schmitz, 2000].

d) Potencial replicativo ilimitado: los telómeros son los extremos de los cromosomas, son regiones altamente repetitivas no codificantes cuya función principal es la estabilidad estructural de los cromosomas. En cada división de una célula normal, los telómeros se van acortando y cuando llegan a una longitud crítica, las células dejan de dividirse. La telomerasa es una enzima que adiciona nucleótidos en hexámeros TTAGGG a los telómeros, en una célula normal esta enzima está inactiva; sin embargo, debido a que la mayoría de los cánceres la expresan se piensa que la actividad de esta enzima es la responsable de brindar la inmortalidad a las células malignas [Hanahan, 2011].

e) Angiogénesis sostenida: las células tumorales de varios tipos de cáncer promueven la angiogénesis, manifestándose como una abundante microvascularización del tumor, que se asocia con un pobre pronóstico de la enfermedad. Es frecuente que las células tumorales expresen el factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF) que promueve el crecimiento de vasos sanguíneos [Hanahan, 2011].

f) Invasión de tejidos y metástasis: la expresión de moléculas como laminina e integrinas se encuentra reducida, lo que contribuye a la pérdida de adherencia de las células tumorales del carcinoma pulmonar, este fenómeno puede propiciar que una célula tumoral invada tejido adyacente o bien que pueda llegar a vasos sanguíneos y diseminarse hacia otros órganos [Kawaguchi, 2005]. También se ha reportado que en muchos tipos de cáncer se encuentra sobreexpresada la glicoproteína mucina 1 (Muc-1) la cual se ha correlacionado con la progresión del tumor y con su potencial metastásico. Dicha glicoproteína se retomará más adelante, ya que se ha empleado como blanco inmunoterapéutico [VanLith, 2002].

Respuesta inmune

El sistema inmune es el conjunto de órganos linfoides, células y componentes humorales, que brindan protección al hospedero en contra de agentes potencialmente patógenos. Una respuesta inmune disminuida puede resultar en susceptibilidad a infecciones, incapacidad para eliminar tumores o bien, en inmunodeficiencias; mientras que una respuesta excesiva conlleva al desarrollo de reacciones de hipersensibilidad o a enfermedades autoinmunes [Parkin, 2001].

La respuesta inmune se divide en dos partes, de acuerdo con la prontitud y especificidad de la respuesta, y son: respuesta inmune innata y respuesta inmune adaptativa. La respuesta inmune innata es la primera línea de defensa, y esta compuesta de 3 barreras: 1) Barreras anatómicas: divididas a su vez en factores mecánicos (la piel, las células ciliadas del tracto respiratorio), factores químicos con potencial antimicrobiano (ácidos grasos “cerumen”, lisozima, fosfolipasa) y factores biológicos (la flora normal de la piel y del tracto gastrointestinal. 2) Barreras humorales: sistema del complemento, y algunas citocinas que propician una reacción inflamatoria (como interferón (IFN) e IL(interleucina)-1). 3) Barreras celulares: parte de la respuesta inflamatoria consiste en el reclutamiento de células polimorfonucleares (neutrófilos, eosinófilos y basófilos), células NK y macrófagos al sitio de inflamación [Parkin, 2001].

La respuesta inmune adaptativa es una respuesta mediada por linfocitos T y B, no es inmediata y se caracteriza por ser antígeno específica. Existen dos poblaciones diferentes de linfocitos T, los linfocitos T CD8+ o linfocitos citotóxicos (CTL's) y los linfocitos T CD4+ o linfocitos cooperadores (Th). La activación correcta de los linfocitos T requiere de tres señales:

1. la interacción del receptor de célula T (TCR) con el epítipo presentado en el contexto de moléculas del MHC de la célula presentadora de antígeno (Macrófago, célula dendrítica o linfocito B) y de las moléculas coreceptoras CD4 o CD8.

Las moléculas de clase 1 del MHC presentan péptidos de 8 a 10 aminoácidos a los TCR de los linfocitos TCD8+ o CTL's. Algunos residuos proporcionan los motivos de unión a la molécula del MHC por lo que se denominan de anclaje y suelen ser los que se encuentran en las posiciones 2 (generalmente tirosina) y 9 (leucina, isoleucina o valina) o bien en las posiciones 5 (generalmente

fenilalanina o tirosina) y 8 (Leucina o metionina). Los aminoácidos que son utilizados para el anclaje a la molécula del MHC se denominan canónicos.

Las moléculas de clase II del MHC presentan péptidos de 13 a 40 aminoácidos a los TCR de los linfocitos TCD4+. Las posiciones y residuos de anclaje suelen ser más heterogéneos ya que las moléculas de clase II del MHC presentan mayor polimorfismo que las moléculas de clase I [Kint, 2007].

2. La interacción de las moléculas coestimuladoras del linfocito (CD28, CD40L e ICOS) con las de la célula presentadora de antígeno (CD80, CD86, CD40, ICOSL). La falta de moléculas coestimuladoras genera anergia o tolerancia frente al epítipo presentado [Kint, 2007].
3. La presencia de citocinas en el microambiente. La población de linfocitos Th se diferencia en varias subpoblaciones efectoras de acuerdo con el microambiente de citocinas en el que esté inmerso el precursor Th0, si en el microambiente predomina la IL-12 e IFN- γ , el linfocito se diferencia hacia Th1 y éste será capaz de secretar IL-2 e IFN- γ , citocinas importantes en la activación de macrófagos y CTL's. En un microambiente donde predomina la IL-4 se favorecerá el perfil Th2, y los linfocitos con este perfil producen IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 e IL-13, citocinas que colaboran con el linfocito B para diferenciarse en células plasmáticas y producir anticuerpos [Kint, 2007; Parkin, 2001].

Respuesta inmune en cáncer

El sistema inmune desempeña un papel importante en la prevención de tumores, protege al organismo eliminando virus potencialmente oncogénicos, reestablece la homeostasis post-infección revirtiendo el ambiente inflamatorio que pudiera favorecer el desarrollo tumoral y eliminado específicamente las células transformadas nacientes [Swann, 2007].

Las células precancerosas o malignas son capaces de inducir una respuesta inmune [Pardoll, 2002]. Es claro que las células tumorales, debido a su inestabilidad genómica, generarán nuevos antígenos y aún estos se modificarán durante el desarrollo del tumor, favoreciendo así su inmunogenicidad [Pardoll, 2003]. Con un sistema inmune competente, el resultado será la eliminación de las células transformadas o de las células malignas, en un proceso conocido como inmunovigilancia [Kim, 2007; Reiman, 2007]. Actualmente la inmunovigilancia se considera parte de otra teoría más completa, la inmunoedición.

Inmunoedición

La participación del sistema inmune en la prevención del cáncer no siempre culmina con la erradicación de las células transformadas. La presión que ejerce el sistema inmune durante la eliminación de las células transformadas desempeña un papel preponderante, ya que puede editar el fenotipo inmunogénico durante el desarrollo tumoral. La teoría de la inmunoedición nos proporciona una visión más amplia de la participación del sistema inmune en el desarrollo tumoral, para ello contempla tres etapas: a) eliminación, b) equilibrio y c) escape [Kim, 2007; Swann, 2007].

a) Eliminación: corresponde al concepto original de la inmunovigilancia. Este proceso incluye la respuesta inmune innata y adaptativa en contra de las células tumorales. Por la respuesta inmune innata participan las células efectoras NK, NKT y los linfocitos TCR $\gamma\delta$, que son activadas por citocinas inflamatorias relacionadas con macrófagos y células del estroma que circundan a las células tumorales. La secreción de estas citocinas recluta a más células del sistema inmune que producen otras citocinas proinflamatorias como IL-12 e IFN- γ [Kim, 2007; Zitvogel, 2006].

b) Equilibrio: en esta fase ocurre una continua selección de células tumorales, ya que las células más inmunogénicas son eliminadas por los mecanismos citolíticos ya mencionados; sin embargo, aquellas células con poca inmunogenicidad sobreviven y proliferan. Como se recordará, una célula transformada es inestable genéticamente, este hecho influye en gran medida en esta etapa, debido a que aquellas células poco inmunogénicas pueden generar variantes con fenotipos no-inmunogénicos (es en este punto en el que el tumor se vuelve muy heterogéneo), que son los que persisten aún en individuos inmunocompetentes. Se considera que esta etapa puede cursar a lo largo de varios años [Khong, 2002].

c) Escape: la respuesta inmune no logra eliminar todas las variantes surgidas durante el desarrollo tumoral, todas las células no-inmunogénicas o aquellas que en su desarrollo adquirieron mecanismos que les confirieron la capacidad de evadir o suprimir la respuesta inmune, proliferan resultando en el crecimiento del tumor y posteriormente al surgimiento de las manifestaciones clínicas debidas a este [Kim, 2007; Ostrand-Roseberg, 2008] (Ver Figura 1.)

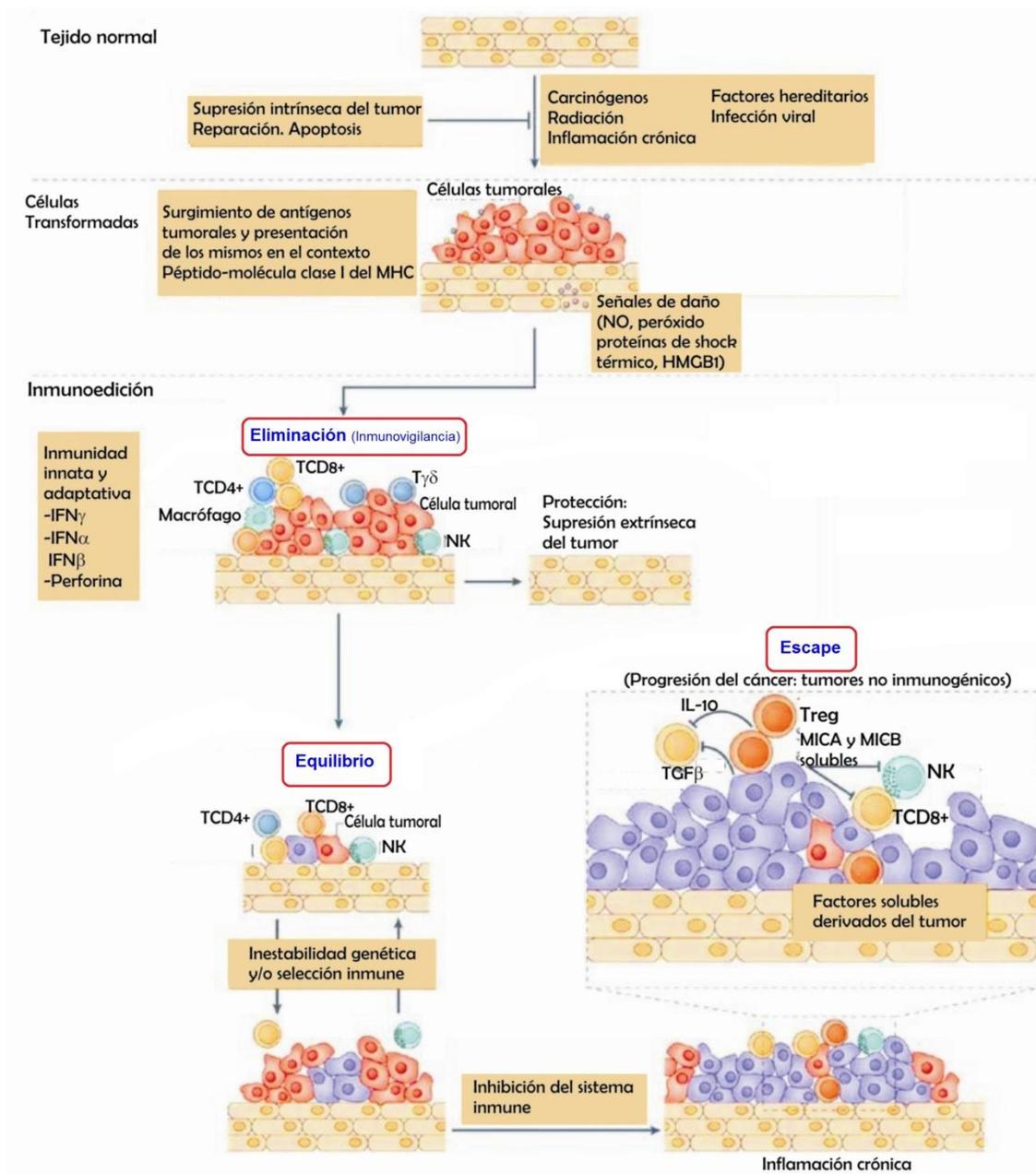


Figura 1: Inmunoección. El proceso de la inmunoección contempla tres etapas: i) Eliminación, ii) Equilibrio y iii) Escape. Se muestra el proceso de carcinogénesis y transformación maligna de algunas células de un tejido normal. A partir de ellas ocurre la primera etapa de la inmunoección, en donde puede ocurrir la eliminación completa de las células transformadas, o bien la supervivencia de aquellas con reducida inmunogenicidad. En la etapa de equilibrio surgen nuevas variantes de las células tumorales poco inmunogénicas. En la tercera etapa, subsisten las células tumorales que han adquirido mecanismos de evasión del sistema inmune, el tumor crece y se manifiesta clínicamente. Para una descripción detallada de esta teoría consultar el texto [Modificada de Gavin, 2006].

Mecanismos de evasión tumoral

Las células tumorales que logran escapar del sistema inmune poseen una gran variedad de mecanismos, los cuales favorecen la progresión de tumor. Estos mecanismos de evasión han sido objeto de múltiples estudios, pues como se podrá inferir, son probables blancos para la inmunoterapia. Entre los mecanismos por los cuales las células tumorales evaden al sistema inmune están los relacionados con las moléculas clase I del MHC, y la vía de procesamiento de antígenos. Inicialmente, las mutaciones en las moléculas clase I del MHC propiciarían el escape de las células tumorales. La deficiencia en la presentación de antígenos o bien, la nula expresión de estas moléculas serían los mecanismos en tumores más avanzados. Mutaciones en el gen de la β 2-microglobulina, o bien mutaciones puntuales o eliminaciones en los genes del MHC I, son las responsables de la reducida o nula expresión de las moléculas clase I del MHC. Así mismo, en algunos cánceres se han observado mutaciones en el proteasoma y en moléculas TAP (que conforman la bomba para transportar los péptidos del citosol al interior del retículo endoplásmico), resultando en defectos en la maquinaria de presentación antigénica [Reiman, 2007; Khong, 2002].

Además de estos mecanismos, los tumores pueden secretar citocinas inmunosupresoras; por ejemplo, los carcinomas pulmonares secretan TGF- β que inhibe la producción de IL-2 e IFN- γ necesarias en la activación y proliferación de los CTL's [Gavin, 2006]. En otros cánceres se presenta la secreción de IL-10 que junto con el TGF- β evitan la activación adecuada de los linfocitos infiltrantes del tumor [Kim, 2007]. Adicionales a esta citocinas inmunosupresoras, las células tumorales son capaces de secretar otros factores solubles, a saber, VEGF que previene la diferenciación y maduración de las células dendríticas además de ser un factor angiogénico; fosfatidil serina soluble que induce una respuesta antiinflamatoria favoreciendo la secreción de IL-10 y TGF- β por los macrófagos; Fas (receptor que desencadena apoptosis por la vía extrínseca) soluble que desempeña un papel para evadir la apoptosis inducida por FasL de la membrana de los CTL's; y finalmente FasL soluble que funge como mecanismo de contraataque tumoral ya que este factor soluble puede interactuar con Fas de la membrana de los CTL's induciendo su apoptosis [Gavin, 2006].

Melanoma

El melanoma es un tipo de cáncer de piel (alrededor del 4% de todos los casos) que involucra a los melanocitos, es decir, aquellas células con la capacidad de producir melanina. Se estima que los pacientes con melanoma detectado tempranamente tienen una supervivencia a 5 años del 95%, mientras que aquellos casos de detección tardía, dicha supervivencia es menor a 6%. Cerca de 132000 casos nuevos de melanoma se diagnostican cada año alrededor del mundo y resulta más frecuente en hombres y personas de raza blanca que habitan regiones con climas soleados. De acuerdo con la Organización Mundial de la Salud, ocurren cerca de 48000 muertes relacionadas con el melanoma cada año [Organización Mundial de la Salud, <http://www.who.int/mediacentre/news/notes/2005/np07/es/index.html>].

Terapia en cáncer

La mayor parte de los cánceres son tratados por tres diferentes métodos. Cirugía, quimioterapia y radioterapia. La quimioterapia y la radioterapia son los más empleados pero conllevan efectos secundarios que disminuyen la calidad de vida de los pacientes, además dichos tratamientos no son totalmente efectivos ni aplicables a todos los tipos de cáncer [Allis, 2012].

En los últimos años ha surgido un nuevo interés por la inmunoterapia, dicha estrategia pretende estimular el sistema inmune del paciente para que él mismo sea quien combata el tumor. La inmunoterapia puede ser activa, induciendo una estimulación de las respuestas del huésped, o pasiva en la que los efectores inmunitarios (células o anticuerpos) son generados en una fuente externa y administrados al paciente [Klebanoff, 2006].

Dentro de las estrategias utilizadas en la inmunidad pasiva se encuentran, la transferencia de CTL tumor específicos, o anticuerpos que generalmente están acoplados a fármacos antitumorales. Por otra parte, las estrategias para desencadenar inmunidad activa se enfocan en el desarrollo de vacunas [Francesco, 2003; Koido, 2009].

Vacunas

En términos generales las vacunas pueden ser consideradas como preparados no patógenos obtenidos de agentes infecciosos o tóxicos que al ser inoculados a individuos

inmunocompetentes inducen un estado específico de protección contra los efectos nocivos del agente de donde provienen. La Organización Mundial de la Salud (OMS) considera a la vacunación como la estrategia más rentable en el control de las enfermedades infecciosas, junto con el mejoramiento de las condiciones de vida como la alimentación y el uso de agua potable [Organización Mundial de la salud, <http://www.who.int/topics/vaccines/es/>].

La historia de la vacunación se remonta a 1796, año en el que Edward Jenner demostró que la inoculación del virus vacuno de la viruela en niños, los hizo resistentes a las epidemias de viruela posteriores. Sin embargo, no fue sino hasta 1881 que Louis Pasteur identificó el proceso de atenuación de cepas virulentas y los usó en los casos de Ántrax, erisipela bovina y rabia, describiendo con ellos al menos tres procesos de atenuación, a saber, el envejecimiento del cultivo, el pase por especies no naturales, y la desecación de tejidos infectados, respectivamente [Munguía, 2003].

Problemas de las vacunas contra enfermedades y patógenos antigénicamente variables.

Como ya se ha mencionado, las vacunas son consideradas como la herramienta más radical en el combate contra las enfermedades, especialmente las infecciosas; sin embargo, existe un contraste dramático entre el pequeño grupo de enfermedades que pueden ser prevenidas por vacunas y el extenso grupo de enfermedades para las cuales no hay vacunas disponibles.

El mayor obstáculo para el desarrollo de nuevas vacunas es la variabilidad genética/antigénica de los agentes patógenos o de enfermedades como el cáncer. La variación antigénica ocurre como resultado de la sustitución de aminoácidos y la evolución genética, fenómeno que ha sido descrito para muchos organismos patógenos como el VIH, virus de la Hepatitis A/B/C, virus de la influenza y dengue, así como en los parásitos de la malaria y tripanosomiasis [Pedroza-Roldán, 2007].

Dada la variabilidad antigénica de los patógenos mencionados anteriormente, ha resultado muy complicado encontrar un antígeno específico, que al ser utilizado en una vacuna tradicional, resulte en protección contra el patógeno del que fue tomado dicho antígeno. El virus de la influenza y el VIH son representativos, se han utilizado regiones conservadas o poco variables de sus proteínas; sin embargo, la respuesta inmune que

generan no es protectora, o bien se utilizan aquellas regiones inmunodominantes aunque la presión del sistema inmune y la elevada tasa de mutagénesis de los virus como el VIH favorecen la aparición de virus mutantes que ya no son eliminados por la respuesta inmune originada por la vacunación con el epítipo inmunodominante original. Por estas razones, resultan claras las limitaciones de las vacunas tradicionales, por lo que es necesaria la búsqueda de nuevas estrategias [Phillips, 1991].

