



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

FACULTAD DE MEDICINA

BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

**EVALUACION DEL EFECTO ANTITUMORAL DE VACUNAS BASADAS EN
BIBLIOTECAS DE EPITOPOS VARIABLES EN EL MODELO DE GLIOBLASTOMA RG2**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

PRESENTA:

LÓPEZ MEJÍA MARIANA

TUTOR PRINCIPAL DE TESIS: DR. BENJAMÍN PINEDA OLVERA

LABORATORIO DE NEUROINMUNOLOGÍA, INNN

COTUTOR DE TESIS: DR. KAREN MANOUTCHARIAN AIRAPETIAN

INSTITUTO DE CIENCIAS BIOMÉDICAS, UNAM

COMITÉ TUTOR: DR. ANDRÉS ELIÚ CASTELL RODRÍGUEZ

FACULTAD DE MEDICINA, UNAM.

CD. MX., MAYO, 2018



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



OFICIO CPCB/313/2018

Asunto: Oficio de Jurado para Examen de Grado

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

Me permito informar a usted que el Subcomité de Biología Experimental y Biomedicina del Posgrado en Ciencias Biológicas, en su sesión ordinaria del día 06 de noviembre de 2017, aprobó el siguiente jurado para la presentación del examen para obtener el grado de **MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS** de la alumna **LÓPEZ MEJÍA MARIANA** con número de cuenta **306207220**, con la tesis titulada **"EVALUACION DEL EFECTO ANTITUMORAL DE VACUNAS BASADAS EN BIBLIOTECAS DE EPITOPOS VARIABLES EN EL MODELO DE GLIOBLASTOMA RG2"**, realizada bajo la dirección del **DR. BENJAMÍN PINEDA OLVERA**:

Presidente: DRA. MARCELA LIZANO SOBERÓN
Vocal: DR. ALEJANDRO MANUEL GARCÍA CARRANCÁ
Secretario: DR. KAREN MANOUTCHARIAN AIRAPETIAN
Suplente: DR. EZEQUIEL MOISÉS FUENTES PANANÁ
Suplente: DR. ANDRÉS ELIÚ CASTELL RODRÍGUEZ

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

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"
Cd. Universitaria, Cd, Mx., a 16 de abril de 2018


DR. ADOLFO GERARDO NAVARRO SIGÜENZA
COORDINADOR DEL PROGRAMA



AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional Autónoma de México y en especial al Posgrado en Ciencias Biológicas, por permitirme adquirir nuevos conocimientos y brindarme la oportunidad de cursar este posgrado.

Agradezco al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca otorgada para el desarrollo del presente trabajo y por brindar el apoyo para realizar mis estudios. CVU 693718

Al CONACyT por el financiamiento otorgado para la realización de mi tesis, proyecto CB180851 y FOSISS 262010

Al Dr. Benjamín Pineda Olvera por permitirme trabajar en su laboratorio, y apoyarme con sus conocimientos.

Al Dr. Karen Manoutcharian por guiar el desarrollo del proyecto y brindar su apoyo y conocimientos.

Al Dr. Andrés Eliú Castell por aportar ideas valiosas al proyecto y brindar su apoyo durante su realización del mismo,

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a mi madre, por creer en mí siempre, y por ser mi apoyo incondicional.

A Dan y a Poly por el enorme apoyo que representan.

A mis familiares, por estar en esta ocasión apoyándome.

A la M. en C. María Elena Munguía Zamudio por brindarme los conocimientos técnicos requeridos para la realización de este proyecto, y auxiliarme durante el desarrollo del mismo.

A la Dra Roxana Magaña por capacitarme en técnicas requeridas para el desarrollo de este proyecto y brindarme su amistad.

A la Dra Patricia Guevara, a la Dra. Guadalupe Palencia y a la Dra. Esperanza, por ayudarme aportando valiosas observaciones consejos y asesorarme en varias técnicas además de hacer de mi estancia en el laboratorio un tiempo memorable.

A la Dra. Margarita Chavarin por ayudarme capacitándome en las técnicas de histopatología.

A los miembros del jurado la Dra. Marcela Lizano Soberón, el Dr. Ezequiel Moisés Fuentes Pananá y el Dr. Alejandro Manuel García Carrancá, por las correcciones y observaciones dadas para la realización de esta tesis,

A mis amigas de toda la vida, Beatriz y Alejandra por su cariño incondicional.

A Caleb por brindarme un respiro cuando más lo necesitaba.

A la Biol. Paulina Díaz juntas comenzamos la maestría y fue un gusto contar con su apoyo durante el proceso.

ÍNDICE

RESUMEN	1
ABSTRACT	3
MARCO TEÓRICO	4
CÁNCER.....	4
EPIDEMIOLOGÍA DEL CÁNCER	4
GENERALIDADES DEL CÁNCER.....	5
GLIOMAS	8
GLIOBLASTOMA	9
RESPUESTA INMUNE.....	11
INMUNOTERAPIA	13
VACUNAS DE EPÍTOPOS VARIABLES.....	14
DESPLIEGUE EN FAGO.....	15
ANTÍGENOS	18
HER-2.....	18
ANTECEDENTES	21
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	25
HIPÓTESIS.....	26
OBJETIVO GENERAL.....	26
OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	26
METODOLOGÍA.....	27
RESULTADOS	34
DISCUSIÓN	42
CONCLUSIONES	43
LITERATURA CITADA.....	44

RESUMEN

Los Gliomas son tumores cerebrales que se originan de células de la glía, y disminuyen la calidad de vida y el tiempo de vida de los pacientes que no supera los 16 meses con el tratamiento que se encuentra disponible actualmente; además de que éste tiene considerables efectos secundarios. Por otro lado se sabe que la respuesta inmune es capaz de eliminar a las células tumorales de manera selectiva, por ello la inmunoterapia se presenta como una alternativa de tratamiento.

En el presente trabajo se usó una novedosa herramienta para la expresión de antígenos tumorales denominada Biblioteca de Epítomos Variables (BEV) que consiste en el uso de bibliotecas derivadas de epítomos inmunodominantes de componentes de las células tumorales, los cuales son mutados en sitios específicos de forma aleatoria, y tienen la cualidad de producir una respuesta inmune efectiva y duradera.

Para este proyecto, se produjeron 2 epítomos (Nominal y biblioteca) derivados de moléculas del receptor del factor de crecimiento epidermal 2 (HER-2) y se evaluó el efecto antitumoral en el modelo intracerebral de glioblastoma RG2 *in vivo*, reflejado como un aumento en la sobrevida de los ratones XXX. Para ello, se implantaron de manera intracerebral 1×10^6 células de glioma RG2 en un volumen de 10 μ L, en 50 ratas divididas aleatoriamente en 5 grupos, para ser vacunadas cuatro días después del implante, de acuerdo con el siguiente esquema: 1) con (BEV) de HER-2 de forma subcutánea 2) Nominal de HER-2 de forma subcutánea 3) (BEV) de HER-2 de forma intravenosa. 4) Nominal de HER-2 de forma intravenosa. 5) grupo control sin vacuna. Se determinó la sobrevida de cada grupo y se realizó el análisis de Kaplan Meier mediante el programa SPSS v 10, seguido de un análisis ANOVA de una sola vía realizado en el programa R.

Se observó un incremento en la sobrevida de los grupos vacunados, el cual fue significativo con respecto al control. Este aumento tuvo una tendencia a ser más efectivo en los grupos tratados con la biblioteca con respecto al nominal. El experimento se repitió 3 veces manteniendo la misma distribución.

Se puede concluir que la vacunación con BEV aumenta el tiempo de supervivencia lo cual es importante, ya que es uno de los problemas más comunes que presentan los pacientes con glioma. Se plantea el uso de estas vacunas como una posible alternativa de tratamiento y se propone evaluar la respuesta inmune involucrada con este efecto, en experimentos subsiguientes.

ABSTRACT

Gliomas are brain tumors whose origin is the glia cells. Neoplastic gliomas decrease the quality of life and the survival time of patients, which does not exceed 16 months with the treatment currently available. Thus, the treatment regimen is ineffective and it has considerable side effects. On the other hand immune response is known to be able to eliminate tumor cells selectively, decreasing side effects, so immunotherapy is presented as an alternative treatment. A new methodology to generate cancer antigens for immunotherapy is available, the Variable Epitope Libraries (VELs), which are libraries derived from immunodominant epitopes from components of tumor cells mutated at specific sites randomly. VELs have the capacity to produce effective and lasting immune response.

In the present study, we produced two epitopes (nominal and library) derived from epidermal growth factor receptor 2 (HER-2) molecules, and evaluated *in vivo* the antitumor effect reflected in the increase of survival in rats xenotransplanted with a glioblastoma cell line. For this purpose, we implanted 50 rats intracerebrally with 1×10^6 RG2 glioma cells and randomly divided them into five groups that were vaccinated four days after implantation according to the following scheme: 1) with (VEL) of HER-2 subcutaneously, 2) nominal HER-2 subcutaneously 3) (VEL) of HER-2 intravenously, 4) HER-2 nominal intravenously, And 5) control group without vaccine. The survival of each group was determined, and the Kaplan Meier analysis was performed using the SPSS v 10 program, followed by a one-way ANOVA analysis performed in program R, finding that there was a significant increased survival in the vaccinated groups. This increase has a tendency to be more effective in the groups treated with the library with respect to the nominal HER-2. We conclude that vaccination with VEL increases survival time and we propose the use of these VELs as a possible alternative treatment to gliomas.

MARCO TEÓRICO

CÁNCER

El cáncer designa a una serie de enfermedades que comparten características en común, según la OMS (Organización Mundial de la Salud) es la enfermedad crónico-degenerativa más frecuente en adultos. Su aparición está relacionada con múltiples factores como son la exposición a agentes biológicos, químicos o físicos capaces de inducir alteraciones genéticas o epigenéticas. En un pequeño porcentaje de los casos estas alteraciones son heredadas. El cáncer se caracteriza porque las células presentan una proliferación desregulada, incrementan la capacidad de guiar mecanismos de angiogénesis, evaden la apoptosis y son insensibles a las señales que regulan el ciclo celular [Hanahan, D., Weinberg, R. A. 2011; OMS 2014].

EPIDEMIOLOGÍA DEL CÁNCER

El cáncer es la segunda causa de morbilidad y mortalidad en el mundo, se registraron alrededor de 14 millones de nuevos casos en el año 2012 y se prevé que el número de nuevos casos aumente en un 70% durante las siguientes dos décadas. El cáncer fue responsable de 8,8 millones de muertes en 2015, casi 1 de cada 6 muertes son debido al cáncer, los tipos de cáncer que se presentan con mayor frecuencia son: cáncer de pulmón (1,69 millones de muertes), hígado (788 000 muertes), colorrectal (774 000 muertes), estómago (754 000 muertes) y mama (571 000 muertes) [National Cancer Foundation, OMS 2014].

GENERALIDADES DEL CÁNCER

El cáncer es una enfermedad que incluye cambios en el genoma de células somáticas se caracteriza por presentar una o más mutaciones y o modificaciones epigenéticas, las cuales le confieren características generales. Estas mutaciones suelen darse en genes que confieren ganancias funcionales para la célula y están en su mayoría relacionados con procesos de proliferación y diferenciación celular, estos genes se denominan protooncogenes, y una vez que sufren una mutación son llamados oncogenes. O bien, las mutaciones se dan en genes que regulan el ciclo celular llamados genes supresores, lo que da como resultado un patrón de metilación alterado en numerosas regiones promotoras de genes supresores de tumor, donde una hipermetilación puede estar relacionada con el silenciamiento transcripcional de genes. [Jones, P.2002].

Otra de las características que comparten las células cancerosas y está relacionada con la presencia de oncogenes es la proliferación sostenida, esto se refiere a la adquisición por parte de las células cancerosas de autosuficiencia en cuanto a las señales de crecimiento. Hay tres mecanismos principales mediante los cuales las células cancerosas logran esta autosuficiencia. Uno es mediante la fabricación de sus propios factores de crecimiento logrando una estimulación autócrina. Las células cancerosas también son capaces de estimular a las células del estroma para que generen señales de crecimiento, y finalmente se pueden activar de manera constitutiva los mecanismos que guían la proliferación a manera de que no dependan de la estimulación de factores de crecimiento [Negrini, S., 2010] [Vermeulen, K 2003].

Las células cancerosas tienen como característica la insensibilidad a las señales que inhiben el crecimiento. De manera fisiológica mediante señales inhibitorias las células pueden ser llevadas a la fase G0 del ciclo celular entrando en un estado quiescente, un estado de quiescencia les permite recuperar su capacidad proliferativa en un futuro, o bien las señales inhibitorias pueden llevar a un estado de diferenciación a la célula donde ésta pierda la capacidad de proliferar de forma irreversible. Las células cancerosas son insensibles a los factores que regulan a una célula sana [Daniel S., 2013]. La disponibilidad de factores de crecimiento y señales de supervivencia, así como la interacción de las células con la matriz extracelular y otras células aledañas, son factores que regulan el crecimiento y supervivencia de las células. Por su parte, las células tumorales pueden sufrir modificaciones en los receptores, o en las vías de señalización implicadas en estos procesos [Vermeulen, K 2003].

Las células tumorales aumentan rápidamente en volumen debido al radio de proliferación y la insensibilidad a las señales de inhibición. Sumado a estos factores, está la capacidad de las células tumorales para evadir la muerte celular. Esta muerte fisiológica denominada apoptosis, es un proceso que mantiene la homeostasis de los tejidos. Comienza con la disrupción de la membrana plasmática y culmina con la fagocitosis de los componentes celulares por parte de las células vecinas [Potten C.2005]. Las células sanas tienen sensores intracelulares o intrínsecos y extracelulares o extrínsecos, que permiten sentir si la célula se encuentra viable y si no hay señales externas que guíen a la célula a iniciar el proceso de apoptosis. De existir estas señales, se activan las proteínas efectoras que como tal, llevan a cabo la muerte celular. Por su parte, las vías intrínseca y extrínseca convergen en la mitocondria, donde un cambio en el balance entre proteínas de la familia Bcl-2 pro-apoptóticas como son Bax Bak y las

anti-apoptóticas como Bcl-2 y Bcl-XL determinan la muerte celular. Las células tumorales tienen diversos mecanismos por los cuales inhiben la muerte celular como mutaciones en los receptores, en los componentes de las vías de apoptosis, o directamente en las proteínas de la familia Bcl-2 [Hanahan, D.2002].

