



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS
BIOMEDICINA

**EVALUACIÓN DEL EFECTO ANTITUMORAL DE EPÍTOPOS DERIVADOS DE
MOLÉCULAS MHC I EN UN MODELO MURINO DE ADENOCARCINOMA**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

PRESENTA:

ROSA MARIANA CHÁVARO ORTIZ

TUTOR PRINCIPAL DE TESIS: DR. KAREN MANOUTCHARIAN AIRAPETIAN
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS, UNAM

COMITÉ TUTOR: DRA. ROMINA MA. DE LA PAZ RODRÍGUEZ SANOJA
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS, UNAM

DR. LUIS ALFONSO VACA DOMÍNGUEZ
INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA CELULAR, UNAM

MÉXICO, CD. DE MÉXICO, SEPTIEMBRE, 2016



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS
BIOMEDICINA

**EVALUACIÓN DEL EFECTO ANTITUMORAL DE EPÍTOPOS DERIVADOS DE
MOLÉCULAS MHC I EN UN MODELO MURINO DE ADENOCARCINOMA**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

PRESENTA:

ROSA MARIANA CHÁVARO ORTIZ

TUTOR PRINCIPAL DE TESIS: DR. KAREN MANOUTCHARIAN AIRAPETIAN
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS, UNAM

COMITÉ TUTOR: DRA. ROMINA MA. DE LA PAZ RODRÍGUEZ SANOJA
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS, UNAM

DR. LUIS ALFONSO VACA DOMÍNGUEZ
INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA CELULAR, UNAM

MÉXICO, CD. DE MÉXICO, SEPTIEMBRE, 2016



Lic. Ivonne Ramírez Wence
Director General de Administración Escolar, UNAM.
Presente

Me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día 20 de junio del 2016, se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de **MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS** de la alumna **CHÁVARO ORTIZ ROSA MARIANA** con número de cuenta **515015548** con la tesis titulada **"EVALUACIÓN DEL EFECTO ANTITUMORAL DE EPÍTOPOS DERIVADOS DE MOLÉCULAS MHC I EN UN MODELO MURINO DE ADENOCARCINOMA"**, realizada bajo la dirección del **DR. KAREN MANOUTCHARIAN AIRAPETIAN**:

Presidente: DRA. EDDA LYDIA SCIUTTO CONDE
Vocal: DRA. ELIZABETH LANGLEY MCCARRON
Secretario: DRA. ROMINA MA. DE LA PAZ RODRÍGUEZ SANOJA
Suplente: DRA. LETICIA ROCHA ZAVALA
Suplente: DR. ALFONSO DUEÑAS GONZALEZ

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

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"
Cd. Universitaria, Cd. Mx., a 15 de agosto del 2016.

DRA. MARÍA DEL CORO ARIZMENDI ARRIAGA
COORDINADORA DEL PROGRAMA



AGRADECIMIENTOS

Al Posgrado en Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) por permitirme realizar mi estudios de maestría y desarrollarme personal y profesionalmente.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca que me otorgó para la realización de mis estudios de maestría y el desarrollo de este proyecto.

A mi tutor principal el Dr. Karen Manoutcharian Airapetian y a los miembros del Comité Tutor, la Dra. Romina Rodríguez Sanoja y el Dr. Luis Vaca Domínguez.

AGRADECIMIENTOS

A mis padres, Enrique y Socorro, por todo su apoyo y motivación.

A mis hermanos, Socorro, Enrique e Irasema. Gracias por siempre compartir conmigo.

A Rodolfo, gracias por ayudarme y guiarme durante estos dos años. A su familia por todo el cariño y apoyo.

A mis abuelos que siempre están pendientes de mis avances y me animan a seguir adelante.

A Gabi, Fer y Mau, gracias por todas las pláticas y por compartir conmigo esta experiencia.

Al Dr. Karen y a mis compañeros de laboratorio por el conocimiento compartido.

A Katy, Xepe, Nelly e Isma con los cuales siempre cuento aunque no estén cerca.

ÍNDICE

RESUMEN	1
ABSTRACT	2
INTRODUCCIÓN	3
HIPÓTESIS	5
OBJETIVO	6
Objetivos particulares.....	6
ANTECEDENTES	7
Cáncer de mama.....	7
Tipos de cáncer de mama.....	7
Clasificación del cáncer de mama.....	7
El complejo mayor de histocompatibilidad.....	8
Presentación de antígenos.....	9
Activación de linfocitos T.....	9
El sistema inmune y el cáncer.....	10
Características de las células tumorales.....	10
Inmunoedición.....	12
Mecanismos de evasión.....	13
Rol de las moléculas del MHC en la evasión del cáncer.....	16
Moléculas de clase I clásicas.....	18
Moléculas de clase I no clásicas.....	18
HLA-G y su función.....	19
HLA-G como mecanismo de evasión en cáncer.....	19
Inmunoterapia en cáncer.....	22
Bibliotecas de Epítomos Variables (BEVs) en la generación de vacunas.....	23
Vacunas contra cáncer de mama basadas en Bibliotecas de Epítomos Variables (BEVs).....	23
METODOLOGÍA	24

Material biológico.....	24
Inmunógenos.....	24
Reto y monitoreo del desarrollo tumoral.....	25
Inmunización.....	26
Conteo de macrometástasis.....	26
Ensayo de proliferación celular mediante tinción con CFSE.....	27
Análisis de los ensayos de proliferación por citometría de flujo.....	27
Análisis estadístico.....	29
RESULTADOS.....	30
Evaluación del efecto antitumoral.....	30
Cinética de crecimiento tumoral.....	30
Masa tumoral.....	34
Conteo de macrometástasis.....	34
Proliferación celular.....	39
DISCUSIÓN.....	44
CONCLUSIONES.....	53
LITERATURA CITADA.....	54

LISTA DE FIGURAS, TABLAS Y GRÁFICOS

FIGURA 1. Marcas del cáncer.....	10
FIGURA 2. Inmunoadición del cáncer.....	12
FIGURA 3. Moléculas de clase I del MHC en la evasión tumoral.....	17
FIGURA 4. Función tolerogénica de HLA-G.....	20
FIGURA 5. Homología de la molécula H2-K ^d y QA2.....	21
FIGURA 6. Esquema de la no interacción entre la región $\alpha 3$ y el correceptor CD8 del linfocito T.....	21
FIGURA 7. Inmunoterapia del cáncer.....	22
TABLA 1. Origen de las secuencias utilizadas como inmunógenos.....	24
FIGURA 8. Localización del péptido 45A2 en la molécula de origen H2-K ^d	24
FIGURA 9. Localización del péptido QA2 en la molécula de origen.....	25
TABLA 2. Inmunógenos evaluados.....	25
TABLA 3. Dosis de los inmunógenos evaluados.....	26
FIGURA 10. Análisis representativo del porcentaje de proliferación total.....	28
FIGURA 11. Análisis representativo del porcentaje de las poblaciones CD4+IFN- γ + y CD8+IFN- γ + así como del porcentaje de proliferación de la población de esplenocitos CD4+ y CD8+.....	29
GRÁFICO 1. Cinética de crecimiento tumoral de la secuencia P3, dosis 250 μ g.....	30
GRÁFICO 2. Cinética de crecimiento tumoral de la secuencia 45A2, dosis 250 μ g.....	31
GRÁFICO 3. Cinética de crecimiento tumoral de la secuencia QA2, dosis 250 μ g.....	31
GRÁFICO 4. Cinética de crecimiento tumoral para la secuencia 45A2, dosis 180 μ g.....	32
GRÁFICO 5. Cinética de crecimiento tumoral para la secuencia QA2, dosis 180 μ g.....	32
GRÁFICO 6. Cinética de crecimiento tumoral para la combinación de bibliotecas y nominales, dosis final 180 μ g.....	33
GRÁFICO 7. Cinética de crecimiento tumoral para la combinación de bibliotecas y nominales, dosis final 360 μ g.....	33
GRÁFICO 8. Promedio de macrometástasis para P3, dosis 250 μ g.....	34
GRÁFICO 9. Promedio de macrometástasis para 45A2, dosis 250 μ g.....	35
GRÁFICO 10. Promedio de macrometástasis para QA2, dosis 250 μ g.....	35
GRÁFICO 11. Promedio de macrometástasis para 45A2, dosis 180 μ g.....	36
GRÁFICO 12. Promedio de macrometástasis para QA2, dosis 180 μ g.....	37

GRÁFICO 13. Promedio de macrometástasis para la combinación de péptidos, dosis final 180 µg.....	37
GRÁFICO 14. Promedio de macrometástasis para la combinación de péptidos, dosis final 360 µg.....	38
GRÁFICO 15. Proliferación de linfocitos T totales.....	39
GRÁFICO 16. Proliferación linfocitos CD3 ⁺ CD4 ⁺	40
GRÁFICO 17. Cantidad de linfocitos CD4 ⁺ productores de IFN-γ.....	41
GRÁFICO 18. Proliferación linfocitos CD3 ⁺ CD8 ⁺	42
GRÁFICO 19. Cantidad de linfocitos CD8 ⁺ productores de IFN-γ.....	42

RESUMEN

El cáncer de mama es, a nivel mundial, la principal causa de muerte asociada a tumores malignos en mujeres. En México la tasa de mortalidad debida a este tipo de cáncer es de 14.04 por cada 100 mil mujeres de 20 años o más.

El uso de terapias convencionales como la cirugía, la radioterapia y la quimioterapia no ha supuesto una mejora generalizada en el tratamiento del cáncer por lo que nuevas estrategias deben ser exploradas. La inmunoterapia contra el cáncer se encuentra dentro de las terapias evaluadas recientemente, la cual puede llegar a ser efectiva ya que se basa en el uso de moléculas y células del sistema inmune con potencial para la eliminación de las células tumorales. Específicamente, la inmunoterapia activa tiene como principal objetivo la activación del sistema inmune y el consecuente reconocimiento y activación de las células inmunes que llevaran a cabo la eliminación de las células transformadas. En la última década se ha desarrollado un concepto innovador denominado Bibliotecas de Epítomos Variables (BEVs) cuya finalidad es la de explotar la alta variabilidad antigénica de las células tumorales para desencadenar la activación del arsenal inmune y la eliminación de la enfermedad.

Las moléculas del MHC, responsables de la presentación de antígenos y la subsecuente activación de linfocitos T (principales células inmunes capaces de eliminar células tumorales), sufren múltiples modificaciones durante el desarrollo tumoral lo que afecta directamente su correcta función y en consecuencia el correcto desencadenamiento de la respuesta inmune antitumoral; sin embargo, no han sido consideradas como posibles blancos en el desarrollo de terapias contra cáncer. En el presente trabajo presentamos por primera vez el uso de moléculas del MHC con base en Bibliotecas de Epítomos Variables como posibles inmunógenos con efecto antitumoral. Ratones con adenocarcinoma de mama fueron inmunizados con péptidos sintéticos generados con base en secuencias de moléculas de clase I del MHC. Se observó que algunos péptidos, 45A2N y L45A2, mostraron una disminución no significativa en el tamaño del tumor primario y el número de macrometástasis presentes en pulmón. Así mismo, para el caso de LQA2 se observó una disminución estadísticamente significativa en el número de macrometástasis presentes en pulmón al comparar con el control sin tratamiento. Mediante estos resultados podemos concluir que el uso de BEVs es una estrategia prometedora en el desarrollo de vacunas y del tratamiento contra cáncer.

ABSTRACT

Worldwide, breast cancer is the top cause of death in women associated with malignancy. In México, the mortality rate due to this type of cancer is 14.04 for each 100 thousand women aged 20 years and more.

The use of conventional therapies such as surgery, radiotherapy and chemotherapy has not led to a general improvement in cancer treatment so that new strategies must be explored. Immunotherapy against cancer is within the therapies recently evaluated, which may be effective as it is based on the use of molecules and cells of the immune system with potential for the elimination of tumor cells. Specifically, the main objective of active immunotherapy is the activation of the immune system and consequent recognition and activation of cells of the immune system that carry out the removal of transformed cells. In the last decade an innovative concept called Variable Epitope Libraries has been developed; its purpose is to exploit the high antigenic variability of tumor cells to trigger the activation of the immune arsenal and the elimination of the disease.

MHC molecules responsible for antigen presentation and subsequent activation of T lymphocytes (main immune cells that can kill tumor cells), undergo multiple modifications that directly affect their proper function, have not been considered as possible targets in the development of therapies against cancer. In this work, we present, for the first time, the use of MHC molecules based on Variable Epitope Libraries as potential immunogens with antitumor effect. Mice under a breast adenocarcinoma model were immunized with synthetic peptides generated based on sequences of MHC class I. It was observed that some peptides, 45A2N and L45A2, show a possible effect in the inhibition of tumor growth. Likewise, in the case of 45A2N, L45A2 and LQA2 a decrease was observed in the number of macrometastases present in lungs when compared with the untreated control. Through this results, we can conclude that the use of VELs is a promising strategy in the development of vaccines and treatment against cancer.

INTRODUCCIÓN

El cáncer es uno de los principales problemas de salud a nivel mundial, que tiene un impacto en el sector salud, así como social y económico. A la fecha no se han podido desarrollar tratamientos que curen completamente la enfermedad lo que convierte las estrategias de la lucha contra el cáncer un tema de interés mundial.

El cáncer es una de las enfermedades con altos índices de morbilidad y mortalidad a nivel mundial. Es la principal causa de muerte a nivel mundial, para el 2012 se reportaron 14 millones de nuevos casos y 8,2 millones de muertes relacionadas.

Se prevé que en los próximos 20 años habrá un incremento de nuevos casos en aproximadamente un 70% (IARC, 2014).

Los tumores primarios son tratados generalmente mediante la combinación de terapias: cirugía en la mayoría de los casos, radioterapia y quimioterapia. Incluso cuando el tumor ha sido aparentemente eliminado, la presencia de células tumorales en estado de latencia puede conducir a una recaída por lo que la terapia no tiene éxito. A pesar de que la quimioterapia y radioterapia suelen ser usadas como estrategias que afectan principalmente las células tumorales, se han acumulado pruebas que indican que las terapias citotóxicas convencionales tienen un impacto negativo sobre el sistema inmune contribuyendo a la regresión tumoral. Por lo tanto, para combatir el tumor es necesario desarrollar estrategias que no solo estén dirigidas a eliminar la enfermedad mínima residual eficientemente, sino que también puedan llegar a estimular la respuesta inmune antitumoral de manera que se puedan eliminar las células tumorales residuales (Zitvogel y col., 2008).

El tratamiento del cáncer de mama se ha desarrollado ampliamente desde 1970, desde la introducción del tratamiento antiendocrino hasta el uso del anticuerpo monoclonal contra Her-2/neu trastuzumab. Incluso cuando se ha logrado probar que anticuerpos monoclonales dirigidos contra un epítipo de importancia biológica en combinación con quimioterapia han producido resultados significativamente mejores comparados con las terapias individuales, éstos anticuerpos requieren aplicaciones frecuentes y su vida media limita la duración de la terapia. Es por esto que el desarrollo de inmunoterapias activas es de gran prioridad, haciendo a las vacunas peptídicas una estrategia de alto impacto en el desarrollo de vacunas contra cáncer (Wiedermann y col., 2013).

La generación de tratamientos terapéuticos que mejoren el reconocimiento y la eliminación de las células tumorales por el sistema inmune, conocidos como inmunoterapia, han sido ampliamente desarrollados y evaluados en los últimos 40 años.

Uno de los campos explorados de la inmunoterapia es el uso de vacunas peptídicas contra cáncer, las cuales tiene como objetivo favorecer el reconocimiento de epítomos específicos, lo que simplifica evaluar la evolución de la eficacia clínica e inmunológica del tratamiento. Específicamente en cáncer de mamá se han probado vacunas peptídicas como E75, GP2 y AE37 pertenecientes a diversas regiones de la proteína HER-2/neu (Clifton y col., 2015). Sin embargo, mediante la administración de péptidos individuales se ha demostrado que las variantes tumorales que portan el epítomo de interés son inmunoseleccionadas propiciando posteriormente la recurrencia de tumores que no presentan el epítomo blanco, complicando el tratamiento de éstas nuevas masas tumorales (von Boehmer y col., 2013).

En el presente trabajo se evaluó el uso de vacunas peptídicas mutagenizadas basadas en moléculas de clase I del MHC. Las moléculas clásicas son de gran importancia en la presentación de antígenos tumorales y por la tanto en la activación de la respuesta inmune antitumoral. Se ha reportado ampliamente la disminución de su expresión en el desarrollo tumoral, lo que deriva en una capacidad disfuncional para la presentación de antígenos y la activación de linfocitos T citotóxicos responsables de la eliminación de las células tumorales. Por otro lado, la molécula no clásica HLA-G, expresada normalmente en trofoblastos donde su principal función es evitar el rechazo materno-fetal durante el embarazo, tiene un aumento en su expresión que correlaciona con la disminución de la moléculas clásicas. La presencia de HLA-G en células tumorales evita la activación de las células citotóxicas del sistema inmune, células NK y células T citotóxicas, impidiendo así la eliminación de las clonas tumorales que la expresan.

HIPÓTESIS

Epítomos derivados del MHC serán inmunógenos capaces de inducir una respuesta inmune protectora contra tumor.

OBJETIVO

Diseñar una Biblioteca de Epitopes Variables con base en secuencias de moléculas de clase I del MHC capaz de desencadenar una respuesta inmune antitumoral en un modelo de adenocarcinoma murino.

OBJETIVOS PARTICULARES

1. Identificar y diseñar *in silico* epítomos derivados de moléculas de clase I del MHC.
2. Evaluar el efecto antitumoral de la BEV derivada de moléculas de clase I del MHC en un modelo *in vivo* de adenocarcinoma murino.
3. Caracterizar la respuesta inmune inducida por la BEV diseñada.

ANTECEDENTES

Cáncer de mama

El cáncer es un proceso de varias etapas que reflejan las alteraciones genéticas que dirigen la transformación progresiva de células normales en clonas altamente malignas capaces de invadir tejidos afectando su función (Hanahan y Weinberg, 2000).

Del total de defunciones registradas en el 2012, se atribuyeron un total de 521,000 muertes al cáncer de mama, ocupando el quinto lugar entre los diferentes tipos de cáncer con un alto índice de mortalidad (IARC, 2014).

Para el caso de México, el INEGI reporta para el 2013 una tasa de mortalidad de 14.04 por cada 100 mil habitantes del sexo femenino de 20 años y más para tumores malignos de cáncer de mama.

Tipos de cáncer de mama

El cáncer de mama puede iniciar en diferentes partes de la mama. La mayoría de las veces el cáncer de mama se presenta en los ductos que conducen la leche al pezón y que se denomina cáncer ductal, este representa el 80 % de los casos. Un menor porcentaje (alrededor del 10 %) se presenta en las glándulas en las que se produce la leche y se conoce como cáncer lobulillar. Existen otros tipos de cáncer de mama que son menos comunes y que representan el otro 10 % de los casos de cáncer de mama, como son, enfermedad de Paget del pezón (5%), cáncer de mama inflamatorio (1 %), entre otros (Organización del Cáncer de Mama, 2016).

