



UNIVERSIDAD DE CONCEPCIÓN

Dirección de Postgrado

Facultad de Ciencias Biológicas

Programa de Doctorado en Ciencias Biológicas, Área Biología Celular y Molecular

Modulación de la respuesta inmune contra el autoantígeno humano MUC16 mediante la co-activación con el ligando del receptor CD40.

CATHERINE DENISSE MEZA FRANCO

CONCEPCIÓN-CHILE 2021

Tesis para optar al grado de Doctora en Ciencias Biológicas área Biología Celular y Molecular.

Profesor Guía y Patrocinante: Dr. Jorge Roberto Toledo Alonso

Depto. de Fisiopatología

Facultad de Ciencias Biológicas

Universidad de Concepción

Esta tesis ha sido realizada en el Departamento de Fisiopatología de la Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad de Concepción.

Profesores integrantes Comisión Evaluadora:

Dr. Jorge R Toledo Alonso
Profesor Guía y Patrocinante
Facultad de Ciencias Biológicas

Dr. Jorge Fuentealba Arcos
Facultad de Ciencias Biológicas



Dra. Violeta Morín Muñoz
Facultad de Ciencias Biológicas

Dra. María Bono Merino
Profesora Evaluadora externa
Universidad de Chile

Dr. Ariel Castro Alma
Programa Doctorado en Ciencias Biológicas
Área Biología Celular y Molecular



Este trabajo está dedicado a mis padres Sonia y Eduardo . Por ser mi motor y ejemplo de lucha. Por siempre confiar en mi.

A Ruddy Morales Balvoa, mi compañero incondicional. Sin duda tu inmenso apoyo y amor fueron fundamentales para concluir este proceso con éxito .

1. TABLA DE CONTENIDOS

1.	TABLA DE CONTENIDOS.....	iv
2.	ÍNDICE DE FIGURAS.....	x
3.	ÍNDICE DE TABLAS.....	xiv
4.	ABREVIATURAS.....	xv
5.	RESUMEN.....	xviii
6.	SUMMARY.....	xxi
7.	INTRODUCCIÓN.....	1
7.1	Antecedentes Generales.....	1
7.2	Cáncer y Sistema Inmune.....	2
7.3	Inmuno-edición del Cáncer.....	5
7.3.1	Eliminación.....	5
7.3.2	Equilibrio.....	7
7.3.3	Escape.....	8
7.5	Mucinas.....	14
7.6	Mucina 16 (MUC16).....	18
7.6.1	Bioquímica y Estructura de MUC16.....	19
7.6.2	Función biológica de MUC16.....	23

7.6.3	Función biológica de MUC16 en la tumorigénesis	24
7.6.4	MUC16 como blanco terapéutico.....	27
7.7	Inmunoterapia contra células tumorales.....	28
7.8	CD40/CD40L.....	34
7.9	Señalización CD40/CD154 en células dendríticas	36
8.	PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN.....	38
9.	HIPOTESÍS.....	40
10.	OBJETIVOS.....	41
10.1	Objetivo General	41
10.2	Objetivos Específicos.....	42
10.2.1	Generar candidatos vacunales basados en el antígeno MUC16 y la molécula co-estimuladora CD154 expresados en cultivos celulares de mamíferos mediante transducción con vectores adenovirales recombinantes.....	42
10.2.1	Evaluar el efecto de la respuesta inmune inducida por los candidatos vacunales de forma preventiva y terapéutica en modelos murinos enfrentados a células tumorales que expresan MUC16.	43
11	MATERIALES Y METODOS.....	44
11.1.1	Líneas celulares	44
11.1.2	Cepas bacterianas	44

11.1.3 Plásmidos	45
11.1.4 Soluciones	46
11.2. Métodos.....	47
11.2.1. Técnicas básicas para el manejo de ADN	47
11.3 Técnicas básicas para el manejo y cultivo de células de mamífero	52
11.3.1 Condiciones de cultivo	52
11.3.2 Cambio de medio.....	52
11.3.3 Propagación.....	52
11.3.4 Transfección en cultivos celulares	53
11.4 Generación de vectores adenovirales	53
11.4.1 Generación de genomas adenovirales recombinantes	53
11.4.2 PCR de los plásmidos adenovirales recombinantes	56
11.4.3 Generación de viriones adenovirales recombinantes.....	56
11.4.4 Amplificación de Vectores Adenovirales	57
11.4.5 Titulación de los Vectores Adenovirales	57
11.5 Transducción adenoviral en cultivo de células de carcinoma cérvico- uterino humano	58
11.5.1 Expresión de proteínas recombinantes en cultivos celulares mediada por vectores adenovirales	58

11.6 Técnicas generales de manipulación e identificación de proteínas	58
11.6.1 Precipitación de proteínas con deoxicolato de sodio – ácido tricloroacético.....	58
11.6.2 Electroforesis en gel desnaturalizantes de poliacrilamida	59
11.6.3 Electro-transferencia de proteínas a partir de geles de poliacrilamida.....	59
11.6.4 Inmuno-identificación de proteínas mediante Western blot.....	60
11.6.5 Cuantificación de Proteínas	61
11.7 Obtención de proteína recombinante desde medio de cultivo de células SiHa	61
11. 7.1 Purificación de las proteínas recombinantes	61
11.8 Determinación de dosis y vía de administración en modelos murinos C57BL/6 enfrentados al antígeno MUC16.....	62
11.8.1 Modelo animal.....	62
11.8.2 Formulación de los candidatos vacunales	63
11.9 Desarrollo de un modelo de implante de células tumorales murinas establemente transformadas para la expresión de MUC16.....	63
11.9.1 Obtención de vector de expresión en mamíferos del fragmento C-terminal de MUC16.	63

11.9.2 Transfección en cultivos celulares mediante el protocolo de Polietilenimina (PEI).....	64
11.9.3 Selección de clones establemente transformados.....	65
11.9.4 Determinación de la expresión de MUC16 en la superficie celular	66
11.9.5 Implantación tumoral <i>in vivo</i>	66
11.10 Respuesta inmune inducida por los candidatos vacunales de forma preventiva y terapéutica en modelos murinos enfrentados a células tumorales que expresan MUC16.....	67
11.10.1 Ensayos de ELISA para la detección de los títulos de inmunoglobulinas IgG y subclases IgG1 e IgG2a en suero de ratón	67
11.10.2 PCR en tiempo real para la detección de citoquinas IL-10, IL-6, IL-12 y VEGF expresadas en el tejido tumoral	68
11.11 Análisis estadístico	69
12.2 Construcción de los plásmidos adenovirales pAd-MUC16his, pAdCD154his y pAd-MUC16/CD154his.....	75
12.3 Amplificación de los vectores adenovirales en la línea complementaria HEK-293A.	85
12.5 Purificación de los candidatos vacunales mediante cromatografía de afinidad para ensayos de inmunogenicidad.....	92

12.6	Desarrollo de un modelo de implante de células tumorales murinas establemente transformadas para la expresión de MUC16.....	99
12.6.1	Ensayo de implantación tumoral.....	103
12.7	Evaluación de los parámetros de la respuesta inmune celular o humoral específica para el antígeno MUC16.	106
12.7.1	Determinación respuesta inmune humoral mediante tratamiento preventivo.....	109
12.7.2	Determinación respuesta inmune humoral mediante tratamiento terapéutico	118
12.8	Evaluación de la respuesta inmune celular inducida por los candidatos vacunales.....	126
12.9	Evaluación del crecimiento tumoral a partir de los implantes de células murinas que expresan el antígeno MUC16 en ratones hembra C57BL/6 inmunizados con los antígenos de forma preventiva o terapéutica	131
15.	BIBLIOGRAFÍA.....	149

2. ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Representación esquemática del concepto de inmunoección del cáncer. 4	
Figura 2. Representación estructural de MUC16.	22
Figura 3. Esquema del mecanismo de las vacunas autoantigénicas en la eliminación del tumor.	33
Figura 4. Representación esquemática de la recombinación homóloga utilizando el sistema comercial AdEasy™-Vector System	55
Figura 5: Diseño secuencias de los candidatos vacunales.	74
Figura 6: Construcción del vector de transferencia recombinante pAdtrackCD154his.	76
Figura 7: Construcción del plasmidio PblueMUC16his.	78
Figura 8: Construcción del vector de transferencia recombinante pAdtrackMUC16his/CD154.	80
Figura 9: Generación del vector adenovirales pAdEASYCD154his.	83
Figura 10: Generación del vector adenovirales pAdEASYMUC16his/CD154. ...	84
Figura 11: Amplificación de los vectores adenovirales en la línea celular complementaria HEK-293A.	87
Figura 12: Transducción de los vectores adenovirales en la línea celular SiHa.	

Figura 13. Análisis de expresión de las proteínas recombinantes en células SiHa. 91	
Figura 14. Análisis de purificación de la proteína MUC16his recombinante expresada en células SiHa.	93
Figura 15. Análisis de purificación de la proteína CD154his recombinante expresada en células SiHa.	94
Figura 16. Purificación de la proteína MUC16his/CD154his recombinante expresada en células SiHa.	98
Figura 17. Detección de la expresión de MUC16 en membrana celular de la línea de melanoma MB16F10 mediante northern blot y citometría de flujo.	102
Figura 18. Representación gráfica del ensayo de implantación tumoral.	104
Figura 19. Evaluación de la sobrevida de ratones implantados con las líneas tumorales MB16F10MUC16 y MB16F10.	105
Figura 20. Esquema de inmunización en ratones para el tratamiento preventivo de los candidatos vacunales.	108
Figura 21. Esquema de inmunización para el tratamiento terapéutico de los candidatos vacunales.	108
Figura 22: Curso temporal de los niveles inmunoglobulina G total anti-MUC16 en ratones hembra C57B/L6 inmunizados con los diferentes candidatos vacunales bajo tratamiento preventivo.	111

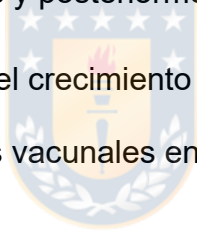
Figura 23: Curso temporal de los niveles inmunoglobulina G1 total anti-MUC16 en ratones hembra C57B/L6 inmunizados con los diferentes candidatos vacunales bajo tratamiento preventivo.....	113
Figura 24: Curso temporal de los niveles inmunoglobulina G2a total anti-MUC16 en ratones hembra C57B/L6 inmunizados con los diferentes candidatos vacunales bajo tratamiento preventivo.....	115
Figura 25: Títulos de anticuerpos IgG total anti-MUC16 en ratones hembra C57B/L6 inmunizados con los diferentes candidatos vacunales bajo tratamiento preventivo.	117
Figura 26: Curso temporal de los niveles inmunoglobulina G1 total anti-MUC16 en ratones hembra C57B/L6 inmunizados con los diferentes candidatos vacunales bajo tratamiento terapéutico.	119
Figura 27: Curso temporal de los niveles inmunoglobulina G1 total anti-MUC16 en ratones hembra C57B/L6 inmunizados con los diferentes candidatos vacunales bajo tratamiento terapéutico.	121
Figura 28: Curso temporal de los niveles inmunoglobulina G2a total anti-MUC16 en ratones hembra C57B/L6 inmunizados con los diferentes candidatos vacunales bajo tratamiento terapéutico.	123
Figura 29: Títulos de anticuerpos IgG total anti-MUC16 en ratones hembra C57B/L6 inmunizados con los diferentes candidatos vacunales bajo tratamiento terapeutico.	125

Figura 30. Expresión de citoquinas en los tumores desarrollados en ratones inmunizados con los diferentes candidatos vacunales bajo el tratamiento preventivo. 128

Figura 31. Expresión de citoquinas en los tumores desarrollados en ratones inmunizados con los diferentes candidatos vacunales bajo el tratamiento terapéutico. 130

Figura 32: Curso temporal del crecimiento tumoral de los grupos inmunizados con los diferentes candidatos vacunales en tratamiento preventivo. Los animales fueron inmunizados y posteriormente inoculados con células..... 133

Figura 33: Curso temporal del crecimiento tumoral de los grupos inmunizados con los diferentes candidatos vacunales en tratamiento terapéutico. 135



3. ÍNDICE DE TABLAS

Tabla N°1. Oligonucleótidos específicos utilizados como cebadores para la amplificación del gen MUC16 mediante PCR.	56
Tabla N°2. Descripción de grupos experimentales para la evaluación de la respuesta inmune de los candidatos vacunales.....	63
Tabla N°3: Secuencias de partidores diseñados para evaluar respuesta inmune celular por PCR en tiempo real.	69



4. ABREVIATURAS

ADN	Ácido desoxirribonucleico
ARN	Ácido ribonucleico
CAR	Receptor de coxsackievirus y adenovirus, del inglés
CD154	Ligando del receptor CD40
CD40	Receptor de la superfamilia de factor de necrosis tumoral
CTL	Linfocito T Citotóxico
IgG	Inmunoglobulina G
IgG1	Variante de la inmunoglobulina G
IgG2a	Variante de la inmunoglobulina G en murinos
DMEM	Medio Mínimo Esencial Dulbecco
<i>E. coli</i>	Escherichia coli
EGFR	Receptor del Factor de Crecimiento Epidérmico
EMT	Transición Epitelio Mesenquimal
FDA	Administración de alimentos y medicamentos
GFP	Proteína Fluorescente Verde
HPLC	Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia
hTPA	Activador tisular del plasminógeno humano
IMAC	Cromatografía de afinidad de metales inmovilizados
INF- γ	Interferón γ
IL-1 β	Interleucina 1 β

IL-2	Interleucina 2
IL-6	Interleucina 6
IL-10	Interleucina 10
Kan	Kanamicina
mAB	Anticuerpo Monoclonal
MHC I	Complejo Mayor de Histocompatibilidad de tipo I
MHC II	Complejo Mayor de Histocompatibilidad de tipo II
MOI	Multiplicidad de infección
MUC	Mucina
MUC16	Mucina 16 humana
mg	Miligramos
ml	Mililitros
ng	Nanogramos
OMS	Organización Mundial de la Salud
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa
PBL	Linfocitos de sangre periférica
qRT-PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa Cuantitativa con trasciptasa reversa
SDS-PAGE	Electroforesis en gel desnaturalizante de poliacrilamida- dodecil sulfato de sodio
TAA	Antígeno Asociado a Tumor
TSA	Antígeno Especifico de Tumor

TGF- β	Factor de Crecimiento Transformante β
Th1	Linfocitos T cooperadores de tipo 1
Th2	Linfocitos T cooperadores de tipo 2
Th17	Linfocitos T cooperadores de tipo 17
TIL	Linfocitos infiltrantes de tumor
TNF- α	Factor de Necrosis Tumoral α
TNF-R	Receptor del Factor de Necrosis Tumoral
ul	Microlitros
uM	Micromolar
UFC	Unidades formadoras de color
UV	Ultravioleta
VNTR	Número Variable de Repeticiones en Tándem

5. RESUMEN

El estudio de las patologías asociadas al desarrollo y progresión de tumores malignos tiene un componente inmunológico relevante. La literatura pertinente ha crecido en forma exponencial desde 1970 hasta la fecha, tanto en el enfoque experimental como en el clínico. La sospecha de que los organismos vivos intentan de alguna manera defenderse de un proceso maligno ha encontrado apoyo en numerosos hechos experimentales y clínicos que hoy en día sustentan la teoría de la inmuoedición del cáncer, dando paso al desarrollo de tratamientos basados en inmunoterapia.

Estas terapias aprovechan las características del sistema inmune para tratar o prevenir enfermedades. A grandes rasgos, significa estimular o atenuar biológicamente el sistema inmune de los pacientes para lograr una reacción dirigida contra tumores o patógenos que provocan una enfermedad determinada o bien la tolerancia de células inmunes hacia lo propio. La tolerancia inmunológica representa una problemática en la búsqueda de alternativas terapéuticas contra el cáncer, debido en parte, a que la mayoría de los antígenos expresados por las células tumorales no son exclusivos de él, sino que corresponden a antígenos de diferenciación de tejidos que también se expresan en células normales. Estos son conocidos como auto-antígenos, y están bajo el control de la auto-tolerancia inmunológica. Ejemplo de lo anterior es la mucina 16 (MUC16), una proteína altamente glicosilada que se expresa normalmente en el epitelio de diversos órganos y cuya función primaria es hidratar, proteger y lubricar estas superficies. Sin embargo, esta proteína también se ha encontrado

sobreexpresada en diversos tipos de cáncer, donde cumple una función como antígeno asociado a tumor y como oncoproteína, favoreciendo el crecimiento de células tumorales, la motilidad y la invasión celular.

Hasta la fecha se han desarrollado múltiples inmunoterapias dirigidas contra MUC16. La efectividad terapéutica antitumoral observada con estos tratamientos y los efectos secundarios, generalmente leves, asociados al bloqueo de esta proteína, mantienen abierta la posibilidad de continuar investigando en otras estrategias de inmunoterapia antígeno-específica contra esta mucina. Una aproximación que podría romper la barrera de la inmunotolerancia es la inmunoterapia dirigida a la co-activación de células dendríticas (CDs), debido a la dualidad de estas células de activar tanto el sistema inmune innato como el adaptativo. Una estrategia para ello sería orientar antígenos tumorales a receptores expresados en CDs, como el CD40. Este receptor participa en la inducción de la maduración de CDs, en la activación de linfocitos T y en la inducción de la respuesta tipo TH1, siendo estos, procesos esenciales para superar la barrera de inmunotolerancia y así, regular la progresión tumoral.

En base a lo anterior, el objetivo del presente trabajo de tesis fue la generación de una formulación vacunal que permitiera incrementar significativamente el nivel y persistencia de la respuesta inmune contra el autoantígeno MUC16 humano. Para ello se construyeron candidatos vacunales quiméricos, basados en el autoantígeno MUC16 y la molécula co-estimuladora CD40 ligando (CD154), estos se expresaron en cultivos celulares de mamíferos mediante transducción con vectores adenovirales. Las proteínas recombinantes producidas fueron utilizadas para inocular ratones C57bl6 que generaron tumores con expresión de

antígeno MUC16 mediante tratamiento profiláctico y tratamiento terapéutico. Mediante este análisis se logró determinar que el candidato vacunal quimérico proveniente del antígeno tumoral humano MUC16 y de la molécula co-estimuladora CD154 producido en un modelo de carcinoma cervicouterino (células SiHa), y cuya utilización fue eficientemente demostrada en modelos de ratones bajo un esquema de tratamiento preventivo, promueve una asociación sinérgica, que incrementa significativamente el nivel efector de la respuesta inmune contra el antígeno MUC16.



6. SUMMARY

The study of pathologies associated to both development and progression of malignant tumors has a relevant immunologic component. Related literature has grown exponentially since 1970, both in its experimental and clinical focus. The suspect that living organisms try to, in some way, defend themselves from a malignant process has found sustain in several experimental and clinical facts that today support cancer immunoediting theory, leading to development of treatments based in immunotherapy.

These therapies take advantage of immune system features to either treat or prevent disease. Roughly, it means to biologically stimulate or attenuate the immune system of a patient in order to achieve a directed reaction against tumors or pathogens that either provoke a determined disease or immune cells tolerance towards one's own. Immunogenic tolerance represents a problem in the search of therapeutic alternatives against cancer, in part due to, that majority of antigens expressed by tumoral cells are not exclusive from it, but correspond to differentiation tissue antigens that also are expressed in normal cells. These are known as self-antigens and are under control of the immunologic self-tolerance. An example of the latter is mucine 16 (MUC16), a highly glycosylated protein that is normally expressed in several tissue epithelium, and whose primary function is to hydrate, protect, and lubricate these surfaces. Nevertheless, has also being found overexpressed in diverse cancer types, where it has a function as antigen associated to tumor and as oncoprotein, favoring tumoral cells growth, motility, and cell invasion.

Until this days, multiple immunotherapies directed against MUC16 has been developed. Antitumoral therapeutic effectiveness observed in these treatments, and their generally mild secondary effects, associated to the blockage of this protein keep an open door to the possibility of maintain research of other strategies of immunotherapy antigen-specific against this mucin. An approach that could break immunotolerance barrier is the immunotherapy aimed to co-activation of dendritic cells (DCs), due to duality of these cells to activate both the innate as the adaptative immune system. A strategy for this is to aim tumoral antigens toward receptors expressed in DCs, as the CD40. This receptor participates in the induction of the maturation of DCs, activation of T lymphocytes, and induction of type TH1 responses, being these essential processes to surpass the immunotolerance barrier, and in this manner regulate tumoral progression.

Based on the before mentioned, the objective of this thesis research was the generation of a vaccinal formulation that allow us to significantly increase both level and persistence of the immune response against the human antigen MUC16. For this, chimeric vaccinal candidates were constructed, based in the self-antigen MUC16 and the co-stimulatory molecule CD40 ligand (CD154), these were expressed in mammal cell cultures through transduction with adenoviral vectors. Produced recombinant proteins were used to inoculate C57bl6 mice that generated tumors with expression of MUC16 antigen by a prophylactic treatment and a therapeutic treatment. Through this analysis was possible to determine that the chimeric vaccinal candidate coming from human tumoral antigen MUC16 and the co-stimulatory molecule CD154 produced in a cervix-uterine carcinoma model (SiHa cells), and whose use was efficiently demonstrated in mice models under a

preventive treatment schematic, promotes a synergistic association that significantly increase the effector level of the immune response against MUC16 antigen.



7. INTRODUCCIÓN

7.1 Antecedentes Generales

El cáncer comprende un conjunto de enfermedades relacionadas que comparten como característica común el desarrollo desequilibrado de algunas células del cuerpo que se dividen sin control, permitiéndoles invadir los tejidos cercanos o extenderse a otras partes del cuerpo (NationalCancerInstitute 2015). Esta patología es una de las causas más comunes de morbilidad y mortalidad, con un total de 18,1 millones de nuevos casos y 9,6 millones de muertes según las cifras informadas por Globocan, durante el año 2018 a nivel mundial (Cancer 2018). Una estimación realizada por la Agencia Internacional para Investigación en Cáncer (IARC) en conjunto con la Organización Mundial de la Salud (OMS) predijo que habrán 21,6 millones de nuevos casos y 13,0 millones de muerte para el año 2030 a nivel mundial (Ferlay, Soerjomataram et al. 2015). Por otra parte, la tasa de mortalidad en los países más desarrollados son un 15% más alta en hombres y 8% más en mujeres en comparación a las tasas en países con un menor índice de desarrollo (Ferlay, Soerjomataram et al. 2015). Este análisis define al rápido crecimiento social y económico como un factor preponderante en el incremento de nuevos casos de cáncer en países más desarrollados e industrializados y se proyectó un aumento de la carga de la enfermedad debido al crecimiento y envejecimiento de la población y a la adopción de comportamientos y factores que producen cáncer (Torre, Bray et al. 2015). Significativos recursos materiales, financieros y humanos se dedican a la investigación de la biología del cáncer. La validación de biomarcadores, el desarrollo de novedosos métodos para el diagnóstico y la terapia, la

implementación de programas de pesquisa a nivel poblacional y la promoción de estilos de vida saludables han impactado positivamente en la prevención y control de este grupo de enfermedades. Sin embargo, el cáncer sigue siendo un problema de salud mundial, entre otros factores, por la compleja relación que se establece entre el sistema inmune del hospedero y las células neoplásicas (Gasparri, Ruscito et al. 2017).

7.2 Cáncer y Sistema Inmune.

La idea de que el sistema inmune puede controlar de forma natural el cáncer ha sido objeto de debate por más de un siglo. Paul Ehrlich, a principios de 1900, fue uno de los primeros en determinar que el cáncer podría ser muy común en organismos de vida larga si no fuera por los efectos protectores de la inmunidad (Ehrlich 1909). Tomaría cerca de 50 años antes que la idea de control inmune del cáncer resurgiera, debido en gran parte por un mayor entendimiento del sistema inmune y la demostración de la existencia de antígenos de tumor (Old and Boyse 1964). Estos antecedentes permitieron que Macfarlane Burnet y Lewis Thomas volvieran a abordar el tema de la protección inmune natural contra el cáncer. Considerando que los nuevos antígenos específicos de las células tumorales podrían provocar una reacción inmunológica efectiva que eliminaría el desarrollo de tumores (Burnet 1957). Sin embargo, cuando esta predicción se validó con pruebas experimentales utilizando ratones desnudos no obtuvieron evidencia convincente. Por esta razón la idea de la inmunovigilancia del cáncer quedó pausada hasta la década de los 90, donde nuevos estudios impulsados por avances tecnológicos en genética murina y producción de anticuerpos

monoclonales (mAb) revitalizaron y finalmente validaron este concepto. Estos experimentos permitieron demostrar, por ejemplo, que los ratones inmunosuprimidos utilizados en los ensayos que pretendía poner a prueba la validez de la teoría de la inmunovigilancia era un modelo imperfecto de inmunodeficiencia ya que estos animales producen un número bajo pero detectable de poblaciones funcionales de células T, por lo tanto, podían manifestar al menos cierto grado de inmunidad adaptativa. Además, el sistema inmune adaptativo residual en presencia de un sistema inmune innato completamente funcional podía proporcionar al ratón inmunodeficiente al menos alguna capacidad de inmunovigilancia del cáncer por lo que estos nuevos hallazgos permitieron incorporar las contribuciones de la inmunidad tanto innata como adaptativa en el modelo de inmunovigilancia (Smyth, Crowe et al. 2001, Dunn, Bruce et al. 2002).

En las últimas décadas, ha habido un reconocimiento creciente de que la inmunovigilancia representa sólo una dimensión de la compleja relación entre el sistema inmune y el cáncer (Dunn, Old et al. 2004, Schreiber, Old et al. 2004). Por ejemplo, se demostró que el sistema inmune también puede promover la aparición de tumores primarios con inmunogenicidad reducida, que evaden el reconocimiento y la destrucción inmune. Este proceso, hoy es considerado como un sello distintivo del cáncer (Shankaran, Ikeda et al. 2001, Hanahan and Weinberg 2011). Esta nueva evidencia, provocó un refinamiento del concepto de inmunovigilancia del cáncer, lo que condujo a la formulación de la Hipótesis de Inmunoedición del Cáncer, proceso que, en su encarnación más compleja, procede secuencialmente a través de tres fases distintas: Eliminación, Equilibrio

y Escape. Estas fases enfatizan la doble acción de la inmunidad, la que por una parte es protectora del huésped y, por otra parte, puede promover el desarrollo tumoral (Dunn, Old et al. 2004) (Fig. 1).

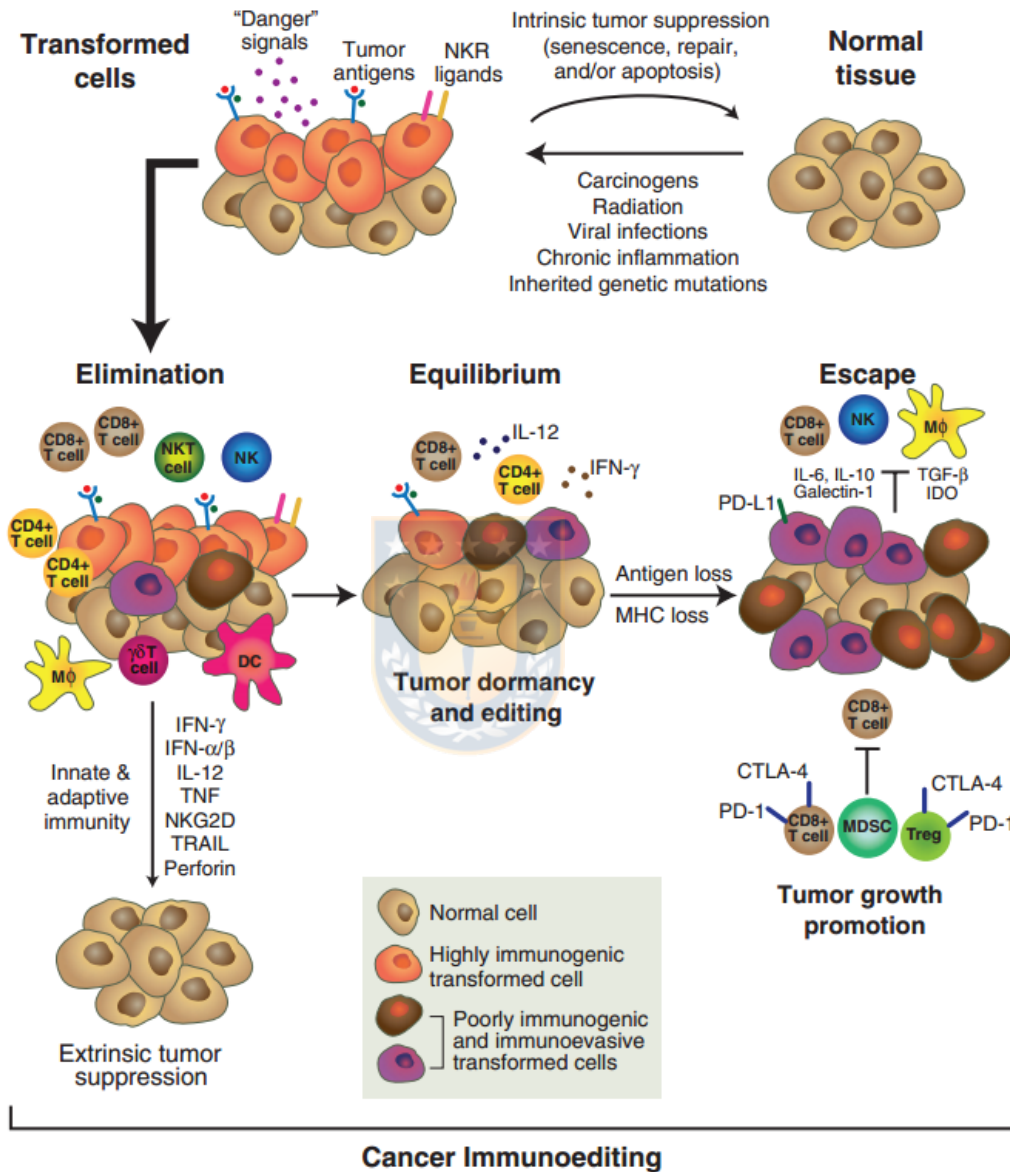


Figura 1. Representación esquemática del concepto de inmunoedición del cáncer. En la figura se puede apreciar las tres fases que caracterizan el mecanismo; eliminación, equilibrio y escape. Imagen modificada de "Response to 'A cancer immunosurveillance controversy'." Nature Immunology 5(1): 4-5.

7.3 Inmuno-edición del Cáncer.

7.3.1 Eliminación.

La primera fase o “eliminación”, es una mirada moderna de la inmuno-vigilancia, Si durante esta fase se logra erradicar con éxito el tumor en desarrollo representa el proceso completo de inmuno-edición, sin progresión a las fases posteriores.

El inicio de la respuesta inmune antitumoral ocurre cuando las células del sistema inmune innato se alertan de la presencia de un tumor en crecimiento, al menos en parte debido a la disrupción del tejido local que ocurre como resultado de los procesos de remodelación estromal integrales a la fisiología básica del desarrollo de tumores sólidos. Esta remodelación estromal podría ser el resultado de dos de las seis "características del cáncer" (Hanahan and Weinberg 2000): la angiogénesis (Carmeliet and Jain 2000) y el crecimiento invasivo de los tejidos (Sternlicht and Werb 2001). La remodelación estromal inducida durante estos procesos produce moléculas proinflamatorias que, junto con las quimioquinas producidas por las propias células tumorales (Vicari and Caux 2002), atraen a células del sistema inmune innato a esta nueva fuente de "peligro" local (Matzinger 1994, Wrenshall, Stevens et al. 1999). Este reconocimiento lleva a un aumento en la producción de interferón gama (IFN- γ), el cual es crítico para la progresión de la respuesta antitumoral.

En el segundo paso, los efectos del reconocimiento del tumor por el sistema inmune innato se amplifican. La cantidad inicial de IFN- γ liberado en el sitio del tumor induce la producción local de quimiocinas que reclutan más células del sistema inmune innato al tumor. Los productos generados durante la remodelación de la matriz extracelular pueden inducir la expresión de interleucina

12 (IL-12) por los macrófagos infiltrantes de tumores (Hodge-Dufour, Noble et al. 1997), lo que estimulan a las células *natural killer* (NK) infiltrantes de tumores a producir bajas cantidades de IFN- γ . A su vez, esta producción de IFN- γ activan a los macrófagos en el tumor para producir más IL-12, lo que conlleva a un aumento de la producción de IFN- γ por las células NK. Esta retroalimentación da a lugar a efectos antiproliferativos (Bromberg, Horvath et al. 1996), proapoptóticos (Kumar, Commane et al. 1997) y angiostáticos (Qin and Blankenstein 2000), provocando la destrucción de una parte del tumor.

En el tercer paso, los antígenos tumorales liberados como resultado de la acción de la inmunidad innata sobre el tumor impulsan el desarrollo de respuestas inmunes adaptativas específicas del tumor. Las CD inmaduras que se han reclutado en el sitio del tumor, se activan por la exposición a citoquinas del medio producidas por el efecto de la respuesta inmune innata o por interacción con células NK infiltrantes de tumor (Gerosa, Baldani-Guerra et al. 2002). Las CD maduras activadas que portan antígenos tumorales, migran posteriormente al nódulo linfático (Sallusto, Mackay et al. 2000), donde inducen la activación de linfocitos T CD4⁺ Th1 específicos (Huang, Golumbek et al. 1994).

Finalmente, el desarrollo de la inmunidad adaptativa específica de tumor (cuarto paso) proporciona al huésped la capacidad de eliminar por completo el tumor en desarrollo. Células T CD4⁺ y CD8⁺ participarán en la destrucción de células tumorales antígeno-positivas. Por su parte, células T CD4⁺ producirán IL-2 que ayuda a mantener la función y la viabilidad de las células T CD8⁺ específicas para el tumor. Las células T CD8⁺ específicas para tumor reconocerán de

manera eficaz sus objetivos tumorales e inducirán la muerte celular tumoral (Shankaran, Ikeda et al. 2001).

La fase de eliminación de la inmunoección del cáncer es un proceso continuo que debe repetirse cada vez que surgen células neoplásicas antigénicamente distintas (nuevos antígenos o antígenos sobre expresados).

7.3.2 Equilibrio.

La inmunovigilancia y destrucción del tumor representa sólo una dimensión de la compleja relación entre el sistema inmune y el cáncer, ya que ciertas células tumorales pueden sobrevivir a la fase de eliminación entrando a la segunda etapa del proceso de inmunoección, denominada fase de "Equilibrio". Durante esta etapa, el sistema inmune adaptativo previene la extensión de las células tumorales, lo que da como resultado final una nueva población de clones tumorales con inmunogenicidad reducida, extraída desde una población parental heterogénea producto del modelado realizado por el sistema inmune. El equilibrio es probablemente la más larga de las tres fases y puede ocurrir en un período de muchos años en humanos. De hecho, se ha estimado que para muchos tumores humanos sólidos puede haber un intervalo de 20 años entre la exposición inicial al carcinógeno y la detección clínica del tumor (Loeb and Christians 1996). Durante este período, la heterogeneidad y la inestabilidad genética de las células tumorales que sobreviven a la fase de eliminación, son posiblemente los factores que les permiten resistir el asedio inmunológico del huésped (Loeb 1991).