Las células tumorales además adquieren un potencial de replicación ilimitado. Las células sanas tienen un número de replications limitadas y una vez que llegan a este punto, entran a un estado donde cesa la división celular de forma irreversible. El acortamiento de los extremos de los cromosomas denominados telómeros, es clave en el número de divisiones que puede tener una célula. Los telómeros cuentan con una serie de secuencias de nucleótidos repetitivas las cuales se van acortando con cada división celular. La división celular cesa antes de que se terminen los telómeros y la célula comience a adquirir mutaciones lo que la puede volver cancerosa. En las células tumorales se encuentra activa la enzima telomerasa, la cual adiciona de manera activa repeticiones de nucleótidos TTAGGG en los telómeros, manteniéndolos activos y evitando así el arresto en la división celular. [Jerry W. 2001]

La angiogénesis sostenida es una característica más del cáncer, necesaria para la progresión de las células tumorales. La angiogénesis es el proceso mediante el cual se forman nuevos vasos sanguíneos a partir de los ya existentes. De forma fisiológica existe un balance entre factores pro-angiogénicos y anti-angiogénicos. En el cáncer, los factores pro-angiogénicos como VEGF (factor de crecimiento endotelial vascular) y su receptor VEGF-R2 (receptor 2 del factor de crecimiento endotelial vascular), se encuentran elevados lo cual favorece la angiogénesis en el sitio donde se encuentran las células tumorales, permitiendo el aporte de nutrientes y la progresión tumoral.

Además, la angiogénesis es un proceso requerido para la invasión y metástasis [Zhao, Y 2015]

Al adquirir la capacidad de mantener una constante formación de vasos sanguíneos en la zona tumoral, las células tienen la oportunidad de desplazarse. Los procesos de invasión y metástasis son otra característica que adquieren las células tumorales. Las células tumorales infiltran de manera constante el tejido que las rodea, pierden las uniones propias de tejido epitelial como las uniones estrechas. Además de ello, adquieren la capacidad de migrar a través de los vasos linfáticos y sanguíneos [Hanahan, D.2002].

Las células tumorales que migran, evitan ser reconocidas por el sistema inmune para poder colonizar otros órganos. En el tumor de origen y en los tumores metastásicos, se da el “escape” del sistema inmune. Existen diversos mecanismos de evasión que adquieren las células tumorales, como son la expresión de moléculas co-inhedoras, o bien debido a que las células tumorales atraen a células como las células T-reguladoras, las cuales al secretar citocinas como IL-10, TGF- β , e IL-35, promueven un ambiente inmunosupresor que evita la correcta activación de los linajes que podrían estar respondiendo en contra de las células tumorales [Gross, S. et al 2007; Rabinovich, G. A. et al. 2007].

GLIOMAS

El término glioma es utilizado para tumores sólidos del sistema nervioso central (SNC), los cuales son clasificados de acuerdo a las células que los originan como astrocitomas (astrocitos), oligodendrogliomas (oligodendrocitos), ependimomas (células ependimarias) y tumores mixtos [Agnihotri, S. 2013]. Los gliomas son la forma más

común de tumor cerebral primario y conforman el 80% de todos los tumores malignos primarios del SNC [Wen, P. 2000].

GLIOBLASTOMA

La clasificación de 2007 de la OMS basada en características citológicas, histológicas y de malignidad, ubica a los gliomas dentro de una escala que va del grado I al IV. El grado uno se presenta casi exclusivamente en la niñez y se considera un tumor benigno de crecimiento lento. Histopatológicamente los gliomas grado I son lesiones poco proliferativas que puede curarse por remoción quirúrgica; mientras que el grado IV también llamado glioblastoma, se caracteriza por ser una neoplasia infiltrante con alta tasa de proliferación y formación de microvasculatura. El glioblastoma, es el tumor primario más común en adultos, donde representa el 45.2% de los tumores. El promedio de supervivencia es de 14 a 15 meses después del diagnóstico [Louis DN, 2007] [Thakkar, J 2014].

La incidencia global de glioblastoma es menor a 10 por cada 100,000 personas; sin embargo, el poco tiempo de supervivencia lo convierte en un importante problema de salud [Iacob, G. 2009]. Puede ocurrir a cualquier edad, pero la mayor incidencia se encuentra entre los 55 y los 60 años, y se presenta con mayor frecuencia en hombres que en mujeres [Adalberto M. 2017]. Es una enfermedad multifactorial y se ha asociado únicamente a la exposición a radiación ionizante como principal factor de riesgo [Sadetzki, S 2005].

La localización más frecuente del glioblastoma es en los hemisferios cerebrales., La mayor parte de los tumores (95%), se localiza en la región que comprende la parte superior del encéfalo [Thakkar, J 2014]. Macroscópicamente, los glioblastomas

contienen células heterogéneas, sitios hemorrágicos y se observan áreas de necrosis [Agnihotri, 2013]. Las células que los componen son una población pleomórfica que varía desde células poco diferenciadas, a células grandes multinucleadas.

Existen glioblastomas primarios los cuales tienen mutaciones específicas que los diferencian de glioblastomas secundarios, éstos últimos provienen de un glioma de menor grado. , Las mutaciones características de un glioblastoma primario, incluyen mutaciones en el gen de receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR), mutaciones en la enzima fosfatidilinositol-3,4,5-trisfosfato 3-fosfatasa (PTEN), pérdida de heterocigosidad en 10q, así como la amplificación de la proteína MDM2. Mientras que la mutación temprana del gen que codifica para P53, mutaciones en las enzimas isocitrato deshidrogenasa 1 y 2 (IDH-1/IDH-2), y pérdida de la heterocigosidad en 19q, son características de un glioma secundario [Wesseling, P, 2017][Masui K. 2012].

Los síntomas del glioblastoma están relacionados con el daño ocasionado por el tumor en el tejido cerebral y la aparición de áreas de necrosis, causando deterioro cognitivo. Los síntomas varían mucho de acuerdo a la región donde se presente el tumor. Síntomas como cefaleas, vómito o incluso convulsiones, son frecuentes independientemente de la región afectada. Para el diagnóstico suelen hacerse pruebas como tomografía computarizada (TC) e imágenes por resonancia magnética (MRI) [Grosu, A.2005].

El esquema de tratamiento para glioblastoma consiste en una resección quirúrgica del tumor, junto con ciclos de radiación y quimioterapia, siendo la temozolomida el agente quimioterapéutico de elección. La terapia actual tiene algunas desventajas, la remoción quirúrgica se ve limitada por el área donde se encuentra el tumor, y porque éste tiene la característica de ser infiltrante. La radiación implica factores de riesgo y se ve limitada

nuevamente por la capacidad infiltrante de las células tumorales, la necrosis de tejido sano inducida por la radiación o bien, puede inducir daño neuronal. Finalmente, la quimioterapia es citotóxica y pueden aparecer células resistentes a ella. Su uso está asociado a muchos efectos secundarios, además de que la temozolomida se considera un agente terapéutico costoso [Alifieris, C 2015][Garside, R 2007].

LA RESPUESTA INMUNE

Los seres vivos se tienen que enfrentar a factores ambientales como agentes infecciosos y partículas químicas, todas las cuales son reconocidas como agentes extraños. Los vertebrados y algunos invertebrados cuentan con mecanismos de vigilancia y de defensa que constituyen el sistema inmune, cuya finalidad es conferir protección o inmunidad contra sustancias y organismos dañinos. La finalidad del sistema inmune es poder discernir entre lo que es propio (que forma parte del organismo) y los agentes extraños [Murphy, 2016].

El sistema inmune está conformado por los órganos linfoides primarios (médula ósea y el timo), los órganos linfoides secundarios como bazo, nódulos linfáticos, apéndice, adenoides, placas de Peyer y amígdalas, y por diversos tipos de células inmunológicas distribuidas en todo el organismo como lo son los linfocitos, macrófagos, monocitos, células dendríticas, células NKs (natural killers), neutrófilos, células cebadas, basófilos y eosinófilos, localizadas en la sangre y en los tejidos. . Además de esto, los organismos cuentan con barreras fisiológicas como la piel, el recubrimiento de mucosas, factores solubles y proteínas que también conforman el sistema inmune [Murphy 2016]. La activación de las células del sistema inmune se produce a través de la estimulación de ciertos receptores específicos que inducen la liberación de mediadores solubles y/o respuestas citotóxicas y fagocíticas directas. Las proteínas solubles como las citocinas,

le sirven al sistema inmune para comunicarse, activarse o inhibirse, esto último, una vez que han cumplido con su función [Abbas, A, 2014].

La respuesta inmune de los vertebrados se divide a grandes rasgos en innata o adaptativa. La respuesta innata es la primera en activarse; mientras que la respuesta adaptativa se presenta después de la innata si ésta última falla al eliminar la causa de activación. La respuesta innata no genera memoria inmunológica, mientras que en el caso de la respuesta adaptativa, confiere protección a largo plazo porque genera células de memoria. La respuesta inmune adaptativa es más específica, requiere más tiempo para manifestar sus efectos (más de 2 semanas) y su reactivación produce una respuesta más rápida.

Para generar una respuesta inmune adaptativa es necesaria la interacción del agente inmunogénico con las células fagocíticas como las células dendríticas y los macrófagos, las cuales procesan los antígenos fagocitados. Las células dendríticas migran a los nódulos linfáticos y en el camino maduran cambiando sus moléculas de superficie. Los antígenos ya procesados son presentados a los linfocitos presentes en los nódulos linfáticos como determinantes antigénicos, que son fracciones de los antígenos unidos a las moléculas clase I ó clase II, del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC). El reconocimiento linfocito-dendrítica induce la diferenciación y proliferación de los linfocitos para montar respuestas efectoras específicas contra ese antígeno.

INMUNOTERAPIA CONTRA CÁNCER

Como una alternativa a las terapias convencionales surge la inmunoterapia. Esta tiene como base, la capacidad del sistema inmune de reconocer y eliminar a las células tumorales, un proceso que ocurre de manera natural durante las primeras etapas de transformación de las células que pueden dar origen a un tumor [Dunn, G. 2004, 2002]. La aplicación de la inmunoterapia tiene sus inicios en las observaciones de William B. Coley, en 1891 [McCarthy, E.2006] quien usó una mezcla de lisados bacterianos junto con bacterias vivas (*Streptococcus pyogenes* y *Bacillus prodigiosus*) para tratar un sarcoma, logrando con éxito la remisión del tumor [Cann, S.2003]. Paul Ehrlich propuso en 1900 la teoría denominada “inmunovigilancia”, la cual propone que clonas con mutaciones somáticas se producen en el cuerpo de un individuo a lo largo de la vida, y el sistema inmune es capaz de detectarlas y eliminarlas antes de que proliferen y deriven en cáncer. Si éste falla en eliminar todas las clonas, estas continúan adquiriendo mutaciones, y mediante diversos mecanismos “evadirán” la respuesta inmune, favoreciendo e un microambiente inmunosupresor caracterizado por células del sistema inmune tolerantes o anérgicas, lo cual las incapacita para eliminar a las células tumorales. . Actualmente se reconoce que si se revierte esta tolerancia, la respuesta inmune es capaz de eliminar a las células tumorales. Las células que se ha demostrado tienen un papel importante en la eliminación de las células tumorales son las células citotóxicas, NKs [Kim, S., 2000; Hirayama, M. et al. 1996] y los linfocitos CD8 [Seki, N. et al. 2002]. Los linfocitos Th1 también están implicados en la producción de citocinas que favorecen la respuesta antitumoral como el INF- γ y TNF [Vile, R. G. et al 1997]. Incluso

se plantea que en menor medida, linajes como los linfocitos Th2 tengan cierta participación en la eliminación de células tumorales [Nishimura, T et al. 1999].

Se han utilizado diversos métodos para potenciar la respuesta inmune y o disminuir los mecanismos de evasión por parte de las células tumorales. Algunos de los métodos utilizados son la administración sistémica de componentes solubles que influyen en la respuesta inmune como INF- γ e IL-2. Se han realizado trasplantes adoptivos de linfocitos específicos para antígenos tumorales una técnica que a comparación de la utilizada en el presente es muy costosa, también se administran células dendríticas cargadas con antígenos tumorales, terapia que requiere de mucho tiempo y es costosa, etc. [Lorenzo Galluzzi et al. 2014]. Es por todo esto, que el uso de bibliotecas de epítomos variables se presenta como una nueva alternativa de inmunoterapia.

VACUNAS DE EPÍTOPOS VARIABLES

En el caso del cáncer no solo nos enfrentamos a la variabilidad genética y antigénica, sino a los cambios dinámicos que conducen a un amplio repertorio de epítomos, así como al escape de la inmunovigilancia por la disminución en la expresión y presentación de antígenos, la inducción de inmunotolerancia y mecanismos de evasión de las células tumorales [Kim, R., 2007]. Para lograr una vacuna exitosa se debe romper con los mecanismos de tolerancia que impiden que se dé el correcto reconocimiento y activación por parte de las células del sistema inmune, y también cubrir la variabilidad de epítomos. El concepto de antígenos variables se refiere a mimótopos versiones modificadas de epítomos derivados de antígenos asociados a tumor, los cuales se han propuesto como una posible terapia exitosa [Jordan 2012]. El equipo que conforma nuestro laboratorio trabaja con un concepto innovador denominado bibliotecas de epítomos variables, dirigido a enfermedades dinámicas que presentan una alta

heterogeneidad genética y por lo tanto también alta variabilidad antigénica [Pedroza 2009]. Estos inmunógenos son bibliotecas construidas a partir de variantes de un mismo epítipo inmunodominante, desplegadas en el fago recombinante M13 y fusionadas a la proteína pVIII [Manoucharian 1999]. En nuestro grupo de trabajo, se probaron las propiedades inmunológicas y el efecto antitumoral de estas bibliotecas de variantes epitópicas derivadas de la proteína survivina en un modelo murino de cáncer de mama 4T1 metastásico agresivo. Los ratones inmunizados con las BEV derivadas de survivina, mostraron una inhibición estadísticamente significativa del crecimiento tumoral, tanto en tratamiento profiláctico como terapéutico. Además, generaron una respuesta de linfocitos CD8+ IFN- γ + que fueron capaces de reconocer más del 50% de un panel de 87 variantes de epítopos mutados de survivina [NoeDominguez, 2014].