Otro tipo de patologías como el cáncer, se pueden considerar como genética/antigénicamente variable, razón por la cual las vacunas tradicionales tendrían las mismas limitaciones que en el caso del VIH, además el tejido neoplásico tiene una característica adicional que le genera ventaja: se originó de tejido propio.

La dificultad por encontrar antígenos tumor específicos o bien antígenos inmunogénicos así como la amplia variedad genética y antigénica es el principal obstáculo para el desarrollo de vacunas contra el cáncer, debido a la inestabilidad genética y la heterogeneidad de los tumores [Francesco, 2003]. Se han propuesto varios antígenos blanco en el desarrollo de vacunas contra el cáncer. Muchos de estos antígenos se encuentran sobre expresados en células tumorales, como Her 2, Muc-1, etc [American Cancer Society, <http://www.cancer.org/Treatment/UnderstandingYourDiagnosis/ExamsandTestDescriptions/TumorMarkers/tumor-markers-what-are-t-m>]. Otro tipo de antígenos blanco son aquellos que no se expresan en tejidos desarrollados pero si durante el desarrollo embrionario y que por alguna razón su expresión se recupera en células tumorales, ejemplo de estos antígenos se encuentra la proteína oncofetal, y survivina. Otra de las estrategias empleadas para la inducción de inmunidad activa es la transferencia de células dendríticas autólogas pulsadas con péptidos tumorales o material genético que codifican proteínas blanco como Muc-1 y Survivina [Koido, 2009].

Mucina

Mucina 1 (Muc-1) es una glicoproteína transmembranal que se encuentra ampliamente distribuida en tejido normal. Muc-1 tiene un gran dominio N-terminal extracelular que consiste en 20-120 repeticiones en tandem de una secuencia variable de 20 aminoácidos, cada secuencia de 20 aminoácidos (VNTR) contiene cinco sitios potenciales para O-glicosilación. El dominio C-terminal contiene la región de anclaje a membrana y una secuencia de 72 aminoácidos como tallo citoplasmático [Pisarev, 2005].

Muc-1 está sobreexpresada en varios tipos de cáncer como mama, colón, pancreático, pulmonar y ovario. La Muc-1 de los tumores se encuentra aberrantemente glicosilada, presenta cadenas cortas de carbohidratos exponiendo epítomos potenciales de la cadena peptídica. La sobreexpresión de Muc-1 se ha correlacionado con la tumorigenicidad, la migración de células tumorales y la resistencia a agentes quimioterapéuticos [Finn, 1995].

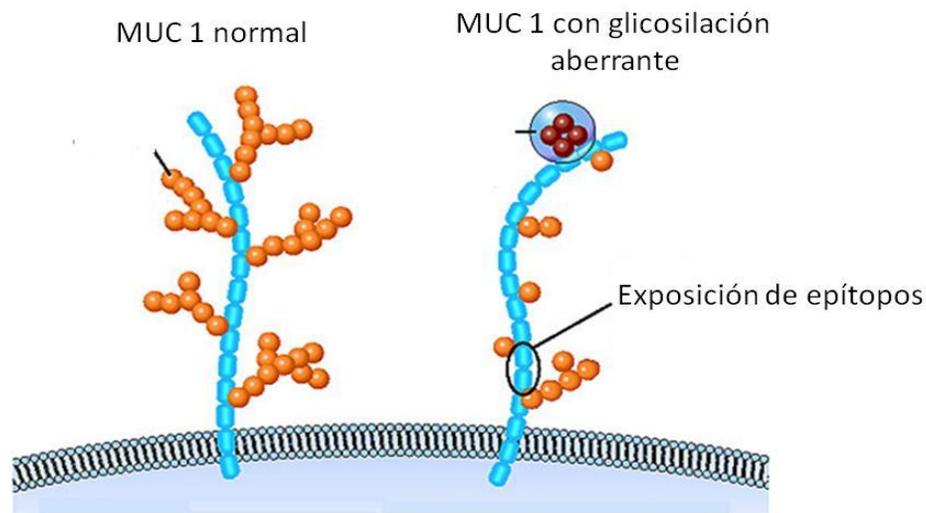


Figura 2: Muc-1. Es una glicoproteína transmembranal ampliamente distribuida en los tejidos. Se muestra en la figura el patrón aberrante de glicosilación y la exposición de epítomos (normalmente ocultos) de la cadena peptídica [tomado de Magazin Merck, 2011].

Survivina

La survivina es una proteína citoplasmática que pertenece a la familia de las IAPs (proteínas inhibidoras de la apoptosis) [Altieri, 2010]. Su función clave se presenta en la regulación de la apoptosis y de la mitosis, en ésta última es necesaria para la formación correcta del huso mitótico y por ende para la adecuada migración de los cromosomas [Mita, 2008]. La expresión de survivina está ausente en la mayoría de los tejidos diferenciados; sin embargo, se encuentra sobreexpresada en varios tipos de cáncer, en donde se correlaciona con un mal pronóstico, la progresión de la enfermedad y la resistencia a las terapias, es junto con Muc-1 un blanco prometedor en la inmunoterapia [Guha, 2009].

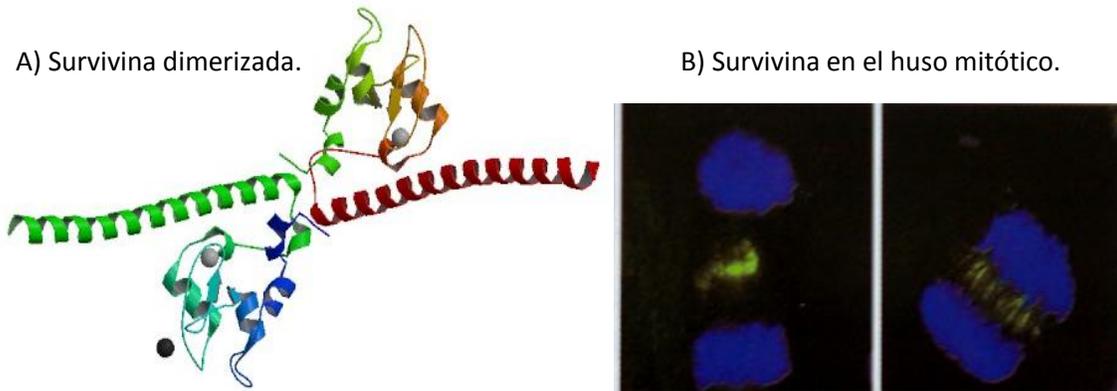


Figura 3: Survivina. Es una proteína perteneciente a las IAPs. Desempeña un papel clave en la regulación de la apoptosis y en la mitosis. En la figura B se observa en verde la presencia de survivina en el huso mitótico [tomado de Espinosa, C. M. “Expresión de la survivina en el cáncer cervicouterino. 2003].

Phage-Display

Esta técnica consiste en desplegar epítopos o antígenos en la superficie de bacteriófagos filamentosos (en adelante “fagos”) para su posterior análisis. Una de las ventajas de dicha técnica es la sencillez y el bajo costo de producción de los fagos recombinantes. Para lograr el despliegue se fusiona el gen de interés con el genoma del fago en la proteína donde se quiera la expresión. Dado que el fago empaqueta la secuencia de ADN que dio origen a sus proteínas podemos tener una relación física entre el epítipo seleccionado y el gen que le codifica [Robles, 2005].

El fago más comúnmente utilizado en phage-display es el fago filamentososo M13, el cual permite desplegar péptidos al azar, fragmentos scFv y Fab de anticuerpos, dominios funcionales de moléculas y despliegue de bibliotecas de ADNc [Monoutcharian, 2005].

El fago M13 mide 900 nm de largo x 6.5 nm de diámetro, posee una cadena sencilla de ADN, infecta células de *E. coli* a través del pilli F; se ensambla en la membrana bacteriana sin causar lisis celular. El ADN del fago contiene toda la información para la síntesis de las 11 proteínas que se requieren para la formación de nuevas partículas virales. La cápside la conforman 2700 copias de la proteína pVIII, 4-5 copias de pIII y pIV a un extremo y 4-5 copias de pVII y pIX al otro (ver figura 4).

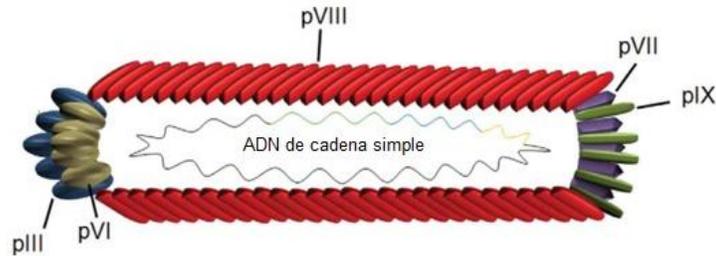


Figura 4: Estructura del fago M13. Se observa la composición de la cápside por las proteínas pIII, pVI, pVII, pIX a los extremos y de pVIII a lo largo del fago. En el interior del fago se encuentra una cadena sencilla de ADN [modificado de web of University of Illinois at Chicago, 2012].

Las proteínas pIII y pVIII son las más frecuentemente utilizadas para el despliegue de péptidos. El número de aminoácidos que se pueden fusionar a pVIII varía, ya que su composición afecta el plegamiento de la proteína fusionada [Rosander, 2004]. Dicha proteína consta de 50 aminoácidos, su región amino terminal está expuesta en la superficie, cuyos primeros 4-5 aminoácidos forman un brazo flexible y a partir de estos se asume una estructura de alfa-hélice hasta la polina de la posición 6 (Pro6) del extremo C-terminal el cual interacciona con el ADN por medio de puentes salinos [Rodi, 2005]. El gen (gVIII) que codifica la proteína pVIII tiene un promotor específico que permite un elevado nivel transcripcional [Vispo, 2004].

Para el despliegue en pVIII uno de los modelos que permite fusionar un mayor número de aminoácidos es el modelo Híbrido tipo 8+8, en el cual los fagos recombinantes presentan cápsides mosaico, es decir, contienen tanto pVIII nativa como pVIII recombinante. Para llevar a cabo este modelo se requiere de dos genes VIII en genomas separados, la versión recombinante se encuentra en un fagémido y la nativa en un fago Helper [Petrenko, 2005].

El uso de fagémidos de alta eficiencia de transformación permite generar amplios repertorios de proteínas recombinantes [Hoogenboom, 1998]. Los fagémidos contienen el origen de replicación para el fago, el origen de replicación plasmídico bacteriano, el gen III u VIII para la fusión con el epítipo de interés, un sitio múltiple de clonación, un gen de resistencia a antibióticos y una señal de empaquetamiento en fago (ver figura 5) [Delmastro, 1997].

El vector fagémido se convierte a fago infectivo por una superinfección con fago helper en células que contienen al fagémido. La proteína recombinante proviene del fagémido y las

demás proteínas necesarias para la formación del fago (incluida pVIII nativa) se encuentran en el genoma del fago helper; el genoma del fago helper tiene un origen de replicación defectuoso, por lo que se favorece el empaquetamiento de la cadena sencilla del fagémido.

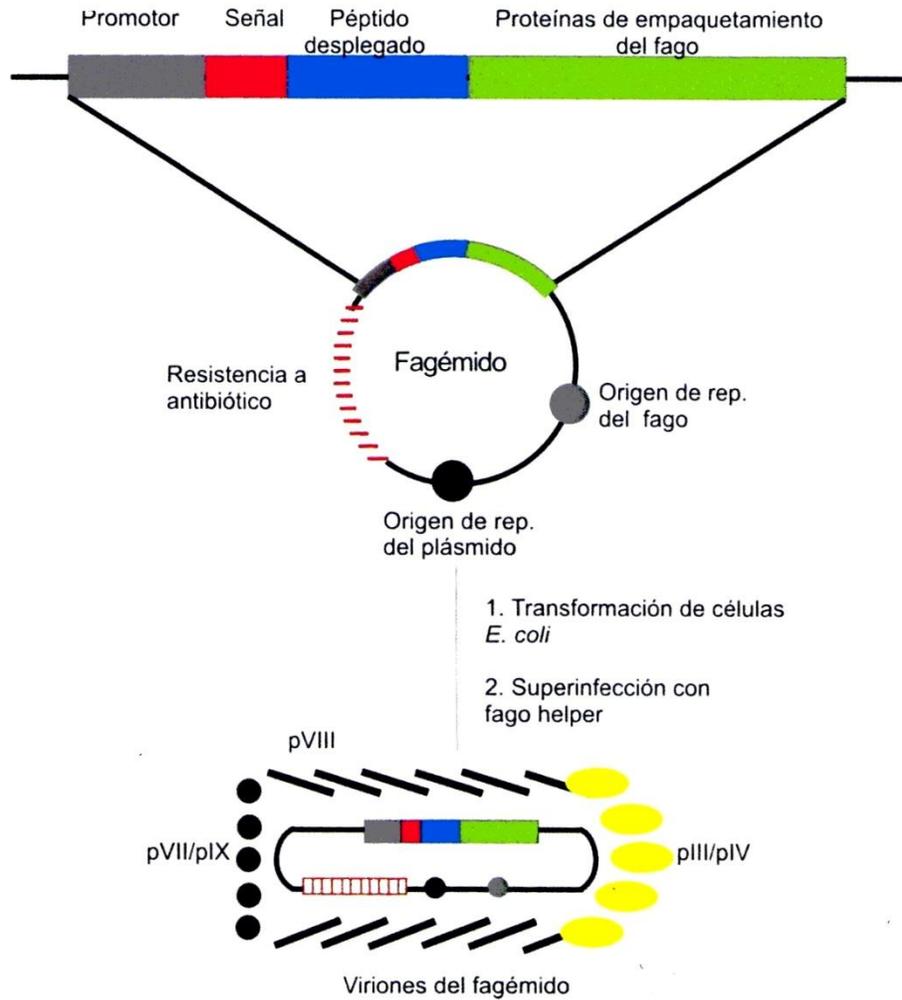


Figura 5: Características de los fagémidos. Un fagémido es un plásmido con un gen de resistencia a antibióticos y dos orígenes de replicación: para el plásmido y para el fago, el cual es inactivo hasta que las células son infectadas con fago helper. El fagémido contiene un sitio múltiple de clonación y una señal de empaquetamiento. Las células transformadas con el fagémido pueden generar fagos infectivos al ser superinfectados con un fago helper, el cual contiene el resto de la información para la formación de partículas virales. El fago helper tiene un origen de replicación defectuoso, por lo que se favorece el empaquetamiento de la cadena sencilla del fagémido en una partícula viral [Modificado de Vectors and Modes of display, 2005]

2. ANTECEDENTES

BEVs

Se ha mencionado la dificultad para el desarrollo de vacunas contra patógenos antigénicamente variables, en nuestro grupo de investigación se ha desarrollado una estrategia que busca enfrentar la variabilidad genética. Se trata de las Bibliotecas de Epítomos Variables (BEVs en adelante), este concepto consiste en tomar la secuencia de aminoácidos de un epítopo, luego mutagenizar una serie de posiciones respetando los aminoácidos de anclaje a las moléculas del MHC-I. En la Figura 6 se muestra un epítopo derivado del loop V3 de la proteína gp120 de VIH-1, dicho epítopo está restringido al haplotipo H-2D^d y es inmunodominante para CTLs. [Pedroza-Roldán, 2009].

RGPGRAFVTI
XGXGXAXVXI

X representa cualquiera de los 20 aminoácidos

Figura 6: Biblioteca de Epítomos Variables. El epítopo silvestre o nominal proviene de la proteína gp120 de VIH-1. La X indica posiciones mutagenizadas en la biblioteca y representa cualquiera de los 20 aminoácidos proteinogénicos, dicha biblioteca tiene una complejidad teórica de 20⁵ epítomos.

En 2009 Pedroza-Roldan et al, reportan que las BEVs en formato de fago filamentoso y de ADN al ser utilizados como inmunógenos en ratones BALB/c, son capaces de inducir una mayor respuesta celular que su respectivo epítopo nominal. También reportan que la complejidad de la biblioteca influye directamente en el reconocimiento; es decir, al utilizar bibliotecas con 4, 3 y 2 posiciones mutagenizadas observaron que el reconocimiento de clonas individuales o variantes del epítopo silvestre era mayor cuanto más posiciones de mutación tenía la biblioteca. En el mismo trabajo se reporta que las BEVs como inmunógenos son capaces de inducir una respuesta inmune de memoria [Pedroza-Roldán, 2009].

En 2011 Charles-Niño et al, reportan que las BEVs antes mencionadas siendo utilizadas como inmunógenos, son capaces de inducir anticuerpos que reconocen al virus VIH, además, demostraron que el suero proveniente de ratones BALB/c inmunizados con

dichos inmunógenos era capaz de neutralizar el 50% de cepas de un panel de virus caracterizados de aislamientos primarios [Charles-Niño, 2011].

Uso de péptidos y mimótopos en vacunas contra el cáncer

En los últimos años se han estado desarrollando vacunas contra el cáncer, una de las estrategias predominantes es la utilización de péptidos. Dichas vacunas buscan incrementar la respuesta inmune directamente en contra de antígenos tumorales ya sean asociados al tumor o específicos (mutados). Se considera una vacuna contra el cáncer “óptima” aquella que es capaz de inducir la respuesta de linfocitos CTL y Th [Berzofsky, 2005; Jordan, 2010; Purcell, 2007, Rosenberg, 2001].

Mirshandi et al. han propuesto una estrategia interesante para cumplir los requisitos de una vacuna óptima; dicha estrategia se enfoca en utilizar una vacuna basada en péptidos sintéticos superpuestos, es decir, una serie de 34 péptidos de 15 aminoácidos que en conjunto cubren la totalidad de la proteína tumoral TPD52 (TPD52 está involucrada en exocitosis y tráfico vesicular) . Ellos reportan que este tipo de vacuna incrementa la población de CTL-tumor específicos; además, en un modelo murino de cáncer de mama se observó que los ratones inmunizados con la vacuna basada en los péptidos superpuestos de TPD52 presentaron mayor sobrevida que aquellos inmunizados con péptidos superpuestos de la proteína Tat (perteneciente al virus de inmunodeficiencia Humana) [Mirshahidi, 2009].

Uno de los inconvenientes con la mayoría de las vacunas basadas en péptidos es que el péptido elegido está restringido a un haplotipo particular de molécula del MHC, además se ha observado que un péptido que tiene las posiciones de anclaje clásicas para las moléculas del MHC no es capaz de inducir una respuesta inmune efectiva [Clay, 1999; Mitchel, 2007].

Varios grupos de investigación han optado por utilizar vacunas contra el cáncer basadas en mimótopos. Los mimótopos, aquellos que imitan epítomos de células T, han sido derivados de epítomos conocidos, por modificación en la secuencia o desarrollados *de novo* utilizando bibliotecas de péptidos, posteriormente se prueban para determinar si son capaces de inducir una respuesta inmune que tenga reactividad cruzada con el epítomo

original [Blake, 1996; La Rosa, 2001; Rubio-Godoy, 2002; Sharav, 2007; Siewert, 2012; Wiesmuller, 2001].

Guevara-Patiño et al, reporta que mutaciones puntuales en epítomos de Tyrp1 favorecen la reactividad cruzada de CTL, lo cual incrementa la supervivencia en un modelo de melanoma y además induce autoinmunidad [Guevara-Patiño, 2006]. De forma similar Brämswing et al., reportan que la inmunización de ratones BALB/c con mimótopos derivados de un epítomo del antígeno carcino embrionario es capaz de brindar protección contra tumores que presentan dicho antígeno [Brämswing, 2007]. En 2009, Bleeker reporta la sustitución sistemática de aminoácidos para generar mimótopos que fueron utilizados como vacuna en un modelo murino de neuroblastoma [Bleeker, 2009].

En los trabajos citados anteriormente se ha demostrado la ventaja de utilizar mimótopos en la elaboración de vacunas; sin embargo, aun quedan puntos clave que mejorar, como la restricción de los mimótopos a un único haplotipo.

