



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
ZARAGOZA**

Carrera de Biología

Unidad Multidisciplinaria de Investigación Experimental
Zaragoza

Unidad de Investigación en Diferenciación Celular y Cáncer
Laboratorio de Inmunobiología

**Evaluación de la capacidad de
anticuerpos anti-GLMEEMSAL para
detectar la presencia de hMena en líneas
celulares murinas y humanas**

TESIS

Que para obtener el título de

Biólogo

P R E S E N T A

Ponce Chavero María de los Angeles

DIRECTOR DE TESIS:

M. en C. Christian Azucena Don
López

ASESOR:

Dra. María de Lourdes Mora
García

Ciudad de México, 2018





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.

El presente trabajo se desarrolló en el Laboratorio de Inmunobiología de la Unidad de Investigación en Diferenciación Celular y Cáncer en la UMIEZ de la FES-Zaragoza, UNAM, en colaboración con el Laboratorio de Inmunología y Cáncer de la Unidad de Investigación Médica en Enfermedades Oncológicas, H. de Oncología CMN SXXI, IMSS y con el apoyo de la Unidad de Investigación en Enfermedades Oncológicas del Hospital Infantil de México Federico Gómez.

“Él da fuerzas al fatigado,
y al que no tiene fuerzas, aumenta el vigor”

Is. 40:29

“¿Qué es el hombre, para que tengas
De él memoria, Y el hijo del hombre,
Para que lo visites?”

Salmos 8:4

AGRADECIMIENTOS

A Dios porque siempre ha estado conmigo y por darme la enorme bendición de concluir la licenciatura. Lo que soy lo debo a Él.

A la Dra. María de Lourdes Mora García y al Dr. Alberto Monroy García por permitirme ser parte de su grupo de trabajo, por su apoyo, sugerencias y aportaciones para este proyecto.

A mi directora de tesis la M. en C. Christian Azucena Don López por su apoyo y su paciencia para la realización de este trabajo.

A mis sinodales el M. en C. Carlos Bautista Reyes, M. en C. Rosalva Rangel Corona, M. en C. Christian Azucena Don López, Dra. María de Lourdes Mora García y el Dr. Alberto Monroy García por su tiempo, sus comentarios y correcciones que ayudaron a mejorar este trabajo.

Al Dr. Jorge Hernández Montes por estar dispuesto a aclarar mis dudas y por sus comentarios.

A mis compañeros de laboratorio Azucena, Luis, Vianey, César, Gaby, Estrella, Janeth, Erick, Alejandro, Ana, Ricardo, Alan, Alberto, Román, Izael, Rosario, y Monse por su ayuda, sus enseñanzas y por permitirme compartir con ustedes momentos agradables.

A la Dra. Guillermina Baay por su amable apoyo para el procesamiento de las muestras.

A la M. en C. Vianey Gutiérrez Serrano por compartir su conocimiento conmigo y por la disposición de invertir su tiempo en apoyarme y despejar mis dudas.

A mis amigos Pao, Anita, Arturo, Ale, Pablo, Nestor y Geovanni por su valiosa amistad, su interés y el ánimo recibido. Deseo que mi amistad sea tan especial como la suya lo es para mí.

A mis amigos de la carrera Gissele, Manuel, Abraham, Anelly, Angélica, Claudia, David por el apoyo recibido, por su amistad y por los momentos que hemos pasado juntos.

A mi familia y amigos que de una u otra manera estuvieron al pendiente de mí y me dieron apoyo moral, material y/o económico lo cual fue parte fundamental para continuar.

DEDICATORIAS

A mis padres Trinidad y Josefina por todo su amor, su apoyo y por estar conmigo en todo momento. Es una bendición tenerles como padres. Los amo.

A mis hermanos César y Fernando por su amor, su comprensión y porque a pesar de las circunstancias adversas siempre han estado dispuestos a apoyarme. Me siento afortunada de tenerles. Los amo.

A la memoria de mi hermano Víctor. Gracias por brindarme tu amor, tu apoyo y gracias también porque siempre quisiste lo mejor para mí. Te amo.

A mis sobrinas Sofí, Victoria y Rocío. Quiero ser un buen ejemplo para ustedes. Las amo.

ÍNDICE

ABREVIATURAS.....	8
LISTA DE FIGURAS Y TABLAS.....	10
RESUMEN.....	11
1. MARCO TEÓRICO.....	12
1.1 <i>Cáncer.....</i>	12
1.2 <i>Sistema inmune.....</i>	13
1.2.1 <i>Inmunidad innata.....</i>	14
1.2.2 <i>Inmunidad adaptativa.....</i>	14
1.2.3 <i>Inmunidad humoral.....</i>	15
1.2.4 <i>Inmunidad celular.....</i>	18
1.3 <i>Metástasis.....</i>	19
1.4 <i>Antígenos Asociados a Tumor (AAT).....</i>	19
1.5 <i>Familia Ena/VASP.....</i>	20
1.5.1 <i>hMena.....</i>	21
1.5.2 <i>hMena y cáncer.....</i>	22
2. JUSTIFICACIÓN Y PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	24
3. HIPÓTESIS.....	24
4. OBJETIVOS	
4.1 OBJETIVO GENERAL.....	24
4.1.1 OBJETIVOS PARTICULARES.....	24
5. MATERIALES Y MÉTODOS.....	25
5.1 <i>Predicción por algoritmos.....</i>	25
5.2 <i>Modelo animal.....</i>	25

5.3 Técnica de ELISA.....	26
5.4 Cultivo celular.....	26
5.5 Extracción de linfocitos humanos.....	27
5.6 Citometría de flujo.....	28
5.7 Tinción inmunocitoquímica.....	29
6. RESULTADOS.....	32
6.1 LA INMUNIZACIÓN CON EL PÉPTIDO GLMEEMSAL INDUCE LA PRODUCCIÓN DE ANTICUERPOS ANTI-PÉPTIDO EN RATONES BALB/c.....	32
6.2 DETECCIÓN DE LA PROTEÍNA MENA EN LÍNEAS CELULARES DE TUMORES HUMANOS Y DE RATÓN USANDO UN ANTICUERPO COMERCIAL ANTI-MENA.....	33
6.3 DETECCIÓN DE LA PROTEÍNA MENA EN LÍNEAS CELULARES DE TUMORES HUMANOS Y DE RATÓN USANDO SUEROS DE RATONES BALB/c INMUNIZADOS CON EL PÉPTIDO GLMEEMSAL.....	34
6.3.1 DETECCIÓN MEDIANTE CITOMETRÍA DE FLUJO.....	34
6.3.2 DETECCIÓN MEDIANTE INMUNOCITOQUIMICA.....	38
7. DISCUSION DE RESULTADOS.....	42
8. CONCLUSIONES.....	46
9. PERSPECTIVAS.....	46
10.APÉNDICE DE PREPARACIÓN DE SOLUCIONES.....	47
11.BIBLIOGRAFÍA.....	49

ABREVIATURAS DE USO FRECUENTE

AAT	Antígeno Asociado a Tumor
BSA	Albúmina Sérica Bovina
CaCu	Cáncer cérvico uterino
CaMa	Cáncer de mama
DAB	Diaminobencidina
EGF	Factor de Crecimiento Epidermal
ELISA	Ensayo Inmunoabsorbente Ligado a Enzima
ELISPOT	Del inglés Enzyme-Linked ImmunoSpot Assay
Ena/VASP	Del inglés Enabled/vasodilator-stimulated phosphoprotein
Evh1	Del inglés Ena/VASP Homology 1
Evh2	Del inglés Ena/VASP Homology 2
FITC	Isotiocianato de Fluoresceína
HLA	Del inglés Human Leukocyte Antigen
hMena	Mena humana
ICQ	Inmunocitoquímica
IFA	Del inglés Incomplete Freund Adjuvant
IFN γ	Interferón gamma
IgG	Inmunoglobulina G
IHC	Del inglés Immunohistochemistry

IMF	Intensidad Media de Fluorescencia
NK	Del inglés Natural Killer
OD	Del inglés Optical Density
PBS	Solución Amortiguadora de Fosfatos
rpm	revoluciones por minuto
SFB	Suero Fetal Bovino
TBS	Del inglés Tris-Buffered Saline
VPH	Virus de Papiloma Humano
μl	Microlitros

LISTA DE FIGURAS Y TABLAS

Figura 1. Incidencia de cáncer a nivel mundial.

Figura 2. Incidencia de cáncer en México en la población femenina.

Figura 3. Incidencia de cáncer en México en la población masculina.

Tabla 1. Características del sistema inmune adaptativo.

Figura 4. Estructura de un anticuerpo.

Figura 5. La inmunización de ratones BALB/c con el péptido GLMEEMSAL genera anticuerpos péptido-específicos.

Figura 6. Detección de la proteína Mena en líneas celulares murinas y humanas.

Figura 7. Sueros de ratones inmunizados con el péptido GLMEEMSAL reconocen a la proteína hMena en células MDA-MB-231 sin permear.

Figura 8. Sueros de ratones inmunizados con el péptido GLMEEMSAL reconocen a la proteína hMena en células MDA-MB-231 permeadas.

Figura 9. Detección de la proteína Mena en líneas celulares murinas y humanas mediante citometría con sueros de ratones inmunizados con el péptido GLMEEMSAL.

Tabla 2. Anticuerpo anti-GLMEEMSAL detecta de manera eficiente la expresión de la proteína Mena en líneas celulares de ratón.

Tabla 3. Anticuerpo anti-GLMEEMSAL detecta de manera eficiente la expresión de la proteína Mena en líneas celulares y linfocitos T humanos.

Figura 10. Expresión de la proteína Mena en líneas celulares humanas y de ratón empleando un anticuerpo comercial Anti-Mena.

Figura 11. Expresión de la proteína Mena en líneas celulares humanas y de ratón empleando anticuerpo anti-GLMEEMSAL.

RESUMEN

El cáncer es uno de los problemas de salud pública más importantes no solo a nivel nacional sino también a nivel mundial. Aunado a esto, el proceso metastásico es la principal causa de muerte en los pacientes oncológicos, por lo que generar herramientas que permitan predecir el riesgo de metástasis en los pacientes resulta de gran interés.

La proteína hMena pertenece a la familia Ena/VASP y es una reguladora de la dinámica de actina, y es la única proteína perteneciente a esta familia que se ha encontrado que genera distintas isoformas mediante splicing alternativo. Se ha asociado la expresión de la isoforma hMena 11^a con alta capacidad proliferativa en células de fenotipo epitelial y la isoforma hMena $\Delta v6$ con células de fenotipo mesenquimal y alto riesgo de metástasis en pacientes con Cáncer de Mama (CaMa), por lo cual resulta importante identificar la expresión de estas isoformas en células tumorales y poder predecir la evolución de los tumores malignos. El péptido GLMEEMSAL es una secuencia conservada entre ambas isoformas de la proteína hMena e isoformas de Mena presentes en células de ratón. Por tanto, en este estudio fue de interés evaluar la capacidad de este péptido para generar anticuerpos específicos y si dichos anticuerpos permiten detectar la expresión de la proteína hMena en líneas celulares humanas que expresan a hMena $\Delta v6$ y hMena 11^a, así como en líneas celulares de ratón.

Ratones de la cepa BALB/c (n=8) fueron inmunizados con tres dosis de 100ug del péptido GLMEEMSAL y adyuvante completo (1 dosis) e incompleto (2 dosis) de Freund. La presencia de anticuerpos específicos se determinó mediante la técnica de ELISA en 8/8 ratones inmunizados. El uso de estos anticuerpos anti-GLMEEMSAL permitió detectar la expresión de hMena en las líneas celulares tumorales humanas CaSki (VPH 16+,hMena 11^a+), C33A (VPH-, hMena $\Delta v6$ +) de Cáncer Cérvico-uterino (CaCu), MDA-MB-231 (hMena $\Delta v6$ +), MCF-7 (hMena 11^a+) de CaMa reportadas como positivas para hMena, así como de las líneas celulares de ratón JC, D2F2/E2 de carcinoma de mama y TC-1(epitelio pulmonar transfectado con E6 y E7 de VPH 16 y el oncogen Ras) mediante citometría de flujo y de manera más eficiente mediante inmunocitoquímica de manera comparable a la de un anticuerpo comercial Anti-Mena.

En conclusión, los anticuerpos anti-GLMEEMSAL generados en ratones BALB/c fueron capaces de reconocer a la proteína hMena o Mena mediante citometría de flujo e inmunocitoquímica, independientemente de las isoformas presentes en las células tumorales. Lo cual puede ser de gran relevancia para su uso potencial en la detección y pronóstico de tumores que sobre-expresen hMena asociada con progresión y metástasis.

1. MARCO TEÓRICO

1.1 Cáncer

El cáncer puede ser definido como un grupo de enfermedades caracterizadas por una proliferación anormal y descontrolada de las células que puede o no implicar el proceso de invasión o metástasis (Pula and Krause, 2008). El cáncer es un problema importante de salud pública pues constituye una de las principales causas de morbilidad y mortalidad alrededor del mundo (OMS, 2017).

El cáncer se ha convertido en una de las principales causas de muerte a nivel mundial. El tipo de cáncer con mayor incidencia en la población general es el cáncer de pulmón (13%) seguido del Cáncer de Mama (CaMa) (12%) (GLOBOCAN, 2012) (Figura 1).

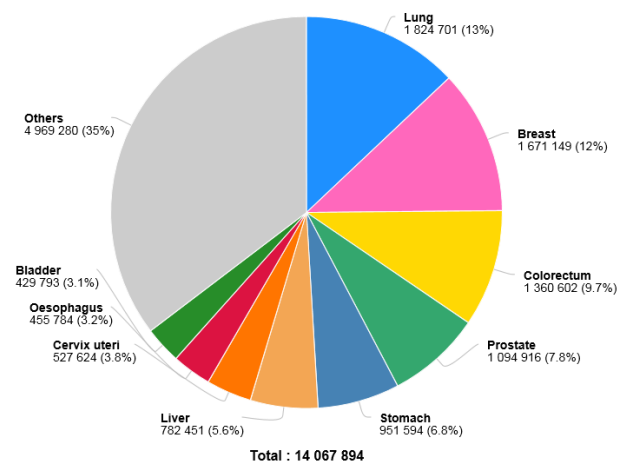


Figura 1. Incidencia de cáncer a nivel mundial. Se muestra el porcentaje de incidencia de cáncer en la población femenina y masculina (GLOBOCAN, 2012)

A nivel nacional, el CaMa y el Cáncer Cérvico-uterino (CaCu) son las dos principales causas de muerte por cáncer entre la población femenina (Figura 2), mientras que entre los varones los primeros lugares son ocupados por el cáncer de próstata y el cáncer de pulmón (Figura 3) (OMS, 2014).