Clasificación del cáncer de mama

El cáncer de mama puede ser clasificado con base en la presencia de receptores de hormonas, estrógeno y progesterona, y la molécula HER2 (Sociedad Americana del Cáncer, 2016):

- Positivo a receptores de hormonas: si las células tumorales contienen ya sea receptores de estrógeno como de progesterona.
- Negativo a receptores de hormonas: si no hay presencia de receptores de estrógeno ni progesterona.
- Positivo a HER2: tumores que expresan grandes cantidades de la proteína HER2 o copias extra del gen HER2.
- Negativo a HER2: tumores que no presentan un incremento de la molécula HER2.

- Triple negativo: si las células tumorales no expresan receptores de estrógeno o progesterona y no presentan un nivel elevado de HER2.
- Triple positivo: tumores que son positivos a receptores de estrógeno, progesterona y niveles elevados de HER2.

El complejo mayor de histocompatibilidad

El complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) es una agrupación grande de genes que se localizan en el cromosoma 6 y son conocidos como genes del antígeno leucocitario humano en los seres humanos; está formado por al menos 4×10^6 pares de bases. En los seres humanos contiene más de 200 genes. Dentro del locus del MHC humano se encuentran muchos genes que participan en el procesamiento o en la presentación de antígenos, o que tienen otras funciones relacionadas con la respuesta inmunitaria innata o adaptativa.

Las moléculas del MHC son glucoproteínas codificadas en el grupo de genes del MHC. Su característica estructural más notoria es una hendidura que corre a través de su superficie exterior, en la cual pueden unirse diversos péptidos. Se han definido tres clases de genes del MHC. Los genes que codifican a las moléculas de clase I del MHC constan de dos cadenas polipeptídicas, la cadena α que se relaciona de modo no covalente con la β_2 microglobulina codificada en el cromosoma 15 en seres humanos. Hay tres genes de la cadena α de clase I, llamados HLA-A, -B y -C, clasificados como clásicos; y otros cuatro genes denominados no clásicos: HLA-E, -F, -G y -H. Los genes clásicos codifican las moléculas que asociarán péptidos endógenos y que serán expresados en la membrana de la célula para ser reconocidos por los linfocitos T CD8⁺. Los genes no clásicos codifican moléculas que presentan péptidos derivados de moléculas clásicas y que cumplen otras funciones como evitar el rechazo materno fetal como en el caso de HLA-G. También hay tres pares de genes de las cadenas α y β de clase II del MHC, llamados HLA-DR, -DP y -DQ (Murphy, 2009).

En el caso de ratones, dependiendo de la cepa, se encuentran hasta tres genes que codifican las moléculas de clase I del MHC, llamados H2-D, -K y -L, dentro del complejo H2, y la mayoría de las cepas tienen dos moléculas de clase II, llamadas I-A e I-E. Así mismo, se ha sugerido una ortología directa entre las moléculas no clásicas HLA-E de humano y Qa-1 en ratón, mientras que la función homóloga parece corresponder entre la molécula HLA-G y su ortólogo en ratón Qa-2, lo que sugiere que sus roles funcionales se han conservado desde la divergencia de ambas especies (Adams y Luoma, 2013).

Las moléculas de clase II del MHC constan de un complejo no covalente de dos cadenas, α y β . En ambas clases de moléculas, los péptidos unidos se encuentran ubicados entre los dos segmentos α -helicoidales de la molécula. Los llamados genes de clase III codifican otras proteínas diversas con funciones en la inmunidad, pero no moléculas presentadoras de antígenos como las de clase I y II (Murphy, 2009).

Presentación de antígenos

El reconocimiento de antígenos en el contexto de péptidos asociados a moléculas clase I y II del MHC por los receptores de células T (TCR), es central en la activación de los linfocitos T (Vyas y col. 2008).

Las moléculas de clase I y II tienen función similar: presentan péptidos a linfocitos T CD8+ y CD4+, respectivamente. Estos péptidos son originados a partir de diferentes fuentes, intracelular vía el retículo endoplásmico para las moléculas de clase I y exógenos vía el fagolisosoma para moléculas de clase II (Neefjes y col., 2011). Sin embargo, la presentación de péptidos asociados a moléculas de clase I del MHC no es suficiente para desencadenar la función citotóxica efectora del linfocito T citotóxico (CTL) hacia un antígeno no sintetizado en una célula presentadora de antígeno (APC). En este caso, los CTL solo pueden ser activados si las APC, generalmente células dendríticas, presentan antígenos exógenos en sus moléculas de clase I del MHC por un proceso denominado presentación cruzada (Kurts y col., 2010).

Las células dendríticas son particularmente eficientes en la presentación cruzada de antígenos y recientemente se ha encontrado que un subgrupo de células dendríticas denominadas CD8+ DC presentan actividad fagocítica para células en proceso de muerte, lo que explicaría el hecho de que las DC CD8+ lleven a cabo selectivamente presentación cruzada de antígenos asociados a células derivadas de células propias, alogénicas o malignas (Iyoda y col., 2002).

Activación de linfocitos T

La unión del complejo péptido:molécula del MHC al receptor de célula T (TCR) y, un correceptor ya sea CD4+ o CD8+, transmite una señal al interior del linfocito T cuando éste es capaz de reconocer el péptido como antígeno extraño. Para la eficaz activación del linfocito T virgen, la célula presentadora de antígeno (APC) envía una señal coestimuladora, generalmente el linfocito T presenta la molécula de superficie CD28 que interactúa con las moléculas CD80/CD86 presentes en la APC y cuyo efecto es una

mayor supervivencia y proliferación del linfocito T. La diferenciación del linfocito T CD4+ está dado por una tercera señal emitida por la APC, suelen participar citocinas en el control de ésta diferenciación (Murphy, 2009).

El sistema inmune y el cáncer

El sistema inmune tiene un claro efecto en el desarrollo del cáncer, y éste puede ser tanto positivo como negativo, de hecho, se han documentado recientemente tres funciones del sistema inmune en el progreso del cáncer que son: facilitar la transformación celular, prevenir o controlar el crecimiento tumoral y modelar la inmunogenicidad de los tumores. Éstas tres funciones del sistema inmune se pueden separar basándose en su ocurrencia temporal durante la formación del tumor, la naturaleza del evento que llevó a la transformación, los componentes particulares de la inmunidad involucrados en cada proceso, y en la naturaleza de los antígenos específicos de tumor expresados en las células transformadas (Mittal y col., 2014).

Características de las células tumorales

Se han descrito 6 capacidades funcionales necesarias para que las células transformadas sean consideradas malignas ya que permiten su supervivencia, proliferación y diseminación (Figura 1), dichas características se han denominado marcas del cáncer.

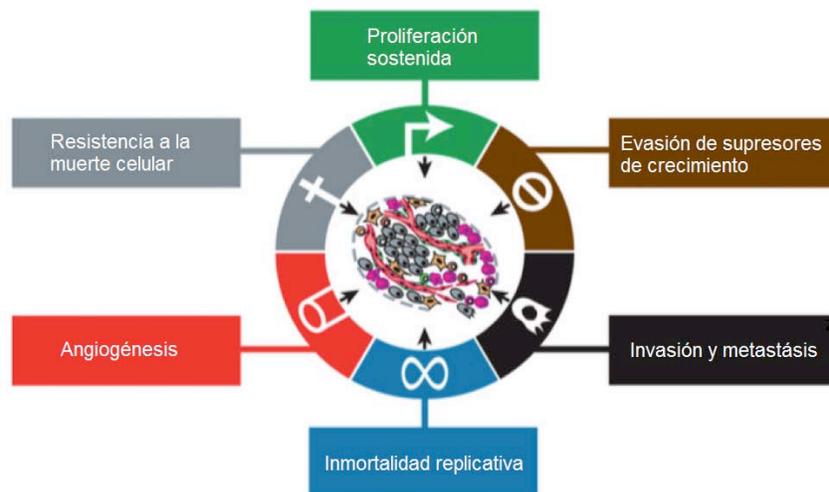


Figura 1. Marcas del cáncer. Modificado de Hanahan y Weinberg, 2011.

La adquisición de éstas funciones se genera en diferentes tipos tumorales vía diversos mecanismos y a diferentes estadios en el curso de los múltiples pasos que derivan en la tumorigenesis (Hanahan y Weinberg, 2011):

1. Mantenimiento de las señales proliferativas. Las células tumorales son capaces de desregular el estricto control bajo el cual se encuentran los tejidos normales durante su proliferación, crecimiento y entrada en división celular mediado por la producción y liberación de señales promotoras de crecimiento.

2. Evasión de las señales supresoras de crecimiento. Diversos genes supresores de crecimiento que actúan limitando el crecimiento y proliferación celular pueden ganar o perder función en las células tumorales lo que permite que esquiven programas celulares que regulan negativamente la proliferación celular.

3. Resistencia a la muerte celular. El proceso de apoptosis es desencadenado en respuesta a varios tipos de estrés fisiológico; sin embargo, en el caso de las células transformadas se observa un desbalance de éstos eventos inductores de la apoptosis debido a elevados niveles de expresión oncogénica.

4. Establecimiento de la inmortalidad replicativa. Las células normales son capaces de pasar por un número limitado de ciclos sucesivos de crecimiento y división celular que se ve limitado por dos procesos que obstaculizan la proliferación: la senescencia que es una entrada irreversible a un estado viable pero no proliferativo y la crisis que involucra la muerte celular. Solo en raras ocasiones las células emergen de una población en crisis y exhiben un potencial de replicación ilimitada que se ha denominado inmortalización y que es una característica presente en las células transformadas malignas.

5. Inducción de angiogénesis. Los requerimientos de nutrientes y oxígeno, así como la habilidad de evacuar desechos del metabolismo y dióxido de carbono deben ser cumplidos en los tumores al igual que en cualquier tejido normal. Estas necesidades son resueltas al inducir la producción de nuevas células endoteliales en tubos (vasculogénesis) y vasos sanguíneos (angiogénesis) que permitan abastecer de estos nutrimentos y por lo tanto sostener la expansión del crecimiento neoplásico.

6. Activación de la invasión y metástasis. Al ir aumentando el grado de malignidad las células tumorales desarrollan alteraciones en su forma y unión a otras células, así como a la matriz extracelular que se ve reflejado en la invasión local y las metástasis a distancia.

La adquisición de éstas seis capacidades funcionales es posible gracias al establecimiento de dos características permisivas: la inestabilidad genómica que genera mutaciones al azar en las células tumorales y el estado de inflamación de las lesiones

pre malignas y malignas propiciado por células del sistema inmune y que promueve la progresión tumoral de diversas formas.

Aunque se han descrito otros atributos de las células tumorales que podrían ser añadidas a la lista de marcas del cáncer dos son de especial importancia considerándolas marcas del cáncer emergentes. La primera se refiere a la reprogramación del metabolismo energético con el fin de mantener el continuo crecimiento celular y proliferación. La segunda involucra la evasión activa de las células tumorales del ataque y eliminación por las células inmunes y que resalta el rol del sistema inmune tanto como antagonista como agonista del desarrollo y progresión tumoral.

Inmunoedición

La teoría de la inmunoedición está basada en que el sistema inmune no solo protege al huésped contra la formación tumoral (Figura 2), sino que también esculpe la inmunogenicidad del tumor, reflejando así la dualidad de acciones del sistema inmune en el desarrollo de los tumores: protección y promoción (Schreiber y col., 2011).

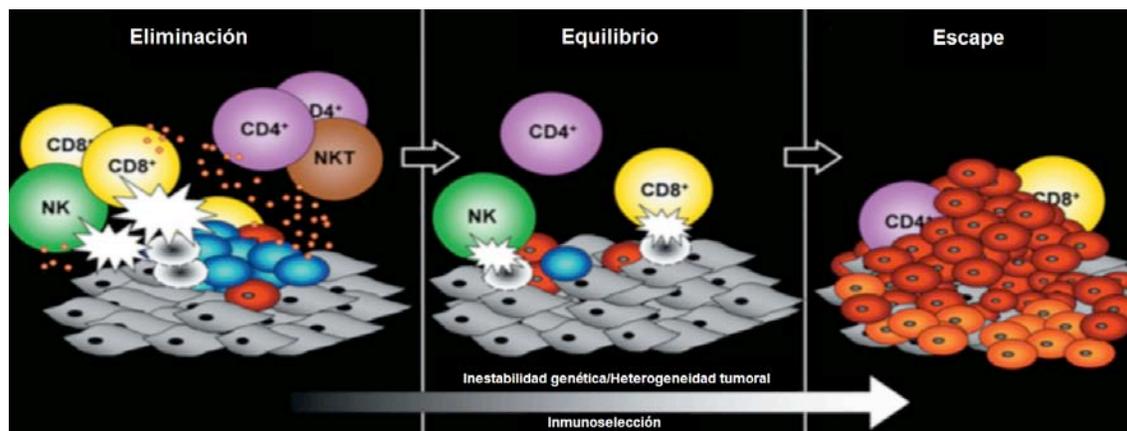


Figura 2. Inmunoedición del cáncer. Modificado de Dunn y col., 2002.

La inmunoedición del cáncer engloba tres procesos: 1. La fase de eliminación que corresponde a la inmunovigilancia, 2. La fase de equilibrio que representa el proceso mediante el cual el sistema inmune iterativamente selecciona y promueve la generación de clones tumorales con características que les permiten sobrevivir al ataque inmune, 3. La fase de escape es el proceso en donde el tumor inmunológicamente esculpido se expande de una manera incontrolada en el huésped inmunocompetente (Dunn y col., 2002).

En la primera fase del proceso de inmunoección del cáncer, la fase de eliminación, células inmunes se localizan, reconocen y destruyen células transformadas nacientes y por lo regular altamente inmunogénicas, siendo esta fase la que previene, en la mayoría de los casos, el desarrollo de la malignidad (Vesely y col., 2011). Dentro de las células efectoras de ésta etapa se encuentran las células NK, NKT, células dendríticas, macrófagos M1, linfocitos T CD4⁺ y T CD8⁺, así como linfocitos T $\gamma\delta$ (Mittal y col., 2014).

Los tumores en fase de equilibrio son un subgrupo de tumores latentes que son controlados específicamente por componentes del sistema inmune, T CD4⁺ y T CD8⁺, principalmente. En ésta fase, el sistema inmune del hospedero y las células tumorales entran en un balance dinámico, en donde una potente inmunidad antitumoral contiene, más no erradica totalmente, una población altamente heterogénea y medianamente inmunogénica de células tumorales, algunas de las cuales han adquirido medios para evadir el reconocimiento inmune y su destrucción.

La fase de escape representa el fracaso del sistema inmune tanto para eliminar como para controlar a las células transformadas, permitiendo a las clonas tumorales sobrevivientes crecer de una manera sin restricciones inmunológicas. Por otra parte, el sistema inmune contribuye a la progresión del tumor mediante la selección de las variantes tumorales más agresivas y poco inmunogénicas, suprimiendo la respuesta inmune antitumoral, o promoviendo el crecimiento tumoral. En esta fase encontramos células y moléculas con función inmunosupresora como linfocitos Treg, MDSC, TGF- β , IL-10, IDO, entre otras, y con función reparadora de tejidos y angiogénica como los macrófagos M2 y moléculas como VEGF (Vesely y col., 2011).

Mecanismos de evasión

Se ha descrito ampliamente que las células tumorales presentan mecanismos de evasión inmune, ya sea mediante la evasión del reconocimiento o la regulación de la respuesta inmune responsable de la eliminación de las clonas transformadas.

La inestabilidad genética, inherente a los tumores, da lugar a la diversidad genética y a la heterogeneidad proporcionando una ventaja de supervivencia que deriva en la selección natural de variantes tumorales. El resultado está determinado por múltiples factores en el microambiente tumoral, como factores de crecimiento, suministro de nutrientes y presión inmune, que sumado a la inestabilidad genómica genera un amplio repertorio de células tumorales que seguirán siendo seleccionadas de acuerdo a los factores ambientales (Khong y Restifo, 2002).

La disminución o pérdida total de la expresión de moléculas de clase I del MHC es un fenómeno común en la biología tumoral que debe su presencia a la importancia de éstas moléculas en la presentación de péptidos antigénicos y el reconocimiento tumoral. La desregulación de éstas moléculas incluye defectos en los genes del MHC, en la vía de procesamiento y transporte de antígenos, como la desregulación de las subunidades del complejo multicatalítico LMP-2 y LMP-7 y en los transportadores de péptidos TAP-1 y TAP-2, mutaciones en el gen $\beta 2m$ y pérdida de la heterocigocidad en el cromosoma 15q21 que contiene a éste gen (Bernal y col., 2012; Garrido y col., 1997).

La pérdida de antígenos tumorales en las células malignas es otro de los mecanismos de evasión ampliamente estudiado y descrito. Ésta pérdida antigénica tiene como consecuencia la falta de inmunogenicidad del tumor y por lo tanto la imposibilidad del sistema inmune para reconocer y eliminar las células tumorales ya sea por la inactivación o la tolerancia de los linfocitos T citotóxicos hacia los antígenos no inmunogénicos. Diversos estudios han demostrado una pérdida de antígenos inmunogénicos diferenciales después de la administración de una vacuna peptídica basada en una sola secuencia de la proteína antigénica, lo que demuestra la presión de selección del sistema inmune hacia el tumor descrito en la teoría de la inmunoedición (von Boehmer y col., 2013; Nicholaou y col., 2011).

Los dos mecanismos que el linfocito T CD8+ usa para eliminar a las clonas tumorales son la citotoxicidad mediada por el receptor de muerte Fas y su ligando FasL (CD95/CD95L) y la mediada por perforinas y granzimas, lo que los convierte en blancos importantes de la evasión tumoral.

Se ha observado en diferentes tipos de tumor una disminución en la expresión de Fas/FasL, promoviendo la resistencia a la apoptosis por éstas clonas tumorales. Para el caso de mieloma múltiple se encontraron mutaciones puntuales en la parte citoplásmica de la proteína, esto es, en la zona responsable de la transducción de la señal apoptótica (Terry y col., 1997). En un estudio realizado en pacientes con melanoma se encontraron mutaciones sin sentido presentes también en la región citoplásmica de la proteína Fas (Shin y col., 1999). Otro mecanismo de evasión incluye mutaciones en proteínas proximales de la vía Fas/FasL, como los dominios de muerte asociados a Fas (FADD), caspasa 8 y caspasa 10 y que han sido descritas en un estudio de pacientes con cáncer de pulmón de células no pequeñas (NSCLC) (Shin y col., 2002).

En el caso de la citotoxicidad mediada por perforinas y granzimas se ha encontrado que las células tumorales pueden resistir a éste tipo de muerte por la

interferencia de la vía. El bloqueo de ésta vía se ha demostrado que es debido a la sobreexpresión del inhibidor de serín proteasas PI-9/SPI-6 que inactiva directamente a la proteína efectora Granzima B (Medeme y col., 2001).