Una de las estrategias en la elaboración de vacunas contra el cáncer, en la que el haplotipo parece no importar, es decir la vacuna no está restringida a alguno en particular, es la utilización de péptidos sintéticos superpuestos [Mirshahidi, 2009]. Otra alternativa es la propuesta de Engelhorn M.E., et al, quienes demuestran la inducción de autoinmunidad y protección tumoral (en ratones B6) al utilizar una un gen de Tyrp1 con una gran cantidad de mutaciones al azar como vacuna de ADN [Engelhorn, 2006].

En el presente trabajo, se implementó la utilización de Bibliotecas de Epítomos Variables para el desarrollo de una vacuna contra el melanoma, dicha estrategia tiene la ventaja de incluir gran cantidad de variantes de epítomos y/o mimótopos los cuales pueden generar epítomos con nuevas posiciones de anclaje en moléculas de MHC y aun así ser capaces de inducir una respuesta inmune celular más amplia, como se ha reportado para algunos péptidos con anclajes no canónicos para la molécula clase I del MHC [Lazoura, 2009].

Muc-1 y Survivina como blancos terapéuticos en cáncer.

Se ha mencionado la dificultad para elegir un blanco ideal en el desarrollo de vacunas contra el cáncer, los antígenos tumorales (originados por mutaciones) se han utilizado poco, la mayoría de los esfuerzos se han enfocado en los antígenos asociados al tumor.

Ejemplos de esta clase de antígenos son las proteínas Mucina 1(Muc-1) y Survivina, por las razones que ya se han mencionado en la introducción del presente trabajo.

Muc-1 y Survivina se han utilizado en modelos murinos. La mayoría de las vacunas derivadas de Muc 1 utilizan epítomos de la región extracelular, la cual tiene la capacidad de inducir una respuesta inmune; sin embargo, los resultados en cuanto a su eficiencia en vacunas antitumorales es controversial [Mitchell, 2007; Pisarev, 2005]. Recientemente, Kovjazin et al, reportan la efectividad de un péptido de 21 aminoácidos (que corresponden al péptido señal de Muc-1) para inducir una respuesta celular en contra de tumores que expresan Muc-1, así como el incremento en la supervivencia en un modelo de cáncer de mama [Kovjazin, 2011]. Respecto a survivina, se han utilizado péptidos, mimótopos y células dendríticas pulsadas con péptidos de dicha proteína. Todos los estudios han demostrado la inducción CTLs tumor-específicos y la disminución de la tasa de crecimiento de tumores sólidos [Ciesielski, 2010; Hofmann, 2009; Siegel, 2003].

Muc-1 y survivina también han sido utilizadas en algunas pruebas clínicas; sin embargo, no se han obtenido los resultados esperados. En la Tabla 1 se muestran algunas de las formas en las que han sido utilizadas tanto survivina como Muc-1 en ensayos clínicos [Koido, 2009; Clinical trials, <http://clinicaltrials.gov>].

Tabla 1: Algunas estrategias inmunoterapéuticas donde se utiliza Muc-1 y survivina

Proteína	Cáncer	Estrategia
Muc-1	Colorectal	Vacuna con Muc-1
	Próstata y Ovario	DC cargadas con Tn-Muc-1
	Próstata	Vacuna Muc 17/L-12
Survivina	Mieloma múltiple	Péptido Sur1M2
	Melanoma	DC transfectadas con mRNA de survivina, hTERT.
	Melanoma, próstata	Péptidos de survivina

Estas proteínas son blancos terapéuticos muy prometedores, sin embargo, aun no ha sido desarrollada una estrategia adecuada para la elaboración de vacunas contra el cáncer, es por ello que deben seguirse investigando nuevas estrategias para utilizar Muc-1, survivina y otros antígenos asociados al tumor en vacunas antitumorales, como lo son las BEVs que presenta el presente trabajo.

1. HIPÓTESIS

Los inmunógenos basados en BEVs inducirán una respuesta más amplia de CTLs tumor-específicos y por tanto una mayor protección antitumoral que aquellos basados en un solo epítipo silvestre en modelo murino de melanoma.

2. OBJETIVO

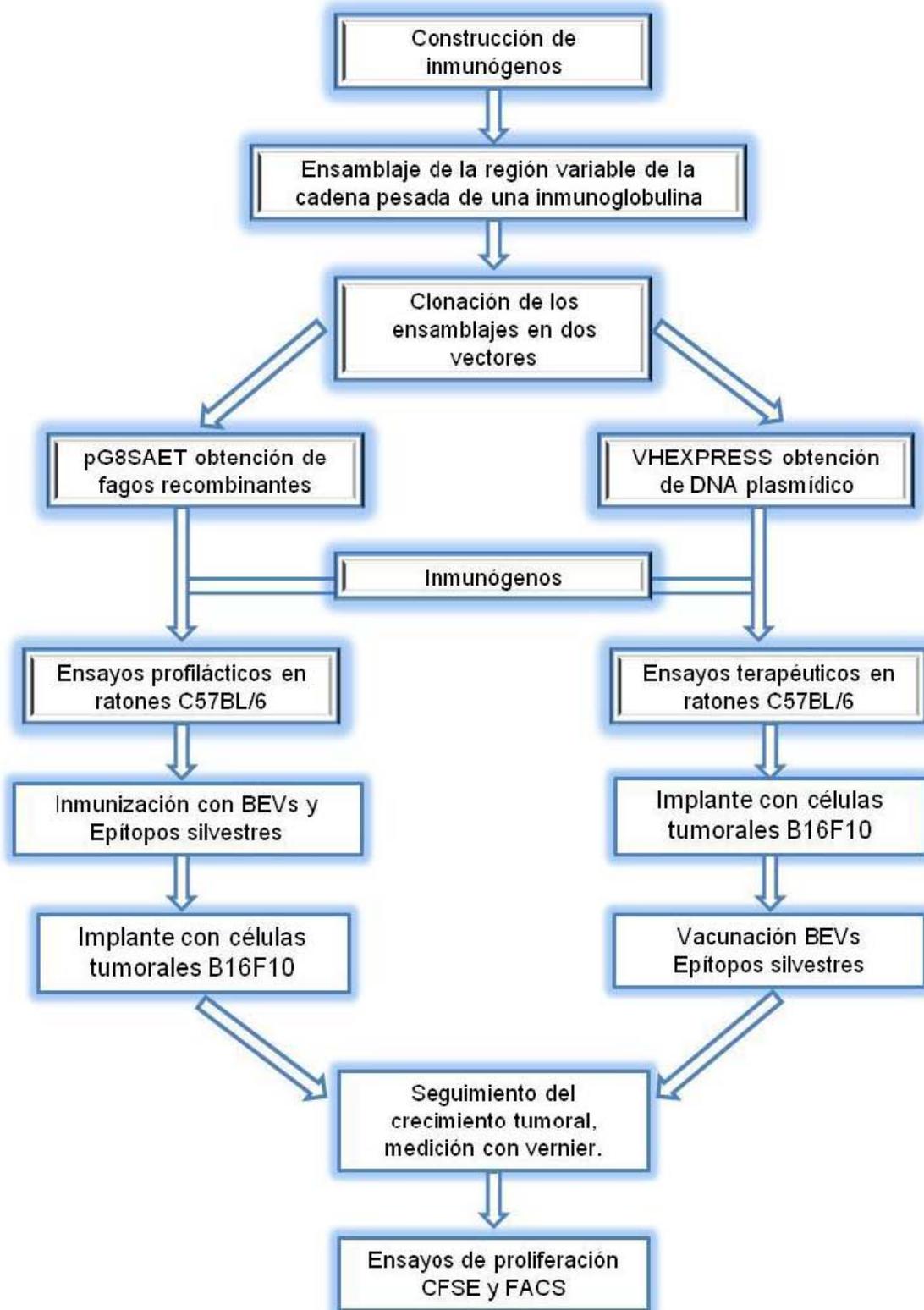
Construir inmunógenos basados en BEVs derivados de antígenos específicos (mucina 1 y survivina) de melanoma murino y evaluar sus efectos antitumorales.

3. OBJETIVOS PARTICULARES

- a) Construcción de BEVs en forma de ADN y Fago M13 recombinante.
- b) Caracterizar las propiedades inmunogénicas de BEVs expresados en forma de ADN y Fago M13.
- c) Evaluar el efecto antitumoral de los inmunógenos generados en un modelo murino de melanoma.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

Estrategia experimental



A) Construcción de los inmunógenos.

Para la construcción de inmunógenos tanto en forma de ADN como expresados en la proteína pVIII del fago M13 se utilizaron 8 oligonucleótidos (B1-B8; cuya secuencia es mostrada en la Tabla 2) que conforman toda la región variable de la cadena pesada de una inmunoglobulina (Ig-VH). Los oligonucleótidos B1-B6 y B8 son los que componen la cadena pesada de la inmunoglobulina y el oligonucleótido B7 que corresponde a la región CDR3 de la inmunoglobulina fue reemplazado por los oligonucleótidos que codifican para los epítomos de survivina y mucina 1 (bibliotecas y silvestres) que han sido elegidos para el presente trabajo. Tanto la estructura de la inmunoglobulina como las secuencias de los epítomos utilizados se muestran en la Figura 7 y Tabla 3, respectivamente.

Tabla 2. Diseño de oligonucleótidos para la construcción de la región variable de la cadena pesada de una inmunoglobulina humana (Ig-VH).

Regiones Ig-VH	Oligonucleótidos
FR 1	B1 5'GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGG GGGGTCCCTGAGACTCTC 3'
CDR 1	B2 5'CCCTGGAGCCTGGCGGACCCAGCTCATGGCATAGCTGCTAAAGG TGAATCCAGAGGCTGCACAGGAGAGTCTCAGGGACCCCCCAGG3'
FR 2	B3. 5-TGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTCTCA 3'
CDR 2	B4 5'GAACCGGCCCTTCACGGAGTCTGCGTAGTATGTGCTACCACCACT ACCACTAATAGCTGAGACCCACTCCAGCCCCTT 3'
FR 3	B5 5'GACTCCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCAGAGACAATTCCAAG AACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGA 3'
FR 3 CDR 3	B6. 5'CGCACAGTAATATACGGCCGTGTCCTCGGCTCTCAGGCTGTTTCAT TTGCAGATAC 3'
CDR3	B7* 5'GCCGTATATTACTGTGCGAAAGGTAGTTACTTTGACTACTGGGGC CAGGGAACCCT GGTC 3'
FR 4	B8. 5'TGAGGAGACGGTGACCAGGGTTCCTGGCCCCA 3'

*El oligonucleótido B7 mostrado corresponde al empleado en la construcción del control VVH. Es dicho oligonucleótido el que es sustituido por aquellos que codifican para los epítomos silvestres o bibliotecas. Los otros controles corresponden a B22 (epítomo de VIH) y KRS5X (biblioteca de un epítomo de ovoalbúmina).

Figura 7. Representa la región variable de la cadena pesada de una inmunoglobulina, la región correspondiente al CDR3 fue sustituida por el epítipo de mucina 1 o survivina.

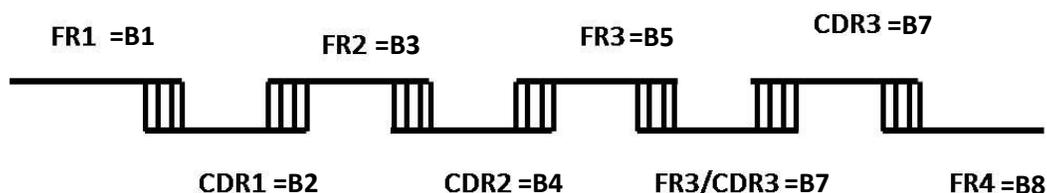


Tabla 3. Epítipos de mucina 1 y survivina. Se presentan las secuencias en aminoácidos de los epítipos y bibliotecas y de nucleótidos de los oligonucleótidos diseñados para cada epítipo silvestre y bibliotecas.

Proteína	Nombre*	Epítipo CTL	Composición BEV
Survivina	BFS3	DLAQCFKLEW 5' GAT CTA GCA CAA TGT TTT TTC TGT TTT AAG GAA CTA GAA TGG 3'	DLAQCFKLEW 5' GAT CTA GCA CAA TGT NNK ** TTC NNK TTT AAG NNK CTA GAA TGG 3'
	BFS1	CFFCFKEL 5' TGT TTT TTC TGT TTT AAG GAA CTA 3'	CFFCFKEL 5' TGT NNK TTC NNK TTT NNK GAA CTA 3'
	BFS2	SGCAFLSV 5' TCA GGT TGT GCA TTT CTA TCA GTA 3'	SGCAFLSV 5' TCA GGT NNK NNK TTT CTA NNK GTA 3'
Mucina 1 (Muc-1)	BFM1	SAPDNRPAL 5' AGT GCA CCA GAT AAT CGT CCA GCA CTT 3'	SAXDNRXAL 5' AGT GCA NNK GAT NNK CGT NNK GCA CTT 3'
	BFM2		SXPXNXPAL 5' AGT NNK CCA NNK AAT NNK CCA GCA CTT 3'
	BFM3		SAXDNXPAL 5' AGT GCA NNK GAT AAT NNK CCA NNK CTT 3'

* Para nombrar los epítipos silvestres o bibliotecas se utilizan tres letras y un número, la primera letra corresponde a 1) B si es biblioteca y 2) N si es el epítipo silvestre o nominal; la segunda letra corresponde al contexto en el que el epítipo será expresado 1) F si es en fago recombinante o 2) D si es ADN; la tercera letra corresponde a la proteína de dónde se obtuvo el epítipo silvestre 1) S de survivina y 2) M de mucina; finalmente el número corresponde al epítipo silvestre que se utilizó o bien a la composición de la biblioteca. De esta forma la denominación BFS1 indica que se trata de una biblioteca en contexto de fago recombinante M13 del epítipo 1 de survivina. Note también que hay tres epítipos silvestres para survivina cada uno con su respectiva biblioteca pero solo un epítipo nominal para mucina del cual se obtienen las tres bibliotecas.

**NNK: donde N representa cualquiera de los cuatro nucleótidos (A,T,G,C) y K puede ser G ó T.

Para el ensamblaje de la Ig-VH se colocaron en un tubo los 8 oligonucleótidos a una concentración de 21pmol/ μ L cada uno, mas el oligonucleótido del respectivo epítipo. A esta mezcla se le adicionó buffer de PCR a una concentración final 1x, 0.75 μ L de MgCl₂ 50 mM, 0.5 μ L de dNTPs 10 mM y 13 μ L de agua. Se realizaron las siguientes incubaciones: 94°C 30s, 84°C 1 min, 74°C 1 min, 64°C 1 min, 54°C 1 min, TA 5 min y 4°C 15min. Finalmente se adicionó 1mL de Taq polimerasa (Fermentas) y se realizaron los siguientes ciclos: 94°C 7 min de desnaturalización; 7 ciclos de amplificación a 94°C 1.5 min, 57°C 2 min, 72°C 2 min y finalmente 2 min de extensión a 72°C (Termociclador Corbett research).

El DNA de dicho ensamblaje fue amplificado por PCR con los primers 5'Damp y 3'Damp (5 pmol/ μ L) que flanquean la región del epítipo y que introdujeron sitios de restricción NcoI/Bam HI, necesarios para la clonación de dicho fragmento en el vector fagémido pG8SAET. Por otra parte, los mismos ensamblajes se amplificaron por PCR con primers 5'Namp y 3'Namp (5 pmol/ μ L) que flanquean el ensamblaje de la cadena VH e introdujeron sitios de restricción Pst I/Bst EII, necesarios para la clonación en el vector VHExpress. Las condiciones de PCR empleadas fueron: desnaturalización 94°C 3 min; 30 ciclos de amplificación 94°C 1 min|57°C 1 min|72°C 1 min y de extensión 72°C 3 min.

Tabla 2. Diseño de oligonucleótidos para la amplificación de las construcciones e introducción de sitios de restricción para su posterior clonación en los vectores de expresión VHExpress y PG8SAET.

Primers para amplificación por PCR	Secuencia de los primers
5Namp	5'ATTCTAGCCATGGTGAATTCCTGCAGGAGGTGCAGCTGTTGGAGTCT3'
3Namp	5'CATGTACGTATGGATCCATTGAGGAGACGGTGACCAGGGT3'
5Damp	5'TGATATTCGTA ^T CTCGAGCCATGGTGTATATACTGTGCG3'
3Damp	5'ATGATTGACAAAGCTTGGATCCCTAGGTTCCCTGGCCCCA 3'

Los productos de la amplificación fueron separados en geles de agarosa al 2% y purificados por medio del kit "Wizard SV Gel and PCR Clean Up System" de Promega. Las digestiones pertinentes se realizaron con 20 U de la enzima de restricción respectiva incubándose 2 h a 37°C con excepción de BstEII que se incubó a 60°C. Los productos de la digestión fueron clonados en sus respectivos vectores utilizando una relación 1:3 molar

de vector:inserto con 10 U de la enzima T4 DNA ligasa (Fermentas) en 15 μ L de volumen final de reacción.

Se realizó la electroporación de ADN de las ligaciones (VHExpress/pG8SAET-inserto) en la cepa TG1 de *E. coli* por medio de un electroporador Gene Pulser II de Biorad. Las células TG1 transformadas fueron plaqueadas en agar selectivo con carbenicilina (50 μ g/mL) para determinar la diversidad de la biblioteca. La complejidad teórica de cada biblioteca fue de 8×10^3 variantes.

B) Rescate de bibliotecas en fago M13 y obtención de antígenos.

Las bibliotecas de fagémidos construidas fueron rescatadas y amplificadas utilizando la cepa TG1 y el fago ayudador (helper) M13K07. Los fagos recombinantes (bibliotecas y con péptidos silvestres) resultantes fueron purificados en un volumen de 100 mL de medio 2X YT seguido de una doble precipitación con PEG/NaCl (20% de polietilenglicol8000 p/v y 2.5 M de NaCl). Los fagos recombinantes purificados fueron resuspendidos en Buffer Tris Salino (TBS).

Por otra parte, se realizó la titulación de los fagos recombinantes por medio de diluciones seriadas y crecimiento en placas con carbenicilina.

C) Extracción de ADN plasmídico para inmunización.

Se realizó la extracción de ADN plasmídico de las bibliotecas y epítomos silvestres por medio del kit Plasmid Maxi Kit de Qiagen. Posteriormente, se realizó la cuantificación de DNA por medio de un nanodrop (Thermo scientific).

D) Inmunización de ratones B6 y evaluación del efecto antitumoral de BEVs.

Se realizaron dos tipos de estudios con dos regímenes de vacunación: uno profiláctico y uno terapéutico. Para el estudio profiláctico se implantaron 3×10^4 células B16F10 (ATCC) viables/100 μ l de PBS en la zona escapular de ratones B6, 6-15 días posteriores a la inmunización con el inmunógeno construido BEVs o silvestres.

Para el estudio terapéutico se implantaron 3×10^4 células B16F10 viables/100 μ l de PBS en la zona escapular de ratones B6, y se inmunizaron después de 5 a 15 días del ímplate con el inmunógeno (BEVs y epítomos silvestres) usando diferentes vías de administración (subcutáneo, intraperitoneal o intravenosa).

Los tumores se midieron en 2 dimensiones cada 3 días utilizando un vernier y el volumen tumoral fue calculado utilizando la fórmula $V = (l \times w^2) / 2$, donde V = volumen (mm^3), l = longitud y w = diámetro.

E) Ensayo de proliferación celular mediante tinción con CFSE

Las células de bazo fueron obtenidas a partir de los ratones después de 15 días de la vacunación y se realizó el ensayo de proliferación por medio de la dilución del fluorocromo Carboxi fluoresceína succinimidil éster (CFSE), para ello se resuspendieron las células en una solución PBS/0.1% BSA precalentada para obtener una concentración final de 1×10^6 células por mL a las que se le adicionan 2 μL de la solución Stock 5 mM de CFSE.