Los mecanismos moleculares que inducen la persistencia del tumor mediada por el sistema inmunitario son poco conocidos, debido principalmente a que esta fase ha sido difícil de modelar en ratones y en humanos se ha descrito sólo de forma

anecdótica. Un escenario clínico que puede ilustrar la fase de equilibrio en humanos es la transmisión del cáncer en trasplantes, desde donantes a receptores. En estos casos, los órganos del donante no presentan evidencia alguna de presencia de cáncer, sin embargo, al momento de ser trasplantados al organismo receptor, desarrollan esta patología. Si bien posteriormente se descubre que algunos donantes albergaban enfermedades en otros sitios anatómicos, otros donantes de trasplantes, en cambio, no presentan antecedentes clínicos de cáncer o han estado en remisión duradera antes del trasplante. Por ejemplo, se informó la aparición de melanoma metastásico durante 1 o 2 años después del trasplante en dos receptores que recibieron riñones del mismo donante. Tras análisis posteriores, se encontró que el donante había sido tratado por melanoma primario 16 años antes de que sus riñones fueran donados, pero se consideró libre de tumor en el momento de su muerte (MacKie, Reid et al. 2003). Esta observación, junto con otras que aparecen en la literatura clínica (Birkeland, Storm et al. 1995, Pham, Kormos et al. 1995, Myron Kauffman, McBride et al. 2002, Zeier, Hartschuh et al. 2002, Morath, Mueller et al. 2004), sugiere que la supresión farmacológica de los sistemas inmunitarios de estos receptores de trasplantes facilitó el crecimiento rápido y progresivo de tumores ocultos que previamente se habían mantenido en la fase de equilibrio mediante el sistema inmunitario competente del donante.

7.3.3 Escape.

Finalmente existen células tumorales que logran evadir el reconocimiento inmune y/o destrucción inmunológica, surgiendo como tumores progresivamente crecientes y visibles. A este proceso se le denomina "Escape". Esta alteración de

las defensas inmunes del huésped ocurre muy probablemente cuando los cambios genéticos y epigenéticos adquiridos por la célula tumoral, le otorgan la capacidad de evadir el reconocimiento y/o eliminación inmunitaria. Esto facilita la expansión de los tumores, la metástasis y que se vuelvan clínicamente detectables (Dunn, Old et al. 2004).

Debido a que la red de inmunovigilancia del cáncer involucra compartimentos del sistema inmune innato y adaptativo, los tumores tendrían que eludir ambos mecanismos de la inmunidad para lograr un crecimiento progresivo. De esta forma, las células tumorales pueden emplear múltiples estrategias inmunoevasivas. Por lo tanto, es probable que se produzcan múltiples eventos distintos de modelación tumoral inmunológicamente guiados antes de que finalmente se establezca el fenotipo inmunogénico de una célula maligna (Malmberg 2004).

El escape de células tumorales puede ocurrir a través de mecanismos diferentes (Khong and Restifo 2002, Vesely, Kershaw et al. 2011). A nivel de células tumorales, ocurren alteraciones que conducen a una reducción del reconocimiento inmunitario (como la pérdida de antígenos) o a un aumento de la resistencia frente a los efectos citotóxicos de la inmunidad. Sin embargo, la pérdida de expresión de un antígeno tumoral es uno de los mecanismos de escape mejor estudiados y de mayor relevancia con respecto a su contribución en el desarrollo tumoral. Este mecanismo puede ocurrir al menos de tres maneras: (i) a través de la aparición de células tumorales que carecen de expresión de antígenos de rechazo fuerte (antígenos específicos de tumor, solo expresados en células tumorales), (ii) mediante de la pérdida del complejo de

histocompatibilidad principal (MHC) de clase I que presentan estos antígenos a células T específicas de tumores, o (iii) asociado a la pérdida de la función de procesamiento de antígenos dentro de la célula tumoral, necesaria para producir el epítipo antigénico y cargarlo en la molécula MHC de clase I. Todas estas alteraciones probablemente se deben a una combinación de inestabilidad genética inherente a todas las células tumorales y al proceso de inmunoselección (Dunn, Bruce et al. 2002, Khong and Restifo 2002). El resultado final es la generación a través de un proceso de selección darwiniana de variantes de células tumorales poco inmunogénicas que se vuelven "invisibles" al sistema inmunológico y, por lo tanto, adquieren la capacidad de crecer progresivamente. Alternativamente, el escape puede resultar del establecimiento de un estado inmunosupresor dentro del microambiente tumoral (Radoja, Rao et al. 2000).

Se ha vuelto cada vez más claro que tanto la explotación de los mecanismos inmunitarios como la evasión de la vigilancia inmunitaria son habilidades que las células cancerígenas deben adquirir en su camino hacia la formación de un tumor, por lo tanto, el estudio de los mecanismos y de los participantes de este proceso ofrece la oportunidad de aprender a implementar medidas de compensación específicas para revertir la situación a favor del sistema inmunológico y, eventualmente, del paciente. En este punto la utilización de antígenos de tumor en terapias contra el cáncer se ofrece como una alternativa atractiva ya que son participantes claves del desarrollo tumoral (Patel, Kaufman et al. 2017).

7.4 Antígenos tumorales.

La inmunoterapia del cáncer tiene el objetivo de distinguir el tejido sano del tejido tumoral, basándose en la capacidad del sistema inmunológico de diferenciar entre células normales y malignas a través de la detección de antígenos de tumor. El primer hito para el desarrollo de esta estrategia fue el descubrimiento del epítipo de antígeno de tumor de la proteína MAGE-1 en melanoma reactivo para células T (Brasseur, Marchand et al. 1992, Traversari, van der Bruggen et al. 1992). El segundo hito fue que el melanoma y los tumores sólidos contienen infiltraciones de linfocitos T citotóxicos (CTL, por sus siglas en inglés) específicos del tumor y de células T auxiliares CD4+ denominadas “linfocitos infiltrantes del tumor” (TIL) (Dudley, Wunderlich et al. 2003). Juntos, estos datos respaldaron la hipótesis de que las células tumorales expresan antígenos que se distinguen de las células normales, y que podrían generarse respuestas inmunes efectivas en contra de dichos antígenos. En base a lo anterior, el concepto de “antígeno tumoral” engloba a epítopes que deben ser reconocido por células efectoras inmunes específicos y/o anticuerpos, y deben ser expresados por células tumorales. Entre los antígenos tumorales, algunos pueden ser específicos del tumor, mientras que otros también pueden ser expresados por tejidos normales. Se ha identificado un gran número de péptidos antigénicos reconocidos por CTL antitumorales. Estos antígenos se clasifican de acuerdo con el patrón de expresión del gen parental. De esa forma podemos encontrar antígenos con alta especificidad tumoral (TSAs) y antígenos con baja especificidad tumoral (TAA). Los TSA o específicos de tumor poseen como característica principal la expresión de antígenos únicos, que son exclusivos del tumor y, por lo tanto, no están

presentes en ningún tejido normal. De esta forma proteínas alteradas que se originan a partir de mutaciones genéticas y proteínas de fusión que surgen de las aberraciones cromosómicas en las células tumorales son la fuente de nuevos antígenos que son reconocidos por células T CD4 y CD8 (Bocchia, Korontsvit et al. 1996, Wang, Wang et al. 1999, van den Broeke, Pendleton et al. 2006, Graf, Heidel et al. 2007, Monjazeb, Hsiao et al. 2012, Yang, Jeang et al. 2014, Patel, Kaufman et al. 2017). Dado que la acumulación de alteraciones genéticas es una característica de las células cancerígenas, se puede suponer que cada tumor expresa múltiples de estos antígenos únicos, por lo que, aparentemente, cumplirían con los criterios para presentarse como dianas ideales para la inmunoterapia del cáncer. Sin embargo, su orientación terapéutica aún estaría limitada a un subconjunto muy pequeño de pacientes debido a la restricción péptido-MHC. Por ejemplo, un antígeno mutado que se diferencia de la proteína nativa por un solo aminoácido podría dar lugar a un neo-epítotope presentado por un sólo alelo MHC. Estos antígenos se presentan principalmente en las etapas tempranas del desarrollo tumoral (etapa de eliminación) y al ser más inmunogénicos son fácilmente detectados, por lo que la célula tumoral podría eliminarlos en las etapas más avanzadas de la progresión como método de escape, dificultando la utilización de este tipo de antígenos para tratamientos exitosos de inmunoterapia. En esta clasificación podemos encontrar antígenos de proteínas virales, antígenos derivados de mutaciones puntuales y antígenos codificados por genes germinales del cáncer (Strausberg, Simpson et al. 2004). Por otra parte, a principios de los años 90, ocurrió un cambio fundamental en el entendimiento de la inmunología del tumor. Múltiples observaciones llevaron a la

conclusión de que la mayoría de los antígenos expresados por células tumorales no fueron necesariamente nuevos antígenos, sino más bien antígenos de diferenciación de tejidos también expresados en células normales (Rosenberg 1999, Boon, Coulie et al. 2006). Estos se denominaron Antígenos con baja especificidad tumoral o TAAs. Estos se distinguen de las proteínas de células normales por características distintas en sus niveles de expresión o localización. La distribución de estos antígenos en tejidos normales es heterogénea; algunos se expresan sólo en ciertos tejidos normales, mientras que otros pueden detectarse de forma ubicua. Experimentos *in vitro* demostraron que las células T que responden a estos antígenos no reaccionan frente a las células normales, probablemente debido al muy bajo nivel de expresión del antígeno. Nuevamente, se puede suponer que los mecanismos centrales y periféricos actúan eficazmente en el repertorio de células T específicas del antígeno para mantener la tolerancia propia (Redmond and Sherman 2005, Gallegos and Bevan 2006, Kyewski and Klein 2006, Lee, Epardaud et al. 2006, Nichols, Chen et al. 2007). Esta tolerancia puede ser evitada en el caso de una sobreexpresión de varios cientos de veces y con el aumento subsiguiente en la presentación de un antígeno dado (Zinkernagel and Hengartner 2001).

Los TAA están estrechamente relacionados con el pronóstico y la recurrencia del cáncer ya que, por un lado, protegen a las células tumorales de los factores estresantes del tratamiento y por otro, tienen un valor significativo para controlar el progreso de la enfermedad, mejorando el diagnóstico, predicción y pronóstico del cáncer (Yang, Jeang et al. 2014). Esto se ha identificado mediante la detección de cambios en la concentración de la proteína en el suero de pacientes

con la enfermedad, lo que los convierte en marcadores biológicos idóneos debido a una expresión altamente estable del antígeno en las células tumorales. Cabe destacar que los péptidos derivados de varias proteínas sobreexpresadas pueden ser reconocidos por linfocitos T CD4 y CD8 específicos (Probst-Kepper, Stroobant et al. 2001, Godefroy, Moreau-Aubry et al. 2005). Dentro del grupo de antígenos asociados a tumores encontramos por ejemplo, al antígeno específico de la próstata (PSA) (Basu, Majhi et al. 2003, Peracaula, Tabarés et al. 2003), y el antígeno carcinoembrionario (CEA) (Macdonald 1999); y en ciertos tumores epiteliales usualmente se sobre-producen glicoproteínas de mucinas, como la mucina 1 (MUC1) (Cai, Huang et al. 2012) y la Mucina 16 (MUC16, también conocido como CA125) (Kui Wong, Easton et al. 2003), las que actualmente son utilizadas como marcadores de diagnóstico de cáncer (Hollingsworth and Swanson 2004, Fortner, Damms-Machado et al. 2017, Hoshino, Nagata et al. 2017, Perisetti, Bellamkonda et al. 2020).

7.5 Mucinas.

El moco es una secreción adherente compleja que recubre todos los órganos que están en contacto con el entorno externo. Esta secreción, tiene una función importante en la respuesta inmunitaria innata; está compuesta de agua, sales y una serie de proteínas que forman un producto viscoelástico (Bansil and Turner 2006). Entre estos componentes destaca la familia de glicoproteínas de las mucinas, que corresponden al elemento funcional y estructural más representativo. Las mucinas protegen el epitelio del daño químico, enzimático y mecánico, ya que, por su naturaleza mucoadhesiva se adhieren a otras sustancias mediante enlaces de hidrógeno, interacciones hidrofóbicas y

electrostáticas, que resultan en la formación de agregados de gel (Corfield 2015, Wagner, Wheeler et al. 2018).

Las mucinas se clasifican, según su estructura y localización, en dos tipos: mucinas secretadas y mucinas unidas a membrana. Las mucinas secretadas, que incluyen a MUC 2, 5AC, 5B, 6, 7, 8, 9 y 19, forman una capa protectora sobre los órganos que están en contacto con el ambiente externo y crean una barrera física en forma de mucus que provee protección a las células epiteliales que forman parte del tracto respiratorio, gastrointestinal, y de las superficies de conductos de algunos órganos, tales como el hígado, mama, páncreas y riñón (Behera, Praharaj et al. 2015).

Adicionalmente, en las mucinas unidas a membrana podemos encontrar a MUC 1, 3A, 3B, 4, 11, 12, 13, 15, 16, 17, 20 y 21 (Andrianifahanana, Moniaux et al. 2006). Este tipo de mucinas conforman el grupo más amplio dentro de esta familia y, debido a su ubicación y tamaño, contribuyen al glicocalix que se encuentra en las superficies de las mucosas de todo el cuerpo. A diferencia de las mucinas secretadas, las mucinas unidas a membrana no forman geles y debido a su ubicación en la superficie celular, los dominios de mucina presentan un glicoarreglo en el espacio extracelular, que está disponible para una amplia variedad de interacciones en este entorno (Chen, Hung et al. 2013, Lakshmanan, Seshacharyulu et al. 2015, Lakshmanan, Rachagani et al. 2016).

Ambos tipos de mucinas comparten características estructurales y composición, basadas en su secuencia proteica subyacente gobernada por la misma familia de genes. En humanos, se han identificado alrededor de 21 genes de mucina (designados como MUC) clonados y secuenciados parcialmente, y se han

identificado genes homólogos, muchos de ellos en ratones y ratas (Perez-Vilar and Hill 1999, Andrianifahanana, Moniaux et al. 2006, Rose and Voynow 2006).

Las mucinas son glicoproteínas extracelulares de gran tamaño, con pesos moleculares que van desde 0,5 a 20 MDa, altamente glicosiladas y compuestas aproximadamente en un 80% de carbohidratos. Las cadenas de oligosacáridos de esta familia de proteínas corresponden en gran medida a glicosilaciones del tipo –O, conformadas por 5–15 monómeros de azúcares, que exhiben una ramificación moderada. Estas estructuras se añaden a las cadenas laterales de serinas y treoninas mediante enlaces O-glicosídicos, y se disponen en una configuración de "dientes de cepillo" sobre el núcleo proteico, que constituye el 20% restante de la masa molecular (200–500 kDa). El núcleo proteico cuenta con una región glicosilada central que comprende un gran número de repeticiones en tándem, ricas en serina, treonina y prolina (repeticiones de STP), que pueden representar más del 60% de los aminoácidos. Entre los terminales amino y carboxilo, y algunas veces intercaladas entre las repeticiones STP hay regiones con una composición de aminoácidos más representativa de proteínas globulares, con relativamente poca O-glicosilación, unos pocos sitios de N-glicosilación (Bell, Xu et al. 2003) y alta proporción de cisteína (>10%), las que participan en la dimerización a través de la formación de enlace disulfuro y posterior multimerización (Baldus, Engelmann et al. 2004).

En condiciones fisiológicas, las mucinas tienen un perfil de expresión definido, específico al tejido, tiempo y estado de desarrollo. Las funciones descritas para esta familia de proteínas, se asocian a hidratación, lubricación, protección contra proteasas y defensa contra patógenos (Knowles and Boucher 2002, Frenkel and

Ribbeck 2015). Las cadenas de oligosacáridos que se enlazan a las mucinas proporcionan un entorno hidrófilo que impiden el acceso al epitelio (Lamblin, Degroote et al. 2001, Stanley 2011). Las mucinas de superficie celular (por ejemplo MUC1, MUC4, MUC13 y MUC16) poseen con un único dominio transmembrana y forman estructuras que se pueden extender entre los 200 y 500 nm sobre la membrana plasmática y cubrir los dominios extracelulares de la mayoría de las glicoproteínas de membrana, que no suelen sobresalir más de 30 nm (Taniguchi, Woodward et al. 2017), proporcionando un mecanismo por el cual las mucinas pueden interrumpir la adhesión de células y patógenos. Además, las modificaciones del núcleo peptídico y de los carbohidratos pueden proporcionar epítomos para una variedad de moléculas de adhesión, como se ha descrito para MUC1 y MUC16 (Rump, Morikawa et al. 2004, Gubbels, Belisle et al. 2006). Por otra parte, la expresión desregulada de las mucinas ha sido asociada con varios tipos de condiciones patológicas, incluyendo trastornos inflamatorios y cáncer (Rhodes 1999, Kinlough, Poland et al. 2011, Hsu, Wu et al. 2013, Madsen, Lavrsen et al. 2013, Häuselmann and Borsig 2014, Wang, Bachvarova et al. 2014). Células de carcinoma derivadas de epitelios, incluidos los de mama, próstata, pulmón y páncreas, comúnmente presentan una expresión desregulada y/o patrones de glicosilación aberrante en mucinas. Ciertos tumores epiteliales usualmente sobre-producen glicoproteínas de tipo mucinas. Un ejemplo de ello es la mucina 16 (MUC16, también conocido como CA125) (Wong y cols., 2003), la cual es utilizada como marcador de diagnóstico de cáncer (Hollingsworth and Swanson 2004, Dochez, Caillon et al. 2019). Esta proteína ha sido extensamente estudiada y comúnmente se localiza en el revestimiento epitelial de varios

órganos. Su función principal es hidratar y prevenir la unión de patógenos al presentarse como una barrera de protección. Sin embargo, diversos estudios han vinculado la desregulación de MUC16 con propiedades metastásicas y tumorigénicas (Bast and Spriggs 2011, Reinartz, Failer et al. 2012, Coelho, Marcos-Silva et al. 2018, Bhatia, Gautam et al. 2019), por lo tanto, representa una diana atractiva para el tratamiento contra el cáncer.

7.6 Mucina 16 (MUC16)

El Antígeno de Cáncer 125, también conocido como CA125, es un epítotope repetitivo de MUC16 que se utiliza como un marcador sérico en la práctica ginecológica para controlar pacientes con cáncer de ovario (Moore, MacLaughlan et al. 2010, Dochez, Caillon et al. 2019). El biomarcador clínico CA125 fue descubierto en 1981, a partir del desarrollo de un anticuerpo monoclonal OC125, que reconoció selectivamente el epítotope de una proteína de alto peso molecular expresada en la superficie de las células de cáncer de ovario (Bast, Feeney et al. 1981). Posteriormente, se identificó que el antígeno reactivo estaba elevado en los sueros de la mayoría de las pacientes con la enfermedad, que formaron la base de una prueba de radioinmunoanálisis (Bast, Klug et al. 1983, Kabawat, Bast et al. 1983). Se descubrió que CA125 es un biomarcador sensible para pacientes con cáncer de ovario en contextos específicos (Wu, Miya et al. 1988). Al establecer el punto de corte de referencia de 35 U/mL, se estableció que el 1% de las mujeres normales tenía CA125 elevado, mientras que el 6% de aquellas con enfermedad benigna y el 28% de las que padecían cáncer no ginecológico tenían niveles elevados de antígeno. En contraste, el antígeno se elevó en más del 80% de las mujeres con cáncer de ovario (Bast, Klug et al. 1983). Esto sirvió

de base para establecer a este antígeno como un marcador molecular en el seguimiento de pacientes con este tipo de enfermedad, determinándose que la progresión de esta enfermedad se asocia con un aumento en los niveles serológicos de CA125, mientras que una disminución en sus niveles se asocia con la respuesta favorable a la terapia (Capstick, Maclean et al. 1991). No fue hasta 2001 que dos grupos demostraron de forma independiente que el antígeno CA125 está codificado por un gen de mucina conocido como Mucina 16 (Yin, Dnistrian et al. 2002).

7.6.1 Bioquímica y Estructura de MUC16

La mucina 16 se identificó mediante clonación parcial del gen, como un cDNA de 5797 pares de bases aislado a partir de una biblioteca de células de cáncer de ovario epitelial humano, (OVCAR-3) (Yin and Lloyd 2001). Estructuralmente, MUC16 es la mucina más grande identificada hasta la fecha. Está presente en el brazo corto del cromosoma humano 19, en 19p13.2 y abarca 179 kb de ADN genómico que codifica una proteína de 22,152 aminoácidos con un tamaño aproximado que varía de 2 a 5×10^6 Da (Hatstrup and Gendler 2008). El análisis bioquímico de esta proteína purificada por inmunofluorescencia indica que el contenido de carbohidratos representa aproximadamente el 77% del peso total de MUC16 y se caracteriza por la presencia de una elevada cantidad de carbohidratos unidos a la molécula. MUC16 es la mucina más grande (peso molecular de ~3-5 millones de Da), y es la segunda proteína humana más larga después de la proteína muscular titina (Haridas, Ponnusamy et al. 2014, Taniguchi, Woodward et al. 2017). La estructura de MUC16 se ha dividido principalmente en tres grandes dominios: un amplio dominio extracelular ubicado en el extremo N-

terminal, compuesto de 12.068 aminoácidos y múltiples sitios potenciales para N- y O-glicosilaciones (O'Brien, Beard et al. 2002, Weiland, Martin et al. 2012, Felder, Kapur et al. 2014); un dominio C-terminal que incluye un segmento de la región transmembrana y la cola citoplasmática, y que es considerado el dominio más pequeño de la molécula; y, entre el dominio N- y C- terminal, se encuentra un extenso dominio de repeticiones en tándem intercaladas con dominios SEA (Haridas, Ponnusamy et al. 2014).

El dominio de repeticiones en tándem está compuesto por 56 repeticiones, cada una de 156 aminoácidos. El primer aminoácido de cada repetición no es idéntico pero es homólogo y en la posición 59 y 79 de cada repetición se conservan dos cisteínas para las que se ha propuesto una razón estructural, al poder formar enlaces disulfuros tanto intra- como intermolecularmente (O'Brien, Beard et al. 2001).

Los dominios SEA fueron identificados por primera vez en erizo de mar, enteroquinasa y agrina (Sea urchin sperm protein, Enterokinase, and Agrin, SEA). Estos dominios tienen tamaños variables, cercanos a los 120 aminoácidos, de los cuales 80 son altamente conservados y generalmente muestran actividad auto-proteolítica (Bork and Patthy 1995).

El terminal carboxilo de la MUC16 se divide en tres regiones principales, el dominio yuxtamembrana, el dominio transmembrana y la cola citoplásmica (CT). Esta porción de la molécula es considerada el dominio más pequeño de la proteína. El dominio CT está compuesto por 32 aminoácidos y contiene una serina, dos treonina y tres residuos de tirosina que pueden ser sitios potenciales de fosforilación (Fig. 2). La fosforilación del dominio CT conduce a la escisión de

la porción extracelular de MUC16 (Fendrick, Staley et al. 1993, Levitin, Stern et al. 2005). Los dominios de CT de MUC16 también contienen una secuencia polibásica de aminoácidos (RRRKK) predicha para unirse a la familia de proteínas ezrin / radixina / moesina (ERM), y que pueden facilitar la interacción de MUC16 con numerosas proteínas asociadas a la membrana y con el citoesqueleto de actina (Blalock, Spurr-Michaud et al. 2007). Se ha propuesto que la secuencia de aminoácidos polibásicos también puede servir como una señal de localización nuclear (NLS), sin embargo, estudios recientes mostraron mediante ensayos de transfección que construcciones del dominio MUC16 van al núcleo independientemente de su secuencia NLS (Das, Majhi et al. 2015).



MUC16

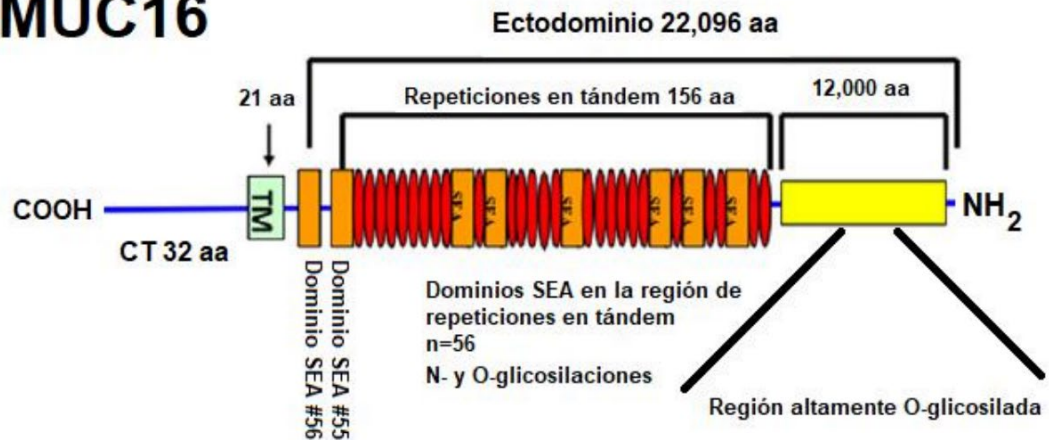


Figura 2. Representación estructural de MUC16. Se muestra una representación esquemática de la estructura de MUC16, con designaciones de la cola citoplasmática (CT), la región transmembrana (TM), el ectodominio con las repeticiones en tándem y los dominios SEA. Además, se muestran los principales sitios de glicosilación de la molécula. Imagen modificada de "Generation and characterization of a monoclonal antibody to the cytoplasmic tail of MUC16", *Glycobiology*. 2017. 27(10):920-926.

7.6.2 Función biológica de MUC16

MUC16 se expresa en el revestimiento epitelial de varios órganos, la superficie de las células epiteliales que recubren el tracto respiratorio superior, la córnea y la conjuntiva (Argüeso, Spurr-Michaud et al. 2003, Govindarajan and Gipson 2010, Gipson, Spurr-Michaud et al. 2014), los órganos reproductivos femeninos, la pleura, el peritoneo y el pericardio (Zeimet, Offner et al. 1998, Tyler, Kapur et al. 2012), la cavidad abdominal y el moco cervical (O'Brien, Hardin et al. 1986, Nustad, Lebedin et al. 2002, Gipson 2005, Bressan, Bozzo et al. 2013) y se ha detectado en la sangre menstrual, líquido amniótico y leche humana (Konishi, Fendrick et al. 1994). En estos revestimientos, las numerosas glicosilaciones de la molécula proporcionan un ambiente hidrofílico ideal para la hidratación y lubricación de los epitelios (Blalock, Spurr-Michaud et al. 2007), además, contribuye a la formación de una barrera di-adhesiva (Kesimer, Scull et al. 2009) y protegen la superficie celular del ataque de patógenos (Argüeso, Spurr-Michaud et al. 2003). La porción extracelular de MUC16 se extiende hasta 700 nm por encima de la superficie celular y forma un componente importante de la capa de glicocalix que cubre las superficies apicales (Frey, Giannasca et al. 1996, Govindarajan and Gipson 2010). La función de MUC16 en el contexto fisiológico se ha estudiado principalmente en el epitelio de la superficie ocular donde el papel principal de la molécula es contribuir a la barrera de la superficie epitelial y prevenir la unión de patógenos y residuos. Las funciones de barrera de MUC16 también se ven facilitadas por su interacción con lectinas, como la galectina-1 y la galectina-3 (Argüeso, Guzman-Aranguez et al. 2009, Taniguchi, Woodward et al. 2017). Además, se encontró que MUC16 se localizaba en vesículas similares

a exosomas contenidas en las secreciones de epitelio ciliado traqueobronquial humano, con la capacidad para neutralizar infecciones virales (Kesimer, Scull et al. 2009). Esta actividad neutralizante se atribuyó a los residuos de ácido siálico con enlaces α -2,6 presentes en moléculas como MUC16. Bacterias como *Streptococcus pneumoniae* secretan metaloproteinasas como ZmpC (metaloproteinasa de zinc) que aumentan la eliminación de MUC16, lo que debilita la barrera del glucocalix, permitiendo que los microorganismos invadan el tejido mucoso (Tyler, Kapur et al. 2012). También se ha detectado la expresión de MUC16 en otros epitelios, como los epitelios celómicos fetales y sus derivados, como el conducto de Müller, la trompa de Falopio, el endometrio y el cuello uterino, donde la molécula tiene funciones protectoras al formar una densa capa de gel mucoso que protege la cavidad endometrial de patógenos. Además de estas funciones, la variante soluble de MUC16 puede unirse a células del sistema inmune (células NK y monocitos) mediante interacción con el receptor siglec-9. La expresión de MUC16 se pierde en la superficie celular apical o la superficie del endometrio, cuando se produce la fase receptiva del ciclo femenino, lo que indica que es necesaria una disminución en los niveles de MUC16 para que se produzca la implantación (Gipson, Blalock et al. 2008).

7.6.3 Función biológica de MUC16 en la tumorigénesis

MUC16 se presenta como un antígeno asociado a tumor al encontrarse sobreexpresado en múltiples tipos de cáncer, y se posiciona como uno de los tres principales genes mutados (Kim, Hong et al. 2013) incluyendo en cáncer de mama (Lakshmanan, Ponnusamy et al. 2012); cáncer pancreático (Lakshmanan, Ponnusamy et al. 2012), cáncer de pulmón de células no pequeñas (Cedrés,

Nuñez et al. 2011) entre otros (Togami, Nomoto et al. 2010, Higashi, Yamada et al. 2012, Streppel, Vincent et al. 2012) y su sobreexpresión se ha relacionado con un mal pronóstico en múltiples tumores malignos (Shimizu, Hirono et al. 2012, Chen, Hung et al. 2013, Cotton, Azevedo et al. 2017).

A partir de la identificación del marcador sérico CA125 como un epítipo de MUC16, diversos estudios han vinculado a esta mucina con propiedades metastásicas y tumorigénicas (Gubbels, Belisle et al. 2006, Bast and Spriggs 2011, Thériault, Pinard et al. 2011, Reinartz, Failer et al. 2012, Das, Rachagani et al. 2015, Rao, Tian et al. 2015). Se sugiere que MUC16 proporciona contacto y adherencia para la metástasis de células de cáncer de ovario al interactuar con mesotelina (Rump, Morikawa et al. 2004, Scholler and Urban 2007), una proteína que recubre el revestimiento mesotelial de la cavidad peritoneal con alta afinidad (Rump, Morikawa et al. 2004, Zervos, Agle et al. 2016). Esta interacción conduce a la metástasis peritoneal de las células cancerígenas de ovario y de páncreas al facilitar la unión de las células al revestimiento mesotelial (Gubbels, Belisle et al. 2006, Chen, Hung et al. 2013, Zervos, Agle et al. 2016). De forma similar, se encontró que MUC16 se une a selectinas y promover así la metástasis de las células de cáncer de páncreas (Chen, Dallas et al. 2012). La reducción de la expresión de MUC16 inhibió el crecimiento de líneas celulares de cáncer de ovario y de mama por inducción de apoptosis independiente o dependiente de caspasa. Además, la eliminación de MUC16 suprime la capacidad de formación de colonias, la migración de la adhesión y la capacidad invasiva de las células cancerosas (Reinartz, Failer et al. 2012). MUC16 puede contribuir a la resistencia a fármacos genotóxicos y a la disminución de la apoptosis en líneas celulares de

cáncer de ovario (Boivin, Lane et al. 2009, Das and Batra 2015). Por otra parte, se demostró que esta proteína participa en la transición epitelial-mesenquimal (EMT), presumiblemente a través de su interacción con E-cadherina y por la modulación del Receptor del Factor de Crecimiento Epidérmico (EGFR) (Comamala, Pinard et al. 2011) y que MUC16 atenúa la apoptosis provocada por el Factor de Necrosis Tumoral Inducido por Ligando (TRAIL) en células de cáncer de ovario epitelial (Matte, Lane et al. 2014).

Otros estudios han vinculado a MUC16 con propiedades inmunosupresoras, como por ejemplo modulando la respuesta inmune innata contra las células de cáncer de ovario, al inhibir directamente la función de las células NK, lo que ayudaría a las células cancerígenas a evadir la respuesta inmune del huésped. El mecanismo de acción parece ser a través de la regulación negativa de CD16 en las células NK, su interacción con Siglec-9 en la superficie de las células inmunitarias y el elevado peso molecular de MUC16, que puede actuar como una barrera física que previene la formación de la sinapsis inmunológica que activa a las células NK contra las células blanco del tumor de ovario (Gubbels, Felder et al. 2010, Felder, Kapur et al. 2014). Así, MUC16 inhibe directamente el mecanismo de citotoxicidad natural de células NK. Además, MUC16 interactúa con linfocitos B y monocitos vía el receptor inhibitorio Siglec-9, que podría estar implicado en la atenuación de respuesta inmune antitumoral (Avril, Floyd et al. 2004, Belisle, Horibata et al. 2010, Felder, Kapur et al. 2014).

7.6.4 MUC16 como blanco terapéutico.

Debido a su importancia clínica, diversos estudios han sugerido a MUC16 como un posible blanco terapéutico, principalmente utilizando anticuerpos dirigidos a las repeticiones en tándem de MUC16, donde se localizan los epítopes CA125. Unos de los que ha tenido mejores resultados es Oregovomab (Mab B43.13), que corresponde a un anticuerpo monoclonal murino que se une con alta afinidad a CA125 y que ha demostrado levantar respuestas inmunitarias tanto humorales como celulares contra el cáncer de ovario, pero que no ha logrado estabilizar la enfermedad ni otorgar una supervivencia mayor a los 2 años (Ehlen, Hoskins et al. 2005). Las terapias basadas en anticuerpos, como Oregovomab (Berek 2004) y Abagovomab (Wagner, Schlebusch et al. 1997, Reinartz, Köhler et al. 2004) que actualmente se encuentran en ensayos clínicos fase I y II respectivamente, han tenido éxito limitado en pacientes con cáncer. Las razones del fallo de estas terapias podría atribuirse al incompleto entendimiento del procesamiento celular básico de MUC16 sumado a que estos anticuerpos apuntan a la región soluble de la molécula, lo que contribuye a que la mayoría del anticuerpo se pierda en circulación y no llegue a las células tumorales que expresan el antígeno (Das and Batra 2015).

La evidencia disponible de terapias con anticuerpos dirigidos contra CA125 consiste en 17 estudios que corresponden a 2.347 individuos, donde se sugiere un aumento de la supervivencia en pacientes, aunque los resultados obtenidos por estas prácticas han sido heterogéneos (Paijens, Leffers et al. 2018). Sin embargo, su importancia en el desarrollo tumoral y su expresión altamente estable durante toda la progresión de la enfermedad enfatizan la importancia de

continuar en la búsqueda de nuevas alternativas terapéuticas que utilicen esta molécula como blanco terapéutico, principalmente utilizando el sistema inmune para levantar una respuesta efectiva y específica contra células tumorales que expresen este antígeno (Liu, Nash et al. 2010, Aithal, Rauth et al. 2018, Carvalho, Grassi et al. 2019).

7.7 Inmunoterapia contra células tumorales.

El tratamiento eficaz contra el cáncer debe resultar en la destrucción de las células transformadas, combinada con una especificidad para determinar dianas celulares apropiadas y el desarrollo de una memoria inmunológica a largo plazo. La práctica clínica actual, especialmente para tumores sólidos, prescribe cirugía, quimioterapia, radioterapia o alguna combinación de estos. Si bien estos protocolos suelen ser eficaces para inducir remisiones temporales, sigue existiendo el riesgo de efectos secundarios graves de la terapia, la recurrencia del tumor y el desarrollo de metástasis. Especialmente como resultado de la evolución de células madre tumorales resistentes a la radio / quimioterapia y las micrometástasis que permanecen después de la resección del tumor primario (Eyler and Rich 2008, Wculek, Cueto et al. 2020).

La capacidad del sistema inmunitario para erradicar tumores sólidos preexistentes no es un concepto nuevo. Hace más de dos mil años, el filósofo Parménides (540–480 AC) reconoció que cuando los individuos que presentaban sarcomas grandes se infectaban con patógenos oportunistas y sufrían fiebre, sus tumores se reducían y muchas veces desaparecían por completo (Niakan 1998, Kleef, Jonas et al. 2001). William Coley (1862-1936) fue uno de los primeros médicos en los tiempos modernos en estudiar sistemáticamente este vínculo

entre la infección activa, la fiebre y el crecimiento de tumores (Richardson, Ramirez et al. 1999, Krieg 2003). Coley emprendió uno de los primeros estudios controlados que demostraron que las infecciones bacterianas localizadas (*Bacillus prodigiosus*) y los sobrenadantes de cultivos bacterianos (llamadas "toxinas de Coley") podrían inducir respuestas inmunitarias que conducían a una necrosis rápida de sarcomas grandes y establecidos (Nauts and McLaren 1990). Lo que contribuyó a curar a un número significativo de pacientes con cáncer.