El microambiente tumoral es de suma importancia en la activación o inactivación de las células del sistema inmune; la liberación de citocinas por parte de las células tumorales impacta directamente sobre la respuesta de los linfocitos T a la presencia de las clonas transformadas. Algunas clonas tumorales llegan a ser capaces de producir citocinas y quimiocinas que afectan negativamente la maduración y función de las células inmunes (Khong y Restifo, 2002).

El factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF) es una proteína producida por el tumor y responsable de la formación de nueva vasculatura tumoral. En un estudio se demostró que VEGF es capaz de interactuar directamente con células progenitoras hematopoyéticas (HPC) bloqueando la vía del factor de transcripción NFκB produciendo una maduración deficiente de células dendríticas (DCs) que contribuye a una ineficiente presentación y reconocimiento de antígenos tumorales e inducción de inmunidad tumoral (Oyama y col., 1998). En un estudio realizado con pacientes con cáncer de mama, pulmón, cabeza y cuello se encontraron niveles elevados de VEGF en plasma que correlacionaba con una disminución en la cantidad de DCs en sangre y una acumulación de células carentes de marcadores de células hematopoyéticas maduras y cuya presencia fue asociada con una función inmune disminuida y el estado clínico del tumor (Almand y col., 2000).

Por otro lado, la presencia de IL-10 secretada por el tumor produce disminución en la capacidad de presentación antigénica, generación de CTLs, producción de citocinas tipo 1, reflejando defectos en la función de los linfocitos T y las APCs (Sharma y col., 1999). La IL-10 también aumenta la apoptosis espontánea en DCs (Ludewig y col., 1995), disminuye la expresión de moléculas de clase I, clase II del MHC e ICAM-1 en células tumorales (Yue y col., 1997) y puede inhibir la expresión y función de TAP1 y TAP2 (Salazar-Onfray y col., 1997).

Un aumento en la expresión de ciclooxigenasa 2 en células tumorales (Parrett y col., 1997) permite la síntesis de la prostaglandina E₂, citocina proinflamatoria que incrementa la producción de IL-10 por los linfocitos y macrófagos e inhibe la producción de IL-12 por los macrófagos (Huang y col., 1998).

La presencia de altas concentraciones de TGF-β se ha asociado fuertemente con la agresividad y progresión de la enfermedad (Gorsch y col., 1992). El TGF-β suprime la

generación de linfocitos T citotóxicos, la proliferación de linfocitos T dependiente de IL-2, la expresión de IL-2R y el receptor de transferrina y activa a los mismos linfocitos T a producir más TGF- β (Brabletz y col., 1993).

La expresión de ligandos de receptores de muerte por las células tumorales es otro de los mecanismos de escape tumoral. Una amplia variedad de tumores expresa FasL, que induce apoptosis en células Fas⁺, como en el caso de carcinoma de pulmón, melanoma, carcinoma de colon y carcinoma hepatocelular (Khong y Restifo, 2002). Así mismo las células tumorales son capaces de inducir la muerte en linfocitos T activados a través de la expresión de PD-L1 ya que promueven la apoptosis de los linfocitos T (Dong y col., 2002).

La presencia de células T reguladoras tanto en sangre periférica como en el microambiente tumoral está incrementada en pacientes con diferentes tipos de cáncer. Éstas T_{reg} pueden mitigar la respuesta inmune contra cáncer al ser células secretoras de TGF- β e IL-10 y que no secretan IFN- γ . También son potentes supresoras de la proliferación de linfocitos CD4⁺ y CD8⁺ activados y por lo tanto de la secreción de IFN- γ por éstos (Liyanage y col., 2002). Otro conjunto de células reguladoras involucradas en la progresión tumoral son las células supresoras derivadas de linaje mielóide (MDSCs). Éstas MDSCs promueven la evasión tumoral mediante la inhibición de la respuesta de las células T, soportando la progresión tumoral. La acumulación de las MDSCs se ha asociado con la progresión en diferentes tipos de cáncer humanos, y su eliminación mostró impacto en la mejoría de la respuesta inmune antitumoral (Khaled y col., 2013).

Rol de las moléculas del MHC en la evasión del cáncer

La alteración de la expresión de moléculas de clase I del MHC en la membrana de las células tumorales es uno de los mecanismos de evasión ampliamente encontrado en diversos tumores (Figura 3). Diferentes fenotipos alterados de moléculas de clase I del MHC se originan mediante múltiples mecanismos moleculares y han sido identificados en tumores humanos (Algarra y col., 2004).

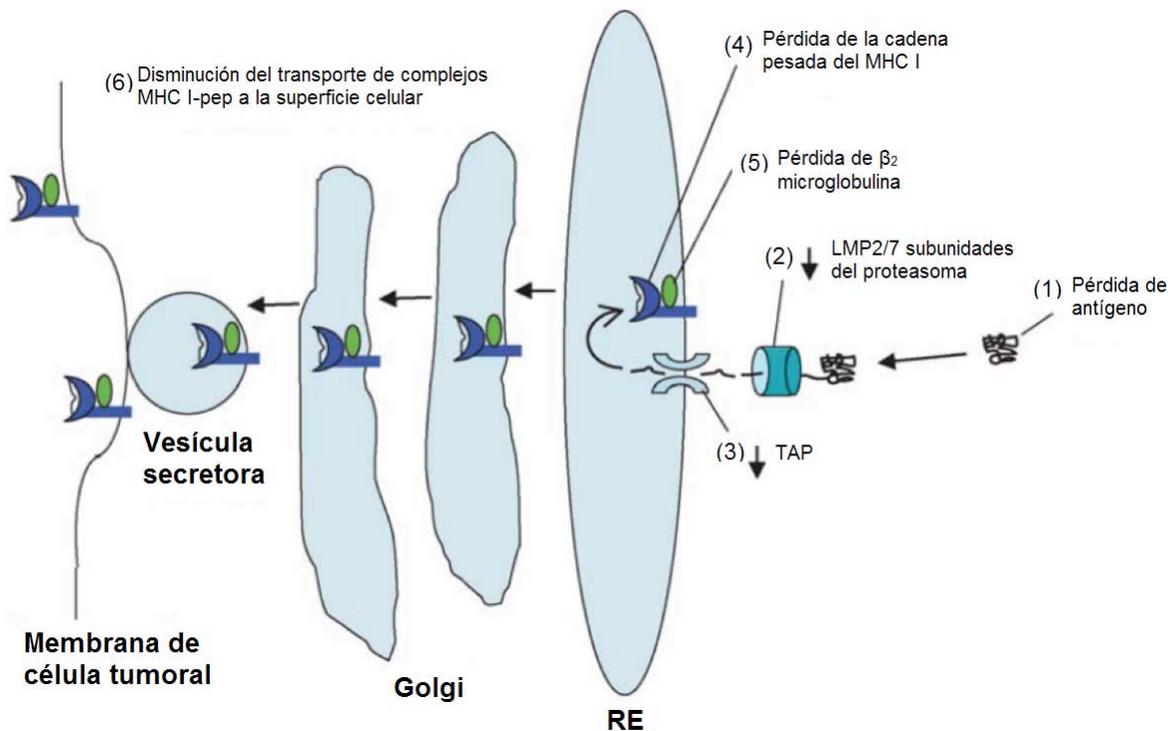


Figura 3. Moléculas de clase I del MHC en la evasión tumoral. Modificado de Drake y col., 2006.

Dentro de éstos mecanismos se encuentran: pérdida de heterocigocidad (LOH) en el cromosoma 6 y/o 15 donde se encuentran localizados los genes de la cadena pesada de las moléculas de clase I o de la β_2 microglobulina, mutaciones afectando éstos genes, disminución coordinada de la expresión de los loci HLA-A, B o C y la desregulación de la maquinaria de procesamiento de antígenos incluyendo los genes TAP y LMP (Garrido y col., 2010).

Las alteraciones en las moléculas de clase I del MHC han sido clasificadas desde el punto funcional en dos grupos principales: de regulación reversible o “suaves” las cuáles son posiblemente reversibles por la administración de IFN- γ ; y las estructurales irreversibles o “duras” en donde la expresión normal de moléculas de HLA no puede ser recuperada por la administración de citocinas (Garrido y col., 2010).

La cadena ligera, β_2 -microglobulina, es esencial para el correcto plegamiento de las moléculas de clase I del MHC. Existe evidencia que la deficiencia de ésta molécula genera fenotipos que escapan a la eliminación inmune en diferentes tipos tumorales. El cromosoma 15 puede sufrir LOH en sólo un gen de la β_2 -microglobulina y que puede ser precedido por una mutación en el segundo gen, que producirá una célula tumoral incapaz de expresar cualquier molécula de clase I del MHC que se asocie a la β_2 -microglobulina (Bernal y col., 2012).

Las clonas tumorales con expresión deficiente de moléculas de clase I del MHC son capaces de escapar al reconocimiento y respuesta inmune de los linfocitos T, pero son más susceptibles a la muerte mediada por las células NK; sin embargo, la célula tumoral puede perder los receptores de activación para la NK: MICA y MICB, moléculas no clásicas cuya expresión generalmente está asociada con el estrés celular y que no se asocian a la β 2-microglobulina. Estas dos alteraciones en conjunto pueden favorecer el crecimiento tumoral mediante el escape simultáneo del reconocimiento por parte del linfocito T y la NK (Algarra y col., 2004).

Moléculas de clase I clásicas

La expresión anormal de moléculas de clase I del MHC en células malignas es un evento frecuente que oscila desde la pérdida total de todas las moléculas de clase I hasta la pérdida parcial de haplotipos o alelos específicos (del Campo y col., 2012). Para el caso de cáncer de mama se reporta hasta un 96% en pérdida de expresión (García-Lora y col., 2003).

Los fenotipos alterados de moléculas de clase I del MHC se pueden definir en diferentes tejidos tumorales (García-Lora y col., 2003): Fenotipo I: Pérdida total de la expresión, Fenotipo II: Pérdida de un solo haplotipo, Fenotipo III: Disminución de la expresión de los locus HLA-A, B o C, Fenotipo IV: Pérdida de un solo alelo, Fenotipo V: Fenotipo compuesto por la combinación de la expresión de los fenotipos anteriores, Fenotipo VI: Falta de respuesta a la inducción por interferones, Fenotipo VII: Disminución de la expresión de moléculas clásicas y aparición de moléculas no clásicas.

Moléculas de clase I no clásicas

La vulnerabilidad de las células tumorales a ser reconocidas y eliminadas por las NK cuando disminuyen o pierden la expresión de moléculas clásicas, puede ser evitada por la expresión aberrante de moléculas no clásicas, clase Ib, que son con frecuencia un indicador de estrés intracelular o malignidad. Algunas de las moléculas clase Ib que se expresan aberrantemente en tumores incluyen a HLA-E, G y F (Haynes-Gilmore y col., 2014).

La expresión de las moléculas HLA-E, G y F en la membrana celular permiten su interacción con receptores de inhibición de la célula NK y por lo tanto causa inhibición en su proliferación y funciones citotóxicas efectoras. En tumores de cáncer de mama se

observó la expresión de HLA-E, G y EG en el 50, 60 y 23% de los pacientes (de Krujif y col., 2010).

HLA-G y su función

La molécula HLA-G se expresa selectivamente en los citotroblastos de la interfase materno fetal, donde juega un rol importante en la tolerancia materna al feto. Las células NK del útero materno expresan receptores de inhibición de muerte para las moléculas HLA-G, por lo que su interacción contribuye a la sobrevivencia del feto semiallografo al conferir tolerancia inmunológica de la madre a los tejidos fetales (Rouas-Freiss y col., 1997).

HLA-G puede interactuar directamente con diferentes subpoblaciones de células inmunes incluyendo células NK, linfocitos T y células presentadoras de antígenos (APC), así como células endoteliales vía receptores de inhibición. Esta interacción está acompañada por la generación y mantenimiento de la tolerancia a diferentes estadios de la respuesta inmune, es decir, diferenciación, proliferación, citolisis y secreción de citocinas (Amiot y col., 2011).

HLA-G como mecanismo de evasión en cáncer

La expresión ectópica de HLA-G en células tumorales podría ser un mecanismo mediante el cual estas células malignas pueden escapar de la inmunovigilancia (Figura 4). El hecho de que la molécula HLA-G sea selectivamente expresada en células trofoblásticas produce un interés particular, ya que, a pesar de que los trofoblastos son un tejido normal, comparten ciertas características comunes con las células neoplásicas, como la alta tasa mitótica, propiedades invasivas, la expresión de factores de crecimiento y sus receptores, hormonas y proto-oncogenes, así como el gasto energético necesario para la proliferación celular (Paul y col., 1998).



Figura 4. Función tolerogénica de HLA-G. Modificado de Rouas-Freiss y col., 2014.

Los antígenos HLA-G tienen un polimorfismo limitado, a diferencia de las moléculas clásicas; sin embargo, la transcripción alternativa de su mRNA codifica siete distintas isoformas de la proteína, de las cuáles HLA-G1, -G2, -G3 y -G4 se expresan como proteínas de unión a membrana en la superficie de la célula, mientras que HLA-G5, -G6 y -G7 son isoformas solubles (Seliger y col., 2003).

Dentro de los mecanismos de evasión mediados por HLA-G se incluyen: 1) inhibición de la actividad citotóxica de CTLs y NK, 2) inhibición de la proliferación de linfocitos T CD4⁺ y liberación de citocinas, 3) inhibición de la progresión del ciclo celular en células T alorreactivas, 4) generación de un nuevo tipo de células CD4⁺ y CD8⁺ reguladoras por la transferencia de HLA-G de las APC a los linfocitos T (trogocitosis), 5) inducción de DC tolerogénicas asociada con inhibición de su diferenciación y 6) inducción de un perfil de citocinas Th2 en el sitio tumoral a través de la estimulación de la secreción de IL-3, IL-4 e IL-10. Las isoformas solubles (sHLA-G) inducen apoptosis de linfocitos T CD8⁺ y NK CD8⁺ activados, ya que la unión al correceptor CD8 promueve la sobreexpresión de Fas ligando aumentando la posible interacción de Fas/sFasL. sHLA-G5 también inhibe la aloproliferación de linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺ bloqueando la progresión del ciclo celular (Pistoia y col., 2007).

La capacidad de HLA-G para inhibir la activación de las NK está dada por el alto grado de homología con respecto a las moléculas clásicas (82%-85%), ya que al estar presente en la membrana celular simula la presencia de una molécula clásica

manteniendo el equilibrio entre receptores de activación e inhibición que mantienen a las NK en un estado de no activación (Figura 5).



Figura 5. Homología de la molécula H2-K^d y QA2. Tomado de Xiao-lin He y col., Structure. 2001.

Para el caso de los CTL, que a diferencia de las NK sí lleva un reconocimiento antígeno-específico, la formación de un bucle, el AB, apunta lejos del sitio en donde normalmente el correceptor CD8 se une a la molécula clásica. Éste bucle en HLA-G requeriría al menos un cambio conformacional de 12 Å para adoptar la posición que presentan las moléculas de clase I del MHC cuando se unen al CD8 (Figura 6).

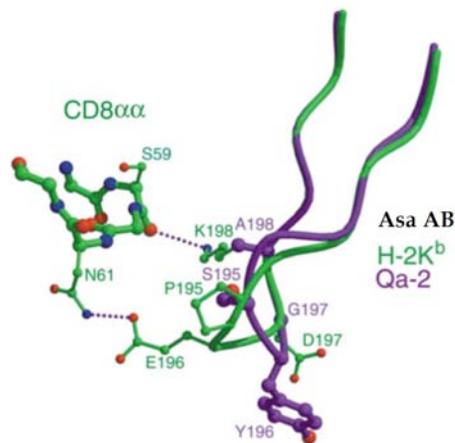


Figura 6. Esquema de la no interacción entre la región $\alpha 3$ y el correceptor CD8 del linfocito T. Modificado de Xiao-lin He y col., Structure. 2001.

En ambos casos la asociación del péptido a la molécula HLA-G producirá una presentación antigénica promiscua que no desencadenará la activación de ninguna de estas dos células, incluso al asociar moléculas inmunogénicas (He y col., 2001).

Inmunoterapia en cáncer

La meta de la inmunoterapia es balancear la activación del sistema inmune contra el cáncer a la vez que prevenir la alta toxicidad de los tratamientos quimioterapéuticos (Schwab y col., 2014).

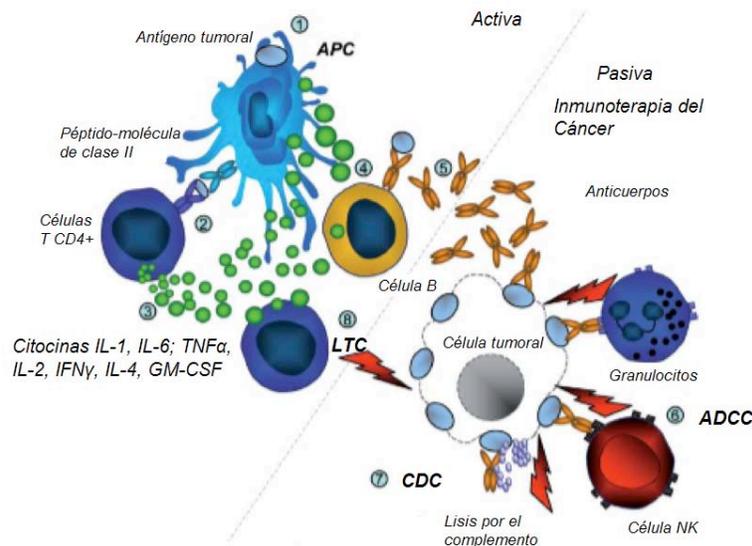


Figura 7. Inmunoterapia del cáncer. Modificado de Schuster y col., 2006.

La inmunoterapia activa es aquella capaz de estimular al sistema inmune para controlar eficientemente el crecimiento tumoral y en algunos casos incluso erradicar tumores sólidos, como es el caso de las vacunas contra cáncer. Tiene como propósito la inducción de una respuesta inmune antígeno-específica endógena y de larga duración (Figura 7).

La inmunoterapia pasiva es aquella que proporciona grandes cantidades de moléculas efectoras que desencadenan una respuesta inmune antígeno-específica, pero a diferencia de la inmunoterapia activa es de vida corta y dependiente de aplicaciones repetidas (Schuster y col., 2006).

Bibliotecas de Epítomos Variables (BEVs) en la generación de vacunas

La amplia variabilidad genética y antigénica son el principal obstáculo en el desarrollo de vacunas contra VIH/SIDA, VHC, influenza, malaria y cáncer. A partir de éste planteamiento se desarrolló el concepto de las Bibliotecas de Epítomos Variables, vacunas con una mezcla de miles de variantes pertenecientes a un solo epítopo. Usando BEVs en el 2009 se inmunizaron ratones con un epítopo inmunodominante de linfocito CD8+ derivado del VIH-1. Los ratones inmunizados con tales inmunógenos desarrollaron una respuesta epítopo-específica de linfocitos CD8+ IFN- γ + que eran capaces de reconocer más del 50% de variantes altamente mutadas provenientes del epítopo silvestre (Pedroza-Roldán y col., 2009). Usando éstas mismas bibliotecas generadas como plásmidos de DNA o como fago M13, Charles-Niño y col., en 2011, demostraron que el suero de ratones inmunizados con éstas BEVs contenían anticuerpos neutralizadores contra 5 de 10 aislados virales, incluyendo aislados de VIH-1 que son resistentes a la neutralización por varios anticuerpos monoclonales potentes.