TÉCNICA DE DESPLIEGUE EN FAGO

La técnica de despliegue en fago tiene diferentes aplicaciones en campos de la medicina y la biotecnología y se ha utilizado para comprender la interacción entre proteínas como es la interacción enzima–ligando. Se usa para descubrir antagonistas e inhibidores de enzimas, diseñar mimotopos y vacunas peptídicas [Hekim C 2006][Smith GP 1985].

Las vacunas hechas con esta técnica tienen mayor capacidad de inmunización, pues las proteínas propias del fago funcionan como inmunoadyuvantes, lo cual permite mejores resultados a bajas dosis en comparación con las vacunas tradicionales, produciendo una respuesta inmune más fuerte y menos variable entre individuos [Bazan, J.2012]

La manipulación y generación de fagos recombinantes es eficiente y económica, tiene una alta tasa de estabilidad en cambios de pH, lo cual facilita su aplicación y distribución además su producción es barata, y como los fagos no infectan células eucariotas, se considera que su uso es seguro. La aplicación de vacunas hechas con fagos filamentosos no reporta efectos secundarios [Bruttin A 2005]. Incluso hay estudios que utilizan esta técnica cargando fagos con antígenos derivados de células espermáticas como método anticonceptivo, esto a nivel de modelo animal.

La generación de la biblioteca consiste en fusionar el gen de interés en el sitio del genoma vírico que codifique para la proteína donde se desea se exprese el péptido, generalmente una proteína de envoltura. Para esta técnica se usa con mayor frecuencia el fago filamentosos M13 [Manoutcharian 2005] el cual pertenece al género inovirus, infecta a células *E.coli* con plásmido F; el ciclo de replicación no es lisogénico, dándose la producción de partículas infectivas cuyo ensamblaje se da en la membrana bacteriana [Rodi, D 1999].

Este virus presenta una forma cilíndrica de 900 nm de largo por 6.5 nm de diámetro, la cápside se encuentra principalmente formada por la proteína VIII, en uno de sus extremos una combinación de proteína VII y IX y en el otro las proteínas III y VI. Los fragmentos recombinantes son clonados con mayor frecuencia en el gen que codifica para la proteína VIII.

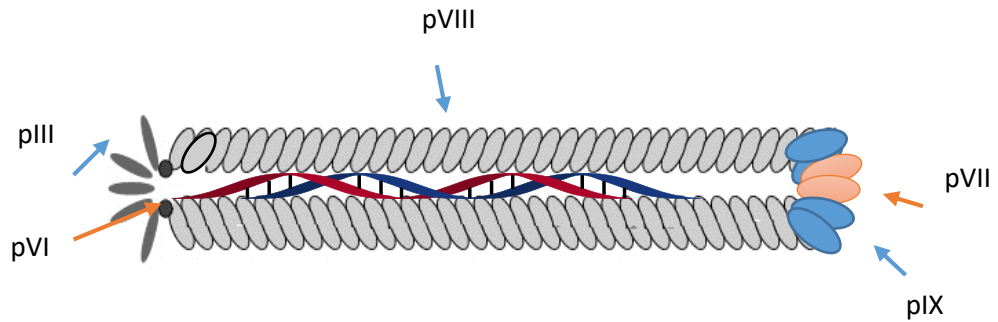


Figura 1 Estructura del Fago. La figura ilustra como luce un fago filamentosos, donde la proteína de la envoltura que expresa la proteína de fusión se encuentra en color gris.

El uso de fagémidos permite construir grandes repertorios de proteínas recombinantes. Estos fagémidos contienen el origen de replicación del fago filamentosos, el origen de replicación plasmídico bacteriano, el gen que codifica para la proteína p VIII para generar la fusión, un sitio de múltiple clonación, el gen de resistencia a antibiótico y una señal para empaquetar el fago [Delmastro 1997]. Estos son fácilmente manipulables para expresar epítomos combinados con proteínas nativas víricas y generar una respuesta inmunológica.

ANTÍGENOS

Explotar las diferencias biológicas entre células cancerosas y sanas, permite que estas sean distinguidas y las terapias dirigidas sean específicas del tumor, evitando así dañar a las células funcionales. Generar una respuesta inmune antitumoral significa romper los mecanismos de tolerancia del tumor, si bien las células tumorales tienen antígenos que pueden ser reconocidos por el sistema inmune, estas generan mecanismos de tolerancia [Makkouk, A 2015]. Existen dos tipos de antígenos en las células tumorales: aquellos impropios del tejido de origen del tumor [Coulie, P. 2014] y las proteínas producto de oncogenes y genes supresores [Haen, S. 2013]. Entre estos últimos se encuentran gp100, MAGE, Muc-1, p53, survivina y HER-2, los cuales se considera que son posibles blancos terapéuticos para el cáncer [Nencioni A, 2004, Liu Y, 2011].

HER-2

La familia de receptores de factores de crecimiento epitelial (EGFR) con actividad tirosina cinasa, está compuesta por 4 miembros HER-1, HER-2, HER-3 y HER-4. De estos, nos enfocaremos en HER-2 (Human Epidermal Growth Factor Receptor 2) cuyo gen se encuentra en el cromosoma 17 q12, donde se genera un mensajero de 4.8 kb que se traduce en una proteína de 185 kDa. Al receptor HER-2 no se le conoce un ligando específico, pero otros miembros de la familia al unir sus ligandos son capaces de unirse a HER-2 y formar heterodímeros, estos dímeros se presentan de forma más común entre HER-2 y HER 3, que al formarse se observa una mayor actividad enzimática. Esta familia de receptores está implicada en procesos de proliferación y supervivencia celular [Hung, M. 1999].

Normalmente HER-2 se expresa en las células epiteliales de adultos y su expresión es necesaria durante la embriogénesis para el desarrollo del tejido mamario, la formación de los ovarios, pulmón, riñón, hígado y también durante la formación del SNC [Peczuh, M 2000]. En células normales la expresión de HER-2 es de 40,000 a 100,000 receptores por célula y es considerado un oncogen [Herbst, R 2004]. La sobreexpresión de este receptor se ha observado en varios tipos de cáncer en los cuales participa en la progresión tumoral, la capacidad de invadir y generar metástasis, así como en la angiogénesis. Dentro de los tumores en los que se encuentra sobreexpresado, se encuentran diversos tipos de carcinomas incluyendo al glioblastoma. El hecho de que esté sobreexpresado en varios tipos de cáncer lo hace un atractivo candidato para la inmunoterapia.

Como ejemplo en cáncer de mama la sobreexpresión de HER-2 es de 2,000,000 de receptores por célula, un aproximado de 20 veces sobre el nivel basal [Herbst, R 2004]. El nivel de sobreexpresión en otros tipos de cáncer es variable; por ejemplo, en cáncer de pulmón de células no pequeñas y glioblastoma, del 40 al 80 % de los tumores presentan sobreexpresión, en gliomas el receptor está sobreexpresado en un 80% de los tumores, e incluso las células con marcadores tipo célula madre cancerosa positivas para CD133, se sobreexpresa este receptor [Loew, S. 2009, Ahmed, N 2010]. La sobreexpresión está relacionada con un mal pronóstico y en algunos casos se ha observado que confiere hasta un 50% de disminución en la sobrevida del paciente [Gutierrez, C.,2011]. La manera por la cual este receptor favorece la progresión tumoral es mediante las numerosas rutas metabólicas en las que se encuentra implicado, las cuales incluyen la cascada de señalización de MAPK y PI3K; éstas rutas son ejemplificadas en la Figura 2 [Olayioye, M. 2001].

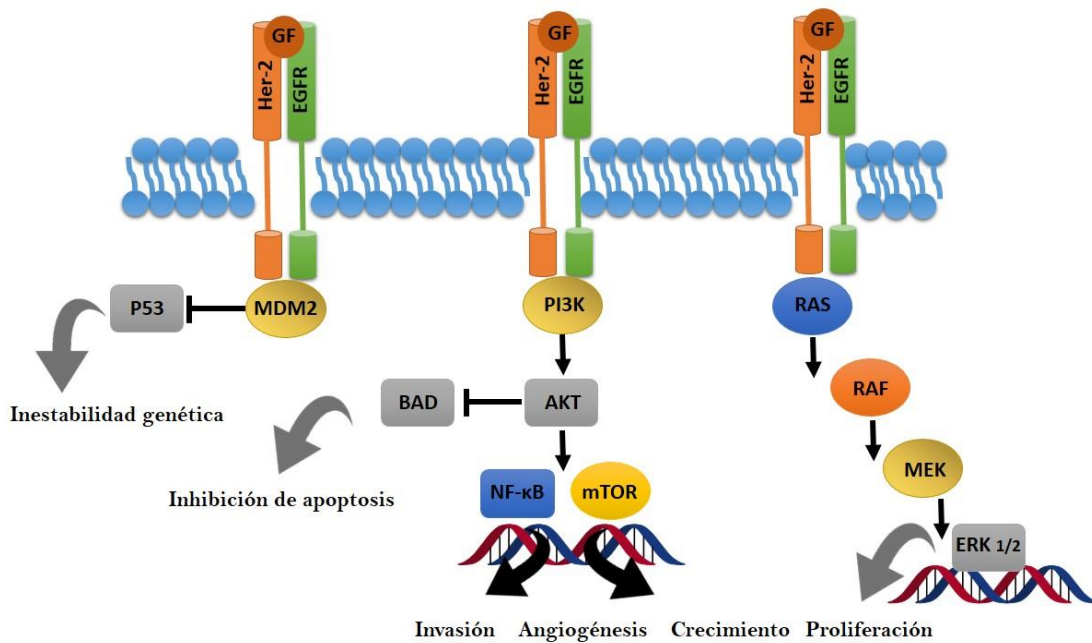


Figura 2. Vías de señalización de HER-2 Algunas de las rutas metabólicas en las cuales está implicado el receptor HER-2; así como su resultado biológico. Al formarse un heterodímero, la región extracelular es capaz de unirse al ligando (GF), lo que provoca un cambio conformacional que permite la actividad tirosina cinasa de la región intracelular, activando vías como la de la proteína MDM2 la cual regula de forma negativa a p53, lo cual se ve reflejado en la progresión del ciclo celular pese al daño en el DNA. Este receptor también activa la ruta de PI3K, Akt y la cascada de MAPKs, las cuales están implicadas en los procesos de proliferación, crecimiento, supervivencia, y de manera indirecta en procesos de angiogénesis.

ANTECEDENTES

Nicola J Manson y colaboradores [2016], en un modelo canino de osteosarcoma apendicular comúnmente utilizado para estudiar el osteosarcoma pediátrico, probaron una cepa atenuada de *Listeria monocytogenes* que expresa una proteína de fusión HER-2/neu quimérica (ADXS31-164) para inducir una respuesta inmune que previniera la metástasis.

Usaron dieciocho perros que se sometieron a amputación de extremidad o cirugía de rescate y quimioterapia como adyuvante. Para un ensayo clínico usando dosis en escala, recibieron 2×10^8 , 5×10^8 , 1×10^9 o $3,3 \times 10^9$ UFC (unidades formadoras de colonias) por vía intravenosa cada 3 semanas durante 3 administraciones. Debido a la biología de la bacteria, sus antígenos son procesados como antígenos de clase 1, pudiendo presentarse en moléculas MHC de tipo 1 y 2, dando como resultado la activación de linfocitos CD4+ y CD8+.

En este estudio, se midió la toxicidad asociada dando como resultado una baja toxicidad determinada por estudios como ecocardiografías y medición de los niveles séricos de troponina I cardiaca. Además de una baja toxicidad, se observó en los animales tratados un aumento en la sobrevida y en el tiempo de sobrevida libre de enfermedad.[Mason, N. 2016]

Nabekura y col. [2008] probaron células dendríticas transfectadas con HER-2, para generar linfocitos T citotóxicos y Th1 en un modelo murino (cepa B6), y produjeron anticuerpos anti-HER-2 específicos. Los ratones mostraron un aumento en la sobrevida libre de enfermedad, reducción del tumor primario y disminución en la aparición de tumores metastásicos. El modelo que usaron consistió en inocular a los ratones con las

células dendríticas los días 1, 7 y 14, y en la última inoculación se agregaron células de linfoma (EL4). En los ratones vacunados, hubo una inhibición del crecimiento tumoral y en algunos casos una regresión total. Usaron ratones FVB-Tg los cuales desarrollan espontáneamente tumores en mama, para probar las células dendríticas transfectadas con el receptor. En este modelo se vio reducida la aparición de tumores y metástasis [Nabekura, T., 2008].

Brian M. y col. [AÑO], transfectaron un cultivo de células CHO, para secretar una fracción del dominio extracelular del receptor HER-2. Con el purificado proteico del receptor, inocularon cobayos de forma subcutánea en una dosis de 100µg junto con el adyuvante completo de Freund, 3 dosis cada 14 días. Obtuvieron el antisuero de estos cobayos para probarlo en líneas celulares y determinar si influía sobre la capacidad de proliferación de las células. Se probó en líneas humanas derivadas de cáncer de mama MDA-MB-175, MDA-MB-361 SK-BR-3 que sobreexpresan al receptor y en líneas que no sobre expresan al receptor: MDA-MB-231, HBL100, MCF-7. En las primeras, se vio una inhibición de hasta el 73% con respecto al control, ellos concluyen que al inmunizar cobayos con la región extracelular de HER-2 pueden adquirir un antisuero capaz de inhibir el crecimiento celular en líneas que sobreexpresan el receptor. En aquellas líneas celulares que no tienen sobreexpresión no se vio este efecto, y los autores lo comparan con el efecto observado en células sanas. Los resultados en porcentaje de inhibición varían de un 30% a un 73%, por lo que determinaron que esta variación no estaba relacionada con el nivel de sobreexpresión, y la atribuyen a las diferencias que presenta el epítipo en las diversas líneas celulares [Fendly, B. 1990].