La identificación molecular de antígenos del cáncer humano permite el desarrollo de múltiples estrategias en inmunoterapia. Sin embargo, los métodos convencionales de inmunización para el levantamiento de inmunidad humoral contra proteínas inmunogénicas o moléculas portadoras de péptidos como es el caso de MUC16, han fallado en inducir una respuesta de anticuerpos de larga duración dirigidos a antígenos multiglicosilados o escasamente inmunogénicos (Shojaeian, Zarnani et al. 2009).

El antígeno MUC16 se caracteriza por ser escasamente inmunogénico, esto debido principalmente a que se presenta como una proteína que cumple funciones en condiciones fisiológicas, por lo tanto, fisiológicamente se encuentra bajo un estado de tolerancia inmunológica, lo que tal vez evite que los ratones inmunizados desarrollen una población diversificada de anticuerpos anti-CA125 (Patankar, Jing et al. 2005).

En el año 2009, fue publicado un manual llamado "Estrategias de Inmunización para producción de anticuerpos" (Burns 2009), donde se describen una gama de técnicas de inmunización que se pueden utilizar para una producción exitosa de anticuerpos, dependiendo de la naturaleza del antígeno y del tipo de anticuerpo

requerida por el usuario. En esta guía se describe un protocolo de inmunización modificado para antígenos no-anamnésicos, que corresponden a antígenos que están altamente glicosilados o provienen de una fuente conocida por ser rica en polisacáridos, y que es muy poco probable que el animal vuelva a producir una respuesta inmunitaria clásica completa. Esto, porque este tipo de antígenos no activan células B en reposo, y las inmunoglobulinas generadas contra ellos son mayormente de clase M. En dicho protocolo, se utilizan 25 µg de antígeno por animal y la administración se hace mediante vía intraperitoneal (IP). Se ha descrito la producción de anticuerpos monoclonales anti-CA125 utilizando preparaciones de antígenos heterólogas, administrando a ratones BALB/c el antígeno CA125 purificado, células vivas de una línea celular de cáncer de ovario que expresan CA125 (CA125+ OVCAR-3) y una combinación de ambos vía intraperitoneal, y el refuerzo de dosis vía intravenosa (Shojaeian, Zarnani et al. 2009). Sin embargo y de forma alternativa, un equipo de investigadores reportaron la generación de un anticuerpo monoclonal para un epítipo definido de MUC16, inmunizando ratones BALB/c inmunizados por vía subcutánea y utilizando 20 µg de antígeno, obteniendo como resultado una alta producción de IgG específica (Marcos-Silva, Ricardo et al. 2015). Por lo que, el estudio de métodos alternativos de inmunización contra este antígeno resulta fundamental para generar altos títulos de anticuerpos que induzcan una respuesta que sobrepase la tolerancia inmunológica y que apunten específicamente a células que sobre expresen esta proteína. Por otra parte, es esencial combinar métodos inmunoterapéuticos que potencien una respuesta antitumoral debido a que la tolerancia al antígeno es solo uno de los mecanismos que tienen las células

tumorales para evadir o ignorar al sistema inmune. Se necesita además, potenciar respuestas co-estimuladoras que fomenten la destrucción del tumor; en este punto uno de los métodos más utilizados es dirigir estos antígenos a células que procesen y presenten de forma eficaz la molécula antigénica a los linfocitos (Steinman and Banchereau 2007).

Las DCs son células presentadoras de antígenos con una función moduladora central de la respuesta inmune, por lo que su habilidad para activar tanto el sistema inmune innato como el adaptativo proporciona la razón fundamental para el concepto de inmunoterapia basada en DC como un tratamiento para el cáncer (Sabado, Balan et al. 2017). En modelos de cáncer en ratón, las DCs capturan antígenos que son liberados desde células tumorales ya sea que estén vivas o apoptóticas, y presentan estos antígenos de forma cruzada a las células T en el nodo linfático que drena el tumor. Esto resulta en la generación de CTLs específicos de tumor que contribuyen al rechazo de este. Además, pueden regular la naturaleza de la respuesta de este tipo de células, ya que proporcionan señales co-estimuladoras apropiadas, que inducen la estimulación de células T ya sea inmunogénica o tolerogénica (Diamond, Kinder et al. 2011, Fuertes, Kacha et al. 2011, Sabado, Balan et al. 2017). Estas características únicas hacen que la modulación dirigida a DCs sea un enfoque fundamental para la inducción de la respuesta inmune contra el cáncer, sobrepasando la tolerancia frente a antígenos propios.

Dentro de la inmunoterapia utilizando DCs destacan las vacunas basadas en DCs modificadas *ex vivo*. Estas son generadas por cultivo de células progenitoras hematopoyéticas o monocitos con combinación de diferentes Las DC derivadas

de monocitos mieloides son las más utilizadas para la inmunoterapia tumoral. Se diferencian *ex vivo* de los monocitos periféricos con factor estimulante de colonias de granulocitos-macrófagos recombinantes (GM-CSF) e interleucina (IL) -4. Son muy eficientes en la fagocitosis de antígenos y en la producción de IL-12, además de provocar respuestas de células T antitumorales. Sin embargo, su producción *ex vivo* es laboriosa y costosa. Una alternativa atractiva es apuntar a las DCs *in vivo* con antígenos tumorales apropiados y activarlos para producir citocinas proinflamatorias (Chiang, Kandalaft et al. 2013).

Ante esta problemática, el uso de agentes activadores y/o antígenos asociados a tumor dirigidos a DCs *in vivo* parece ser una alternativa funcional para esto se debe tener en cuenta que la respuesta inmune inducida por la orientación de antígenos a las DCs depende de muchos factores, incluyendo el receptor específico dirigido, el nivel de expresión del receptor objetivo y su distribución entre los diferentes subconjuntos de DCs y el sistema de suministro de antígeno utilizado (Wculek, Cueto et al. 2020). El receptor específico de elección debe tener las siguientes características: i) debe ser selectivo o altamente expresado en DCs, ii) el antígeno específico debe ser internalizado eficazmente, procesado y presentado a receptores específicos de linfocitos T, idealmente a ambas células, tanto linfocitos T ayudadores CD4+ y (Th) y linfocitos T citotóxicos CD8+ (CTL), y iii) el suministro dirigido de antígeno debe preferiblemente conducir a la activación selectiva de las DCs (Fig. 3). Han sido utilizados una variedad de receptores expresados en las DCs para dirigir antígenos a estas células incluyendo el complejo mayor de histocompatibilidad clase II (MHC II), CD11c, CD36, DEC205, DCIR2, Dectin-1/2, CD80/86, F4/80-like receptor, CIRE, receptor

de manosa (MR), y CD40 (Apetoh, Ghiringhelli et al. 2007, Tagliani, Guermonprez et al. 2008, Dickgreber, Stoitzner et al. 2009, Wei, Wang et al. 2009).

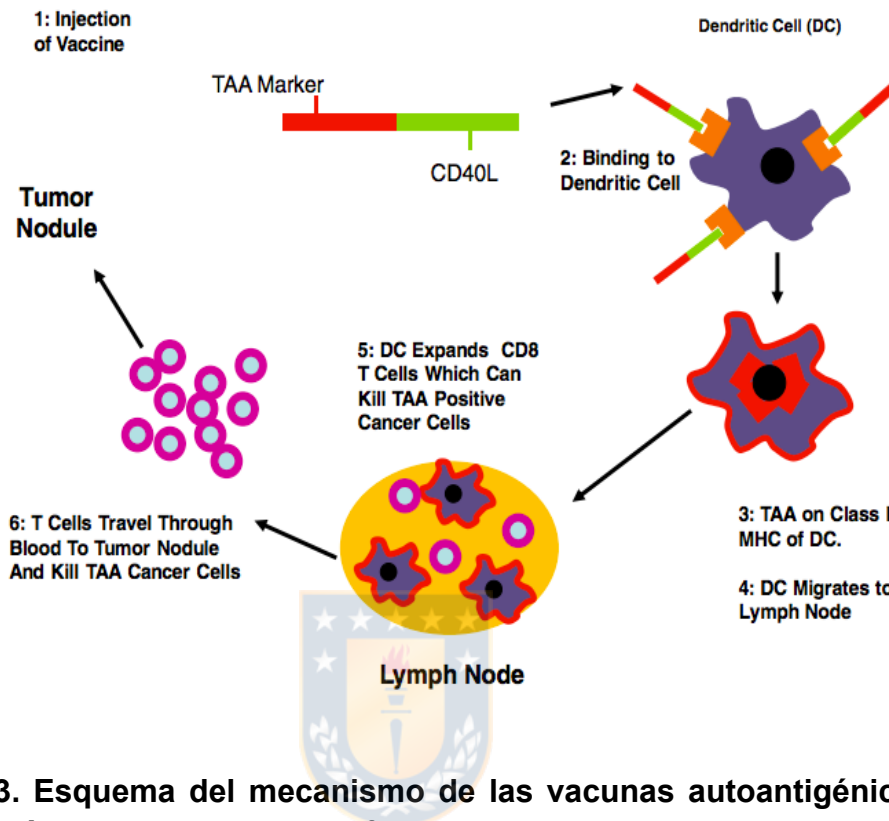


Figura 3. Esquema del mecanismo de las vacunas autoantigénicas en la eliminación del tumor. El TAA fusionado a una molécula coestimuladora es presentada a las CD, es procesado y presentado por el MHC, presentado a las células T CD4⁺ y T CD8⁺, para que migren e infiltren el tumor. Imagen modificada de “Use of CD40L immunoconjugates to overcome the defective immune response to vaccines for infections and cancer in the aged”, *Cancer Immunology, Immunotherapy* volume 58, pages1949–1957, 2009

7.8 CD40/CD40L.

El modelo más aceptado para activar respuestas inmunes adaptativas, requiere de dos señales distintas: la primera señal es la interacción del por medio del receptor de células T (TCR) con péptidos presentados en MHC en la superficie de la célula presentadora de antígeno (APC); y la segunda señal proviene de moléculas co-estimuladoras (Sánchez-Paulete, Teijeira et al. 2017); siendo esto último fundamental para prevenir la tolerancia inmune frente a un antígeno. En este proceso las APCs, tales como las DCs, se encuentran en un estado de reposo (inmaduro) y poseen una expresión reducida o nula de moléculas co-estimuladoras. Estas APC pueden estar constantemente presentando antígenos propios sin señales activadoras y los linfocitos T que reconocen a estos antígenos se hacen anérgicos, llevando a un estado de tolerancia frente a un antígeno propio. Este proceso reafirma la importancia de la señal co-estimuladora para sobrepasar la barrera de tolerancia frente a antígenos propios. Una de las parejas de interacción inmunoestimuladoras mejor caracterizadas es el receptor CD40 y su ligando, la molécula CD154 (Elgueta, Benson et al. 2009, Steinman 2012), por lo que representan una alternativa tentativa para el direccionamiento de las CDs. El CD40 es una glicoproteína de membrana integral de tipo I perteneciente a la superfamilia del receptor del factor de necrosis tumoral (TNF-R), que se expresa en la superficie celular en forma de homodímero. Posee un peso molecular entre 44 y 48 kDa, dependiendo de sus glicosilaciones. Este receptor contiene un dominio extracelular de 193 aminoácidos (aa), una secuencia líder de 21 aa, un dominio transmembrana de 22 aa, y un dominio intracelular de 62 aa en humanos (90 aa en ratones). En el dominio extracelular de CD40, se encuentran 22

residuos de cisteína que son conservados entre los miembros de la superfamilia de TNF-R (van Kooten and Banchereau 2000). CD40 fue inicialmente identificado y funcionalmente caracterizado en células B (Mazzei, Edgerton et al. 1995), sin embargo, posteriormente se demostró que la expresión de CD40 no está restringida para células B sino que también se expresa en células dendríticas (DCs), monocitos, plaquetas, y macrófagos así como en células no hematopoyéticas tal como fibroblastos, miofibroblastos, epiteliales y endoteliales (Hollenbaugh, Mischel-Petty et al. 1995, Mazzei, Edgerton et al. 1995, Yellin, Winikoff et al. 1995, Denfeld, Hollenbaugh et al. 1996, Young, Eliopoulos et al. 1998, Zhang, Cao et al. 1998).

Por otra parte, el ligando de CD40, conocido como CD154 o CD40L, es una proteína integral de membrana tipo II con un peso molecular variable entre 32 a 39 kDa, dependiendo de sus modificaciones post-traduccionales (van Kooten and Banchereau 2000), aunque una forma soluble de CD154 fue reportada, con actividad similar a la forma transmembrana. CD154 es un miembro de la superfamilia de TNF y consta de un dominio extracelular con 215 aa, una porción de transmembrana con 24 aa y un dominio intracitoplasmático de 22 aa (Mazzei, Edgerton et al. 1995). Se expresa principalmente en linfocitos T activados, así como en células B y plaquetas. También se observó que bajo condiciones inflamatorias su expresión se induce en células monocíticas, células NK, mastocitos y basófilos (Grammer, Bergman et al. 1995, Pinchuk, Klaus et al. 1996, Carbone, Ruggiero et al. 1997).

La interacción del receptor de CD40 con CD154, es crítica para la inducción de la respuesta inmune humoral al promover la proliferación y diferenciación de

linfocitos B inmaduros a células plasmáticas productoras de inmunoglobulinas. Además, en células no hematopoyéticas, tales como células endoteliales, la expresión de CD40 es relativamente baja, sin embargo, su función está involucrada en la amplificación y regulación de respuestas inflamatorias (Probst-Kepper, Stroobant et al. 2001). La amplia expresión de este par estimulador (CD40/CD154) indica la función fundamental que ejerce en diferentes procesos de la respuesta inmune celular (Steinman 2012).

7.9 Señalización CD40/CD154 en células dendríticas

La señalización CD40/CD154 induce cambios en las CD que las hace más efectivas como células presentadoras de antígeno, promoviendo la sobre regulación del complejo mayor de histocompatibilidad clase II, y de moléculas coestimuladoras como CD80 y CD86 (Rhodes 1999). Además, la interacción CD40/CD154 induce el cambio en la expresión desde CD inmaduras a maduras (Bast, Feeney et al. 1981). Las CD inmaduras adquieren antígenos a partir de células muertas y desde su entorno circundante, procesándolos para su presentación tanto en moléculas MHC clase I y II. Si las CD reciben señales de activación de linfocitos T vía interacción de CD40/CD154 se diferencian en células maduras que expresan altos niveles de MHC clase I y II, así como también moléculas coestimuladoras, las cuales son requeridas para la estimulación de células “naive” (Bast, Klug et al. 1983). Su señalización conduce a un aumento en la producción de IL-6 y IL-12, esta última citoquina por si sola sobre regula la expresión de CD154 en linfocitos T y sinergiza con IL-2, u otras interacciones coestimuladoras incluyendo CD80 y CD86, para maximizar la expresión de CD154. La IL-12 es una molécula quimiotáctica para macrófagos, aumenta la

expansión homeostática de linfocitos T CD8+, y en presencia de antígenos, actúa directamente con estas células promoviendo su expansión clonal y diferenciación (Kabawat, Bast et al. 1983). Además, IL-12 es un mediador importante para inducir respuestas de tipo TH1 (Wu, Miya et al. 1988). Se han utilizado anticuerpos monoclonales murinos (mAbs) , agonista contra CD40 o CD40L trimerizado recombinante, el cual es administrado en combinación con el antígeno para inducir respuestas de linfocitos T CD8+ y CD4+ de memoria y protectores (Yin and Lloyd 2001). Aunque la expresión de CD40 no es restrictiva a CDs, sus propiedades de activación lo hacen un blanco relevante para ser utilizado en inmunoterapia y para la orientación específica de antígenos a células dendríticas.



8. PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN

La utilización de antígenos de tumor se posiciona como una alternativa eficaz en terapias contra el cáncer, ya que son moléculas relevantes para desarrollo y progresión tumoral. Los TAA están estrechamente relacionados con el pronóstico y la recurrencia del cáncer, y tienen un valor significativo para mejorar el diagnóstico y controlar el progreso de la enfermedad. Dentro del grupo de antígenos de tumores podemos encontrar a la mucina 16.

La mucina 16 es una proteína de alto peso molecular que posee funciones fisiológicas de hidratación, lubricación, protección contra proteasas y defensa contra patógenos. No obstante, también cumple funciones patológicas fundamentales en la progresión del cáncer. En su estructura contiene al antígeno CA125, epítipo que es actualmente utilizado como biomarcador sérico para cáncer de ovario. Si bien la mayoría de las investigaciones para estudiar su función se han realizado en este tipo de cáncer, diversos estudios han demostrado que también se sobre expresa en múltiples tipos de tumores, incluidos cáncer de mama, páncreas y colorrectal, y que, además, es uno de los tres genes más frecuentemente mutado.

La identificación molecular de este tipo de antígenos ha permitido el desarrollo de múltiples estrategias en inmunoterapia. Sin embargo, los métodos convencionales de inmunización para la activación de inmunidad contra proteínas antigénicas o moléculas portadoras de epítopes como es el caso de MUC16, han fallado en inducir una respuesta inmune de larga duración. Por lo que el estudio

de métodos alternativos de inmunización contra este antígeno resulta fundamental para inducir una respuesta inmune que sobrepase la tolerancia inmunológica propia de antígenos que poseen una función fisiológica y que apunten específicamente a células que sobre expresen esta proteína en condiciones fisiopatológicas. Por otra parte, es esencial combinar métodos inmunoterapéuticos que potencien una respuesta antitumoral que conduzcan a la destrucción del tumor. En este punto unos de los métodos más utilizados, es dirigir estos antígenos a células que procesen y presenten de forma eficaz la molécula a los linfocitos, como es el caso de las células dendríticas (CDs).

El receptor CD40 representa un motivo tentativo de direccionamiento a este tipo celular, debido principalmente a que las señales coestimuladoras que genera la unión con su ligando, puede evitar la tolerancia inmune frente a un antígeno propio. Además, este receptor inmunomodulador cumple una función fundamental en la inducción de la maduración de las CDs y en la activación de linfocitos T, activando, además, respuestas de tipo TH1, siendo estos, procesos esenciales para sobrepasar la barrera de inmunotolerancia y contener la progresión tumoral.

9. HIPOTESIS

Basados en estos antecedentes planteados nos propusimos la siguiente hipótesis de trabajo:

La asociación sinérgica de una molécula quimérica que contiene dominios fusionados del antígeno humano MUC16 y el ligando soluble del receptor CD40 murino (CD154), potencia la respuesta inmune humoral y celular contra el antígeno *in vivo* en un modelo murino.



10. OBJETIVOS

10.1 Objetivo General

Evaluar si una formulación vacunal basada en la asociación sinérgica del antígeno humano MUC16 y el ligando soluble del receptor CD40 murino (CD154) incrementa significativamente el nivel efector de la respuesta inmune contra el antígeno MUC16.



10.2 Objetivos Específicos

Generar candidatos vacunales basados en el antígeno MUC16 y la molécula co-estimuladora CD154 expresados en cultivos celulares de mamíferos mediante transducción con vectores adenovirales recombinantes.

1.a Generación de tres vectores adenovirales que codifiquen: uno para el fragmento soluble de la mucina 16 humana (vector AdMUC16), un segundo vector que codifique para una variante quimérica de MUC16 unida al dominio extracelular de la molécula CD154 murina (AdMUC16-CD154) y un tercer vector que permita la expresión del dominio extracelular de CD154.

1.b Expresión de los candidatos antigénicos (antígeno MUC16, dominio extracelular CD154 y la variante quimérica MUC16-CD154) mediante transducción adenoviral en células SiHa, para utilizar como modelos de inmunización.

1.c Purificación de los candidatos vacunales mediante cromatografía de afinidad para ensayos de inmunogenicidad.

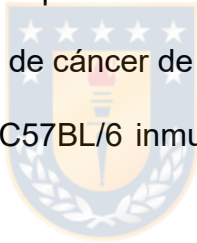
Evaluar el efecto de la respuesta inmune inducida por los candidatos vacunales de forma preventiva y terapéutica en modelos murinos enfrentados a células tumorales que expresan MUC16.

2.a. Determinación de dosis y vía de administración en modelos murinos C57BL/6 enfrentados al antígeno MUC16.

2.b Desarrollo de un modelo de implante de células tumorales murinas establemente transformadas para la expresión de MUC16.

2.c Evaluación de los parámetros de la respuesta inmune celular o humoral específica para el antígeno MUC16.

2.d Evaluación del curso temporal del crecimiento tumoral a partir de los implantes de células murinas de cáncer de ovario que expresan o no el antígeno MUC16 en ratones hembra C57BL/6 inmunizados con los antígenos de forma preventiva o terapéutica.



11 MATERIALES Y METODOS

11.1 Materiales

11.1.1 Líneas celulares.

Las líneas celulares que se utilizaron en el desarrollo de esta investigación, para la amplificación de vectores adenovirales y para la producción de proteínas recombinante: se detallan a continuación:

- i. HEK-293A (Quantum Biotechnologies, Canadá): células epiteliales de riñón embrionario humano que expresan constitutivamente el activador transcripcional E1 del Adenovirus humano serotipo 5.
- ii. SiHa (ATCC® HTB-35™): línea celular de carcinoma de células escamosas grado II del cuello uterino humano.

El medio de cultivo utilizado para el crecimiento de las líneas celulares mencionadas anteriormente fue el Medio Mínimo Esencial Dulbecco (DMEM) (Gibco-BRL, EE.UU.), suplementado con L-glutamina 0,3 mg/mL, piruvato sódico 1 mmol/L y solución antibiótico-antimicótico (Gibco-BRL, EE.UU.).

11.1.2 Cepas bacterianas.

Las cepas bacterianas utilizadas en esta investigación se describen a continuación: i) *Escherichia coli* TOP 10 (Invitrogen, EE.UU.): utilizada en las diferentes etapas de clonación como cepa amplificadora de vectores plasmidiales de interés. ii) *Escherichia coli* BJ5183 (Quantum Biotechnologies, EE.UU.): se utilizó durante la generación de vectores adenovirales, específicamente para

mediar la recombinación homóloga entre el vector de transferencia y el plásmido con el genoma adenoviral.

El medio de cultivo utilizado para el crecimiento de las cepas bacterianas fue el medio LB (triptona 10 g/L, extracto de levadura 5 g/L, NaCl 10 g/L, pH 7,5). Para el medio LB sólido se añadió agar bacteriológico 15 g/L (Gibco -BRL, EE.UU.). Cuando fue necesario, se incluyeron antibióticos en las siguientes concentraciones: ampicilina (Amp): 100 µg/mL y kanamicina (Kan): 50 µg/mL.

11.1.3 Plásmidos.

pAdTrack-MUC16his: Este vector fue generado previamente en el laboratorio.

Es un vector que tiene un tamaño de 12 632 pb, y contiene el origen de replicación Ori pBR322, NeoR y KanR, el promotor del citomegalovirus (CMVP) y el gen reportero EGFP. Funciona como vector de transferencia ya que incluye la secuencia codificante del gen MUC16his, que corresponde a una secuencia de 3,420 pb de la región C-terminal (sin región transmembrana) que incluye 6 repeticiones en tándem del antígeno tumoral humano CA125. Además, tiene fusionado la secuencia codificante para la señal de secreción del activador tisular del plasminógeno humano (hTPA) y a una cola de seis histidinas (6xHis).

pAdEASY-1: Vector de 33 441 pb que cuenta con el genoma del adenovirus serotipo 5 (Ad5) con deleciones en las regiones E1 y E3. Las funciones de E1 pueden complementarse en la línea celular HEK-293A. Además, cuenta con brazos de recombinación, AmpR y el origen de replicación Ori pBR322.

11.1.4 Soluciones.

Las soluciones y tampones utilizados en el presente trabajo se prepararon de acuerdo con las siguientes formulaciones:

PBS: Solución Tampón Fosfato. NaCl 136 mmol/L; KCl 2,7mmol/L, Na₂HPO₄ 7,8 mmol/L; KH₂PO₄ 1,5 mmol/L; pH 7,4.

Solución de bloqueo para ELISA: Leche descremada al 3% diluida en PBS

Solución de bloqueo para Western blot: Leche descremada al 5% diluida en TBS.

Solución de destinción: metanol 10% y ácido acético 10%.

Solución de Rojo Poncaeu: Ponceau S 20 g/L; ácido tricloroacético (TCA) 300 g/L; ácido sulfosalicílico 300 g/L.

Solución de sustrato para ELISA: Citrato trisódico di-hidratado (C₆H₅Na₃×2H₂O) 29,4 g/L; 900 mL agua purificada; completar volumen con agua destilada; pH 4,5 (ajustar con HCl); agregar antes de usar ortofenilendiamina (OPD) 0,4 g/L y 1 µL de peróxido de hidrógeno por cada mg de OPD utilizado. Proteger la solución de la luz.

TAE: Tris-Acetato 400 mmol/L; EDTA 1 mmol/L; pH 7,9.

Tampón de carga desnaturalizante: glicerol 10%; SDS 2%; β-mercaptoetanol 5%; Tris-base 0,0625 g/L; azul de bromofenol 0.001%; pH 6,8

Tampón de carga: Tris-HCl 100 mmol/L; pH 6,8; SDS 4%; glicerol 20%; Azul de bromofenol 0,2%; y DTT 50 mmol/L.

Tampón de corrida Tris-Glicina (TG): Glicina 144 g/L; Tris base 30 g/L; SDS 0,1%; pH 8,3.

Tampón de dilución de muestras y conjugados ELISA: Leche descremada al 1% diluida en PBS-Tween20 al 0,05%.

Tampón de recubrimiento ELISA: Bicarbonato de sodio 2,93 g/L; carbonato de sodio 1,52 g/L; pH 9,4-9,6.

Tampón de transferencia: Tris base 5,8 g/L; glicina 2,9 g/L; Metanol 20%; pH 9,2.

TBS: Tris base 2,42 g/L; NaCl 8,0g /L; pH 7,6

Tripsina- EDTA: Tripsina 2,5 g/L; glucosa 1,01 g/L; rojo fenol 1%, EDTA 0,1 g/L.

11.2. Métodos

11.2.1. Técnicas básicas para el manejo de ADN.

11.2.1.1 Transformación de células quimiocompetentes.

Las células quimiocompetentes de la cepa de *E. coli* Top10 se mezclaron con 50-100 ng de ADN plasmídico. La mezcla se incubó durante 30 min en hielo, 90 seg a 42°C y 1 min en hielo y posteriormente se añadió 1 mL de medio LB líquido (Liofilchem, 610084) y se incubó 1 h a 37°C. Las células se sembraron en medio LB sólido (Mo Bio Laboratories, 12107-1) suplementado con 100 µg/mL de ampicilina (US Biological, A2260) o con 50 µg/mL de kanamicina (Duchefa Biochemie, K0126.0010). Todos los plasmidios utilizados en este trabajo confieren resistencia a ampicilina, excepto el plasmidio pAdTrack que confiere resistencia a kanamicina.

11.2.1.2 Crecimiento de cultivos bacterianos.

Las colonias de las bacterias transformadas con los diferentes plasmidios o con el producto de la reacción de ligamiento se inocularon en tubos de 5 mL de medio LB líquido. Los cultivos se suplementaron con 100 µg/mL de ampicilina (US

Biological, A2260) o con 50 µg/mL de kanamicina (Duchefa Biochemie, K0126.0010) y se incubaron a 37°C durante 16 h en agitación a 300 rpm. Posteriormente, se inocularon frascos de 500 mL de medio LB líquido suplementado con el antibiótico apropiado. Los cultivos bacterianos se crecieron a 37°C durante 16 h en agitación a 300 rpm.

11.2.1.3 Purificación de ADN plasmídico a pequeña escala (*miniprep*).

La purificación de ADN se realizó por el método de lisis alcalina a partir de cultivos bacterianos de 5 mL. Las células se centrifugaron a 7000 rpm durante 3 min a 25°C y se resuspendieron en una solución de 50 mmol/L de Tris-HCl, 10 mmol/L de EDTA, 100 µg/mL de ribonucleasa A (Invitrogen, 12091-021), pH 7,5. Las células se lisaron con una solución de 0,2 mol/L de NaOH y 1% de SDS, incubando durante 5 min a 25°C. El medio se neutralizó con 1,32 mol/L de KAc, pH 4,8. El lisado celular se centrifugó durante 15 min a 12 000 rpm y 25°C; el sobrenadante fue transferido a tubos limpios, repitiéndose este último paso de centrifugación. El ADN se precipitó con 0,7 volúmenes de isopropanol centrifugando en las mismas condiciones anteriores. El precipitado se lavó con 1 mL de etanol al 70%. Se resuspendió el ADN en 50 µL de H₂O calidad biología molecular y se cuantificó por espectrofotometría a $\lambda=260$ nm.

11.2.1.4 Purificación de ADN plasmídico a escala masiva.

La purificación de ADN se realizó por un método de lisis alcalina a partir de cultivos bacterianos de 500 mL. Las bacterias se colectaron mediante centrifugación a 8 000 rpm durante 10 min a 4°C. El precipitado celular se

resuspendió en 14 mL de una solución de 50 mmol/L de Tris-HCl, 10 mmol/L de EDTA, 100 µg/mL de ribonucleasa A, pH 7,5. La suspensión celular se trasvasó a tubos de 40 mL y se incubó durante 5 min en hielo. Las bacterias se lisaron con 14 mL de una solución de 0,2 mol/L de NaOH y 1% de SDS durante 5 min en hielo. El pH del medio se neutralizó con 12 mL de 1,32 mol/L de KAc, pH 4,8 durante 5 min en hielo. Las muestras se centrifugaron a 12 000 rpm durante 15 min a 4°C. El sobrenadante se trasvasó a tubos de 80 mL, filtrando con gasa, se añadieron 22 mL de isopropanol y se incubó 20 min a 25°C. Los tubos se centrifugaron a 12 000 rpm durante 10 min a 4°C y el ADN se resuspendió en 2 mL de tampón tris-EDTA (10 mmol/L de Tris-HCl, 0,1 mmol/L de EDTA, pH 8,0). Se añadieron 2 mL de 5 mol/L de LiCl y se incubó 10 min en hielo. Las muestras se centrifugaron a 12 000 rpm durante 10 min a 25°C y el sobrenadante se pasó a tubos de 40 mL. Se adicionaron 10 mL de etanol absoluto frío, se incubó 20 min a -20°C y se centrifugó 10 min a 12 000 rpm y 4°C. El precipitado se lavó con 10 mL de etanol al 70% centrifugando 10 min a 12 000 rpm y 4°C. El ADN se resuspendió en 1 mL de agua calidad biología molecular y se pasó a tubos de 1,5 mL. La concentración de ADN se determinó mediante espectrofotometría a $\lambda=260$ nm.

11.2.1.5 Digestiones de ADN plasmídico con endonucleasas de restricción.

Los ADN plasmídicos se digirieron con 3 U de enzima por µg de ADN diluido en el tampón apropiado y en un volumen total de 20 o 100 µL para las digestiones analíticas o preparativas, respectivamente. Las digestiones se incubaron 1 h a 37°C. Los productos de las digestiones enzimáticas se mezclaron con tampón de

carga para ácidos nucleicos (0,25% (p/v) de bromofenol azul, 30% (v/v) de glicerol) y se aplicaron en geles de agarosa al 0,8% (p/v, digestión preparativa). La corrida electroforética se realizó a voltaje constante de 100 V en tampón tris-acetato (TAE; 40 mmol/L de Tris, 20 mmol/L de ácido acético, 1 mmol/L de EDTA, pH 8,6)

Los fragmentos de la digestión preparativa se separaron en gel de agarosa de bajo punto de fusión, realizándose la corrida electroforética a 80 V en tampón TAE. Los fragmentos de interés se purificaron utilizando el kit de extracción de gel GeneJet (ThermoFisher Scientific, K0691). Los productos de la digestión analítica se separaron en gel de poliacrilamida al 8 % en condiciones no desnaturizantes. La corrida electroforética se realizó a voltaje constante de 100 V en tampón tris-borato (5 mmol/L de Tris, 45 mmol/L de ácido bórico, 2 mmol/L de EDTA, pH 8,0). Los productos de las digestiones se visualizaron mediante tinción con bromuro de etidio y exposición a luz ultravioleta.

11.2.1.6 Desfosforilación de extremo 5' de vectores de interés para futura ligación.

La desfosforilación de los extremos 5' se realizó utilizando la enzima fosfatasa antártica (New England Biolabs, M0289). Se mezclaron 1 pmol de extremos libres de ADN, 10 U de la enzima y tampón de la enzima (New England Biolabs, B0289S) en un volumen final de 20 μ L, incubándose durante 30 min a 37°C. La reacción se detuvo mediante inactivación de la enzima por calor a 80°C durante 20 min.

11.2.1.7 Fosforilación de extremos 5' del fragmento de ADN para futura ligación.

La fosforilación de los extremos 5' del fragmento de ADN codificante se realizó utilizando la enzima T4 polinucleótido quinasa-PNK (New England Biolabs, M0201S). Se mezclaron 2 pmoles de ADN, 10 U de la enzima PNK y tampón de la enzima (New England Biolabs, B0202S) en un volumen final de 10 μ L, incubándose durante 30 min a 37°C. La reacción se detuvo mediante inactivación de la enzima por calor a 65°C durante 20 min.

11.2.1.8 Reacción de ligamiento.

Se tomaron 100 ng del vector plasmídico puro digerido y se mezclaron con una cantidad de inserto adecuada para obtener una relación molar inserto: vector de 3:1. Se añadió 1 U weiss de la enzima ADN ligasa (New England Biolabs, M0202S) y tampón de la enzima (New England Biolabs, B0202S) en un volumen final de 20 μ L y se incubó 14 h a 16°C.

11.2.1.9 Electroporación del producto de la reacción de ligamiento y obtención de colonias recombinantes.

La mitad del producto de la reacción de ligamiento (10 μ L) se dializó en membrana de microdiálisis (Merck, VSWP 02500) contra agua destilada durante 30 min a 25°C. El ADN se mezcló con 50 μ L de bacterias electrocompetentes y se transfirió a cubetas de electroporación. Las cubetas se incubaron 5 min en hielo y las bacterias se transformaron aplicando un pulso eléctrico de 1,8 kV en el electroporador. Posteriormente, las cubetas se incubaron 1 min en hielo y se

recuperó el contenido con 1 mL de medio LB líquido. Las bacterias se incubaron 1 h a 37°C en agitación a 300 rpm. Las células se sembraron en medio LB sólido suplementado con 100 µg/mL de ampicilina y se crecieron durante 14-16 h a 37°C.

11.3 Técnicas básicas para el manejo y cultivo de células de mamífero.

11.3.1 Condiciones de cultivo.

Las líneas celulares HEK-293A y SiHa fueron cultivadas utilizando medio D'MEM (GIBCO, EE.UU.) suplementado con L-glutamina (0,3 mg/mL), piruvato sódico (1 mmol/L), antibiótico-antimicótico (10 000 U de penicilina, 10 000 µg estreptomycinina y 25 µg anfoterisina), según las indicaciones de los proveedores. Se trabajó con cultivos en monocapa en placas de 100 mm, frascos de cultivo de 25 cm² (T25) o de 75 cm² (T75), de acuerdo con los requerimientos de cada ensayo. Todos los cultivos se realizaron a 37°C, 5% de CO₂ y humedad relativa del 95%.

11.3.2 Cambio de medio.

El medio de cultivo se cambió teniendo en cuenta la densidad celular y el pH del medio. El medio de cultivo metabolizado fue extraído mediante aspiración con pipetas Pasteur de vidrio, seguido de un lavado con 3 mL/placa de PBS. Se agregó medio fresco DMEM suplementado con suero fetal bovino (SFB) al 5%, previamente calentado a 37°C.