Vacunas contra cáncer basadas en Bibliotecas de Epítomos Variables (BEVs)

En el caso del cáncer no solo nos enfrentamos a la variabilidad genética y antigénica sino a los cambios dinámicos que conducen a un amplio repertorio epitópico junto al escape de la inmunovigilancia por la disminución en la expresión y presentación de antígenos, así como la inmunotolerancia y mecanismos de evasión de las células tumorales. A partir del concepto de las BEVs, se probaron las propiedades inmunológicas y el efecto antitumoral de variantes epitópicas derivadas de la proteína survivina en un modelo murino de cáncer de mama 4T1 metastásico agresivo. Los ratones inmunizados con las BEVs derivadas de survivina mostraron una inhibición estadísticamente significativa del crecimiento tumoral, tanto en tratamiento profiláctico como terapéutico. Además, generaron una respuesta de linfocitos CD8+ IFN- γ + que fueron capaces de reconocer más del 50% de un panel de 87 variantes de epítomos mutados de survivina (Dominguez-Romero y col., 2014).

METODOLOGÍA

Material biológico

Se utilizó la línea celular 4T1 de cáncer de mama de la empresa ATCC. La línea celular fue cultivada en medio RPMI-1640 suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB) y antibióticos.

Se utilizaron ratones hembra de la cepa Balb/c de seis a ocho semanas adquiridos en la Unidad de Modelos Biológicos del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM.

Inmunógenos

El origen de las secuencias que fueron probadas en este trabajo se presentan en la Tabla 1.

Secuencia	Origen
45A2	Región $\alpha 2$ de la molécula H2-Kd
QA2	Secuencia de la molécula QA2, homólogo de HLA-G
P3	Región líder de la molécula H2-Kd

Tabla 1. Origen de las secuencias utilizadas como inmunógenos.

La localización de los péptidos dentro de la molécula de origen para 45A2 y QA2 se muestran en color rojo en las imágenes de la Figura 8 y 9 correspondientemente, generadas mediante el programa Pymol.

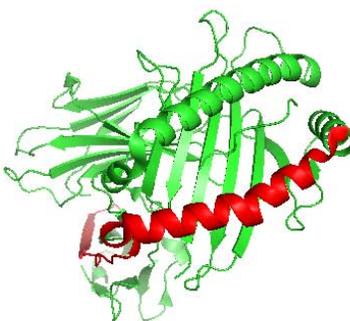


Figura 8. Localización del péptido 45A2 en la molécula de origen H2-K^d. Generado en Pymol.

Las secuencias de los péptidos sintéticos fueron elegidas a partir de la secuencia de la molécula completa utilizando la herramienta informática para predicción de epítopos inmunogénicos SYFPEITHI.

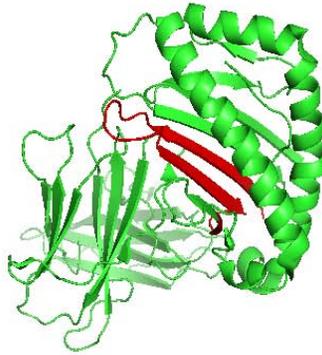


Figura 9. Localización del péptido QA2 en la molécula de origen. Generado en Pymol.

Los péptidos sintéticos P3 fueron adquiridos de la empresa GenScript (Nueva Jersey, Estados Unidos), los péptidos de la secuencia 45A2 de la empresa PEPMIC (Suzhou, China) y los de QA2 de la empresa Synpeptide (Shanghai, China), las secuencias tanto de las Bibliotecas como de los péptidos silvestres (Nominales) se registran en la siguiente Tabla:

Inmunógeno	Secuencia	Posiciones de mutación
45A2N	AGDAEYYRAYLEGECEVWLRRYLELGNETLLRTDSP KAHVTYHPRS	0
L45A2	AGDAEYXRAYLXGECVEXLRXYLXLGNXTLLRXDXP KAHVTYHPRS	8
QA2N	GPHSLRYFHTAVSWPGLVEPRFIIVGYVDDTQFV	0
LQA2	GPHXLRXFXTAVXWPGLVXPRFIXVGYVXDTQFV	6
P3	MAPCTLLLLLAAALAPTQTR	0
P3.1	MAPXTXLXLXAXALAXTQTX	6

Tabla 2. Inmunógenos evaluados. Se muestran los inmunógenos probados y las secuencias que los componen. En el caso de 45A2N, QA2N y P3.1 corresponden a la secuencia silvestre (nominal) y en el caso de L45A2, LQA2 y P3 corresponden a los péptidos mutagenizados (bibliotecas) en los cuales el número de posiciones de mutación corresponden a las X presentes en la secuencia. X representa cada uno de los 20 aminoácidos posibles.

Reto y monitoreo del desarrollo tumoral

Los ratones fueron implantados con 1×10^4 células 4T1 en un volumen de 100 μ L de buffer salino de fosfatos (PBS) por vía subcutánea cerca de la almohadilla mamaria. A partir de la aparición del tumor (alrededor del día 8-10 posterior al reto tumoral) se

monitoreó el tamaño tumoral midiendo dos diámetros transversales utilizando un calibrador vernier digital y se reporta el área tumoral en mm². Al día 30 posterior al reto tumoral los ratones fueron sacrificados y el tumor fue extraído para determinar la masa tumoral.

Inmunización

Al quinto día posterior al reto tumoral los ratones fueron inmunizados con el péptido sintético y adyuvante PolyI:C en una proporción 1:1 disueltos en PBS al 1X en un volumen final de 100 µL por ratón inmunizado, por vía subcutánea en la almohadilla contralateral al sitio del implante tumoral. Se decidió utilizar dosis de 180 y 250 µg debido a que la dosis de 180 µg es con la que se han obtenido mejores resultados al probar péptidos de otras moléculas en nuestro grupo de trabajo y la dosis de 250 µg se probó esperando un efecto dependiente de dosis. Las dosis utilizadas para cada uno de los inmunógenos se detallan en la Tabla 2.

Inmunógeno	Dosis (µg)
P3	250
45A2	250
QA2	250
45A2	180
QA2	180
QA2+45A2	90 y 90
QA2+45A2	180 y 180

Tabla 3. Dosis de los inmunógenos evaluados.

Conteo de macrometástasis

Al día 30 posterior al reto tumoral los ratones fueron sacrificados y los pulmones fueron obtenidos después de ser perfundidos con solución Bouin, solución que ayuda a revelar los puntos de macrometástasis. Las macrometástasis fueron contadas en cada uno de los pulmones para obtener un promedio por tratamiento evaluado. Para el conteo de macrometástasis se usó como criterio contar aquellas macrometástasis que son visibles a ojo.

Ensayo de proliferación celular mediante tinción con CFSE

Células de bazo fueron obtenidas a partir de los ratones después de 10 días de la inmunización y se realizó el ensayo de proliferación por medio de la tinción con CFSE, para ello se lisaron los eritrocitos y las células blancas se resuspendieron en una solución PBS/0.1% BSA precalentada para obtener una concentración final de 5×10^6 células por mL a las que se le adicionaron 2 μ L de la solución Stock 5mM de CFSE.

Las células marcadas con CFSE fueron cocultivadas por cinco días con células dendríticas y péptido sintético ya sea de las bibliotecas o con los epítomos silvestres y PolyI:C como adyuvante. En algunos casos se realizó la inmunotinción con anticuerpos anti-CD3 (eBioscience, San Diego CA), anti-CD4, anti-CD8 y anti-IFN- γ (BioLegend, San Diego CA). 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-CD3 APC-eFluor780 (1 μ g/ 10^6 células), anti-CD8 PE y anti-CD4 APC (0.2 μ g/ 10^6 células) para antígenos de membrana, 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, San Diego, CA) 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 15 min con la disolución de permeabilización (BioLegend, San Diego, CA). A las células permeabilizadas se adicionó el anticuerpo anti-IFN- γ PerCP-Cy5.5 (1 μ g/ 10^6 células) incubándose en oscuridad a temperatura ambiente (TA) durante 30 min. Finalmente, las células fueron fijadas con 1% de paraformaldehído.

Además, 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 citotóxicos y cooperadores, así como los porcentajes de dichas subpoblaciones que producen IFN- γ .

Análisis de los ensayos de proliferación por citometría de flujo

Todas las muestras fueron adquiridas y analizadas en un citómetro de flujo Attune (Applied Biosystems, Foster City, CA) utilizando el programa Attune Cytometric Software 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 (Figura 10).

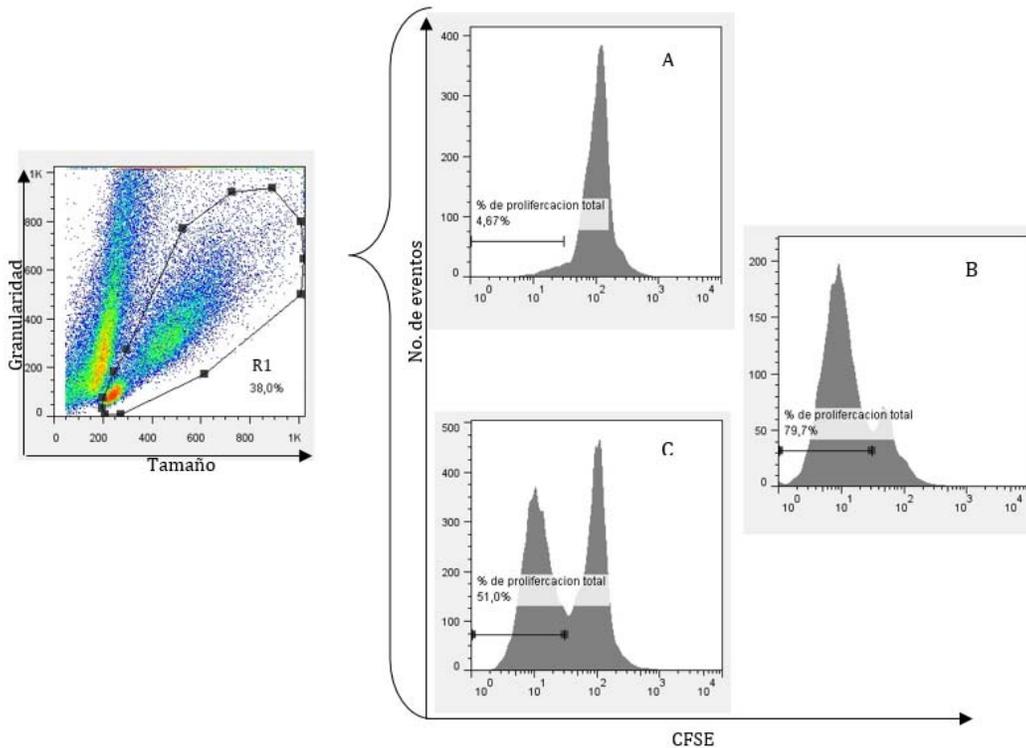


Figura 10. Análisis representativo del porcentaje de proliferación total. En la gráfica tamaño vs granularidad se delimitó la región de esplenocitos (R1), de ella se construyó el histograma donde se muestra la fluorescencia para CFSE. En A se muestra el pico de esplenocitos que no proliferaron, estos fueron cultivados sin inmunógeno, 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 péptido sintético.

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 CD3 vs tamaño, seleccionando la región CD3+ a partir de la cual se construyó un nuevo 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 (Figura 11).

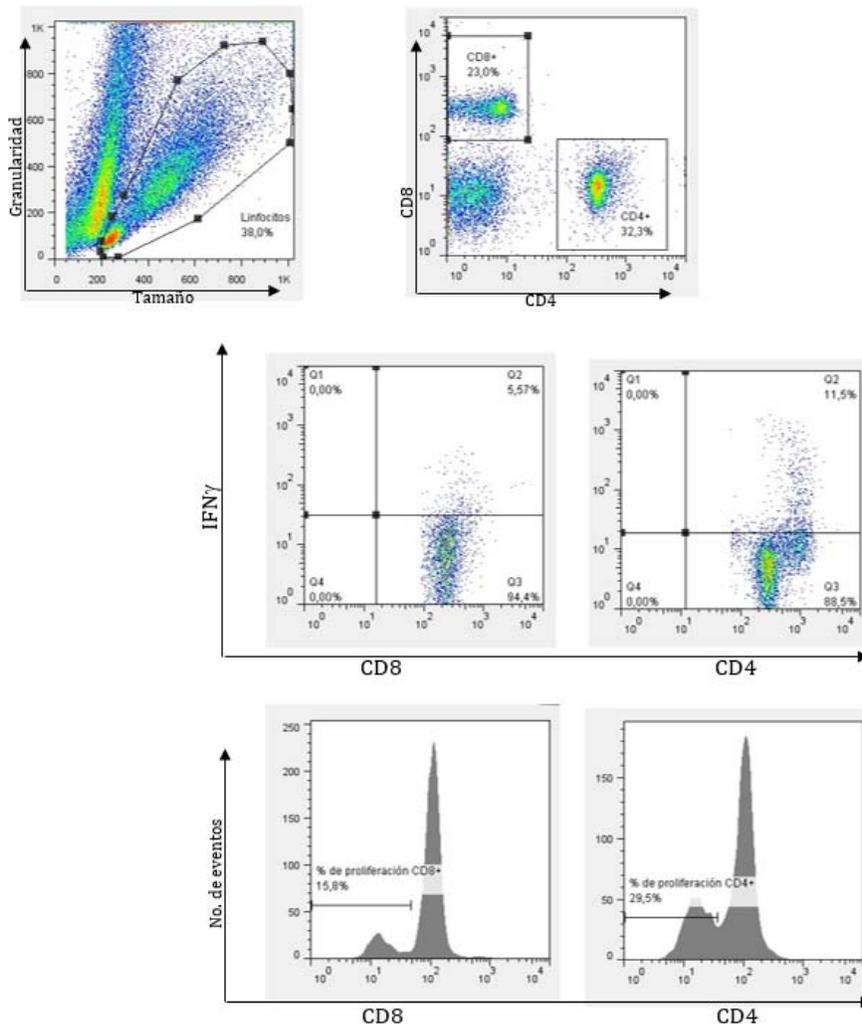


Figura 11. Análisis representativo del porcentaje de las poblaciones CD4+IFN- γ + y CD8+IFN- γ + así como del porcentaje de proliferación de la población de esplenocitos CD4+ y CD8+. En la gráfica tamaño vs granularidad se delimitó la región de esplenocitos (R1), de ella se construyó una gráfica CD4 vs CD8 y de ahí se seleccionaron dos subpoblaciones (CD8+ y CD4+). Con dichas subpoblaciones se realizaron los gráficos CD4 o CD8 vs. IFN- γ donde se determinó el porcentaje de las poblaciones CD4+IFN- γ + y CD8+IFN- γ +. De forma similar al análisis de la figura 8, se construyeron los histogramas donde se determinó el porcentaje de proliferación de las poblaciones CD4+ y CD8+.

Análisis estadístico

Los resultados para crecimiento tumoral fueron analizados mediante ANOVA. Para el caso del conteo de macrometástasis los resultados se analizaron por medio de la prueba Kruskal-Wallis. Se utilizó el Software GraphPad Prism versión 6.0.

RESULTADOS

Evaluación del efecto antitumoral

Para la evaluación del efecto antitumoral de los tratamientos se compararon los grupos inmunizados con nominales y las bibliotecas entre si y contra el control de implante, los parámetros que se evaluaron fueron la cinética de crecimiento tumoral, la proliferación celular al día quince posterior al reto tumoral, la masa tumoral al día treinta (día que se finalizó el experimento y se extrajeron tumor y pulmones como se mencionó en materiales y métodos) y el promedio de macrometástasis pulmonar al día treinta posterior al reto tumoral.

Cinética de crecimiento tumoral

La cinética de crecimiento tumoral se realizó a partir del día 8-10 posterior al reto tumoral por la medición de los tumores en intervalos de dos o tres días. Se obtuvo un promedio de los datos individuales de cada ratón y se compararon entre tratamientos.

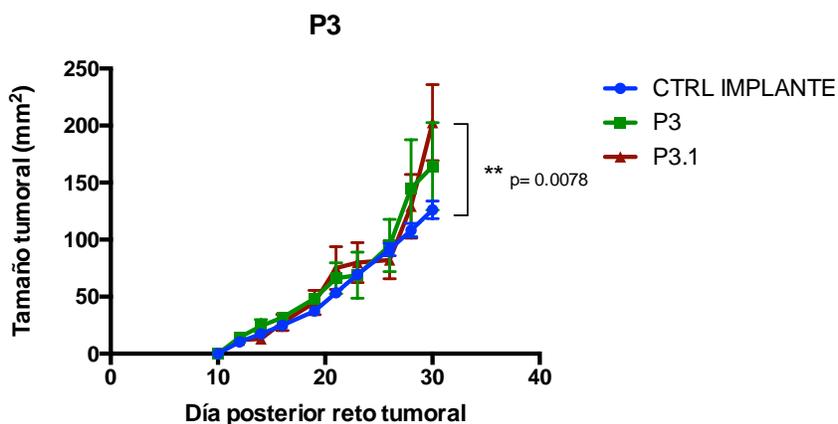


Gráfico 1. Cinética de crecimiento tumoral de la secuencia P3 (n=6), dosis 250 µg. Se observó un efecto pro tumoral en el tratamiento P3.1 correspondiente a la biblioteca de ésta secuencia, se obtuvo una diferencia significativa contra el control de implante (n=37).

Para el caso de la dosis de 250 µg para el tratamiento P3.1 se observó un aumento significativo en el crecimiento tumoral comparando contra el control de implante al realizar un análisis de varianza con un intervalo de confianza de 95 % y una $p=0.0078$, lo que indica que ésta biblioteca promueve el crecimiento tumoral. Es importante remarcar que no se observó el mismo efecto para la secuencia nominal P3 que tuvo un comportamiento similar al control de implante (Gráfico 1).

En el caso de la inmunización con una dosis de 250 µg para la secuencia 45A2 se obtuvo un aumento estadísticamente significativo al comparar el péptido nominal, 45A2N, contra el control de implante con una $p=0.0202$ con un IC=95% (Gráfico 2). No así para la biblioteca L45A2 que presentó un comportamiento similar al control de implante.