Nabil A. y col. [AÑO], compararon al meduloblastoma cuya sobreexpresión de HER-2 está presente en el 40% de los tumores con cáncer de mama, donde la expresión es mucho mayor, siendo ésta la razón por la cual no es efectivo para este tumor el tratamiento con trastuzumab, un anticuerpo monoclonal dirigido a HER-2 actualmente utilizado como tratamiento para cáncer de mama. Para corroborar esto, midieron la expresión de HER-2 mediante FACs en las líneas celulares MDA-MB-468 y SK-BR-3 de cáncer de mama, las cuales contrastaron con las líneas celulares de meduloblastoma Daoy, D283 y D341. En comparación con las líneas de cáncer de mama, se podría considerar como negativa la expresión del receptor en meduloblastoma. Midieron además la expresión de HER-2 en células CD133+ que presentan características de células madre carcinogénicas, y concluyeron que la expresión es igual que en el resto de las células que conforman al tumor. La proliferación de las líneas celulares de meduloblastoma no se ve afectada con trastuzumab a diferencia de las células de cáncer de mama donde se observa una disminución en la proliferación. Decidieron probar CAR (Antigen Receptor T cells) específicos para HER-2, los cuales son construidos con células CD8 y CD4. En células de meduloblastoma HER-2+, se observó la producción de INF γ e IL-2 por parte de las células T; solo las células positivas fueron eliminadas y esto se vio desde 4 h posteriores a la adición de los CARs al cultivo. Se probaron también estos CARs en 10 cultivos primarios de meduloblastoma donde de igual manera, hubo producción de INF γ e IL-2 y la eliminación de las células que expresaban HER-2. Esto se extendió a un modelo ortotópico xenogénico en ratones SCID, donde aquellos tratados con los CARs para HER-2 tuvieron un aumento significativo en la supervivencia y el tumor permaneció indetectable, en comparación con los individuos no tratados con los CAR para HER-2 [Ahmed, N, 2010].

Charles L. y col. [AÑO], evaluaron la eficacia y seguridad de trastuzumab (en mujeres con cáncer de mama metastásico y alta expresión de HER-2. Un grupo de 114 mujeres al recibieron al azar trastuzumab en una dosis de 4mg/kg como dosis inicial, seguido de una dosis semanal de 2mg/kg de peso, o una dosis inicial de 8mg/kg, seguida de una dosis semanal de 4 mg/kg. En ambos grupos los malestares presentes con mayor frecuencia, fueron astenia y fiebre. Un 26% de las mujeres respondieron ante el tratamiento, esto corresponde a aquellas que tenían mayor expresión de HER-2; en 48% de las pacientes la progresión clínica disminuyó, esto medido por última vez 12 meses después del tratamiento, por lo cual concluyeron que trastuzumab es un tratamiento de primera línea clínicamente seguro con beneficios para las pacientes [Vogel, C.2002].

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Los gliomas son neoplasias malignas muy agresivas y con una alta tasa de mortalidad, para los cuales no existen tratamientos eficaces, por lo cual la búsqueda de nuevas terapias que sean efectivas resulta de suma importancia. La inmunoterapia es una de las propuestas más recientes para combatir tumores agresivos, dentro de este tipo de terapia se encuentran las vacunas contra antígenos propios del tumor. Sin embargo, frecuentemente el microambiente inmunosupresor del tumor y la gran variabilidad antigénica presente en el cáncer, han dificultado el desarrollo de vacunas exitosas. En este sentido, las bibliotecas de epítomos variables combinadas con la técnica de despliegue en fago representan una alternativa viable a estos problemas. Los gliomas tienen la característica de sobreexpresar la proteína HER-2. En este proyecto, se propone hacer una biblioteca de variantes antigénicas de HER-2 y utilizarlas como vacuna terapéutica en un modelo de xenotrasplante de glioma en rata. Se estudiará la supervivencia de ratas vacunadas con epítomos variables, no variables y no vacunada.

HIPÓTESIS

Las células tumorales de glioblastoma expresan HER-2, y este antígeno tiene diversas variantes, entonces las bibliotecas de variantes de epítomos derivados de estas moléculas serán inmunógenos capaces de inducir una respuesta protectora.

OBJETIVO GENERAL

Evaluar el efecto antitumoral de vacunas (nominal y biblioteca) basadas en un epítomo inmunodominante derivado de la molécula HER-2

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Obtener vacunas (nominal y biblioteca) derivadas de moléculas HER-2.
2. Evaluar el efecto antitumoral en el modelo *in vivo* de glioblastoma RG2.
3. Evaluar la supervivencia en el modelo de glioblastoma RG2 de ratas tratadas con estas vacunas.

METODOLOGÍA

El presente proyecto fue aprobado de acuerdo a las normas establecidas por el comité institucional para el cuidado de los animales de laboratorio (CICUAL-INNN).

1.1 DISEÑO DE LAS VACUNAS

1.2

1.3 Péptidos

En un primer y único ensayo, se diseñaron péptidos sintéticos que contienen una región inmunodominante determinada previamente por Nagata y col.[AÑO] de HER-2 que comprende la región extracelular del receptor desde el aminoácido número 32 hasta el aminoácido 83 y poli I:C (SIGMA®) como adyuvante, los datos obtenidos de este experimento se encuentran en información suplementaria.

1.2 Biblioteca Se usó la técnica de despliegue en fago la cual tiene como fundamento la capacidad para que se expresen proteínas foráneas fusionadas a la proteína cpVIII de envoltura del virus filamentoso M13, sirviendo éste como vehículo y a su vez como adyuvante, el fago fue cultivado en bacterias *E. coli* TG1, las cuales fueron transformadas por medio de electroporación con el fagémido que contiene al epítipo. Se trabajó utilizando una biblioteca de epítipos variables que fue construida previo al inicio del presente trabajo. Los epítipos variables se basan en un epítipo inmunodominante de 9 aminoácidos de longitud, derivado del receptor HER-2 [Nagata 1997; Okugawua. 2000], de este modo la biblioteca está constituida por péptidos diferentes con variaciones.

Con estos iniciadores se introdujeron los sitios de restricción NcoI y BamHI, con lo que fue posible clonar los fragmentos codificantes de la biblioteca en el vector fagémido pG8SAET del mismo modo que se describió para la biblioteca BCaMa [Allan Noé, 2014] este fagémido posee el origen de replicación plasmídica y el origen de replicación vírica, que permite fusionar proteínas foráneas con el fragmento

5'Damp 5'TGATATTCGTA~~CTCGAG~~CCATGGTGTATATTACTGTGCG 3'

3'Damp 5'ATGATTGACAAAGCTTGGATCCCTAGGTTCCCTGGCCCCA 3'

Las bibliotecas y el fagémido con la secuencia nominal, se conservó dentro de *E. coli* TG1 en medio 2x YT SIGMA® con 10% de glicerol, a -20°C. Posteriormente, se cultivaron las bacterias en medio 2x YT SIGMA® hasta un aproximado de 0.7 D.O. y se infectaron con fago ayudador SIGMA® para obtener fagos recombinantes. Los fagos que fueron obtenidos, expresan en la superficie las bibliotecas de HER-2 con las mutaciones antes mencionadas, o el fragmento de HER-2 sin alteraciones (nominal). Esto se verificó mediante la infección de nuevas TG1 y la posterior amplificación de la secuencia de HER-2 mediante PCR, y su posterior secuenciación con el oligo pYsaet. Las secuencias de nucleótidos fueron analizadas con el programa Chromas 2.6.2 para Windows, para la traducción a aminoácidos se usó el traductor de aminoácidos en línea ExPASy (<http://web.expasy.org/translate/>). De estas clonas se guardó una alícuota en medio con glicerol y de estas alícuotas se realizaron las posteriores amplificaciones. Se ajustó el título de ambos fagos (nominal y biblioteca) a $1 \times 10^{13}/500\mu\text{l}$. Ambas muestras de fago fueron almacenadas a 4°C en TBS por un tiempo no mayor a 6 meses.

1.3 Cultivo de células RG2

Se cultivaron células RG2 (ATCC#CRL-2433), las células RG2 fueron obtenidas de ATCC y se cultivaron en medio DMEM (GIBCO® Dulbecco's Modified Eagle Medium) suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB, Gibco®BRL), 4mM glutamina, 100U/ml de penicilina, y 100mg/ml de estreptomycin, a una temperatura de 37C, y 5% de CO₂, permitiéndoles un máximo de confluencia del 90%.

A las células RG2 en cultivo se les retiró el medio y se les trató con tripsina, una vez que se desprendió la monocapa se colectaron las células. Estas fueron centrifugadas y resuspendidas en 2 ml de medio DMEM suplementado con 10 % de SFB se tomó una alícuota para realizar el conteo celular en cámara de Neubauer, usando como tamiz de viabilidad el colorante azul de tripano ajustando el volumen final a 1×10^6 células viables/10 μl . Durante el implante, las células se agitaron constantemente con la finalidad de evitar la sedimentación de las mismas y se mantuvieron a una temperatura de 4°C,

al finalizar el implante se tomó una alícuota y se tiñó con azul de tripano para verificar que las células continuaban siendo viables.

1.5 Animales

Se utilizaron ratas Fisher 344 de 180 a 250 g de peso, de ambos sexos, con alimento y agua *ad libitum* a una temperatura controlada de 24°C, con ciclos alternados de luz y oscuridad. El implante se llevó a cabo de acuerdo a un modelo previamente descrito (Kobayashi, N., et al 1980). Los animales fueron inmovilizados y anestesiados vía intraperitoneal con ketamina-xilazina, de acuerdo a la dosis indicada por el fabricante. Posteriormente se desinfectó el área de interés y se realizó una incisión sagital sobre la cabeza de los animales, donde se ubicaron las suturas lambdaidea, bregmática y sagital; se realizó la medición correspondiente y se procedió a realizar una perforación a 2 mm de la sutura lateral y 2 mm por delante del bregma en el lado derecho del cráneo. Se inocularon 1×10^6 células RG2 en 10 μ L y se inyectaron a una profundidad de 6 mm a una velocidad de 2 μ L/min utilizando una jeringa de vidrio de 25 μ L (Hamilton, Reno, NV). Un tiempo de espera de 3 min fue seguido después de la inyección, se procedió a cerrar la herida y se dio seguimiento a la recuperación de los animales.

1.6 Esquema de tratamiento

En un primer esquema se realizó el implante y 4 días después del implante, los animales fueron divididos en cinco grupos de forma aleatoria, mezclando machos y hembras. Un total de 25 ratas con una $n=5$ /grupo, se dividieron en los siguientes grupos:

Grupo Control- Únicamente con implante, sin tratamiento posterior.

Grupo Fago Biblioteca- tratado con el fago en un volumen de 500 μ l conteniendo 1×10^{13} fagos, administrado de forma subcutánea.

Grupo Fago Biblioteca tratado con el fago- en un volumen de 500 μ l conteniendo 1×10^{13} fagos administrado de forma intravenosa.

Grupo Péptido Biblioteca- de 45 aa de longitud administrado de forma subcutánea en un volumen de 300 μ l conteniendo 500 μ g del péptido, adicionado con Poli I:C SIGMA® en relación v/v.

Grupo Péptido Nominal- de 45 aa de longitud administrado de forma subcutánea, en un volumen de 300µl conteniendo 500µg del péptido, adicionado con Poli I:C SIGMA® en relación v/v.

De forma esquemática:

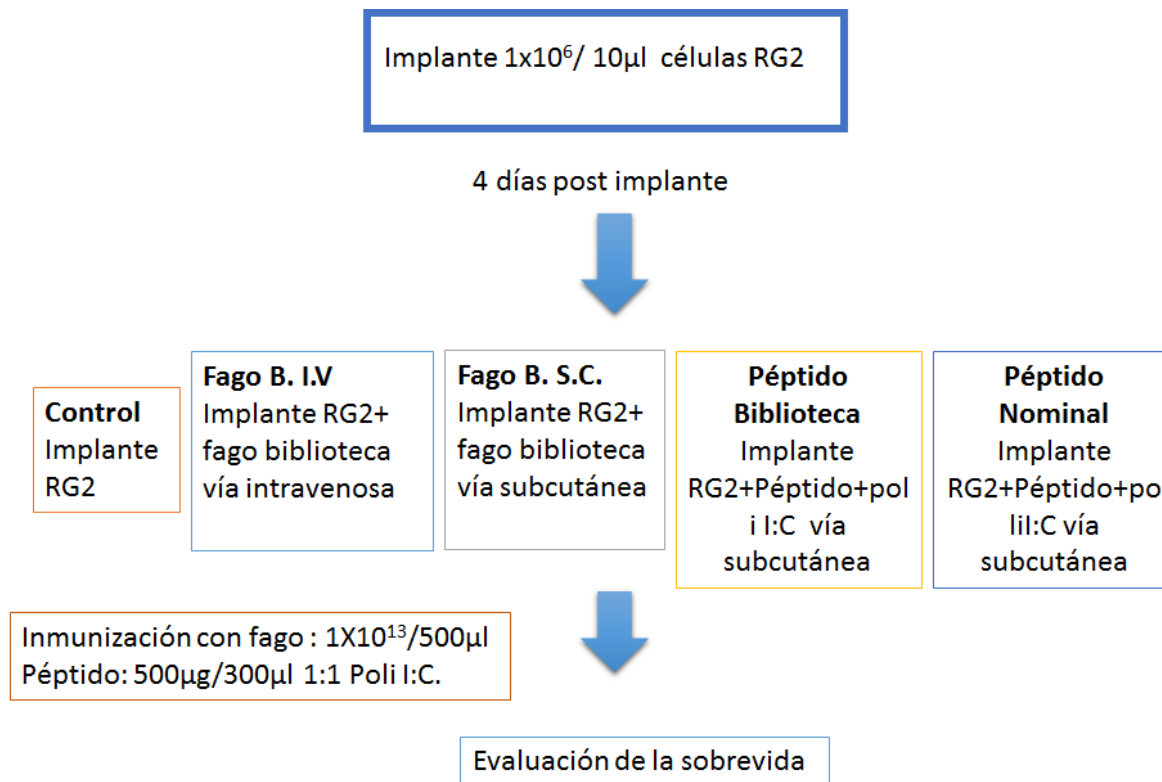


Figura 3 Esquema de tratamiento 1, usado únicamente durante el primer ensayo.

Debido a los resultados obtenidos, se modificó el formato de vacunación agregando la vacunación con fago nominal acorde con el esquema de la Figura 4, realizándose bajo este esquema dos experimentos más, uno con 25 ratas con una n=5 y otro con 50 ratas con una n=10, divididas de forma aleatoria e inmunizadas a los 4 días después del implante.