11.3.3 Propagación.

Una vez que el cultivo se encontraba alrededor del 95% de densidad celular en monocapa, se eliminó el medio de cultivo y las células se lavaron dos veces con

un volumen de 3 mL de PBS. Se añadió solución de Tripsina- EDTA y se incubó en las condiciones descritas durante 5 min. Se agregó a cada placa 2 mL de medio de crecimiento fresco para inactivar la acción de la enzima. Posteriormente se preparó la dilución a sembrar utilizando el mismo medio. Las células se sembraron en placas o frascos de cultivo y se incubaron en las mismas condiciones.

11.3.4 Transfección en cultivos celulares.

Las células HEK-293A se sembraron a una confluencia del 40% en medio de crecimiento y se continuó el cultivo hasta alcanzar una confluencia celular del 80%. Una hora antes de comenzar el ensayo de transfección se cambió el medio de crecimiento por medio DMEM fresco. Como reactivo de transfección se utilizó Lipofectamina 2000 (Invitrogene, EE.UU.), y se siguieron las recomendaciones del proveedor.

11.4 Generación de vectores adenovirales.

11.4.1 Generación de genomas adenovirales recombinantes.

La generación de los vectores adenovirales recombinantes se realizaron mediante el protocolo del sistema comercial AdEasy™-Vector System (Quantum Biotechnologies, Canadá) (Figura 1). La inserción de la unidad transcripcional de interés en el genoma adenoviral se realizó mediante recombinación homóloga del vector pAdEASY-1 y los vectores de transferencia pAdTrack-MUC16his, pAdTrack-CD154his y pAdTrack-MUC16his/CD154, previamente linealizados con la endonucleasa *PmeI* (New England Biolabs, EE.UU.). Para esto, se co-electroporaron ambos vectores en la bacteria *E. coli* BJ5183 utilizando el

electroporador Micropulser (Bio-Rad Laboratories, EE.UU.), en una proporción de 1 µg de cada vector linealizado y 100 ng de pAdEASY-1. Posteriormente, los plasmidios resultantes de la recombinación fueron transformados en bacterias *E. coli* TOP10 y fueron purificados con el conjunto de reactivos Plasmid Midi Purification Kit (Qiagen, EE.UU). Los genomas recombinantes fueron identificados mediante digestión con la endonucleasa *PacI* (New England Biolabs, EE.UU.).



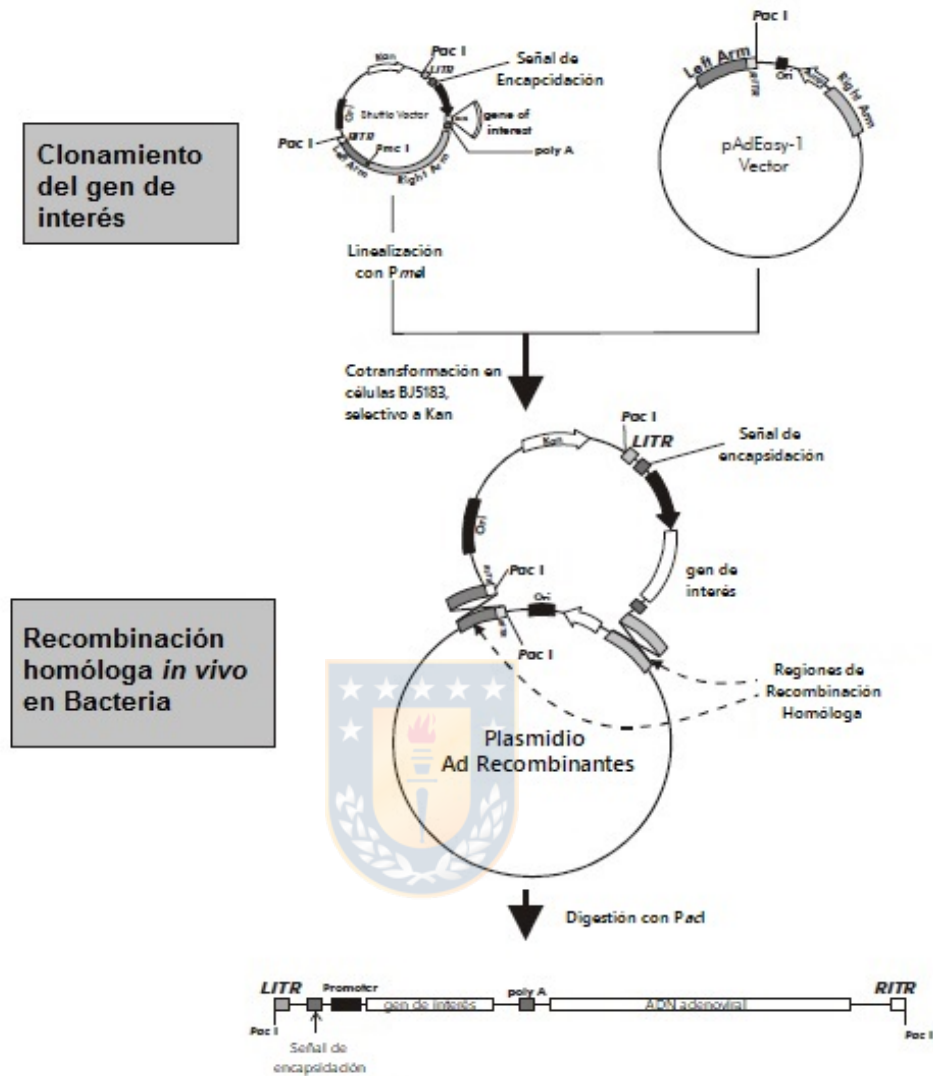


Figura 4. Representación esquemática de la recombinación homóloga utilizando el sistema comercial AdEasy™-Vector System (Quantum Biotechnologies, Canadá). En la parte superior de la figura se presenta el clonamiento del gen de interés en el vector de transferencia y la representación del vector pAdEasy-1. En la parte inferior, se esquematiza la recombinación homóloga *in vivo* en las células de *E. coli* BJ5183.

11.4.2 PCR de los plásmidos adenovirales recombinantes.

La amplificación por PCR del plásmido recombinante pAdEasy-MUC16his se realizó utilizando los oligonucleótidos específicos flanqueantes al gen (Tabla 1), que incluyen el sitio de corte para las enzimas de restricción *HindIII* y *NotI*, y además la secuencia consenso Kozak y el codón de iniciación ATG.

Tabla N°1. Oligonucleótidos específicos utilizados como cebadores para la amplificación del gen MUC16 mediante PCR.

Partidor	Tm (°C)	Secuencia 5' -3'
Forward	57,7	aagcttgccggccgcaccatggatgcaatgaagagaggg
Reverse	60	agattcgaaccaccggaattcccagtaagg

El protocolo de preparación y los parámetros de ciclos y temperaturas se realizaron según las indicaciones del proveedor de la enzima *Pfu* Ultra II HS DNA Polymerase (Agilent Technologies, EE.UU.).

11.4.3 Generación de viriones adenovirales recombinantes.

La linealización de los vectores pAdEASYMUC16his; pAdEASYCD154his y pAdEASYMUC16his/CD154 se realizó digiriendo 20 µg de cada vector con la endonucleasa *PacI*, y el producto de cada digestión se transfectó en las células HEK-293A, previamente crecidas hasta un 70% de confluencia en frascos de cultivo de 25 cm² (Falcon, EE.UU.). Los cultivos fueron mantenidos en monocapa celular confluyente durante 3 días, y posteriormente, fueron traspasados a frascos de cultivos de 75 cm², donde se mantuvieron durante 14 días más hasta la

formación de halos de lisis (Graham and Prevec 1995). Las partículas virales infectivas fueron denominadas AdsMUC16his; AdsCD154his y AdsMUC16his/CD154.

11.4.4 Amplificación de Vectores Adenovirales.

La multiplicación de los viriones AdsMUC16his; AdsCD154his y AdsMUC16his/CD154 se realizó en la línea celular HEK-293A a un 80% de confluencia, utilizando una multiplicidad de infección (MOI) de 5 UFC/célula. Tras 8 h de infección, se cambió el medio de crecimiento y 48 h post-infección, el cultivo se desprendió del frasco y las células colectadas se rompieron mediante tres pasos sucesivos de congelación (-20°C) -descongelación (37°C), seguido de agitación vigorosa. La muestra se centrifugó a 4000 rpm y el sobrenadante se almacenó a -80°C hasta su titulación.

11.4.5 Titulación de los Vectores Adenovirales.

Los adenovirus recombinantes fueron titulados mediante el método de la Unidad Formadora de Color (Quantum Biotechnologies). Para esto, se utilizaron 40 μL de cada una de las diluciones virales y fueron transferidas a una placa de cultivo de 96 pocillos con células HEK-293A previamente sembradas al 80% de confluencia. Las células transducidas fueron incubadas durante 72 h y se cuantificó el número de células que expresaban GFP en el microscopio óptico de fluorescencia (OLYMPUS IX81, Japón).

Una partícula viral o unidad formadora de color (UFC) se definió como la máxima dilución en la cual se visualizaba al menos una célula fluorescente por pocillo. El resultado de estos conteos, realizados en triplicados, se promedia y se multiplica

por la dilución para obtener el título viral, el cual se expresa en UFC/mL, y que queda expresado en la siguiente ecuación: N° células verdes × 5 n° de columna x 1000 = UFC mL

11.5 Transducción adenoviral en cultivo de células de carcinoma cérvico-uterino humano.

11.5.1 Expresión de proteínas recombinantes en cultivos celulares mediada por vectores adenovirales.

Para la expresión de las proteínas recombinantes MUC16his; CD154his y MUC16his/CD154 en cultivos de células SiHa se utilizó un MOI igual a 25, el cual fue determinado previamente en el laboratorio. Los cultivos se mantuvieron en placas de 100 mm (Falcon, EE.UU.) con medio de crecimiento hasta alcanzar un 80% de confluencia. Antes de realizar la infección, las placas fueron lavadas 3 veces con 3 mL de PBS y posteriormente los cultivos fueron transducidos con medio de infección, el que consistió en solución de PBS con la dosis de cada vector adenoviral acorde al MOI. Pasadas 8 h, el medio de infección se reemplazó por medio fresco sin suero y fue colectado transcurridas 48 y 96 h. Antes de almacenarlo a -20°C, se centrifugó a 800 rpm por 5 min y se filtró en membranas de 0,45 µm.

11.6 Técnicas generales de manipulación e identificación de proteínas.

11.6.1 Precipitación de proteínas con deoxicolato de sodio – ácido tricloroacético.

Medio de cultivo de células SiHa transducidas (1 mL), se le adicionó 100 µL de deoxicolato de sodio (1,5 mg/mL), se agitó vigorosamente durante 1 min y se dejó reposar 10 min a 25°C. Posteriormente, se agregó 100 µL de ácido tricloroacético

(TCA), se agitó fuertemente 1 min y se dejó reposar durante 10 min. Las muestras se centrifugaron a 10 000 rpm durante 15 min y el precipitado se lavó con acetona fría (4°C) agitándose fuertemente. Finalmente, las muestras se centrifugaron a 11 000 rpm durante 5 min y el precipitado resultante se disolvió en 20 µL de agua y se almacenó a 4°C hasta su análisis.

11.6.2 Electroforesis en gel desnaturalizantes de poliacrilamida.

Para la detección de proteínas de interés se utilizaron alícuotas provenientes desde medio de cultivo o mantenidas en soluciones tampones, que fueron ajustadas con tampón de carga. Las muestras de proteínas se separaron mediante electroforesis unidimensional en gel de poliacrilamida desnaturalizante (SDS-PAGE) al 8,5-10% utilizando una cámara Bio-Rad® con una solución tampón de corrida. La separación de las muestras se realizó a una corriente constante de 100 V. Los geles se tiñeron con solución de Azul de Coomasie y posteriormente, se hicieron lavados sucesivos con solución de destinción hasta observar las bandas de proteínas definidas. Finalmente se escanearon en el equipo Odyssey (Li -cor, EE.UU.).

11.6.3 Electro-transferencia de proteínas a partir de geles de poliacrilamida.

La transferencia a membranas de nitrocelulosa Hybond ECL Nitrocellulose (GE Healthcare, Reino Unido), se realizó una vez separadas las proteínas en SDS-PAGE, en el equipo de transferencia semi-seco Trans-Blot-Turbo (BioRad, EE.UU.). La transferencia desde el gel de poliacrilamida a la membrana se realizó aplicando un campo eléctrico de corriente constante (300 mA) durante 30 min y

a 25 V en solución tampón de transferencia. La transferencia de proteínas se comprobó a través de la tinción con solución de Rojo Ponceau al 1%.

11.6.4 Inmuno-identificación de proteínas mediante Western blot.

La inmuno-identificación de las proteínas de interés se realizó según se describió previamente (Burnette 1981). La membrana de nitrocelulosa electro-transferida se sumergió en solución de bloqueo durante 1 h a 25°C, se lavó con tampón TBS-Tween20 0,05%. Los anticuerpos primarios y secundarios utilizados se describen a continuación:

- i. Anticuerpo monoclonal primario anti-6xHis (Clontech, EE.UU.) en dilución 1:5000 en solución de bloqueo. Se incubó durante 1 h a 25°C y se lavó 3 veces en TBS-tween20 al 0,05% durante 10 min. Posteriormente se incubó con el anticuerpo secundario anti-IgG de ratón conjugado al fluoróforo AlexaFluor® 680nm (Jackson Laboratory, EE.UU.) diluido 1:5000 en solución de bloqueo, durante 1 h. Finalmente la membrana se lavó 3 veces en solución TBS-tween20 al 0,05% durante 10 min.
- ii. Anticuerpo policlonal primario anti-MUC16 C-20 (Santa Cruz Biotechnology, EE.UU.) en una dilución 1:1000 en solución de bloqueo. Se incubó durante 4 h a 25°C y se lavó 3 veces en TBS-Tween20 al 0,05% durante 10 min. Posteriormente se incubó con el anticuerpo secundario anti-IgG de cabra conjugado al fluoróforo AlexaFluor® 790 nm (Jackson Laboratory, EE.UU.) en una dilución 1:5000 en solución de bloqueo durante 1 h. Finalmente la membrana se lavó 3 veces en solución TBS-Tween20 al 0,05% durante 10 min. La

identificación de bandas inmuno-fluorescentes fue realizada en el equipo Odyssey (Li-cor, EE.UU.).

11.6.5 Cuantificación de Proteínas.

Las proteínas se cuantificaron por el método colorimétrico del Ácido Bicinconínico (BCA), (kit, Thermo Scientific Pierce, EE.UU.). Se realizó una curva de calibración con un rango de concentraciones entre 0,1 y 2,0 mg/mL de BSA en una placa de 96 pocillos y se midió absorbancia en el espectrofotómetro SpectroStar Nano (BMG-LABTECH, Alemania). Las muestras fueron cargadas por triplicado.

11.7 Obtención de proteína recombinante desde medio de cultivo de células SiHa.

El medio de cultivo de células SiHa transducidas de 48 h se concentró 10 veces mediante bio-separación de solución biológica-acuosa, utilizando Millipore Amicon™ (Fischer Scientific, EE.UU.) y posteriormente se dializó utilizando membrana Spectra/Por® de 12 kDa (SpectrumLabs, EE.UU.) en PBS.

11. 7.1 Purificación de las proteínas recombinantes.

La purificación de las proteínas CD154his y MUC16his se realizó mediante cromatografía de afinidad a iones metálicos (IMAC). En el caso de MUC16his se utilizó una matriz de Quelato-Sepharosa de flujo rápido cargada con Cu^{2+} y para purificar la proteína CD154his se utilizó una columna de Quelato-Sepharosa de alta resolución cargada con Ni^{2+} , ambas acopladas al cromatógrafo líquido (AKTPrime, EE.UU.). La señal se registró a 280 nm. Soluciones (10 mL) de NiSO_4 o CuSO_4 100 mmol/L a un flujo de 1 mL/min, se utilizaron para cargar las matrices y posteriormente se lavó con 20 mL de agua miliQ. Ambas matrices se equilibraron con solución tampón fosfato 50 mM pH 7,4.

Previo a la aplicación de las proteínas en las columnas, el medio de cultivo que expresa la proteína CD154his y MUC16his, se diluyó con un volumen de solución de equilibrio. La elución se realizó en la solución de equilibrio que contenía cantidades crecientes de imidazol. La purificación de la CD154his se utilizó 50, 200 y 500 mM de imidazol y para MUC16his se utilizó 5, 50 y 200 mM de imidazol. La purificación de MUC16his/CD154 se realizó mediante cromatografía de exclusión molecular en columna Superosa 12 10/300 GL de alta resolución acoplada en el equipo de purificación (AKTPrime, EE.UU.). La matriz se equilibró con solución tampón fosfato 50 mM más 750 mmol/L de L-arginina a pH 7,4. La muestra (medio de cultivo que contiene la proteína MUC16his/CD154) concentrada con polietilenglicol (PEG) y filtrada, se aplicó a la columna a un flujo de 0,5 mL/min. Posteriormente se realizó la elución en solución de equilibrio que contenía 200 mM de imidazol. Las fracciones obtenidas de la cromatografía se dializaron en PBS.

11.8 Determinación de dosis y vía de administración en modelos murinos C57BL/6 enfrentados al antígeno MUC16.

11.8.1 Modelo animal .

La evaluación de la respuesta inmune generada por los candidatos vacunales se realizó en ratones hembra (*Mus musculus*) de la cepa C57BL/6 (ISP, Chile) de ocho semanas de vida y 20 g de peso. Durante la realización de los experimentos los ratones se mantuvieron en la sala de manejo animal del Departamento de Fisiopatología de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad de Concepción. El experimento con los animales se realizó por personal técnico veterinario especializado. Todos los protocolos experimentales y de manejo

animal propuestos en el presente proyecto fueron aprobados por el Comité de Bioética y Bioseguridad de la Facultad de Ciencias Biológicas.

11.8.2 Formulación de los candidatos vacunales

Las proteínas purificadas MUC16his, CD154his y MUC16his/CD154 se formularon en una emulsión de agua y aceite (70:30) utilizando el adyuvante comercial Montanide ISA150 (Seppic, Francia). Se administraron dosis de 30 µg de cada proteína en volúmenes de 150 µL, por vía subcutánea, en los ratones C57BL/6, como indica la Tabla 2. En los 14 y 28 días de la primera inmunización se aplicaron dosis de refuerzo.

Tabla N°2. Descripción de grupos experimentales para la evaluación de la respuesta inmune de los candidatos vacunales.

Grupo experimental	Inmunógeno	Vía de administración
Grupo A	MUC16his	subcutánea
Grupo B	CD154his	subcutánea
Grupo C	MUC16his/CD154	subcutánea
Grupo D	MUC16his+CD154his	subcutánea
Grupo E	PBS	subcutánea
Grupo F	AdMock	subcutánea

11.9 Desarrollo de un modelo de implante de células tumorales murinas establemente transformadas para la expresión de MUC16.

11.9.1 Obtención de vector de expresión en mamíferos del fragmento C-terminal de MUC16.

La banda resultante del PCR se clonó en el vector plasmídico pMosblue generándose el plasmidio pMOSBlue-MUC16. El fragmento de ADN clonado se

secuenció y el resultado de la secuenciación se analizó empleando el programa ClustalW. Simultáneamente, la secuencia codificante para la señal de secreción del TPA, se extrajo del vector pAEC-SPT mediante digestión con las endonucleasas *KpnI* y *SmaI* y se clonó en el MCS del vector pBSM previamente digerido con las mismas endonucleasas de restricción, generándose así el vector pBSM-sp.

La secuencia de 3,6 kilobases (kb) codificante para el C-Terminal de MUC16 se extrajo del vector pMOSBlue-MUC16 mediante digestión con las endonucleasas de restricción *BglII* y *EcoRV* y se clonó en el vector pBSM-sp previamente digerido con las mismas enzimas, generando el pstMUC16. Posteriormente, la secuencia codificante para MUC16 fusionada al péptido de secreción del TPA humano, se extrajo del vector pstMUC16 mediante digestión con *NotI* y se clonó en el vector de expresión mamíferos pTarget previamente digerido con la endonucleasa *NotI*. Como resultado de este clonaje se generó el vector pT-stMUC16.

11.9.2 Transfección en cultivos celulares mediante el protocolo de Polietilenimina.

Las células se sembraron en frascos de 25 cm², a una confluencia del 40%, en medio de crecimiento, y se mantuvieron el cultivo hasta una confluencia celular del 80%. La solución de transfección se preparó utilizando polietilenimina (PEI) de 25 kDa (Sigma-Aldrich, EE.UU.) (0,81 mg/mL pH=7) y una solución de glucosa al 5%. El ADN se usó a razón de 3 µg por cada 400 mm² y se empleó 1 µL de la solución de PEI por cada µg de ADN. Tanto el ADN como el PEI se les adicionó glucosa al 5% hasta completar 50 µL, ambos tubos se agitaron vigorosamente y

se dejaron reposar durante 10 min. Pasado este tiempo se añadió el PEI al ADN, inmediatamente se mezcló vigorosamente durante 1 min y se dejó reposar a temperatura ambiente durante 10 min. A la mezcla ADN/PEI se le adicionó medio sin suero hasta completar 1 mL y se añadió suavemente sobre la capa celular. Las células fueron se incubaron a 37°C, en atmósfera de CO₂ al 5% y humedad relativa del 95% por 6 h, antes de adicionarle el SFB.

11.9.3 Selección de clones establemente transformados.

Veinticuatro horas después de la transfección las células se tripsinizaron y sembraron en placas de 145 cm² en medio suplementado con el antibiótico de selección G4128, a una concentración final de 600 µg/mL. Las células se mantuvieron en este medio por 17 días, momento en el que el 100% de las células controles (no transfectadas) habían muerto. Durante este tiempo, el medio de selección se cambió teniendo en cuenta la acumulación de células muertas y el pH.

El cultivo resistente a G418, se tripsinizó y se sembró en placas de 145 cm² a razón de 120 células por placas, en medio de selección. Los clones derivados de estas células alcanzaron un diámetro aproximado de 2 mm en 15 días. Acorde al tamaño y nivel de aislamiento, se seleccionaron 24 clones los que se microtripsinizaron y sembraron independientemente pasando por áreas de cultivo en aumento según densidad celular (placas de cultivo adherente de 96, 24, 12 y 6 pozos (COSTAR®, EE.UU.) hasta llegar a frascos para cultivo de 25 cm² de donde se tomó el 50% de las células para el análisis de la expresión de

la proteína MUC16 mediante citometría de flujo. Estos clones se nombraron MB16MUC16.

11.9.4 Determinación de la expresión de MUC16 en la superficie celular.

Los clones seleccionados con el antibiótico G418 se lavaron con solución de bloqueo y se centrifugaron 2 min. a 2000 rpm. Las células se incubaron durante 30 min a 4°C con 100 µL de una dilución 1:6.000 del suero policlonal anti-MUC16. Después de 2 lavados, se le añadió el anticuerpo anti-IgG de ratón conjugado con estreptoavidina-isotiocianato de fluoresceína (FITC) (Jackson, EE.UU.) en una dilución de 1:200, durante 30 min a 4°C. Finalmente, las células se lavaron dos veces por centrifugación durante 3 min a 2000 rpm y se resuspendieron en solución de bloqueo. Las células positivas al marcaje en cada situación experimental se determinaron en el citómetro de flujo FACScan (Becton Dickinson, EE.UU.). El porcentaje de expresión de MUC16 en las células se determinó utilizando la fórmula:

$$\% \text{Inb} = (\text{IMF}_{\text{células controles}} - \text{IMF}_{\text{células evaluadas}}) / \text{IMF}_{\text{células controles}} \times 100.$$

Se utilizó el programa WinMDI 2.8 para el procesamiento de los datos obtenidos por citometría de flujo.

11.9.5 Implantación tumoral *in vivo*.

Las células tumorales para la implantación se obtuvieron mediante tripsinización de los cultivos *in vitro* MB16F10MUC16. El número de células tumorales se contó y se llevó a una concentración de 500 000 células /mL utilizando como diluyente PBS. Los animales se inocularon por vía subcutánea en el flanco lateral superior derecho con 100 µL de PBS / células. Los animales se monitorearon durante 45

días posteriores a la inoculación. Los tumores se midieron en los días 16 y 24 tras la implantación utilizando un pie de rey. El volumen tumoral se calculó utilizando la ecuación $V_t = \pi/6 \times D \times d^2$, donde D representa el diámetro mayor y d el diámetro menor del tumor.

11.10 Respuesta inmune inducida por los candidatos vacunales de forma preventiva y terapéutica en modelos murinos enfrentados a células tumorales que expresan MUC16.

La determinación de la respuesta inmune innata, humoral o celular; generada por los candidatos vacunales en el modelo murino C57BL/6 enfrentado a células tumorales que expresan MUC16 se realizó análisis inmunológicos capaces de indicar los niveles de expresión de antígenos en el suero, citoquinas en los tumores.



11.10.1 Ensayos de ELISA para la detección de los títulos de inmunoglobulinas IgG y subclases IgG1 e IgG2a en suero de ratón.

La evaluación de la respuesta inmune humoral: IgG y subclases IgG1 e IgG2a en el suero con especificidad a MUC16, se determinó mediante ELISA. La placa de ELISA (ThermoFisher, EE.UU.) de 96 pocillos se recubrió con 50 μ L del antígeno MUC16 purificado diluido en la solución de recubrimiento (bicarbonato de sodio 2,93 g/L + carbonato de sodio 1,52 g/L pH 9,4 – 9,6), a una concentración de 5 μ g/mL, durante 12 h o 16 h, a 4°C. Luego, se retiró la solución de recubrimiento y se lavó dos veces con 100 μ L de tampón de lavado, PBS-Tween20 0,05%, por pocillo y se bloqueó con 50 μ L de solución de bloqueo, leche descremada al 3% diluida en PBS, por pocillo durante 1 h a 37°C y se lavó tres veces con 100 μ L de solución de lavado. Posteriormente, la placa se incubó con una dilución en serie

de los sueros de ratones inmunizados durante 2 h a 37°C y se lavó tres veces con 100 µL de solución de lavado. Finalmente se añadieron anticuerpos secundarios conjugados a peroxidasa de rábano picante (HRP) (Sigma, Oakville, ON, Canadá): anti-ratón IgG-HRP (Sigma, Oakville, ON, Canadá), anti-ratón IgG1-HRP, anti-cabra IgG2a-HRP; en la dilución 1:5000, 1:10000, 1:20000; respectivamente. Después de 1 h de incubación a 37°C, las placas se lavaron cuatro veces con 100 µL de solución de lavado, y se añadió 100 µL de solución de sustrato (citrato trisódico dihidratado ($C_6H_5Na_3 \times 2H_2O$) 29,4 g/L más 900 mL de agua purificada) a cada pocillo más 0,4 g/L de diclorhidrato de o-fenilendiamina (OPD) y 1 µL H_2O_2 /mg. Después de 20 min de incubación a 25°C, la reacción enzimática se detuvo por adición de 25 µL de H_2SO_4 en cada pocillo.

11.10.2 PCR en tiempo real para la detección de citoquinas IL-10, IL-6, IL-12 y VEGF expresadas en el tejido tumoral.

El análisis de la expresión de citoquinas en los tumores establecidos en el modelo murino se efectuó mediante PCR en tiempo real (qRT-PCR). A partir del ARN total (1 µg) aislado de los tejidos de tumorales se obtuvo el ADNc utilizando la enzima transcriptasa inversa, según las recomendaciones del fabricante. Los cebadores específicos para ARNm de las citoquinas IL-10, IL-6, IL12 y VEGF, la sonda y el protocolo experimental para qRT-PCR se adaptó al protocolo del laboratorio. La reacción de qRT-PCR se llevó a cabo con cebadores inversos y hacia adelante utilizando la PCR en tiempo real de Applied Biosystems ViiA 7 (Applied Biosystems International, Foster City, CA, EE. UU.). Cada reacción de qRT-PCR se realizó por duplicado. Se utilizaron diluciones del amplicón de genes

de las citoquinas (100–108 números de copias) para preparar la curva estándar.

Cada experimento se realizó por triplicado.

Tabla N°3: Secuencias de partidores diseñados para evaluar respuesta inmune celular por PCR en tiempo real.

Partidores	Secuencia (5'→3')
IFN- γ (F)	TCAAGTGGCATAGATGTGGAAGAA
IFN- γ (R)	TGGCTCTGCAGGATTTTCAT
TGF- β (F)	CTCCCGTGGCTTCTAGTGC
TGF- β (R)	GCCTTAGTTTGGACAGGATCTG
IL-6 (F)	GAGGATAACCACTCCCAACAGACC
IL-6 (R)	AAGTGCATCATCGTTGTTTCATACA
TNF- α (F)	GCACCACCATCAAGGACTCAA
TNF- α (R)	TCAGGGAAGAATCTGGAAAGGT
IL-10 (F)	ATCCTGACTTCTTTTCCTTG
IL-10 (R)	GCCTTCTTTTGCAAGTCTGTC.
IL-1 β (F)	ATCCTGACTTCTTTTCCTTG
IL-1 β (R)	TGTTGATGTGCTGCTGCGAGA
VEGF (F)	GTACCTCCACCATGCCAAGT
VEGF (R)	TCATGGGACTTCTGCTCTCC
IL-12 (F)	CCAGGTGTCTTAGCCAGTCC
IL-12 (R)	GCAGTGCAGGAATAATGTTTCA
β -actina (F)	CGTGGACATCCGCAAAGACC
β -actina (R)	GGACTCGTCATACTCCTGCTTGC

11.11 Análisis estadístico.

El análisis de los resultados de la respuesta inmune en los ensayos con animales se realizó graficando el promedio \pm error estándar y se expresó como porcentaje de disminución o aumento con respecto al control sin tratamiento. En el análisis se usó ANOVA de doble vía y prueba de comparaciones múltiples de Turkey. Los símbolos empleados para denotar los resultados estadísticamente significativos fueron: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ y **** $p < 0,0001$. Un nivel de $p < 0,05$ se

consideró estadísticamente significativo para los análisis con ANOVA. Para todos los análisis se utilizó el software GraphPad Prism 6 (GraphPad Prism, EE.UU.).



12. RESULTADOS

12.1 Generación de tres vectores adenovirales que codifiquen para el fragmento soluble de la mucina 16 humana, un segundo vector que codifique para una variante quimérica de MUC16 unida al dominio extracelular de la molécula CD154 murina y un tercer vector que permita la expresión del dominio extracelular de CD154.

Para expresar las proteínas antigénicas o inmunoreguladoras MUC16his, CD154his y MUC16his/CD154 en cultivos celulares, se construyeron dos de los tres plásmidos adenovirales (pAd-MUC16his/CD154 Y pAd-CD154his) con el sistema de expresión pAd-Easy mediante recombinación homóloga. El pAd-MUC16his ya había sido previamente generado en el Laboratorio de Biotecnología y Biofármacos de la Universidad de Concepción, Chile. La secuencia de interés codificante insertada en este vector permitió la expresión de la región C terminal de MUC16 humana. Esta región está compuesta de un dominio citoplasmático y un fragmento de siete repeticiones aminoacídicas del dominio extracelular. Además, el diseño de la secuencia también contempló la señal de secreción del activador tisular del plasminógeno humano (ht-PA) hacia el N-terminal, y una cola de seis histidinas (his) hacia el C-terminal de la secuencia, con la finalidad de facilitar la identificación y purificación de la proteína, esta secuencia se obtuvo mediante PCR a partir de células tumorales de cáncer de ovario epitelial. Por otra parte, el diseño de la secuencia también contemplo

una señal de secreción del activador tisular del plasminógeno humano (ht-PA) hacia el N-terminal y una cola de seis histidinas, para facilitar la identificación y purificación de la proteína hacia el C-terminal de la secuencia Fig. 2A).

Para el diseño del vector que contiene el dominio extracelular de la molécula coestimuladora CD154 se identificó la secuencia de cDNA de esta última en la base de datos de GenBank, tomando en consideración los residuos aminoacídicos desde el 47 al 260 del CD40L murino, ya que esta región comprende el dominio extracelular de la proteína sin considerar su región transmembrana. A partir de estos datos, y con la finalidad de mantener el plegamiento y funcionalidad de los dominios estructurales, se utilizó un péptido espaciador flexible compuesto a base de aminoácidos con cadenas laterales poco ramificadas, tales como Serina y Glicina, que poseen una distancia óptima de 10 residuos (SGGGGSGGGG). Además, tal como se mostró en el vector anterior, se añadió una secuencia de 6 histidinas en el diseño de la molécula hacia el N-terminal y con el fin de expresar la proteína de forma soluble se agregó la señal de secreción del ht-PA. A partir de este diseño, se sintetizó el gen para el dominio extracelular de la molécula CD154 en un vector comercial (pUC57CD154his) que contiene las secuencias de corte de las endonucleasas *NotI-EcoRV* para facilitar la posterior inserción del gen en el vector de transferencia pAdTrack-CMV (Fig. 5B).

Para el diseño de la secuencia quimérica que comprende la región C terminal de la mucina 16 humana y el dominio extracelular de la molécula coestimuladora CD154 se utilizó la secuencia de la mucina 16 humana contenida en el vector

pAdTrack-MUC16his la cual se amplificó mediante PCR. A la secuencia original se le añadieron sitios de restricción para las endonucleasas *NotI-HindIII* esto permitió la inserción de la secuencia de interés en el vector pAdTrack-CD154his. De esta forma la secuencia quimérica incluyó la señal de secreción ht-PA y la secuencia codificante de la región C-terminal de la mucina 16 humana, seguido por el péptido espaciador flexible, la cola de histidina entre las dos secuencias y el dominio extracelular del CD154 murino hacia el C-terminal del gen (Fig. 5C).



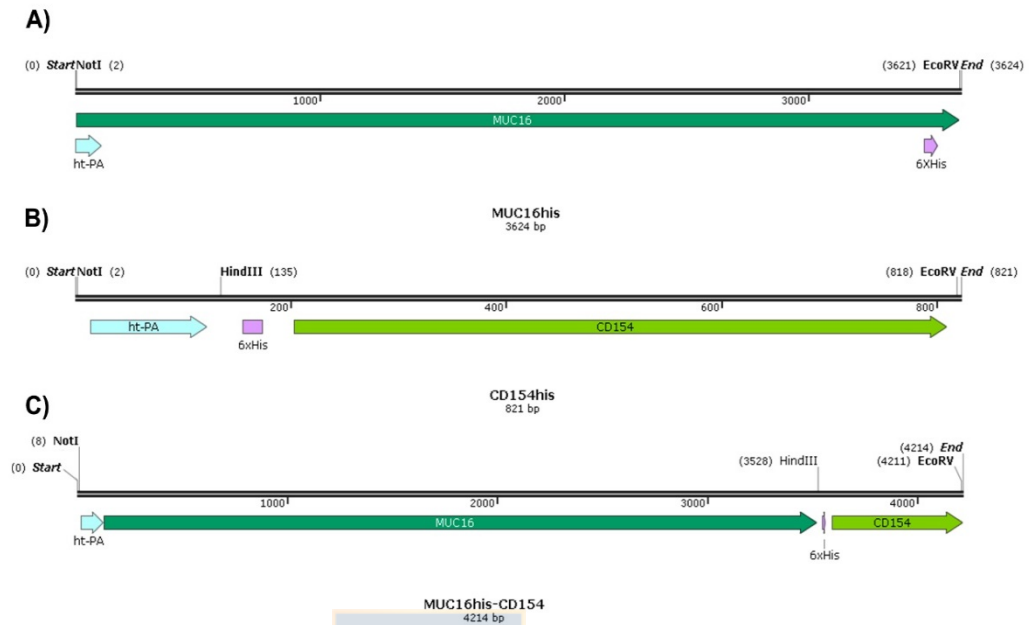


Figura 5: Diseño secuencias de los candidatos vacunales. A: Secuencia codificante del dominio extracelular del antígeno Mucina 16 humana; **B:** Secuencia codificante del dominio extracelular de la molécula coestimuladora CD154 murina; **C:** Secuencia quimérica codificante del dominio extracelular del antígeno Mucina 16 y del dominio extracelular de la molécula coestimuladora CD154. Fuente: elaboración propia.