Las células marcadas con CFSE fueron cocultivadas por tres días con los fagos recombinantes ya sea de las bibliotecas o con los epítomos silvestres. En algunos casos se realizó la inmunotinción con anticuerpos anti-CD4, anti-CD8 y anti-IFN γ (Biolegend) de acuerdo al protocolo recomendado por el fabricante. Brevemente, 2×10^5 esplenocitos en solución salina amortiguadora de fosfatos conteniendo 1% de albúmina sérica bovina (BSA) y 0.1% de NaN_3 en adelante denominada PBS/BSA. Posteriormente se adicionaron los anticuerpos anti-CD8 PE y anti-CD4 APC para antígenos de membrana, a la concentración óptima de trabajo incubándose en oscuridad a temperatura ambiente (TA) durante 30 min. Al concluir la incubación, se realizó un lavado con PBS/BSA y las células se fijaron en solución de Lisis (Biolegend) a TA durante 10 min.

Después de realizada la tinción de membrana, se realizó la tinción de antígenos intracelulares, por lo que las células se incubaron a TA por 10 min con la disolución de permeabilización (Biolegend). A las células permeabilizadas se adicionó el anticuerpo anti-IFN γ PERCP a la concentración óptima de trabajo incubándose en oscuridad a temperatura ambiente (TA) durante 30 min. Finalmente las células fueron fijadas con 1% de paraformaldehído.

Finalmente los esplenocitos se analizaron por citometría de flujo para determinar el porcentaje de proliferación de esplenocitos totales o bien el porcentaje de proliferación de las subpoblaciones de linfocitos, así como los porcentajes de dichas subpoblaciones que producen IFN γ .

F) Análisis de los ensayos de proliferación por citometría de flujo

Todas las muestras fueron adquiridas y analizadas en un citómetro de flujo FACScalibur (Becton Dickinson) utilizando el programa CellQuest y el programa FlowJo.

Para el análisis del porcentaje de proliferación de esplenocitos totales, primero se realizó una gráfica de tamaño vs granularidad, de ella se delimitó una región (R1) correspondiente a los esplenocitos. A partir de R1 se realizó un histograma CFSE vs número de células (ver Figura 8).

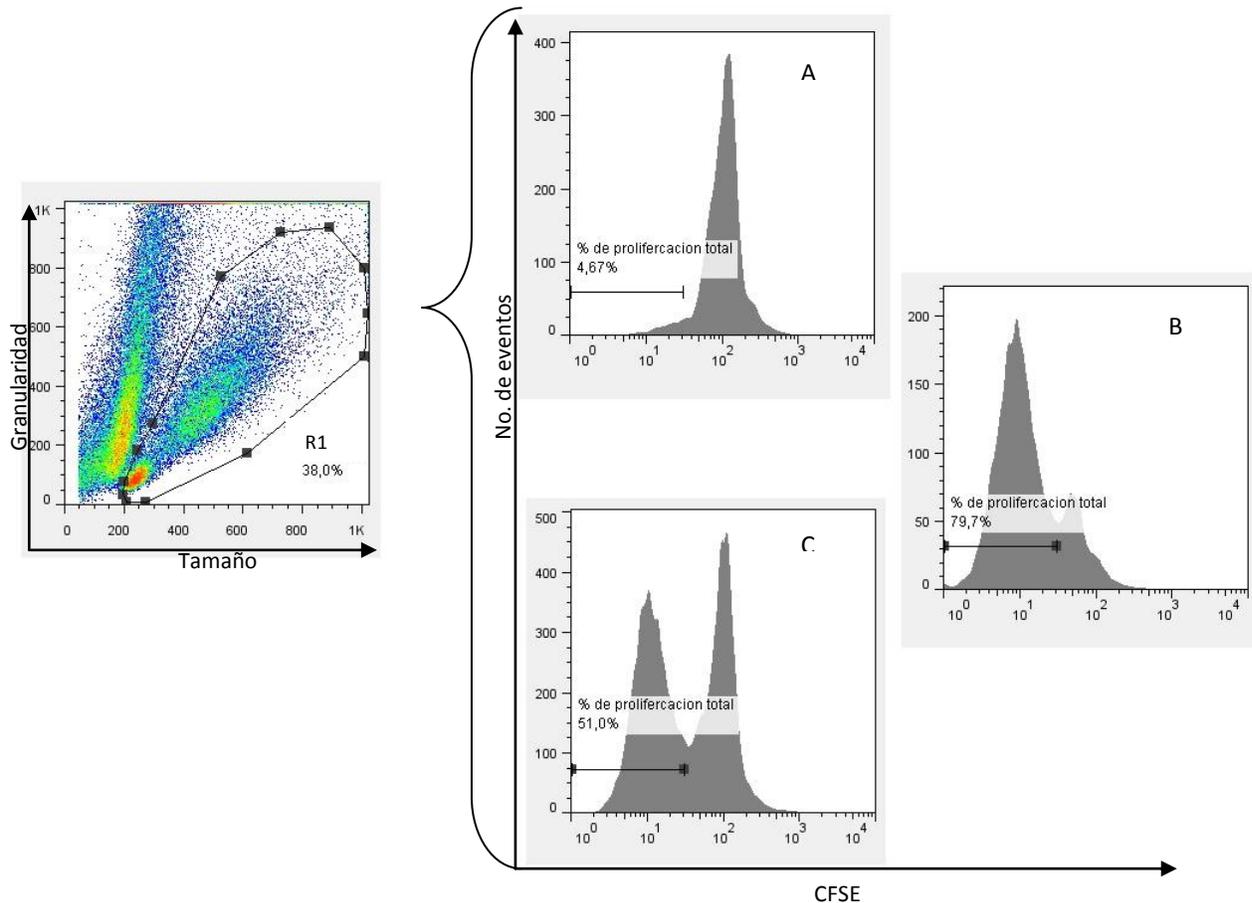


Figura 8. Análisis representativo del porcentaje de proliferación total. En la gráfica tamaño vs. Granularidad se delimitó la región de esplenocitos (R1), de ella se construyó el histograma donde se muestra la fluorescencia para CFSE. En A se muestra el pico de esplenocitos que no proliferaron, estos fueron cultivados sin fago o mitógeno, esta población se utilizó para colocar el marcador (barra). En B se observan los esplenocitos cultivados con Concanavalina A (control positivo de proliferación). En C se observa una muestra cultivada con fago recombinante.

Para el análisis de los porcentajes de proliferación de las subpoblaciones CD4+ o CD8+ y el porcentaje de dichas subpoblaciones productoras de IFN γ , se realizó un análisis similar. Se construyó una gráfica de tamaño vs. granularidad de la que se delimitó una región (R1). Con respecto a R1 se realizó un dotplot CD4 vs CD8, se seleccionaron dos regiones CD4+ (R3) y CD8+ (R4), con dichas regiones se construyeron graficas CD4 o CD8 vs. IFN γ y se determinó el porcentaje de células CD4+IFN γ + o CD8+IFN γ +. Además, con las regiones R3 y R4 también se realizaron sendos histogramas CFSE vs Número de células, para determinar el porcentaje de proliferación de dichas subpoblaciones (ver Figura 9).

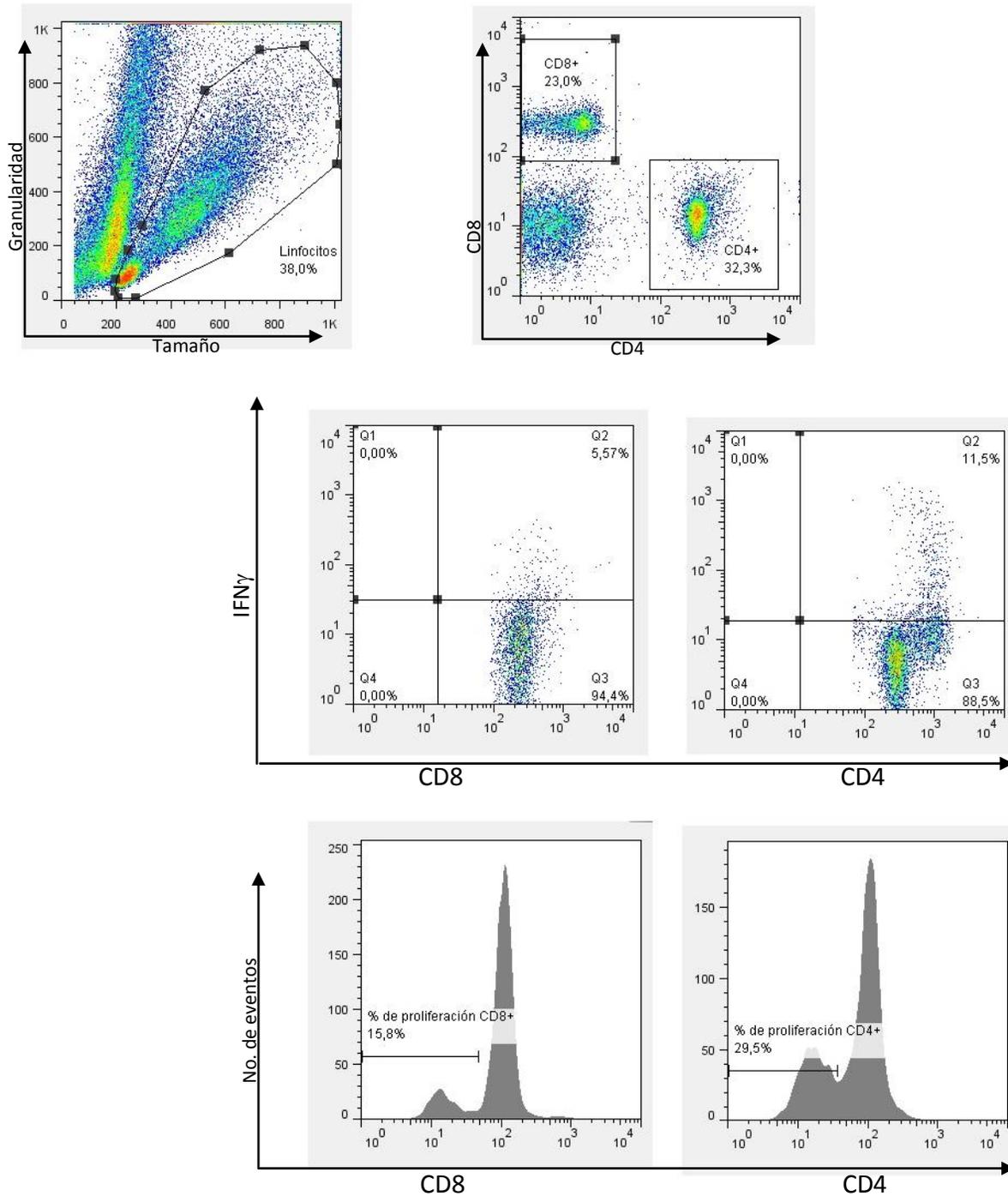


Figura 9. Análisis representativo del porcentaje de las poblaciones CD4+IFN γ + y CD8+IFN γ + así como del porcentaje de proliferaci3n de la poblaci3n de esplenocitos CD4+ y CD8+. En la gráfica tamaño vs. Granularidad se delimitó la regi3n de esplenocitos (R1), de ella se construy3 una gráfica CD4 vs CD8 y de ah3 se seleccionaron dos subpoblaciones (CD8+ y CD4+). Con dichas subpoblaciones se realizaron los gráfcos CD4 o CD8 vs. IFN γ +, donde se determin3 el porcentaje de las poblaciones CD4+IFN γ + y CD8+ IFN γ +. De forma similar al análisis de la figura 2, se construyeron los histogramas donde se determin3 el porcentaje de proliferaci3n de las poblaciones CD4+ y CD8+.

5. RESULTADOS

A) Construcción de los inmunógenos (BEVs y nominales)

Cada uno de los inmunógenos (epítomos silvestres o nominales, BEVs y controles) fueron generados mediante PCR usando oligonucleótidos estándares y degenerados (secuencia mostrada en materiales y métodos), en la Tabla 4 se muestran nuevamente los epítomos utilizados y las bibliotecas correspondientes.

Tabla 4. Epítomos de mucina 1 y survivina

Proteína	Nombre	Epítomo CTL	Composición BEV
Survivina	BFS3	DLAQCFFCFKELEW	DLAQC XFXFKX LEW
	BFS1	CFFCFKEL	CXFXFXEL
	BFS2	SGCAFLSV	SGXXFLXV
Mucina 1 (Muc-1)	BFM1	SAPDNRPAL	SAXDXRXAL
	BFM2		SXPXNXPAL
	BFM3		SAXDNXPXL

Se emplearon como epítomos control en contexto de fago M13 recombinante: B22 (ALQRLFFTC) que proviene de la biblioteca construida a partir de un epítomo (AMQMLKETI) de la proteína gp120 de VIH y KRS5X que es una biblioteca construida a partir de un epítomo de ovoalbúmina (SIINFEKL).

Como se mencionó en materiales y métodos se realizó un ensamblaje con 8 oligonucleótidos que codifican para la región variable de la cadena pesada de una inmunoglobulina, en donde se sustituyó la región CDR3 por el oligonucleótido que codifica al epítomo deseado. Posteriormente, se amplificó y se verificó por electroforesis en geles de agarosa que existiera el producto de la amplificación, que corresponde a aproximadamente 100 pb para el fragmento que se insertó en pG8SAET y a 450 pb para aquel fragmento insertado en el vector VHexpres. En la Figura 10 se muestra una figura representativa de los ADN amplificados de 100 pb.

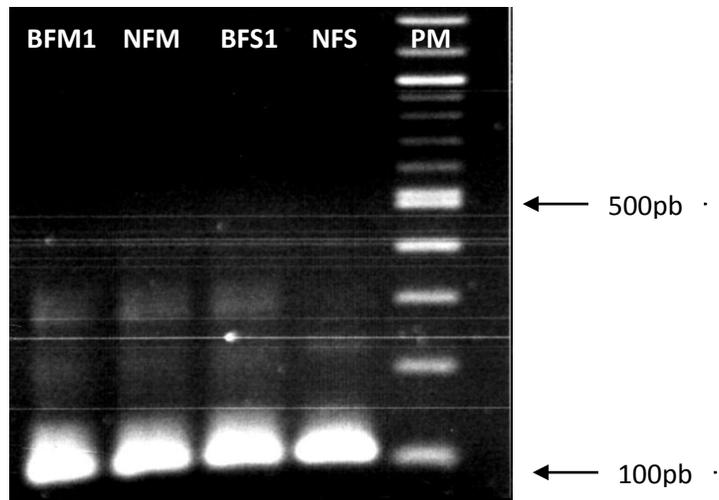


Figura 10. Se observa en la fotografía las bandas correspondientes a 100 pb. Los carriles mostrados corresponden a dos BEVs y dos Nominales.

Con los fragmentos de interés amplificados se realizó la digestión de los mismos y de los vectores con las enzimas de restricción mencionadas, posteriormente se realizó la ligación y electroporación de acuerdo a lo descrito en materiales y métodos.

Finalmente se verificó que las bacterias obtenidas tuvieran los plásmidos con los insertos de interés, para ellos se realizó una PCR de colonia bajo las mismas condiciones en la que se realiza la amplificación de los ensamblajes. En la Figura 11 se muestran la fotografía de un gel de electroforesis en el que se observan los fragmentos de 100 pb que indican que las bacterias transformadas contienen los plásmidos con insertos deseados.

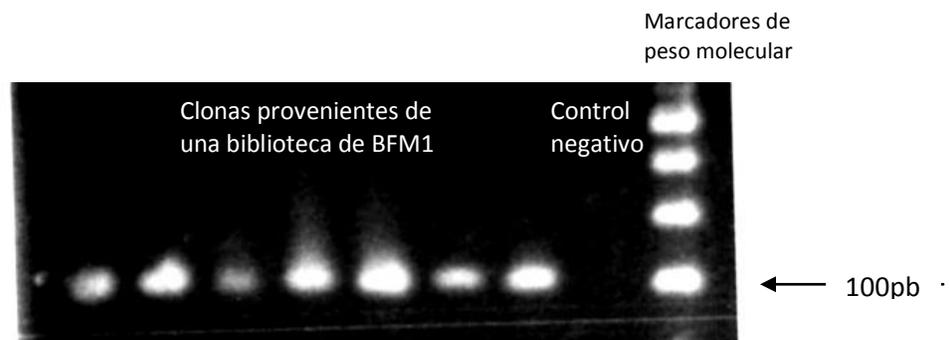


Figura 11. Se observa en la fotografía las bandas correspondientes a 100 pb. Los carriles mostrados corresponden a siete clonas transformadas y un control negativo (bacteria no transformada).

Lo descrito anteriormente se repitió para cada una de las BEVs y de los epítomos silvestres o nominales. Algunas de las clonas obtenidas fueron secuenciadas para verificar que las clonaciones fueron realizadas correctamente. La Tabla 52 muestra algunas secuencias de clonas de la biblioteca de mucina BFM1 y de la biblioteca de survivina BFS1.

Tabla 5. Secuencia de algunas clonas individuales pertenecientes a las bibliotecas BFM1 y BFS1

Mucina BFM1	Secuencia nominal →	AGT	GCA	CCA	GAT	AAT	CGT	CCA	GCA	CTT
	Aminoácido que codifica →	S	A	P	D	N	R	P	A	L
	1.1	AGT	GCA	GAA	GAT	ACT	CGT	CAA	GCA	CTT
		S	A	E	D	T	R	Q	A	L
	1.5	AGT	GCA	CAT	GAT	ACA	CGT	ACG	GCA	CTT
		S	A	H	D	T	R	T	A	L
	1.6	AGT	GCA	AAG	GAT	TAG	CGT	ACT	GCA	CTT
		S	A	K	D	Q	R	T	A	L
	1.7	AGT	GCA	GTT	GAT	UGG	CGT	AGU	GCA	CTT
		S	A	V	D	W	R	S	A	L
1.8	AGT	GCA	GTA	GAT	CCG	CGT	CCA	GCA	CTT	
	S	A	V	D	P	R	P	A	L	
Survivina BFS1	Secuencia nominal →	TGT	TTT	TTC	TGT	TTT	AAG	GAG	CTA	
	Aminoácido que codifica →	C	F	F	C	F	K	E	L	
	BFS 1.1	TGT	AGG	TTC	TAG	TTT	AGG	GAG	CTA	
		C	R	F	Q	F	R	E	L	
	BFS 1.2	TGT	GAT	TTC	TAG	TTT	TAT	GAG	CTA	
		C	D	F	Q	F	Y	E	L	
	BFS 1.3	TGT	AGT	TTC	GTG	TTT	TAG	GAG	CTA	
		C	S	F	V	F	Q	E	L	
	BFS 1.4	TGT	TAG	TTC	AAG	TTT	TAG	GAG	CTA	
		C	Q	F	K	F	Q	E	L	
BFS 1.5	TGT	TGT	TTC	TAT	TTT	AAT	GAG	CTA		
	C	C	F	Y	F	N	E	L		

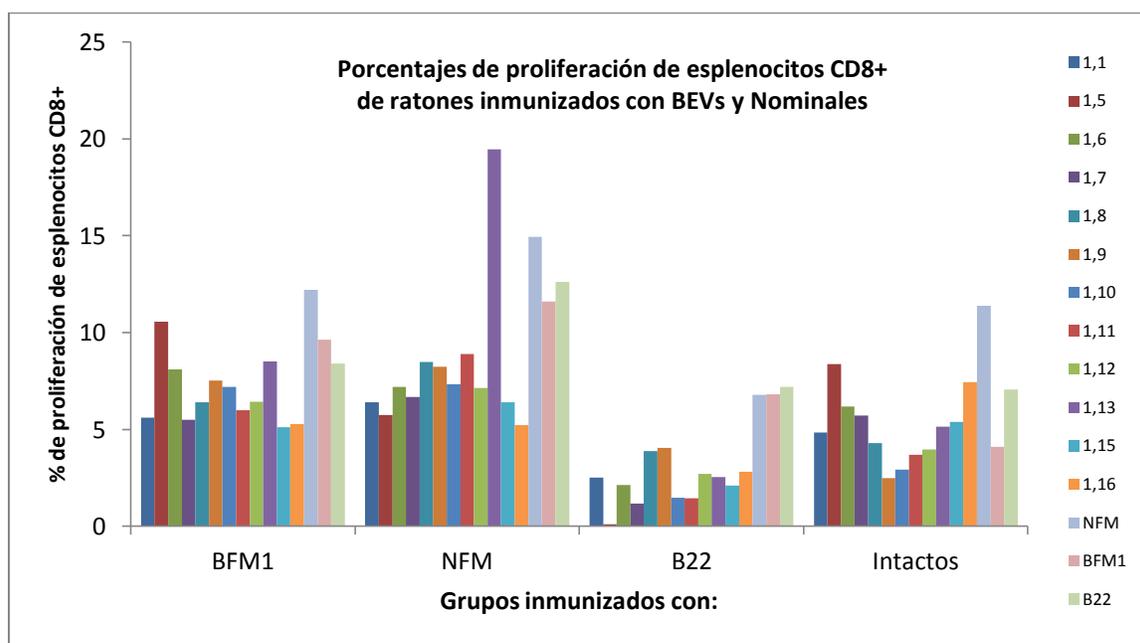
Finalmente con las bacterias transformadas, se procedió al rescate de fagos recombinantes o bien a amplificar y purificar los plásmidos para las inmunizaciones.