Grupo Control- Únicamente con implante, sin tratamiento posterior.

Grupo Fago Biblioteca- tratado con el fago en un volumen de 500µl conteniendo 1×10^{13} fagos, administrado de forma subcutánea.

Grupo Fago Biblioteca- tratado con el fago en un volumen de 500µl conteniendo 1×10^{13} fagos administrado de forma intravenosa.

Grupo Fago Nominal- tratado con el fago en un volumen de 500µl conteniendo 1×10^{13} fagos, administrado de forma subcutánea.

Grupo Fago Nominal- tratado con el fago en un volumen de 500µl conteniendo 1×10^{13} fagos administrado de forma intravenosa.

De forma esquemática:

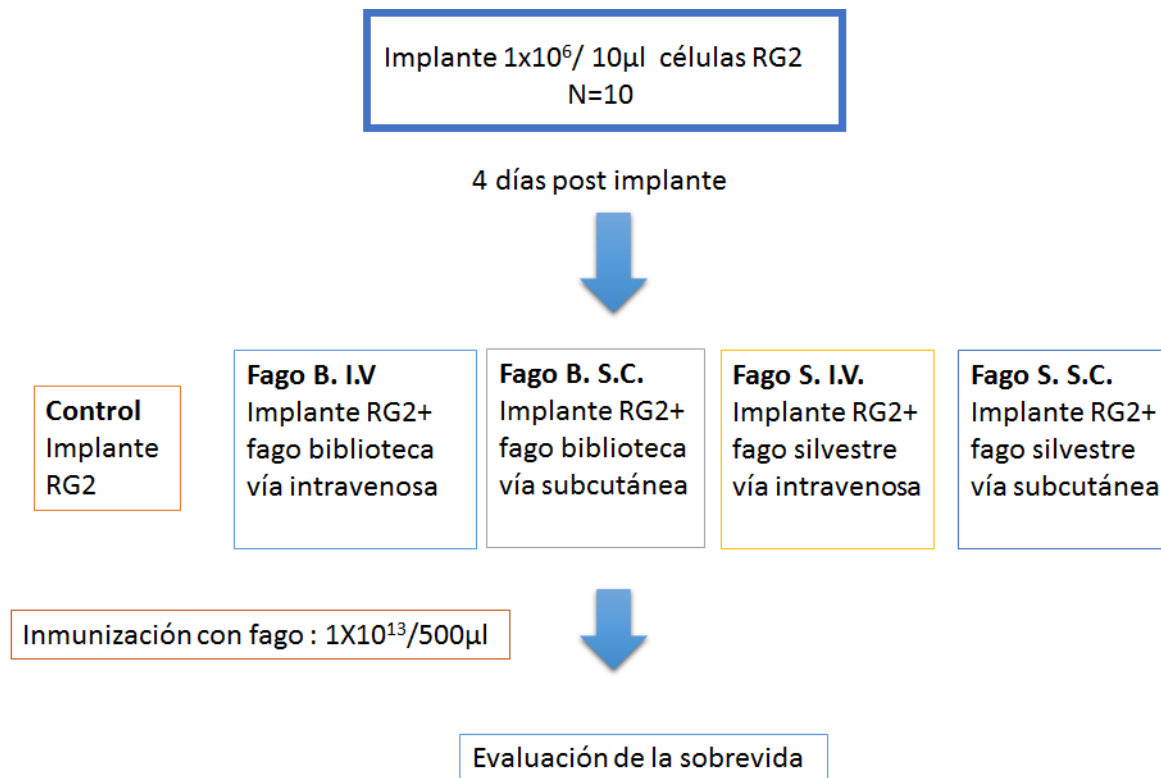


Figura 4. Esquema de tratamiento 2, utilizado en dos experimentos posteriores, con la variable de número de animales utilizados.

Para la vacunación subcutánea, se inyectó en el flanco derecho a los animales mientras estos eran inmovilizados, corroborando que no hubiera filtraciones de la vacuna.

Para la vacunación de forma intravenosa, se inmovilizó a los animales y se introdujo la vacuna por la vena caudal corroborando que no existieran filtraciones.



Figura 5. Vacunación vía intravenosa.

Se monitoreo la evolución de cada animal, y se sacrificaron únicamente cuando el animal mostraba signos de estar agonizando de acuerdo a los criterios de la institución, de lo contrario se permitió que el animal muriera y se recuperó el tejido para verificar la presencia del tumor.

1.7 Análisis de sobrevida

El análisis estadístico se llevó a cabo con el paquete estadístico SPSS v.10 y se realizó el análisis de sobrevida mediante Kaplan Meier (SPSS 23.0 para Windows; SPSS Inc., Chicago IL.) Adicionalmente se realizó el análisis de sobrevida en el programa R (R Core Team 2013). R:A Language and Environment for Statistical Computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. <URL:<https://www.R-project.org/>>) seguido de una prueba Logrank.

1.8 Tejido

Para la recuperación del tejido, se extrajo el cerebro . El tejido fue procesado para estandarizar las técnicas de inmunohistoquímica e histopatología. Para procesar el tejido para inmunohistoquímica, se realizaron dos técnicas diferentes; la primera consistió en fijar el tejido en formol al 10% por 5 días, después se lavó el tejido y se colocó en paraformaldehído al 4%, posterior a esto se llevó a los ciclos de deshidratación con alcohol desde 70% hasta 100% para finalmente ser embebido en parafina y se realizaron cortes de 5 micras de grosor. Se desparafinaron los cortes a 60°C por 3 horas, y de allí se rehidrató el tejido con grados de alcohol desde 100% hasta 70%.

La segunda técnica consistió en inyectar una dosis letal de anestésico (Pentobarbital) en el animal cuando se encontraba agonizando y perfundirlo vía cardíaca con PBS para posteriormente perfundir con paraformaldehído al 4%, recuperar el tejido y colocarlo en gradientes de sacarosa (15%, y 30%); esto con la finalidad de obtener cortes en el criostato congelando previamente el tejido.

De las láminas obtenidas se realizaron dos tinciones, la primera consistió en una tinción contraste con HyE, dejando la muestra 2.5 min en hematoxilina y 1.25 min en eosina.

1.9 Tinción de células RG2

Se realizó una tinción para evidenciar mediante inmunofluorescencia la presencia de HER-2 en células RG2, usando como anticuerpo primario anti HER-2, producido en conejo neu (C-18, Santa Cruz™ Biotechnology) y como anticuerpo secundario un anti-IgG producido en cabra acoplado a Alexa Fluor 488 (Invitrogen®), y se usó fluido de montaje conteniendo Dapi para contrastar los núcleos.

RESULTADOS

Construcción de vacunas

Inmunógeno de 45 aa de longitud.

Se sintetizó un péptido proveniente de una fracción de 45 aa de la región extracelular del receptor HER-2. Se realizó la construcción de la biblioteca variando los aminoácidos en las posiciones 5, 14, 21, 28, 30, 32 y 41, a esta combinación de péptidos se le denomina péptido biblioteca. Al péptido sin modificación se le denomina péptido nominal, estos péptidos se utilizaron únicamente durante el primer ensayo

SPETHLDMLRHLYQGCVVQGNLELTYLPANASLSFLQDIQEVQG

Epítos variables de la biblioteca:

SPETXLDMLRHLYXGCVVQXNLELTYXPXNXSLSFLQDIXEVQG

X= Cualquiera de los 20 aminoácidos esenciales.

La complejidad de la biblioteca es de 1.28×10^9 variantes posibles.

Inmunógeno de 9 aa de longitud en vector fago.

Se realizó la construcción de los inmunógenos expresados en el fago recombinante M13. La proteína pVIII de envoltura vírica se utilizó para ser fusionada con el epítipo inmunodominante derivado de la región extracelular del receptor HER-2 de una longitud de 9 aa sin alteraciones al cual se le denominó nominal, y con mutaciones inducidas en las posiciones 3, 5 y 7 se le nombró biblioteca.

Epítipo inmunodominante nominal:

T Y L P A N A S L

Epítos variables de la biblioteca:

T Y X P X N X S L

X= Cualquiera de los 20 aminoácidos esenciales.

La complejidad de la biblioteca es de 8,000 variantes posibles.

Se muestra el PCR realizado a las bacterias TG1 infectadas con los fagos que poseen los inmunógenos

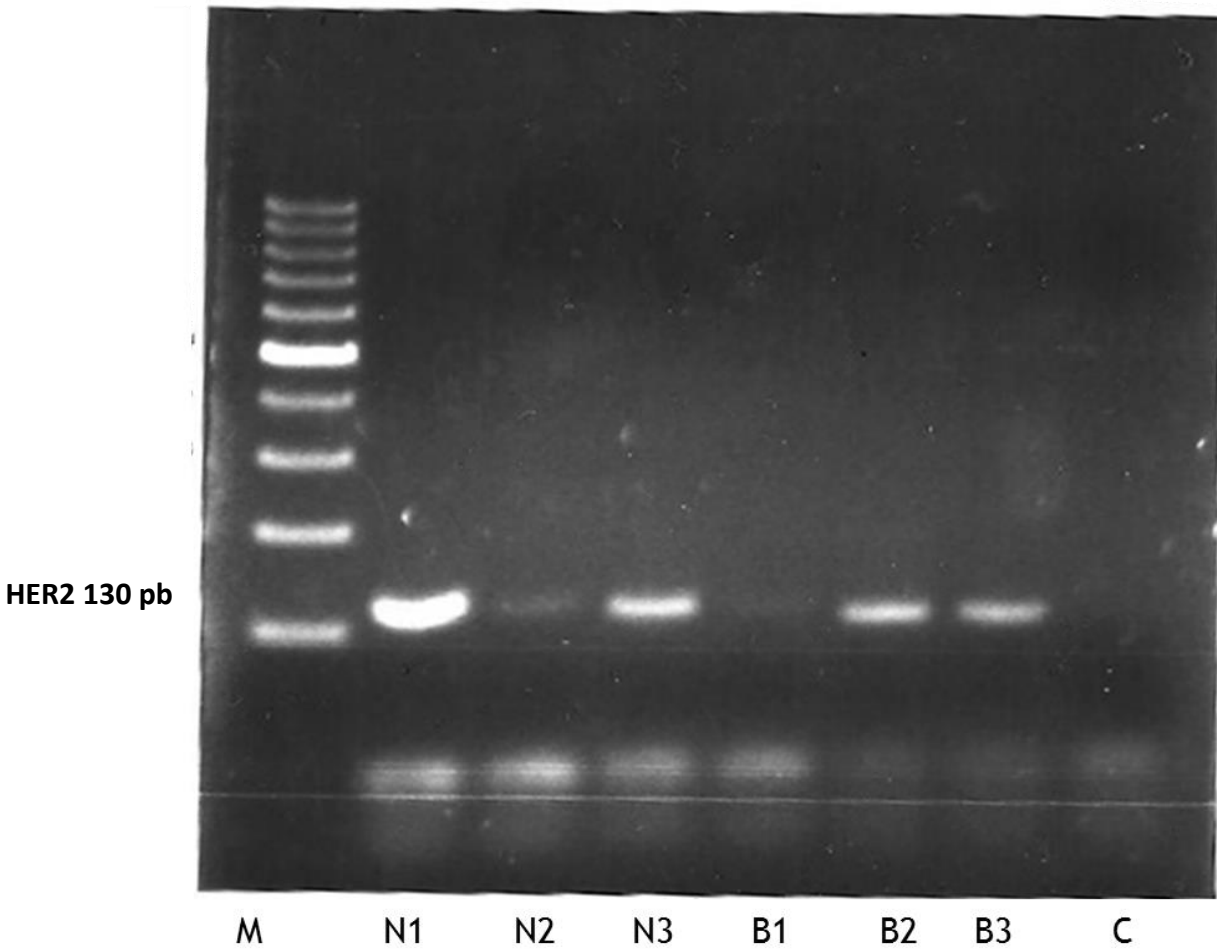


Figura 6 PCR de TG1 infectadas con el fago para evidenciar la presencia de HER-2. Ejemplo de clonas obtenidas de bacterias infectadas con el fago recombinante para el receptor HER-2, en el primer carril el marcador de peso molecular cada 100 pb, en los siguientes tres carriles DNA obtenido de clonas con el fragmento nominal del receptor proveniente de diferentes cultivos (N1-N3), y en los siguientes (B1-B3) DNA obtenido de las clonas con el fragmento biblioteca, en último carril (C) control negativo.

Se mandó a secuenciar el DNA obtenido de las clonas se analizó usando el programa Chromas 2.6.2, y el traductor de aminoácidos en línea ExpPAS. Se muestran los resultados de la secuencia y traducción. , 2 ejemplos de secuencias del tipo nominal HN1 y HN3, y un ejemplo HB2 del resultado de la secuenciación del fragmento que contiene la biblioteca.

```

HB2
CATGGTGTATATTACTGTGCGACTTATCTGCCTGTTAATTATAGTTTATGGGGGCAGGGAACCTAGGGATCC

catggtgtatattactgtgcgacttatctgcctgttaattatagtttatgggggcagggga
H G V Y Y C A , T Y L P V N Y S L , W G Q G
acctagggatcc
T - G S

HN1
CATGGTGTATATTACTGTGCGACTTATCTACCTGCTAATGCTAGTTTATGGGGCCAGGGAACCTAGGGATCC

catggtgtatattactgtgcgacttatctacctgctaataatgctagtttatggggccagggga
H G V Y Y C A , T Y L P A N A S L , W G Q G
acctagggatcc
T - G S

HN3
CATGGTGTATATTACTGTGCGACTTATCTACCTGCTAATGCTAGTTTATGGGGCCAGGGAACCT
A

catggtgtatattactgtgcgacttatctacctgctaataatgctagtttatggggccagggga
H G V Y Y C A , T Y L P A N A S L , W G Q G
accta

```

Figura 7 Resultados de la secuenciación Se observa que las secuencias provenientes de bacterias infectadas con fagos que contienen la secuencia nominal HN1 y HN3 no cuentan con ninguna mutación, mientras que en la secuencia proveniente de una clona infectada se muestran al menos dos mutaciones en los sitios antes mencionados.

Se realizó de igual manera la inmunofluorescencia para evidenciar la expresión de HER-2 en células RG2 en cultivo.