12.2 Construcción de los plásmidos adenovirales pAd-MUC16his, pAdCD154his y pAd-MUC16/CD154his.

Un segmento de 821 pb correspondiente a la secuencia diseñada para el dominio extracelular de la molécula coestimuladora del CD154 murino, se extrajo del vector pUC57CD154his, mediante digestión enzimática con las endonucleasas *NotI-EcoRV*, posteriormente esta secuencia se clonó en el vector de transferencia pAdTrack-CMV bajo el control del promotor inmediato temprano del citomegalovirus humano (PCMV) (Fig. 6A), usando las mismas enzimas de restricción. Como resultado de la clonación se obtuvo el plásmido de transferencia denominado pAdTrack-CD154his de 9829 pb (Fig. 6C) su correcta inserción fue evaluada utilizando las enzimas de restricción *NcoI* y *PvuII* (Fig. 6B).

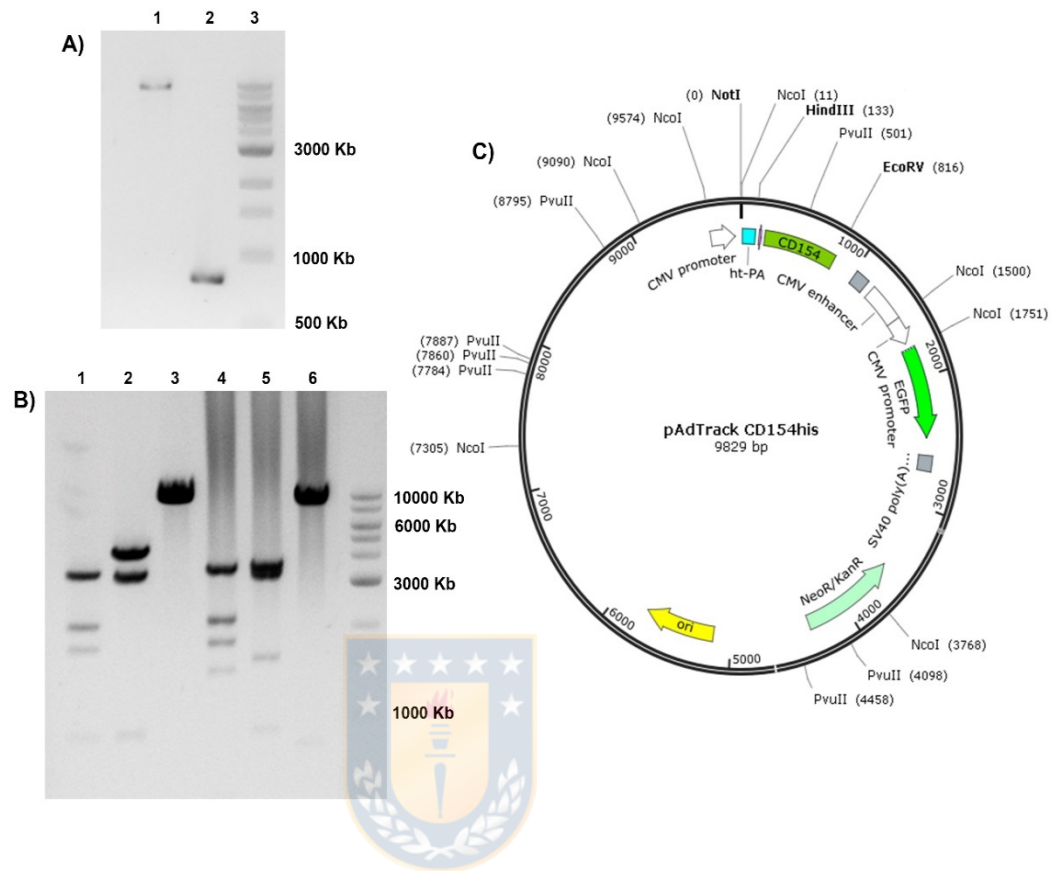


Figura 6: Construcción del vector de transferencia recombinante pAdtrackCD154his. **A:** Electroforesis de ADN (Carril 1: Vector de transferencia pAdTrack obtenido mediante digestión enzimática con *NotI* y *EcoRV*; Carril 2: Banda obtenida del vector comercial pUC52CD154his mediante digestión enzimática con *NotI* y *EcoRV*; Carril 3: Marcador de peso molecular) **B:** Electroforesis analítica del clon recombinante seleccionado digerido con enzimas de restricción *NcoI* y *PvuII*. (Carril 1: digestión del clon recombinante con la enzima de restricción *NcoI*; Carril 2: digestión del clon recombinante con la enzima de restricción *PvuII*; Carril 3: clon recombinante sin digerir; Carril 4: digestión del vector de transferencia pAdTrack con la enzima de restricción *NcoI*; Carril 5: digestión del vector de transferencia pAdTrack con la enzima de restricción *PvuII*; Carril 6: Vector de transferencia pAdTrack sin digerir) **C:** Diseño del vector recombinante pAdtrackCD154his. Fuente: elaboración propia.

El vector pAdTrack-MUC16his/CD154 se obtuvo utilizando la secuencia de la mucina 16 humana contenida en el vector pAdTrack-MUC16his, el fragmento de ADN que codifica para este segmento se amplificó mediante PCR convencional. Con este método se obtuvo una banda única con una talla aproximada a los 3520 pares de bases (Fig. 7 A-B). Con el objetivo de multiplicar la secuencia amplificada y verificar su identidad, el producto de PCR se clonó en el vector pBlueScript el cual previamente fue digerido con la enzima de restricción *EcoRV* y tratado con la enzima Fosfatasa Alcalina (Fig 7D). Un análisis de restricción con las endonucleasas *XmnI*, *HindIII* y *NotI* permitió corroborar la identidad de la banda clonada (Fig. 7C).



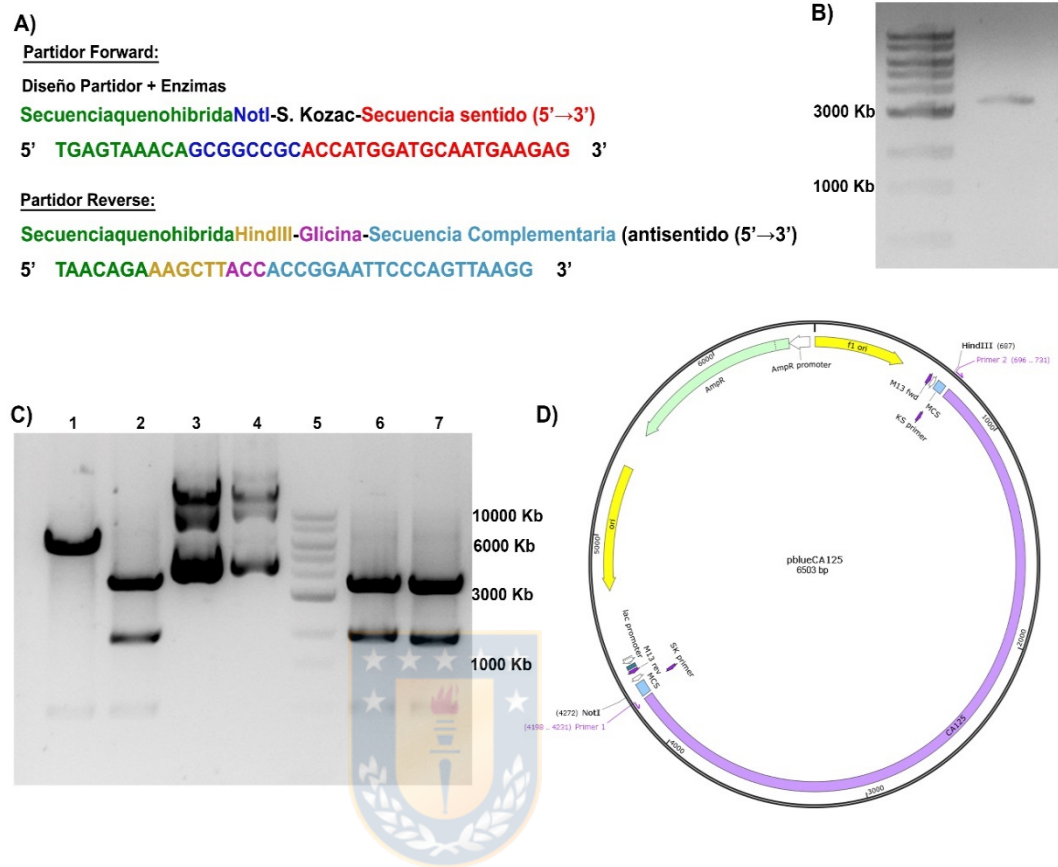


Figura 7: Construcción del plasmidio PblueMUC16his. **A:** Secuencias de partidores utilizados en PCR convencional para extracción de banda de MUC16 a partir de pAdEasyMUC16his. **B:** Electroforesis de banda de MUC16 obtenida mediante PCR convencional. **C:** Electroforesis analítica del clon recombinante seleccionado digerido con enzimas de restricción *XmnI*, *HindIII* y *NotI*. (Carril 1: digestión del clon recombinante 1 con la enzima de restricción *XmnI* y *HindIII*; Carril 2: digestión del clon recombinante 1 con la enzima de restricción *XmnI*, *HindIII* y *NotI*; Carril 3: clon recombinante 1 sin digerir; Carril 4: clon recombinante 2 sin digerir; Carril 5: Marcador de peso molecular; Carril 6: digestión del clon recombinante 2 con la enzima de restricción *XmnI* y *HindIII*; Carril 7: digestión del clon recombinante 1 con la enzima de restricción *XmnI*, *HindIII* y *NotI*) **D:** Diseño del vector recombinante pBlueMUC16his. Fuente: elaboración propia.

Una vez obtenido el vector pBlueMUC16 este fue digerido con las endonucleasas *NotI-HindIII*, la banda obtenida fue clonada en el vector de transferencia pAdTrack-CD154his anteriormente mencionado (Fig. 8A), utilizando las mismas enzimas de restricción. Mediante este clonamiento se obtuvo el vector denominado pAdTrack-MUC16his/CD154 de 13216 pb (Fig. 8C). La correcta inserción de la banda en el vector de transferencia fue chequeada mediante las endonucleasas *KpnI*, *NotI-HindIII* y *HindIII-EcoRV* (Fig. 8B)



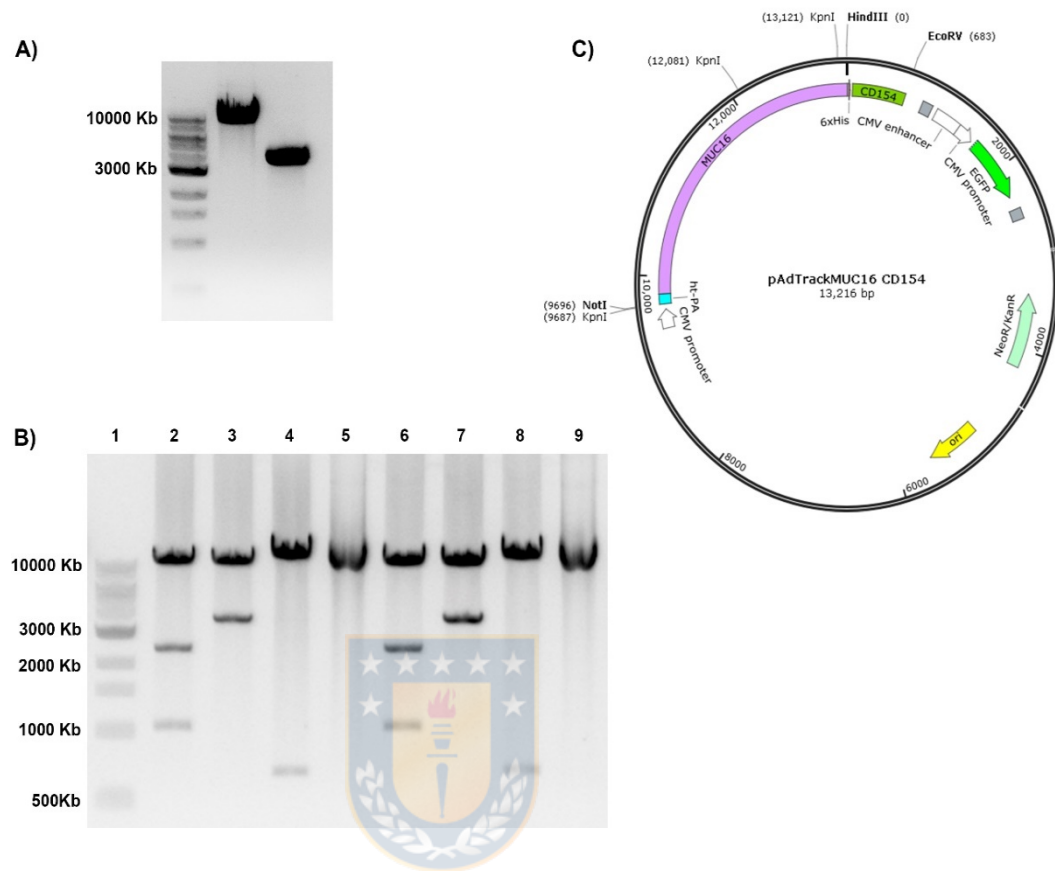


Figura 8: Construcción del vector de transferencia recombinante pAdtrackMUC16his/CD154. **A:** Electroforesis analíticas de las bandas obtenidas a partir de la digestión realizada con *NotI-HindIII* (Carril 1: Marcador de peso molecular; Carril 2: Vector de transferencia pAdtrackCD154; Carril 3: banda MUC16 obtenida a partir del vector pBlueMUC16.) **B:** Electroforesis analítica del clon recombinante seleccionado digerido con enzimas de restricción *KpnI*, *NotI-HindIII* y *HindIII-EcoRV*. (Carril 1: Marcador de peso molecular; Carril 2: digestión del clon recombinante 1 con la enzima de restricción *KpnI*; Carril 3: digestión del clon recombinante 1 con las enzimas de restricción *NotI-HindIII*; Carril 4: digestión del clon recombinante 1 con las enzimas de restricción *HindIII-EcoRV*; Carril 5: clon recombinante 1 sin digerir; Carril 6: digestión del clon recombinante 2 con la enzima de restricción *KpnI*; Carril 7: digestión del clon recombinante 2 con las enzimas de restricción *NotI-HindIII*; Carril 8: digestión del clon recombinante 2 con las enzimas de restricción *HindIII-EcoRV*; Carril 9: clon recombinante 2 sin digerir) **C:** Diseño del vector de transferencia recombinante pAdtrackMUC16his/CD154. Fuente: elaboración propia.

Una vez obtenidos los vectores de transferencia con las secuencias de interés que codifican para los 3 candidatos vacunales, se generaron los plásmidos Ad-recombinantes. Para ello, nos basamos en el sistema comercial AdEasy™-Vector System (Quantum Biotechnologies, EE. UU.) que permite la generación de vectores adenovirales recombinantes utilizando el vector pAd-EASY como donador del genoma adenoviral. Este vector contiene la mayoría del genoma del adenovirus serotipo 5 humano, presentando deleciones de las regiones génicas E1 y E3. La proteína E1 es fundamental para la replicación del virus, por lo tanto, esta deleción genera vectores virales deficientes para la replicación, a partir de los cuales no se generan partículas infecciosas en células huésped. Sin embargo, su función es esencial en la generación de vectores adenovirales. En cambio, la proteína E3 cumple una función en la evasión de la inmunidad del hospedero, pero su función no es esencial para este proceso.

Los vectores pAdTrack-CD154his y pAdTrack-MUC16his/CD154 previamente linealizados con la enzima de restricción *PmeI* (Fig. 9B y Fig. 10B), se co-transformaron con el vector pAd-EASY1 en la cepa de *E. coli* BJ5183 de forma separada, para la obtener los genomas adenovirales recombinantes. A partir de esta transformación se obtuvieron posibles clones recombinantes, los cuales fueron seleccionados de acuerdo con su patrón de corrida electroforética teniendo como controles los vectores pAdTrack-CMV y pAd-EASY. Todas las posibles colonias que tuvieron un patrón de corrida “más retrasado” y similar al del vector pAd-EASY fueron seleccionados para su análisis mediante un chequeo de restricción con la endonucleasa *PacI* (Fig. 9C-D y Fig. 10C-D). De esta forma

se obtuvieron los plásmidos que contenían los genomas adenovirales recombinantes, pAdEASYCD154his que contiene el dominio extracelular y soluble de la molécula coestimuladora CD154 y el pAdEASYMUC16his/CD154 el cual contiene una unidad transcripcional para la proteína de fusión conformada por el C terminal de MUC16 y el dominio extracelular soluble de CD154 y el pAdEASY-MUC16his, que fue previamente generado en el laboratorio y que contiene una unidad transcripcional para el dominio extracelular de la proteína MUC16. Además, todos los plásmidos contienen una segunda unidad transcripcional para el gen reportero de la proteína verde fluorescente (GFP) y el genoma del adenovirus humano serotipo 5 con las regiones E1 y E3 eliminadas. Posteriormente los plasmidios pAdEASY-MUC16his, pAdEASY-CD154his y pAdEASY-MUC16his/CD154 se digirieron con la endonucleasa *PacI* con la finalidad de eliminar la región bacteriana de los plásmidos (Fig. 9D Y 10D) y los segmentos resultantes fueron transfectados separadamente en la línea de empaquetamiento adenoviral HEK-293A.

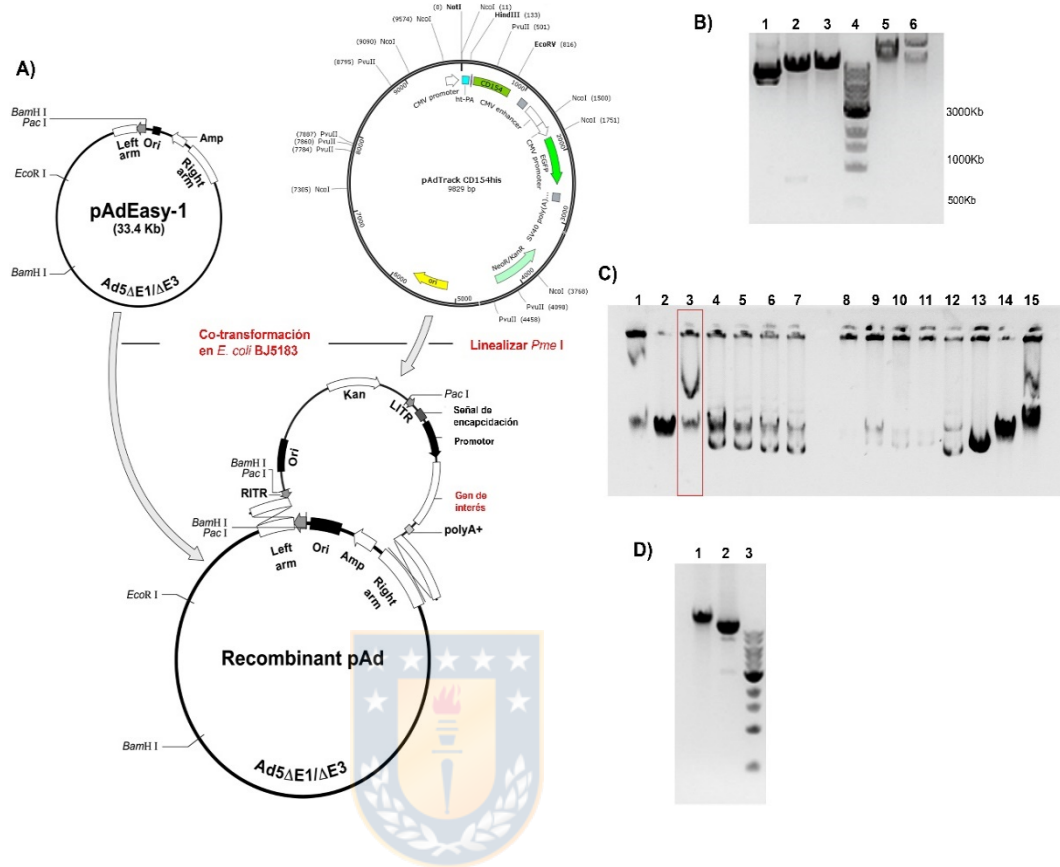


Figura 9: Generación del vector adenovirales pAdEASYCD154his. **A:** Esquema representativo de la recombinación de homólogos y obtención del vector pAdEasy recombinante. **B:** Análisis de restricción del vector recombinante pAdEasy-CD154his con la endonucleasa *Pme*I (Carril 3: digestión del pAdTrackCD154his con *Pme*I; Carril 4: Marcador de peso molecular; Carril 5: pAdEasy sin digerir). **C:** Corrida electroforética para determinar posibles pAdEasy recombinantes (Carril 1 y 15: pAdEasy como control; Carril 2-14: posibles recombinantes) **D:** electroforesis para visualizar digestión analítica mediante la endonucleasa *Pacl*I (Carril 1: recombinante sin digerir; Carril 2: Recombinante digerido con *Pacl*I; Carril 3: Marcador de peso molecular). Fuente: elaboración propia.

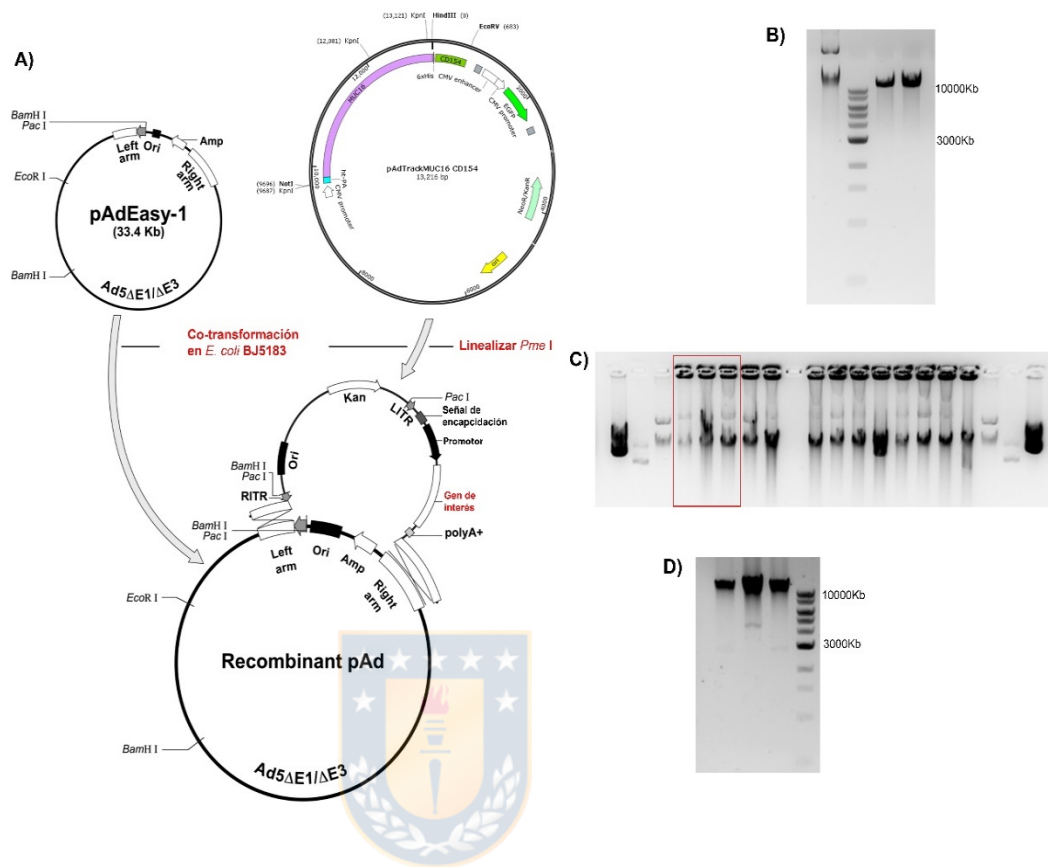


Figura 10: Generación del vector adenovirales pAdEASYMUC16his/CD154.
A: Esquema representativo de la Recombinación de homólogos y obtención del vector pAdEasy Recombinante. **B:** Análisis de restricción del vector recombinante pAdEasyMUC16his/CD154 con la endonucleasa *Pme*I (Carril 1: pAdEasy sin digerir; Carril 2: Marcador de peso molecular; Carril 3-4: digestión del pAdTrackMUC16his/CD154 con *Pme*I). **C:** Corrida electroforética para determinar posibles pAdEasy recombinantes (Carril 1 y 20: pAdEasy como control; Carril 2-19: posibles recombinantes) **D:** electroforesis para visualizar digestión analítica mediante la endonucleasa *Pac*I (Carril 1: recombinante sin digerir; Carril 2-3: Recombinantes digeridos con *Pac*I; Carril 3: Marcador de peso molecular). Fuente: elaboración propia.

12.3 Amplificación de los vectores adenovirales en la línea complementaria HEK-293A.

Para la producción inicial, amplificación y titulación de los vectores adenovirales incompetentes para la replicación, se utilizó la línea complementaria HEK-293A. Este modelo es un subclon de la línea celular derivada de riñón de embrión humano, HEK-293. Estas células poseen como principal característica una copia integrada estable del gen E1 que provee en *trans* las proteínas E1a y E1b, estas proteínas son imprescindibles para la expresión de otros genes virales y además, están involucradas en la replicación viral requerida para generar adenovirus recombinantes.

De esta forma, para la amplificación viral, los vectores adenovirales Ad-MUC16his, Ad-CD154his y Ad-MUC16his/CD154 se inocularon en HEK-293A a una multiplicidad de infección (MOI) de 5 UFC/célula. Esta MOI fue seleccionado ya que se reportó previamente que 5 partículas virales por células es el MOI indicado para obtener un aumento en el título viral, sin generar un efecto citopático drástico. Una vez transducidos los cultivos, estos se mantuvieron en medio DMEM suplementado con 3% de FBS por 48 h, con cambios de medio cada 24 h. Una vez transcurrido este tiempo, el medio fue retirado y las células fueron colectadas para su posterior ruptura mediante cambios de temperatura (-20 a 37°C), de esta forma se consiguió la liberación de los vectores virales amplificados. La amplificación se repitió hasta obtener un título viral de 10¹⁰ UFC/mL.

El transcurso de este experimento se documentó mediante microscopia de fluorescencia, lo que permitió determinar un aumento en la expresión de GFP asociado a un aumento progresivo de efecto citopático (Fig. 11(2A-3B)). Cabe destacar que no se observó efecto citopático ni expresión de GFP en el cultivo control no transducido (Fig. 11(1A-B)).



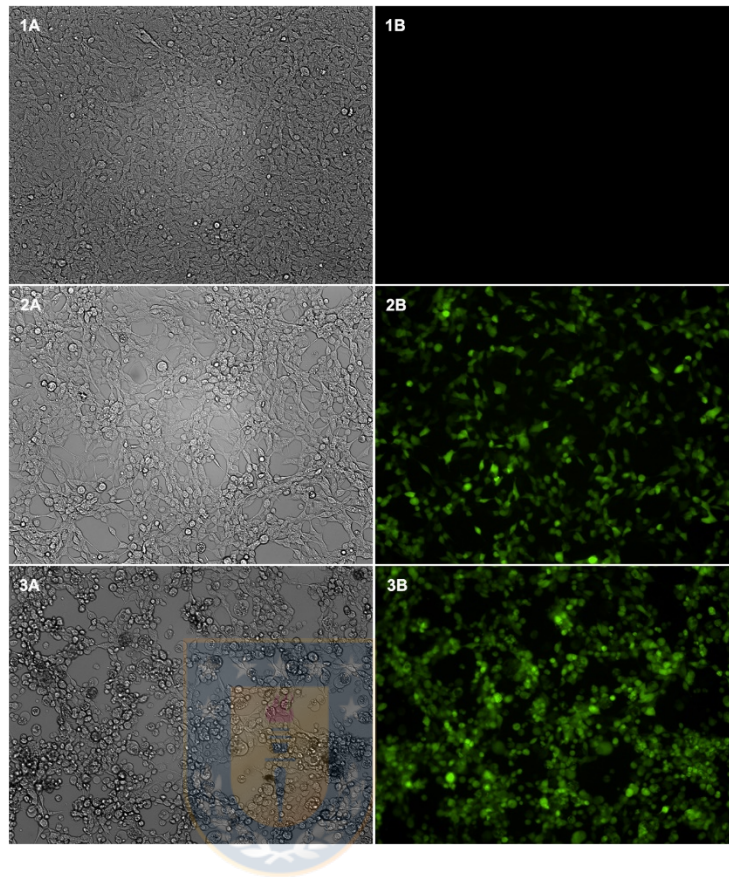


Figura 11: Amplificación de los vectores adenovirales en la línea celular complementaria HEK-293A. Paneles **A**: campo claro, Paneles **B**: Emisión de Fluorescencia GFP; Paneles 1A-1B: control de células HEK-293A; Paneles 2A-2B: 24 h post-transducción; panel 3A-3B: 48 h post-transducción. La observación se realizó en un microscopio de fluorescencia (OLYMPUS IX81, Japón) con un aumento 100X. Fuente: elaboración propia.

12.4 Expresión de los candidatos antigénicos mediante transducción adenoviral en células SiHa.

Para los ensayos de expresión se utilizó la línea celular SiHa, un modelo celular epitelial derivado de carcinoma cérvico-uterino de células escamosas grado 2. Para ello, cultivos de células SiHa fueron inoculadas con 25 partículas virales por células, ya que se ha descrito que es la MOI indicada para trabajar con este modelo celular. Además, los cultivos de células SiHa transducidos con los vectores Ad-MUC16his, Ad-CD154his y Ad-MUC16his/CD154 previamente amplificados, fueron mantenidos separadamente, solo con medio D'MEM durante 96 h, con cambios de medio cada 48 h. Durante todo este periodo se corroboró la transducción celular de los vectores adenovirales mediante microscopia de fluorescencia, observándose expresión de GFP y efecto citopático en todos los cultivos transducidos (Fig. 12 (1C-1D: 24h; 2C-2D: 48h; 3C-3D: 72h; 4C-4D: 96h)). Es importante mencionar que se observó un mayor efecto citopático en los cultivos a las 96 h post-transducción, además las células se observaron de un color verde intenso, que se correlaciona con elevados niveles de expresión de GFP intracelular y se podría asociar a una mayor expresión de la proteína de interés. Por su parte no se observó efecto citopático ni expresión de GFP en el cultivo control no transducido (Fig. 12 1A-4B)

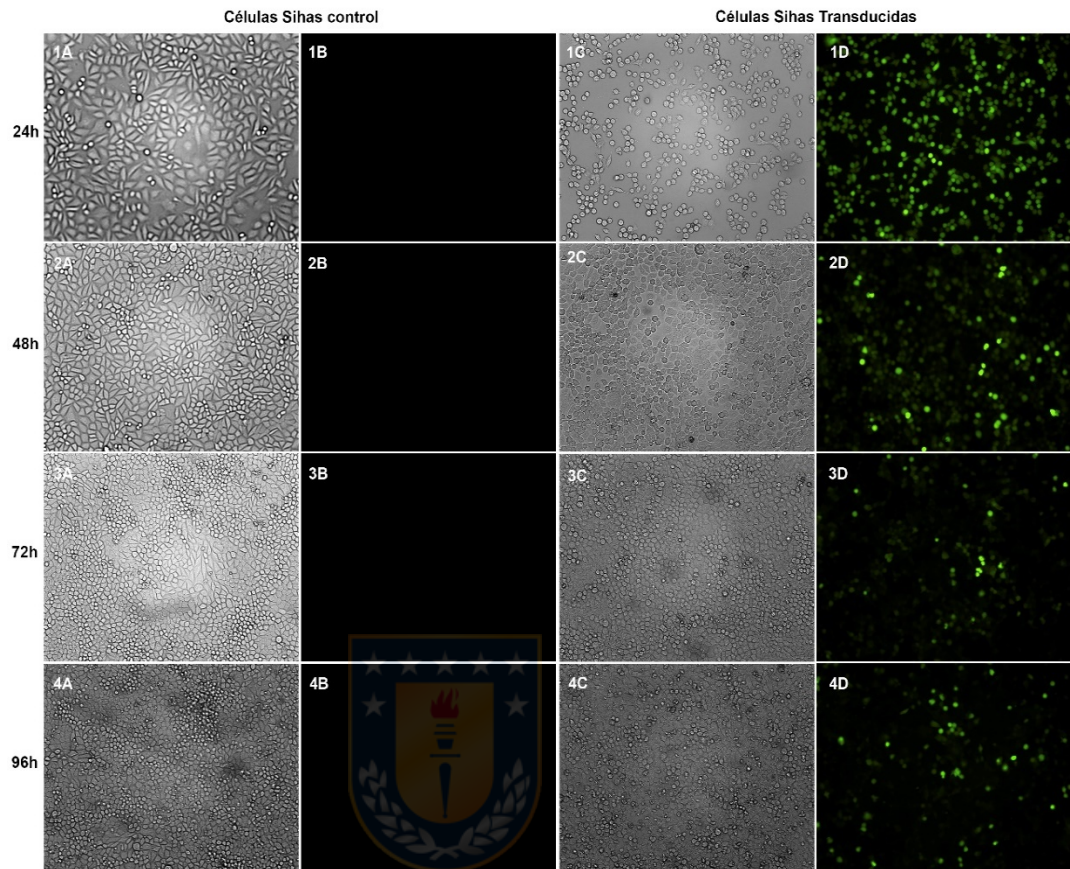


Figura 12: Transducción de los vectores adenovirales en la línea celular SiHa. Paneles **A-C**: Campo Claro; Paneles **B-D**: Fluorescencia GFP; Paneles 1A-4B: Fotografías realizada al control de células SiHa (1A-1B: 24h; 2A-2B: 48h; 3A-3B: 72h; 4A-4B: 96h); Paneles 1C-4D: Fotografías realizada a células SiHa transducidas con los distintos vectores adenovirales (1C-1D: 24h; 2C-2D: 48h; 3C-3D: 72h; 4C-4D: 96h). La observación se realizó en el microscopio de fluorescencia (OLYMPUS IX81, Japón) con un aumento 100X. Fuente: elaboración propia.

Como resultado de estos ensayos se identificó una banda a una altura aproximada a 29 KDa. Al analizar la figura 9 podemos observar que este peso molecular coincide con el peso calculado para el dominio C terminal de la molécula coestimuladora CD154his, insertado en el genoma del vector pAd-CD154his (Fig. 13B).

En cuanto a la proteína MUC16, al analizar su expresión mediante el ensayo de Western blot, utilizando el anticuerpo anti-His, se identificó la presencia de una banda ancha y reforzada a una altura de aproximadamente de 180 kDa. Si bien el peso molecular teórico calculado (basado en el contenido de aminoácidos) para el dominio extracelular de esta proteína es de 135 KDa, los sitios potenciales de glicosilaciones presente en la molécula justificarían un aumento en el tamaño teórico predicho (Fig. 13A). Para el caso de MUC16his/CD154 se observa una banda inmunoreactiva cercana a los 210 KDa. El peso molecular de esta proteína quimérica es de 164 KDa el cual corresponde a la suma del dominio extracelular de MUC16 y el dominio C terminal de CD154. Sin embargo, la gran cantidad de modificaciones postraduccionales presentes en el dominio de MUC16 permiten un aumento en el peso de esta molécula por favor corregir el lenguaje, similar a la observación de la idea anterior (Fig. 13C).