B) Evaluación de la inmunogenicidad de las BEVs

Se realizó un ensayo para determinar la capacidad inmunogénica de las construcciones, se utilizaron grupos de 5 ratones, los cuales fueron inmunizados con BFM1, NFM, B22, Mix BFM1/BDM1, Mix NFM/NDM, Mix VVH/B22. Con dosis de 1.5×10^{10} fagos y 250 μ g de ADN según el grupo. El protocolo de inmunización consistió en un “prime” con la dosis indicada el día 1, posteriormente se realizó un refuerzo (boost) al día 6, los fagos se

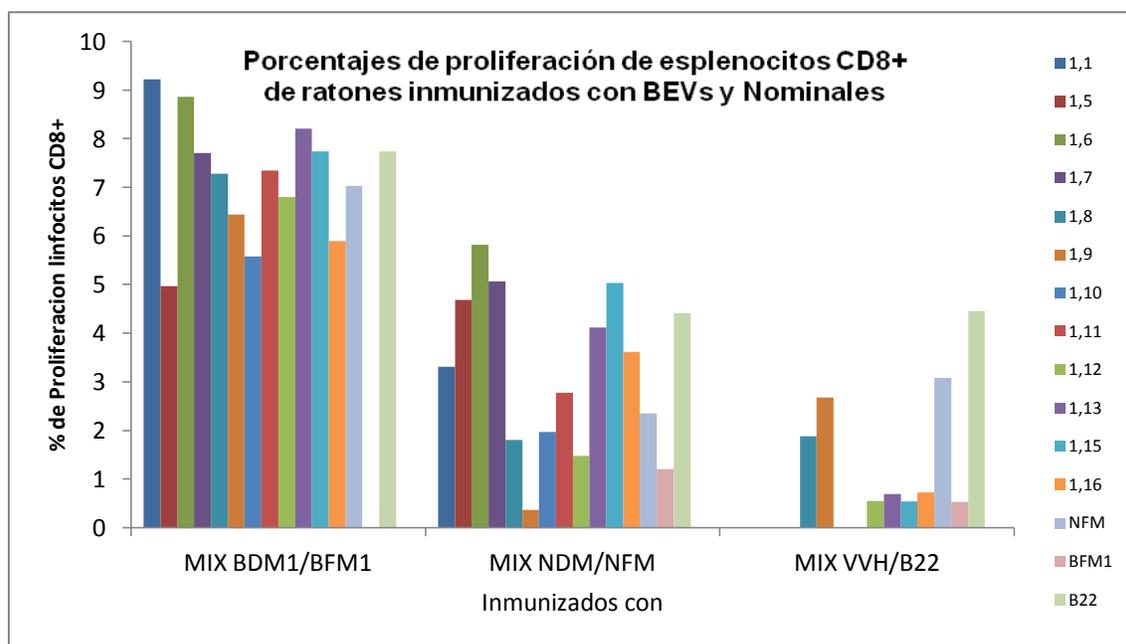
administraron vía i.p. y los Mix ADN/fago vía subcutánea. Al cabo de 20 días se realizaron ensayos de proliferación como se indicó en materiales y métodos, los esplenocitos se estimularon con las bibliotecas, los nominales, y las variantes individuales de epítomos durante 72 h.

En la Gráfica 1 se muestra el porcentaje de proliferación de esplenocitos CD8+ de los grupos inmunizados con fago. Se puede observar que en general los esplenocitos CD8+ provenientes de ratones inmunizados con BFM1 y NFM tienen un comportamiento similar (porcentaje de proliferación 5-10%). Se observa también que los esplenocitos provenientes de ratones inmunizados con NFM proliferan en mayor porcentaje frente a BFM1, NFM e inclusive fago control B22 que aquellos provenientes de la inmunización con BFM1. Por otra parte, los esplenocitos provenientes de ratones inmunizados con B22 (fago con epítomo no relacionado) presentan bajos porcentajes (<5%) de proliferación frente a variantes.



Grafica 1. Proliferación de esplenocitos CD8+ de ratones inmunizados con NFM1, BFM1 y B22. En la gráfica se observan los porcentajes de proliferación frente a variantes individuales de BFM1. Los porcentajes determinados con los grupos inmunizados con BFM1 o NFM son muy similares, sin embargo, el grupo inmunizado con NFM presenta un porcentaje de proliferación contra B22 (epítomo no relacionado).

En la Gráfica 2 se muestran los porcentajes de proliferación de esplenocitos CD8+ de los grupos inmunizados con Mix ADN/fago. Se observa que el comportamiento es diferente al observado en la inmunización con fago solo. En el contexto de Mix ADN/fago, para el caso de los esplenocitos provenientes del grupos NDM/NFM y VVH/B22, el reconocimiento hacia las clonas individuales es menor en comparación con las células obtenidas de ratones inmunizadas con Mix BDM1/BFM1.



Gráfica 2. Proliferación de esplenocitos CD8+ de ratones inmunizados con mix fago/ADN. En la gráfica se observa que los esplenocitos provenientes del grupo inmunizado con mix BDM/BFM1 presentan porcentajes de proliferación mayores que los del grupo nominal. Nótese que a diferencia de la inmunización exclusiva con Fago, el reconocimiento de B22 por parte del grupo inmunizado con NDM/NFM es menor.

De las Gráficas 1 y 2 se determinó que la inmunización con las bibliotecas BDM1 y BFM1 induce respuesta inmune que favorece un mayor porcentaje de proliferación de las poblaciones de esplenocitos CD8+ (se mantienen de 5-10% en ambos tipos de inmunización) específicas para variantes (mutantes) de epítomos presentes en las BEVs, por lo que se evaluó el efecto antitumoral de los inmunógenos construidos.

C) Evaluación del Efecto antitumoral de BEVs y Nominales

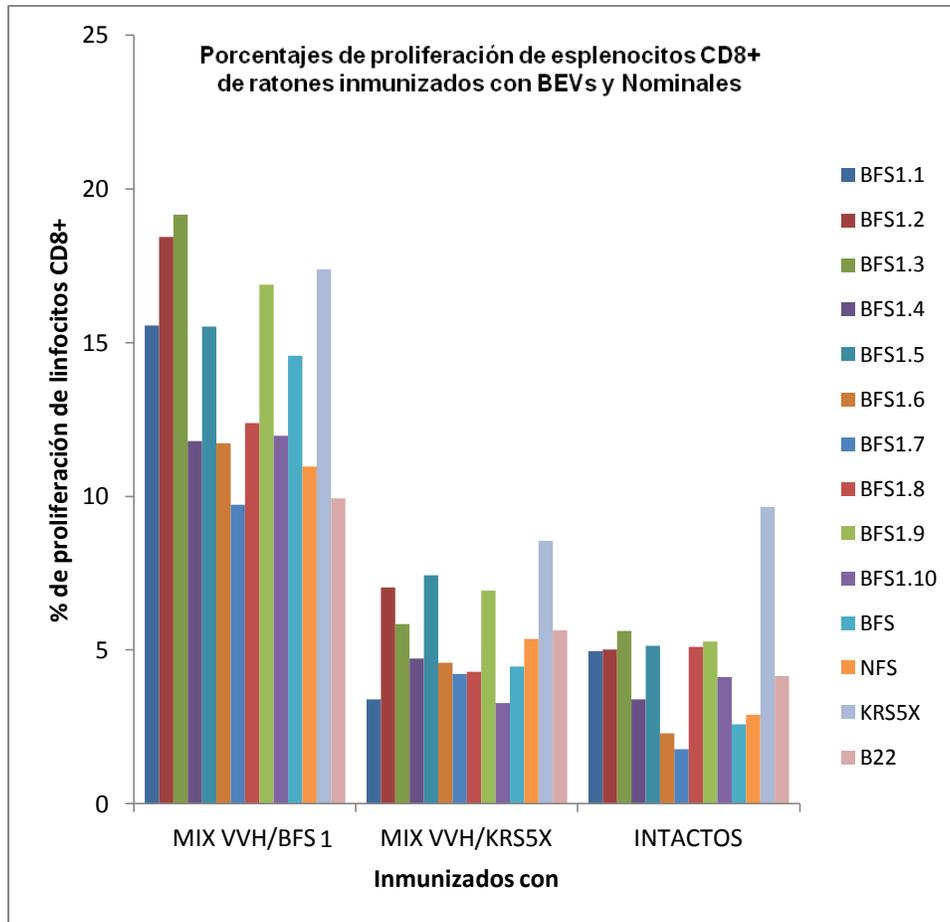
- **Proliferación de esplenocitos CD8+ en experimentos terapéuticos**

Se realizó un experimento terapéutico en donde el trasplante fue realizado con 3×10^4 células tumorales B16F10, al 6° día se comenzó el protocolo de inmunización “prime-boost” (250 μ g de ADN y 1.5×10^{10} fagos) con Mix BFM1/BDM1, Mix NFM/NDM, Mix VVH/BFM, Mix VVH/BFS y Mix VVH/KRS5X (KRS5X es una biblioteca proveniente de un epítipo de ovoalbúmina, por lo que es un control de biblioteca de BEV) Finalmente a los 30 días se sacrificaron los ratones y se realizaron ensayos de proliferación análogos a los anteriores.

En este experimento no se presentaron diferencias significativas en la dinámica de crecimiento tumoral; sin embargo, se presentó un fenómeno que no esperábamos, a saber, se observaron dos comportamientos diferentes en los ratones inmunizados con Mix NDM/NFM, el primer subgrupo desarrolla tumor y el segundo subgrupo incluye ratones que presentaron unas lesiones en la zona de implante y que no desarrollan tumor. Dichos subgrupos presentaron perfiles de proliferación diferencial frente a las clonas individuales de la biblioteca BFM1 aunque las diferencias no son concluyentes por la cantidad de ratones presentes en cada subgrupo.

Respecto a la inmunización con mix BDM/BFM1 se obtuvieron porcentajes de proliferación bajos (0-3%) comparados con la inmunización en ausencia de tumor (5-10%), sugiriendo que el tumor ha provocado un sistema inmune debilitado o bien suprimido.

En la Gráfica 3 se presentan los grupos inmunizados con los epítipos de survivina, dos grupos fueron inmunizados con VVH como ADN no relacionado en combinación con fagos recombinantes de la biblioteca BFS1 o KRS5X. El grupo al que se le administró la biblioteca BFS1 fue capaz de responder fuertemente frente a variantes de la biblioteca de survivina BFS1 (>10%), contrastando con el grupo que fue inmunizado con KRS5X y con el grupo de ratones intactos (<7%). El porcentaje de proliferación del grupo intactos puede corresponder a activación no específica.

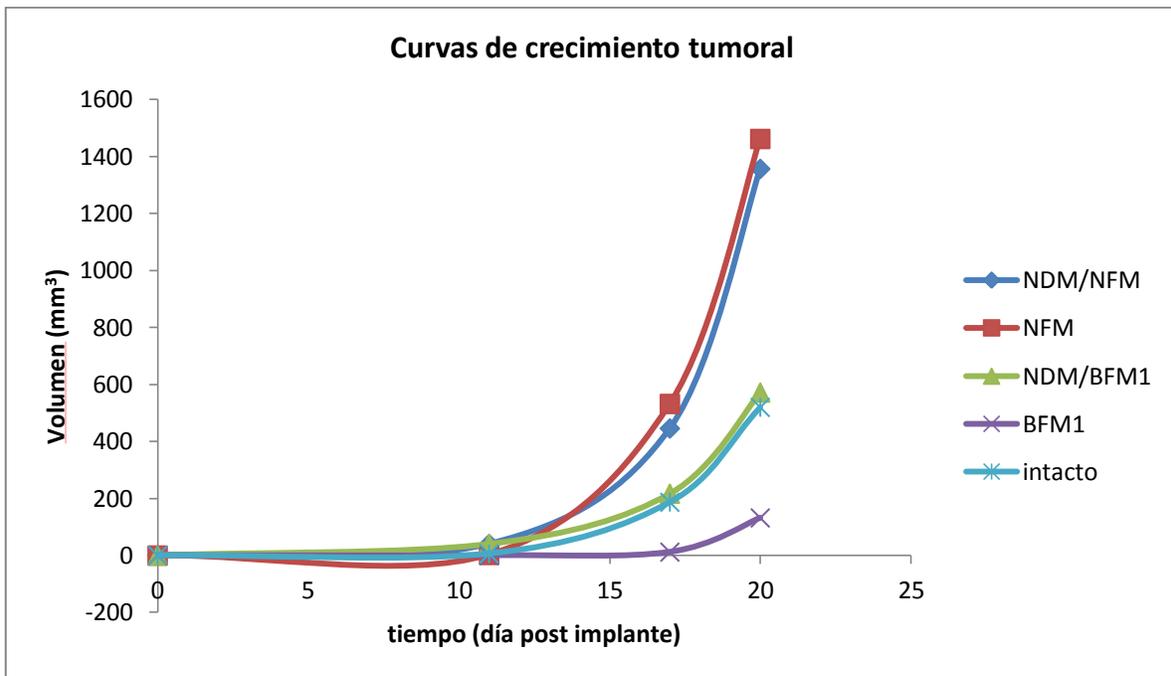


Grafica 3. Proliferación de linfocitos CD8+ de ratones retados con 3×10^4 células B16F10 e inmunizados con Mix fago/ADN. Se observa en está gráfica el comportamiento de los grupos inmunizados con la biblioteca de survivina BFS1 en mix con ADN que contiene un epítipo no relacionado (VVH).

Como ya se mencionó, en el experimento terapéutico antes descrito no se obtuvieron diferencias en el crecimiento tumoral entre los diferentes grupos, por lo que se decidió utilizar el régimen “prime-boost” con los inmunógenos por separado, es decir, administrar una primera inmunización (prime) con ADN y un refuerzo (boost) con fago M13 recombinante. Así mismo se crearon grupos para un régimen prime-boost ambos con fago M13 recombinante.

- **Efecto de la inmunización en el crecimiento tumoral**

Se muestran en las Gráficas 4 y 5 las curvas de crecimiento tumoral de un experimento terapéutico donde se comparan la inmunización tipo “prime-boost” ADN-fago con fago-fago. Para dicho experimento se utilizaron 250 μg de ADN vía s.c. y 10^{11} fagos vía i.p. El “prime” se realiza al día 6 y el “boost” al día 12.

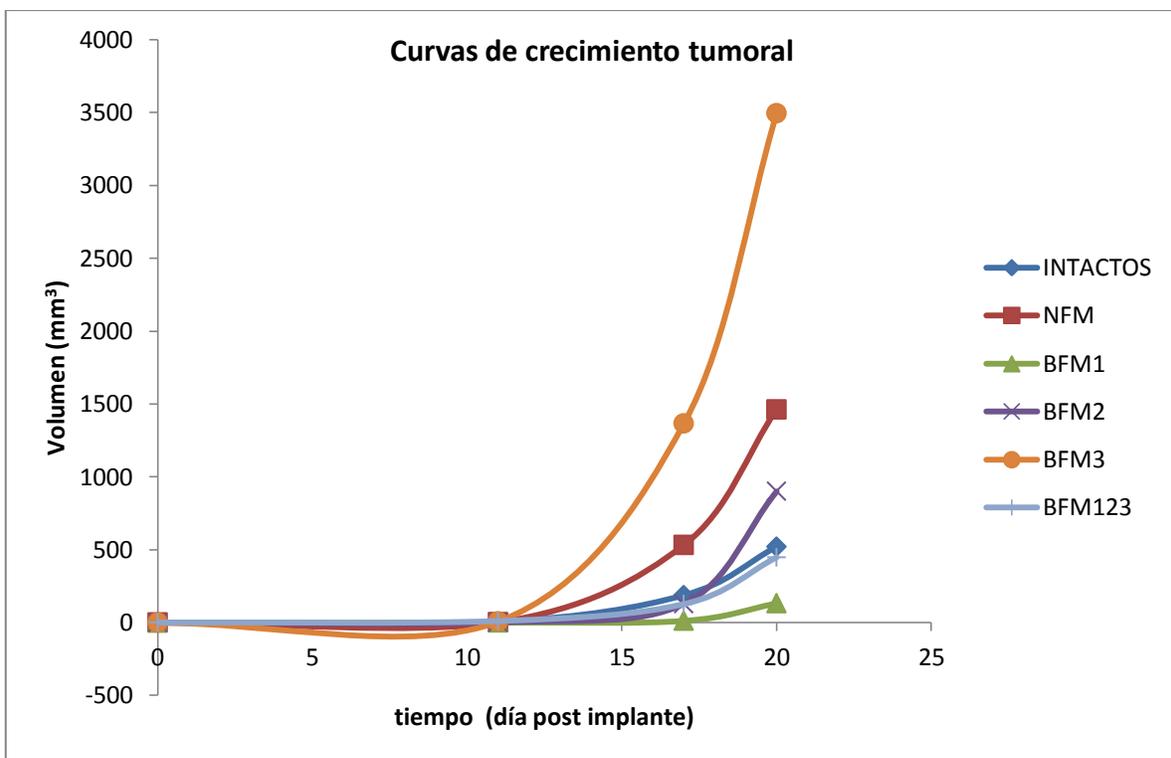


Gráfica 4. Crecimiento tumoral, NFM vs BFM1. “Prime” al 6º día y “boost” al 12º. Se observa una importante inhibición en el crecimiento tumoral de los ratones inmunizados con BFM1

En la Gráfica 4 se observa fuerte inhibición del crecimiento tumoral en los ratones inmunizados con BFM1, si bien dicha diferencia no fue comprobada estadísticamente debido a la muerte de varios ratones de los grupo inmunizado con BFM1 e intactos, podemos observar dicha tendencia. También se observa un fenómeno interesante, comparando las curvas de crecimiento de los tumores en ratones inmunizados con BFM1 vs NDM/BFM1 se puede notar que pese a que ambos han sido inmunizados con la biblioteca, el hecho de que un grupo haya sido inmunizado previamente con el epítipo

nominal en contexto de DNA lo hace menos capaz de controlar el crecimiento del tumor, posiblemente debida al fenómeno de interferencia inmune.