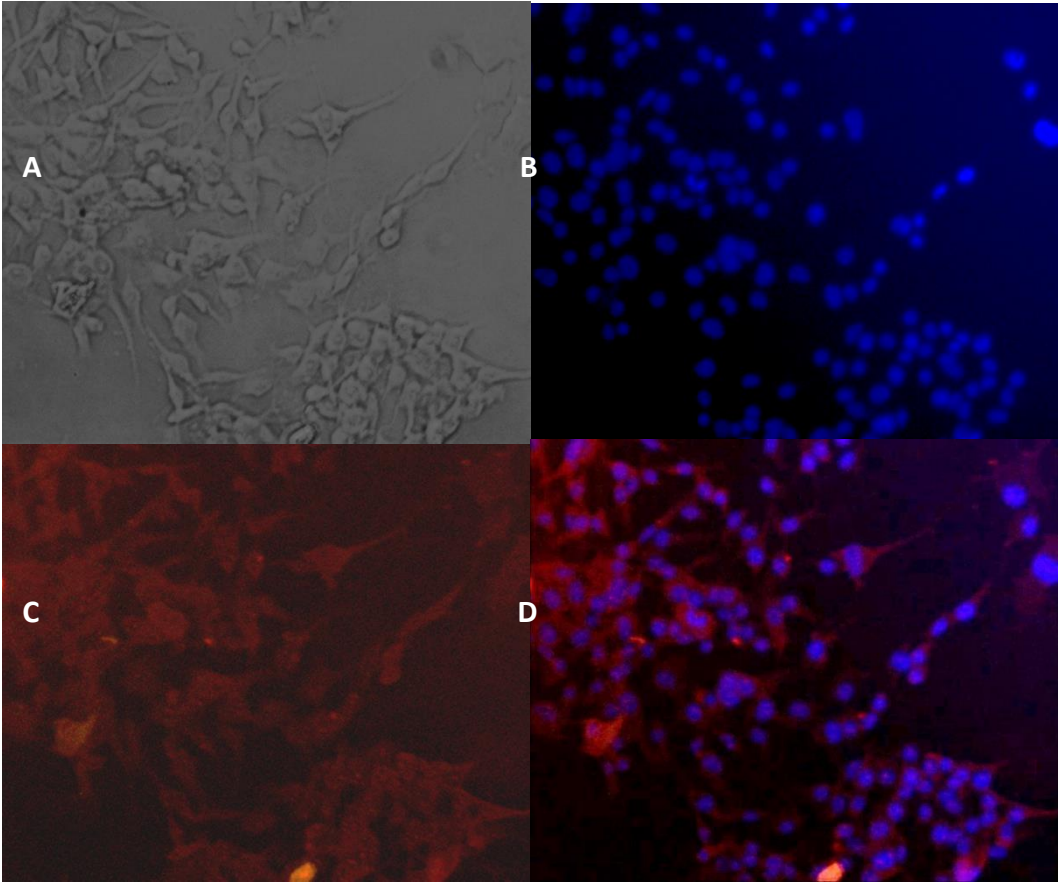


Figura 8 Tinción de RG2 para evidenciar la presencia de HER-2. A) Campo claro, B) DAPI que tiñe en color azul permitiendo ubicar las células, C) receptor HER en color rojo, y D) la superposición de las imágenes del receptor y el núcleo.



Figura 9. Cerebros de las ratas tratadas. Muestras de tejido recuperado donde se observa el cerebro completo, el tumor en un color más oscuro muestra una mayor cantidad de vascularización.

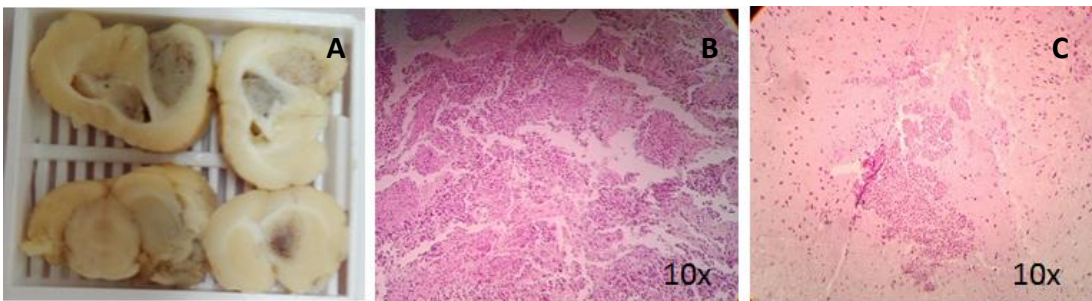


Figura 10. Tinción H&E A) muestra de tejido deshidratado donde se observa el tumor en un color oscuro, cortes transversales de la zona tumoral, B) tinción H&E de la parte central del tumor, y tinción H&E del perímetro del tumor, C) las células tumorales se observan pequeñas pleomorfas y más oscuras.

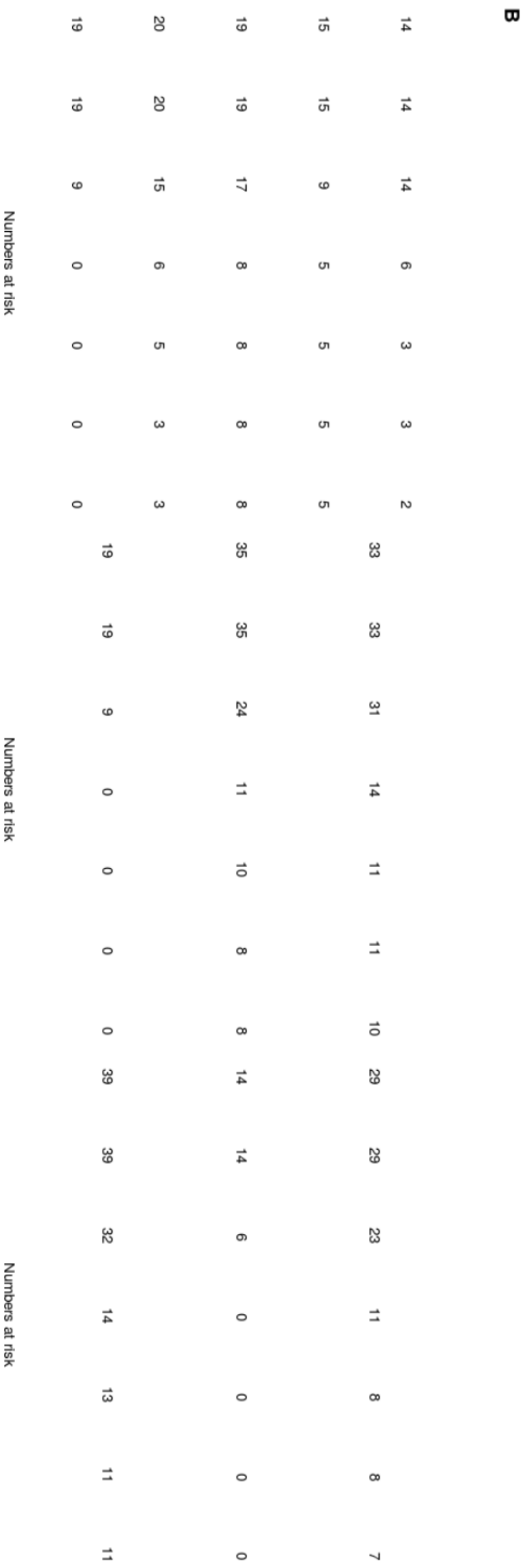
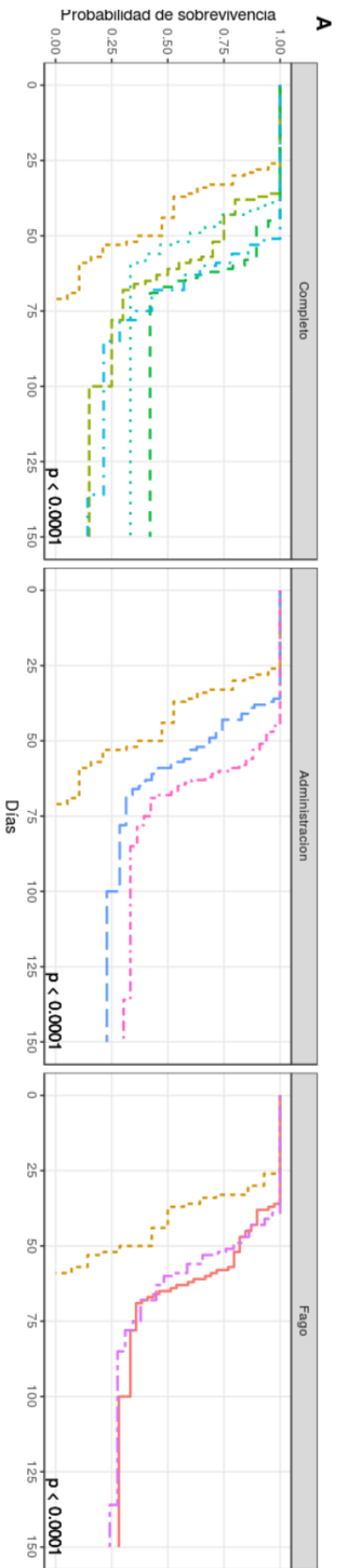


Figura 1 Sobrevida A) Se observan las curvas de sobrevida de Kaplan Meier de los grupos de tratamiento y el control en la gráfica con nombre “completo” y los valores de p después de aplicar la prueba long-rank, donde los diferentes grupos de tratamiento contra el control dan una diferencia estadísticamente significativa, se comparan los individuos de los tres experimentos realizados, debido a que los tres experimentos cumplen con las mismas condiciones experimentales. En la gráfica “Administración”, se comparan las vías de administración utilizadas a lo largo de los tres experimentos, después de aplicar la prueba long-rank nos da un valor de p significativo. En la gráfica “fago” se compara el fago con la secuencia nominal, contra el fago con la biblioteca contra el control y después de aplicar la prueba long-rank nos da un valor de p significativo. **B)** Se muestran los valores de las tablas de sobrevida con una diferencia de 5 días entre cada medición.

Muestras de tejido

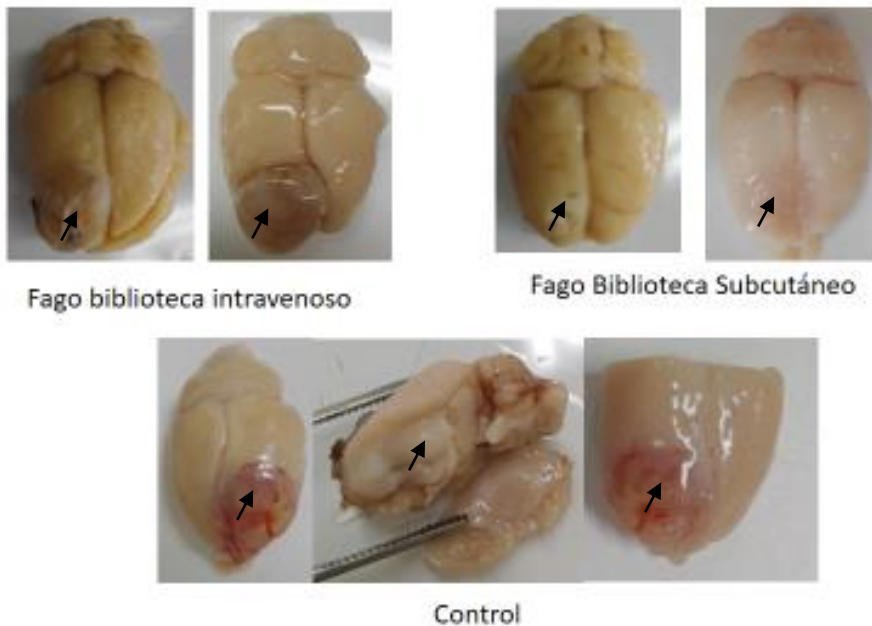


Figura 12. Muestras de tejido provenientes del segundo ensayo de sobrevida. Arriba dos muestras provenientes de ratas del grupo vacunado con fago biblioteca intravenosa, donde se aprecia el tumor a los 36 y 38 días respectivamente. Arriba a la derecha, muestras de ratas vacunadas con fago biblioteca subcutánea a los 62 y 65 días. Abajo ratas control de 29, 53 días.

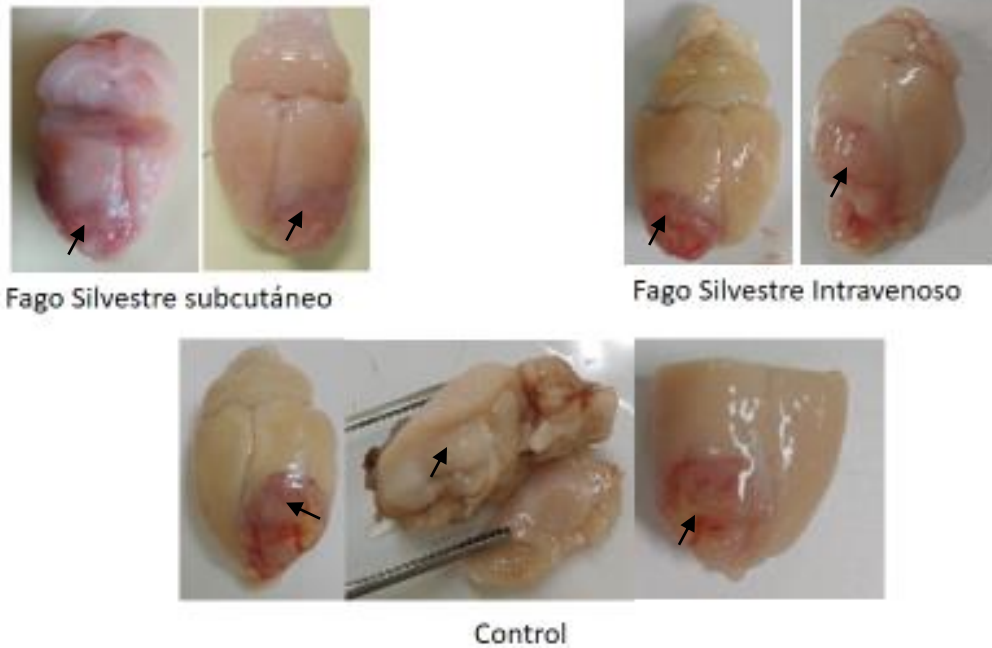


Figura 13. Muestras de tejido provenientes del segundo ensayo de sobrevivencia. Arriba dos muestras provenientes de ratas del grupo vacunado con fago recombinante que expresa el inmunógeno nominal administrado de forma subcutáneo, donde se aprecia el tumor a los 45 y 68 días respectivamente. Arriba a la derecha muestras de ratas vacunadas con fago nominal intravenoso a los 49 y 43 días. Abajo ratas control de 29, 53 días.