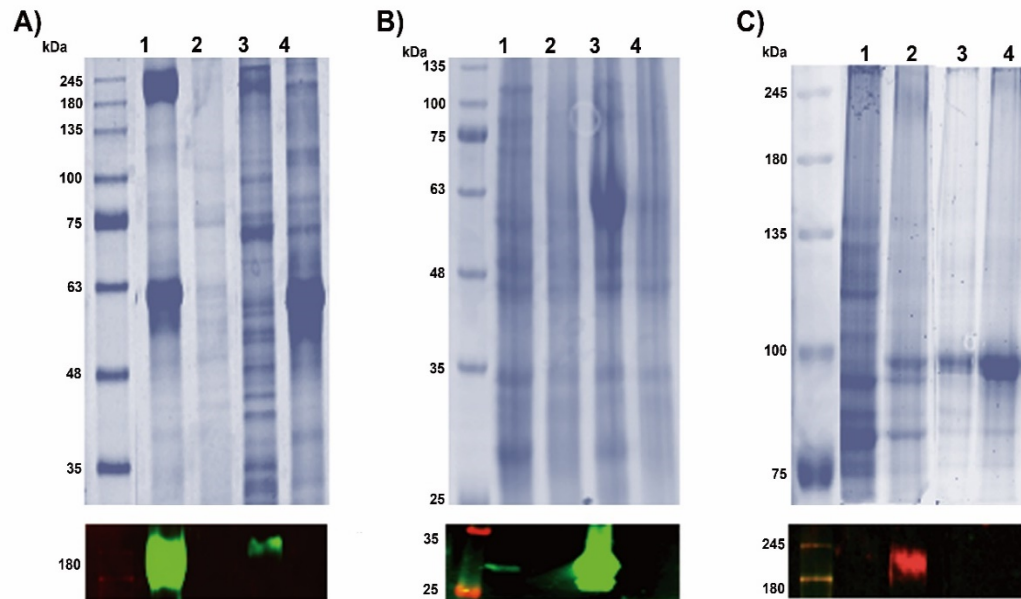


Figura 13. Análisis de expresión de las proteínas recombinantes en células SiHa. A: Electroforesis en gel de poliacrilamida al 10 % en condiciones no reductoras y Western blot de la proteína MUC16his. **B:** Electroforesis en gel de poliacrilamida al 12,5 % en condiciones no reductoras y Western blot de la proteína CD154his. **C:** Electroforesis en gel de poliacrilamida al 8 % en condiciones no reductoras y Western blot de la proteína MUC16his/CD154. MP: marcador de peso molecular, 1: muestra positiva de cultivo a las 48 h, 2: muestra negativa de cultivo a las 48 h, 3: muestra positiva de cultivo a las 96 horas, 4: muestra negativa de cultivo a las 96 h. Fuente: elaboración propia.

12.5 Purificación de los candidatos vacunales mediante cromatografía de afinidad para ensayos de inmunogenicidad.

Los medios de cultivo de células SiHa transducidas con los vectores adenovirales Ad-MUC16his, Ad-CD154his y Ad-MUC16his/CD154 y en los que se corroboró la presencia de cada una de las moléculas, fueron utilizados para purificar las proteínas de interés. En el caso de MUC16his y CD154his se utilizó una cromatografía de afinidad a metales inmovilizados (IMAC). Esta es una técnica para purificación de proteínas basadas en la afinidad que tiene una región de repeticiones de histidinas (presente en las proteínas) con iones metálicos. Específicamente para MUC16 se utilizó una matriz de Quelato-Sepharosa de flujo rápido, cargado con cobre, y en el caso de CD154his se utilizó una matriz de Quelato-Sepharosa de alta resolución cargada con níquel. Además, para ambas proteínas se escogió tampón fosfato 50 mM pH 7.4 como tampón de equilibrio ya que ambas moléculas eran estables en esta solución. Cabe destacar que este tampón fue utilizado para pasar los medios de cultivos a través de las matrices de afinidad. En el caso de la proteína CD154his se utilizó tampón fosfato con 50, 200 y 500 mM de imidazol y para MUC16his se utilizó tampón fosfato con 5, 20, 50 y 200 mM de imidazol.

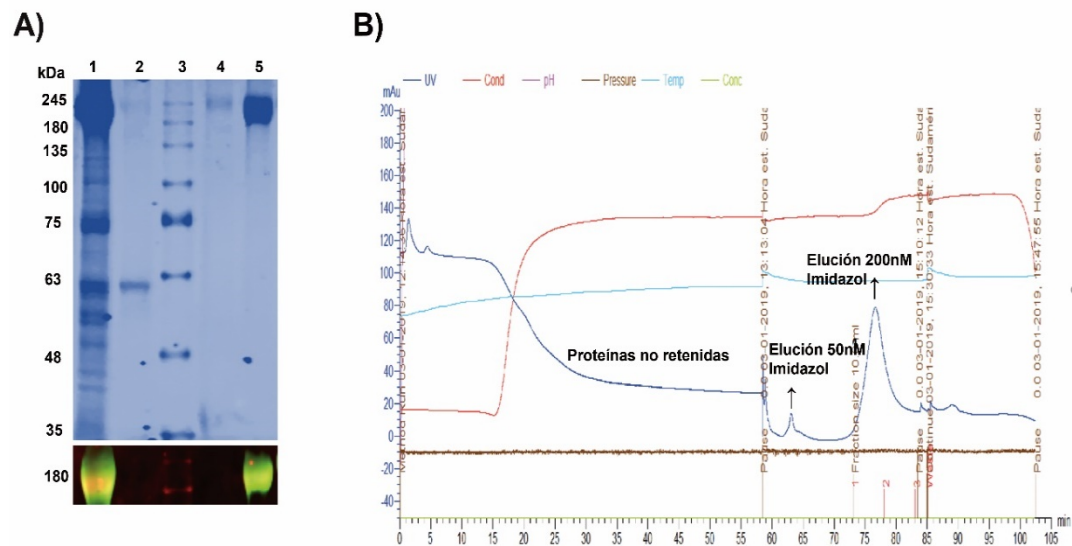


Figura 14. Análisis de purificación de la proteína MUC16his recombinante expresada en células SiHa. A: Electroforesis y Western blot. kDa: Patrón de peso molecular de proteínas. (Carril 1: Muestra inicial de entrada a partir del medio de cultivo celular. Carril 2: Proteínas no retenidas en la matriz con el paso del tampón fosfato 50 mM más 5 mM de imidazol. Carril 4: Proteínas contaminantes eluidas con tampón fosfato 50mM más 50 mM de imidazol. Carril 5: Proteína de interés eluidas con tampón fosfato 50 mM más 200 mM de imidazol. Todos los tampones tienen pH 4,5). **B:** Cromatograma a 280 nm: se muestra el paso de las proteínas por la matriz durante las etapas de purificación: equilibrio, paso de la muestra y elución. Resultado obtenido en el cromatógrafo líquido AKTPrime. Fuente: elaboración propia.

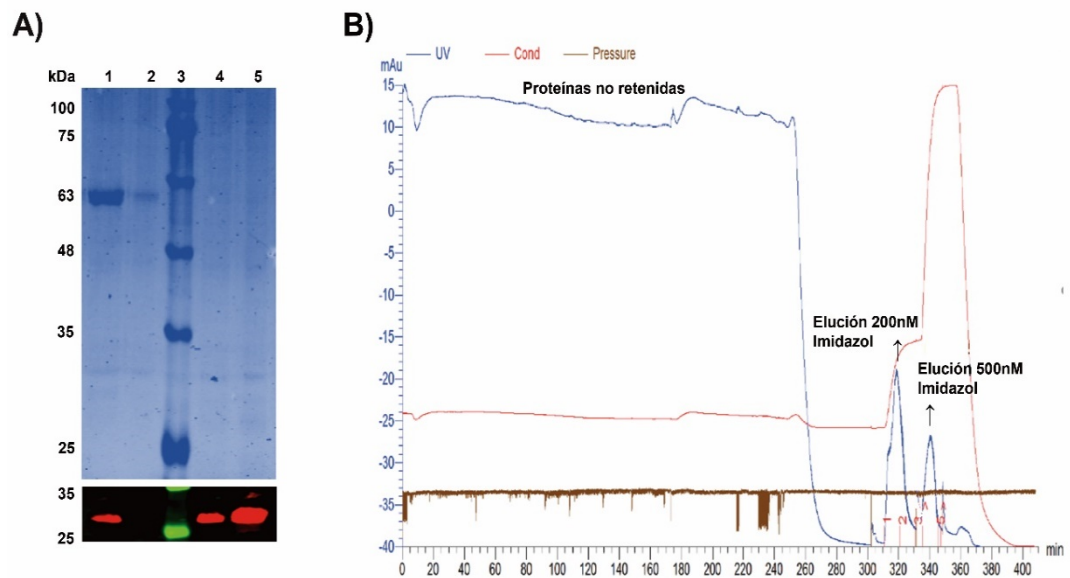


Figura 15. Análisis de purificación de la proteína CD154his recombinante expresada en células SiHa. A: Electroforesis y Western blot PM: Patrón de peso molecular de proteínas. (Carril 1: Muestra inicial de entrada a partir del medio de cultivo celular SiHa. Carril 2: Proteínas no retenidas en la matriz con el paso del tampón fosfato 50 mM más 50 mM de imidazol. Carril 4: Proteínas contaminantes junto con proteína CD154his eluidas con 200 mM de imidazol. Carril 5: Proteína de interés eluída en 500 mM de imidazol. **B:** Cromatograma a 280 nm a través del tiempo que muestra el comportamiento de la proteína durante las etapas de purificación: equilibrio, paso de la muestra y elución. Resultado obtenido en el cromatógrafo líquido AKTPrime. Fuente: elaboración propia.

Ambas purificaciones estuvieron acopladas a un cromatógrafo líquido de fraccionamiento con el que se registraron los siguientes cromatogramas (Fig. 14B y 15B), estos grafican la absorbancia a 280 nm a través del tiempo. Para el candidato vacunal MUC16his se puede apreciar en el cromatograma una fracción que corresponde a las proteínas no retenida de la muestra con tampón de equilibrio más 5 mM de imidazol. Posteriormente se agregó la solución con tampón fosfato más 50 mM de imidazol, este cambio de conductividad también se correlaciona con un aumento en la línea base de la absorbancia, por último, se utilizó un tampón con 200 mM de imidazol el cual logró desprender la totalidad de las proteínas unidas aún al metal. Con el cambio de conductividad se observa también un aumento en la línea base de la absorbancia, además se puede apreciar la presencia de un *peak*; este *peak* es el de mayor altura registrado en el cromatograma y estaría relacionado con una mayor cantidad de proteína purificada.

Las proteínas obtenidas a partir de las muestras no retenidas a la columna y a las distintas eluciones fueron precipitadas y analizadas mediante SDS-PAGE y Western blot (Fig. 14A). Se puede apreciar la presencia de la banda inmunoreactiva a una altura aproximada a los 180 KDa en el carril 5 el cual corresponde a una elución con 200 mM de imidazol, al analizar el gel de poliacrilamida se observa que esta banda es mayoritaria en la muestra de elución. Utilizando una concentración de 50 mM de imidazol en el tampón se lograron desprender de la matriz las proteínas contaminantes del medio de cultivo. Con

este procedimiento se recuperó aproximadamente un 95% de la proteína recombinante presente en el medio de cultivo.

Para el caso del candidato vacunal CD154his, se utilizó una concentración mayor de imidazol en el tampón de equilibrio. Esto ya que previamente se analizó su afinidad a la columna enlazada a níquel y se demostró que se necesita una concentración mayor de imidazol para eluir la proteína de interés (resultado no mostrado). Además, a menores concentraciones de imidazol se mantuvieron unidas una mayor cantidad de proteínas contaminantes, por lo tanto, un tampón fosfato con 50 mM de imidazol fue el indicado para pasar la muestra por la columna.

En el cromatograma obtenido para el candidato vacunal CD154his, se observó una fracción que corresponde a las proteínas no retenida de la muestra. Posteriormente al eluir con 200 mM de imidazol se observó un *peak*. A continuación, la elución con 500 mM aumenta la línea base de la absorbancia lo que está relacionado con un cambio de conductividad, pero acompañado a esto se determinó la presencia de un *peak* de mayor altura comparado al observado con la elución a 200 mM. Además, al analizar el Western blot (Fig. 15A) se observa la presencia de una banda a 29 KDa, lo que coincide con el peso molecular teórico de la proteína. Además, en la electroforesis se observó solo la presencia de esta banda en el carril correspondiente a la elución de 500 mM, lo que indica que la purificación fue exitosa. Mediante esta metodología se logró recuperar aproximadamente un 60% de la proteína, esto debido a que en las eluciones con concentraciones menores de imidazol parte de la molécula se

desprendió de la columna, esto acompañado de proteínas contaminantes del medio de cultivo.

La purificación del candidato vacunal quimérico MUC16his/CD154 (Fig. 16) se realizó mediante cromatografía de exclusión molecular, una técnica de purificación de proteínas que permite la separación de moléculas en base a su tamaño. Específicamente, para este candidato se utilizó una columna de Superosa 12 10/300 GL de alta resolución. Además, como tampón de equilibrio se utilizó tampón fosfato 50 mM más 750 mM de arginina a pH 7.4, es importante mencionar que se trabajó con este tampón debido a que la proteína era estable en esta solución además la arginina fue necesaria para evitar la formación de agregados de la molécula.



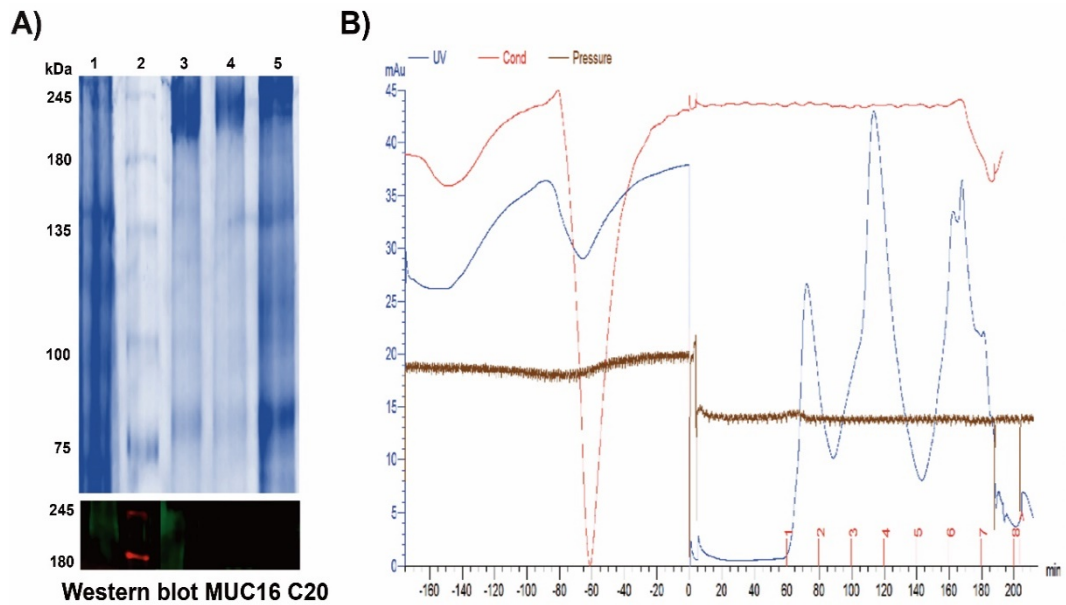


Figura 16. Purificación de la proteína MUC16his/CD154his recombinante expresada en células SiHa. **A:** Electroforesis y Western blot. PM: Patrón de peso molecular de proteínas. (Carril 1: Muestra inicial de entrada a partir del medio de cultivo celular SiHa. Carril 2: elución con 750 mM de arginina. Carril 3 y Carril 4: Proteínas de menor peso molecular que la proteína de interés pertenecientes al medio de cultivo. **B:** Cromatograma a 280 nm a través del tiempo que muestra el comportamiento de la proteína durante las etapas de purificación: equilibrio, paso de la muestra y elución. Fuente: elaboración propia.

12.6 Desarrollo de un modelo de implante de células tumorales murinas establemente transformadas para la expresión de MUC16.

Para generar de la línea tumoral estable que expresara MUC16 fue necesario trabajar con un vector que permitiera expresar y seleccionar adecuadamente las células que poseerían dichas características. Por lo que se trabajó con el plásmido pT-stCA125, el cual fue previamente generado en el Laboratorio de Biotecnología y Biofármacos. A modo de resumen este vector se generó mediante la obtención del segmento génico que codifica para la región C-terminal de la proteína CA125 (dominio citoplasmático, dominio transmembrana y un fragmento de 7 repeticiones aminoacídicas del dominio extracelular). El fragmento de ADN que codifica para este segmento se amplificó mediante PCR a partir del RNA total obtenido de células tumorales de ovario. Teniendo en cuenta que el fragmento de ADN amplificado codifica solamente para la región C-terminal de CA125 y por tanto carece de secuencia codificante para una señal de secreción natural de CA125; fue necesario realizar otro paso de clonamiento cuyo propósito principal fue dotar de una señal de secreción heteróloga a la molécula de CA125. Con este propósito, la secuencia codificante para el extremo C-terminal de CA125 se clonó en el vector pBSM-SP, a continuación de la secuencia codificante para el péptido de secreción del activador tisular del plasminógeno humano (TPA). El vector resultante de este paso de clonamiento se denominó pstCA125.

Posteriormente con el objetivo de general un vector plasmídico que permitiera la generación de clones establemente transformados, la secuencia codificante para

la variante secretable de CA125 (stCA125) se clonó en el vector plasmídico pTarget. El vector pTarget contiene un gen de neomicina fosfotransferasa que confiere resistencia a G418 (un análogo de la neomicina). El vector resultante de este paso de clonación se denominó pT-stCA125.

La línea tumoral de melanoma murino MB16F10 se transfectó con el vector pT-stMUC16 previamente digerido con la endonuclease *ScaI*. Después de una selección con G418, se aislaron 33 clones los que se expandieron y congelaron para su posterior análisis. De los 33 clones seleccionados, los primeros 7 se evaluaron mediante un ensayo de Northern blot para estimar los niveles de transcripto de MUC16 (Fig. 17A). Esta técnica permitió detectar transcripto del gen de MUC16 en 5 de los 7 clones evaluados. El clon 3 fue el que mayores niveles de transcriptos mostró, lo que sugiere que, entre los clones evaluados, este podría ser el que expresa mayores niveles de MUC16. Sin embargo, este resultado solo permite corroborar la presencia de una unidad transcripcional de MUC16 funcional dentro de las células seleccionadas. No constituye una evidencia de que la molécula se exprese correctamente en la superficie celular. Con el objetivo de evaluar y detectar la presencia de MUC16 en la membrana celular, los 33 clones seleccionados fueron analizados mediante citometría flujo. Como resultado de este análisis se obtuvo que el clon número 3, además de mostrar los mayores niveles de transcripto, también mostraba los mayores niveles de MUC16 en superficie, con un 99.46% de eventos positivos (Fig. 17B) vs 1.51% en control negativo (Fig. 17B). La presencia de MUC16 en la superficie de los clones establemente transformados valida el trabajo y efectividad de las

construcciones genéticas realizadas. Este resultado corrobora que la señal de secreción del TPA humano fusionado a la molécula de MUC16, garantiza la entrada de la molécula retículo endoplasmático durante el proceso de traducción. Los eventos positivos encontrados en las células correspondientes a la línea parental MB16F10 pueden ser el resultado de un marcaje inespecífico debido a la naturaleza policlonal del anticuerpo primario utilizado durante el marcaje.

De esta caracterización, se seleccionó el clon 3 para su posterior expansión y empleo en ensayos *in vivo*. Esta línea establemente transformada se denominó MB16F10MUC16.



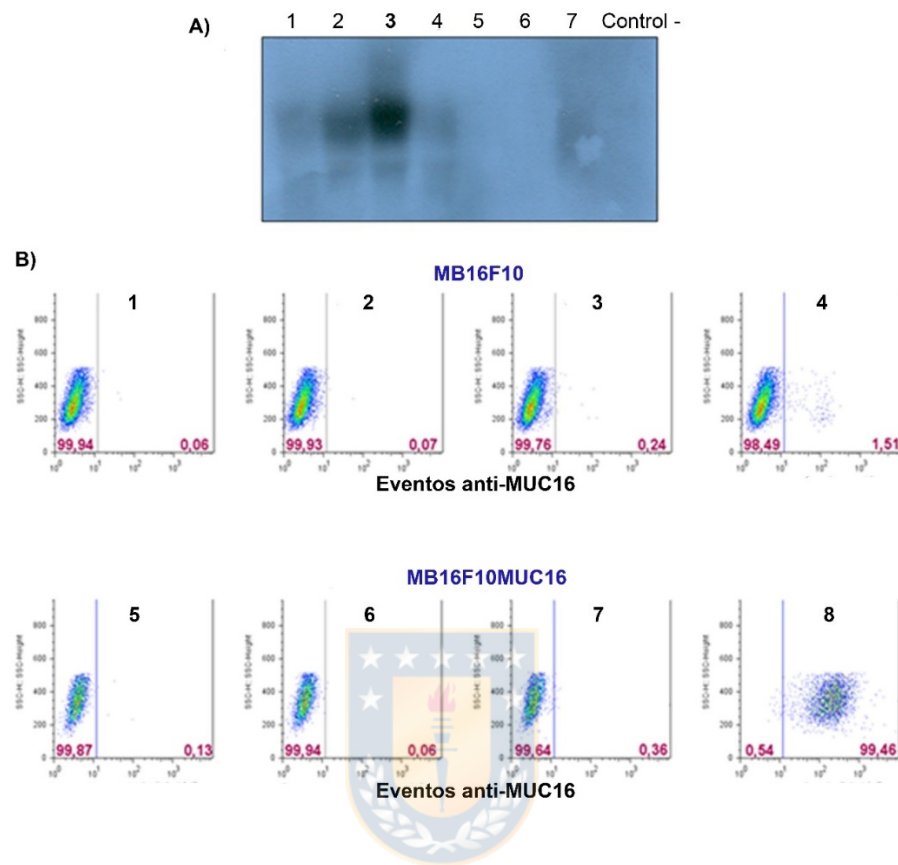


Figura 17. Detección de la expresión de MUC16 en membrana celular de la línea de melanoma MB16F10 mediante northern blot y citometría de flujo. **A:** Northern Blot realizado a siete clones de melanoma MB16F10 transformados establemente con el plásmido pT-stCA125 en los carriles del 1-7. Carril 8 control negativo (MB16F10 sin transfectar). **B:** Análisis por citometría de flujo del clon 3 (gráficos 5, 6, 7 y 8) con respecto a un control negativo de MB16F10 (gráficos 1, 2, 3 y 4). Los gráficos 1 y 5 representan las células sin marcar, 2 y 6 células marcadas con anticuerpo primario policlonal murino, 3 y 7 células marcadas con anticuerpo anti-IgG murino secundario conjugado con FITC y 4 y 8 células marcadas con anticuerpo primario policlonal murino más anticuerpo secundario anti-IgG conjugado con FITC. Fuente: elaboración propia.

12.6.1 Ensayo de implantación tumoral

La capacidad de la línea tumoral expresando MB16F10MUC16 para implantarse y desarrollar tumores, se evaluó en un ensayo de implantación *in vivo* en ratones. Para este ensayo, a cada ratón se le administró un total de 300 000 células tumorales por vía subcutánea en la zona centro-dorsal. En este ensayo se empleó como control la línea parental MB16F10. Los resultados de la implantación y desarrollo *in vivo* de la línea tumoral modificada y la parental MB16F10 fueron similares en cuanto a condiciones en la implantación y crecimiento *in vivo*. La eficiencia de implantación y desarrollo tumoral fue de un 100% para ambos casos y el volumen de tumor de ambas líneas en iguales condiciones de experimentación no mostró diferencias significativas, aunque se observó una tendencia de menor crecimiento en la línea MB16F10-MUC16 (Fig. 18).

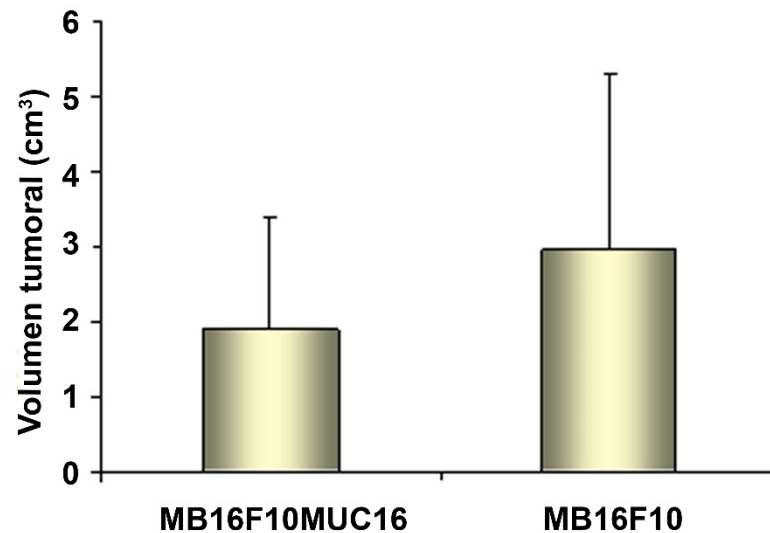


Figura 18. Representación gráfica del ensayo de implantación tumoral. La grafica muestra el volumen tumoral *in vivo* de la línea modificada MB16F10MUC16 y la salvaje MB16F10. Las barras representan la media del área \pm SD, n=6 a los 24 días de la inoculación tumoral. Se utilizó una prueba t de Student para comparar el volumen tumoral desarrollados por ambas líneas celulares ($p > 0,05$). Fuente: elaboración propia.

El análisis de sobrevida de los animales a los cuales se les implantaron las líneas tumorales mostró que los animales inoculados con la línea MB16F10MUC16 sobrevivieron aproximadamente 10 días más que aquellos inoculados con la línea parental MB16F10 (Fig. 19).

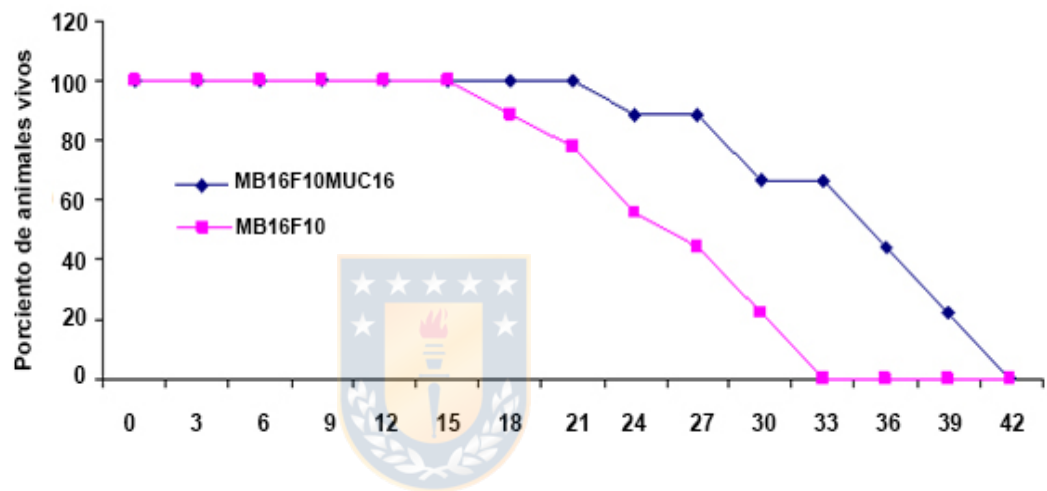


Figura 19. Evaluación de la sobrevida de ratones implantados con las líneas tumorales MB16F10MUC16 y MB16F10. La gráfica muestra el porcentaje de sobrevida de los grupos experimentales con la línea tumoral MB16F10MUC16 y MB16F10. Los datos fueron tomados cada tres días (animales muertos) y se comenzó su recogida una vez implantado el tumor. Fuente: elaboración propia.

Las diferencias en las sobrevividas observadas entre ambos grupos experimentales fueron consistentes con el tamaño de los tumores desarrollado en ambos grupos. A pesar de que no se detectaron diferencias estadísticamente significativas entre el tamaño de los tumores, el gráfico muestra que el crecimiento de los tumores en los ratones inoculados con la MB16F10MUC16 fue ligeramente inferior al desarrollado por los animales inoculados con la línea parental MB16F10. Estas diferencias podrían deberse a dos causas probables: I) La velocidad de crecimiento y capacidad para inducir tumores en la línea MB16F10MUC16 es inferior a la de su parental MB16F10 ó; II) Los ratones inoculados desarrollan una respuesta inmune más potente contra la línea que muestra el antígeno MUC16 en superficie, y por tanto resisten durante un periodo más prolongado de tiempo, el crecimiento y diseminación del tumor.

12.7 Evaluación de los parámetros de la respuesta inmune celular o humoral específica para el antígeno MUC16.

El modelo murino de inmunización empleado fueron ratones hembra C57BL/6 de ocho semanas de edad, con los cuales se formaron seis grupos de experimentación: (A) MUC16his; (B) CD154his; (C) MUC16his/CD154 y (D) MUC16his + CD154his (E) PBS (F) AdMock. Para cada grupo se destinaron seis ratones que fueron inmunizados por vía subcutánea y las proteínas recombinantes fueron formuladas con el adyuvante comercial Montanide ISA150, el esquema de inmunización queda detallado en la figura 20, para el tratamiento preventivo y en la figura 21 para el tratamiento terapéutico. Es importante mencionar que la inmunización se realizó para ambos tratamientos con un

esquema combinado de inmunización. Una primera inmunización con el antígeno proteico (30 µg), un refuerzo con los candidatos adenovirales que codificaban para la proteína del grupo de tratamiento (1×10^8 ufc) y una tercera inmunización nuevamente con la proteína antigénica (30 µg). Para establecer las condiciones óptimas de inmunización necesarias para inducir una respuesta inmune específica anti-MUC16, previamente en el Laboratorio de Biotecnología y Biofármacos se probaron dos vías de inoculación para el antígeno (subcutánea e intraperitoneal), y una dosis de 30 µg de antígeno que, según lo propuesto en la revisión bibliográfica, debería ser suficiente para inducir una respuesta de anticuerpos anti-MUC16 (Shojaeian, Zarnani et al. 2009, Marcos-Silva, Ricardo et al. 2015). Los experimentos de inmunización por las dos vías de administración ensayadas indujeron una respuesta anti-CA125, sin embargo, los niveles de anticuerpos inducidos por la inoculación del antígeno por vía subcutánea no fueron significativamente diferentes al título inducido por la vía intraperitoneal ($p > 0,001$) (resultados no mostrados). Podemos inferir que, para este caso, la vía de administración del antígeno sCA125his no afectará la respuesta inmune anti-MUC16.

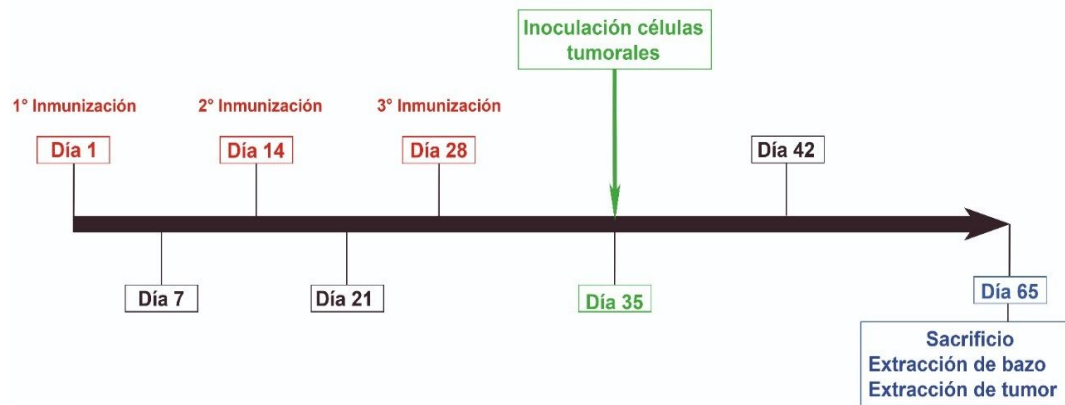


Figura 20. Esquema de inmunización en ratones para el tratamiento preventivo de los candidatos vacunales. Seis grupos, de seis ratones hembra C57BL/6 cada uno, fueron inmunizados 3 veces con los candidatos vacunales con intervalos de dos semanas, y posteriormente se inocularon 3×10^5 células MB16F10MUC16 por animal en la región centro-dorsal. Se colectaron muestras de sangre cada siete días antes de la inoculación de las células tumorales y cada catorce días después de la inyección de estas células. Fuente: elaboración propia.

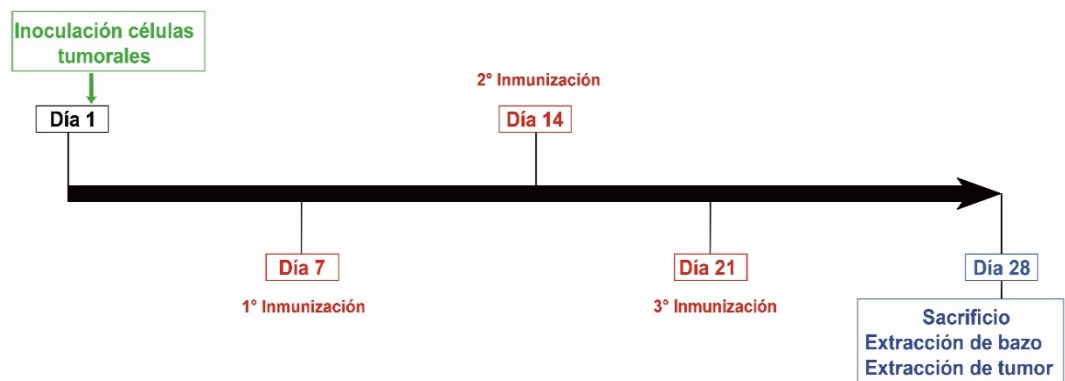


Figura 21. Esquema de inmunización para el tratamiento terapéutico de los candidatos vacunales. Seis grupos, de seis ratones hembra C57BL/6 cada uno, fueron inoculados 3×10^5 células MB16F10MUC16 por animal en la región centro-dorsal y pasados siete días fueron inmunizados 3 veces con los candidatos vacunales con intervalos de una semana. Se colectaron muestras de sangre cada siete días por un periodo de 28 días. Fuente: elaboración propia.

Con el fin de analizar la respuesta inmune inducida por los diferentes candidatos vacunales y ante la necesidad de determinar si estos candidatos podrían tener distintos efectos en el desarrollo de inmunidad, se generaron dos esquemas de experimentación. (Estos estuvieron diseñados dependiendo el tiempo en que se inocularon las células tumorales de melanoma de ratón que expresaban el antígeno MUC16). Si las células se inyectaban al inicio del tratamiento seguido de tres inmunizaciones con los candidatos vacunales, el modelo de experimentación fue denominado: tratamiento terapéutico. Por el contrario, si las células se inyectaban posterior a las tres inmunizaciones, el modelo fue denominado: tratamiento preventivo.

Para cada modelo de experimentación se tomaron muestras de sangre cada 7 días y al final del experimento los ratones de cada grupo fueron sacrificados considerando todas las normas de bioética definidas en el Protocolo de Bioética y Bioseguridad aprobado para el presente trabajo de Tesis. De estos animales se extrajo el bazo y el tumor para realizar los análisis pertinentes de inmunidad humoral, celular y crecimiento tumoral.

12.7.1 Determinación respuesta inmune humoral mediante tratamiento preventivo.

Para evaluar el nivel de respuesta inmune humoral con los diferentes candidatos vacunales bajo un modelo de experimentación de tratamiento preventivo, se realizaron ensayos de ELISA indirecto que cuantificaban los niveles de expresión de inmunoglobulina G, y del subtipo G1 y G2a, en las muestras de suero de

ratones inmunizados, obtenidas cada 7 días por un periodo de 42 días. Para ello, se fijaron 0,5µg del antígeno MUC16 en el fondo de placas de ELISA de 96 pocillos (high binding, Corning®), y se hicieron diluciones seriadas del suero colectado. La detección se realizó con un anticuerpo secundario anti-IgG de ratón conjugado con HRP (ThermoFisher Scientific). Los resultados obtenidos se presentan en las Figuras 22 a la 25.