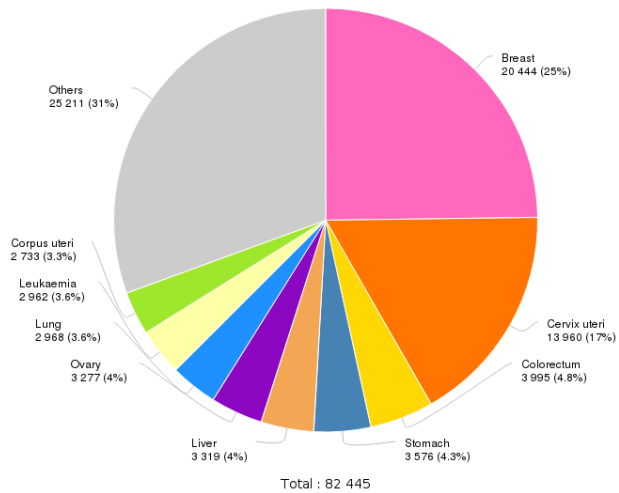


Figura 2. Incidencia de cáncer en México en la población femenina (GLOBOCAN, 2012)

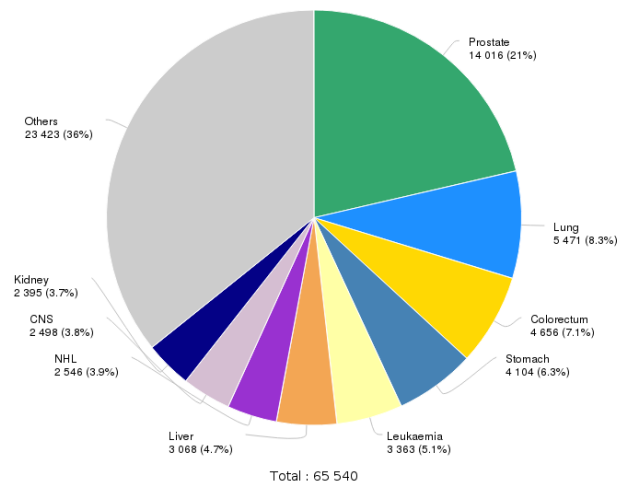


Figura 3. Incidencia de cáncer en México en la población masculina (GLOBOCAN, 2012)

Debido a que el cáncer representa un problema importante de salud pública no solo a nivel nacional sino también a nivel mundial, el estudio multidisciplinario de esta enfermedad es fundamental para comprender mejor los mecanismos involucrados y poder generar estrategias de tratamiento más eficaces que permitan aumentar la sobrevivencia de los pacientes. El estudio del sistema inmune en un contexto neoplásico ha cobrado fuerza en los últimos años.

1.2 Sistema inmune

El sistema inmune puede ser definido como el conjunto de moléculas, células y tejidos que trabajan de manera coordinada para generar lo que se conoce como respuesta inmune.

La respuesta inmune se da como resultado de la exposición del organismo a un agente endógeno o exógeno, denominado antígeno, el cual es reconocido como extraño por las células del sistema inmune (Vega, 2008).

El sistema inmune comprende órganos linfoides primarios (también conocidos como centrales) los cuales son la médula ósea y el timo. Ellos pueden madurar de manera independiente de la exposición a un antígeno. También existen los órganos linfoides secundarios o periféricos como ganglios linfáticos, bazo, amígdalas y placas de Peyer (Zaldivar, 2002).

Para su estudio, el sistema inmunológico se ha dividido en dos tipos de inmunidad: innata y adaptativa.

1.2.1 Inmunidad innata

La inmunidad innata, además de constituir la primera línea de defensa contra microorganismos, provee el contexto adecuado para que se genere la respuesta inmune adaptativa (Chabalgoity *et al.*, 2008).

Entre los componentes se encuentran barreras físicas y químicas como por ejemplo el epitelio que produce moco y sustancias antimicrobianas en la superficie epitelial. También incluye células fagocíticas como neutrófilos y macrófagos, células dendríticas, células NK, algunas proteínas sanguíneas como las que son parte del sistema de complemento y también varias citocinas. Cuando algún microorganismo logra atravesar estas barreras, se desencadena una respuesta inmune (Descotes, 2014).

1.2.2 Inmunidad adaptativa

Esta inmunidad se da cuando los antígenos logran escapar de los mecanismos de la respuesta inmune innata (Castellanos *et al.*, 2000).

A diferencia de la inmunidad innata, la inmunidad adaptativa se distingue por ser antígeno específica además de tener habilidad para recordar (memoria inmunológica) y responder con más intensidad a exposiciones repetidas con el mismo antígeno (Tabla 1). Las células que tienen un papel fundamental en este tipo de inmunidad son los linfocitos. (Descotes, 2014).

Tabla 1. Características del sistema inmune adaptativo. Tomada de: Toche, 2012

Especificidad	Reconoce diferentes tipos de antígenos.
Diversidad	Responde a una amplia variedad de antígenos.
Memoria	Amplifica las respuestas a repetidas exposiciones al mismo antígeno.
Especialización	Genera respuestas óptimas para la defensa contra diversos microorganismos.
No reactivo a lo propio	Previene el daño al huésped durante la respuesta a antígenos extraños.

La respuesta inmune adaptativa tiene dos vertientes que trabajan en conjunto para asegurar la homeostasis del individuo: la inmunidad humoral y la inmunidad celular.

1.2.3 Inmunidad humoral

Está regulada por las células B, también conocidas como linfocitos B las cuales son capaces de producir anticuerpos altamente específicos en respuesta a una variedad de compuestos antigénicos extraños. Se originan en la médula ósea y son derivadas de células troncales hematopoyéticas multipotentes, definidas por su habilidad para auto renovarse y producir múltiples tipos celulares más diferenciados (Merlo & Mandik, 2013).

Las células B juegan un papel muy importante en el sistema inmune, incluyendo su actuación como células presentadoras de antígeno, secreción de citocinas, y “formar” la arquitectura de los órganos linfoides.

Las células B se desarrollan en dos tipos de células: células plasmáticas, que se localizan en la médula ósea o en tejidos mucosos y producen anticuerpos de alta afinidad por varios años; y células B de memoria, las cuales no secretan de manera activa anticuerpos, pero permanecen en circulación y en mucosas de tejidos por largo tiempo, manteniendo el potencial de desarrollar anticuerpos (Nicholson, 2016).

Como se mencionó anteriormente, las células B plasmáticas tienen como función principal la producción de anticuerpos también denominados inmunoglobulinas (Ig) las cuales estructuralmente son polipéptidos formados por cuatro cadenas, dos de mayor peso molecular o cadenas pesadas (H), idénticas entre sí para cada inmunoglobulina y con una secuencia de aminoácidos única que determina tanto su clase (G, M, A, D y E) como sus funciones biológicas. Por otra parte consta

también de dos cadenas ligeras (L) también idénticas entre sí y unidas por puentes disulfuro. Asimismo, las inmunoglobulinas poseen una región cristalizable (Fc) idéntica en todas las Ig de un mismo isotipo y una región de unión al antígeno (Fab) (Abbas and Litchman, 2005; Barcenilla *et al.*, 2009). En la figura 4 se muestra la estructura de un anticuerpo.

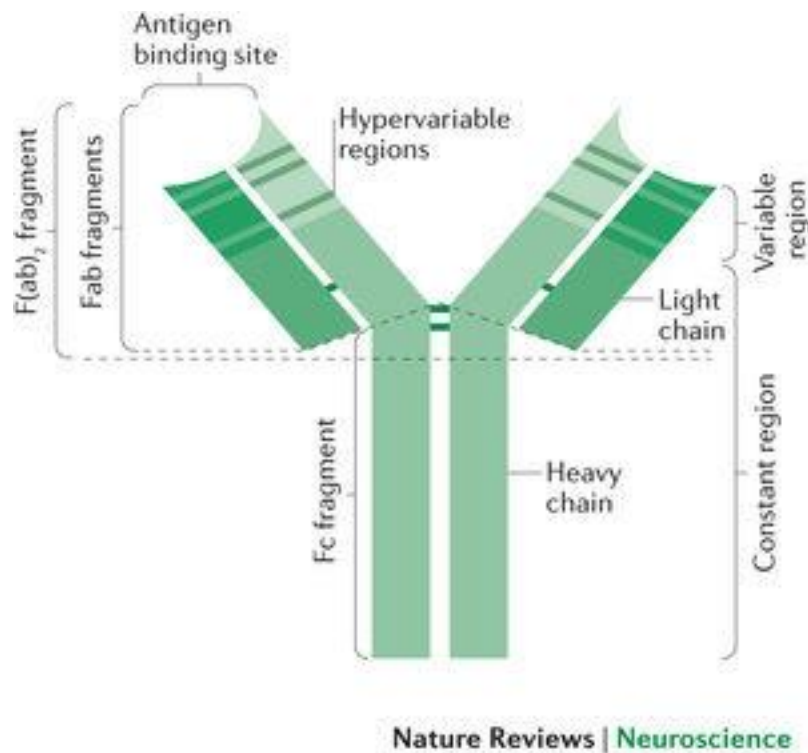


Figura 4. Estructura de un anticuerpo. Tomada de: Crisp *et al.*, 2016

Los anticuerpos pueden hallarse en el organismo ya sea anclados en la membrana de la célula B como receptor de antígeno, o bien, secretados encontrándose en la circulación, tejidos y sitios con mucosa, neutralizando toxinas y previniendo la entrada de patógenos (Descotes, 2014).

Se sabe de la existencia de cinco isotipos de inmunoglobulinas. Las diferentes clases responden a diversos tipos de antígenos y tienen distintas habilidades para activar vías de neutralización o eliminación de patógenos (Merlo & Mandik, 2013).

La IgM está expresada en la superficie celular durante el desarrollo de la célula B y la forma secretada se asocia a respuestas inmunes primarias (Merlo & Mandik, 2013) cuando se le encuentra en altas concentraciones en adultos, indica que hubo una exposición reciente a un antígeno (Actor, 2014).

IgD tiende a ser expresada a niveles muy bajos en suero. Podría estar involucrada en la modulación de la homeostasis de la célula B (Geisberger *et al.*, 2006).

Por otro lado, la IgA es usualmente encontrada en las superficies mucosas y protege esas superficies de toxinas, virus, y bacterias mediante la unión a su superficie o por neutralización directa (Schroeder and Cavacini, 2010). Se produce en grandes cantidades. A pesar de que no es capaz de activar el sistema de complemento, ha sido demostrado que posee una actividad bactericida para los organismos gram negativos. La transferencia de IgA de la leche materna al tracto gastrointestinal del bebé, produce una inmunidad pasiva contra patógenos en el neonato (Actor, 2014).

La IgE está involucrada en la defensa contra infecciones parasitarias pero es más conocida por su acción en reacciones alérgicas. Es considerada como una inmunoglobulina de acción potente dado que su concentración en suero es baja y su vida media es corta.

Finalmente la Inmunoglobulina G (IgG) es el isotipo de anticuerpos más común, y comprende la mayoría de las inmunoglobulinas encontradas en suero, en donde es la más estable de todas (Schroeder and Cavacini, 2010). Debido a su pequeño tamaño, ésta inmunoglobulina puede atravesar la placenta. La IgG derivada de la mamá provee inmunidad pasiva al neonato durante los primeros 4 meses de vida (Actor, 2014).

Hay dos formas en las que un anticuerpo puede ejercer su función; una de ellas es la neutralización de antígeno. Esto ocurre cuando el anticuerpo “cubre” la superficie de una toxina, virus o bacteria para imposibilitar la acción del patógeno (Joller *et al.*, 2011; Hangartner *et al.*, 2006).

La otra es mediante la opsonización, proceso que está usualmente asociado con la remoción de bacterias (Merlo & Mandik, 2013).

Cuando el linfocito alcanza su madurez, expresan como receptores a las inmunoglobulinas M y D expuestos en la membrana celular. Posteriormente circulan hacia los órganos linfoides para encontrarse con el antígeno directamente o bien, con la ayuda de una célula presentadora de Antígeno como un macrófago o mediante un linfocito T CD4+ cooperador con el fin de provocar la proliferación de las células B en los centros germinales para dar origen a células plasmáticas capaces de producir gran cantidad de anticuerpos (Guevara *et al.*, 2002).

1.2.4 Inmunidad celular

La inmunidad regulada por células es fundamental para la defensa de patógenos intracelulares como virus, bacterias y participan en la lucha contra las células tumorales (Limachi, 2011).

Esta inmunidad se encuentra mediada principalmente por macrófagos, células dendríticas y por los linfocitos T (Brooks *et al.*, 2008; Liébana, 2002; Murray *et al.*, 2002).

Los linfocitos T derivan de un precursor presente en la médula ósea, el cual obtiene su madurez en el timo cuando el individuo está en etapa fetal y en el primer periodo después del nacimiento (Liébana, 2002; Murray *et al.*, 2002; Rojas, 2005).

Terminada la maduración, las células T son llevadas hacia el torrente sanguíneo y son transportadas por la circulación a los órganos linfoides periféricos. Luego, migran a través del tejido linfoide y regresan al torrente sanguíneo y recirculan por el tejido linfoide periférico hasta que tienen el encuentro con un antígeno (Janeway *et al.*, 2001).

Tras someterse a una diferenciación en los tejidos linfoides secundarios, las células T se dirigen hacia los sitios de infección. Su papel como células efectoras se inicia cuando los receptores de las células T se unen a complejos peptídicos-Complejo Principal de Histocompatibilidad hallados en una célula diana. Esta unión provoca que el linfocito T libere moléculas efectoras como perforinas y granzimas que se actúan sobre la célula diana (Parham, 2005).

Naturalmente, una respuesta inmune se genera a causa de un crecimiento tumoral. Dicha respuesta puede ser innata efectuada mediante la secreción de factores solubles (Fearon and Locksley, 1996) o bien a través del reconocimiento de péptidos que se encuentran unidos a moléculas del Complejo Principal de Histocompatibilidad provenientes de tumores, acción que está regulada por la respuesta adaptativa y efectuada por las células T (Seliger *et al.*, 2002).

Aunque, el sistema inmune tanto innato y adaptativo es eficiente para eliminar tanto patógenos como células con crecimiento anormal y mantener la estabilidad interna del individuo, existe la posibilidad de que células malignas logren proliferar dando lugar al cáncer y a pesar de la respuesta inmune producida ante un crecimiento anormal de las células, diversos factores del microambiente tumoral pueden estar actuando de tal forma que las células malignas adquieran la capacidad de escapar de la vigilancia inmune, dando lugar a lo que se ha definido como metástasis.

1.3 Metástasis

La metástasis es definida como la diseminación del cáncer a diferentes órganos, y es la consecuencia de un desprendimiento de las células cancerosas del tumor primario además de intravasación, diseminación vía sanguínea o linfática y la invasión de nuevos órganos (Pula and Krause, 2008).

Cuando la célula cancerosa invade o realiza el proceso de metástasis, ocurren diversos eventos como la disociación del tumor primario, la invasión del estroma circundante e intravasación al sistema vascular (Friedl and Wolf, 2003). Mientras estos eventos ocurren, las células del carcinoma invasivo adquieren un fenotipo migratorio asociado con un incremento en la expresión de genes que regulan la polimerización de actina (Wang *et al.*, 2004; Wang *et al.*, 2005), lo cual es también requerido para el proceso de migración celular en células normales, no neoplásicas incluyendo la morfogénesis embrionaria, la cicatrización de una herida, y el tráfico de células inmunes (Friedl and Wolf, 2003).

La alteración en la adhesión celular, pérdida de la inhibición por contacto, la consecuente proliferación y la aberrante migración celular caracterizan al fenotipo agresivo de las células malignas (Pula and Krause, 2008).

Dado que el proceso metastásico es la principal causa de muerte en pacientes con cáncer (OMS, 2017), el hecho de generar herramientas que permitan detectar el riesgo de diseminación de la enfermedad es de suma importancia pues permitiría dar prioridad de tratamiento a aquellos con dicho riesgo. Por ello, en años recientes se ha llevado a cabo la identificación y uso de lo que se ha denominado como Antígenos Asociados a Tumor (AAT).

1.4 Antígenos Asociados a Tumor (AAT)

Hoy en día gracias a múltiples estudios sobre las células cancerosas, se sabe que en estas células, hay moléculas expresadas selectivamente, de forma aberrante o bien en cantidades que sobre pasan a las normales. Además, muchas de estas moléculas son inmunogénicas, por lo que llaman la atención como blancos inmunológicos ya que ayudarían a la eliminación eficaz del tumor (Sarmiento, 2015). Dichas moléculas se conocen colectivamente como Antígenos Asociados a Tumor (AAT).

Los AAT son moléculas que están expresadas en células de cáncer, y en menor grado en tejidos sanos. Pueden ser proteínas, carbohidratos o lípidos (Lucas and Coulie, 2008; Scott *et al.*, 2000).