DISCUSIÓN

Es de suma importancia implementar terapias contra el cáncer que sean efectivas y que tengan una menor cantidad de efectos secundarios, asociados en especial en aquellos tipos de cáncer con una alta tasa de mortalidad como lo es glioblastoma, un padecimiento asociado a un pronóstico menor a dos años de sobrevida [Weitzner, M.1997, Peterson, D.2004, Meirrow, D., 2001].

Como alternativa de tratamiento surge la inmunoterapia donde las células del sistema inmune son capaces de reconocer y eliminar de forma selectiva a las células tumorales, [Cann, S. 2003]. Con este tipo de terapia se han visto tratamientos exitosos, con una toxicidad menor a la que presenta el tratamiento convencional [Hoption C.2003, Mellman, I.2011, Snook,2013].

En el presente estudio se probó el uso de vacunas hechas con un epítipo inmunodominante derivado de la molécula HER-2, la cual ha sido utilizada en el campo de la inmunoterapia [Yarden, Y. 2001] en numerosos tipos de cáncer. Las inmunoterapias contra esta molécula han sido aprobadas para el uso en pacientes, donde se han reportado casos de éxito aumentando la sobrevida y disminuyendo la progresión de la enfermedad [Cortés 2009]. El tratamiento propuesto en este trabajo, se enfoca a activar al sistema inmune y generar una respuesta, la cual influya sobre la progresión tumoral.

Para probar nuestra propuesta como una posible alternativa de tratamiento, se consideró importante evaluar el efecto de nuestra vacuna basada en epítipos variables de HER-2 sobre la sobrevida en un modelo de glioblastoma, mostrando una diferencia significativa de los grupos tratados contra el grupo control. Se observó si la vía de administración influía en la eficiencia de las vacunas, comparando las vías de administración contra el control, se obtuvo una diferencia estadísticamente significativa favoreciendo la vía de administración subcutánea. Se probó si había diferencia entre el fago con el epítipo nominal y el fago que contiene la biblioteca, la diferencia entre estos y el control es estadísticamente significativa; sin embargo, entre ambos fagos no hubo diferencia estadística, aunque se ve la clara tendencia del fago que contiene la

biblioteca administrado de forma subcutánea, el cual tiene mayor éxito al aumentar la sobrevida. Los estudios realizados se llevaron a cabo de forma independiente, manteniendo la misma tendencia.

CONCLUSIONES

El tratamiento con las vacunas de bibliotecas de epítomos variables, prolonga la sobrevida de las ratas en un modelo RG2, la vía de administración más eficiente es la subcutánea, pese a no tener diferencia significativa entre la biblioteca y el control, si hay una tendencia a mayor eficiencia de la biblioteca al aumentar la sobrevida, el uso de las bibliotecas permite tener un amplio repertorio de variantes de células T, por lo tanto no hay clonas que puedan favorecerse por poseer una variante del receptor, la técnica de despliegue en fago M13 es una técnica sencilla y económica. La vacunación con la biblioteca de forma subcutánea mostro un efecto protector, al aumentar la sobrevida de los animales de forma significativa, se plantea estudiar a fondo el mecanismo por el cual observamos este efecto, para en un futuro proponer como tratamiento la vacuna de bibliotecas basadas en un epítomo variable de HER-2

LITERATURA CITADA

Abbas, A. K., Lichtman, A. H., & Pillai, S. (2014). *Basic immunology: functions and disorders of the immune system*. Elsevier Health Sciences.

Adalberto Miranda-Filho, Marion Piñeros, Isabelle Soerjomataram, Isabelle Deltour, Freddie Bray (2017) *Cancers of the brain and CNS: global patterns and trends in incidence*, *Neuro-Oncology*, Volume 19, Issue 2, 1,270–280.

Agnihotri, S., Burrell, K. E., Wolf, A., Jalali, S., Hawkins, C., Rutka, J. T., & Zadeh, G. (2013). Glioblastoma, a brief review of history, molecular genetics, animal models and novel therapeutic strategies. *Archivum immunologiae et therapeuticae experimentalis*, 61(1), 25-41

Ahmed, N., Brawley, V. S., Hegde, M., Robertson, C., Ghazi, A., Gerken, C. & Gray, T. (2015). Human Epidermal Growth Factor Receptor 2 (HER2/HER-2)–Specific Chimeric Antigen Receptor–Modified T Cells for the Immunotherapy of HER2/HER-2-Positive Sarcoma. *Journal of Clinical Oncology*, 33(15), 1688-1696.

Ahmed, N., Ratnayake, M., Savoldo, B., Perlaky, L., Dotti, G., Wels, W. S. & Rooney, C. M. (2007). Regression of experimental medulloblastoma following transfer of HER2/HER-2-specific T cells. *Cancer research*, 67(12), 5957-5964.

Ahmed, N., Salsman, V. S., Kew, Y., Shaffer, D., Powell, S., Zhang, Y. J., & Gottschalk, S. (2010). HER2-specific T cells target primary glioblastoma stem cells and induce regression of autologous experimental tumors. *Clinical Cancer Research*, 16(2), 474-485.

Alifieris, C., & Trafalis, D. T. (2015). Glioblastoma multiforme: Pathogenesis and treatment. *Pharmacology & therapeutics*, 152, 63-82.

Bao, S., Wu, Q., McLendon, R. E., Hao, Y., Shi, Q., Hjelmeland, A. B. & Rich, J. N. (2006). Glioma stem cells promote radioresistance by preferential activation of the DNA damage response. *Nature*, 444(7120), 756.

Bazan, J Całkosiński, I., & Gamian, A. (2012). Phage display—A powerful technique for immunotherapy: 1. Introduction and potential of therapeutic applications. *Human vaccines & immunotherapeutics*, 8(12), 1817-1828.

Blank, C., Gajewski, T. F., & Mackensen, A. (2005). Interaction of PD-L1 on tumor cells with PD-1 on tumor-specific T cells as a mechanism of immune evasion: implications for tumor immunotherapy. *Cancer Immunology, Immunotherapy*, 54(4), 307-314.

Böttger, V., Böttger, A., Lane, B. E., & Spruce, B. A. (1995). Comprehensive Epitope Analysis of Monoclonal Anti-proenkephalin Antibodies using Phage Display Libraries and Synthetic Peptides: Revelation of Antibody Fine Specificities Caused by Somatic Mutations in the Variable Region Genes. *Journal of molecular biology*, 247(5), 932-946.

Bruttin, A., Brussow, H., (2005) Human volunteers receiving escherichia coli phage t4 orally, safety test of phage therapy . *Antimicrobial Agents Chemotherapy* 49:2874-8

Budihardjo, I., Oliver, H., Lutter, M., Luo, X., & Wang, X. (1999). Biochemical pathways of caspase activation during apoptosis. *Annual review of cell and developmental biology*, 15(1), 269-290.

Cann, S. H., Van Netten, J. P., & Van Netten, C. (2003). Dr William Coley and tumour regression: a place in history or in the future. *Postgraduate medical journal*, 79(938), 672-680. .

Carmeliet, P., & Jain, R. K. (2000). Angiogenesis in cancer and other diseases. *Nature*, 407(6801), 249.

Cortés, J., Baselga, J., Petrella, T., Gelmon, K., Fumoleau, P., Verma, S., & Gianni, L. (2009). Pertuzumab monotherapy following trastuzumab-based treatment: activity and tolerability in patients with advanced HER2-positive breast cancer. *Journal of Clinical Oncology*, 27(15S), 1022-1022.

Coulie, P. G., Van den Eynde, B. J., Van Der Bruggen, P., & Boon, T. (2014). Tumour antigens recognized by T lymphocytes: at the core of cancer immunotherapy. *Nature Reviews Cancer*, 14(2), 135-146.

Cruz, J. S. D., Lau, S. Y., Ramirez, E. M., De Giovanni, C., Forni, G., Morrison, S. L., & Penichet, M. L. (2003). Protein vaccination with the HER2/neu extracellular domain plus anti-HER2/neu antibody–cytokine fusion proteins induces a protective anti-HER2/neu immune response in mice. *Vaccine*, 21(13), 1317-1326.

Daniel S. Chen, Ira Mellman (2009), *Oncology Meets Immunology: The Cancer-Immunity Cycle*, In *Immunity*,39:1, 1-1.

Delmastro P, Meloa A, Monaci P, Cortese R, Galfre G. (1997) Immunogenicity of filamentous phage displaying peptide mimotopes after oral administration. *Vaccine*, 15:11, 1276-1285.

DeVita, V. T., & Chu, E. (2008). A history of cancer chemotherapy. *Cancer research*, 68(21), 8643-8653.

Disis, M. L., & Cheever, M. A. (1997). HER-2/neu protein: a target for antigen-specific immunotherapy of human cancer. *Advances in cancer research*, 71, 343-371.

Dong, H., Strome, S. E., Salomao, D. R., Tamura, H., Hirano, F., Flies, D. B., & Lennon, V. A. (2002). Tumor-associated B7-H1 promotes T-cell apoptosis: a potential mechanism of immune evasion. *Nature medicine*, 8(8), 793.

- Drake, C. G., Jaffee, E., & Pardoll, D. M. (2006). Mechanisms of immune evasion by tumors. *Advances in immunology*, 90, 51-81.
- Dunn, G. P., Bruce, A. T., Ikeda, H., Old, L. J., & Schreiber, R. D. (2002). Cancer immunoediting: from immunosurveillance to tumor escape. *Nature immunology*, 3(11), 991-998.
- Dunn, G. P., Fecci, P. E., & Curry, W. T. (2012). Cancer immunoediting in malignant glioma. *Neurosurgery*, 71(2), 201-223.
- Dunn, G. P., Koebel, C. M., & Schreiber, R. D. (2006). Interferons, immunity and cancer immunoediting. *Nature reviews. Immunology*, 6(11), 836.
- Dunn, G. P., Old, L. J., & Schreiber, R. D. (2004). The immunobiology of cancer immunosurveillance and immunoediting. *Immunity*, 21(2), 137-148.
- Esserman, L. J., Lopez, T., Montes, R., Bald, L. N., Fendly, B. M., & Campbell, M. J. (1999). Vaccination with the extracellular domain of p185 neu prevents mammary tumor development in neu transgenic mice. *Cancer Immunology, Immunotherapy*, 47(6), 337-342.
- Evan, G. I., & Vousden, K. H. (2001). Proliferation, cell cycle and apoptosis in cancer. *Nature*, 411(6835), 342-8.
- Fendly, B. M., Kotts, C., Vetterlein, D., Lewis, G. D., Winget, M., Carver, M. E. & Shepard, M. H. (1990). The extracellular domain of HER2/neu is a potential immunogen for active specific immunotherapy of breast cancer. *Journal of Immunotherapy*, 9(5), 449
- Fendly, B. M., Kotts, C., Vetterlein, D., Lewis, G. D., Winget, M., Carver, M. E., & Shepard, M. H. (1990). The extracellular domain of HER2/neu is a potential immunogen for active specific immunotherapy of breast cancer. *Journal of Immunotherapy*, 9(5).
- Furnari, F. B., Fenton, T., Bachoo, R. M., Mukasa, A., Stommel, J. M., Stegh, A., & Chin, L. (2007). Malignant astrocytic glioma: genetics, biology, and paths to treatment. *Genes & development*, 21(21), 2683-2710.
- Galluzzi, L., Vacchelli, E. et al. (2014). Classification of current anticancer immunotherapies. *Oncotarget*, 5(24), 12472-12508.
- Gil-Salú, J. L., López-Escobar, M., Román, P., Benítez, E., Maestro, E., & Pérez-Requena, J. (2004). Análisis de la supervivencia global al añadir temozolamida al tratamiento quirúrgico y radioterápico en pacientes con glioblastoma multiforme. *Neurocirugía*, 15(2), 144–150.
- Grakoui, A., Bromley, S. K., Sumen, C., Davis, M. M., Shaw, A. S., Allen, P. M., & Dustin, M. L. (1999). The immunological synapse: a molecular machine controlling T cell activation. *Science*, 285(5425), 221-227.
- Gross, S., & Walden, P. (2008). Immunosuppressive mechanisms in human tumors: Why we still cannot cure cancer. *Immunology Letters*, 116(1), 7–14.

- Grosu, A. L., Weber, W. A., Franz, M., Stärk, S., Piert, M., Thamm, R., & Nieder, C. (2005). Reirradiation of recurrent high-grade gliomas using amino acid PET (SPECT)/CT/MRI image fusion to determine gross tumor volume for stereotactic fractionated radiotherapy. *International Journal of Radiation Oncology• Biology• Physics*, 63(2), 511-519.
- Gutierrez, C., & Schiff, R. (2011). HER2: biology, detection, and clinical implications. *Archives of pathology & laboratory medicine*, 135(1), 55-62.
- Haen, S. P., & Rammensee, H. G. (2013). The repertoire of human tumor-associated epitopes—identification and selection of antigens and their application in clinical trials. *Current opinion in immunology*, 25(2), 277-283.
- Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2000). The hallmarks of cancer. *Cell*, 100(1), 57-70.
- Herbst, R. S. (2004). Review of epidermal growth factor receptor biology. *International Journal of Radiation Oncology Biology Physics*, 59(2), S21-S26.
- Hirayama, M., Genyeva, C., & Kaplan, J. (1996). Natural Killer Cell Recognition of “Self” and “Non-Self” Triggering Antigens on Normal Lymphoblasts. *Cellular Immunology*, 173(1), 33–48.
- Hirohashi, Y., Torigoe, T., Inoda, S., Takahashi, A., Morita, R., Nishizawa, S., & Sato, N. (2010). Immune response against tumor antigens expressed on human cancer stem-like cells/tumor-initiating cells. *Immunotherapy*, 2(2), 201-211
- Hoption Cann, S. A., van Netten, J. P., & van Netten, C. (2003). Dr William Coley and tumour regression: a place in history or in the future. *Postgraduate Medical Journal*, 79(938), 672–680.
- Hung, M. C., & Lau, Y. K. (1999). Basic science of HER-2/neu: a review. In *Seminars in oncology* 26 (4) 12, 51-59
- Iacob, G., & Dinca, E. B. (2009). Current data and strategy in glioblastoma multiforme. *Journal of medicine and life*, 2(4), 386.
- Iwasaki, A & Medzhitov, R. (2015). Control of adaptive immunity by the innate immune
- Johnstone, R. W., Ruefli, A. A., & Lowe, S. W. (2002). Apoptosis: a link between cancer genetics and chemotherapy. *Cell*, 108(2), 153-164.
- Jones, P. A., & Baylin, S. B. (2002). The fundamental role of epigenetic events in cancer. *Nature reviews. Genetics*, 3(6), 415.
- Jordan, C. T., Guzman, M. L., & Noble, M. (2006). Cancer stem cells. *New England Journal of Medicine*, 355(12), 1253-1261.
- Jordan, K. R., Buhrman, J. D., Sprague, J., Moore, B. L., Gao, D., Kappler, J. W., & Slansky, J. E. (2012). TCR hypervariable regions expressed by T cells that respond to effective tumor vaccines. *Cancer Immunology, Immunotherapy*, 61(10), 1627-1638.