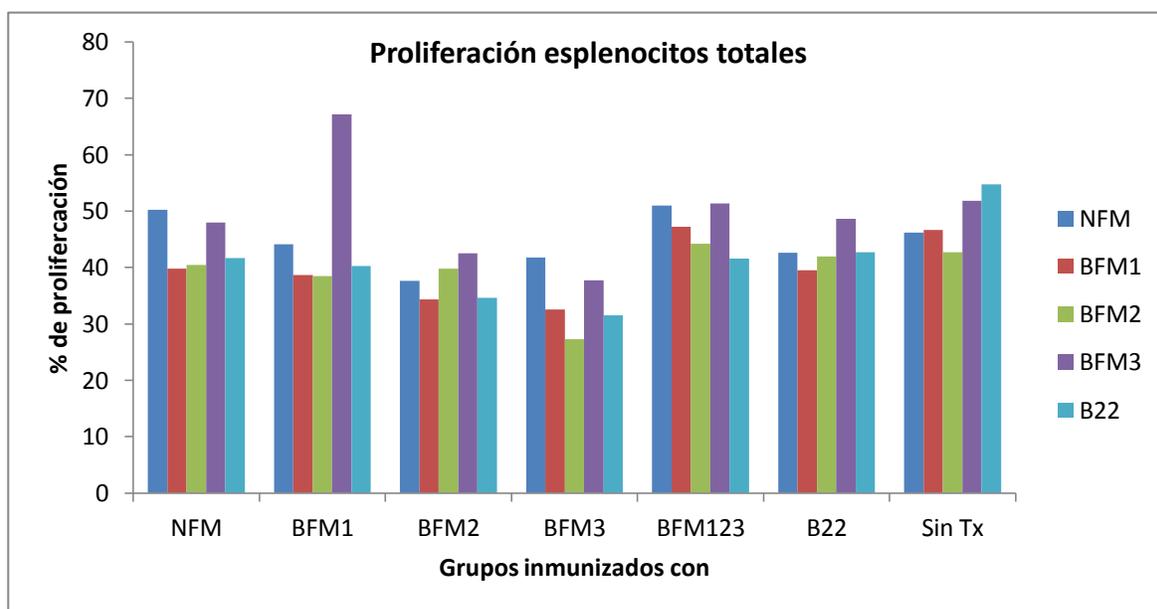
En los grupos de ratones a los que se trató con un régimen “prime–boost” en contexto fago-fago se observaron comportamientos diferentes para cada biblioteca, no se determinaron diferencias significativas entre las curvas de crecimiento tumoral de los grupos inmunizados con BFM1 y BFM123 al ser comparadas con el grupo de ratones sin tratamiento (ver Gráfica 5). Respecto a la inmunización con el nominal (NFM) se observa una tendencia en donde BFM1 es la curva con el crecimiento tumoral más lento considerando que el verdadero control son los grupos donde está presente el fago y no el grupo intacto. BFM3 en este régimen de inmunización parece potenciar el crecimiento tumoral.



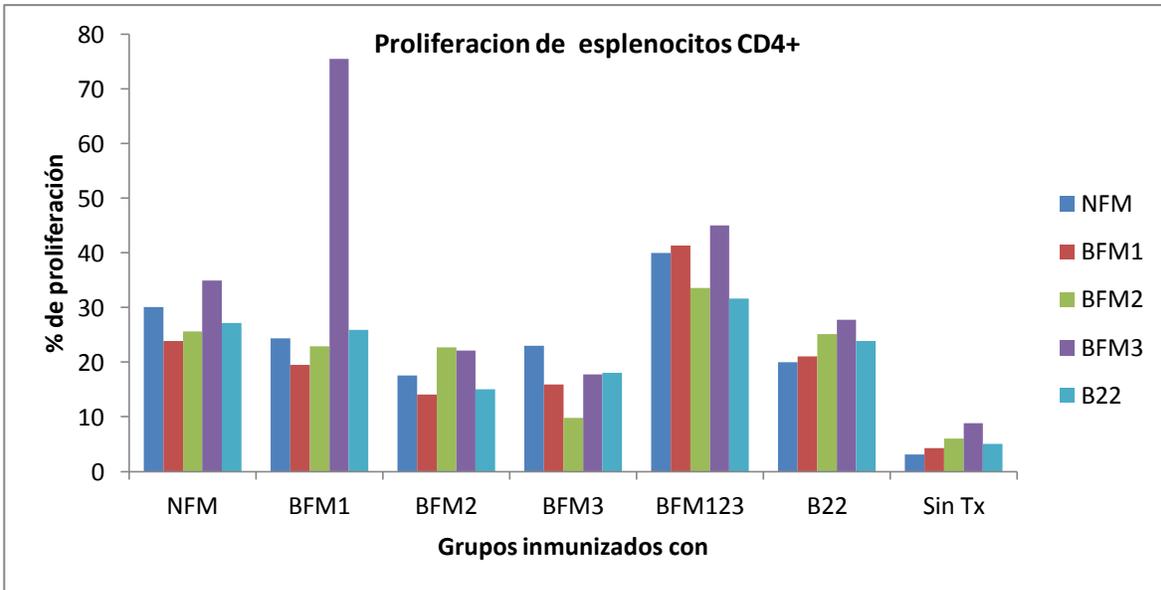
Gráfica 5. Crecimiento tumoral. Comparación entre grupos inmunizados exclusivamente con fago. El grupo de ratones BFM123 (mezcla de las 3 bibliotecas de mucina) sólo recibió un “prime” y fue por vía intravenosa.

A los 14 días posteriores al implante (7 días después de la inmunización) se realizaron los ensayos de proliferación para observar cuál era el perfil de reconocimiento de las variantes de epítomos por los linfocitos de cada grupo experimental. Se realizaron también inmunotinciones para determinar el porcentaje de proliferación de las subpoblaciones de esplenocitos CD4+, CD8+, además se determinaron los porcentajes de células T productoras de IFN γ de dichas subpoblaciones.

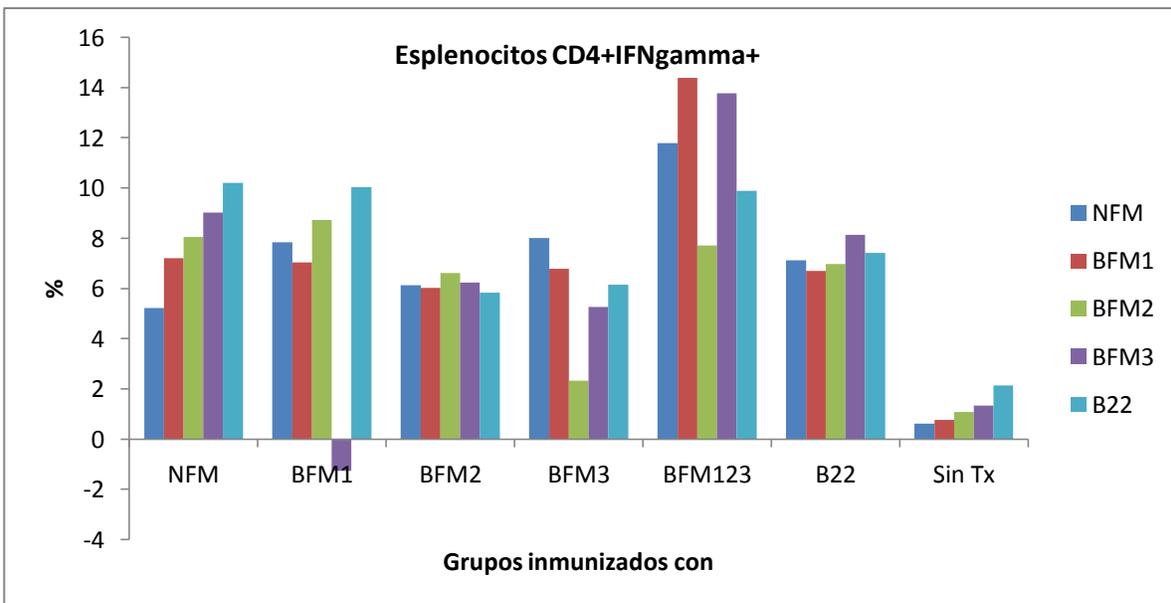
En la Gráfica 6 se presentan los porcentajes de proliferación de esplenocitos totales. Se pueden observar porcentajes similares entre todos los grupos inmunizados inclusive en el grupo sin tratamiento, un fenómeno que no esperábamos; sin embargo, al analizar las subpoblaciones podemos observar que si hay diferencias entre los diferentes inmunógenos (ver gráficas 7-10).



Gráfica 6. Porcentajes de proliferación de esplenocitos totales. Se estimularon los esplenocitos con fago durante 3 días con fago recombinante NFM, BFM1, BFM2, BFM3 o B22.

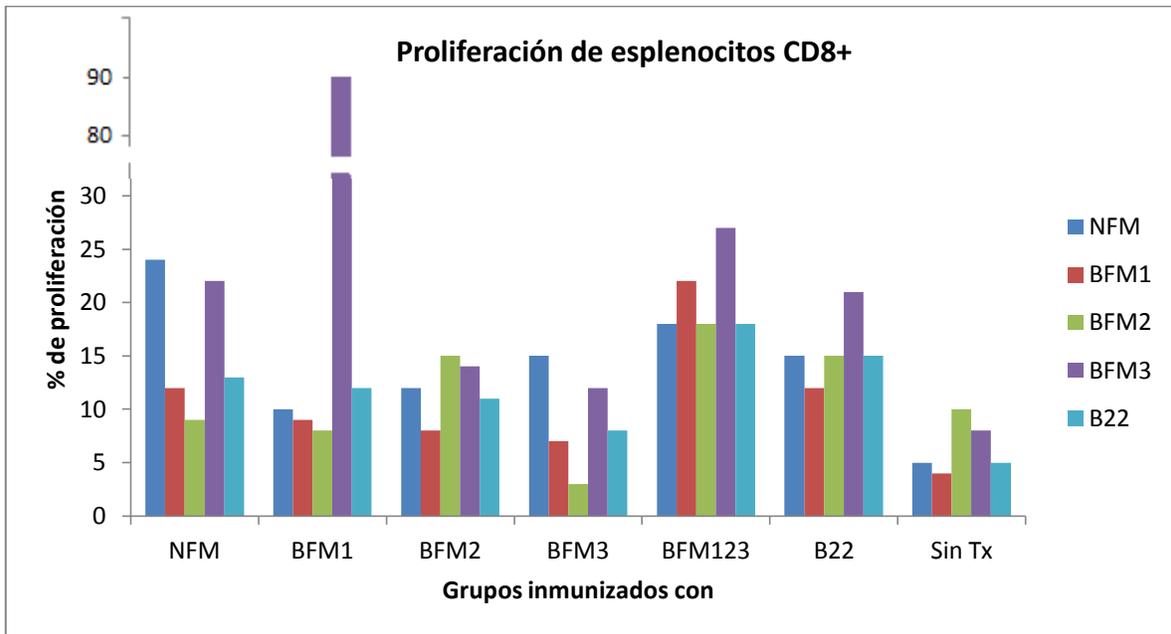


Gráfica 7. Porcentajes de proliferación de esplenocitos CD4+. Se estimularon los esplenocitos con fago durante 3 días con fago recombinante NFM, BFM1, BFM2, BFM3 o B22.

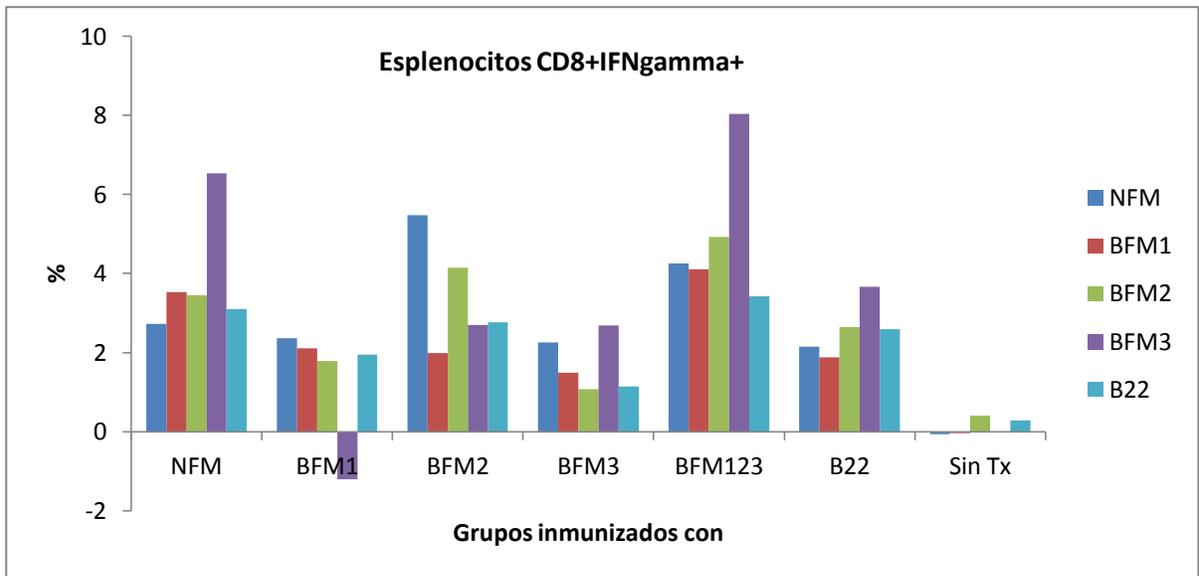


Gráfica 8. Porcentajes de esplenocitos CD4+ productores de IFN γ . Se estimularon los esplenocitos con fago durante 3 días con fago recombinante NFM, BFM1, BFM2, BFM3 o B22.

Como se observa en las graficas 7 y 8, hay mayores porcentajes de proliferación y de esplenocitos productores de $IFN\gamma$ en los grupos inmunizados respecto al grupo sin tratamiento. El grupo que presenta mayor porcentaje de esplenocitos $CD4+IFN\gamma+$, es el inmunizado con las mezclas de bibliotecas (BFM123), se observa también que el grupo inmunizado con NFM es el que presenta mayor reconocimiento de B22, sugiriendo que los esplenocitos de dicho grupo reconocen primordialmente al fago B22 y no los epítomos en cuestión.



Gráfica 9. Porcentajes de proliferación de esplenocitos $CD8+$. Se estimularon los esplenocitos con fago durante 3 días con fago recombinante NFM, BFM1, BFM2, BFM3 o B22.



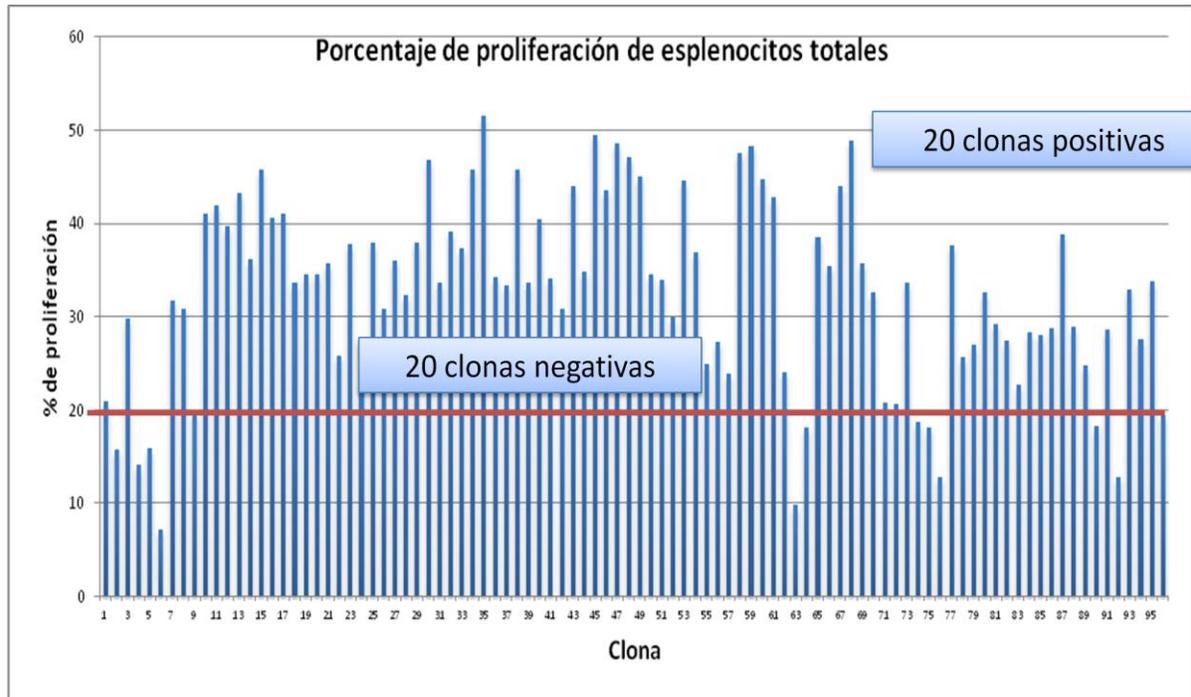
Gráfica 10. Porcentajes de esplenocitos CD8+ productores de IFN γ . Se estimularon los esplenocitos con fago durante 3 días con fago recombinante NFM, BFM1, BFM2, BFM3 o B22.

Se puede observar en las Gráficas 9 y 10 que los esplenocitos CD8+ provenientes del grupo sin tratamiento muestran bajos porcentajes de proliferación y de producción de IFN γ (<1%), el grupo que presenta el mayor porcentaje de proliferación para dicha subpoblación es BFM123.

Aunque es complicado interpretar las diferencias entre grupos inmunizados y los porcentajes de proliferación observados frente a los antígenos con los que no fueron inmunizados ya que no se aprecian tendencias o correlaciones directas entre los porcentajes y los efectos sobre el crecimiento tumoral, podemos sugerir que las diferencias pueden deberse, no a los porcentajes sino a la heterogeneidad de las poblaciones o bien a los números totales de la población, los cuales no han sido determinados.

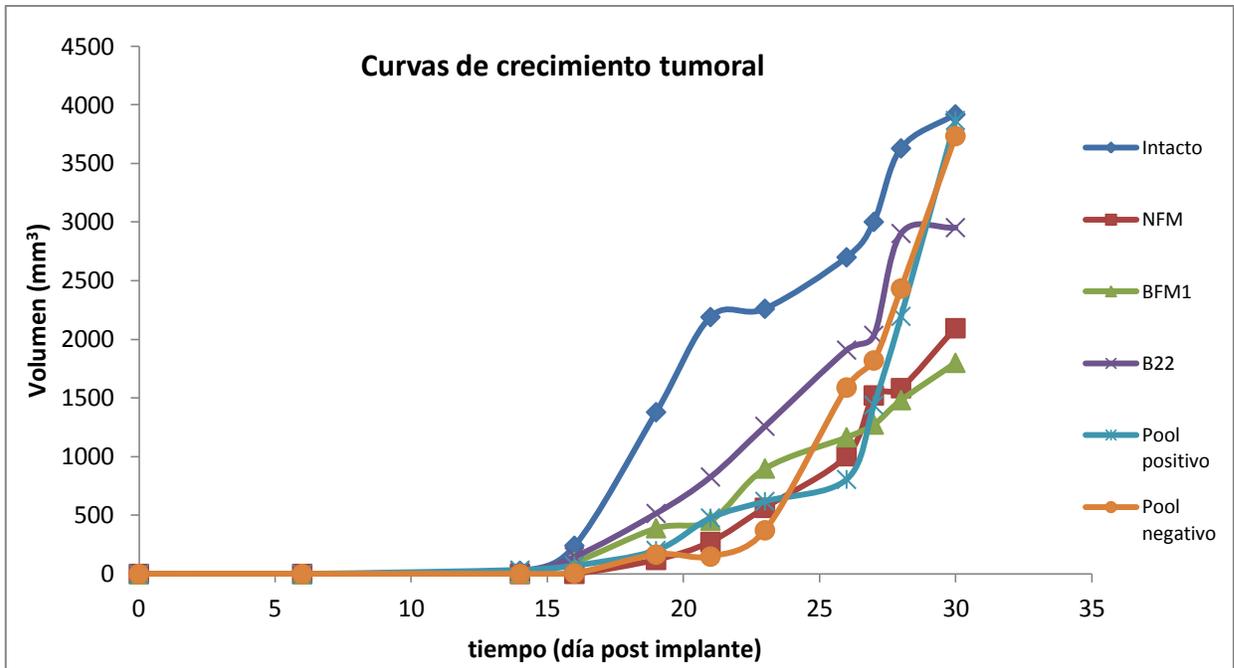
Por otra parte, ya que se ha observado que BFM1 presenta los mayores efectos sobre el crecimiento tumoral, se decidió realizar un “screening” de clonas de dicha biblioteca con la premisa de obtener información acerca de si aquellas clonas con mayores índices de proliferación son protectoras o bien aquellas con los porcentajes mas bajos son las que, si se consigue mejorar su inmunogenicidad proporcionarán mayor protección contra los tumores. Para dicho “screening”, se utilizaron dos ratones del grupo sin tratamiento, al

cabo de 14 días posterior al implante con células B16F10 se realizó un ensayo de proliferación frente a 95 clonas individuales de la biblioteca BFM1. En la Gráfica 11 se muestran los porcentajes de proliferación de esplenocitos totales frente a variantes individuales.