Se sabe que el sistema inmune es capaz de reconocer los tejidos sanos de aquellos neoplásicos. Esta distinción es posible gracias a la sobre expresión de AAT (Cavallo *et al.*, 2005). Los AAT usualmente son resultado de genes celulares mutados, genes normales expresados de manera aberrante, o bien genes que codifican proteínas virales (Criscitiello, 2012). Es por ello que la identificación de AAT es de suma relevancia para una caracterización molecular y genética en el inmunodiagnóstico y la inmunoterapia (Cavallo *et al.*, 2005); pues la detección de AAT expresados en tejidos sanos y sobre expresados en células tumorales, permite el desarrollo de vacunas potencialmente capaces de mejorar la respuesta inmune antitumoral específica e intrínseca (Parmiani *et al.*, 2007; Parmiani *et al.*, 2007; Curigliano *et al.*, 2009).

El estudio de los AAT es de vital importancia pues abre la posibilidad de aportar información útil para generar estrategias más eficaces para el tratamiento del cáncer. En este contexto, varios grupos de trabajo han definido como AAT a diversas proteínas asociadas al citoesqueleto que podrían estar involucradas de manera muy importante en el proceso de metástasis, como es el caso de las proteínas pertenecientes a la familia de Ena/VASP las cuales se encargan de regular la dinámica de actina del citoesqueleto, por lo que se han asociado con un alto riesgo de metástasis para los pacientes.

1.5 Familia Ena/VASP

Las proteínas Ena/VASP (Enabled/vasodilator-stimulated phosphoprotein) son una familia estructuralmente conservada hallada en vertebrados, invertebrados y *Dictyostelium* (Kwiatkowski *et al.*, 2003).

Las proteínas Ena/VASP de mamífero: Mena (mammalian Enabled), VASP (vasodilator-stimulated phosphoprotein) y EVL (Ena-VASP-Like) (Krause *et al.*, 2003; Kwiatkowski *et al.*, 2003) tienen una organización conservada y exhiben funciones que comparten entre sí, por lo que comparten estructuralmente el dominio N-terminal denominado Ena/VASP Homology 1 (EVH1), un dominio central rico en prolina y un dominio C-terminal conocido como Ena/VASP Homology 2 (EVH2) (Halbrugge and Walter, 1989; Gertler *et al.*, 1989,1996).

El dominio EVH1 es el encargado de mediar las interacciones específicas proteína-proteína con un péptido corto rico en prolina. Esta interacción es

importante para el reclutamiento de dominios EVH1 almacenando proteínas en localizaciones subcelulares específicas y a los complejos de receptor de membrana (Pula and Krause, 2008).

La región central rica en prolina es la porción menos conservada de las proteínas Ena/VASP. Sin embargo, todas mantienen el sitio de unión rico en prolina que confiere la unión a profilina en la región central (Reinhard *et al.*, 1995; Gertler *et al.*, 1996; Lambrechts *et al.*, 2000).

El dominio EVH2 contiene sitios de unión para G-actina (Walders-Harbeck *et al.*, 2002; Chereau and Domínguez 2006) y F-actina (Bachmann *et al.*, 1999; Huttelmaier *et al.*, 1999; Harbeck *et al.*, 2000).

Los miembros de la familia de proteínas Ena/VASP están involucradas en la motilidad celular, en la adhesión y en muchos otros procesos dependientes de actina por lo que se cree que pueden tener un papel fundamental en procesos de migración y metástasis en los tumores. En años recientes se ha puesto especial interés en la proteína hMena la cual ha demostrado ser clave en la motilidad celular y de bacterias.

1.5.1 hMena

hMena además de ser un miembro de la familia de proteínas que se unen a la actina (Ena/VASP) es un mediador clave en los arreglos de citoesqueleto y funciones de la convergencia de las vías de motilidad reguladas por cofilina (Patsialou *et al.*, 2013; Philippar *et al.*, 2008). A nivel embrionario, hMena es fundamental para un desarrollo neural adecuado (Gertler *et al.*, 1990; Gertler *et al.*, 1995).

A diferencia de los otros miembros de la familia Ena/VASP, hMena posee una región repetitiva conocida como LERER. Dicha secuencia se ubica entre el dominio EVH1 y la región rica en prolina (Gertler *et al.*, 1996). Además, existen tres isoformas de la proteína hMena que son resultado del splicing alternativo y son de particular importancia en los tumores. hMena contiene solo los exones constitutivos, mientras que las dos variantes hMena INV y hMena 11^a contienen alternativamente los exones denominados “INV” o “11a” respectivamente. El exón INV (también conocido como “+++”) codifica 19 residuos de aminoácidos insertados cerca del extremo N terminal, mientras que el exón 11a codifica 21 residuos de aminoácidos insertados cerca del extremo C terminal (Gertler and Condeelis, 2011; Goswami *et al.*, 2009; Pino *et al.*, 2008).

1.5.2 hMena y cáncer

En un contexto neoplásico, la proteína hMena se asocia a la migración de las células tumorales *in vivo*, en parte gracias a la interferencia con la actividad de las proteínas inhibidoras de capping y al incremento del índice de elongación de los filamentos de actina promoviendo su polimerización (Entenberg *et al.*, 2011; Philippar *et al.*, 2008; Goswami *et al.*, 2009).

En pacientes, la expresión de hMena está incrementada en lesiones precursoras de cérvix y colon, en lesiones de mama asociadas con un alto riesgo de desarrollo de cáncer, y tumores de mama metastásicos (Di Modugno *et al.*, 2006) y se ha visto que la proteína constituye un factor clave para la metástasis (Gertler *et al.*, 2011).

Actualmente se ha reportado que las isoformas de la proteína hMena están asociadas a células con cierto fenotipo; hMena 11^a se encuentra en células con fenotipo epitelial mientras que hMena $\Delta v6$ se halla en células con fenotipo mesenquimal. Mientras tanto, la isoforma hMena INV se ha relacionado con aquellas células que son capaces de invadir sitios distintos al tumor.

En lo que refiere a la expresión de la isoforma hMena 11^a, ésta se encuentra asociada a células pertenecientes al tumor primario; mientras que en aquellas células con características invasivas, se encuentra regulada a la baja (Goswami *et al.*, 2009).

Por otro lado, cuando la isoforma hMena INV es abundante, las respuestas quimiotácticas e invasivas de las células cancerosas hacia el EGF se ven potenciadas (Entenberg *et al.*, 2011; Philippar *et al.*, 2008). Además, Existe evidencia experimental de que cuando ésta isoforma está expresada en células tumorales de mama, dichas células adquieren mayor sensibilidad a factores pro-invasivos de crecimiento (Philippar *et al.*, 2008; Hughes *et al.*, 2015).

El incremento en la expresión de hMena observado en células tumorales invasivas refleja un aumento en la abundancia de hMena y hMena INV, y correlaciona con una disminución relativa de hMena 11^a que es observada en células tumorales no invasivas en tumores de mama primarios (Goswami *et al.*, 2009).

Se ha asociado la sobreexpresión de hMena con una mayor motilidad celular y por lo tanto con un alto riesgo de invasión y metástasis debido a que ha mostrado ser capaz de acumularse en adhesiones focales que son sitios de señalización bidireccional entre el citoesqueleto y la matriz extra celular así como en regiones de la remodelación de la actina como los lamelipodios y en el borde de células móviles (Reinhard *et al.*, 1992; Gertler *et al.*, 1996). Además, ha sido involucrada

en el movimiento de la bacteria patógena *Listeria*, debido a que interviene en la unión de la proteína profilina en la superficie del microorganismo (Theriot *et al.*, 1994). Sin embargo, también se ha reportado que tiene un papel importante durante el desarrollo embrionario ya que ha sido comprobado que ratones depletados de la proteína Mena, aunque son viables, padecen de malformaciones del cuerpo calloso y la comisura del hipocampo (Lanier *et al.*, 1999).

Por estas observaciones y dado que el Cáncer es una enfermedad que constituye un problema de salud pública importante a nivel mundial y nacional, resulta de suma relevancia generar estrategias que permitan detectar el riesgo de progresión y metástasis, hMena parece ser un AAT prometedor tanto para el diagnóstico como para el tratamiento de diferentes tipos de cáncer.

En ese sentido, algunos investigadores han sumado esfuerzos para ver si es posible generar una respuesta inmune hacia epítopes de proteínas involucradas en el proceso de transformación maligna. El grupo de investigación de Nístico, al aislar la población de linfocitos T CD8+ de pacientes con CaMa y luego de estimularlos con tres epítopes de hMena: TMNGSKSPV, ILDEMRKEL y GLMEEMSAL, y evaluar la producción de IFN γ y mediante ensayos de ELISPOT demostró que existe una respuesta inmune celular contra péptidos de hMena en los pacientes con CaMa HLA-A2+ (Antígeno Leucocitario Humano).

Además de observar linfocitos T CD8+ específicos con actividad citotóxica, al analizar el suero de los pacientes, hallaron IgG γ s específicas a los mismos epítopes de la proteína hMena comprobando que existe respuesta inmune natural mediada por anticuerpos (Di Modugno *et al.*, 2004)

Recientemente nuestro grupo de trabajo mediante una estrategia de vacunación *in vitro* ha logrado demostrar que es posible generar respuesta inmune hacia epítopes de hMena en donadores sanos logrando generar respuesta citotóxica hacia líneas celulares de CaCu y CaMa que sobre-expresan cualquiera de las isoformas de la proteína hMena. Esto ha sido posible estimulando Células Mononucleares de Sangre Periférica (CMSP) de donadores sanos HLA-A2+ con células dendríticas maduras cargadas con el péptido GLMEEMSAL derivado de hMena, al realizar un co-cultivo de células efectoras - células blanco en una proporción de 5:1 se detectó lisis celular importante (Artículo enviado).

2. JUSTIFICACIÓN Y PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La proteína hMena se encarga de regular la dinámica de actina del citoesqueleto y tras un proceso de splicing genera distintas isoformas; una asociada a células con fenotipo epitelial y tumores con riesgo de progresión (hMena 11^a) y la otra asociada a células con fenotipo mesenquimal y tumores con alto riesgo de metástasis (hMena $\Delta v6$).

El péptido GLMEEMSAL derivado de hMena, es una secuencia conservada entre las isoformas de la proteína y ha mostrado ser capaz de generar respuesta inmune humoral detectable en pacientes con CaMa.

Por lo anterior en este trabajo se planteó la utilización de dicho péptido para la inmunización de ratones BALB/c con la finalidad de saber si es capaz de inducir una respuesta inmune mediada por anticuerpos y si éstos podrían detectar a hMena en líneas celulares murinas y humanas que sobre-expresen isoformas de esta proteína asociadas con la progresión y metástasis. Lo cual puede ser una herramienta auxiliar en el pronóstico de pacientes con cáncer.

3. HIPÓTESIS

Dado que el péptido GLMEEMSAL derivado de la proteína hMena es una secuencia conservada entre las isoformas de la proteína Mena humana y la proteína Mena murina, se espera que al inmunizar ratones de la cepa BALB/c con el péptido GLMEEMSAL se generen anticuerpos y que éstos tengan la capacidad de reconocer a la proteína Mena en células tumorales murinas y humanas.

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo general

- Generar anticuerpos contra el péptido GLMEEMSAL y evaluar su capacidad de reconocer a la proteína hMena en líneas celulares.

4.1.1 Objetivos particulares

- Inducir anticuerpos específicos al péptido GLMEEMSAL de hMena en ratones de la cepa BALB/c.
- Evaluar la presencia de anticuerpos contra el péptido de hMena en sueros de ratones inmunizados.

- Determinar la expresión de Mena en líneas celulares murinas y humanas utilizando sueros de ratones inmunizados con el péptido de hMena y compararlo con un anticuerpo comercial Anti-Mena.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 Predicción por algoritmos

Mediante los programas de predicción por algoritmos BIMAS (Parker *et al.*, 1994), SYFPEITHI (Rammensee *et al.*, 1999) y PAPProC (Nussbaum *et al.*, 2001) se analizó la secuencia de hMena (570 aa) y se encontró que el péptido GLMEEMSAL (derivado de hMena aa 443-451) es afín no solo a las moléculas HLA-A2 humanas, sino también a las moléculas H-2K de ratón (cepa BALB/c). Además, el péptido GLMEEMSAL derivado de la proteína hMena se ubica entre los aminoácidos del 414 al 422 (Mena de ratón) y aminoácidos 443-451 (hMena humana) y tiene alta probabilidad de ser procesado y presentado naturalmente por el inmunoproteasoma, de acuerdo al programa de predicción por algoritmos PAPProC (Gritzapis *et al.*, 2008).

5.2 Modelo animal

Dieciséis ratones de la cepa BALB/c con haplotipo H-2K fueron inmunizados bajo dos esquemas de tratamiento (ocho ratones por grupo). El primer grupo se inmunizó con 100 µg/ml del péptido GLMEEMSAL (Invitrogen, USA) de la proteína hMena. El segundo grupo (control) consistió en ratones a los cuales se les inoculó PBS. La primera inmunización se realizó utilizando el péptido GLMEEMSAL de la proteína hMena disuelto en PBS y en el grupo control solo se inoculó PBS. En ambos tratamientos se utilizó adyuvante completo de Freund (Sigma, USA) en una proporción 1:1.

Las siguientes dos inmunizaciones se realizaron con un intervalo del tiempo de 10-12 días utilizando adyuvante incompleto de Freund (Sigma, USA) en una proporción 1:1.

Transcurridos diez días después de la tercera inmunización se sacrificaron los ratones de cada grupo por exanguinación axilar y se obtuvo el suero que fue conservado en ultracongelación (-70 °C) hasta su análisis.

5.3 Técnica de ELISA

Los sueros obtenidos se analizaron mediante la técnica de ELISA para detectar anticuerpos contra el péptido GLMEEMSAL. Para lo cual se procedió de la siguiente manera:

En una placa de 96 pozos con fondo plano se colocaron 100 μ l del péptido GLMEEMSAL disuelto en buffer de carbonatos (Ver apéndice) a una concentración de 1 μ g de péptido por cada 100 μ l de buffer de carbonatos. Se colocó la muestra por triplicado así como también un triplicado del fondo al cual solo se le agregó buffer de carbonatos (100 μ l). Una vez cargada la placa con el péptido y el buffer de carbonatos, se incubó a 37°C por 1 hora. Pasado ese tiempo, se dejó incubando a 4°C toda la noche.

Al día siguiente se procedió a lavar los pozos dos veces con una solución de TBS Tween 20 al 0.1% (300 μ l por pozo) (Ver apéndice), para posteriormente bloquear con 200 μ l por pozo de una solución de albúmina sérica bovina (BSA) (Equitech-Bio, Inc., Texas) al 2% disuelta en TBS Tween y se dejó incubar por 1 h a 37°C.

Transcurrido este tiempo se hicieron cuatro lavados a los pozos con TBS Tween y se colocaron 100 μ l del anticuerpo primario (suero de ratón) en cada pozo en una dilución de 1:100 en BSA al 2%. Se colocó en incubación por 1 hora a 37°C.

Posteriormente, se lavaron los pozos seis veces con TBS Tween y se agregaron 100 μ l de un anticuerpo secundario acoplado a fosfatasa alcalina AP-Rabbit Anti mouse IgG (Invitrogen) en una dilución de 1:2500 en BSA al 2% y se incubó 1 h a 37°C.

Concluida la hora de incubación, se lavaron los pozos 8 veces con TBS Tween y se agregaron 100 μ l por pozo del sustrato preparado con 0.03 g de fosfatasa alcalina por cada 5 ml de dietanolamina y se incubó nuevamente durante 1 h.