- Kim, H. Y., Wang, X., Wahlberg, B., & Edwards, W. B. (2014). Discovery of hapten-specific scFv from a phage display library and applications for HER2-positive tumor imaging. *Bioconjugate Chemistry*, 25(7), 1311-1322.
- Kim, R., Emi, M., & Tanabe, K. (2007). Cancer immunoediting from immune surveillance to immune escape. *Immunology*, 121(1), 1-14.
- Kim, S., Iizuka, K., Aguila, H. L., Weissman, I. L., & Yokoyama, W. M. (2000). In vivo natural killer cell activities revealed by natural killer cell-deficient mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 97(6).
- Kobayashi, N., Allen, N., Clendenon, N. R., & Ko, L. W. (1980). An improved rat brain-tumor model. *Journal of Neurosurgery*, 53(6), 808-815.
- Loew, S., Schmidt, U., Unterberg, A., & Halatsch, M. E. (2009). The epidermal growth factor receptor as a therapeutic target in glioblastoma multiforme and other malignant neoplasms. *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry (Formerly Current Medicinal Chemistry-Anti-Cancer Agents)*, 9(6), 703-715.
- Lopez-Gonzalez, M. A., & Sotelo, J. (2000). Brain tumors in Mexico: characteristics and prognosis of glioblastoma. *Surgical Neurology*, 53(2), 157-162.
- Louis, D.N., Ohgaki, H, Wiestler, O.,D,, Cavenee, W.,K. (2007) WHO Classification of Tumours of the Central Nervous System. IARC Press, Lyon
- Makkouk, A., & Weiner, G. J. (2015). Cancer immunotherapy and breaking immune tolerance: new approaches to an old challenge. *Cancer research*, 75(1), 5-10.
- Manoutcharian, K. (2005). Bacteriophages as tools for vaccine and drug development. *Expert Review Of Vaccines*, 4(1), 5-7.
- Manoutcharian, K., Terrazas, L. I., Gevorkian, G., Acero, G., Petrossian, P., Rodriguez, M., & Govezensky, T. (1999). Phage-displayed T-cell epitope grafted into immunoglobulin heavy-chain complementarity-determining regions: an effective vaccine design tested in murine cysticercosis. *Infection And Immunity*, 67(9), 4764-4770.
- Mason, N. J., Gnanandarajah, J. S., Engiles, J. B., Gray, F., Laughlin, D., Gaurier-Hausser, A., & Paterson, Y. (2016). Immunotherapy with a HER2-targeting *Listeria* induces HER2-specific immunity and demonstrates potential therapeutic effects in a phase I trial in canine osteosarcoma. *Clinical Cancer Research*, 22(17), 4380-4390.
- Masui K, Cloughesy TF, Mischel PS. (2012) Molecular pathology in adult high-grade gliomas: from molecular diagnostics to target therapies. *Neuropathol Appl Neurobiol*. 38(3):271-291.
- McCarthy, E. F. (2006). The Toxins of William B. Coley and the Treatment of Bone and Soft-Tissue Sarcomas. *The Iowa Orthopaedic Journal*, 26, 154-158.
- McCarthy, E. F. (2006). The toxins of William B. Coley and the treatment of bone and soft-tissue sarcomas. *The Iowa orthopaedic journal*, 26, 154.

- Meirow, D., & Nugent, D. (2001). The effects of radiotherapy and chemotherapy on female reproduction. *Human reproduction update*, 7(6), 535-543.
- Mellman, I., Coukos, G., & Dranoff, G. (2011). Cancer immunotherapy comes of age. *Nature*, 480(7378), 480–489.
- Mineo, J. F., Bordron, A., Baroncini, M., Maurage, C. A., Ramirez, C., Siminski, R. M., & Hieu, P. D. (2007). Low HER2-expressing glioblastomas are more often secondary to anaplastic transformation of low-grade glioma. *Journal of neuro-oncology*, 85(3), 281-287.
- Mittendorf, E. A., Storrer, C. E., Shriver, C. D., Ponniah, S., & Peoples, G. E. (2006). Investigating the combination of trastuzumab and HER2/neu peptide vaccines for the treatment of breast cancer. *Annals Of Surgical Oncology*, 13(8), 1085-1098.
- Murphy, K., & Weaver, C. (2016). *Janeway's immunobiology*. Garland Science.
- Murphy, M. A., O'Leary, J. J., & Cahill, D. J. (2012). Assessment of the humoral immune response to cancer. *Journal Of Proteomics*, 75(15), 4573-4579.
- Nabekura, T., Nagasawa, T., Nakauchi, H., & Onodera, M. (2008). An immunotherapy approach with dendritic cells genetically modified to express the tumor-associated antigen, HER2. *Cancer Immunology, Immunotherapy*, 57(5), 611-622.
- Nagata, Y., Furugen, R., Hiasa, A., Ikeda, H., Ohta, N., Furukawa, K., & Shiku, H. (1997). Peptides derived from a wild-type murine proto-oncogene c-erbB-2/HER2/neu can induce CTL and tumor suppression in syngeneic hosts. *The Journal of Immunology*, 159(3), 1336-1343.
- Negrini, S., Gorgoulis, V. G., & Halazonetis, T. D. (2010). Genomic instability--an evolving hallmark of cancer. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 11(3), 220.
- Nencioni A, Grünenbach F, Patrone F, Brossart P. (2004) Anticancer vaccination strategies. *Annals of Oncology*, 15(4) 153-60.
- Nishimura, T., Iwakabe, K., Sekimoto, M., Ohmi, Y., Yahata, T., Nakui, M., & Ohta, A. (1999). Distinct role of antigen-specific T helper type 1 (Th1) and Th2 cells in tumor eradication in vivo. *The Journal Of Experimental Medicine*, 190(5), 617-628.
- NoeDominguez-Romero, A., Zamora-Alvarado, R., Servín-Blanco, R., Pérez-Hernández, E. G., Castrillon-Rivera, L. E., Munguia, M. E., Manoutcharian, K. (2014). Variable epitope library carrying heavily mutated survivin-derived CTL epitope variants as a new class of efficient vaccine immunogen tested in a mouse model of breast cancer. *Human Vaccines & Immunotherapeutics*, 10(11), 3201–3213.
- Norden AD, Young GS, Steayesh K, (2008). Bevacizumab for recurrent malignant gliomas: efficacy, toxicity, and patterns of recurrence. *Neurology*; 70:779–87.
- Okugawa, T., Ikuta, Y., Takahashi, Y., Obata, H., Tanida, K., Watanabe, M., & Shiku, H. (2000). A novel human HER2-derived peptide homologous to the mouse Kd-restricted tumor rejection antigen can induce HLA-A24-restricted cytotoxic T lymphocytes in

ovarian cancer patients and healthy individuals. *European Journal Of Immunology*, 30(11), 3338-3346.

Olayioye, M. A. (2001). Intracellular signaling pathways of ErbB2/HER-2 and family members. *Breast Cancer Research*, 3(6), 385.

Parkin, J., & Cohen, B. (2001). An overview of the immune system. *The Lancet*, 357(9270), 1777-1789.

Peczuh, M. W., & Hamilton, A. D. (2000). Peptide and protein recognition by designed molecules. *Chemical Reviews* 100(7), 2479-2494.

Pedroza-Roldan, C., Charles-Niño, C., Saavedra, R., Govezensky, T., Vaca, L., Avannis-Aghajani, E., & Manoutcharian, K. (2009). Variable epitope library-based vaccines: Shooting moving targets. *Molecular immunology*, 47(2), 270-282.

Peterson, D. E., & Cariello, A. (2004). Mucosal damage: a major risk factor for severe complications after cytotoxic therapy. In *Seminars in oncology* 31, 35-44.

Potten, C., & Wilson, J. (2004). *Apoptosis: the life and death of cells*. Cambridge University Press.

Rabinovich, G. A., Gabrilovich, D., & Sotomayor, E. M. (2007). Immunosuppressive strategies that are mediated by tumor cells. *Annu. Rev. Immunol.*, 25, 267-296.

Rabinovich, G. A., Gabrilovich, D., & Sotomayor, E. M. (2007). Immunosuppressive Strategies that are Mediated by Tumor Cells. *Annual Review of Immunology*, 25(1), 267–296.

Rodi, D. J., & Makowski, L. (1999). Phage-display technology—finding a needle in a vast molecular haystack. *Current opinion in biotechnology*, 10(1), 87-93.

Rosenberg, S. A., Yang, J. C., & Restifo, N. P. (2004). Cancer immunotherapy: moving beyond current vaccines. *Nature Medicine*, 10(9), 909.

Rotte, A., & Bhandaru, M. (2016). Mechanisms of Immune Evasion by Cancer. In *Immunotherapy of Melanoma*, 199-232.

Sadetzki, S., Chetrit, A., Freedman, L., Stovall, M., Modan, B., & Novikov, I. (2005). Long-term follow-up for brain tumor development after childhood exposure to ionizing radiation for tinea capitis. *Radiation research*, 163(4), 424-432.

Seki, N., Brooks, A. D., Carter, C. R., Back, T. C., Parsonault, E. M., Smyth, M. J., & Sayers, T. J. (2002). Tumor-specific CTL kill murine renal cancer cells using both perforin and Fas ligand-mediated lysis in vitro, but cause tumor regression in vivo in the absence of perforin. *The Journal of Immunology*, 168(7), 3484-3492.

Smith GP. (1985). Filamentous fusion phage: novel expression vectors that display cloned antigens on the virion surface. *Science*; 228:1315 – 7

- Smyth, M. J., Dunn, G. P., & Schreiber, R. D. (2006). Cancer immunosurveillance and immunoediting: the roles of immunity in suppressing tumor development and shaping tumor immunogenicity. *Advances in Immunology*, 90, 1-50.
- Snook, A. E., & Waldman, S. A. (2013). *Advances in Cancer Immunotherapy*. *Discovery Medicine*, 15(81), 120–125.
- Stutman, O. (1974). Tumor development after 3-methylcholanthrene in immunologically deficient athymic-nude mice. *Science*, 183(4124), 534-536.
- Thakkar, J. P., Dolecek, T. A., Horbinski, C., Ostrom, Q. T., Lightner, D. D., Barnholtz-Sloan, J. S., & Villano, J. L. (2014). Epidemiologic and molecular prognostic review of glioblastoma. *Cancer Epidemiology Biomarkers and Prevention*, 23(10), 1985-1996.
- Thomas, S., Sharma, N., Golden, E. B., Cho, H., Agarwal, P., Gaffney, K. J., & Schönthal, A. H. (2012). Preferential killing of triple-negative breast cancer cells in vitro and in vivo when pharmacological aggravators of endoplasmic reticulum stress are combined with autophagy inhibitors. *Cancer letters*, 325(1), 63-71.
- Van den Boorn, J. G., & Hartmann, G. (2013). Turning tumors into vaccines: co-opting the innate immune system. *Immunity*, 39(1), 27-37.
- Vermeulen, K., Van Bockstaele, D. R. and Berneman, Z. N. (2003), The cell cycle: a review of regulation, deregulation and therapeutic targets in cancer. *Cell Proliferation*, 36: 131–149.
- Vile, R. G., Castleden, S., Marshall, J., Camplejohn, R., Upton, C., & Chong, H. (1997). Generation of an anti-tumour immune response in a non-immunogenic tumour: HSVtk killing in vivo stimulates a mononuclear cell infiltrate and a Th1-like profile of intratumoural cytokine expression. *International Journal of Cancer*, 71(2), 267-274.
- Vogel, C. L., Cobleigh, M. A., Tripathy, D., Gutheil, J. C., Harris, L. N., Fehrenbacher, L., & Shak, S. (2002). Efficacy and safety of trastuzumab as a single agent in first-line treatment of HER2-overexpressing metastatic breast cancer. *Journal of Clinical Oncology*, 20(3), 719-726.
- Weitzner, M. A., & Meyers, C. A. (1997). Cognitive functioning and quality of life in malignant glioma patients: a review of the literature. *Psycho-Oncology*, 6(3), 169-177.
- Wen, P. Y., & Reardon, D. A. (2016). Neuro-oncology in 2015: Progress in glioma diagnosis, classification and treatment. *Nature Reviews Neurology*, 12 (2), 69–70.
- Wesseling, P., & Capper, D. (2017). WHO 2016 Classification of Gliomas. *Neuropathology and Applied Neurobiology*.
- Whiteside, T. L. (2010). Immune responses to malignancies. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 125(2), S272-S283.
- Yarden, Y. The EGFR family and its ligands in human cancer: signalling mechanisms and therapeutic opportunities. *European journal of cancer*, 37, 3-8

Zeng Q, Li Y, Zhou J, Chen Y, et al (2011). Identification of phage display peptides with affinity for the tegument of *Schistosoma japonicum* schistosomula, *Molecular and Biochemical Parasitology*; 180:86-98

Zhang, C., Burger, M. C., Jennewein, L., Genßler, S., Schönfeld, K., Zeiner, P. & Steinbach, J. P. (2015). ErbB2/HER2-specific NK cells for targeted therapy of glioblastoma. *Journal of the National Cancer Institute*, 108(5),