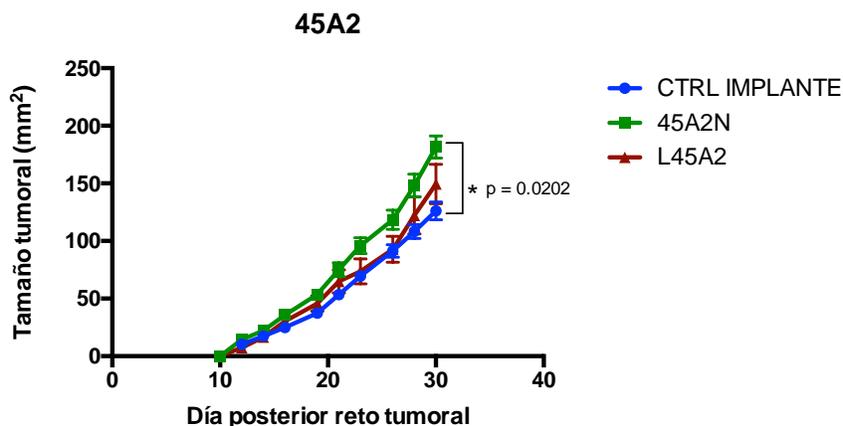


Gráfico 2. Cinética de crecimiento tumoral para la secuencia 45A2 (n=6), dosis 250 µg. Se observó un aumento estadísticamente significativo en el crecimiento tumoral del péptido nominal 45A2N al comparar contra el control de implante (n=37).

Para la secuencia QA2 no se observó diferencia en la cinética del crecimiento tumoral para ninguno de los dos péptidos, nominal y biblioteca, comparando contra el control de implante (Gráfico 3).

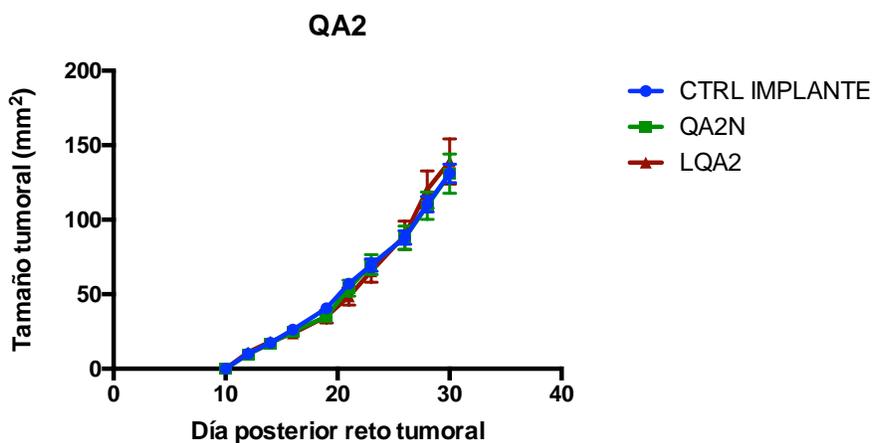


Gráfico 3. Cinética de crecimiento tumoral para la secuencia QA2 (n=20), dosis 250 µg. No se observó un comportamiento diferente al control de implante (n=37) para los péptidos QA2N (nominal) y LQA2 (biblioteca).

En el caso de los tratamientos evaluados con una dosis de 180 μg para la secuencia 45A2 se observa, en el Gráfico 4, una tendencia no significativa en la disminución del crecimiento tumoral entre los tratamientos y el control de implante al realizar un análisis de varianza para los datos al día 30 posterior al reto tumoral. Por lo que no podemos asegurar que alguno de los dos inmunógenos presenten una actividad inhibitoria del crecimiento tumoral comparando contra el grupo sin tratamiento.

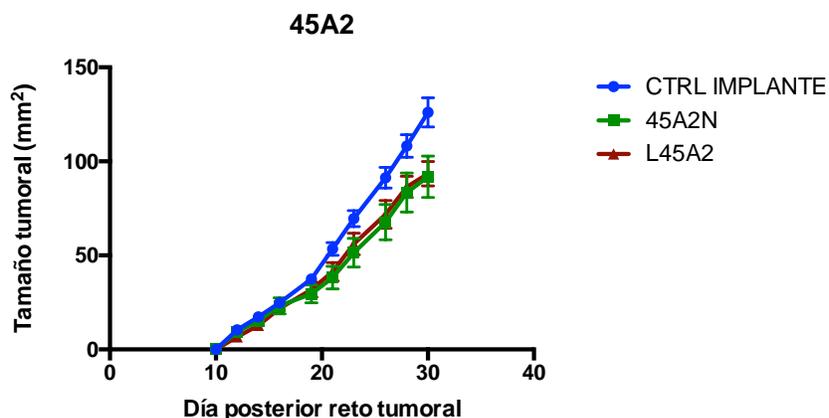


Gráfico 4. Cinética de crecimiento tumoral para la secuencia 45A2 (n=7), dosis 180 μg . Se observó una tendencia a la disminución del crecimiento tumoral entre los tratamientos y el control de implante (n=37) más no se encontró diferencia significativa.

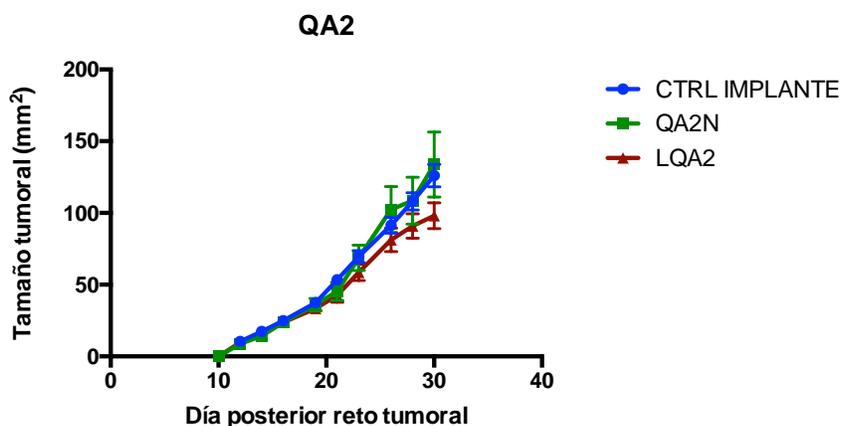


Gráfico 5. Cinética de crecimiento tumoral para la secuencia QA2, dosis 180 μg . No se observó diferencia entre los tratamientos (n=13) y el control de implante (n=37).

Para el caso del tratamiento QA2 en la dosis de 180 μg no encontramos diferencia para el crecimiento tumoral al comparar con el control de implante. Por lo tanto, a ésta

dosis tanto la biblioteca, LQA2, como la secuencia nominal, QA2N, no presentan un efecto inhibitorio del crecimiento tumoral (Gráfico 5).

Se evaluaron combinaciones de los péptidos QA2 y 45A2 en dosis de 90 y 180 μg por péptido, obteniendo dosis finales de 180 y 360 μg . Para el caso de la combinación de bibliotecas (LQA2+L45A2) y nominales (QA2N+45A2N) en una dosis final de 180 μg no se observó disminución en el crecimiento tumoral entre los tratamientos y el control de implante (Gráfico 6).

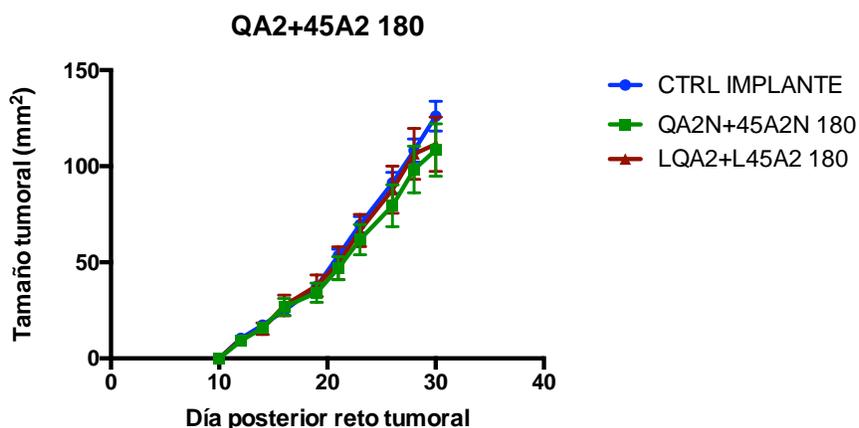


Gráfico 6. Cinética de crecimiento tumoral para la combinación de bibliotecas, LQA2+L45A2, (n=7) y nominales, QA2N+45A2N, (n=7) dosis final 180 μg . No se observó disminución en el crecimiento tumoral entre la combinación de péptidos y el control de implante (n=37).

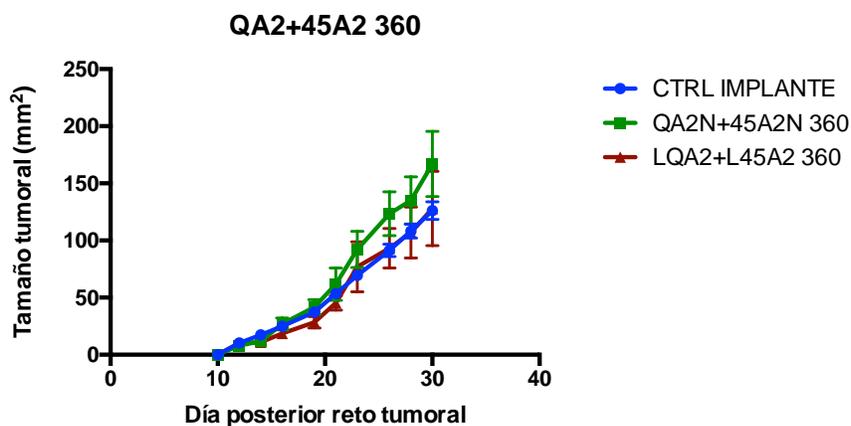


Gráfico 7. Cinética de crecimiento tumoral para la combinación de bibliotecas, LQA2+L45A2, (n=6) y nominales, QA2N+45A2N, (n=6) dosis final 360 μg . No se observó diferencia significativa entre los tratamientos y el control de implante.

En el caso de la combinación de péptidos con una dosis final de 360 μg (Gráfico 7), aunque se observa un ligero aumento en el crecimiento tumoral para la combinación de nominales, éste no alcanza a ser estadísticamente significativo por lo que no se observaron diferencias entre los tratamientos y el control de implante.

Masa tumoral

Al día treinta posterior al reto tumoral los ratones fueron sacrificados y el tumor principal fue removido para obtener su peso en una balanza analítica. La masa tumoral se obtuvo promediando, para cada uno de los grupos, el peso de cada uno de los tumores. Los resultados fueron analizados más no se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos ni contra el control de implante para ninguno de los tratamientos evaluados.

Conteo de macrometástasis

El modelo de 4T1 es conocido por inducir metástasis espontáneas a pulmón a partir del tumor primario. Para evaluar el grado de invasión tumoral se contó el número de macrometástasis presentes en los pulmones de los ratones para los diferentes tratamientos.

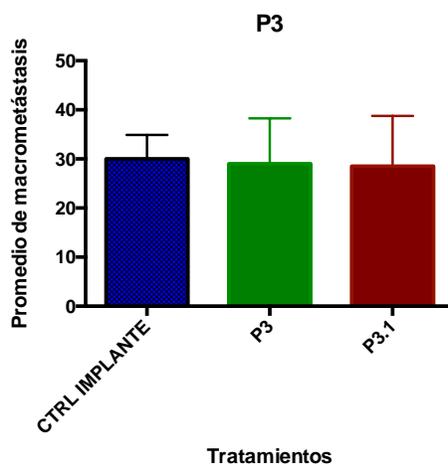


Gráfico 8. Promedio de macrometástasis para P3, dosis 250 μg . No se observó diferencia en el promedio de macrometástasis pulmonar entre los tratamientos P3 (n=5), P3.1 (n=6) y el control de implante (n=37).

En el caso de los péptidos P3 y P3.1 en la dosis de 250 μg no se observó diferencia en la disminución de macrometástasis presentes en el pulmón comparando con el control de implante, como se observa en el Gráfico 8. Por lo tanto, aunque la biblioteca

P3.1 promueve el crecimiento del tumor primario no favorece la invasión y metástasis pulmonar si lo comparamos con el control de implante y su respectivo nominal (P3).

Así mismo, no se observó diferencia en el promedio de macrometástasis pulmonares para las secuencias 45A2 y QA2 en la dosis de 250 µg al comparar con el control sin tratamiento (Gráficos 9 y 10).

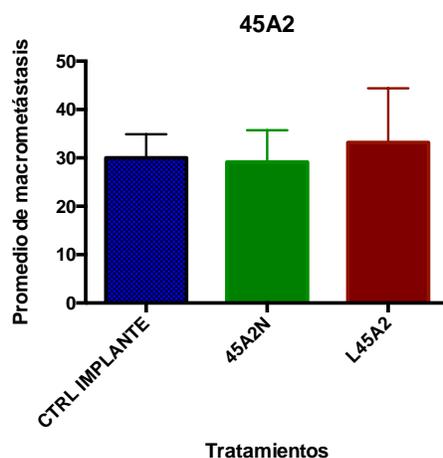


Gráfico 9. Promedio de macrometástasis para 45A2, dosis 250 µg. No se observó diferencia entre los péptidos, nominal y biblioteca (n=6), al comparar contra el control de implante (n=37).

Aunque se observó un mínimo aumento en el promedio de macrometástasis para las bibliotecas L45A2 y LQA2, no fue estadísticamente significativo, por lo que no se puede asegurar que exista un efecto prometastásico al inmunizar con dichas bibliotecas a una dosis de 250 µg.

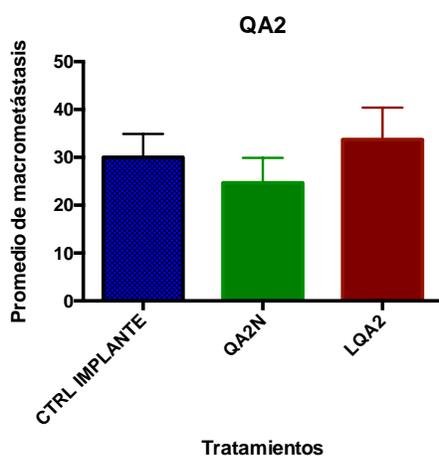


Gráfico 10. Promedio de macrometástasis para QA2, dosis 250 µg. No se observó diferencia entre los péptidos, nominal y biblioteca (n=20), y el control de implante (n=37).

En el caso de la dosis de 180 µg para la secuencia 45A2, Gráfico 11, no se encontró diferencia significativa entre los tratamientos (45A2N y L45A2) y el control de implante, aunque si se observó tendencia en la disminución del número de macrometástasis presentes en pulmón tanto para el nominal como para la biblioteca al comparar contra el control de implante.

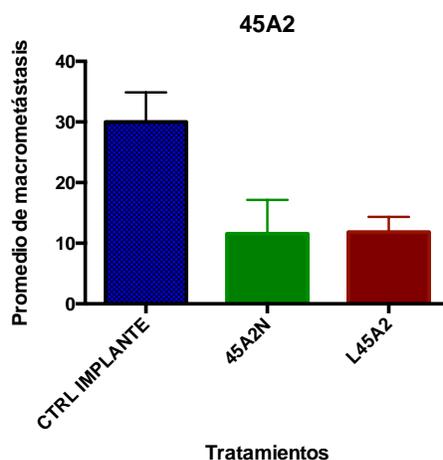


Gráfico 11. Promedio de macrometástasis para 45A2, dosis 180 µg. No se observó diferencia significativa entre el control de implante (n=37) y los tratamientos (n=7) aunque si se observa tendencia a la disminución del número de macrometástasis pulmonares.

Esto puede ser debido a la dispersión de los datos y al número reducido de individuos evaluados para cada uno de los tratamientos, por lo que es conveniente no descartar completamente la funcionalidad antimetastásica de la secuencia 45A2 (tanto nominal como biblioteca) para éste modelo murino de adenocarcinoma de mama, así como aumentar la cantidad de individuos evaluados tanto para la biblioteca como para el nominal.

Para el caso de la secuencia QA2 se observó diferencia significativa entre la biblioteca (LQA2) y el control de implante con un intervalo de confianza del 95 % y una $p=0.0460$; mientras que para el tratamiento nominal (QA2N) no se observó diferencia significativa al comparar con el control de implante (Gráfico 12). En este caso la biblioteca mostró tener un efecto antimetastásico que no se genera al inmunizar con el péptido nominal QA2N.

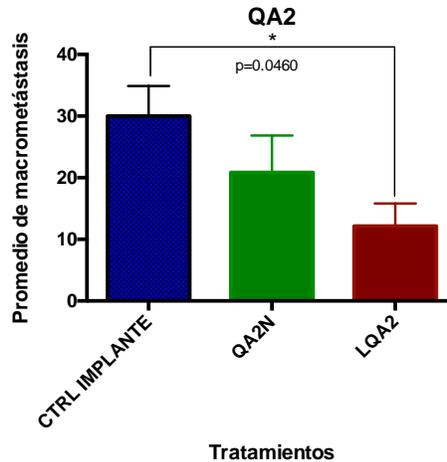


Gráfico 12. Promedio de macrometástasis para QA2, dosis 180 µg. Se encontró diferencia significativa entre LQA2 (n=13) y el control de implante (n=37). No se observó diferencia entre QA2N y el control de implante.

Con estos resultados podemos asegurar que la biblioteca LQA2 tiene un efecto antimetástasico que no se observa al inmunizar con el péptido nominal, lo que nos sugiere que las posiciones de mutación para esta secuencia son las responsables de dicho efecto.

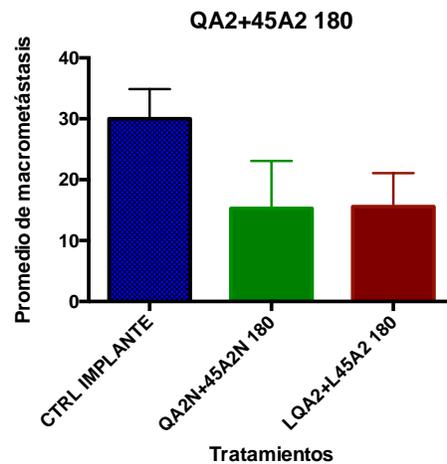


Gráfico 13. Promedio de macrometástasis para la combinación de péptidos, dosis final 180 µg. Se observa una tendencia no significativa a la disminución de macrometástasis pulmonar para ambas combinaciones, QA2N+45A2N (n=7) y LQA2+L45A2 (n=7), comparando con el control de implante (n=37).

Para los tratamientos 45A2 y LQA2 con una dosis de 250 µg no se encontró diferencia significativa y no se observaron tendencias que demostraran algún efecto antimetastásico probable para ambos tratamiento, nominal y biblioteca, en su lugar

observamos el mismo comportamiento que el control de implante lo que nos indica que no hubo ningún efecto con las mismas vacunas pero a una dosis mayor. Lo que observamos es un efecto dosis dependiente al observar tendencia o función a una dosis de 180 µg pero no a una dosis de 250 µg.

En el caso de las combinaciones de péptidos QA2+45A2 observamos una tendencia no significativa para la dosis de 90 µg por péptido con una dosis final de 180 µg (Gráfico 13), esto tanto para la combinación de nominales como para la combinación de bibliotecas, por lo que sería importante volver a probar la combinación a dicha dosis.