Finalmente con ayuda de un lector de placas (Molecular Devices), se realizó la lectura a 405 nm de la placa con el Software short cut to soft max pro 4.7.1.

5.4 Cultivo celular

Las células de CaCu C33A (VPH-, hMena Δ V6+), CaSki (VPH-16+, hMena 11a+), la línea de queratinocitos humanos HaCaT, las células de CaMa MDA-MB-231 (hMena Δ V6+) de carcinoma mamario humano avanzado con derrame pleural, MCF-7 (hMena 11a+) de adenocarcinoma mamario humano aún con diferenciación de epitelio mamario y JC de adenocarcinoma mamario de ratón BALB/c, se mantuvieron en cultivo con medio RPMI (Gibco BRL Life Technologies, USA) más suplementos: aminoácidos no esenciales (Sigma, USA),

piruvato de sodio (Sigma, USA) y 2-mercaptoetanol (Gibco BRL, Life Technologies, USA) además de 10% de suero fetal bovino (Gibco BRL, Life Technologies, USA) (Ver apéndice). La línea celular TC-1 proveniente de un carcinoma de pulmón de ratón C57BL/6, que expresa permanentemente E6 y E7 de VPH-16 junto con el oncogen *ras* (Lin *et al.*, 1996), fue mantenida en cultivo con medio RPMI (Gibco BRL Life Technologies, USA) más suplementos: aminoácidos no esenciales (Sigma, USA), piruvato de sodio (Sigma, USA) y 2-mercaptoetanol (Gibco BRL, Life Technologies, USA), 10% de suero fetal bovino (Gibco BRL, Life Technologies, USA) y geneticina a 400 µg/ml. Las células D2F2/E2 (carcinoma mamario de BALB/c con HER2) fueron cultivadas con medio OPTI-MEM (Gibco BRL, Life Technologies, USA) más 10% de Suero Fetal Bovino (Gibco BRL, Life Technologies, USA) y geneticina (Sigma, USA) a 400 µg/ml. Todas las líneas fueron mantenidas en una incubadora Forma Scientific con 5% de CO₂ a 37 °C y humedad saturante.

5.5 Extracción de linfocitos humanos

Se realizó una toma de muestra de sangre periférica humana (15 ml) con ayuda de un vacutainer y tubos para toma de muestra con ACD (BD, USA). Una vez colectada la sangre se vació en un tubo de 50 ml y se puso a centrifugar a 5000 rpm durante 10 minutos.

Posteriormente se desechó el sobrenadante y el resto del contenido se llevó a un volumen de 35 ml con PBS estéril. En un tubo de 50 ml (Corning) se colocaron 10 ml del gradiente de densidad Histopaque (Sigma, USA) atemperado y se agregó lentamente la sangre diluida con PBS (proporción 1:3) utilizando una pipeta serológica.

Después, se centrifugó a 3 000 rpm durante 15 minutos. Terminado este tiempo, se extrajo cuidadosamente la banda de color blanco que es la correspondiente a las células mononucleares y se colocó en un tubo de 50 ml (Corning) completando a un volumen de 20 ml con PBS estéril y se centrifugó a 3 000 rpm por 5 minutos.

Terminado el tiempo, se decantó el sobrenadante y se realizaron 2 lavados con 4 ml de PBS estéril. Después de realizar los lavados, se añadieron 2 ml de medio de cultivo IMDM suplementado con 10% de suero autólogo humano inactivado al botón celular resultante y se resuspendió para sembrar las células en una caja de cultivo de 60 mm (Corning) y dejar incubando durante 2 horas.

Transcurrido el tiempo de la incubación se obtuvieron dos poblaciones celulares, una adherente y otra no adherente por lo que se colectó la fracción no adherente (donde se encuentra la población linfocitaria) y se pasó a otra caja de cultivo de 60 mm con medio IMDM. Al día siguiente la mitad de los linfocitos fueron usados para adherirlos en un portaobjetos y usarlos para la tinción Inmunocitoquímica, y la parte restante se usó para la detección de hMena por citometría de flujo.

5.6 Citometría de flujo

Para la estandarización de la técnica con el suero Anti-péptido, se usó la línea celular MDA-MB-231, pues ésta se ha reportado como positiva para la expresión de hMena en su isoforma $\Delta V6+$ por el grupo de investigación de Nistico en el 2012. Para la estandarización con el anticuerpo comercial, se utilizó la línea celular TC-1.

Las líneas celulares de CaCu, CaMa, murinas junto con la línea celular HaCaT y el control negativo (linfocitos) fueron utilizadas para la detección de la proteína hMena por citometría de flujo mediante el uso del suero anti-GLMEEMSAL y del anticuerpo Anti-Mena clone A351F7D9 (Millipore, USA) el cual reconoce a la proteína hMena y su isoforma 11^a en conjunto con el Ab secundario Goat anti mouse α IgG acoplado a FITC (Sigma, USA).

Una vez que las líneas celulares en cultivo alcanzaron el 80% de confluencia de un plato de cultivo CORNING® de 100mm x 20mm se procedió a despegar las células. Se retiró el medio de cultivo y se agregaron 3 ml de verseno (Ver apéndice) y se dejaron incubando por 5 minutos. Luego se enjuagó la caja de cultivo con el verseno y se colectó en un tubo de 50 ml para su centrifugación. Se centrifugó a 3000 rpm por 5 minutos. Terminada la centrifugación se aspiró el sobrenadante y se agregaron 300 μ l de paraformaldehído al 2% (Ver apéndice). Se resuspendieron las células y se colocaron 100 μ l en cada pozo de una placa de 96 pozos fondo U (Corning). El primer pozo correspondió a la autofluorescencia, el segundo al anticuerpo secundario, el tercero al suero de ratones inoculados con PBS, el cuarto al anticuerpo anti-GLMEEMSAL y el quinto al anticuerpo Anti-Mena clone A351F7D9.

Una vez preparados los pozos, se dejó reposar por 15 minutos a temperatura ambiente para posteriormente centrifugar a 2500 rpm 4 minutos a 4°C en una centrifuga para placas. Después, se retiraron los sobrenadantes y se hizo un lavado con Permash® 1X (BD Biosciences, CA).

A continuación se agregó al tercer, cuarto y quinto pozo, 100 μ l del anticuerpo primario (suero de ratón inoculado con PBS, suero anti-GLMEEMSAL y Anti-Mena respectivamente) diluido en Permash® 1X en una proporción de 3:100 (Suero

ratón inoculado con PBS, suero anti-GLMEEMSAL) y 2:100 (Anti-Mena). Al pozo de auto fluorescencia y al del anticuerpo secundario se les colocaron 100 µl de PBS + SFB al 2% y se dejó incubando por 30 minutos en frío y oscuridad.

Pasado el tiempo de incubación, se centrifugó bajo las condiciones establecidas y se aspiró el sobrenadante. Luego se procedió a lavar una vez los pozos con 100 µl de PBS + SFB 2%. Se volvió a centrifugar y se desechó el sobrenadante.

Se procedió a agregar 100 µl de anticuerpo secundario diluido 1:100 en PBS + SFB 2%, a los pozos correspondientes al anticuerpo secundario, suero de ratón inoculado con PBS, anti-GLMEEMSAL y Anti-Mena. Al pozo de autofluorescencia se le agregaron 100 µl de PBS + SFB al 2% se resuspendió y se incubó en frío durante 15 minutos.

Una vez terminada la incubación, se centrifugaron las muestras se desechó el sobrenadante y se lavaron 2 veces los pozos con 100 µl de PBS + SFB al 2%. Terminados los lavados se agregó a cada pozo 100 µl de PBS + SFB al 2%, se resuspendieron las muestras y se traspasaron a tubos de poliestireno de 5ml agregando 200 µl más de PBS + SFB al 2%. Las muestras se mantuvieron en frío y oscuridad hasta que fueron leídas en el citómetro de flujo FACS- ARIA (BD Biosciences).

El análisis posterior de los resultados se realizó con la ayuda del programa Flowing software 2.5.1

5.7 Tinción inmunocitoquímica

Se colocaron 40, 000 células (CaSki, HaCaT, MCF-7) o 35,000 células (C33A, MDA-MB-231, D2F2/E2, TC-1 y JC) por pozo en placas de 8 pozos (ThermoScientific, USA). Una vez que las células estaban adheridas a la placa se retiró el medio de cultivo, se procedió a fijar las células con paraformaldehído al 2% (200 µl/ pozo) y fueron preservadas en frío hasta su tinción.

Como control negativo se usaron linfocitos humanos no estimulados obtenidos a partir de sangre periférica mediante separación por gradiente de densidad con Ficoll (como fue descrito anteriormente en materiales y métodos). 1, 000,000 linfocitos fueron adheridos en un portaobjetos con la ayuda de una centrifuga Cytospin (Shandon Southern) durante 7 minutos a 5,000 rpm.

Para la tinción, se retiró el paraformaldehído y se lavaron los pozos con agua milli-Q por 5 minutos manteniendo en agitación y con IHC Rinse Buffer 1X Kit DAB150 Immunoperoxidase Secondary Detection System (Millipore, USA) durante 2 minutos en agitación. Terminados los lavados se retiró cuidadosamente el plástico que divide a los pozos, se marcó el contorno de los cuadros con un lápiz

hidrofóbico (Sigma, USA) y se procedió a bloquear con 100 µl de una solución de BSA al 5% en agitación durante 10 minutos.

Pasado este tiempo, se aplicó una gota del reactivo bloqueador (Kit DAB150 Immunoperoxidase Secondary Detection System Millipore, USA) a las muestras dejando incubar durante 5 minutos en agitación y se lavó después con IHC Rinse buffer dos veces durante 5 minutos manteniendo en agitación.

Terminados los lavados se colocaron 100 µl del anticuerpo primario Anti-Mena clone A351F7D9 (Millipore, USA) en una dilución de 1:100 en BSA 5% a las muestras problema mientras que a las muestras control se les colocó un anticuerpo Isotipo control mouse IgG (Santa Cruz, USA) 1:500 en BSA 5%. Se dejó incubar durante 90 minutos en agitación y terminado el tiempo se lavó dos veces con 100 µl de IHC Rinse buffer por 5 minutos en agitación.

Después se aplicó una gota de Anticuerpo secundario (Kit DAB150 Immunoperoxidase Secondary Detection System Millipore, USA) en cada pozo y se incubó por 10 minutos en una cámara húmeda y en agitación, al terminar la incubación se lavó nuevamente con 100 µl de IHC Rinse buffer por 5 minutos (dos veces).

Posteriormente, se añadió una gota de Streptavidina HRP (Kit DAB150 Immunoperoxidase Secondary Detection System Millipore, USA) y se incubó por 10 minutos en agitación, al término se realizaron dos lavados con 100 µl de IHC Rinse Buffer de 5 minutos cada uno.

Para el revelado se procedió a añadir 15 µl/pozo de reactivo cromógeno DAB (Kit DAB150 Immunoperoxidase Secondary Detection System Millipore, USA) recién preparado a una dilución 1:25, se incubó durante dos minutos y medio y se lavó con agua corriente, posteriormente se añadió una gota de hematoxilina (Kit DAB150 Immunoperoxidase Secondary Detection System Millipore, USA) a cada pozo, y se dejó incubar 6 minutos y pasado este tiempo, se lavó la laminilla nuevamente con agua corriente.

Terminado el lavado, se fijó la laminilla con alcohol al 70%, 96%, 100%, alcohol-xilol 1:1 y xilol absoluto durante 5 minutos en cada solución.

Finalmente, se adicionó la resina Entellan (Millipore, USA) sobre el porta objetos y se colocó encima un cubre objetos para su encapsulación y se dejó secar para su posterior escaneo.

Para realizar la tinción de las líneas celulares con el suero anti-GLMEEMSAL, se efectuó el mismo procedimiento pero se colocó un pozo con el anticuerpo isotipo

control (1:500), uno con el suero del ratón inoculado con PBS (0.5:100) y uno con el suero anti-GLMEEMSAL (0.5:100).

Para el escaneo de las tinciones se utilizó el equipo Aperio (Leica) con el software Consola a un aumento de 40X y se tomaron fotos representativas de las tinciones a un aumento de 40 X con ayuda del software ImageScope (Leica), mismo que se usó para el análisis.

Debido a que el equipo Aperio no logra escanear células tan pequeñas como los linfocitos, éstos fueron analizados usando un método distinto en el cual se obtiene un valor denominado IOD (Integrated Optical Density).

El análisis de la tinción de linfocitos se realizó de la siguiente manera: se seleccionaron cuatro campos representativos y se tomaron fotos con ayuda de un microscopio biológico triocular (Olympus) con cámara (Evolution VF cooled color, MediaCybernetics) a un aumento de 40X. Posteriormente se contó el total de células de los cuatro campos seleccionados y se realizó el análisis de positividad de las mismas. Se tomó como referencia un total de 200 células para realizar el análisis.

Con ayuda del software Image Pro Plus (MediaCybernetics) se analizaron las tinciones tomando el valor de IOD de cuatro campos. Luego de obtener el valor de cada campo, se hizo la sumatoria de la IOD para conocer el valor total de los campos considerados. Del mismo modo, se contaron las células por campo y se realizó la sumatoria del número de células de los cuatro campos haciéndose una relación como se muestra a continuación:

	IOD	Células por campo
Foto 1	Y1	N1
Foto 2	Y2	N2
Foto 3	Y3	N3
Foto 4	Y4	N4
Total	Sumatoria	Sumatoria

$$\text{IOD total de la muestra} = (\text{Sumatoria de Y1-Y4}) \times 200 / \text{Sumatoria de N1-N4}$$

Para la obtención del valor de IOD, fue necesario realizar el mismo procedimiento usado para los linfocitos fue utilizado para la línea celular C33A (hMena $\Delta v6$ +) con la finalidad de establecer un valor positivo para la expresión de la proteína hMena, y a partir de ello calcular la IOD de los linfocitos.

6. RESULTADOS

6.1 LA INMUNIZACIÓN CON EL PÉPTIDO GLMEEMSAL INDUCE LA PRODUCCIÓN DE ANTICUERPOS ANTI-PÉPTIDO EN RATONES BALB/c.

Con el propósito de saber si era posible generar una respuesta inmune humoral en un modelo murino de ratones BALB/c, dieciséis ratones hembra fueron inmunizados bajo dos esquemas de vacunación. El grupo control (n=8) consistió de animales tratados con PBS + adyuvante de Freund en una proporción de 1:1 y el grupo problema (n=8) de ratones con tres dosis de 100 µg del péptido GLMEEMSAL derivado de hMena emulsionado con adyuvante completo (1 dosis) e incompleto (2 dosis) de Freund. Tras concluir el tratamiento, se sacrificaron los ratones, se obtuvo el suero y se procedió a evaluar la presencia de anticuerpos contra el péptido mediante la técnica de ELISA. En la figura 5 se muestran los resultados de O.D. (Densidad Óptica) después de la inmunización.

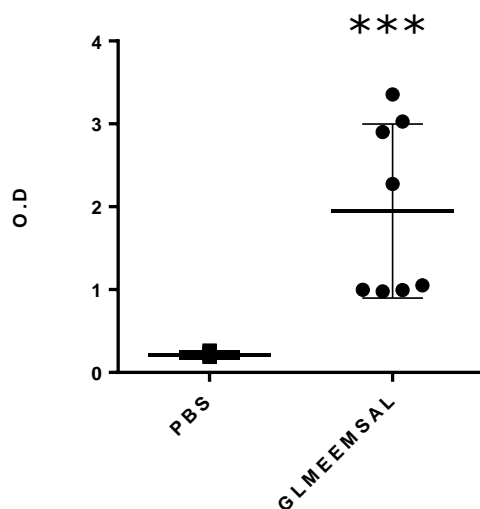


Figura 5. La inmunización de ratones BALB/c con el péptido GLMEEMSAL genera anticuerpos péptido-específicos. Ratones de la cepa BALB/c (n=8) fueron inmunizados con 3 dosis de 100ug del péptido GLMEEMSAL de la proteína hMena con adyuvante completo e incompleto de Freund (ver materiales y métodos). Los sueros de los ratones inmunizados con el péptido (GLMEEMSAL) fueron probados en ensayos de ELISA para determinar su especificidad hacia el propio péptido utilizado como antígeno. Sueros de ratones inmunizados con PBS y adyuvantes de Freund (PBS) (n=8) fueron utilizados como control negativo. Se muestran los valores de O.D de ratones inmunizados con GLMEEMSAL y PBS. *** Diferencia significativa con respecto al grupo inoculado con PBS (P<0.001) prueba de U de Mann Whitney.