El análisis específico de la respuesta inmune humoral mediante ELISA indirecto nos permitió determinar que al día 0 no existieron diferencias significativas en los niveles de reactividad contra MUC16 en ninguno de los grupos experimentales (Fig. 22A). Sin embargo, desde el día 7 al día 42 podemos observar que el candidato vacunal quimérico (MUC16his/CD154) presenta diferencias significativas en los niveles de respuesta en comparación a sus controles positivos (MUC16 y CD154his), y esta diferencia es sostenida y va aumentando en el tiempo. Al realizar la comparación con los valores de absorbancia obtenidas para los controles negativos PBS y AdMock, podemos determinar que existe una diferencia significativa entre ambos grupos específicos ($p < 0,0001$) (Fig. 22G).

Es importante señalar que durante el transcurso de este experimento no se observaron diferencias significativas en los valores de absorbancia obtenidos entre el grupo MUC16his+CD154 y el grupo MUC16his/CD154 para los análisis de esta inmunoglobulina.

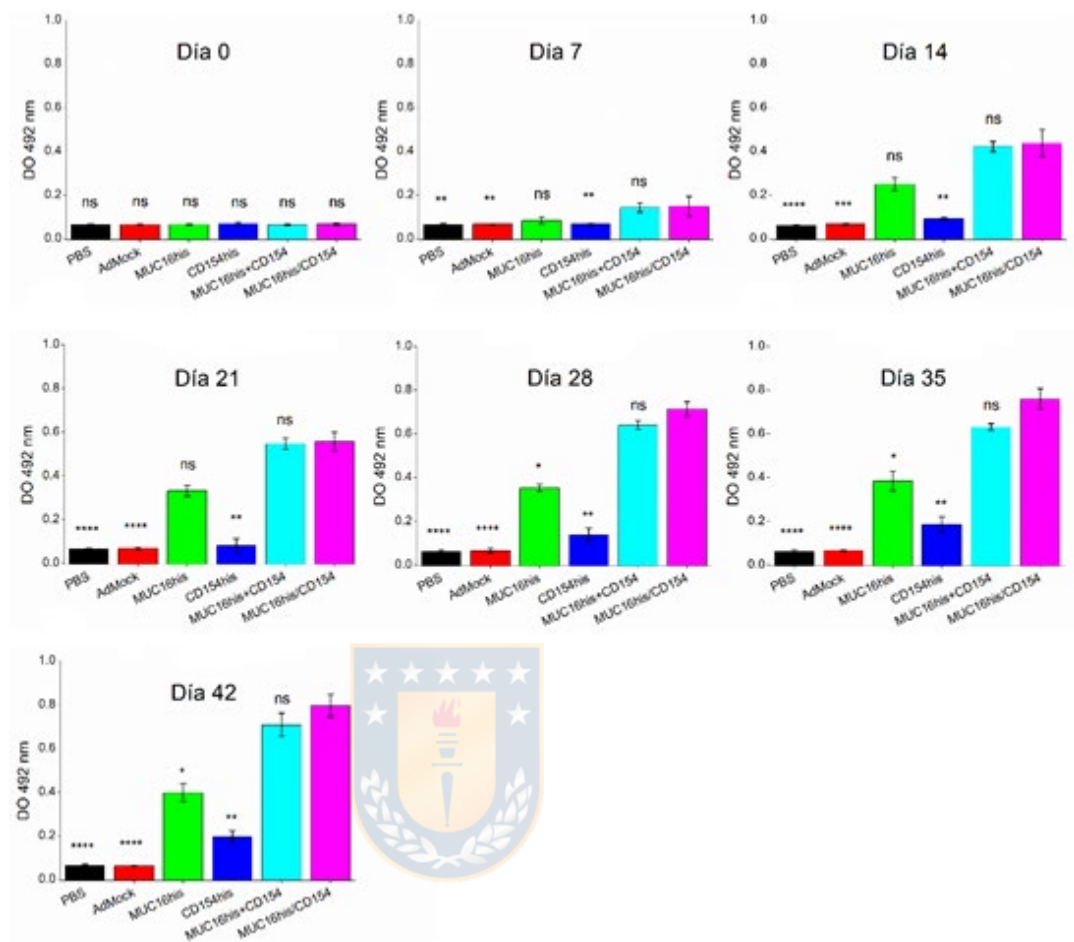


Figura 22: Curso temporal de los niveles inmunoglobulina G total anti-MUC16 en ratones hembra C57B/L6 inmunizados con los diferentes candidatos vacunales bajo tratamiento preventivo. Las gráficas muestran los valores promedio de absorbancia generados para cada grupo de animales inmunizados y evaluados mediante ELISA indirecto contra el antígeno recombinante MUC16. Cada uno de los grupos se comparó de forma independiente contra el grupo inmunizado con el antígeno MUC16his/CD154. Las barras representan la media del área ± SD, n=6. Los resultados fueron procesados con el programa Prisma 8 utilizando ANOVA de una vía, prueba de Kruskal-Wallis y test de comparación múltiples de Dunn, *: p<0,05; **: p<0,01; ***: p<0,001; ****: p<0,0001; ns: no existen diferencias significativas. **A:** día 0; **B:** día 7; **C:** día 14; **D:** día 21; **E:** día 28; **F:** día 35 y **G:** día 42. Fuente: elaboración propia.

Resultados similares se determinaron al analizar el subtipo IgG1 mediante ELISA indirecto (Fig. 23), las muestras de suero al inicio del ensayo resultaron similares para todos los grupos experimentales, corroborando que no existía una reactividad humoral de base contra el antígeno MUC16 en los animales que serían vacunados. Sin embargo, desde el día 7 hasta el 42 (Fig. 23B-G) esta diferencia se incrementa en el tiempo al comparar nuestra variante quimérica con el resto de los controles, a excepción del grupo que fue inmunizado con la variante MUC16his + CD154his, ya que con este candidato no se observaron diferencias de expresión de inmunoglobulina G1 durante todo el transcurso del experimento. Resulta destacable que durante los días 14 y 28 se observó un mayor aumento en la absorbancia en cada grupo analizado, lo que coincide con los días en que se realizó el refuerzo de la inmunización (Fig. 23C y E).

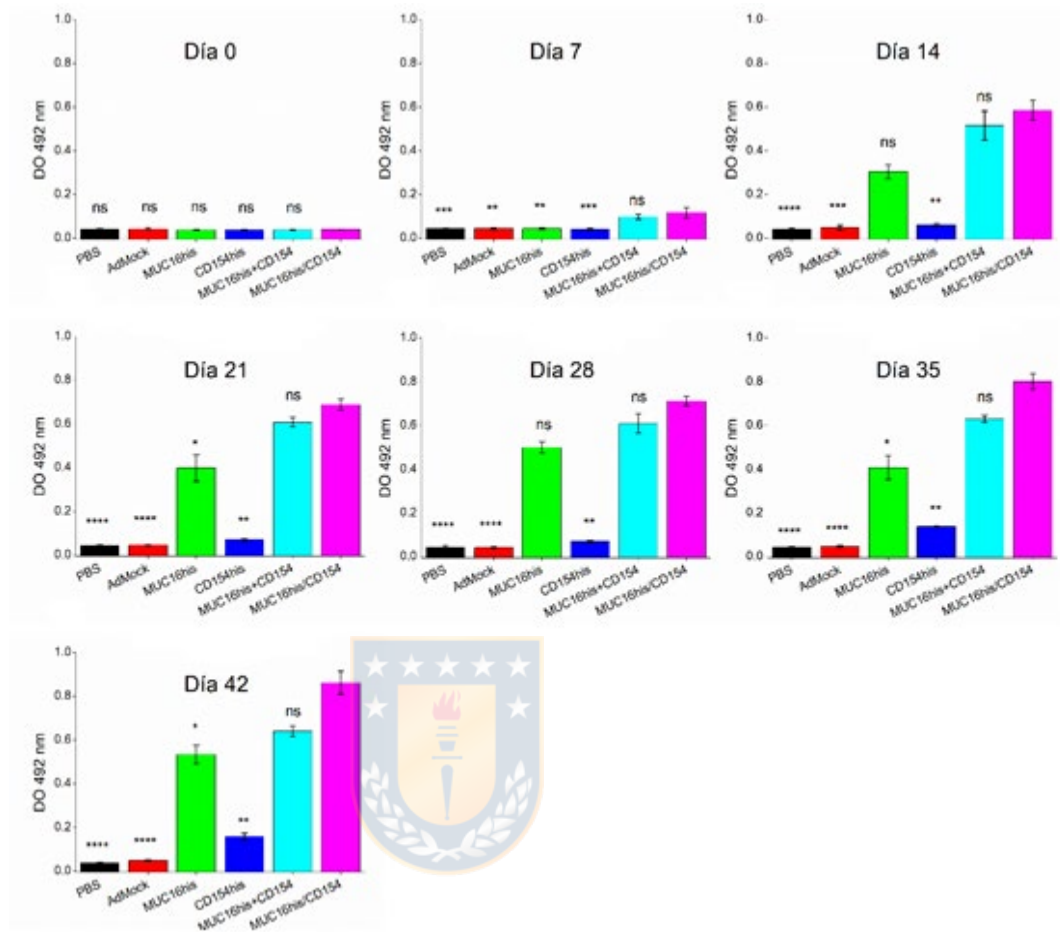


Figura 23: Curso temporal de los niveles inmunoglobulina G1 total anti-MUC16 en ratones hembra C57B/L6 inmunizados con los diferentes candidatos vacunales bajo tratamiento preventivo. Las gráficas muestran los valores promedio de absorbancia generados para cada grupo de animales inmunizados y evaluados mediante ELISA indirecto contra el antígeno recombinante MUC16. Cada uno de los grupos se comparó de forma independiente contra el grupo inmunizado con el antígeno MUC16his/CD154. Las barras representan la media del área \pm SD, n=6. Los resultados fueron procesados con el programa Prisma 8 utilizando ANOVA de una vía, prueba de Kruskal-Wallis y test de comparación múltiples de Dunn, *: p<0,05; **: p<0,01; ***: p<0,001; ****: p<0,0001; ns: no existen diferencias significativa **A**: día 0; **B**: día 7; **C**: día 14; **D**: día 21; **E**: día 28; **F**: día 35 y **G**: día 42. Fuente: elaboración propia.

Al analizar el subtipo IgG2a (Fig. 24) observamos que, para el inicio del ensayo, aunque los valores de absorbancia son cercanos a 0, existe una diferencia significativa entre MUC16his + CD154his y MUC16his/CD154 ($p < 0,05$) (Fig. 24A). Además, es importante destacar que, si bien existen diferencias significativas en el tiempo desde el día 7 al día 42, entre nuestra variante quimérica y los controles negativos PBS y AdMock ($p < 0,0001$) (Fig. 24G), esta diferencia no es tan marcada al observar los controles positivos, incluso hasta el día 42 no existe diferencia significativa entre nuestra variante quimérica y la molécula coestimuladora CD154his (Fig. 24G). Además, es importante señalar que si bien existe una expresión de este subtipo de inmunoglobulina los niveles de expresión son menores que los obtenidos para la IgG total (Fig. 22) y el subtipo IgG1 (Fig. 23), eso reflejado en los niveles de absorbancia obtenidos.

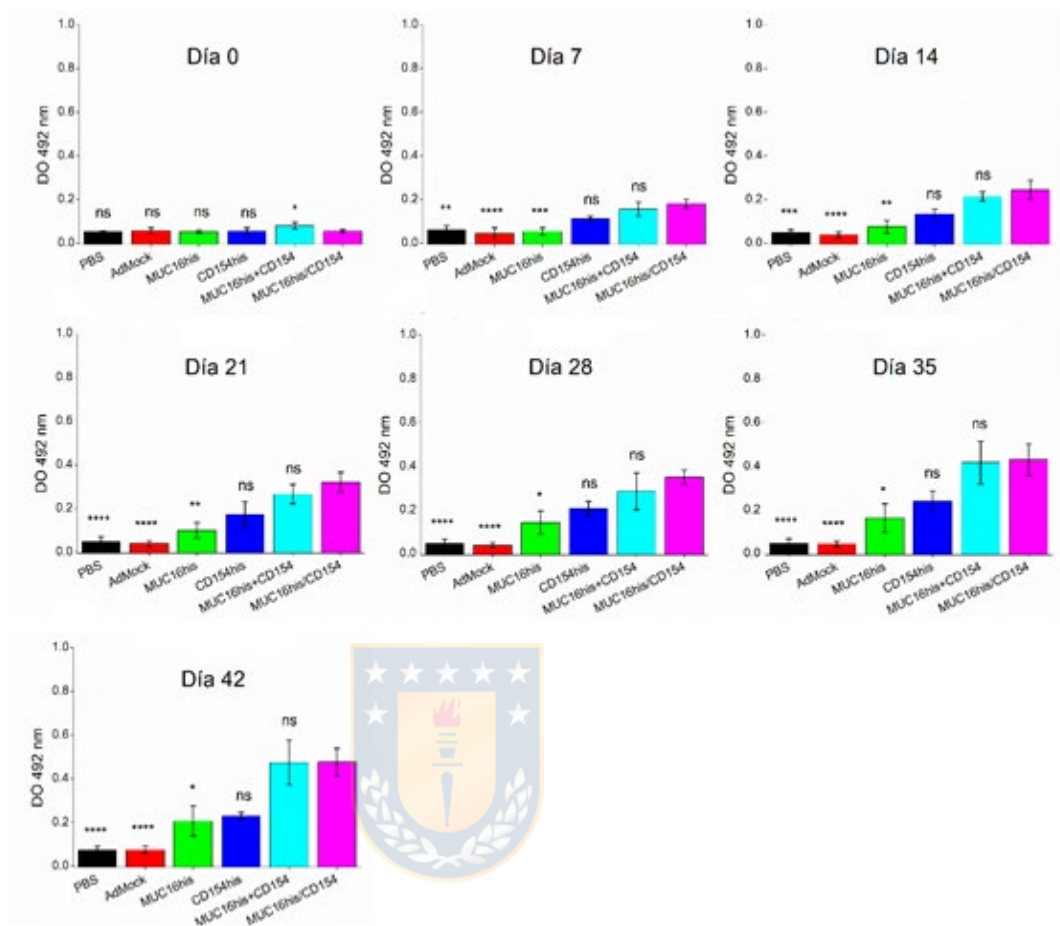


Figura 24: Curso temporal de los niveles de inmunoglobulina G2a total anti-MUC16 en ratones hembra C57B/L6 inmunizados con los diferentes candidatos vacunales bajo tratamiento preventivo. Las gráficas muestran los valores promedio de absorbancia generados para cada grupo de animales inmunizados y evaluados mediante ELISA indirecto contra el antígeno recombinante MUC16. Cada uno de los grupos se comparó de forma independiente contra el grupo inmunizado con el antígeno MUC16his/CD154. Las barras representan la media del área \pm SD, n=6. Los resultados fueron procesados con el programa Prisma 8 utilizando ANOVA de una vía, prueba de Kruskal-Wallis y test de comparación múltiples de Dunn, *: p<0,05; **: p<0,01; ***: p<0,001; ****: p<0,0001; ns: no existen diferencias significativas. **A:** día 0; **B:** día 7; **C:** día 14; **D:** día 21; **E:** día 28; **F:** día 35 y **G:** día 42. Fuente: elaboración propia.

El análisis de los títulos de anticuerpo IgG totales en el tratamiento preventivo (Figura 25) mostró que a partir del día 28 y hasta el día 42, los ratones inmunizados con MUC16his/CD154 mostraron títulos elevados de IgG en comparación con los animales inmunizados con PBS, AdMock y CD154his llegando a una diferencia significativa máxima para el día 42 con sus controles negativos PBS y AdMock ($p < 0,0001$) (Fig. 25D) y con el candidato CD154his ($p < 0,01$) (Fig. 25D). En un análisis temporal de la respuesta inmune humoral, se observó que el grupo inmunizado con MUC16his/CD154 mantiene títulos elevados, a diferencia de los ratones inmunizados con el antígeno MUC16his. Sin embargo, esta diferencia no es significativa, lo mismo se observa con el grupo inmunizado con el candidato MUC16his + CD154his (Fig. 25D).

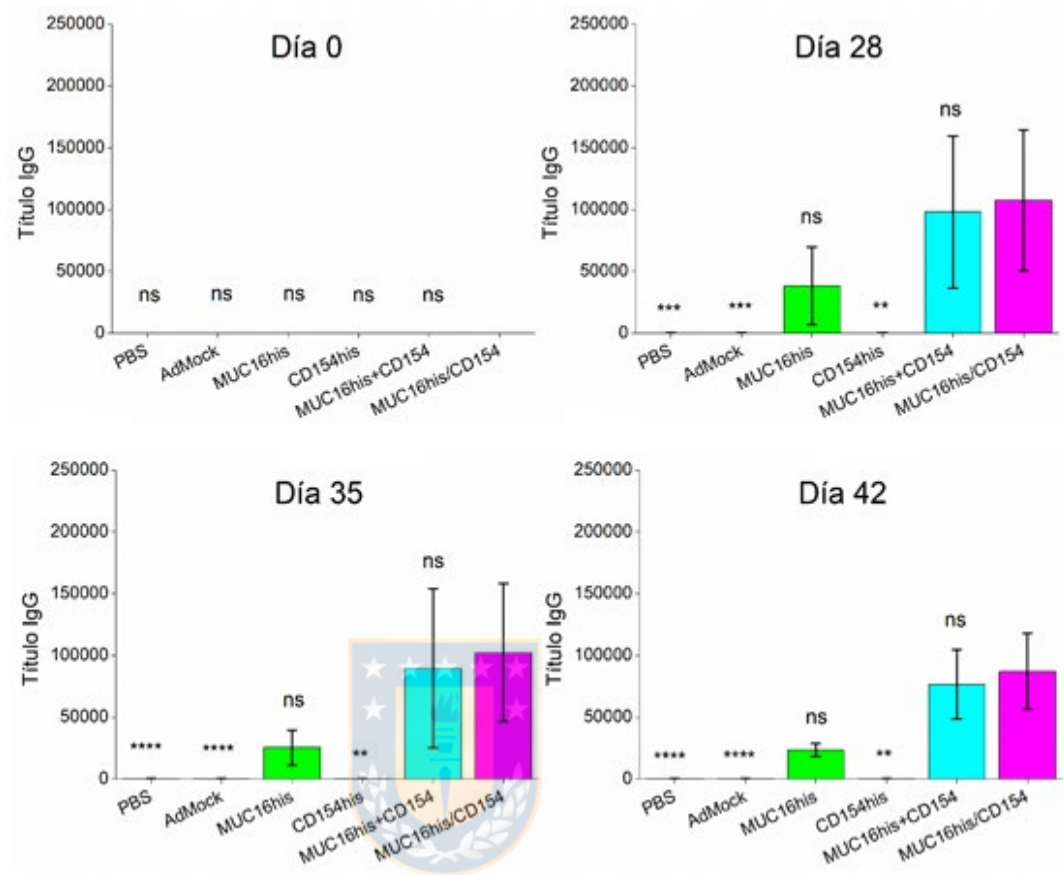


Figura 25: Títulos de anticuerpos IgG total anti-MUC16 en ratones hembra C57B/L6 inmunizados con los diferentes candidatos vacunales bajo tratamiento preventivo. Las gráficas muestran los títulos de anticuerpos para cada grupo de animales inmunizados y evaluados mediante ELISA indirecto contra el antígeno recombinante MUC16. Cada uno de los grupos se comparó de forma independiente contra el grupo inmunizado con el antígeno MUC16his/CD154. Las barras representan la media del área \pm SD, n=6. Los resultados fueron procesados con el programa Prisma 8 utilizando ANOVA de una vía, prueba de Kruskal-Wallis y test de comparación múltiples de Dunn, *: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$; ***: $p < 0,001$; ****: $p < 0,0001$; ns: no existen diferencias significativas. **A:** día 0; **B:** día 28; **C:** día 35; **D:** día 42. Fuente: elaboración propia.

12.7.2 Determinación respuesta inmune humoral mediante tratamiento terapéutico

Para determinar el nivel de respuesta inmune humoral con los diferentes candidatos vacunales bajo un modelo de experimentación de tratamiento terapéutico, se analizaron los niveles de la respuesta humoral en el tiempo, mediante ELISA para cuantificar los niveles de expresión de inmunoglobulina G, y del subtipo G1 y G2a, en muestras de suero de los ratones inmunizados hasta el día 21 (Fig. 26).

Mediante estos análisis se determinó que, tal como había sucedido para los ensayos de tratamiento preventivo, inicio del ensayo (día 0) no existió respuesta inmune humoral del tipo IgG total contra MUC16 (Fig. 26A). Las diferencias comenzaron a ser significativas desde el día 7, específicamente entre la variante quimérica y los controles negativos PBS y AdMock ($p < 0,01$) (Fig. 26B). Sin embargo, en esta fecha no se observaron diferencias con los controles positivos MUC16his y CD154his. Al final del experimento (día 21) las diferencias con los controles negativos fueron máximas ($p < 0,0001$), una menor diferencia se observó con la molécula co-estimuladora ($p < 0,05$) (Fig. 26D). Esto no fue observado para el control positivo MUC16 ni para la variante MUC16his+CD154his, ya que durante todo el transcurso del experimento no se generaron diferencias significativas en los niveles de IgG entre estos grupos.

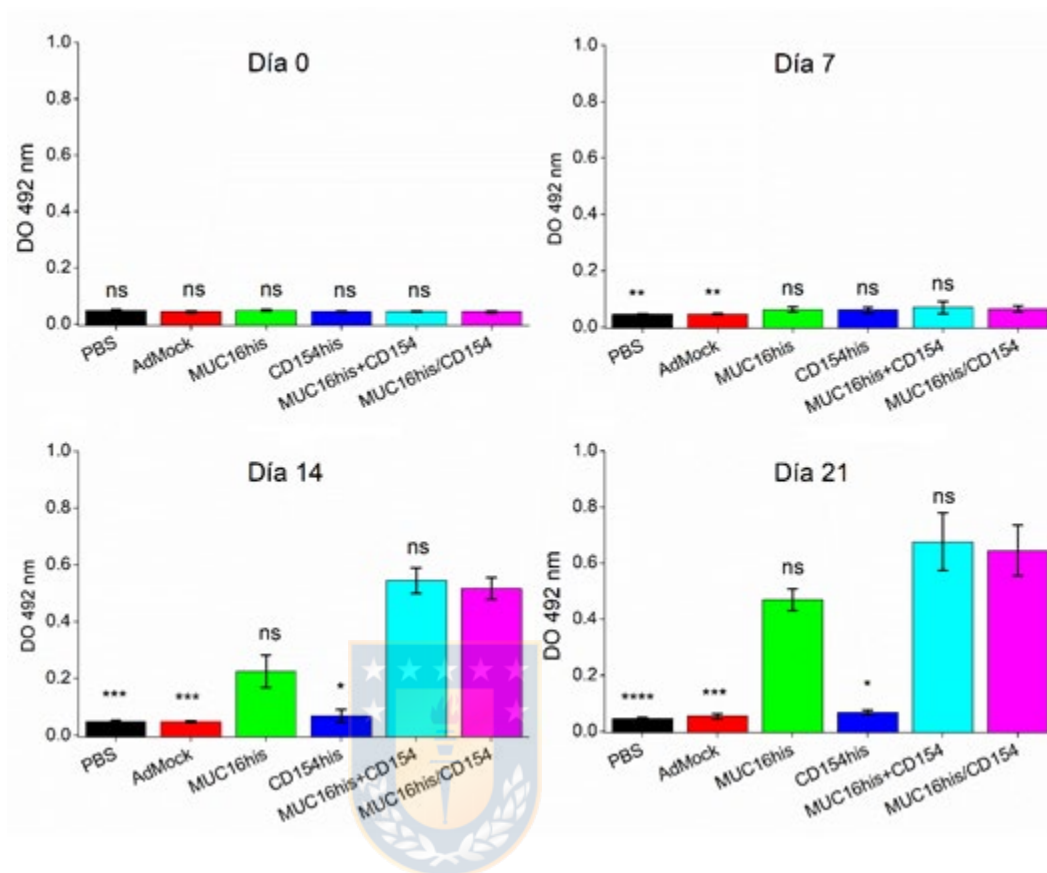


Figura 26: Curso temporal de los niveles inmunoglobulina G1 total anti-MUC16 en ratones hembra C57B/L6 inmunizados con los diferentes candidatos vacunales bajo tratamiento terapéutico. Las gráficas muestran los valores promedio de absorbancia generados para cada grupo de animales inmunizados y evaluados mediante ELISA indirecto contra el antígeno recombinante MUC16. Cada uno de los grupos se comparó de forma independiente contra el grupo inmunizado con el antígeno MUC16his/CD154. Las barras representan la media del área \pm SD, n=6. Los resultados fueron procesados con el programa Prisma 8 utilizando ANOVA de una vía, prueba de Kruskal-Wallis y test de comparación múltiples de Dunn, *: p<0,05; **: p<0,01; ***: p<0,001; ****: p<0,0001; ns: no existen diferencias significativas. **A:** día 0; **B:** día 7; **C:** día 14; **D:** día 21. Fuente: elaboración propia.

Al analizar los niveles de absorbancia obtenidos para determinar la cuantificación del subtipo de inmunoglobulina G1 se observó que en el día 0 y en el día 7 los niveles de absorbancia no presentan diferencias significativas con respecto a nuestra variante quimérica (Fig. 27A y B). Sin embargo, en los días 14 y 21 tanto los controles negativos PBS y AdMock y el control positivo de la molécula estimuladora son significativamente diferentes a MUC16his/CD154 ($p < 0.0001$). Por otra parte, determinó que en este mismo tiempo no existieron diferencias significativas al comparar las absorbancias del control positivo MUC16 y MUC16his+CD154his con respecto a la variante quimérica (Fig. 27C y D).

Es importante destacar que el máximo nivel de absorbancia obtenido en este experimento llegó aproximadamente a un valor de 0,6 este valor fue obtenido tanto por la variante quimérica MUC16his/CD154 y por la variante control MUC16his+CD154his. Sin embargo, los valores obtenidos en este experimento fueron menores que los obtenidos para IgG1 en tratamiento preventivo.

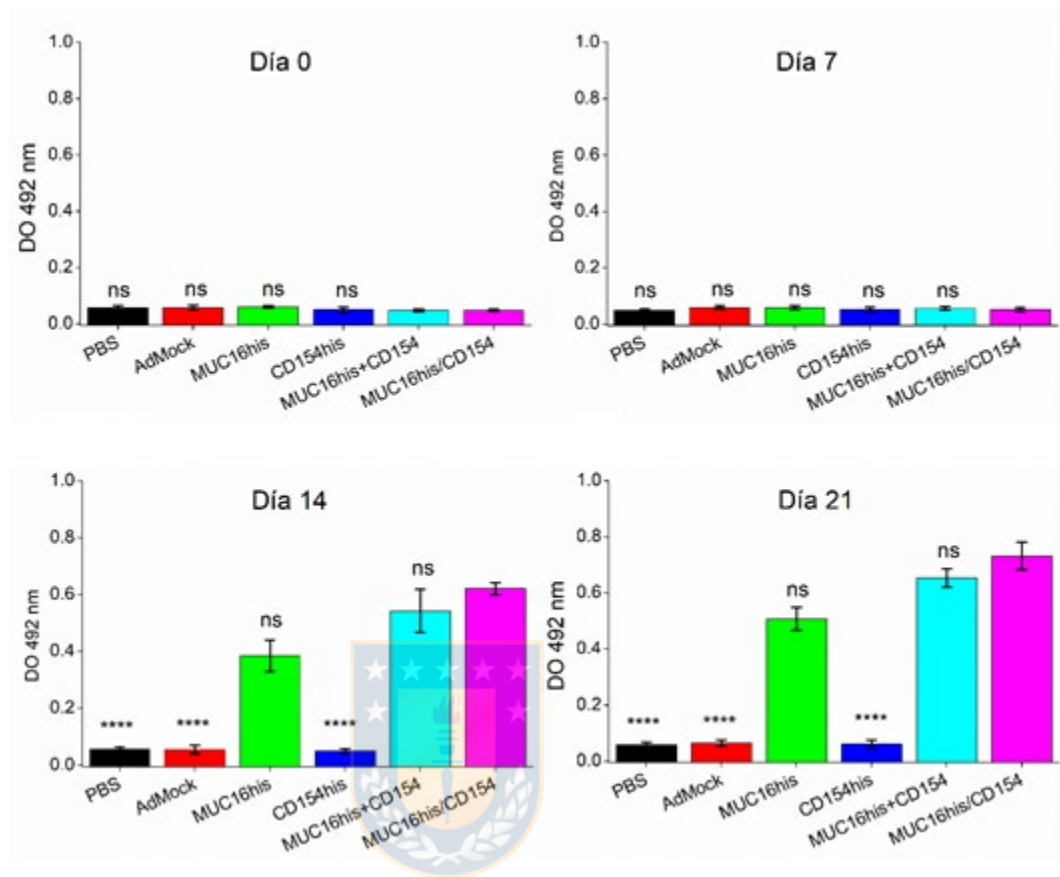


Figura 27: Curso temporal de los niveles inmunoglobulina G1 total anti-MUC16 en ratones hembra C57B/L6 inmunizados con los diferentes candidatos vacunales bajo tratamiento terapéutico. Las gráficas muestran los valores promedio de absorbancia generados para cada grupo de animales inmunizados y evaluados mediante ELISA indirecto contra el antígeno recombinante MUC16. Cada uno de los grupos se comparó de forma independiente contra el grupo inmunizado con el antígeno MUC16his/CD154. Las barras representan la media del área \pm SD, $n=6$. Los resultados fueron procesados con el programa Prisma 8 utilizando ANOVA de una vía, prueba de Kruskal-Wallis y test de comparación múltiples de Dunn, *: $p<0,05$; **: $p<0,01$; ***: $p<0,001$; ****: $p<0,0001$; ns: no existen diferencias significativas. **A:** día 0; **B:** día 7; **C:** día 14; **D:** día 21. Fuente: elaboración propia.

Siguiendo las evaluaciones de las muestras de suero en este ensayo, se determinó que al inicio de la inmunización (día 0) no fue evidente una respuesta inmune humoral del tipo IgG2a específico para el antígeno MUC16 (Fig. 28A). Este mismo fenómeno se pudo observar para el día 7, excepto una diferencia significativa de $p < 0,05$ al comparar la variante quimérica con el control negativo PBS (Fig. 28B). Las mayores diferencias se observaron en los días 14 y 21, al comparar los controles negativos con respecto a la variante quimérica MUC16his/CD154, mostrando una diferencia de $p < 0,0001$ y no se observan diferencias significativas para estas fechas en CD154his y MUC16his+CD154his con respecto a MUC16his/CD154 (Fig. 28C y D). Es importante destacar que los niveles de absorbancia para esta molécula fueron los más bajos observados, al analizar tanto tratamiento preventivo y terapéutico de las diferentes inmunoglobulinas estudiadas para este ensayo.

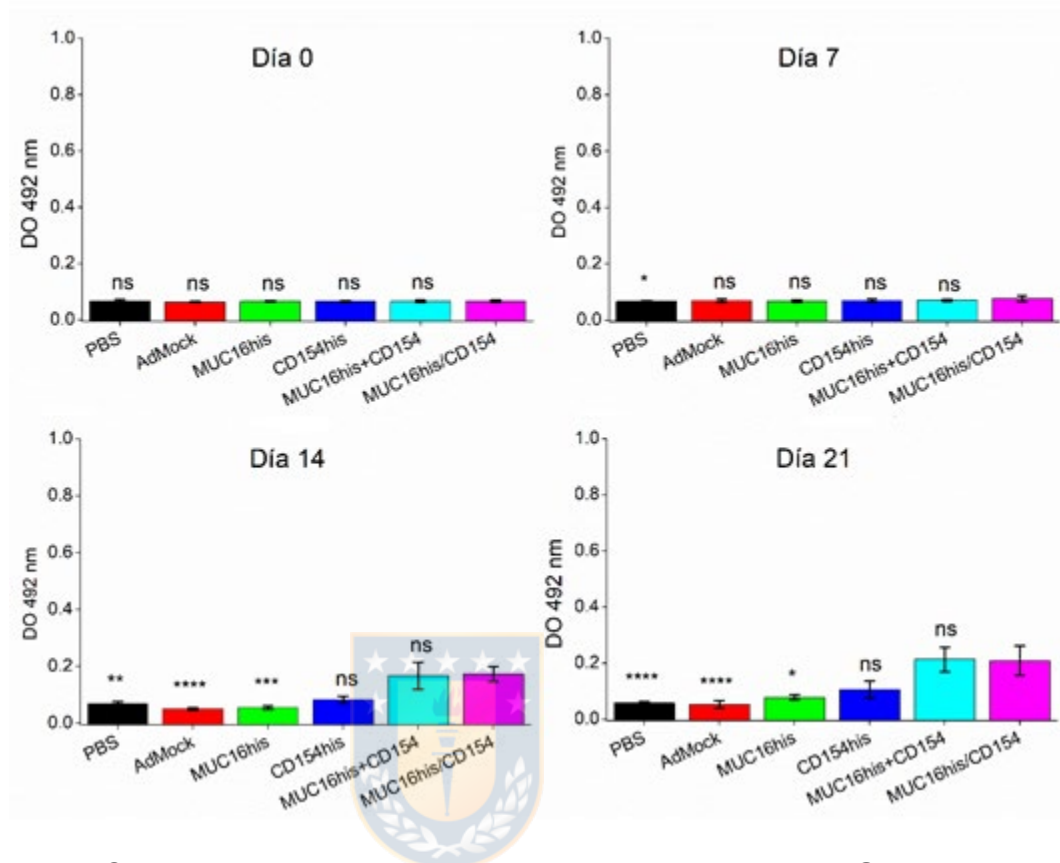


Figura 28: Curso temporal de los niveles inmunoglobulina G2a total anti-MUC16 en ratones hembra C57B/L6 inmunizados con los diferentes candidatos vacunales bajo tratamiento terapéutico. Las gráficas muestran los valores promedio de absorbancia generados para cada grupo de animales inmunizados y evaluados mediante ELISA indirecto contra el antígeno recombinante MUC16. Cada uno de los grupos se comparó de forma independiente contra el grupo inmunizado con el antígeno MUC16his/CD154. Las barras representan la media del área \pm SD, n=6. Los resultados fueron procesados con el programa Prisma 8 utilizando ANOVA de una vía, prueba de Kruskal-Wallis y test de comparación múltiples de Dunn, *: p<0,05; **: p<0,01; ***: p<0,001; ****: p<0,0001; ns: no existen diferencias significativas. **A:** día 0; **B:** día 7; **C:** día 14; **D:** día 21. Fuente: elaboración propia.

Además, analizamos los títulos de IgG totales en el tratamiento terapéutico, existiendo diferencias significativas en el título de IgG de los controles PBS, AdMock ($p < 0,0001$) y CD154his ($p < 0,01$) con respecto a MUC16his/CD154 para el día 21 (Fig. 29B). Sin embargo, no se observan diferencias al compararlo con los títulos obtenidos por MUC16his y la variante MUC16his+CD154his.

Los mayores títulos obtenidos por la variante quimérica fueron aproximadamente cercanos a 50.000, muy por debajo del título conseguido para el tratamiento preventivo con esta misma molécula.