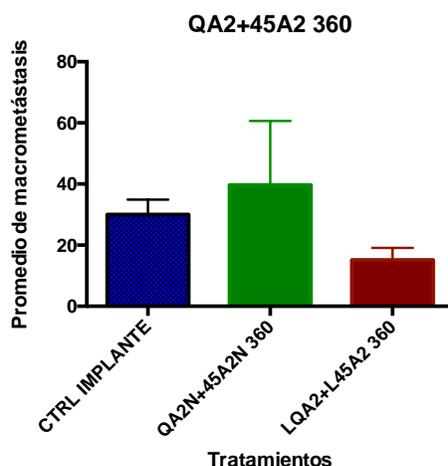


Gráfico 14. Promedio de macrometástasis para la combinación de péptidos, dosis final 360 µg. Se observó una disminución no significativa, en el promedio de macrometástasis en pulmón, entre la combinación de bibliotecas, LQA2+L45A2, (n=6) y el control de implante (n=37). También se observó un aumento no significativo entre la combinación de nominales, QA2N+45A2N, (n=6) y el control de implante (n=37).

En el caso de la combinación de bibliotecas (LQA2+L45A2) con una dosis final de 360 µg (Gráfico 14) se observó una tendencia similar a la combinación con dosis final de 180 µg, no así para la combinación de nominales (QA2N+45A2N) con dosis final de 360 µg, con la cual se observó un aumento no significativo en el número de macrometástasis pulmonares al comparar con el control de implante y la combinación de bibliotecas. Así mismo, se observó un aumento en el promedio de macrometástasis al comparar la combinación de nominales (QA2N+45A2N) en una dosis de 360 µg con la misma combinación pero a una dosis de 180 µg.

Para comparar los formatos de administración del péptido se probó la administración mediante células dendríticas pulsadas con los diferentes péptidos; sin

embargo, no se encontró ninguna tendencia ni diferencia significativa al comparar contra el control de implante y contra los péptidos inmunizados en combinación con PolyI:C.

Proliferación celular

Debido a que se observaron tendencias de posibles efectos antitumorales con diversos tratamientos a la dosis de 180 µg quisimos evaluar la activación antígeno-específica de linfocitos T por lo que se realizó un ensayo de proliferación celular. Al día 15 después del implante se obtuvieron los esplenocitos del bazo de un ratón por cada tratamiento y un ratón blanco, es decir, sin implante y sin inmunización. Los esplenocitos obtenidos fueron cocultivados con células dendríticas y péptido sintético, las células dendríticas fueron estimuladas con PolyI:C. A los cinco días de iniciado el cocultivo las células fueron teñidas con CFSE para medir proliferación total. Para identificar las diferentes poblaciones y su proliferación se usaron anticuerpos para marcadores de membrana, anti-CD3, -CD4, -CD8. Para el caso de IFN-γ se utilizó un anticuerpo intracelular anti-IFN-γ. Los resultados corresponden a los ratones inmunizados con una dosis de 180 µg para los péptidos individuales y en el caso de la combinación de péptidos se utilizó una dosis de 180 µg por péptido, siendo la dosis final de 360 µg. Para el caso de las dosis de 250 µg y la combinación de 90 µg por péptido no se obtuvo un porcentaje de proliferación diferente al control de implante por lo que los datos no se reportan.

Mediante la tinción del antígeno CD3 se obtuvo el porcentaje de proliferación de linfocitos T totales, esto es, tanto CD4+ como CD8+.

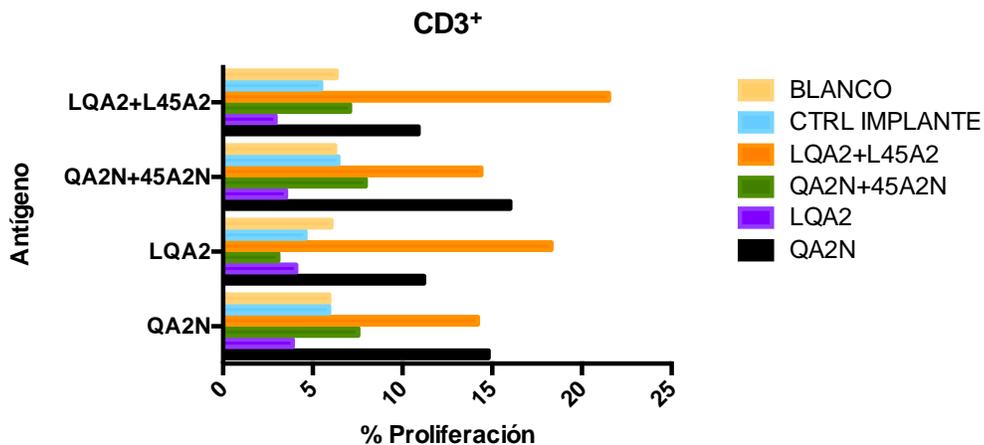


Gráfico 15. Proliferación de linfocitos T totales. Se observó que el mayor porcentaje de proliferación se obtuvo para las células del grupo inmunizado con ambas bibliotecas y retado contra ambos péptidos.

En el gráfico 15 se muestra la proliferación de linfocitos T totales. En el eje de las X se observa el porcentaje de proliferación de los ratones de los grupos inmunizados con los péptidos enlistados a la derecha, mientras que en el eje de las Y se muestran los antígenos con los cuales fueron estimulados los esplenocitos obtenidos de los diferentes tratamientos. Se observa claramente que el grupo inmunizado con ambas bibliotecas (LQA2+L45A2) presenta la mayor proliferación con un porcentaje mayor al 20% al ser estimulado con los péptidos correspondientes a ambas bibliotecas (LQA2+L45A2); sin embargo, se observa que los esplenocitos correspondientes a ésta inmunización con ambas bibliotecas presentan una elevada proliferación al ser estimulados con todos los antígenos y que puede ser debido a que la estimulación con solo un péptido individual sea suficiente para inducir la proliferación. Así mismo, observamos que para el grupo inmunizado con QA2N se observan porcentajes de proliferación elevados comparando contra los demás grupos. También observamos que hay proliferación al ser retados con todos los antígenos, por lo que también podríamos suponer que es debido a reacciones cruzadas y que por lo tanto se observe un comportamiento similar para el grupo de la combinación LQA2+L45A2 y el grupo inmunizado con QA2N.

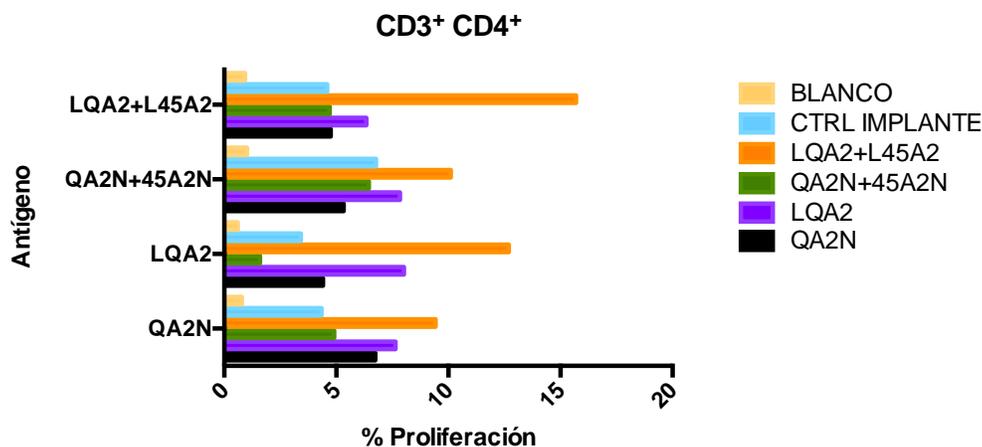


Gráfico 16. Proliferación linfocitos CD3⁺ CD4⁺. Observamos el mismo patrón de comportamiento para los linfocitos CD4⁺ que para los linfocitos T totales CD3⁺. El grupo inmunizado con la combinación de bibliotecas es estimulado por la misma combinación de péptidos, pero también presenta la mayor proliferación al ser retado con los demás antígenos, lo que nos indica una posible estimulación por reconocimiento cruzado de los péptidos.

Al evaluar la proliferación de linfocitos T CD4⁺ (Gráfico 16) observamos nuevamente que el grupo inmunizado con ambas bibliotecas es el que presenta mayor

porcentaje de proliferación y nuevamente observamos que la proliferación se produce al estimular los esplenocitos con los diferentes antígenos. En este caso observamos que el grupo LQA2 presenta un mínimo aumento en el porcentaje de proliferación al ser expuesto a los diferentes antígenos.

También se evaluó la cantidad de linfocitos CD4+ productores de IFN-γ (Gráfico 17) y observamos que los grupos que presentan el mayor porcentaje de linfocitos CD4+ productores de IFN-γ son la combinación de bibliotecas (LQA2+L45A2) seguida de la combinación de nominales (QA2N+45A2N).

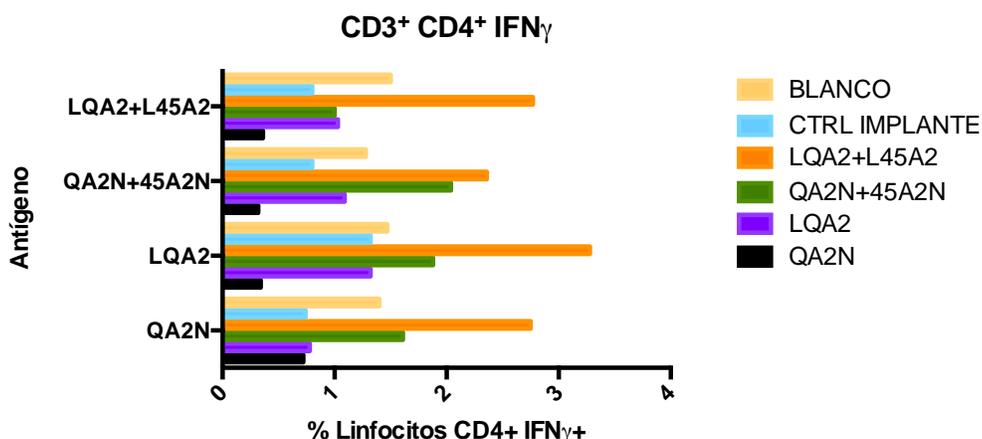


Gráfico 17. Cantidad de linfocitos CD4+ productores de IFN-γ. La mayor cantidad de linfocitos CD4+ productores de IFN-γ lo presentó el grupo inmunizado con ambas bibliotecas, pero retado solamente contra la biblioteca LQA2; sin embargo, aunque en menor cantidad, éste grupo respondió al reto con todos los antígenos. También observamos que el grupo inmunizado con ambas bibliotecas, al comparar con el control de implante, presentó una mayor cantidad de linfocitos productores de IFN-γ al retar con todos los péptidos excepto al retar con ambas bibliotecas. Para los grupos inmunizados individualmente con los péptidos QA2N y LQA2 no se observó un aumento en la cantidad de linfocitos CD4+ productores de IFN-γ al compararlos con el control de implante.

En el caso de los linfocitos T CD8+ observamos el mayor porcentaje de proliferación para el grupo inmunizado con ambas bibliotecas y retado también con ambas bibliotecas. (Gráfico 18).

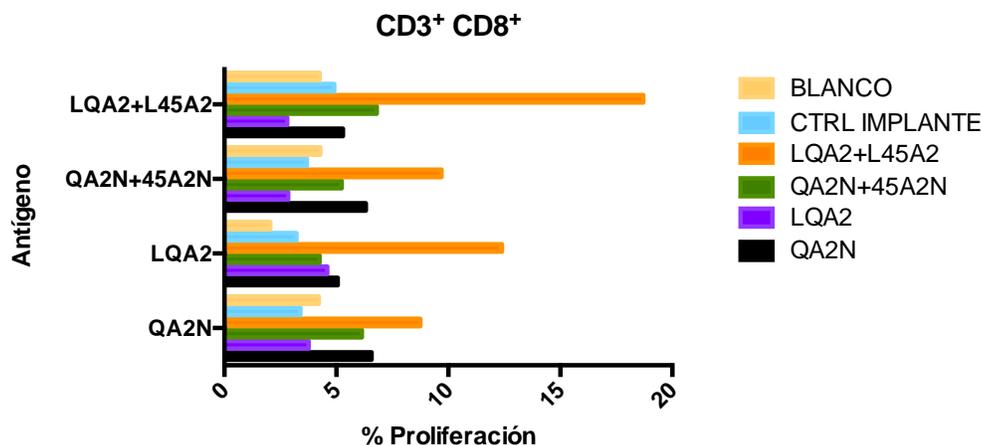


Gráfico 18. Proliferación linfocitos CD3⁺ CD8⁺. El mayor porcentaje de proliferación de linfocitos T CD8⁺ fue para el grupo inmunizado con ambas bibliotecas y retado contra ellas. También se observa que los grupos inmunizados individualmente con QA2N y LQA2 presentaron una menor proliferación para linfocitos CD8⁺ al compararlos con los CD4⁺, siendo mayor para el grupo QA2N que para el LQA2.

La cantidad de linfocitos T CD8⁺ productores de IFN- γ no presentó un comportamiento similar al de las demás subpoblaciones (Gráfico 19), en este caso observamos que no hay un incremento en los linfocitos CD8⁺ productores de IFN- γ de los grupos inmunizados con bibliotecas y nominales al compararlos con el control de implante y el blanco (intacto), inclusive en el caso del reto con los antígenos individuales LQA2 y QA2N se observa un porcentaje de linfocitos CD8⁺ IFN- γ ⁺ que fue mucho menor que el que se obtuvo de los controles.

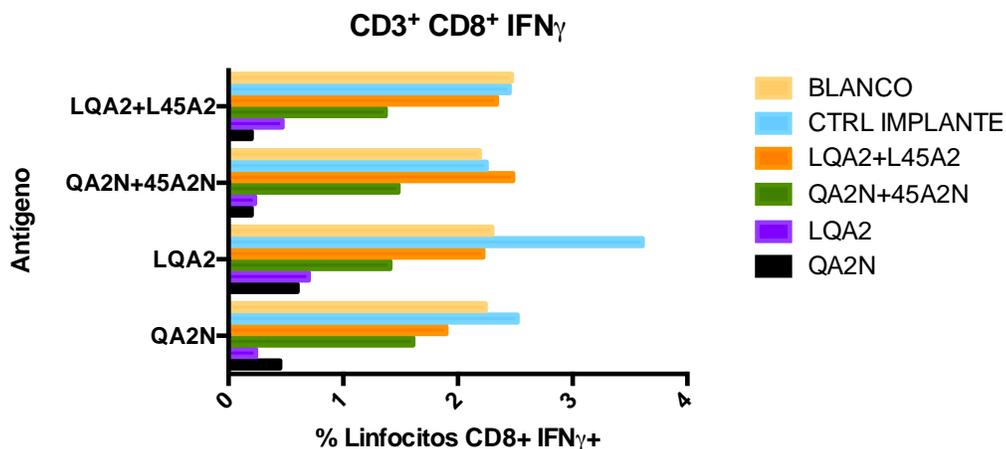


Gráfico 19. Cantidad de linfocitos CD8⁺ productores de IFN- γ . No se observó un aumento en la cantidad de linfocitos CD8⁺ productores de IFN γ para ninguno de los grupos inmunizados retados contra alguno de los antígenos al comparar con el control de implante. Al contrario de lo esperado, se observó que los grupos inmunizados individualmente con los antígenos QA2N y LQA2 presentaron una mínima cantidad de

dichos linfocitos, mucho menor que la que presentó el grupo control, al retarlos contra los antígenos evaluados.

Este comportamiento pudo haber sido debido a que los linfocitos hayan muerto por sobreactivación lo que podría explicar porque es la única subpoblación con dicho comportamiento.

En los gráficos de proliferación celular se puede apreciar que los tratamientos que presentaron mayor proliferación al cruzarse con los diferentes antígenos fueron los correspondientes a los grupos de la combinación LQA2+L45A2 y de los péptidos individuales QA2N y LQA2 para todas las subpoblaciones evaluadas excepto para el caso de los linfocitos T CD8+ productores de IFN- γ . Es de notable interés que el grupo inmunizado con la combinación de bibliotecas LQA2+L45A2 presenta el mayor porcentaje de proliferación al ser retado con los antígenos correspondientes a dicho tratamiento. Este hecho puede corresponder a la inducción de una respuesta inmune amplia ya que es capaz de reconocer las variantes de ambas bibliotecas y por tanto presenta un mayor porcentaje de proliferación.

DISCUSIÓN

El cáncer es una de las enfermedades más difíciles de tratar y curar. Durante el desarrollo de terapias contra el cáncer, los investigadores se han enfrentado a problemas inherentes a la enfermedad como: 1) la alta mutación y variabilidad de las células tumorales; cada tumor es diferente y por lo tanto existe una complicación en la generación de un tratamiento que sea aplicable a todos los casos, 2) la extensa gama de mecanismos de evasión que presentan las células tumorales, así como el impacto del microambiente tumoral, ya que, aunque existen estrategias que en fase experimental demuestran tener un efecto antitumoral, una vez aplicado al paciente no se obtiene la respuesta esperada debido a que el microambiente tumoral mantiene al organismo en un estado de inmunosupresión que no es apto para la correcta activación del sistema inmune y el desencadenamiento de una respuesta antitumoral, 3) la diversidad de tipos de cáncer y las características específicas que acarrearán dependiendo el tipo de tejido y la localización de la masa tumoral, pocas son las posibles moléculas blanco que se asocian a más de un tipo de cáncer. En conjunto todas estas características propician que el desarrollo de un tratamiento generalizado a todos los tipos de cáncer y todos los pacientes no sea una tarea fácil.

Por otro lado, las terapias que se encuentran actualmente en uso, han mostrado desencadenar una respuesta antitumoral buena; sin embargo, no han llegado a ser satisfactorias en la cura del cáncer. Dichos tratamientos presentan ciertos aspectos negativos respecto a su uso por los pacientes: 1) no son accesibles para la mayoría de los pacientes, tienden a ser tratamientos costosos por lo que la mayoría de las personas que presentan esta enfermedad no pueden adquirirlos, 2) se deben administrar más de una vez, generalmente mensuales, debido a que la mayoría de los tratamientos que han demostrado tener un buen efecto contra tumor pertenecen a la inmunoterapia pasiva, por ello, cumplen su función por un periodo limitado y no desencadenan una respuesta inmune que genere memoria, como lo hace una vacuna, 3) algunas de las moléculas blanco contra las que van dirigidas estos tratamientos presentan mutaciones de resistencia que provoca que no todos los pacientes sean aptos para recibir dicha terapia, 4) en general se trata de anticuerpos monoclonales que serán usados para tratar al paciente solo si existe una sobreexpresión de la molécula blanco, dejando sin tratamiento muchos casos que no presentan dicha característica.

Con todos estos antecedentes lo esencial sería desarrollar un tratamiento que desencadene una respuesta inmune antitumoral capaz de generar memoria inmunológica.