Mediante la técnica de ELISA se pudo detectar la presencia de anticuerpos anti-GLMEEMSAL, en los sueros obtenidos de animales inmunizados con el péptido, la actividad óptica (O.D) detectada de 0.9- 3.3 fue significativamente mayor ($p < 0.001$) que la mostrada en sueros de ratones tratados solo con PBS e IFA, donde los valores de O.D fueron de 0.2.

Una vez que se comprobó que la inmunización con el péptido fue suficiente para generar anticuerpos contra el epítipo de hMena, se procedió a ver si mediante citometría de flujo, era posible detectar a la proteína hMena en células tumorales utilizando el anticuerpo Anti-Mena y el suero anti-péptido obtenido.

6.2 DETECCIÓN DE LA PROTEÍNA MENA EN LÍNEAS CELULARES DE TUMORES HUMANOS Y DE RATÓN USANDO UN ANTICUERPO COMERCIAL ANTI-MENA.

La sobre expresión de la proteína hMena en las líneas celulares humanas CaSki, MCF-7, C33A y MDA-MB-231 ha sido previamente reportada por Di Modugno en 2004 y 2006. No obstante, para conocer si también las líneas celulares de ratón TC-1, JC y D2F2/E2 expresan a la proteína Mena, en este trabajo utilizamos el anticuerpo comercial Anti-Mena clone A351F7D9. Mediante citometría de flujo se pudo detectar de manera diferencial la expresión de la proteína Mena, tanto en las líneas celulares humanas como de ratón. Las líneas celulares C33A, HaCaT, TC-1 y D2F2/E2 mostraron la mayor expresión de Mena, presentando una intensidad media de fluorescencia (IMF) de: 537.22, 654.08, 289.03 y 62.125 respectivamente (figura 6).

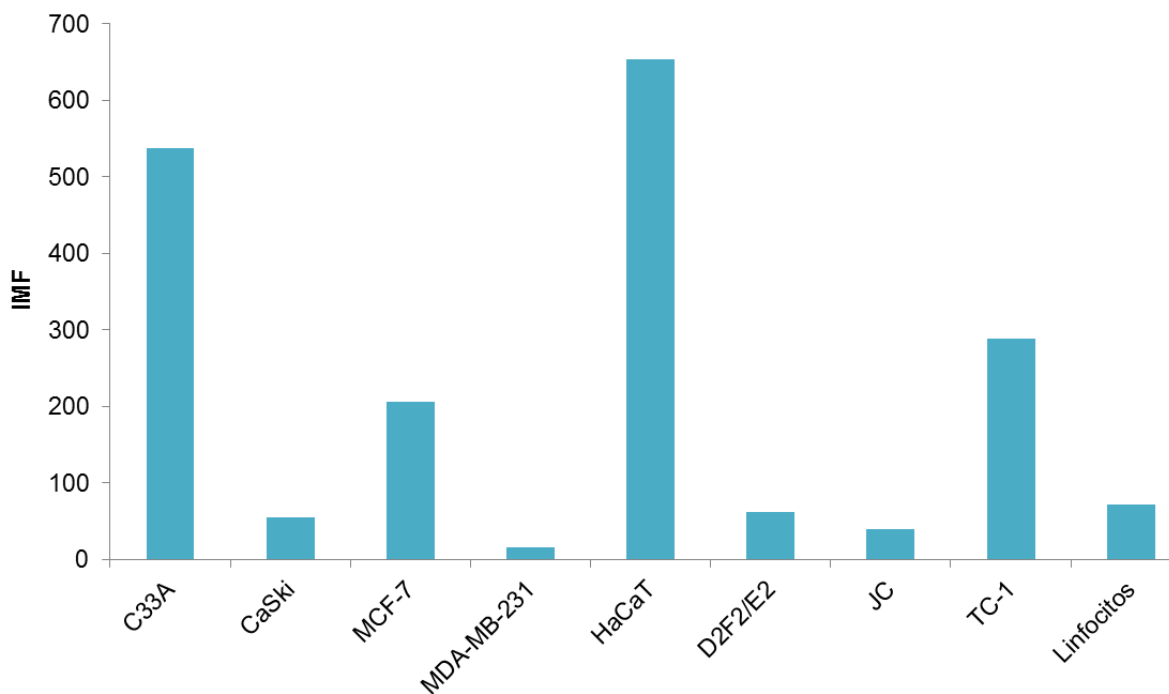


Figura 6. Detección de la proteína Mena en líneas celulares murinas y humanas. Las líneas celulares humanas (C33A, CaSki, HaCaT, MCF-7 y MDA-MB-231) y de ratón (D2F2/E2, JC y TC-1) así como de linfocitos T humanos fueron teñidas con el anticuerpo Anti-Mena y un anticuerpo 2º marcado con FITC, y analizadas mediante citometría de flujo. Se muestra la Intensidad Media de Fluorescencia (IMF) para cada tipo celular. Los valores mostrados son representativos de tres experimentos independientes por triplicado.

6.3 DETECCIÓN DE LA PROTEÍNA MENA EN LÍNEAS CELULARES DE TUMORES HUMANOS Y DE RATÓN USANDO SUEROS DE RATONES BALB/c INMUNIZADOS CON EL PÉPTIDO GLMEEMSAL.

6.3.1 Detección mediante citometría de flujo.

Una vez corroborada la expresión de la proteína Mena en las diferentes líneas celulares utilizadas en este estudio mediante el uso de un anticuerpo comercial Anti-Mena, se procedió a analizar si anticuerpos contenidos en sueros de ratones BALB/c inmunizados con el péptido GLMEEMSAL (anti-GLMEEMSAL) reconocen a la proteína Mena en las diferentes células de estudio. Para lo cual se utilizó la línea celular MDA-MB-231 de cáncer de mama, positiva para la expresión de la proteína hMena $\Delta V6$ (Di Modugno *et al.*, 2006). Para analizar la expresión de la proteína Mena en las células MDA-MB-231, se utilizaron los métodos sin permear y permeando a las células, debido a que el grupo de Nístico en 2016 reporta que es posible en algunos tipos celulares se localiza la proteína hMena tanto en la membrana como en citoplasma.

En la Figura 7 se muestran histogramas y los valores promedio de la IMF de los ensayos de citometría de flujo de células MDA-MB-231 sin permeabilizadas e incubadas con diferentes diluciones de sueros de ratones inmunizados con PBS o anti-GLMEEMSAL. Solo en la dilución 3:100 de suero de ratones inmunizados con el péptido mostraron un ligero incremento en el valor de la IMF respecto a los sueros de ratones inoculados con solo PBS.

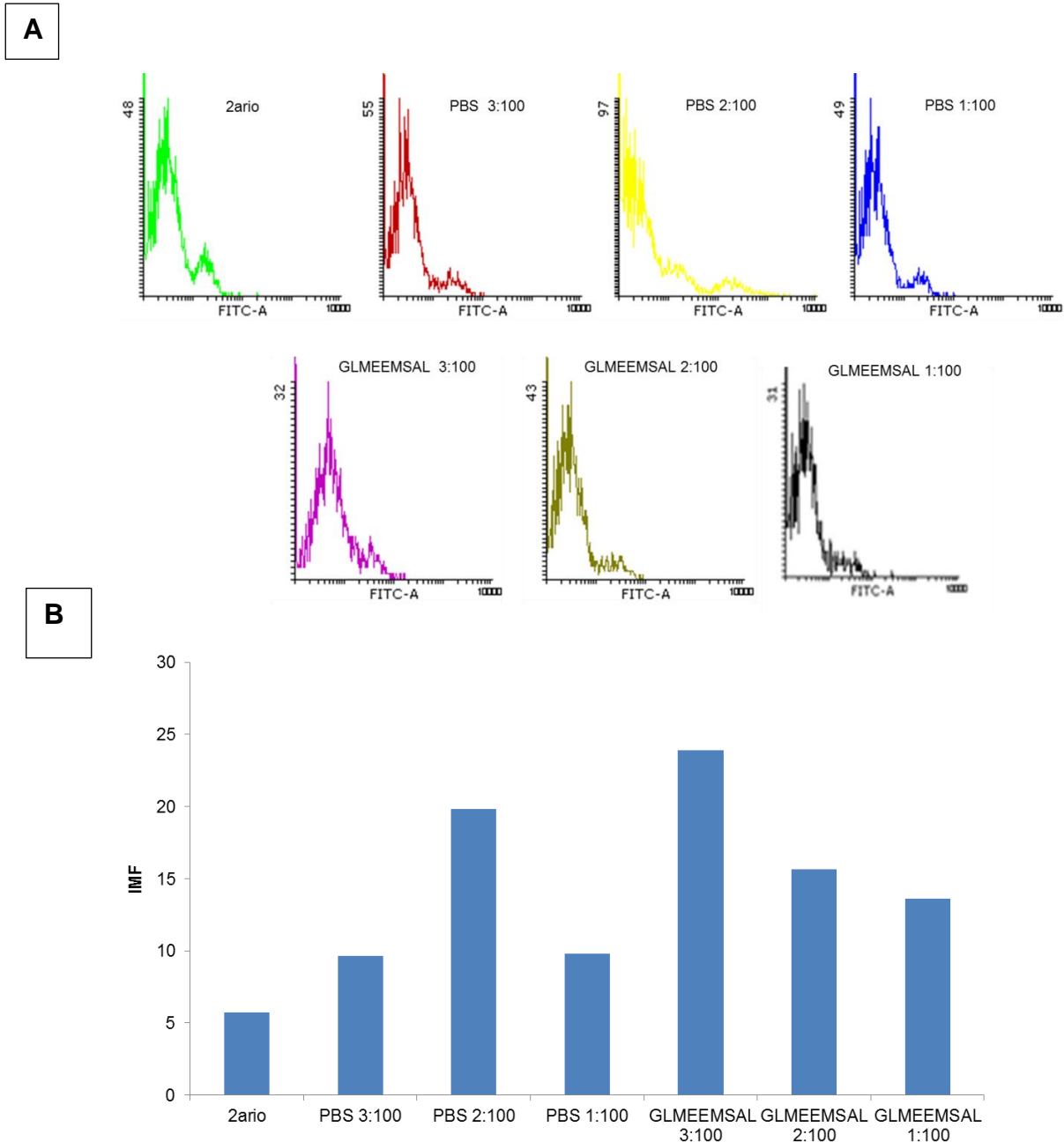
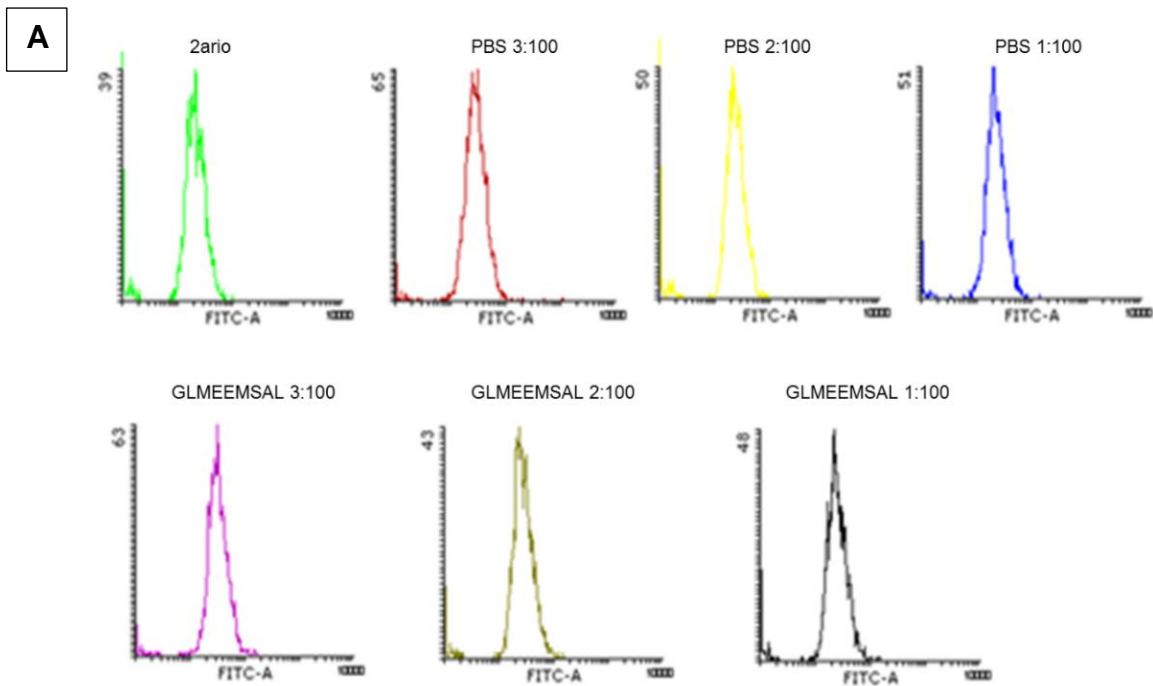


Figura 7. Sueros de ratones inmunizados con el péptido GLMEEMSAL reconocen a la proteína hMena en células MDA-MB-231 sin permeabilizadas. Células MDA-MB-231 fueron incubadas con

diferentes diluciones del suero (3:100, 2:100, 1:100) de ratones inmunizados con el péptido GLMEEMSAL o con PBS y posteriormente con un anticuerpo secundario marcado con FITC y se procedió analizar la Intensidad Media de Fluorescencia (IMF) mediante citometría de flujo. Se muestran los histogramas representativos de cada lectura (A) y los valores de IMF (B) de 3 experimentos independientes por triplicado.

Por otro lado, al analizar la expresión de hMena en las células MDA-MB-231 permeadas, se pudo apreciar un ligero incremento (20%) al utilizar dilución 3:100 de los sueros anti-GLMEEMSAL en las células MDA-MB-231 permeadas (Figura 8).