Gráfica 11. Porcentajes de esplenocitos totales frente a clonas individuales de BFM1. La clona 96 corresponde al fago no relacionado B22. Se estimularon los esplenocitos con fago durante 3 días. La línea roja corresponde la porcentaje de proliferación de los esplenocitos estimulados con el fago control B22.

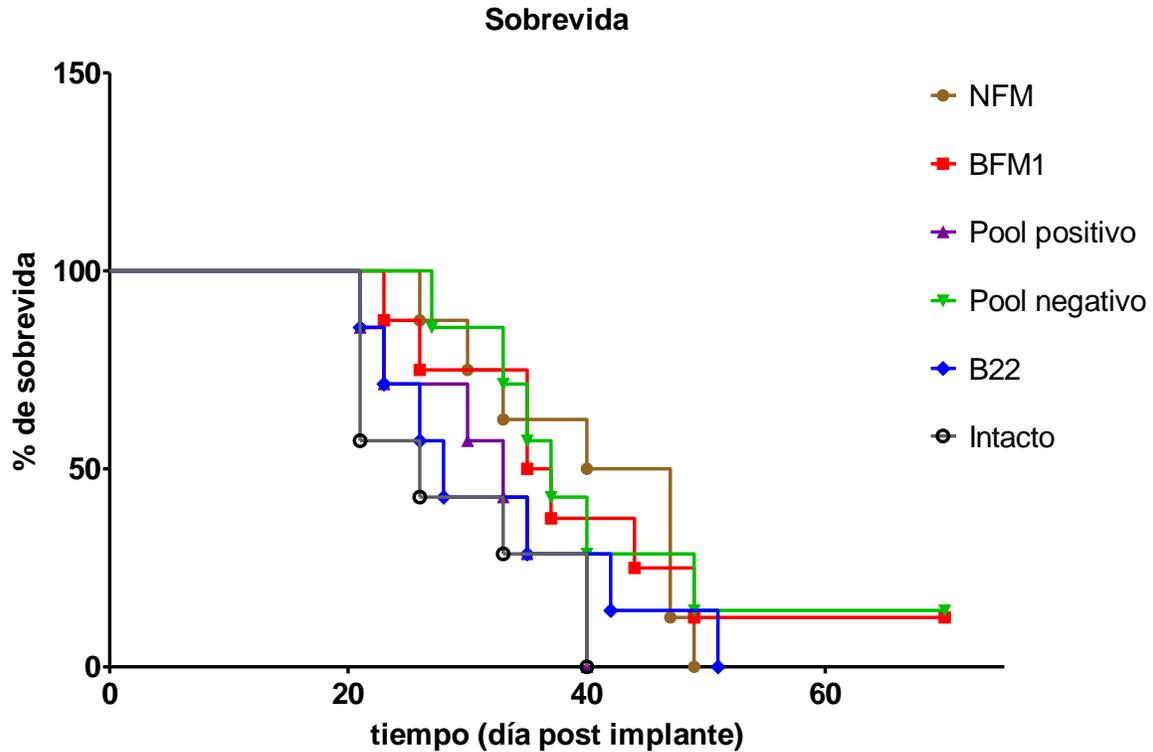
Se seleccionaron 20 clonas con los porcentajes mas elevados de proliferacion que constituirán el pool de clonas positivas, además de eligieron las 20 clonas (pool negativo) con los porcentajes de proliferacion menores, pero que superaran el porcentaje de proliferación de la clona 96 o B22, para evitar elegir fagos con posibles defectos en el inserto.



Gráfica 12. Curvas de crecimiento tumoral, se realizó un transplante con 3×10^4 células B16F10, al 6º día se realizó un “prime” con 10^{12} fagos recombinantes.

Al día 30 los grupos con menor crecimiento tumoral son NFM y BFM1, aunque las diferencias no son estadísticamente significativas. Al día 21, el grupo que presentaba un crecimiento menor fue el inmunizado con el “pool” negativo, además se observa que presenta una tasa de crecimiento menor la cual se dispara al día 23. Al final del experimento dicho grupo presenta los tumores del mismo tamaño que el del grupo intacto.

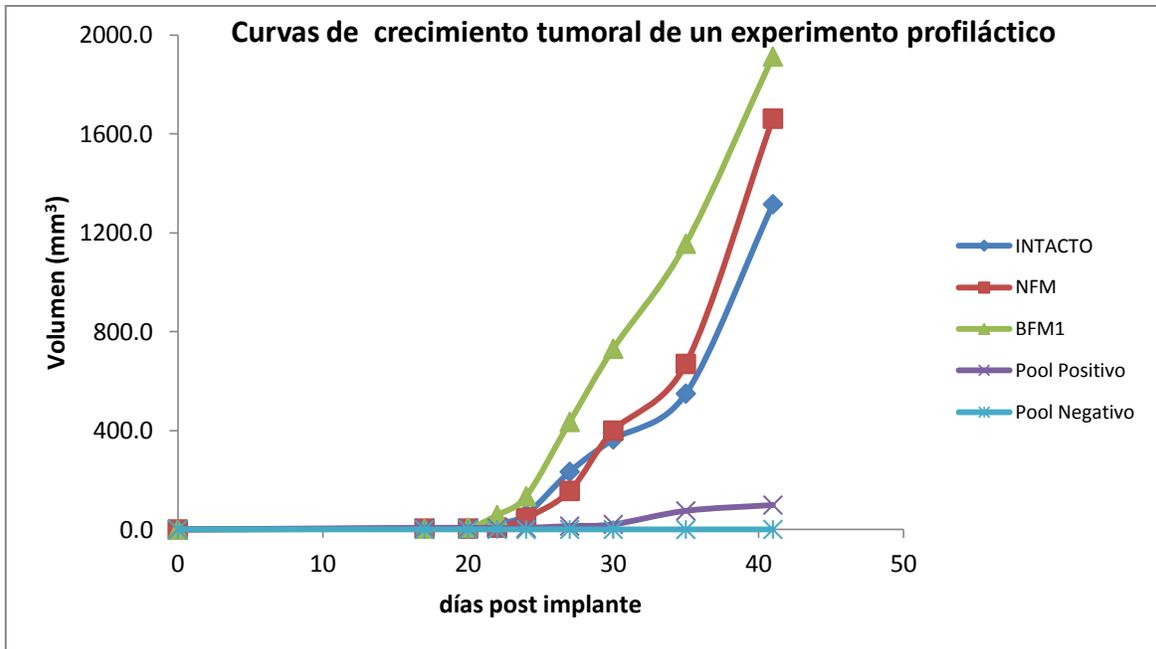
A pesar de no presentarse diferencias significativas en las curvas de crecimiento tumoral presentadas en la Gráfica 12 se determinaron diferencias en el tiempo de vida de los ratones que conformaron cada grupo. En la Gráfica 13 se observa que al día 40 el 100% de los ratones de los grupos intacto e inmunizados con el “pool” positivo habían fallecido. Diez días después lo hacen el grupo B22 y NFM. Se observó que 20% de los ratones del “pool” negativo y de BFM1 sobreviven mas de 60 días.



Grafica 13. Curvas de sobrevivência de um experimento terapêutico. Se realizou um transplante com 3×10^4 células B16F10, al 6º día se realizou un “prime” con 10^{12} fagos recombinantes.

- **Efecto de la inmunización profiláctica en el crecimiento tumoral.**

Se realizó un experimento profiláctico con los inmunógenos construidos. Grupos de 6-7 ratones fueron inmunizados (vía i.v.) con 10^{12} fagos de BFM1, NFM, “pool” negativo o “pool” positivo, 30 días después de la inmunización fueron retados con 3×10^4 células B16F10. En la gráfica 14 se presentan las curvas de crecimiento tumoral de cada grupo.



Grafica 14. Curvas de crecimiento tumoral, se realizó una inmunización con 10^{12} fagos recombinantes y 30 después de la misma se efectuó un reto con 3×10^4 células B16F10.

En el experimento profiláctico se obtuvieron resultados inesperados, se puede observar en la Gráfica 14 que no hay diferencias significativas entre los grupos intacto, NFM y BFM1; sin embargo, el crecimiento tumoral en los ratones inmunizados con el “pool” positivo es el menor registrado ($<100\text{mm}^3$), más sorprendente es que ningún ratón del grupo inmunizado con el “pool” negativo desarrolló tumor.

6. DISCUSIÓN

El cáncer es un grave problema de salud pública en la actualidad, a pesar de los esfuerzos por diagnosticar oportunamente este mal y reducir la tasa de mortalidad, la mayoría de los diagnósticos se realizan en etapas avanzadas (estadios III-IV), donde los tratamientos suelen ser por quimioterapia, radioterapia y en el mejor de los casos cirugía.

Dado que las terapias convencionales tienen limitaciones y provocan efectos secundarios que disminuyen la calidad de vida de los pacientes, es necesario el desarrollo de nuevas estrategias como la inmunoterapia.

En los últimos años una gran cantidad de grupos de investigación han enfocado sus esfuerzos en el desarrollo de vacunas contra algún tipo de cáncer. Se han probado una buena cantidad de vacunas basadas en péptidos, las cuales no han tenido los mejores resultados en pruebas clínicas. Dichas vacunas están compuestas por uno o varios epítomos de CTL (linfocitos T citotóxicos) restringidos a una sola molécula clase I del MHC.

A finales de los 90's Apostolopoulos y cols. identificaron dos péptidos de muc-1 (STAPPAHGV y APDTRPA) capaces de unirse a moléculas de clase I del MHC, en particular HLA-A 0201 y generar CTLs específicos en un modelo murino, Brossart y cols. reportan dos epítomos diferentes de muc-1 (LLLLTVLTV y STAPPVHNV) con capacidad para unirse al HLA-A 0201 y generar CTLs específicos que son capaces de reconocer y lisar líneas celulares tumorales de diferentes tipos de cáncer como renal, pancreático y de mama [Apostolopoulos, 1997; Brossart, 1999].

Pese a los esfuerzos por encontrar un buen inmunógeno, una vía de administración adecuada y un régimen de tratamiento eficaz, hasta ahora no se ha encontrado la combinación que sea eficaz cuando se prueban en ensayos clínicos. En la actualidad, son varias las estrategias implementadas para mejorar la eficiencia de las vacunas, entre éstas se encuentran: uso de péptidos largos, multipéptidos (epítomos para células Th y CTL por separado), cocteles, péptidos híbridos, péptidos personalizados y DCs pulsadas con péptidos [Yamada, 2013].

En el presente trabajo se utilizó el novedoso concepto de biblioteca de epítomos variables (BEVs). Nuestro grupo de investigación piensa que el uso de un epítomo y la restricción del mismo a un sólo tipo de molécula de clase I del MHC inducirá la activación de un pool

de células T con diversidad limitada que sería una desventaja en el combate contra el cáncer, por ello es necesario incrementar la cantidad de inmunógenos. Sabemos que las células tumorales tienen fallas en los mecanismos de reparación de ADN y que por lo tanto pueden generar proteínas con mutaciones, de esta forma utilizando variantes de un epítopo como inmunógeno capacitaríamos al sistema inmune para identificar las células con el epítopo silvestre y con mutaciones. Además si provocamos mutaciones en el epítopo en las posiciones de anclaje a moléculas de MHC, podríamos eliminar la restricción a un sólo haplotipo y con ello generar una vacuna que se utilice en individuos con diferentes haplotipos.

En 2009 Pedroza-Roldán utilizó el concepto de BEVs por primera vez y demostró que dichas bibliotecas son capaces de generar CTLs que reconocen un repertorio más amplio de variantes de epítopos, aunque él utiliza un epítopo de la proteína gp120 de VIH-1, el concepto es el mismo [Pedroza-Roldán, 2009]. De forma similar, en el presente trabajo demostramos que la inmunización con BFM1 o Mix BDM/BFM1 es capaz de generar un mayor reconocimiento de las variantes de BFM1 que la secuencia nominal (SAPDTRPA) que ya había demostrado ser capaz de generar CTLs específicos; sin embargo, faltaba probar que este mayor reconocimiento tuviera impacto sobre el tumor, pues de lo contrario no tendría utilidad. De forma similar demostramos que una biblioteca de survivina (BFS1) fue capaz de generar CTL con un mayor reconocimiento de clona de dicha biblioteca que aquellas reconocidas por una biblioteca (KRS5X) basada en un epítopo de ovoalbúmina (ver Gráfica 3).

El uso de bibliotecas de epítopos variables hasta el presente trabajo no se había probado en modelos de cáncer. En particular en el modelo murino B16F10 de melanoma la estrategia terapéutica más cercana es la establecida por Guevara-Patiño y cols., [Guevara-Patiño, 2006; Engelhorn, 2006]. Ellos utilizaron vacunas de ADN que contenían secuencias del gen *Tyrp1* que codificaban péptidos con mutaciones puntuales, las cuales alteraban los sitios de glicosilación o bien modificaban el anclaje a moléculas de MHC. Con dicha estrategia pudieron observar inhibición en el crecimiento tumoral y la generación de un amplio repertorio de CTLs específicos; sin embargo, obtuvieron un resultado inesperado y no deseado desde un punto de vista conservador, ya que algunos de los ratones utilizados en sus experimentos presentaron una respuesta autoinmune similar al vitiligo.

Si bien, gran parte de los autores consideran que una respuesta autoinmune representa un peligro, nosotros estamos convencidos que llevar al sistema inmune hasta el límite entre tolerancia y autoinmunidad es necesario para la lucha contra el cáncer, ya que las células tumorales pertenecen a la categoría de lo propio.

En 2010 Jaini y cols. utilizando un modelo murino de cáncer de mama, reportan que el uso de un antígeno específico (alfa lactoalbúmina) para el tejido mamario en condiciones de lactancia o en algunos tipos de cáncer puede ser utilizado como componente de una vacuna profiláctica, ya que el sistema inmune identificaría a la alfa lactoalbúmina como extraña en ratones que no han lactado y cuando se presenta el desarrollo tumoral y la expresión de dicha proteína se montaría una respuesta autoinmune que sería capaz de controlar el desarrollo tumoral [Jaini, 2010].

Cuando nosotros evaluamos el efecto antitumoral de las bibliotecas y epítomos nominales observamos que en la inmunización con NDM/NFM provocaba lesiones en la zona del trasplante de las células tumorales de algunos ratones, quizá dichas lesiones sean indicios de alguna respuesta autoinmune, aunque lo que nos llama la atención es que este fenómeno se haya presentado en la inmunización con el epítomo nominal y no con las bibliotecas; sin embargo, en experimentos posteriores pudimos apreciar señales de alopecia en los ratones inmunizados con un régimen “prime-boost” en contexto fago-fago, aunque esto no significó encontrar diferencias en el crecimiento tumoral. La respuesta autoinmune y otros efectos adversos relacionados con el sistema inmune han sido observadas en la inmunoterapia contra el melanoma [Gyorki, 2013].

Para mejorar los péptidos o epítomos utilizados en las terapias, se han realizado modificaciones de los aminoácidos en algunas posiciones, autores como La Rosa y cols. y Bleeke y cols. han reportado variantes de epítomos con mejor capacidad para inducir respuestas celular y humoral, respectivamente [Bleeke, 2009; La Rosa, 2001]. Aunque en el proceso han encontrado variantes que pierden la capacidad de generar una respuesta inmune. Además, se debe considerar que el cambio de aminoácidos en un epítomo también puede generar tolerancia.

A partir de un epítomo de muc-1 se crearon 3 bibliotecas diferentes, en donde lo que se cambió fueron las posiciones de mutación. Cada biblioteca presentó comportamientos diferentes cuando fue usada como inmunógeno (Grafica 4), BFM1 que había sido mutada en las posiciones de anclaje muestra un mayor efecto en la inhibición del tumor, quizá

debida al surgimiento de variantes con una mejor interacción con la molécula de clase I del MHC. En contraste BFM3 como inmunógeno, propició que el desarrollo tumoral fuese potenciado, sugiriendo que posiblemente en esta biblioteca se generaron variantes que indujeron tolerancia o bien, que las clonas de CTLs activadas no eran capaces de reconocer ningún epítipo en la célula tumoral. Muraoka y cols. reportaron en 2010 que una vacuna constituida por péptidos favorecía el crecimiento tumoral, ellos encontraron que los CTLs activados por medio de la vacuna sufrían apoptosis [Muraoka, 2010].

La enorme complejidad de variantes en cada biblioteca hace posible que dentro de la misma se presenten clonas que favorezcan el efecto antitumoral o la tolerancia. Por ello a partir de la biblioteca de BFM1 se eligieron dos sub bibliotecas denominadas pool positivo y pool negativo, que corresponden a 20 clonas que indujeron los mayores porcentajes de proliferación y 20 que indujeron los más bajos, pero siempre superiores a los porcentajes inducidos por B22 que recordemos, es el fago con un epítipo no relacionado.

Al utilizar tanto el pool positivo como el pool negativo como inmunógenos en un esquema terapéutico, no se observaron diferencias en el crecimiento tumoral al final del experimento, pero si durante el mismo. Creemos que reducir la complejidad y hacer una selección óptima de las clonas permitirá obtener un efecto importante, hasta ahora no se han reportado trabajos en dónde se utilicen como vacunas una cantidad similar de variantes de epítipos, lo más cercano es un trabajo donde se utilizan péptidos sobrelapados que en conjunto cubren la totalidad de la proteína TPD52 o bien las bibliotecas con mutaciones aleatorias en el gen Tyrp1 [46, 55]. Dichas estrategias tienen la ventaja de que los péptidos administrados o generados pueden ser procesados de diversas maneras y de esta forma generar en una misma inmunización muchos epítipos diferentes pero no variantes de un epítipo en particular como en el caso de nuestras BEVs.

La complejidad de trabajar con bibliotecas no sólo se presenta en la interpretación del efecto que tienen sobre el crecimiento tumoral, sino también en la clase de perfiles que se obtienen del reconocimiento de variantes individuales y bibliotecas en los ensayos de proliferación. Pudimos observar diferencias entre los porcentajes de proliferación de las poblaciones de esplenocitos totales, CD4+ y CD8+, mismas que no parecen guardar alguna correlación entre sí. La enorme heterogeneidad entre los porcentajes de proliferación puede deberse a la presencia de grandes cantidades de linfocitos B en el bazo. Charles-Niño, demostró que un epítipo de CTLs es capaz de generar una

respuesta humoral, es decir, que un fago recombinante con dicho epítipo puede ser procesado y presentado en el contexto de MHCII y culminar en la activación de linfocitos B que produzcan anticuerpos específicos, como en el caso de un epítipo de la proteína gp120 [Charles-Niño, 2011].

A pesar de que se determinaron mayores porcentajes de proliferación de los linfocitos CD4+ y CD8+ provenientes de los grupos inmunizados con las bibliotecas en comparación con los nominales o sin tratamiento, la cantidad de células activadas no parece ser suficiente como para observar un efecto aun mayor en el crecimiento tumoral en los experimentos terapéuticos. Choi DH. y Choi Y. en 2011 reportaron que en un modelo murino de melanoma (B16F1) una vacuna de ADN que contiene la región transmembranal de muc-1 no era capaz de tener efecto en el crecimiento tumoral ni en la cantidad de metástasis; sin embargo, al utilizar una vacuna quimera conteniendo muc-1 y HSP70 o bien utilizando la vacuna de ADN de muc-1 en combinación con un mRNA de un inductor de la apoptosis (mANT2), el efecto antitumoral es notorio [Choi DH, 2011; Choi Y, 2011].