Es importante considerar la alta tasa mutagénica que presentan las células tumorales ya que tiene una repercusión directa en la variabilidad antigénica, generándose una gran cantidad de antígenos específicos de tumor que pueden ser utilizados como posibles blancos terapéuticos. Esta amplia gama de neo-antígenos, lejos de representar un obstáculo para la generación de terapias, es la base del novedoso concepto que se ha desarrollado en nuestro grupo de trabajo. Las BEVs han sido propuestas como una inmunoterapia que busca desencadenar una respuesta inmune protectora contra tumor caracterizada por un amplio repertorio de linfocitos T activados capaces de reconocer las mutaciones de las células tumorales expresadas, como los mencionados neo-antígenos, todo esto mediante la activación de dichos linfocitos por una secuencia peptídica mutagenizada que tiene altas posibilidades de encontrarse en las células tumorales que serán eliminadas.

Pocos son los trabajos en los cuales encontramos el uso de péptidos basados en secuencias de moléculas del MHC como posible terapia contra el cáncer.

Stopeck y col., en el 2001 probaron un complejo liposómico que contenía un vector para la expresión del haplotipo HLA-B7 en conjunto con la molécula β_2 -microglobulina obteniendo resultados satisfactorios en pacientes con melanoma metastásico. Es importante recalcar que los pacientes que presentaron una mejoría con este tratamiento no presentan el haplotipo HLA-B7, por lo que el probable mecanismo de acción es un rechazo del tumor debido a un reconocimiento aloinmune. Tal respuesta no fue observada en los pacientes HLA-B7 positivos.

Para el 2004 el grupo de trabajo de Huang y col., demostró que un paciente tratado con terapia adoptiva con linfocitos infiltrantes de tumor autólogos presentó una regresión casi completa de múltiples lesiones de melanoma metastásico. Al analizar qué epítomos eran reconocidos por los linfocitos reactivos, se encontró que una de las clonas reconocía un producto mutado de la molécula HLA-A11, dicha clona comprendía aproximadamente el 20 % de los linfocitos reinyectados al paciente. Esta clona fue la de mayor prevalencia en sangre periférica hasta 5 meses después de realizada la terapia adoptiva, lo cual sugiere la inducción de una respuesta inmune que genera memoria.

Estos resultados demuestran que las mutaciones pueden generar epítomos que sean reconocidos por clonas con afinidad por ellos y eliminarán las células tumorales que porten dicho epítomo mutado. Específicamente la respuesta a antígenos provenientes de moléculas del MHC mutados es similar a una respuesta en un rechazo de órgano trasplantado.

En nuestro trabajo nos basamos en tal concepto para generar una BEV capaz de activar linfocitos T que reconozcan moléculas de clase I del MHC mutadas y hasta cierto punto tratar de mimetizar la activación del sistema inmune hacia el órgano trasplantado pero dirigido a la masa tumoral.

Al comparar nuestra estrategia (una BEV basada en epítomos mutados del MHC I) con las inmunoterapias actualmente en uso, que han mostrado tener un mayor efecto en el tratamiento contra el cáncer, observamos que la mayoría están basadas en anticuerpos monoclonales con función bloqueadora. Respecto a esto, la generación de un anticuerpo monoclonal dirigido a moléculas de clase I del MHC no es viable ya que bloquearía la función principal de éstas moléculas que es la presentación de antígenos y lejos de ser una terapia útil perjudicaría completamente la activación de linfocitos T y el posible desencadenamiento de la respuesta inmune antitumoral.

En el caso de la molécula no clásica HLA-G (QA2 en ratón) que en este trabajo proponemos como posible blanco para la generación de una BEV, es necesario tomar en consideración ciertas características de dicha molécula para poder hacer una comparación con la inmunoterapia basada en anticuerpos monoclonales. HLA-G es una molécula que se presenta de manera normal en los trofoblastos, su función principal es evitar el rechazo materno fetal por lo que es una molécula que presenta una amplia variedad de mecanismos inmunosupresores. Al ser expresada por células tumorales confiere una ventaja contra el ataque de las células del sistema inmune y durante el proceso llamado inmunoección serán seleccionadas al no ser eliminadas por las células con función citotóxica. Considerando que existe una relación entre la disminución de la expresión de moléculas clásicas y la sobreexpresión de HLA-G, y que la disminución de moléculas clásicas tiene como consecuencia la reducción en la presentación antigénica, la cual no llevan a cabo las no clásicas como en este caso HLA-G, se evita la posible activación de los linfocitos T CD8+, esto es debido a que la principal función de HLA-G es mimetizar a las moléculas clásicas de clase I del MHC pudiendo también inhibir la posible activación de las células NK. Éstas características confieren a las moléculas de HLA-G la función inmunosupresora que podría ser contrarrestada con el uso de anticuerpos bloqueadores; sin embargo, HLA-G se genera por splicing alternativo, lo que genera una gran variabilidad de molécula a molécula. También es importante mencionar que como reportan Amiot y col., (2011) HLA-G es capaz de expresarse de manera disfuncional en la membrana de las células tumorales, es decir, puede llegar a expresarse un solo dominio de la molécula y ser suficiente para tener una función inmunosupresora. Debido a lo antes

mencionado, la molécula HLA-G no es un buen blanco para ser bloqueada por anticuerpos monoclonales que van dirigidos al mismo epítipo de la molécula blanco.

Por lo tanto, el uso de una vacuna mutagenizada, como son las BEVs, tomaría la alta variabilidad en la expresión de HLA-G como una ventaja, generando la activación de un gran número de linfocitos T capaces de eliminar células tumorales que presenten péptidos alterados de ésta molécula altamente variable. Este tipo de mecanismo es el que proponemos como posible para explicar el efecto en la inhibición del crecimiento tumoral y en la actividad antimetastásica que presentaron nuestras vacunas.

Otro de los aspectos que no se consideran al evaluar las terapias basadas en anticuerpos monoclonales es el hecho de que la respuesta antitumoral observada no es debida a la acción bloqueadora del anticuerpo, sino que es más bien una consecuencia del bloqueo de las moléculas blanco que presentan una actividad inmunosupresora, y que dichos anticuerpos bloqueadores cumplen la función de “quitar el freno” que no permite la correcta activación de las células inmunes. Por lo que al final, el blanco necesario es, como lo mencionan Straten y Garrido, un péptido mutado asociado a la molécula del MHC lo que desencadenará la respuesta antitumoral.

En el caso del ensayo de proliferación celular observamos que los esplenocitos provenientes de los ratones retados con los diferentes inmunógenos si son estimulados en los casos específicos mencionados en los resultados, lo que explica el aumento en la proliferación al ser comparados con el control de implante y el grupo blanco; sin embargo, no podemos asegurar que haya un reconocimiento antígeno-específico, sino más bien las dinámicas que observamos podrían ser explicadas por una posible reacción cruzada de los péptidos que producen un aumento en el porcentaje de proliferación en la mayoría de los grupos.

Para el caso del grupo inmunizado con ambas bibliotecas (LQA2+L45A2), al comparar la cantidad de linfocitos CD8+ productores de IFN- γ con las otras subpoblaciones evaluadas (CD4+ totales, CD4+ productores de IFN- γ y CD8+) se observó claramente un menor porcentaje de linfocitos en los grupos tratados con respecto a los controles. Esto puede ser debido a una sobreestimulación de los linfocitos, hecho que pudo provocar muerte inducida por activación y por lo tanto que disminuyera la cantidad de linfocitos presentes. Por otro lado, el hecho de que la proliferación se llevara a cabo con esplenocitos y no con los linfocitos productores de IFN- γ que pudieran encontrarse localizados en la zona del tumor podría explicar dos eventos: 1) que la cantidad de linfocitos CD8+ totales presentaron un comportamiento muy similar a los linfocitos CD4+

totales y productores de IFN- γ , y 2) que es justamente en los grupos que no observamos proliferación de ésta subpoblación que se observa una tendencia en la inhibición del crecimiento tumoral.

Específicamente para la biblioteca P3.1, perteneciente a la región líder de la molécula H2-K^d, y el nominal 45A2N, perteneciente a la región $\alpha 2$ de la molécula H2-K^d, se observó un efecto protumoral para la dosis de 250 μg pero no así para la dosis de 180 μg . Muraoka y col., en el 2010 demostraron una relación directa entre el aumento del tamaño tumoral y una mayor cantidad de péptido inmunizado que correlacionan con una disminución de linfocitos T CD8+ específicos para el antígeno utilizado en la inmunización. Ellos proponen una posible inducción de la tolerancia al encontrar linfocitos CD8+ que expresaban niveles elevados de Fas y PD-1, lo que explicaría la disminución de linfocitos capaces de eliminar a las células tumorales y que tiene un efecto directo en el aumento del tamaño tumoral. En el caso de nuestro trabajo, un mecanismo semejante al reportado por Muraoka y col., explicaría el efecto protumoral que observamos con la biblioteca P3.1 de la secuencia líder de la molécula H2-K^d y el nominal 45A2N al usar una dosis mayor (250 μg) comparando con la dosis de 180 μg y nuestro control de implante.

La invasión y metástasis es un proceso que involucra cambios en la vía de polimerización de la actina, la disminución de moléculas que participan en la inhibición por contacto como lo son la E-cadherina y la β -catenina, y por lo tanto la disrupción de las uniones celulares (Pignatelli y col., 2014). Una vez que la célula tumoral es capaz de individualizarse e intravasarse puede viajar a órganos cercanos y distantes, alojarse y comenzar a proliferar e invadir. El que un tratamiento sea capaz de presentar un efecto antimetastásico es prioritario en el tratamiento del cáncer ya que ésta es la principal causa de muerte asociada al cáncer y una de las principales características al evaluar, diagnosticar y tratar al paciente. En la mayoría de los casos en los que no hay metástasis presentes, el paciente puede ser sometido a cirugía para eliminar el tumor primario con una alta probabilidad de curar la enfermedad.

En nuestro trabajo encontramos que la biblioteca LQA2 presenta un efecto antitumoral al comparar con el control de implante y con su respectivo nominal QA2N, lo que sugiere que las posiciones de mutación presentes en la biblioteca pudieron permitir la generación de una respuesta inmune amplia capaz de actuar a diferentes niveles en el proceso de invasión y metástasis y que podría implicar una ventaja en el uso de BEVs respecto al uso de secuencias nominales, que son la estrategia utilizada actualmente en pruebas clínicas. Así mismo, para el caso de 45A2N y L45A2 observamos una tendencia

a la disminución de macrometástasis pulmonares; sin embargo, no se obtuvo una diferencia significativa por lo que no podemos asegurar que dichos tratamientos tengan un efecto antimetastásico, por ello recomendamos realizar más experimentos con estos péptidos con el fin de poder concluir si tienen efecto o no en nuestro modelo.

Respecto al mecanismo de acción para LQA2 podría tratarse de un efecto similar al descrito en el trabajo reportado por Mandelboim y col., en el cual demostraron en un modelo murino de cáncer que al abatir las poblaciones de linfocitos T CD4+ y CD8+, mediante el uso de anticuerpos bloqueadores, que la capacidad antimetastásica observada en su modelo fue dependiente de la acción de los linfocitos T CD8+. Por otro lado, al individualizarse e intravasarse las células tumorales pueden tener una mayor susceptibilidad a la destrucción mediada por los linfocitos T citotóxicos (CTL) debido a que al encontrarse en circulación, la proporción células tumorales:linfocitos es mayor que en el sitio del tumor primario, sumado a que la actividad citotóxica del CTL no se encuentra disminuida porque no se encuentra en el ambiente inmunosupresor presente en la mayoría de los sitios de tumor primario. Éstas características podrían explicar la disminución en el número de macrometástasis presentes en los pulmones de nuestros grupos con posible actividad antimetastásica.

Otra de las características de este trabajo que considero importante discutir es el esquema de vacunación probada. Se trató de un ensayo terapéutico con una administración única al día 5 posterior al reto tumoral. Los péptidos que mostraron una clara tendencia de un posible efecto antitumoral pueden ser capaces de inducir, con una sola administración de 180 µg, dicho efecto antitumoral al desencadenar la activación del sistema inmune mediante el reconocimiento de secuencias mutagenizadas (BEV) en el caso de LQA2 y L45A2, y de la secuencia silvestre en el caso de 45A2N. La administración única de una terapia representa una ventaja sobre las terapias basadas en anticuerpos monoclonales que requieren de aplicaciones periódicas mientras no se cure la enfermedad. Otra ventaja es que también se disminuye el riesgo a generar tolerancia de los linfocitos T como se demuestra en el trabajo de Aichele y col., en donde mediante inmunizaciones repetidas se produce la tolerancia de los CTL comparando con la administración única del péptido probado, también demuestran que la activación o inducción de la tolerancia de los CTL se relaciona al uso apropiado de adyuvantes, ya que mencionan, la inducción de la tolerancia por la inmunización del péptido sintético sin el uso de adyuvantes se generó solo cuando cantidades mayores a 500 µg del péptido fueron administrados. Por lo que la una inmunización única del péptido en conjunto con el

adyuvante es capaz de activar CTLs mientras que inyecciones repetidas del mismo péptido y el adyuvante generan tolerancia porque suponen que la función del adyuvante es la lenta liberación del péptido previniendo su rápida degradación y prolongando así su vida media en el organismo. Además, es importante mencionar que muchos de los péptidos sintéticos no son inmunogénicos por sí solos, por lo que es requisito el uso de un adyuvante que ayude a desencadenar la respuesta inmune.

En el trabajo de Muraoka y col., se demuestra que la administración del péptido en adyuvante incompleto de Freund (IFA) genera una activación de linfocitos T CD8+ con un fenotipo apoptótico que presentan moléculas Fas y PD-1 en la membrana y que correlaciona con un aumento del crecimiento tumoral; sin embargo, al inmunizar el mismo péptido bajo el mismo esquema de vacunación pero usando como adyuvante CpG, activador del TLR9, son capaces de evadir la expresión elevada de PD-1 y Fas, exhibiendo una fuerte respuesta inmune antitumoral, demostrando mediante su trabajo la importancia en la elección del adyuvante.

En el caso de nuestro trabajo los péptidos fueron disueltos en PBS en conjunto con el adyuvante PolyI:C en una proporción 1:1. El PolyI:C es un polímero sintético de RNA de doble cadena agonista del TLR3 capaz de activar una respuesta inmune tipo antiviral que desencadena la expresión de interferones tipo I, IFN- α e IFN- β , que a su vez tienen como efecto el incremento en la expresión de moléculas de clase I del MHC (Ammi y col., 2015). El uso de PolyI:C como adyuvante para nuestros péptidos pudo originar que éstos fueran inmunogénicos, estimulando así la presentación de antígenos a los linfocitos T, y probablemente generando el efecto antitumoral observado en algunos de nuestros tratamientos.

La correcta presentación de los péptidos es la clave para que un tratamiento antitumoral tenga éxito. Otra de las estrategias ampliamente evaluada y usada en la actualidad es el uso de terapia adoptiva, la activación de células inmunes in vitro que posteriormente son reinyectadas al paciente. Dentro de éstas encontramos a las células dendríticas, principales células presentadoras del sistema inmune, que son pulsadas con péptido sintético y reinyectadas al individuo para que presenten deseablemente los antígenos con los que fueron pulsadas y asegurar una presentación exitosa de éstos antígenos a los linfocitos T del individuo aumentando la probabilidad de activación y por lo tanto la eliminación de las células tumorales portadoras de los antígenos blanco. Para comprobar si el uso de células dendríticas pulsadas con nuestros péptidos generaba mejores resultados que los péptidos en combinación con el adyuvante, llevamos a cabo

un ensayo utilizando células dendríticas extraídas, pulsadas con los péptidos y reinyectadas a los ratones; sin embargo, no encontramos efecto o tendencia alguna que probara de alguna manera un efecto antitumoral mediante esta vía de administración. Por otro lado, no podemos descartar que la terapia adoptiva con células dendríticas pueda llegar a presentar algún efecto antitumoral ya que no comprobamos que los péptidos se hayan internalizado en las células.

A la fecha no existe tratamiento alguno en desarrollo o en uso en la clínica que esté basado en el uso de epítomos derivado de moléculas del MHC; sin embargo, cada vez se comprueba que es mediante las funciones que desempeñan éstas moléculas que se producen los efectos antitumorales en los tratamientos hasta ahora usados con éxito, ya que es por medio de ellas que las células presentadoras muestran los péptidos que activarán a los linfocitos T y que una vez activados será nuevamente mediante éstas moléculas presentes en las células tumorales que serán eliminadas por los linfocitos T ya activados (Straten y Garrido., 2016).

Por lo anterior es fácil suponer que las moléculas del MHC serán altamente susceptibles a sufrir mutaciones que deriven en la pérdida de su función. Es mediante este tipo de mecanismos que las células tumorales son inmunoseleccionadas y por lo tanto formen una gran parte de la masa tumoral. Un trabajo publicado recientemente realizado por Shukla y col (2015)., describe un nuevo método para analizar las mutaciones en los genes del HLA-A, B y C, en el cual, dependiendo del tipo tumoral, se encuentran diferencias en la localización y los tipos de mutaciones somáticas; sin embargo, aunque los genes del HLA son susceptibles a sufrir mutaciones que conllevan la pérdida de función de la molécula, es necesario sean expresadas en la membrana de las células para no ser eliminadas por las células NK que monitorean la presencia de éstas. Como ya mencionamos, la disminución de la expresión de las moléculas clásicas se relaciona directamente con la sobreexpresión de la molécula no clásica HLA-G que tiene una identidad en secuencia de aproximadamente el 80% con las moléculas clásicas, lo que tiene como consecuencia que las clonas tumorales que presentan este fenotipo (baja expresión de moléculas clásicas y elevada expresión de HLA-G) puedan evadir la eliminación por parte de las células NK. En resumen, al disminuir las moléculas clásicas se disminuye la presentación antigénica y la activación de los linfocitos T CD8+ citotóxicos, y al aumentar la expresión de moléculas HLA-G se evade la posible muerte mediada por células NK. Aun considerando éstos mecanismos de evasión, varios estudios han demostrado que linfocitos CD8+ son capaces de reconocer y ser activados por neo-

antígenos resultantes de las mutaciones en los genes del HLA con resultados muy favorables en la disminución del tamaño tumoral y mejoría general de los pacientes. No es de extrañar que las mutaciones en HLA desencadenen una fuerte respuesta antitumoral si consideramos el estricto control al que se encuentran sometidas y que es la razón de que haya una fuerte respuesta inmune cuando se realiza un trasplante de órgano, que finaliza con su rechazo. Es bajo este concepto y por medio de los resultados obtenidos en este trabajo que respaldamos el uso de una BEV capaz de activar una amplia gama de linfocitos T que eliminen los productos mutados en las células tumorales.

Mucho falta por desarrollar bajo el concepto de las BEVs basadas en moléculas de clase I del MHC; sin embargo, este trabajo es una primera aproximación con resultados satisfactorios en la búsqueda de tratamientos innovadores y funcionales en la cura del cáncer.

CONCLUSIONES

Se encontró una tendencia no significativa en el efecto inhibitorio del crecimiento tumoral de los tratamientos correspondientes a la región $\alpha 2$ de la molécula H2-K^d (45A2) para la dosis de 180 μ g al comparar con el control de implante. Debido a estos resultados, podemos concluir que estos tratamientos podrían ser buenos inmunógenos al inhibir el crecimiento tumoral comparado con el grupo sin tratamiento; sin embargo, es necesario realizar mas experimentos para comprobar que los resultados tengan significancia.