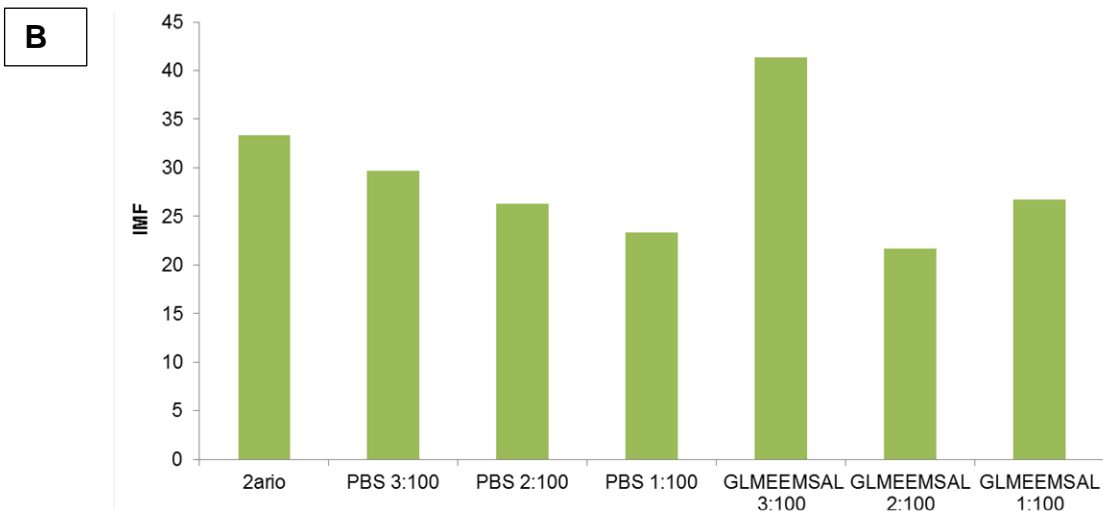


Figura 8. Sueros de ratones inmunizados con el péptido GLMEEMSAL reconocen a la proteína hMena en células MDA-MB-231 permeadas. Células MDA-MB-231 fueron fijadas con paraformaldehído y posteriormente permeadas (ver materiales y métodos) antes de incubadas con diferentes diluciones del sueros (3:100, 2:100, 1:100) de ratones inmunizados con el péptido GLMEEMSAL o con PBS, y en seguida con un anticuerpo secundario marcado con FITC y se procedió analizar la Intensidad Media de Fluorescencia (IMF) mediante citometría de flujo. Se muestran los histogramas representativos de cada lectura (A) y los valores de IMF (B) de 3 experimentos independientes por triplicado.

Después de analizar los resultados obtenidos de la citometría de flujo se concluyó que lo más adecuado para analizar la expresión de hMena en las líneas celulares era utilizar células permeadas con el suero a una dilución de 3:100. Por ello, bajo estas condiciones se realizaron los ensayos subsecuentes con las demás líneas celulares.

Con la finalidad de analizar el nivel de expresión de la proteína Mena en cada línea celular con el uso de sueros anti-GLMEEMSAL, los datos obtenidos de la incubación de cada línea celular en presencia de suero de ratones inoculados con PBS fueron normalizados a 1. De esta manera, las líneas celulares MCF-7, C33A y las líneas celulares de ratón JC, D2F2/E2 y TC-1 fueron las que mostraron incremento en la expresión de Mena (aprox 20-30%) (Figura 9). No obstante, los niveles de expresión detectados con los sueros anti-GLMEEMSAL fueron menores a los detectados con el uso del anticuerpo comercial Anti-Mena a través de la técnica de citometría de flujo.

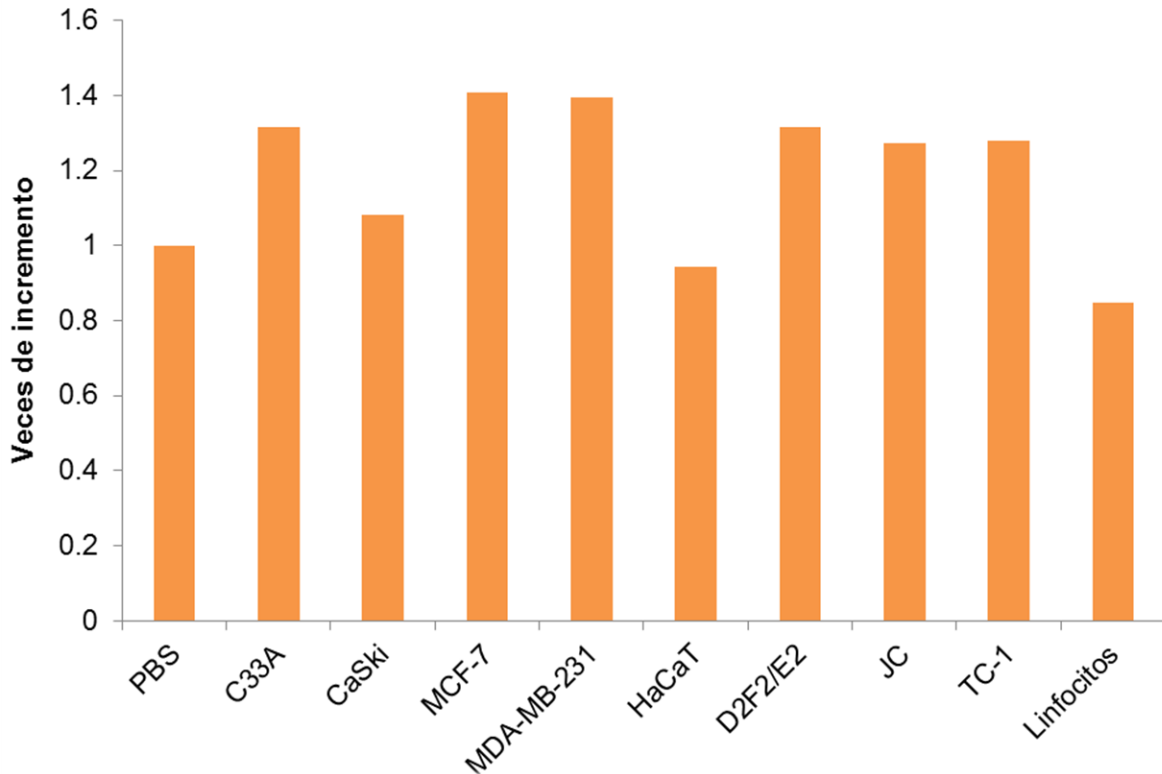


Figura 9. Detección de la proteína Mena en líneas celulares murinas y humanas mediante citometría con sueros de ratones inmunizados con el péptido GLMEEMSAL. Las líneas celulares humanas (C33A, CaSki, HaCaT, MCF-7 y MDA-MB-231) y de ratón (D2F2/E2, JC y TC-1) así como de linfocitos T humanos fueron fijadas con paraformaldehído al 2% y posteriormente permeadas e incubadas con sueros de ratones BALB/c inmunizados con el péptido GLMEEMSAL o con PBS (dilución 3:100) y en seguida teñidas con anticuerpo secundario-FITC. Los datos obtenidos de cada una de las células incubadas con sueros de ratones inmunizados con PBS fueron normalizados a 1 y se muestran los valores obtenidos con el suero anti-GLMEEMSAL. Los valores mostrados son representativos de tres experimentos independientes por triplicado.

6.3.2 Detección mediante inmunocitoquímica (ICQ).

Después de evaluar la capacidad de los anticuerpos anti-GLMEEMSAL para detectar a la proteína Mena por citometría de flujo se decidió probar si estos podían reconocer a esta proteína por ICQ. Para lo cual, las líneas celulares fueron sembradas sobre laminillas de vidrio y posteriormente incubadas con el anticuerpo Anti-Mena (control positivo) y el suero de ratones inmunizados con el péptido GLMEEMSAL (anti-GLMEEMSAL). Un anticuerpo irrelevante de isotipo IgG fue utilizado como control negativo.

La expresión de la proteína Mena en las líneas celulares de ratón (Tabla 2) y humanas (Tabla 3) fue detectada eficientemente con el suero anti-GLMEEMSAL, la cual fue comparable a la realizada con el anticuerpo comercial Anti-Mena.

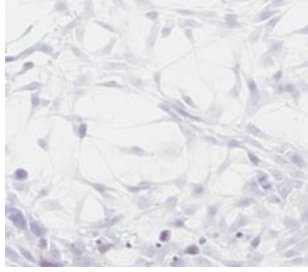
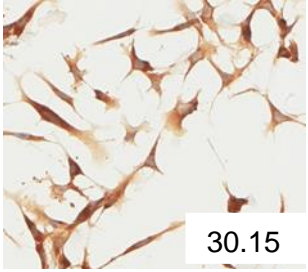
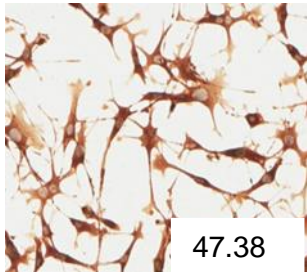
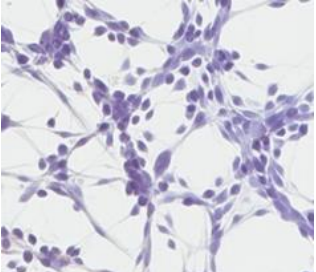
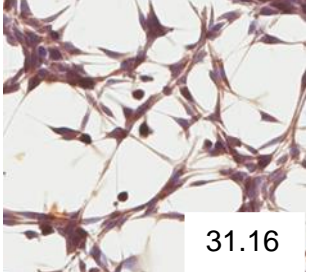
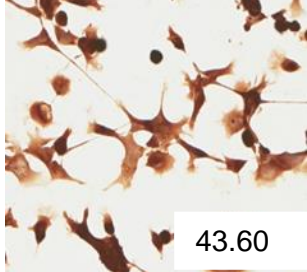

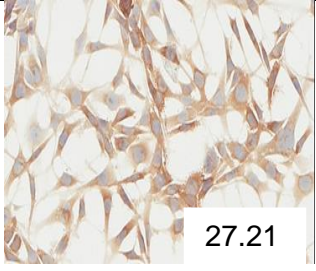
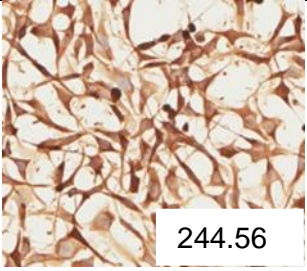
Línea celular	Control negativo	Control positivo	anti-GLMEEMSAL
D2F2/E2			
JC			
TC-1			

Tabla 2. Anticuerpo anti-GLMEEMSAL detecta de manera eficiente la expresión de la proteína Mena en líneas celulares de ratón. Se muestran fotografías representativas de la expresión de la proteína Mena en células de ratón D2F2/E2, JC y TC-1 teñidas con un anticuerpo comercial Anti-Mena (control positivo), anticuerpo anti-GLMEEMSAL obtenido de suero de ratones inmunizados con el péptido GLMEEMSAL, un anticuerpo irrelevante de isotipo IgG fue utilizado como control negativo. Se muestran imágenes representativas escaneadas a un aumento de 40X en el equipo Aperio y su respectivo valor de Intensidad Total de Expresión (ITE).

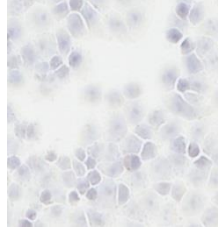
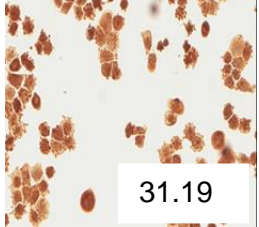
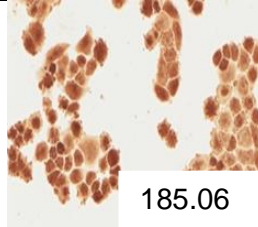
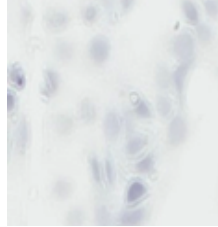
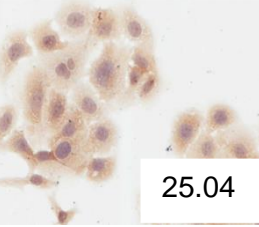
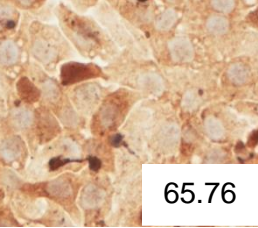
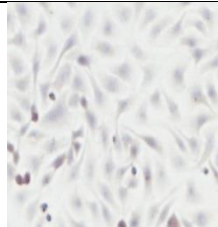
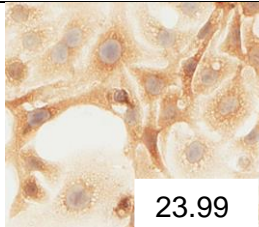
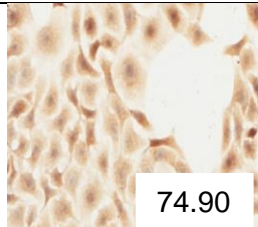
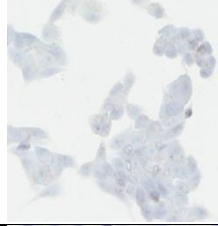
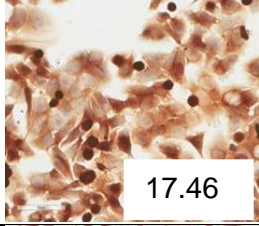
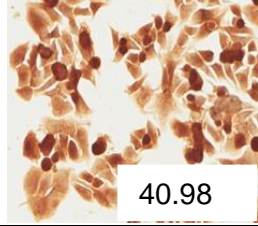
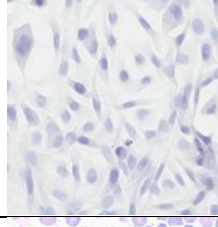
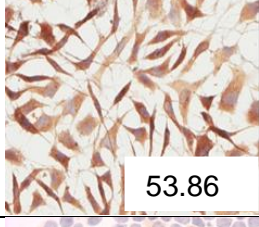

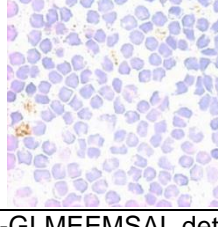
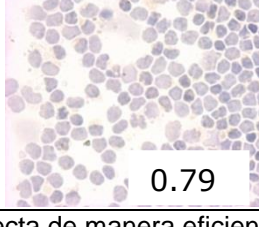

Línea celular	Control negativo	Control positivo	anti-GLMEEMSAL
C33A			
CaSki			
HaCaT			
MCF-7			
MDA-MB-231			
Linfocitos			

Tabla 3. Anticuerpo anti-GLMEEMSAL detecta de manera eficiente la expresión de la proteína Mena en líneas celulares y linfocitos T humanos. Se muestran fotografías representativas de la expresión de la proteína Mena en células C33A, CaSki, MCF-7, MDA-MB-231 y linfocitos T humanos empleando un anticuerpo comercial Anti-Mena (control positivo), anticuerpo anti-GLMEEMSAL obtenido de suero de ratones inmunizados con el péptido GLMEEMSAL, un anticuerpo irrelevante de isotipo IgG fue utilizado como control negativo. Se muestran imágenes

escaneadas a un aumento de 40X en el equipo Aperio y su respectivo valor de Intensidad Total de Expresión (ITE) y de la densidad óptica integrada para el caso de los Linfocitos T.

Al normalizar como 1 los valores de ITE empleando al anticuerpo usado como control negativo, se pudo determinar un incremento de 3 a 5 veces de la ITE en las líneas celulares MDA-MB-231 y TC-1 y de 0.5-2 en las líneas C33A, CaSki, MCF-7 y HaCaT, D2F2/E2 y JC usando tanto el anticuerpo comercial anti-Mena como el suero anti-GLMEEMSAL (Figura 10 y 11).