Es factible que el uso de una biblioteca a partir de un sólo epítipo tenga un problema similar, es mejor que un epítipo único pero no suficiente como para evidenciar efecto mayor en el crecimiento tumoral en experimentos terapéuticos, por lo que proponemos utilizar la combinación de epítipos o bien regiones epitópicas y generar bibliotecas a partir de ellas.

Por otra parte, los resultados prometedores se obtuvieron en los experimentos profilácticos, si bien dichos resultados son preliminares y es necesario incrementar el tamaño de los grupos para hacer conclusiones válidas es pertinente mencionar lo observado hasta la conclusión de los primeros experimentos.

Al evaluar la biblioteca BFM1, el nominal NFM, B22 y las sub-bibliotecas (pool positivo y pool negativo) se observó que las sub-bibliotecas claramente proporcionaban protección contra el desarrollo tumoral. El 50% de los ratones tratados con el pool positivo presentaron los tumores con el menor tamaño y aun más sorprendente y quizá paradójico fue que el 100% de los ratones tratados con el pool negativo estuvieron libres de tumor hasta el final del experimento (41 días). Para tener un parámetro de comparación se debe mencionar que los primeros tumores del resto de los grupos comenzó a ser palpable alrededor del día 18 post reto y que a partir del día 28 el 100% de los ratones de los

grupos NFM, BFM1 e intactos presentaba tumor. No se ha reportado protección del 100% de ratones con algún inmunógeno en modelos de melanoma B16F10.

Para finalizar, el uso de una biblioteca de muc-1 (BFM1) en experimentos terapéuticos y profilácticos presenta diferencias muy marcadas, dicha biblioteca parece ser más prometedora en un contexto terapéutico ya que su uso permitió observar la inhibición del crecimiento tumoral en algunos ratones, mientras que en condiciones profilácticas BFM1 no presenta inicios de conferir protección contra el desarrollo o crecimiento tumoral, pero si lo hacen sus sub-bibliotecas, principalmente el pool negativo.

Falta mucho por comprender alrededor del concepto de BEVs como estrategia de vacunación contra el cáncer. El presente trabajo es sólo el reflejo de los primeros acercamientos, los cuales han sido prometedores. Además, falta evaluar el efecto terapéutico y profiláctico de las bibliotecas de survivina construidas, así como utilizar péptido sintético y adyuvante o bien células dendríticas pulsadas con las BEVs generadas en el presente trabajo e identificar de esta manera la mejor forma de utilizar las BEVs como vacuna contra el cáncer.

7. CONCLUSIONES

- Las BEVs son capaces de inducir un mayor repertorio de células T que los epítomos silvestres, puesto que hay un mayor reconocimiento de clonas individuales.
- La biblioteca BFM1 tiene efecto sobre el crecimiento tumoral al ser utilizada como agente terapéutico.
- Las sub-biblioteca de BFM1 denominada “pool positivo” confirió protección contra el tumor en el 50% de los ratones al ser utilizado como vacuna profiláctica.
- La sub-biblioteca de BFM1 nombrada “pool negativo” al ser utilizada como vacuna profiláctica generó protección contra el desarrollo tumoral en el 100% de los ratones inmunizados.
- Las composición de las BEVs (posición de los aminoácidos que son mutados) generadas a partir de un solo epítomo le confieren a cada biblioteca propiedades diferenciales como en el caso de BFM1, BFM2 y BFM3.

8. PERSPECTIVAS

Como se ha mencionado, el presente trabajo tuvo como propósito generar los primeros datos alrededor del uso de Bibliotecas de Epítomos Variables (BEVs) como estrategia en el desarrollo de vacunas contra el cáncer.

Hemos mostrado experimentos en los que las BEVs generan resultados prometedores. Por ello pretendemos continuar con esta línea de investigación, ampliando el número de ratones por tratamiento, reduciendo el número de variantes de epítomos con las que se realiza la inmunización, evaluando el efecto antitumoral junto con el análisis de citocinas y de los cortes histológicos de los tumores. Pretendemos generar bibliotecas de regiones epitópicas y probarlas no solo en un modelo de tumor en la zona escapular como en el presente trabajo, sino en un modelo de metástasis en donde el reto con las células tumorales se realiza por vía intravenosa.

Además, sería conveniente evaluar el efecto de las bibliotecas en formato de péptido sintético, para eliminar el posible efecto del fago M13 o bien, utilizar células dendríticas pulsadas con péptidos sintéticos de las bibliotecas o de las variantes que se vayan seleccionando por presentar efectos antitumorales significativos.

9. REFERENCIAS

Allis S, Reali A, Mortellaro G, Arcadipane F, Bartoncini S, Ruo Redda MG. Should radiotherapy after primary systemic therapy be administered with the same recommendations made for operable breast cancer patients who receive surgery as first treatment? A critical review. *Tumori*. 2012;98(5):543-9.

Altieri DC. Survivin and IAP proteins in cell-death mechanisms. *Biochem J*. 2010;430(2):199-205.

American Cancer Society. "What are tumor markers?" <http://www.cancer.org/Treatment/UnderstandingYourDiagnosis/ExamsandTestDescriptions/TumorMarkers/tumor-markers-what-are-t-m>. consultado el 6 de noviembre de 2013.

Apostolopoulos V, Karanikas V, Haurum J. S., and McKenzie I. F. C., "Induction of HLA-A2-restricted CTLs to the mucin 1 human breast cancer antigen," *Journal of Immunology*, 1997;159(11): 5211–18.

Berzofsky JA, Oh S, Terabe M. Peptide vaccines against cancer. *Cáncer Treat Res* 2005;123:115-36.

Blagosklonny MV. Cell immortality and hallmarks of cancer. *Cell Cycle*. 2003;2:296-9.

Blagosklonny MV. Molecular theory of cancer. *Cancer Biol Ther*. 2005;4:621-7.

Blake J, Johnston J-V, Hell Strom K-H, Marquardt H, Chen L. Use of combinatorial peptide libraries to construct functional mimics of tumor epitopes recognized by MHC class I-restricted cytolytic T lymphocytes. *J Exp Med* 1996;184:121-30.

Bleeke M, Fest S, Huebener N, Landgraf C, Schraven B, Gaedicke G, Volkmer R, Lode HN. Systematic amino acid substitutions improved efficiency of GD2-peptide mimotope vaccination against neuroblastoma. *Eur J Cancer*. 2009;45(16):2915-21.

Brämswig KH, Knittelfelder R, Gruber S, Untersmayr E, Riemer AB, Szalai K, Horvat R, Kammerer R, Zimmermann W, Zielinski CC, Scheiner O, Jensen-Jarolim E. Immunization with mimotopes prevents growth of carcinoembryonic antigen positive tumors in BALB/c mice. *Clin Cancer Res*. 2007;13(21):6501-8.

Brossart P, Heinrich K. S, Stuhler G, et al., "Identification of HLA-A2-restricted T-cell epitopes derived from the MUC1 tumor antigen for broadly applicable vaccine therapies," *Blood*. 1999; 93(12):4309–17.

Charles-Niño C, Pedroza-Roldan C, Viveros M, Gevorkian G, Manoutcharian K. Variable epitope libraries: new vaccine immunogens capable of inducing broad human

immunodeficiency virus type 1-neutralizing antibody response. *Vaccine*. 2011;29(32):5313-21.

Choi DH, Woo JK, Choi Y, Seo HS, Kim CW. "A novel chimeric DNA vaccine: enhancement of preventive and therapeutic efficacy of DNA vaccine by fusion of Mucin 1 to a heat shock protein 70 gene," *Molecular Medicine Reports*. 2011;4(5): 885–90.

Choi Y, Jeon YH, Jang JY, Chung JK, Kim CW. "Treatment with mANT2 shRNA enhances antitumor therapeutic effects induced by MUC1 DNA vaccination," *Molecular Therapy*. 2011;19(5):979–89.

Ciesielski MJ, Ahluwalia MS, Munich SA, Orton M, Barone T, Chanan-Khan A, Fenstermaker RA. Antitumor cytotoxic T-cell response induced by a survivin peptide mimic. *Cancer Immunol Immunother*. 2010;59(8):1211-21

Clay T-M, Custer M-C, McKee M-D, Parkhursi M, Robbins P-F, Kerstann K, et al. Changes in the fine specificity of gp 100(209-217)-reactive T cells in patients following vaccination with a peptide modified at an HLA-A2.I anchor residue. *J Immunol* 1999;162:1749-55.

Clínical trials <http://clinicaltrials.gov> consultado el 24 de noviembre de 2012.

Delmastro P, Meóla A, Monaci P, Córtese R, Galfré G. Immunogenicity of filamentous phage displaying peptide mimotopes after oral administration. *Vaccine*, 1997;15 (11):1276-85.

Engelhorn ME, Guevara-Patiño JA, Noffz G, Hooper AT, Lou O, Gold JS, Kappel BJ, Houghton AN. Autoimmunity and tumor immunity induced by immune responses to mutations in self. *Nat Med*. 2006;12(2):198-206.

Finn OJ, Jerome KR, Henderson RA, Pecher G, Domenech N, Magarian-Blander J, Barratt-Boyes SM. MUC-1 epithelial tumor mucin-based immunity and cancer vaccines. *Immunol Rev*. 1995;145:61-89.

Francesco M Marincola., Tumors as elusive targets of T-cell-based active immunotherapy. *Trends in Immunology* 2003; 24: 334-341.

Gavin P. Dunn, Catherine M. Koebel & Robert D. Schreiber. Interferons, immunity and cancer immunoediting. *Nature Reviews Immunology* 2006; 6:836-848.

Guevara-Patiño JA, Engelhorn ME, Turk MJ, Liu C, Duan F, Rizzuto G, Cohen AD, Merghoub T, Wolchok JD, Houghton AN. Optimization of a self antigen for presentation of multiple epitopes in cancer immunity. *J Clin Invest*. 2006;116(5):1382-90.

Guha M, Altieri DC. Survivin as a global target of intrinsic tumor suppression networks. *Cell Cycle*. 2009;8(17):2708-10.

Gyorki David E, Callahan Margaret, Wolchok Jedd D and Ariyan Charlotte E. The delicate balance of melanoma immunotherapy. *Clinical & Translational Immunology*. 2013. [en prensa]

Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell* 2000;100:57-70.

Hofmann UB, Voigt H, Andersen MH, Straten PT, Becker JC, Eggert AO. Identification and characterization of survivin-derived H-2Kb-restricted CTL epitopes. *Eur J Immunol*. 2009;39(5):1419-24

Hoogenboom H, De Bruine A, Hufton S, Hoet R, Arends J, Roovers R. Antibody phage display technology and its applications. *Immunotechnology*, vol. 4, p. 1-20, 1998.

Jaini R, Kesaraju P, Johnson JM, Altuntas CZ, Jane-Wit D, Tuohy VK. An autoimmune-mediated strategy for prophylactic breast cancer vaccination. *Nat Med*. 2010;16(7):799-803.

Jordan KR, McMahan RH, Kemmler CB, Kappler JW, Slansky JE. Peptide vaccines prevent tumor growth by activating T cells that respond to native tumor antigens. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010 Mar 9;107(10):4652-7

Kawaguchi T. Cancer metastasis: characterization and identification of the behavior of metastatic tumor cells and the cell adhesion molecules, including carbohydrates. *Curr Drug Targets Cardiovasc Haematol Disord*. 2005;5(1):39-64.

Klebanoff CA, Gattinoni L and Nicholas P. Restifo.. CD8+ T-cell memory in tumor immunology and immunotherapy. *Immunology Reviews*. 2006; 211:214–224.

Khong HT, Restifo NP. Natural selection of tumor variants in the generation of "tumor escape" phenotypes. *Nat Immunol*. 2002;3:999-1005.

Kim R, Emi M, Tanabe K. Cancer immunoediting from immune surveillance to immune escape. *Immunology*. 2007;1211-14.

Kint. J. Thomas. *Inmunología de Kuby*. Ed Mc Graw Hill. 6ª edición. México. 2007; 525-42.

Koido S, Hara E, Homma S, Namiki Y, Ohkusa T, Gong J, Tajiri H. Cancer vaccine by fusions of dendritic and cancer cells. *Clin Dev Immunol*. 2009; 2009:657369.

Kovjazin R, Volovitz I, Kundel Y, Rosenbaum E, Medalia G, Horn G, Smorodinsky NI, Brenner B, Carmon L. ImMucin: a novel therapeutic vaccine with promiscuous MHC binding for the treatment of MUC1-expressing tumors. *Vaccine*. 2011;29(29-30):4676-86.

La Rosa C, Krishnan R, Market S, Schneck JP, Houghten R, Pinilla C, et al. Enhanced immune activity of cytotoxic T-lymphocyte epitope analogs derived from positional scanning synthetic combinatorial libraries. *Blood* 2001;97:1776-86.

Lazoura E, Lodding J, Farrugia W, Day S, Ramsland PA, Apostolopoulos V. Non-canonical anchor motif peptides bound to MHC class I induce cellular responses. *Mol Immunol*. 2009;46(6):1171-8.

Manoutchanan K. Bacteriophages as tools for vaccine and drug development *Expert. Rev. Vaccines*, vol. 4, n° 1, pp. 5 -7, 2005.

Mirshahidi S, Kramer VG, Whitney JB, Essono S, Lee S, Dranoff G, Anderson KS, Ruprecht RM. Overlapping synthetic peptides encoding TPD52 as breast cancer vaccine in mice: prolonged survival. *Vaccine*. 2009;27(12):1825-33.

Mita AC, Mita MM, Nawrocki ST, Giles FJ Survivin: key regulator of mitosis and apoptosis and novel target for cancer therapeutics.. *Clin Cancer Res*. 2008;14(16):5000-5.

Mitchell MS, Lund TA, Sewell AK, Marincola FM, Paul E, Schroder K, et al. The cytotoxic T cell response to peptide analogs of the HLA-A*0201 -restricted MUC1 signal sequence epitope. M1.2. *Cancer Immunol Immunother*. 2007;56(3):287-301.

Munguía, ZME. Vacunas. *Microbiología y Parasitología Médicas*. 2003. 45; 371-383.

Muraoka D, Kato T, Wang L, Maeda Y, Noguchi T, Harada N, Takeda K, Yagita H, Guillaume P, Luescher I, Old LJ, Shiku H, Nishikawa H. Peptide vaccine induces enhanced tumor growth associated with apoptosis induction in CD8+ T cells. *J Immunol*. 2010;185(6):3768-76.

Organización Mundial de la Salud. OMS.

<http://www.who.int/mediacentre/news/notes/2005/np07/es/index.html> consultado el 24 de enero de 2013.

Organización Mundial de la Salud. OMS.

<http://www.who.int/topics/vaccines/es/> consultado el 10 de febrero de 2013

Ostrand-Rosenberg S. Immune surveillance: a balance between protumor and antitumor immunity. *Curr Opin Genet Dev*. 2008;18:11-8.

Pardoll D. T cells take aim at cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002;99:15840-2.

Pardoll D. Does the immune system see tumors as foreign or self? *Annu Rev Immunol.* 2003;21:807-39.

Parkin J, Cohen B. An overview of the immune system, *Immunology.* 2001;357(9270):1777-89.

Pedroza-Roldan C, Charles-Niño C, Manoutcharian K. Los problemas de las vacunas contra enfermedades y patógenos antigénicamente variables. *Mensaje Bioquímico.* 2007;31:131-140.

Pedroza-Roldan C, Charles-Niño C, Saavedra R, Govezensky T, Vaca L, Avannis-Aghajani E, Gevorkian G, Manoutcharian K. Variable epitope library-based vaccines: shooting moving targets. *Mol Immunol.* 2009;47(2-3):270-82.

Petrenko V, Smith G. 2005. *Vectors and Modes of Display* En: Sachdev S (ed.) *Phage Display in Biotechnology and Drug Discovery.* NW. USA, CRC Press Taylor and Francis Group, pp. 63-110.

Phillips RE, Rowland-Jones S, Nixon DF, Gotch FM, Edwards JP, Ogunlesi AO, Elvin JG, Rothbard JA, Bangham CR, Rizza CR. Human immunodeficiency virus genetic variation that can escape cytotoxic T cell recognition *Nature* 354;453-459.

Pisarev VM, Kinarsky L, Caffrey T, Hanisch FG, Sanderson S, Hollingsworth MA, Sherman S. T cells recognize PD(N/T)R motif common in a variable number of tandem repeat and degenerate repeat sequences of MUC1. *Int Immunopharmacol.* 2005;5(2):315-30.

Prado-Garcia H, Aguilar-Cazares D, Flores-Vergara H, Mandoki JJ, Lopez-Gonzalez JS. Effector, memory and naïve CD8+ T cells in peripheral blood and pleural effusion from lung adenocarcinoma patients. *Lung Cancer.* 2005;47:361-71.

Purcell AW, McCluskey J, Rossjohn J. More than one reason to rethink the use of peptides in vaccine design. *Nat Rev Drug Discov.* 2007;6(5):404-14.

Reiman JM, Kmiecik M, Manjili MH, Knutson KL. Tumor immunoediting and immunosculpting pathways to cancer progression. *Semin Cancer Biol.* 2007;17:275-87.

Rodi D, Mandava S, Makowski L. 2005. *Filamentous Bacteriophage Structure and Biology.* En: Sachdev S (ed.) *Phage Display in Biotechnology and Drug Discovery.* NW. USA, CRC Press Taylor and Francis Group, pp. 1 - 62.

Robles Y, González E, Govezensky T, Munguia M, Acero G, Bobes R, Gevorkian G, Manoutcharian K. Isolation of the *Taenia crassiceps* antigens from a phage display cDNA library and evaluation of their use for diagnosis of neurocysticercosis. *Clinical*

Immunology, vol. 116, pp. 265-270, 2005.

Rosander A. 2004. Novel Applications of Shotgun Phage Display. Doctor's dissertation. Swedish University of Agricultural Sciences. Uppsala 2004.

Rosenberg SA. Progress in human tumour immunology and immunotherapy. Nature 2001;411(6835):380-4.

Rubio-Godoy V, Ayyoub M, Dutoit V, Servis C, Schink A, Rimoldi D, et al. Combinatorial peptide library-based identification of peptide ligands for tumor-reactive cytolytic T lymphocytes of unknown specificity. Eur J Immunol 2002;32:2292-9.

Schmitz M, Diestelkoetter P, Weigle B, Schmachtenberg F, Stevanovic S, Ockert D, Rammensee HG, Rieber EP. Generation of survivin-specific CD8+ T effector cells by dendritic cells pulsed with protein or selected peptides. Cancer Res. 2000;60(17):4845-9.

Sharav T, Wiesmüller KH, Walden P. Mimotope vaccines for cancer immunotherapy. Vaccine. 2007;25(16):3032-7.

Siegel S, Wagner A, Schmitz N, Zeis M. Induction of antitumour immunity using survivin peptide-pulsed dendritic cells in a murine lymphoma model. Br J Haematol. 2003;122(6):911-4.

Siewert K, Malotka J, Kawakami N, Wekerle H, Hohlfeld R, Dornmair K. Unbiased identification of target antigens of CD8+ T cells with combinatorial libraries coding for short peptides. Nat Med. 2012;18(5):824-8.

Swann JB, Smyth MJ. Immune surveillance of tumors. J Clin Invest. 2007 May;117:1137-46.

VanLith ML, Kohlgraf KG, Sivinski CL, Tempero RM, Hollingsworth MA MUC1-specific anti-tumor responses: molecular requirements for CD4-mediated responses Int Immunol. 2002;14(8):873-82.

Vispo N, Dueñas M. 2004. Características Generales de los Bacteriófagos Filamentosos. En: Vispo N, Silva D, Marina A. (eds.) Combinatoria Molecular. Cuba. Elfos Scientíae. pp 57 - 68.

Wiesmuller K-H, Heckenstein B, Jung G. Peptide vaccines and peptide libraries. Biol Chem 2001;382:571-9.

Yamada A, Sasada T, Noguchi M, Itoh K. Next-generation peptide vaccines for advanced cancer. Cancer Sci.104(1):15-21.

Zitvogel L, Tesniere A, Kroemer G. Cancer despite immunosurveillance: immunoselection and immunosubversion. *Nat Rev Immunol.* 2006;6:715-27.