Se realizó un ensayo de proliferación para evaluar el posible reconocimiento antígeno-específico de las secuencias peptídicas por parte de los linfocitos T; sin embargo, el ensayo por sí solo no es suficiente para determinar la especificidad del reconocimiento de nuestros péptidos. Lo que podemos concluir por el ensayo de proliferación es que los tratamientos de la secuencia de la molécula QA2 y la de la región $\alpha 2$ de la molécula H2-K^d, tanto nominal como biblioteca, fueron capaces de estimular y activar a los linfocitos T CD4+ y CD8+ lo que explica la proliferación al compararlos con el control de implante.

En cuanto a la actividad antimetastásica de nuestros tratamientos, encontramos que las secuencias de la región $\alpha 2$ de la molécula H2-K^d tanto nominal como biblioteca presentan una tendencia en la disminución de macrometastásis en pulmón pero los resultados no mostraron tener significancia al comparar con el control de implante. Para la biblioteca proveniente de la molécula QA2 se observó una reducción en la cantidad de metástasis presentes en pulmón al comparar con el grupo control con un intervalo de confianza del 95 %. Los resultados observados con estos péptidos pueden ser un resultado relevante ya que la mayoría de las muertes en cáncer de mamá están asociadas a metástasis pulmonar.

Para el tratamiento P3.1, correspondiente a la biblioteca de la secuencia líder de la molécula clásica del MHC y el 45A2N, correspondiente al nominal de la región $\alpha 2$ de la molécula clásica, se observó un efecto pro tumoral al compararlos con el control de implante, esto para la dosis de 250 μ g. Sin embargo, no se observó el mismo efecto en la administración de 180 μ g por lo que puede ser un efecto debido a la dosis.

LITERATURA CITADA

1. Adams E. J., Luoma A. M. The adaptable major histocompatibility complex (MHC) fold: structure and function of nonclassical and MHC class I-like molecules. *Annu Rev Immunol.* 2013;31:529-61.
2. Aichele P., Brduscha-Riem K., Zinkernagel R. M., Hengartner H., Pircher H. T Cell Priming Versus T Cell Tolerance Induced by Synthetic Peptides. *J Exp Med.* 1995;182(1):261–266.
3. Algarra I., García-Lora A., Cabrera T., Ruiz-Cabello F., Garrido F. The selection of tumor variants with altered expression of classical and nonclassical MHC class I molecules: implications for tumor immune escape. *Cancer Immunol Immunother.* 2004;53(10):904-10.
4. Almand B., Resser J. R., Lindman B., Nadaf S., Clark J. I., Kwon E. D., Carbone D. P., Gaboritovich D. I. Clinical Significance of Defective Dendritic Cell Differentiation in Cancer. *Clin Cancer Res.* 2000;6(5):1755-66.
5. Amiot L., Ferrone S., Grosse-Wilde H., Seliger B. Biology of HLA-G in cancer: a candidate molecule for therapeutic intervention? *Cell Mol Life Sci.* 2011;68(3):417-31.
6. Ammi R., De Waele J., Willemen Y., Van Brussel I., Schrijvers D. M., Lion E., Smits E. L. J. Poly(I:C) as cancer vaccine adjuvant: Knocking on the door of medical breakthroughs. *Pharmacol Ther.* 2015;146:120-31.
7. Bernal M., Ruiz-Cabello F., Concha A., Paschen A., Garrido F. Implication of the b2-microglobulin gene in the generation of tumor escape phenotypes. *Cancer Immunol Immunother.* 2012;61:1359-1371.
8. Bernal M., Ruiz-Cabello F., Concha A., Paschen A., Garrido F. Implication of the β 2-microglobulin gene in the generation of tumor escape phenotypes. *Cancer Immunol Immunother.* 2012;61(9):1359-71.
9. Brabletz T., Pfeuffer I., Schorr E., Siebelt F., Wirth T., Serfling E. Transforming growth factor beta and cyclosporin A inhibit the inducible activity of the interleukin-2 gene in T cells through a noncanonical octamer-binding site. *Mol Cell Biol.* 1993;13(2):1155-62.
10. Clifton G. T., Mittendorf E. A., Peoples G. E. Adjuvant HER2/neu peptide cancer vaccines in breast cancer. *Immunotherapy.* 2015;7(11):1159-68.
11. 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 antibodies. *Vaccine*. 2011;29(32):5313-21.
12. de Krujif E. M., Sajet A., van Nes J. G., Natanov R., Putter H., Smit V. T., Liefers G. J., van den Elsen P. J., van de Velde C. J., Kuppen P. J. HLA-E and HLA-G expression in classical HLA class I-negative tumors is of prognostic value for clinical outcome of early breast cancer patients. *J Immunol*. 2010;185(12):7452-9.
 13. del Campo A. B., Carretero J., Aptsiauri N., Garrido F. Targeting HLA class I expression to increase tumor immunogenicity. *Tissue Antigens*. 2012;79(3):147-54.
 14. Dong H., Strome S. E., Salomao D. R., Tamura H., Hirano F., Flies D. B., Roche P. C., Lu J., Zhu G., Tamada K., Lennon V. A., Celis E., Chen L. Tumor-associated B7-H1 promotes T-cell apoptosis: a potential mechanism of immune evasion. *Nat Med*. 2002;8(8):739-800.
 15. Dunn G. P., Bruce A. T., Ikeda H., Old L. J., Schreiber R. D. Cancer immunoediting: from immuno-surveillance to tumor escape. *Nat Immunol*. 2002;3(11):991-8.
 16. García-Lora A., Algarra I., Garrido F. MHC class I antigens, immune surveillance, and tumor immune escape. *J Cell Physiol*. 2003;195(3):346-55.
 17. Garrido F., Algarra I., García-Lora A. M. The escape of cancer from T lymphocytes: immunoselection of MHC class I loss variants harboring structural-irreversible "hard" lesions. *Cancer Immunol Immunother*. 2010;59(10):1601-6.
 18. Garrido F., Ruiz-Cabello F., Cabrera T., Pérez-Villar JJ., López-Botet M., Duggan-Keen M., Stern P. L. Implications for immunosurveillance of altered HLA class I phenotypes in human tumors. *Immunol Today*. 1997;18(2):89-95.
 19. Gorsch S. M., Memoli V. A., Stukel T. A., Gold L. I., Arrick B. A. Immunohistochemical staining for transforming growth factor beta 1 associates with disease progression in human breast cancer. *Cancer Res*. 1992;52(24):6949-52.
 20. Hanahan D., Weinberg R. The Hallmarks of Cancer. *Cell*. 2000;100(1):57-70.
 21. Hanahan D., Weinberg R. The Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell*. 2011;144(5):646-74.
 22. Haynes-Gilmore N., Banach M., Edholm E. S., Lord E., Robert J. A critical role of non-classical MHC in tumor immune evasion in the amphibian *Xenopus* model. *Carcinogenesis*. 2014;35(8):1807-13.
 23. He X., Tabaczewski P., Ho J., Stroynowski I., Garcia K. C. Promiscuous antigen presentation by the nonclassical MHC Ib Qa-2 is enabled by a shallow,

- hydrophobic groove and self-stabilized peptide conformation. *Structure*. 2001;9(12):1213-24.
24. Huang J., El-Gamil M., Dudley M. E., Li Y. F., Rosenberg S. A., Robbins P. F. T Cells Associated with Tumor Regression Recognize Frameshifted Products of the *CDKN2A* Tumor Suppressor Gene Locus and a Mutated HLA Class I Gene Product. *J Immunol*. 2004;172(10):6057-64.
 25. Huang M., Stolina M., Sharma S., Mao J. T., Zhu L., Miller P. W., Wollman J., Herschman H., Dubinett S. M. Non-small cell lung cancer cyclooxygenase-2-dependent regulation of cytokine balance in lymphocytes and macrophages: up-regulation of interleukin 10 and down-regulation of interleukin 12 production. *Cancer Res*. 1998;58(6):1208-16.
 26. INEGI (2014). Estadísticas de Mortalidad. Base de datos y CONAPO (2014). Proyecciones de la Población 2010-2050.
 27. Informe mundial sobre el cáncer. 2014. IARC.
 28. Iyoda T., Shimoyama S., Liu K., Omatsu Y., Akiyama Y., Maeda Y., Takahara K., Steinman R., Inaba K. The CD8+ Dendritic Cell Subset Selectively Endocytoses Dying Cells in Culture and In Vivo. *J Exp Med*. 2002;195(10):1289-302.
 29. Khaled Y. S., Ammori B. J., Elkord E. Myeloid-derived suppressor cells in cancer: recent progress and prospects. *Immunol Cell Biol*. 2013;91(8):493-502.
 30. Khong H. T., Restifo N. P. Natural selection of tumor variants in the generation of "tumor escape" phenotypes. *Nat Immunol*. 2002;3(11):999-1005.
 31. Kurts C., Robinson B., Knolle P. Cross-priming in health and disease. *Nat Rev Immunol*. 2010;10(6):403-14.
 32. Liyanage U. K., Moore T. T., Joo H. G., Tanaka Y., Herrmann V., Doherty G., Drebin J. A., Strasberg S. M., Eberlein T. J., Goedegebuure P. S., Linehan D. C. Prevalence of regulatory T cells is increased in peripheral blood and tumor microenvironment of patients with pancreas or breast adenocarcinoma. *J Immunol*. 2002;169(5):2756-61.
 33. Ludewig B., Graf D., Gelderblom H. R., Becker Y., Kroczeck R. A., Pauli G. Spontaneous apoptosis of dendritic cells is efficiently inhibited by TRAP (CD40-ligand) and TNF- α , but strongly enhanced by interleukin-10. *Eur J Immunol*. 1995;25(7):1943-50.
 34. Mandelboim O., Vadai E., Fridkin M., Katz-Hillel A., Feldman M., Berke G., Eisenbach L. Regression of established murine carcinoma metastases following

- vaccination with tumour-associated antigen peptides. *Nat Med.* 1995;1(11):1179-83.
35. Medeme J. P., de Jong J., Peltenburg L. T., Verdegaal E. M., Gorter A., Bres S. A., Franken K. L., Hahne M., Alber J. P., Melief C. J., Offringa R. Blockade of the granzyme B/perforin pathway through overexpression of the serine protease inhibitor PI-9/SPI-6 constitutes a mechanism for immune escape by tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2001;98(20):11515-20.
 36. Mittal D., Gubin M., Schreiber R., Smyth M. New insights into cancer immunoediting and its three component phases – elimination, equilibrium and escape. *Curr Opin Immunol.* 2014;27:16-25.
 37. Muraoka D., Kato T., Wang L., Maeda Y., Noguchi T., Harada N., Takeda K., Yagita H., Guillame P., Luescher I., Old L. J., 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.
 38. Murphy K. M. *Inmunología de Janeway.* 7ª Ed., 2009. McGraw-Hill Interamericana de España.
 39. Neefjes J., Jongsma M., Paul P., Bakke O. Towards a systems understanding of MHC class I and MHC class II antigen presentation. *Nat Rev Immunol.* 2011;11(12):823-36.
 40. Nicholaou T., Chen W., Davis I. D., Jackson H. M., Dimopoulos N., Barrow C., Browning J., MacGregor D., Williams D., Hopkins W., Maraskovsky E., Venhaus R., Pan L., Hoffman E. W., Old L. J., Cebon J. Immunoediting and persistence of antigen-specific immunity in patients who have previously been vaccinated with NY-ESO-1 protein formulated in ISCOMATRIX™. *Cancer Immunol Immunother.* 2011;60(11):1625-37.
 41. NoeDominguez-Romero A., Zamora-Alvarado R., Servín- Blanco R., Pérez-Hernández E. G., Castrillon-Rivera L. E., Munguia M. E., Acero G., Govezensky T., Gevorkian G., Manoutcharian K. Variable epitope library carrying heavily mutated survivin-derived CTL epitope variants as a new class of efficient vaccine immunogen tested in a mouse model of breast cancer. *Hum Vaccin Immunother.* 2014;10(11):3201-13.
 42. Organización del Cáncer de Mama <http://www.breastcancer.org> consultado el 09 de mayo del 2016.

43. Oyama T., Ran S., Ishida T., Nadaf S., Kerr L., Carbone D. P., Gabrilovich D. Vascular Endothelial Growth Factor affects Dendritic Cell maturation through the inhibition of Nuclear Factor- κ B activation in Hemopoietic Progenitor Cells. *J Immunol.* 1998;160(3):1224-1232.
44. Parrett M., Harris R., Joarder F., Ross M., Clausen K., Robertson F. Cyclooxygenase-2 gene expression in human breast cancer. *Int J Oncol.* 1997;10(3):503-7.
45. Paul P., Rouas-Freiss N., Khalil-Daher I., Moreau P., Riteau B., Le Gal F. A., Avril M. F., Dausset J., Guillet J. G., Carosella E. D. HLA-G expression in melanoma: a way for tumor cells to escape from immunosurveillance. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998;95(8):4510-5.
46. Pedroza-Roldan C., Charles-Niño C., Saavedra R., Govezensky T., Vaca L., Avaniss-Aghajani E., Gevorkian G., Manoutcharian K. Variable epitope library-based vaccines: shooting moving targets. *Mol Immunol.* 2009;47(2-3):270-82.
47. Pignatelli J., Goswami S., Jones J. G., Rohan T. E., Pieri E., Chen X., Adler E., Cox D., Maleki S., Bresnick A., Gertler F. B., Condeelis J. S., Oktay M. Invasive breast carcinoma cells from patients exhibit Mena^{INV}-and macrophage-dependent transendothelial migration. *Sci Signal.* 2014;7(353):112.
48. Pistoia V., Morandi F., Wang X., Ferrone S. Soluble HLA-G: Are the clinically relevant? *Semin Cancer Biol.* 2007;17(6):469-79.
49. Rouas-Freiss N., Gonçalves R. M., Menier C., Dausset J., Carosella E. D. Direct evidence to support the role of HLA-G in protecting the fetus from maternal uterine natural killer cytotoxicity. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1997;94(21):11520-5.
50. Salazar-Onfray F., Charo J., Petersson M., Frelund S., Noffz G., Qin Z., Blankenstein T., Ljunggren H. G., Kiessling R. Down-regulation of the expression and function of the transporter associated with antigen processing in murine tumor cell lines expressing IL-10. *J Immunol.* 1997;159(7):3195-202.
51. Schreiber R. D., Lloyd J. O., Smyth M. J. Cancer Immunoeediting: Integrating Immunity's Roles in Cancer Suppression and Promotion. *Science.* 2011;331(6024):1565-70.
52. Schuster M., Nechansky A., Kircheis R. Cancer immunotherapy. *Biotechnol J.* 2006;1(2):138-47.

53. Schwab C. L., English D. P., Roque D. M., Pasternak M., Santin A. D. Past, present and future targets for immunotherapy in ovarian cancer. *Immunotherapy*. 2014;6(12):1279-93.
54. Seliger B., Abken H., Ferrone S. HLA-G and MIC expression in tumors and their role in anti-tumor immunity. *Trends Immunol*. 2003;24(2):82-7.
55. Sharma S., Stolina M., Lin Y., Gardner B., Miller P. W., Kronenberg M., Dubinett S. M. T Cell-Derived IL-10 Promotes Lung Cancer Growth by Suppressing Both T Cell and APC Function. *J Immunol*. 1999;163(9):5020-8.
56. Shin M. S., Kim H. S., Lee S. H., Lee J. W., Song Y. H., Kim Y. S., Park W. S., Kim S. Y., Lee S. N., Park J. Y., Lee J. H., Xiao W., Jo K. H., Wang Y. P., Lee K. Y., Park Y. G., Kim S. H., Lee J. Y., Yoo N. J. Alterations of Fas-pathway genes associated with nodal metastasis in non-small cell lung cancer. *Oncogene*. 2002;21(26):4129-36.
57. Shin M. S., Park W. S., Kim S. Y., Kim H. S., Kang S. J., Song K. Y., Park J. Y., Dong S. M., Pi J. H., Oh R. R., Lee J. Y., Yoo N. J., Lee S. H. Alterations of Fas (Apo-1/CD95) gene in cutaneous malignant melanoma. *Am J Pathol*. 1999;154(6):1785-91.
58. Shukla S. A., Rooney M. S., Rajasagi M., Tiao G., Dixon P. M., Lawrence M. S., Stevens J., Lane W. J., Dellagatta J. L., Steelman S., Sougnez C., Cibulskis K., Kiezun A., Hacohen N., Brusic V., Wu C. J., Getz G. Comprehensive analysis of cancer-associated somatic mutations in class I HLA genes. *Nature Biotechnology*. 2015;33:1152-1158.
59. Sociedad Americana del Cáncer <http://www.cancer.org/index> consultado el 09 de mayo del 2016.
60. Stopeck T. A., Jones A., Hersh E. M., Thompson J. A., Finucane D. M., Gutheil J. C., Gonzalez R. Phase II Study of Direct Intralesional Gene Transfer of Allovectin-7, an HLA-B7/β2-Microglobulin DNA-Liposome Complex, in Patients with Metastatic Melanoma. *Clin Cancer Res*. 2001;7(8):2285-91.
61. Terry H., Landowski, Qu N., Buyuksal I., Painter J. S., Dalton W. S. Mutations in the Fas Antigen in patients with multiple myeloma. *Blood*. 1997;90(11):4266-4270.
62. Thor Straten P., Garrido F. Targetless T cells in cancer immunotherapy. *J Immunother Cancer*. 2016;4:23.
63. Vesely M. D., Kershaw M. H., Schreiber R. D., Smyth Mark. Natural Innate and Adaptive Immunity to Cancer. *Annu Rev Immunol*. 2011;29:235-71.

64. von Boehmer L., Mattle M., Bode P., Landshammer A., Schäfer C., Nuber N., Ritter G., Old L., Moch H., Schäfer N., Jäger E., Knuth A., van den Broek M. NY-ESO-1-specific immunological pressure and escape in a patient with metastatic melanoma. *Cancer Immun.* 2013;13:12.
65. Vyas J. M., Van der Veen A. G., Ploegh H. L. The known unknowns of antigen processing and presentation. *Nat Rev Immunol.* 2008;8(8):607-18.
66. Wiedermann U., Davis A. B., Zielinski C. C. Vaccination for the prevention and treatment of breast cancer with special focus on Her-2/neu peptide vaccines. *Breast Cancer Res Treat.* 2013;138(1):1-12.
67. Yue F. Y., Dummer R., Geertsens R., Hofbauer G., Laine E., Manolio S., Burg G. Interleukin-10 is a growth factor for human melanoma cells and downregulates HLA class-I, HLA class-II and ICAM-1 molecules. *Int J Cancer.* 1997;71(4):630-7.
68. Zitvogel L., Apetoh L., Ghiringhelli F., Kroemer G. Immunological aspects of cancer chemotherapy. *Nat Rev Immunol.* 2008;8(1):59-73.