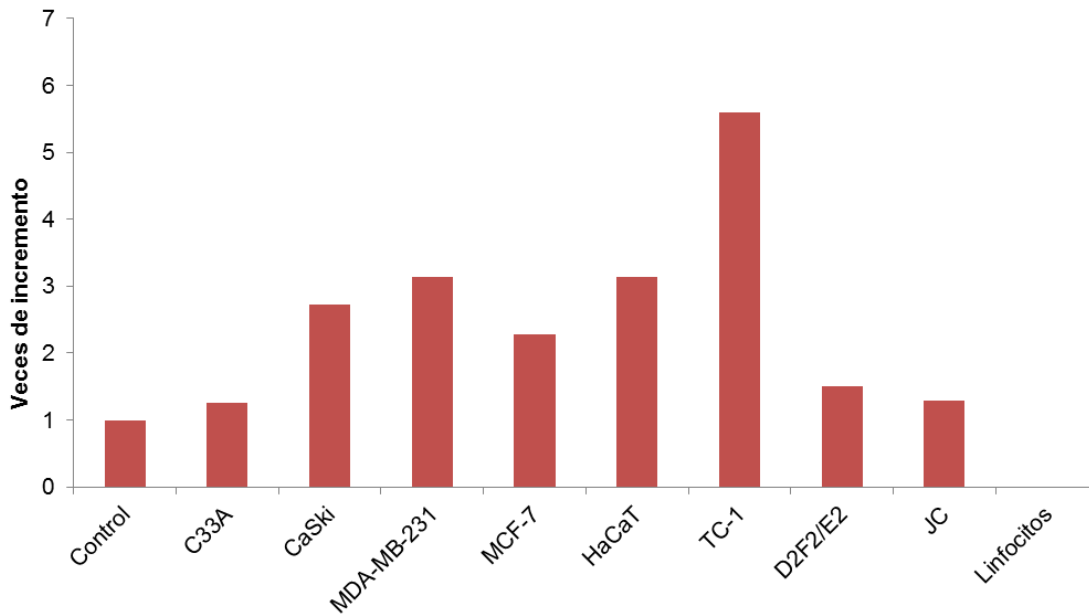


Figura 10. Expresión de la proteína Mena en líneas celulares humanas y de ratón empleando un anticuerpo comercial Anti-Mena. Las líneas celulares humanas (C33A, CaSki, HaCaT, MCF-7 y MDA-MB-231) y de ratón (D2F2/E2, JC y TC-1) así como de linfocitos T humanos fueron fijadas con paraformaldehído al 2% y posteriormente teñidas con un anticuerpo comercial Anti-Mena. Se muestra el número de veces en el incremento de la expresión de Mena relativo a la tinción realizada con un anticuerpo irrelevante de isotipo IgG. Los valores corresponden a un ensayo representativo de dos realizados de manera independiente.

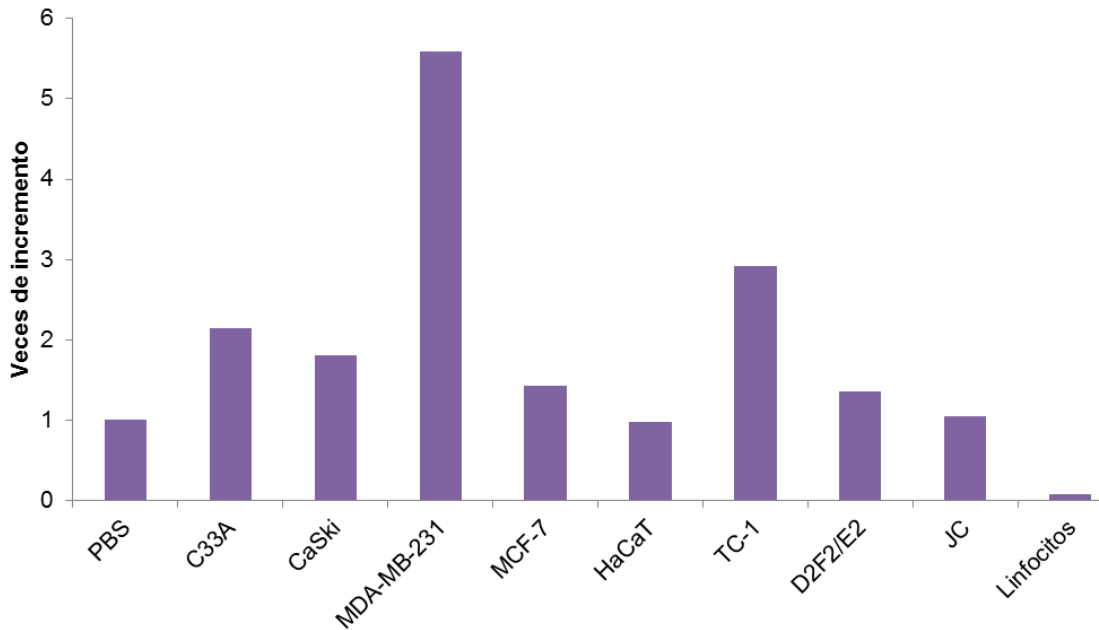


Figura 11. Expresión de la proteína Mena en líneas celulares humanas y de ratón empleando anticuerpo anti-GLMEEMSAL. Las líneas celulares humanas (C33A, CaSki, HaCaT, MCF-7 y MDA-MB-231) y de ratón (D2F2/E2, JC y TC-1) así como de linfocitos T humanos fueron fijadas con paraformaldehído al 2% y posteriormente teñidas con el anticuerpo anti-GLMEEMSAL. Se muestra el número de veces en el incremento de la expresión de Mena relativo a la tinción realizada con un anticuerpo irrelevante de isotipo IgG. Los valores corresponden a un ensayo representativo de dos realizados de manera independiente.

7. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

hMena es una proteína perteneciente a la familia Ena/VASP que se encuentra sobre expresada en células tumorales de diferente origen como de tumores mamarios (Di Modugno *et al.*, 2006), cervicales (Gurzu *et al.*, 2009), pancreáticos (Pino *et al.*, 2008), y colorectales (Philippar *et al.*, 2008). Además dicha proteína mediante splicing alternativo, genera diferentes isoformas de la proteína hMena de 570 aa que se considera la proteína en su forma nativa, las cuales son: hMena 11^a de 591 aa que es la isoforma presente en células de tipo epitelial asociada a tumores con riesgo de progresión y hMena $\Delta V6$ de 533 aa que es la isoforma expresada en células con fenotipo mesenquimal que se ha asociado con tumores con alto riesgo de metástasis. Además, actualmente las isoformas de hMena se han aceptado como AAT por lo que son indetectables en el tejido mamario normal pero si son detectadas en lesiones de mama premalignas (Di Modugno *et al.*, 2006).

Por otra parte se ha descrito que el equivalente murino de la proteína Mena humana se encuentra expresado de manera tejido específica, y se halla en

corazón, testículo, en bajos niveles en pulmón, músculo esquelético, riñón, páncreas y cerebro (base de datos UNIPROT, Q03173). A pesar de tener isoformas, no se sabe si dichas isoformas se encuentran también asociadas con el riesgo de progresión y metástasis.

Debido a la importancia de hMena y dado que se ha reportado que es posible detectar anticuerpos hacia el epítipo GLMEEMSAL de hMena en pacientes con cáncer de mama (Di Modugno *et al.*, 2004) en este trabajo se evaluó el uso del epítipo GLMEEMSAL para generar anticuerpos en ratones BALB/c.

Por lo anterior, se procedió a inmunizar ratones de la cepa BALB/c con el epítipo GLMEEMSAL y se pudo comprobar que es posible la producción de anticuerpos específicos hacia el péptido a pesar de ser una secuencia de solo 9 aminoácidos lo cual no es algo común en la generación de anticuerpos. Además, se observó que los anticuerpos específicos generados contra el péptido (anti-GLMEEMSAL) fueron capaces de reconocer a hMena en todas las líneas celulares empleadas incluyendo aquellas con expresión del equivalente murino. Hallazgo comprobado con el empleo de las líneas celulares tumorales de origen murino (D2F2/E2, TC-1, JC), la detección de la proteína fue posible debido a que GLMEEMSAL se encuentra conservado entre la estructura de la Mena humana (hMena) y su contraparte murina, además se sabe que en los ratones esta proteína posee hasta un 87% de homología con la Mena humana (base de datos UNIPROT, Q03173), compartiendo en su estructura el nonapéptido GLMEEMSAL utilizado en este trabajo.

Actualmente no se tiene reportes acerca de la expresión de la proteína Mena en líneas celulares tumorales de ratón. En este trabajo se pudo observar por citometría de flujo y por medio de tinción inmunocitoquímica que las líneas celulares tumorales murinas son positivas para la expresión de Mena. Dicho hallazgo resulta interesante porque podrían plantearse a futuro modelos murinos que permitan el estudio de los beneficios de la respuesta inmune hacia esta proteína en el desarrollo de tumores.

Todas las líneas celulares empleadas mostraron expresión diferencial de la proteína hMena tanto por citometría como por inmunocitoquímica, lo cual corrobora lo reportado por Di Modugno en 2004 y 2006 donde se muestra la expresión de alguna de las isoformas de hMena en las líneas humanas empleadas en este trabajo. Sin embargo, en este trabajo se encontró mayor incremento al utilizar el anticuerpo Anti-Mena comercial en citometría sobre todo para la línea celular C33A y HaCaT, lo anterior puede deberse a la naturaleza del antígeno empleado para la producción del anticuerpo lo cual no es especificado en el inserto, en donde solo se indica que se empleó la proteína hMena recombinante

para su elaboración. La detección de expresión de Mena en HaCaT es un hecho importante pues no hay reportes acerca de ello.

Al utilizar el suero anti-GLMEEMSAL tanto en citometría de flujo como en inmunocitoquímica, las veces de incremento con respecto al control son de 2 a 3 veces en ambas técnicas en todas las líneas empleadas lo cual es comparable con lo observado en la tinción inmunocitoquímica usando Anti-Mena. Sin embargo, los resultados obtenidos en las líneas celulares marcadas con el anticuerpo Anti-Mena en citometría de flujo muestran incrementos mayores para algunas de las líneas y en otras como HaCaT y los linfocitos arroja un falso positivo de expresión, lo cual podría deberse a que dicho anticuerpo solo está diseñado para su uso en inmunocitoquímica.

Al analizar las tinciones inmunocitoquímicas se logró observar que en aquellas líneas celulares con mayor positividad a la tinción con el anticuerpo Anti-Mena (C33A y HaCaT) se teñía todo el citoplasma, a diferencia del suero anti-GLMEEMSAL que parece ser una tinción más localizada encontrándose tinción perinuclear o en uno de los polos del núcleo y en ciertas prolongaciones celulares, lo cual pudo contribuir a que al realizar el análisis con el software arrojara un valor más alto de ITE.

En este estudio se utilizaron linfocitos humanos como control negativo de expresión de hMena, ya que Coppolino y colaboradores en el 2001 reportaron que mientras se carezca de una estimulación, éstas células no expresan ninguna de las proteínas de la familia Ena/VASP a la cual pertenece hMena (Coppolino *et al.*, 2001). Lo anterior se pudo comprobar ya que no solo se pudo encontrar expresión al emplear el anticuerpo Anti-Mena en citometría observándose 1.5 veces de incremento con respecto al control negativo de tinción aunque, como ya se explicó esta detección puede deberse a que el anticuerpo no está diseñado para su uso en citometría de flujo ya que en la tinción inmunocitoquímica la reactividad es nula.

Por otro lado, las diferencias entre la detección de la proteína Mena dadas por el suero anti-GLMEEMSAL y el anticuerpo comercial Anti-Mena, podrían deberse a la afinidad de los anticuerpos secundarios utilizados en las técnicas. Porque el suero obtenido es policlonal, por lo tanto no sólo existen IgG's por lo que la presencia de otro tipo de inmunoglobulinas podría estar afectando la detección, lo cual puede generar inespecificidad. Es necesario purificar el suero para aislar los anticuerpos específicos a GLMEEMSAL.

Con base a los resultados obtenidos los anticuerpos contra GLMEEMSAL podrían ser de gran utilidad para la detección de hMena, varios grupos de investigación han detectado las isoformas de la proteína en líneas celulares de cáncer y en

tejidos tumorales de pacientes mediante técnicas como tinción inmunohistoquímica, Western Blot e Inmunofluorescencia (Oudin *et al.*, 2017; Weidmann *et al.*, 2016; Di Modugno *et al.*, 2007; Gurzu *et al.*, 2013; Pino *et al.*, 2008) utilizando anticuerpos comerciales Anti-Mena en conjunto con anticuerpos específicos para una isoforma, el anticuerpo evaluado en este trabajo ha demostrado que puede ser empleado en 2 distintas técnicas con la misma especificidad lo cual no ocurre al emplear el anticuerpo Anti-Mena, por lo que facilitaría la detección.

Dado que se ha relacionado a la proteína hMena con la existencia de un riesgo de padecer metástasis, su detección se vuelve fundamental para predecir dicho riesgo. De tal manera que llevándolo a un grado de aplicación en pacientes oncológicos, y en conjunto con otras pruebas, toma suma relevancia pues permitiría dar prioridad a pacientes con mayor riesgo de diseminación de la enfermedad.

Este trabajo, es clave para estudios posteriores en donde se pretenda desarrollar técnicas rápidas y de fácil detección del riesgo de metástasis, no solo en pacientes con CaMa y CaCu sino en pacientes con otras neoplasias como cáncer pancreático, cáncer colorectal en donde también la proteína hMena se ha visto sobre expresada.

8. CONCLUSIONES

Es posible generar una respuesta inmune mediada por anticuerpos usando un esquema de inmunización con el péptido GLMEEMSAL de hMena en ratones de la cepa BALB/c.

Los anticuerpos generados (anti-GLMEEMSAL) tienen capacidad de detectar a la proteína Mena en líneas celulares de diferente origen mediante citometría de flujo.

Los anticuerpos anti-GLMEEMSAL pueden reconocer a Mena por tinción inmunocitoquímica de manera diferencial de acuerdo al grado de sobre expresión de la proteína en las líneas celulares.

Los anticuerpos anti-GLMEEMSAL pueden reconocer la proteína hMena mediante 2 técnicas distintas con una especificidad similar.

Se logró determinar la expresión de Mena en líneas tumorales murinas con el uso de los anticuerpos generados.

9. PERSPECTIVAS

Dado los resultados obtenidos en este trabajo, se pretende proponer un modelo de estudio en ratones BALB/c para ver los beneficios profilácticos y terapéuticos de la inmunización con el péptido GLMEEMSAL en la respuesta inmune contra tumores, debido al hallazgo de que las líneas celulares tumorales de ratón D2F2/E2, TC-1 y JC son positivas para la expresión de la proteína Mena.

Por otro lado, es importante dar continuidad a este proyecto realizando tinciones por inmunofluorescencia usando el suero anti-GLMEEMSAL, con el fin de corroborar la localización de la proteína Mena en las líneas celulares, lo cual sería de utilidad porque de ser posible la detección por esta técnica, se podría usar junto con otras pruebas, para identificar a hMena en células de pacientes con cáncer y predecir el riesgo de metástasis y progresión de la enfermedad. Además, será importante realizar ensayos de Western Blot con el fin de determinar en las líneas celulares tumorales murinas expresión de isoformas de la proteína Mena.

10. APÉNDICE DE PREPARACIÓN DE REACTIVOS

Preparación de RPMI

1800 ml de agua mili-Q en una probeta de 2 L, adicionar dos frascos de reactivo para medio de cultivo RPMI (Sigma, USA) manteniendo en agitación hasta que se disuelva y posteriormente añadir 4 g de bicarbonato de sodio hasta que se logre una mezcla homogénea. Aforar a dos litros con agua mili-Q. Ajustar el pH a 7.2-7.3 con ayuda de Ácido Clorhídrico HCl o NaOH.

Filtrar en condiciones de esterilidad y añadir al medio antibiótico (5 ml por cada 500 ml de medio).

Preparación de medio para linfocitos IMDM

Disolver un frasco de medio Iscoves modified Dubelcco's (Sigma, USA) en 800 ml de agua mili-Q y agregar 3 g de NaHCO₃ manteniendo en agitación. Ajustar a pH de 7.3. Aforar a 1 L. Luego de filtrar el medio, agregar antibióticos. Posteriormente, agregar suero inactivado humano al 10%. Finalmente suplementar con 500 µl de piruvato de sodio (100 X), 500 µl de aminoácidos no esenciales (100X) y 50 µl de 2- mercaptoetanol (100 X).

Preparación de solución amortiguadora de fosfatos (PBS)

8 g de Cloruro de sodio

0.2 g de cloruro de potasio

0.2 g de fosfato de potasio monobásico

Se afora en un litro de agua Milli-Q y se ajusta a un pH de 7.2 con fosfato de sodio dibásico.

Preparación de Rinse Buffer 1X para 50 ml

2.5 ml de Rinse Buffer 20X (Millipore, USA)

47.5 ml agua destilada

50 µl tween 20

Preparación de reactivo cromógeno:

12 µl de cromógeno A.

288 µl de cromógeno B.

Mezclar el cromógeno A con el cromógeno B en un tubo ámbar.

Preparación de verseno (para 2L)

Tris base 6.88 g

16 g NaCl

0.8 g KCl

0.4 g EDTA

Ajustar pH a 7.7

Preparación de tripsina

Pesar 0.25 g de tripsina y disolver en 50 ml de PBS estéril. Filtrar la solución.

Luego, realizar una dilución de tripsina para obtener una proporción de tripsina-verseno 1:5

BSA al 5%

0.5 g de BSA disuelta en 10 ml de agua mili-Q

Preparación de Paraformaldehído al 2%

En un frasco se agregan 200 ml de agua mili-Q caliente a 60°C y se agregan 5 g de paraformaldehído y de ahí se va aplicando gotas de NaOH. Se agita vigorosamente hasta que esté disuelto, y después se agregan 25 ml de PBS 10X y se afora a 250 ml.

Buffer de carbonato-Bicarbonato

Solución A: Carbonato de sodio 0.1 M (5.29 g / 500 ml H₂O)

Solución B: Bicarbonato de sodio 0.1 M (4.2 g / 500 ml H₂O)

Adicionar solución A en la solución B. Ajustar pH a 9.6

11. BIBLIOGRAFÍA

- Abbas K., Litchman A. 2005. General Proprieties of Immune Responses. Cellular and Molecular Immunology Fifth Edition USA Elsevier Science, Chapter 14 ; pp. 318-344
- Actor. 2013. Introductory Immunology. Elsevier Science, Chapter 3; pp. 28-41
- Bachmann C., Fischer L., Walter U., Reinhard M. 1999. The EVH2 domain of the vasodilator stimulated phosphoprotein mediates tetramerization, F-actin binding, and actin bundle formation. Biol Chem 274:23549–23557.
- Barcenilla H., Prieto A., Monserrat J. *et al.*, 2009. Respuesta inmune específica. Medicine; 28:1868-1879.
- Brooks G., Carroll C., Butel S., Morse A. 2008. Microbiología medica de Jawetz, Melnick y Adelberg. 19ª. Edición. Editorial El Manual Moderno;145-146
- Castellanos R., Guevara M., Robinson R. & Vázquez L. 2000. Respuestas inmunes innatas y adaptativas. MEDISAN; 4:64-74
- Cavallo F., Astolfi A., Iezzi M. *et al.* 2005. An integrated approach of immunogenomics and bioinformatics to identify new Tumor Associated Antigens (TAA) for mammary cancer immunological prevention. BMC Bioinformatics; 6:7
- Chabalgoity J., Pereira M., Rial J. 2008. Inmunidad contra agentes infecciosos. Temas de bacteriología y virología médica. Pág. 100
- Chereau D., Dominguez R. 2006. Understanding the role of the G-actin binding domain of Ena/VASP in actin assembly. Struct Biol; 155:195-201.
- Coppolino M., Krause M., Hagendorff P. *et al.* 2001. Evidence for a molecular complex consisting of Fyb/SLAP, SLP-76, Nck, VASP and WASP that links the actin cytoskeleton to Fcg receptor signalling during phagocytosis. Cell Sci; 114:4307-4318
- Criscitiello C. 2012. Tumor-Associated Antigens in Breast Cancer. Breast Care; 7: 262–266
- Crisp S., Kullmann D. & Vincent A. 2016. Autoimmune synaptopathies. Nature Reviews Neuroscience; 17:103-117.
- Curigliano G, Locatelli M, Fumagalli L, Goldhirsch A. 2009. Immunizing against breast cancer: a new swing for an old sword. Breast; 18:51–54.
- Di Modugno F., Bronzi G., Scanlan M., *et al.* 2004. Human Mena protein, a serex-defined antigen overexpressed in breast cancer eliciting both humoral and CD8+ T-cell immune response. Int J Cancer; 109:909–918.
- Di Modugno F., DeMonte L., Balsamo M. *et al.* 2007. Molecular cloning of hMena (ENAH) and its splice variant hMena+11a: epidermal growth factor increases their expression and stimulates hMena+11a phosphorylation in breast cancer cell lines. Cancer Res; 67:2657-2665.

- Di Modugno F., Mottolese M., Di Benedetto A. *et al.* 2006. The cytoskeleton regulatory protein hMena (ENAH) is overexpressed in human benign breast lesions with high risk of transformation and human epidermal growth factor receptor-2–positive/hormonal receptor–negative tumors. *Clin Cancer Res*; 12:1470–1478.
- Entenberg D., Wyckoff J., Gligorijevic B., *et al.* 2011 Setup and use of a two-laser multiphoton microscope for multichannel intravital fluorescence imaging. *Nat Protoc*; 6:1500–1520.
- Fearon D. and Locksley R. 1996. The instructive role of innate immunity in the acquired immune response. *Science*; 272: 50-54.
- Ferlay J., Soerjomataram I., Ervik M., Dikshit R., Eser S., Mathers C., Rebelo M., Parkin D., Forman D., Bray F. GLOBOCAN 2012 v1.0, Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC CancerBase No. 11 [Internet]. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer; 2013. Disponible en: <http://globocan.iarc.fr>. Consultado el 20 / julio / 2017.
- Friedl P. and Wolf K. 2003. Tumour-cell invasion and migration: diversity and escape mechanisms. *Nat Rev Cancer* 3: 362-374.
- Geisberger R, Lamers M, Achatz G. 2006. The riddle of the dual expression of IgM and IgD. *Immunology*; 118:429-437.
- Gertler F & Condeelis J. 2011. Metastasis: tumor cells becoming MENAcing. *Trends Cell Biol*; 21:81–90.
- Gertler F. and Condeelis J. 2011. Metastasis: Tumor cells becoming MENAcing. *Trends Cell Biol*; 21:81–90.
- Gertler F., Bennett R., Clark M. and Hoffmann F. 1989. Drosophila abl tyrosine kinase in embryonic CNS axons: a role in axonogenesis is revealed through dosage-sensitive interactions with disabled. *Cell*; 58:101-113.
- Gertler F., Comer A., Juang J. *et al.* 1995. Enabled, a dosage-sensitive suppressor of mutations in the Drosophila Abl tyrosine kinase encodes an Abl substrate with SH3domain-binding properties. *Genes Dev*; 9: 521–533.
- Gertler F., Doctor J. and Hoffmann F. 1990. Genetic suppression of mutations in the Drosophila Abl proto oncogene homolog, *Science*; 248:857-860.
- Gertler F., Niebuhr K., Reinhard M. *et al.* 1996. Mena, a relative of VASP and Drosophila Enabled, is implicated in the control of microfilaments dynamics. *Cell*; 87:227-239.
- Goswami S., Philippar U., Sun D., *et al.* 2009. Identification of invasion specific splice variants of the cytoskeletal protein Mena present in mammary tumor cells during invasion in vivo. *Clin Exp Metastasis*; 26:153–159.
- Guevara M., Castellanos R., Robinson R. and Vázquez L. 2002. El Sistema Inmune en los estados de salud y enfermedad. *MEDISAN*; 6:60-68.

- Gurzu S., Jung I., Prantner I. et al. 2009. The immunohistochemical aspects of protein Mena in cervical lesions. *Morphol and Embryol*;50: 213-216
- Halbrugge M. and Walter U. 1989. Purification of vasodilator regulated-phosphoprotein from human platelets. *Eur J Biochem*; 185:41-50.
- Hangartner L., Zinkernagel R. and Hengartner H. 2006. Antiviral antibody responses: the two extremes of a wide spectrum. *Nat Rev Immunol*; 6:231-243.
- Harbeck B., Huttelmaier S., Schluter K. et al. 2000. Phosphorylation of the vasodilator-stimulated phosphoprotein regulates its interaction with actin. *J Biol Chem*; 275:30817-30825.
- Hughes S., Oudin M., Tadros J., et al. 2015. PTP1B-dependent regulation of receptor tyrosine kinase signaling by the actin-binding protein Mena. *Mol Biol Cell*; 26:3867–3878.
- Huttelmaier S., Harbeck B., Steffens O. et al. 1999. Characterization of the actin binding properties of the vasodilator-stimulated phosphoprotein VASP. *FEBS Lett*; 451:68-74.
- Janeway C., Travers P., Walport M., and Shlomchik M. 2001. *Immunobiology*. 5th edition. Garland Science. New York
- Joller N., Weber S. and Oxenius A. 2011. Antibody-Fc receptor interactions in protection against intracellular pathogens. *Eur J Immunol*; 41:889-897.
- Krause M., Dent E., Bear J. 2003. Ena/VASP proteins: regulators of the actin cytoskeleton and cell migration. *Annu Rev Cell Dev Biol*; 19: 541-564.
- Kwiatkowski A., Gertler F. and Loureiro J. 2003. Function and regulation of Ena/VASP proteins. *Trends Cell Biol*; 13: 386-392.
- Lambrechts A, Kwiatkowski A, Lanier L. et al. 2000. cAMP-dependent protein kinase phosphorylation of EVL, a Mena/VASP relative, regulates its interaction with actin and SH3 domains. *J Biol Chem* 275:36143–36151.
- Lanier L., Gates M., Witke W. et al. 1999. Mena is required for neurulation and commissure formation. *Neuron*; 22: 313-325.
- Liébana J. 2002. *Microbiología oral*. 2a edición. Editorial Mc Graw Hill Interamericana. 159-160.
- Limachi N. Inmunidad celular. *Rev. Act. Clin. Med.* 2011. Vol.13 pp. 649-653. Disponible en: http://www.revistasbolivianas.org.bo/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2304-37682011001000004&lng=es&nrm=iso
- Lin K., Guarnieri F., Staveley K., et al. 1996. Treatment of established tumors with a novel vaccine that enhances major histocompatibility class II presentation of tumor antigen. *Cancer Research*; 56: 21-26.
- Lucas, S. & Coulie, P. 2008. About human tumor antigens to be used in immunotherapy. *Semin. Immunol*; 20: 301–307 139.

- Merlo L. and Mandik L. 2013. Adaptive immunity: B Cells and Antibodies. Cancer immunotherapy. Second edition. 25-40.
- Murray R., Rosenthal S., Kobayashi S., Pfaller A. 2002. Microbiología médica. 4a edición. Editorial Elsevier. 111-113, 132-133.
- Nicholson L. 2016. The immune system. Essays in Biochemistry; 60: 275-301.
- Nussbaum A., Kuttler C., Haderer K. *et al.* 2001. PProC: a prediction algorithm for proteasomal cleavages available on the WWW. Immunogenetics; 53: 87-94
- OMS. 2014. Perfil oncológico de los países. Consultada el 3 de junio de 2017. Disponible en: <http://www.who.int/cancer/country-profiles/es/>
- OMS. 2017. Nota descriptiva: cáncer. Consultada el 3 de junio de 2017. Disponible en: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/es>
- Oudin M., Barbier L., Schäfer C. *et al.* 2017. MENA Confers Resistance to Paclitaxel in Triple-Negative Breast Cancer. Mol Cancer Ther; 16:143-155.
- Parham P. 2005. Inmunología. Editorial Médica Panamericana. Segunda edición. Madrid, España. Pág. 175
- Parker K., Bednarek M and Coligan J. 1994. Scheme for ranking potential HLA-A2 binding peptides based on independent binding of individual peptide sidechains. J Immunol; 152:163-175
- Parmiani G., De Filippo A., Novellino L., Castelli C. 2007. Unique human tumor antigens: immunobiology and use in clinical trials. J Immunol; 178: 1975–1979.
- Parmiani G., Russo V., Marrari A. *et al.*, 2007. Universal and stemness-related tumor antigens: potential use in cancer immunotherapy. Clin Cancer Res; 13: 5675–5679.
- Patsialou A., Bravo J., Wang Y., *et al.* 2013. Intravital multiphoton imaging reveals multicellular streaming as a crucial component of in vivo cell migration in human breast tumors. Intravital; 2:e25294.
- Philipp U., Roussos E., Oser M., *et al.* 2008. A Mena invasion isoform potentiates EGF-induced carcinoma cell invasion and metastasis. Dev Cell; 15:813–828.
- Pino M., Balsamo M., Di Modugno F. *et al.* 2008. Human Mena+11a isoform serves as a marker of epithelial phenotype and sensitivity to epidermal growth factor receptor inhibition in human pancreatic cancer cell lines. Clin Cancer Res; 14:4943–4950.
- Pula G. and Krause M. 2008. Role of Ena/VASP Proteins in Homeostasis and Disease. E. Klussmann, J. Scott (eds.) *Protein–Protein Interactions as New Drug Targets*. 39 Handbook of Experimental Pharmacology 186, © Springer-Verlag Berlin Heidelberg
- Rammensee H., Bachmann J. and Emmerich N. 1999. SYFPEITHI: database for MHC ligands and peptide motifs. Immunogenetics; 50: 213-219

- Reinhard M, Giehl K, Abel K. *et al.* 1995. The proline-rich focal adhesion and microfilament protein VASP is a ligand for profilins. *Embo J*; 14:1583–1589.
- Reinhard M., Halbrügge M., Scheer U. *et al.* 1992. The 46/50 kDa phosphoprotein VASP purified from human platelets is a novel protein associated with actin filaments and focal contacts. *EMBO J*; 11:2063-2070.
- Rojas W. 2005. *Inmunología*. 13a edición. Editorial CIB.
- Sarmiento L. 2015. Antígenos asociados a tumores y su potencial uso en el tratamiento del cáncer. *Revista Científica Salud Uninorte*; 31: 119-138.
- Schroeder H., Cavacini L. 2010. Structure and function of immunoglobulins. *Allergy Clin Immunol*; 125:41-52.
- Scott A. *et al.* 2000. Construction, production, and characterization of humanized anti-Lewis Y monoclonal antibody 3S193 for targeted immunotherapy of solid tumors. *Cancer Res*; 60: 3254–3261.
- Seliger B., Cabrera T., Garrido F. and Ferrone S. 2002. HLA class I antigen abnormalities and immune escape by malignant cells. *Sem. Cancer Biol*; 12: 3-13.
- Theriot J., Rosenblatt J., Portnoy D. *et al.* 1994. Involvement of profilin in the actin-based motility of *L. monocytogenes* in cells and in cell-free extracts. *Cell*; 76:505-517.
- Toche P. 2012. Visión panorámica del Sistema Inmune. *Rev Med Clin Las Condes*; 23: 446-457
- Vega G. 2008. La respuesta inmune. *Rev Fac Med UNAM*; 5:128-129
- Walders B., Khaitlina Y., Hinssen H. *et al.* 2002. The vasodilator-stimulated phosphoprotein promotes actin polymerisation through direct binding to monomeric actin. *FEBS LETTERS*; 529: 275-280.
- Wang W., Goswami S., Lapidus K. *et al.* 2004. Identification and testing of a gene expression signature of invasive carcinoma cells within primary mammary tumors. *Cancer Res*; 64: 8585-8594.
- Wang W., Goswami S., Sahai E. *et al.* 2005. Tumor cells caught in the act of invading: their strategy for enhanced cell motility. *Trends Cell Biol*; 15: 138-145.
- Weidmann M., Surve C., Eddy R. *et al.* 2016. MenalNV dysregulates cortactin phosphorylation to promote invadopodium maturation. *Sci Rep*; 6:36-42
- Zaldívar M. 2002. El sistema inmunológico de las mucosas. *Rev Cubana Med Gen Integr*; 18: 352-354