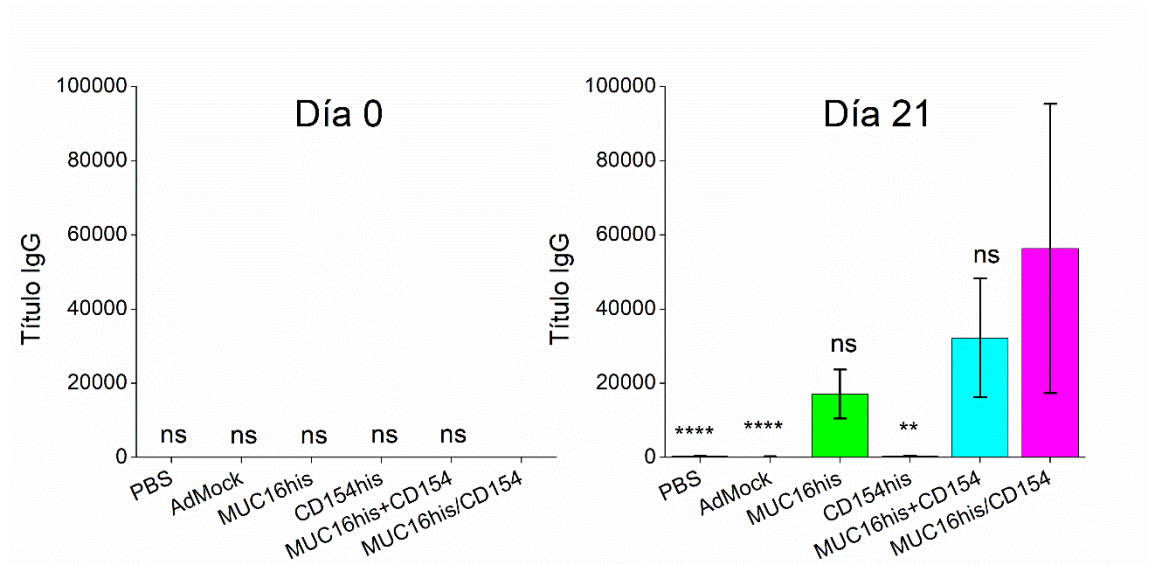


Figura 29: Títulos de anticuerpos IgG total anti-MUC16 en ratones hembra C57B/L6 inmunizados con los diferentes candidatos vacunales bajo tratamiento terapéutico. Las gráficas muestran los títulos de anticuerpos para cada grupo de animales inmunizados y evaluados mediante ELISA indirecto contra el antígeno recombinante MUC16. Cada uno de los grupos se comparó de forma independiente contra el grupo inmunizado con el antígeno MUC16his/CD154. Las barras representan la media del área \pm SD, n=6. Los resultados fueron procesados con el programa Prisma 8 utilizando ANOVA de una vía, prueba de Kruskal-Wallis y test de comparación múltiples de Dunn, *: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$; ***: $p < 0,001$; ****: $p < 0,0001$; ns: no existen diferencias significativas. **A:** día 0; **B:** día 21. Fuente: elaboración propia.

12.8 Evaluación de la respuesta inmune celular inducida por los candidatos vacunales.

Al finalizar los tratamientos preventivo y terapéutico se extrajeron los tumores desarrollados de cada uno de los ratones de los grupos de estudio, esto con la finalidad de determinar si el candidato vacunal quimérico MUC16his/CD154 estimulo la producción de citoquinas proinflamatorias tales como TNF α , IL-1 β , IL-6, IL-12, IFN γ y citoquinas antiinflamatorias como IL-10, TGF β , activadoras o inhibidoras de la respuesta inmune contra el desarrollo del tumor que expresa MUC16. Se analizo la expresión de estas citoquinas mediante una qRT-PCR a partir del ARN extraído de los tumores.

Mediante este análisis para el tratamiento preventivo se determinó que la IL-1 β se incrementó significativamente con los grupos controles negativos ($p < 0,01$ para PBS y $p < 0,05$ para AdMock (Fig. 30A)). Para IL-6 tantos controles negativos ($p < 0,05$) y positivos ($p < 0,01$) presentaron diferencias significativas, sin embargo, no se observaron diferencias al comparar los datos obtenidos con la variante MUC16his+CD154his. En el caso de IL-12 se observaron diferencias con los controles negativos ($p < 0,01$) (Fig. 30B)) y con el control positivo MUC16 ($p < 0,05$), pero no hubo diferencias significativas con el control positivo CD154 ni con MUC16his+CD154his (Fig. 30C). De manera similar, los resultados observados para para IFN γ fueron concordantes con los niveles de IL-12. Además, se observaron diferencias significativas en los niveles de TGF β con respecto a ambos controles negativos ($p < 0,01$) y con el control de CD154 ($p < 0,05$). Sin embargo, no hubo diferencias con MUC16 ni con MUC16his+CD154his. Con los

niveles de TNF α se determinó que existió diferencia significativa en el control negativo AdMock y para CD154, pero no se observaron diferencias para PBS, MUC16 ni para MUC16his+CD154his. Por último, la expresión de VEGF presento diferencias significativas con PBS ($p<0,05$); con AdMock ($p<0,001$) y MUC16 ($p<0,05$). No se observó diferencias con CD154 ni con MUC16his+CD154his.



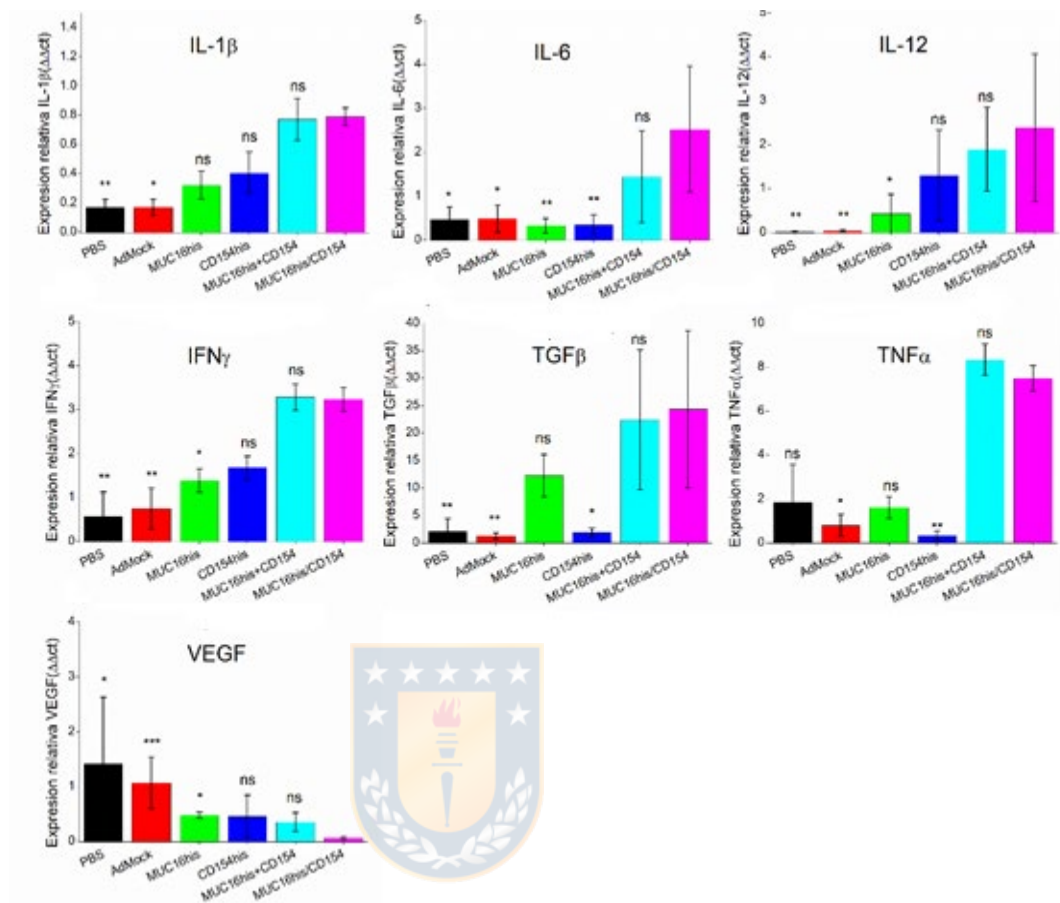


Figura 30. Expresión de citoquinas en los tumores desarrollados en ratones inmunizados con los diferentes candidatos vacunales bajo el tratamiento preventivo. Cada uno de los grupos se comparó de forma independiente contra el grupo inmunizado con el antígeno MUC16his/CD154. Las barras representan la media del área \pm SD, n=6. Los resultados fueron procesados con el programa Prisma 8 utilizando ANOVA de una vía, prueba de Kruskal-Wallis y test de comparación múltiples de Dunn, *: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$; ***: $p < 0,001$; ****: $p < 0,0001$; ns: no existen diferencias significativas. **A:** Expresión de interleucina 1 beta; **B:** Expresión de interleucina 6; **C:** Expresión de interleucina 12; **D:** Expresión de factor de crecimiento transformante beta; **E:** Expresión de factor de necrosis tumoral alfa; **G:** Expresión de factor de crecimiento endotelial vascular. Fuente: elaboración propia

Además, se realizaron análisis para el tratamiento terapéutico donde se determinó que para la IL-1 β se observó diferencias significativas con los grupos controles negativos ($p < 0,01$ para PBS y $p < 0,001$ para AdMock (Fig. 31A)). Para IL-6 tanto los controles negativos ($p < 0,01$) como el control positivo MUC16 ($p < 0,01$) presentaron diferencias significativas (Fig. 31B). Sin embargo, no se observaron diferencias al comparar los datos obtenidos con CD154 ni con la variante MUC16his+CD154his. En el caso de IL-12 se determinó que existían diferencias con los controles negativos ($p < 0,001$ para PBS y $p < 0,05$ para AdMock) y con el control positivo MUC16h ($p < 0,05$) (Fig. 31B)) pero no hubo diferencias con el control positivo CD154 ni con MUC16his+CD154his (Fig. 31C). Para IFN γ se vio que existían diferencias con los controles negativos ($p < 0,001$ para PBS y $p < 0,01$ para AdMock) y con el control positivo MUC16h ($p < 0,05$), pero no había diferencias ni con CD154, ni con MUC16his+CD154his. Además, para TGF β existieron diferencias significativas con ambos controles negativos ($p < 0,01$) y con ambos controles positivos CD154 ($p < 0,05$), sin embargo, no hubo diferencias con MUC16his+CD154his. Para el caso de TNF α se identificaron niveles significativamente incrementados respecto al control negativo AdMock y PBS ($p < 0,01$ para PBS y $p < 0,001$ para AdMock), y con el control positivo MUC16h ($p < 0,05$), pero no se observaron diferencias con CD154 ni con MUC16his+CD154his. Por último, VEGF presentó diferencias significativas con PBS ($p < 0,01$); con AdMock ($p < 0,001$) y CD154 ($p < 0,05$). No se observó diferencias con MUC16 ni con MUC16his+CD154his.

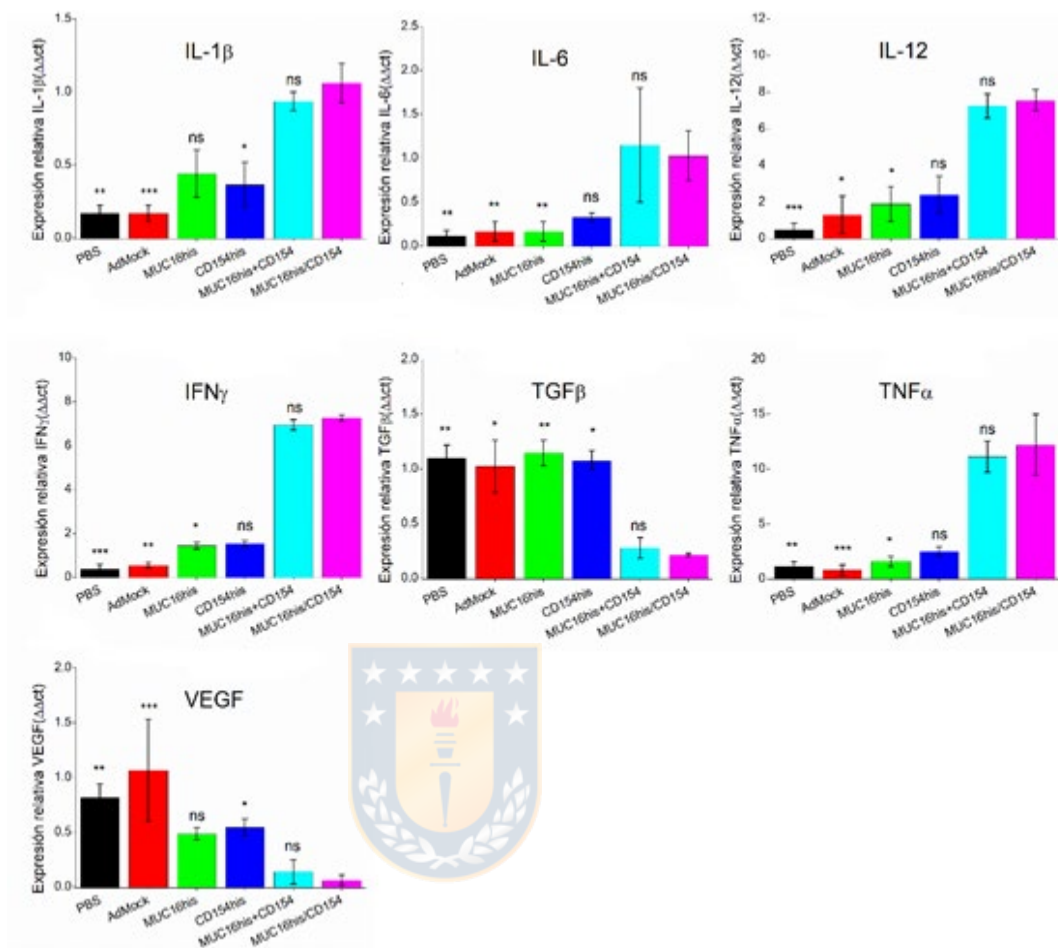


Figura 31. Expresión de citoquinas en los tumores desarrollados en ratones inmunizados con los diferentes candidatos vacunales bajo el tratamiento terapéutico. Cada uno de los grupos se comparó de forma independiente contra el grupo inmunizado con el antígeno MUC16his/CD154. Las barras representan la media del área \pm SD, n=6. Los resultados fueron procesados con el programa Prisma 8 utilizando ANOVA de una vía, prueba de Kruskal-Wallis y test de comparación múltiples de Dunn, *: p<0,05; **: p<0,01; ***: p<0,001; ****: p<0,0001; ns: no existen diferencias significativas. **A:** Expresión de interleucina 1 beta; **B:** Expresión de interleucina 6; **C:** Expresión de interleucina 12; **D:** Expresión de factor de crecimiento transformante beta; **E:** Expresión de factor de necrosis tumoral alfa; **G:** Expresión de factor de crecimiento endotelial vascular. Fuente: elaboración propia.

12.9 Evaluación del crecimiento tumoral a partir de los implantes de células murinas que expresan el antígeno MUC16 en ratones hembra C57BL/6 inmunizados con los antígenos de forma preventiva o terapéutica.

En el modelo preventivo y terapéutico, los ratones que conformaban el ensayo fueron previamente anestesiados con isoflorano, y se les inyectaron 3×10^6 células MB16F10MUC16 suspendidas en 150 μ L de medio RPMI 1640 sin aditivos, en el flanco derecho del ratón. Para evaluar si el candidato vacunal formado por la molécula quimérica MUC16his/CD154 prevenía, disminuía o eliminaba la formación de tumores en los ratones, se calculó el volumen de las tumoraciones para todos los grupos experimentales. Para obtener estos valores se utilizó un dispositivo pie de rey, con el cual se midió el largo y el ancho de cada tumor cada 3 días (Fig. 32).

A partir del día 1, se realizó una revisión diaria de los ratones, controlando el aspecto general y comportamiento animal. No hubo cambios en estos parámetros durante los días del ensayo, por lo que no fue necesario establecer alguna medida especial hacia algún individuo. Las masas de tumor comenzaron a ser detectables desde el 14 post inoculación (Fig. 32) con las células tumorales que expresaban la mucina 16, para esta fecha solo era posible detectar diferencias significativas en cuanto al volumen entre los grupos inmunizados con los controles negativos y nuestro candidato vacunal quimérico. El seguimiento se realizó durante 29 días post inoculación de las células tumorales, donde fue posible determinar que nuestro candidato vacunal poseía características preventivas pues durante todo el transcurso del experimento el grupo presento

un volumen similar cercano a cero. Por otra parte, para el día 29 (Fig. 32), el volumen tumoral de los ratones control (PBS y AdMock) fue significativamente diferente a los tumores de los ratones inmunizados con la variante quimérica. Sin embargo, la diferencia fue menor al comparar estos resultados con los obtenidos de los grupos controles positivos MUC16 y CD154, por lo tanto, se deduce que por sí solos estos inmunógenos confieren cierto tipo de protección antitumoral, pero es menor a la obtenida cuando se inmuniza con el candidato quimérico.



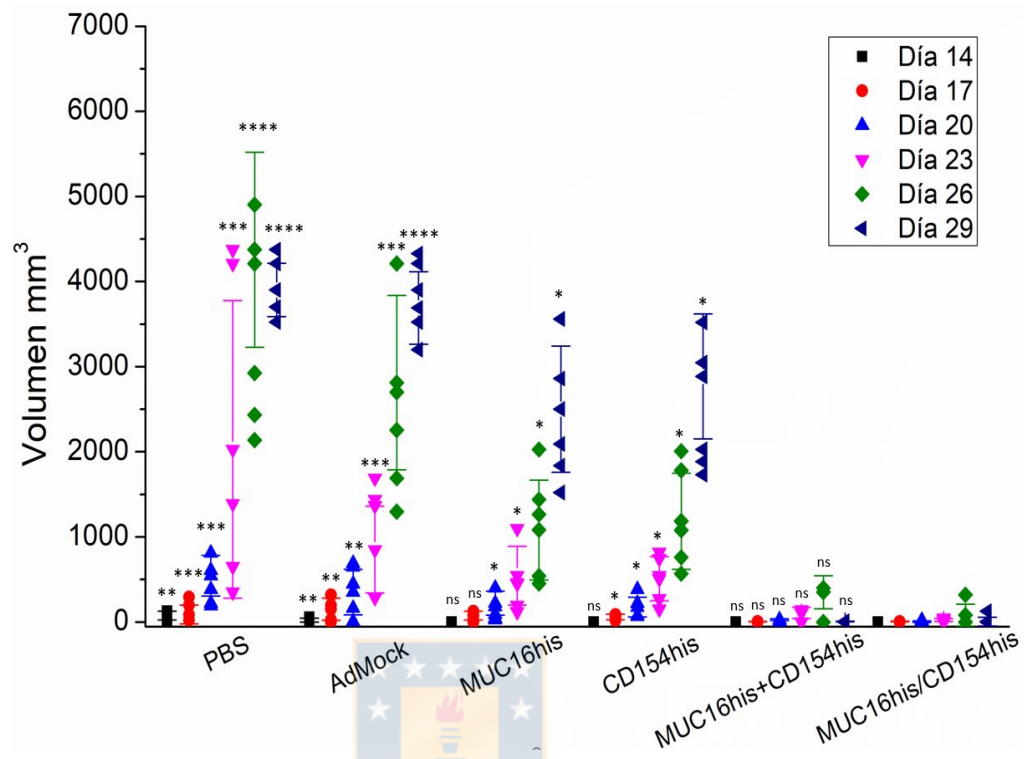


Figura 32: Curso temporal del crecimiento tumoral de los grupos inmunizados con los diferentes candidatos vacunales en tratamiento preventivo. Los animales fueron inmunizados y posteriormente inoculados con células MUC16his/CD154. Se evaluó el volumen tumoral de cada animal semanalmente. Cada uno de los grupos se comparó de forma independiente contra el grupo inmunizado con el antígeno MUC16his/CD154. Las barras representan la media del área \pm SD, $n=6$. Los resultados fueron procesados con el programa Prisma 8 utilizando ANOVA de una vía, prueba de Kruskal-Wallis y test de comparación múltiples de Dunn, *: $p<0,05$; **: $p<0,01$; ***: $p<0,001$; ****: $p<0,0001$; ns: no existen diferencias significativas. Fuente: elaboración propia.

Para el caso del cálculo del volumen tumoral en el tratamiento terapéutico es importante recordar que las células tumorales fueron inoculadas en el día 0 y tres días después se realizó la primera inmunización, la cual fue seguida de un segundo y tercer refuerzo cada 7 días. El seguimiento del experimento se realizó 12 días después de la inoculación de células tumorales que expresaban el antígeno para cada grupo experimental. Se midió el largo y ancho de las masas tumorales con un dispositivo pie de rey, cada 3 días y el seguimiento se realizó hasta el día 24. A partir de esto se determinó que durante todo el transcurso del experimento no se observaron diferencias significativas ni en los grupos control negativo (PBS y AdMock), ni en los controles positivos (MUC16 y CD154his). Tampoco se observaron diferencias con la variante MUC16his + CD154his (Fig. 33)



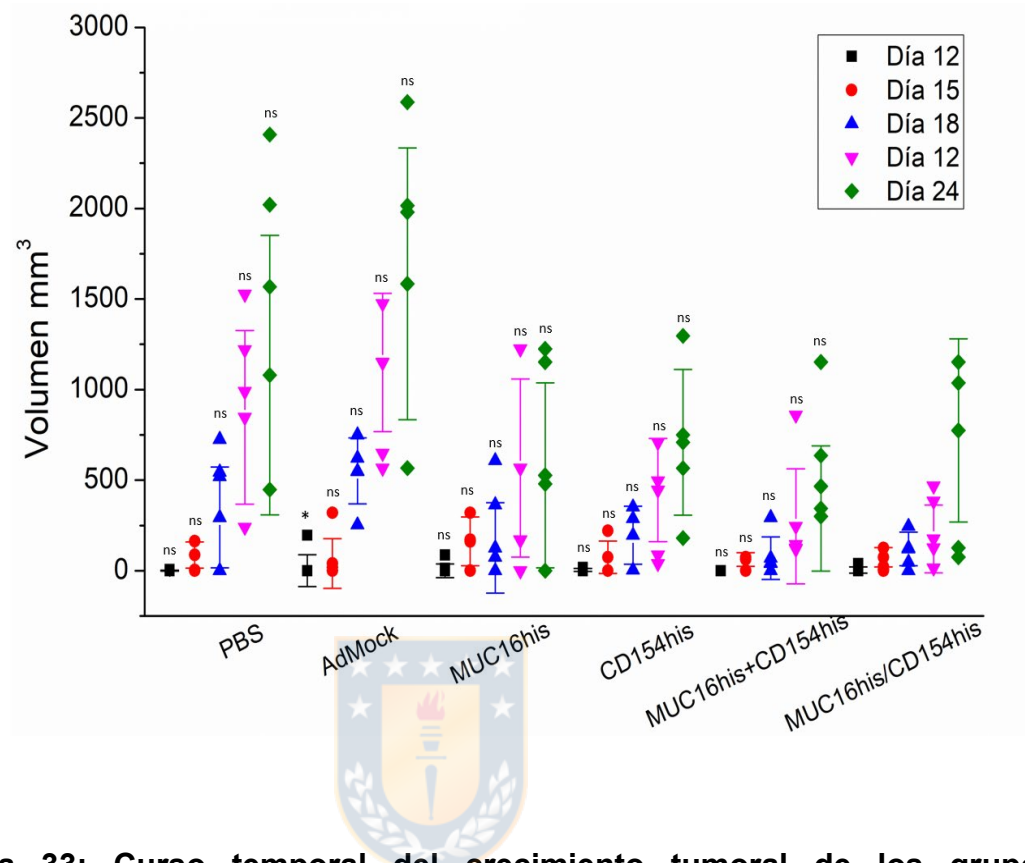


Figura 33: Curso temporal del crecimiento tumoral de los grupos inmunizados con los diferentes candidatos vacunales en tratamiento terapéutico. Los animales inicialmente inoculados con células MUC16his/CD154 y pasados tres días fueron inmunizados. Se evaluó el volumen tumoral de cada animal semanalmente. Cada uno de los grupos se comparó de forma independiente contra el grupo inmunizado con el antígeno MUC16his/CD154. Las barras representan la media del área \pm SD, $n=6$. Los resultados fueron procesados con el programa Prisma 8 utilizando ANOVA de una vía, prueba de Kruskal-Wallis y test de comparación múltiples de Dunn, *: $p<0,05$; **: $p<0,01$; ***: $p<0,001$; ****: $p<0,0001$; ns: no existen diferencias significativas. Fuente: elaboración propia.

13. DISCUSIÓN

Una de las estrategias inmunooncológicas de vanguardia son las vacunas antitumorales. Estas han tenido éxito en cuanto al control y eliminación de las células cancerígenas mediante la inducción o la potencialidad de la inmunidad. Estas vacunas pueden emplear por ejemplo antígenos asociados a tumor como blancos terapéuticos (Schlitzer and Ginhoux 2014), activando reacciones inmunitarias innatas y adaptativas de larga duración.

Una de las características que presentan los TAAs es que se encuentran altamente expresados en células cancerígenas, lo que permite que se presenten como candidatos ideales para terapias contra el cáncer. Sumado a esto, es importante destacar que los TAAs presentan características únicas que la diferencia de los antígenos presentes en el tejido sano (McDonald, Byrne et al. 2015). Ejemplo de TAAs encontramos a las mucinas expresadas en las células epiteliales como: mucina - 1 (MUC1), mucina - 4 (MUC4), mucina - 5AC (MUC5AC), mucina - 16 (MUC16) (Torres, Chakraborty et al. 2012).

Se han desarrollado múltiples inmunoterapias dirigidos a esta última mucina, MUC16. La efectividad terapéutica antitumoral observada con estos tratamientos y los efectos secundarios, generalmente leves, asociados al bloqueo de esta proteína, evidencian la necesidad de continuar investigando en otras estrategias de inmunoterapia antígeno-específica contra esta proteína. Una aproximación que podría romper la barrera de la inmunotolerancia es la inmunoterapia dirigida a la co-activación de células dendríticas (CDs), debido a la dualidad de estas

células de activar tanto el sistema inmune innato como el adaptativo (Sabado, Balan et al. 2017).

El inicio de la respuesta inmune antitumoral requiere de la activación de las células T y en este proceso debe ocurrir el reconocimiento del péptido antigénico debidamente presentado por las moléculas del MHC, por medio del TCR de la molécula CD3 (complejo TCR/CD3). Sin embargo, la señal liberada por la interacción del TCR con el antígeno asociado a tumor, no es suficiente para producir proliferación y expansión clonal de células T específicas. Se necesitan de otras señales de activación mediadas por varios miembros de la familia de moléculas de adhesión localizadas en las células T, entre las que figuran CD28, CTL4, CD80, CD11a/CD18, CD2, CD8, CD4, CD43, CD5, CD40L y CD6 (Greenberg and Zieyler 1991, Gückel, Lindauer et al. 1995, Osorio, Ordonez et al. 1995). Por esta razón, es fundamental para este acercamiento, la utilización de vacunas autoadyuvantes sintéticas antitumorales (Wurz, Kao et al. 2014). Se denominan así, porque el TAAs tumoral está fusionado al adyuvante formando una sola molécula (McDonald, Byrne et al. 2015). Este adyuvante puede presentar diferentes características potenciando o, aumentando la inmunogenicidad, capaz de romper la autotolerancia a los antígenos tumorales. Los adyuvantes candidatos deben reconocer patrones de receptores presentes en las APC como células dendríticas y macrófagos. De esta manera, co-activan a las APC para continuar con el cebado de las células T cooperadoras y citotóxicas (células T_h y CTL, respectivamente) (Torres, Chakraborty et al. 2012). La posibilidad de que las moléculas co-estimuladoras sirvan como una vía

alternativa de la activación de las células T es de gran importancia para la inmunología tumoral ya que la incapacidad de una respuesta inmune protectora contra el tumor puede ser consecuencia de trastornos en la expresión de estas moléculas. Una de las razones de la pobre inmunoestimulación provocada por las células tumorales puede deberse a un trastorno en las señales coestimuladoras.

En base a lo anterior, el objetivo del presente trabajo de tesis fue el diseño y evaluación de una formulación vacunal que permitiera incrementar significativamente el nivel y persistencia de la respuesta inmune contra el autoantígeno MUC16, mediante la utilización del adyuvante molecular CD154.

Al inicio de nuestro trabajo diseñamos una molécula quimérica en base a la secuencia del antígeno MUC16 humano, que se fusionó al dominio C-terminal de la molécula CD154, ligando de unión al CD40. Esta estrategia se enfoca en activar las células dendríticas mediante la unión CD40/CD154, y a su vez lograr la presentación del antígeno MUC16 en dichas células activadas. La secuencia diseñada se insertó en un vector adenoviral para facilitar la expresión de esta molécula en cultivos celulares artificiales y, además, para utilizar los propios vectores como vehículo de inmunización. Una de las formas de generar vectores adenovirales recombinantes ha implicado tradicionalmente la recombinación de homólogos en células de mamíferos (líneas de empaquetamiento), que permiten generar vectores en forma de viriones defectivos para la replicación (Stratford-Perricaudet, Makeh et al. 1992, Mittal, McDermott et al. 1993). Este sistema utiliza la maquinaria de recombinación bacteriana para la obtención del vector

adenoviral y emplea vectores de transferencia que permiten la inclusión de una o varias secuencias variantes antigénicas MUC16his; CD154his; que fueron utilizados como controles positivos en nuestros esquemas de inmunización y para la expresión de nuestro candidato vacunal quimérico MUC16hisCD154. El vector de transferencia pAdTrack contienen además el gen de la proteína fluorescente verde (GFP, del inglés: Green Fluorescent Protein), el cual se incorpora al genoma adenoviral y permite monitorear la eficiencia de los eventos de transfección e infección tal como se observa en la figura 8. Una vez clonados los genes de interés en el vector pAdTrack-CMV, éste es linealizado y co-transformado en células de *E. coli* con el plasmidio pAdEasy-. Los recombinantes son seleccionados por resistencia a Kanamicina y el plásmido resultante es linealizado y transfectado en líneas celulares de empaquetamiento como HEK293A (Graham, Smiley et al. 1977). El proceso de producción viral puede ser seguido por visualización de la proteína GFP incorporada al genoma viral. Los viriones pueden ser cosechados entre 7 y 10 días, y utilizados directamente en experimentación. Las células transfectadas con los genomas adenovirales recombinantes muestran halos de ruptura, que pueden ser visualizados entre los 5-7 días post-transfección, debido al efecto citopático de la multiplicación de los viriones. La amplificación de estos viriones continuó en la línea celular HEK293A, hasta la obtención de un pase adenoviral, cuyo título fue cercano a 1×10^{10} UFC/ml para los tres vectores generados.

Los vectores adenovirales generados fueron utilizados como una herramienta para facilitar la expresión de las proteínas recombinantes MUC16his; CD154his

y MUC16his/CD154 en cultivos de células de carcinoma cérvico -uterino (células SiHa) (Fig. 12). Estas células tienen la ventaja de expresar en su superficie celular los receptores CAR que permiten la transducción de las partículas adenovirales y aunque existen otras líneas celulares reportadas con buenas eficiencias de transducción (Kim, Lee et al. 2001), la densidad de receptores CAR en la superficie de las célula SiHa, junto con el tropismo natural del adenovirus Ad5 por células humanas (Pose, Gómez et al. 2011), permitió una eficiencia de transducción óptima para este modelo celular utilizando un MOI igual a 25; eficiencia que fue observada mediante la expresión de GFP y el efecto citopático en los cultivos transformados a las 48 y 96 post-transducción. Adicionalmente, para esa línea celular no se ha reportado la expresión de MUC16, pero sí se ha descrito su expresión en células cervicales y endometriales (Uhlén, Fagerberg et al. 2015), además de una sobre-expresión aberrante en adenocarcinomas del tipo endocervical (Togami, Nomoto et al. 2010), por lo que se propone como un modelo adecuado para la expresión de este antígeno.

El análisis de la expresión de las variantes antigénica en estudio reveló que la molécula CD154his se obtuvo con un peso molecular de 29 kDa, lo que coincidió con investigaciones anteriores que marcan una expresión entre 29 y 32 kDa (Yun and Peter 2015). Sin embargo, la talla de MUC16his obtenida es de 180 kDa, lo que difiere de la talla óptima esperada de 135 kDa. En estudios previos se demuestra que pesos moleculares desproporcionados de una glicoproteína se deben a modificaciones postraduccionales (PTM) (N-glicosilación, ubiquitilación, autodioligomerización) (Bathia, 2015). Esta diferencia en masa y la apariencia de

la banda ancha reforzada, puede deberse a la presencia de glicanos asociados al polipéptido que aumentan la masa molecular de la proteína, sumado a que las cadenas laterales de azúcares en las glicoproteínas no interactúan con el SDS de la misma forma que los aminoácidos en una cadena de péptidos, provocando que las glicoproteínas no se compacten de forma homogénea, lo que modifica su relación masa/carga y su movilidad en el gradiente electroforético (Pose, Gómez et al. 2011). Esto explicaría la diferencia de tamaño observada para la molécula quimérica MUC16his/CD154.

El segundo objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto de la respuesta inmune inducida por los candidatos vacunales de forma preventiva y terapéutica, en modelos murinos enfrentados a células tumorales que expresan MUC16. De forma preliminar, se estableció mediante esquemas de inmunización que la dosis de 30 ug de antígeno era óptima para la generación de anticuerpos específicos anti-MUC16 y que, para este caso, no había diferencia significativa entre la vía de inoculación subcutánea e intraperitoneal. Para estos experimentos, la dosis y vías de administración fueron elegidas en base al análisis de otros reportes de inmunización previamente descritos para el antígeno MUC16 (Shojaeian, Zarnani et al. 2009, Marcos-Silva, Ricardo et al. 2015).

Se desarrolló un esquema basado en una inmunización inicial seguido de dos refuerzos de dosis. Se eligió este esquema porque es el utilizado en seres humanos con vacunas cuyos antígenos son de tipo recombinante (Tulchinsky 2018). En nuestros ensayos de inmunización y desafío con células tumorales que expresan la molécula MUC16, tanto para el esquema preventivo y como para el

terapéutico, el segundo refuerzo se realizó con los vectores adenovirales adecuados para cada grupo. La dosis administrada de vector adenoviral se definió en 10^8 UFC/mL, estos títulos han sido utilizados exitosamente anteriormente, sin generar eventos de toxicidad (Savelyeva, Allen et al. 2017). La estrategia de inmunización empleado en la presente investigación permite aprovechar la propiedad de los AdVs de crear un ambiente inmunogénico, tanto humoral como celular, y se combina con inmunización y refuerzos adicionales con el antígeno proteico purificado. Esta estrategia ha sido previamente utilizada de forma exitosa (Bradley, Maxfield et al. 2012). Sin embargo, nuestro esquema de inmunización difiere de otros estudios, donde utilizando vacunas con vectores adenovirales que contienen la secuencia de antígenos tumorales como MUC1 y E7 fusionados al dominio extracelular del CD154, han probado sus moléculas con administraciones en base a vectores adenovirales recombinantes y si se han desarrollado efectos adversos en base a la respuesta inmune generada (Deisseroth, Tang et al. 2013). Estas aparentes contradicciones podrían explicarse en base a una respuesta no tóxica cuando se alterna las inmunizaciones con antígenos purificados / vectores adenovirales recombinantes, a diferencia de administrar en varias dosis solo el vector adenoviral. Si bien en nuestro trabajo no tuvimos evidencias de efectos adversos con la estrategia de inmunización combinada, tampoco alcanzamos a evaluar estos eventos de forma más precisa a nivel celular o histológico. Por lo que nuestros hallazgos se basan solo en evaluación conductual y parámetros fisiológicos de los animales en estudio.

Adicionalmente, las inmunizaciones con vectores adenovirales induce a anticuerpos neutralizantes que afecta la administración de dosis repetidas (Lee, Epardaud et al. 2007). Con a administración combinada de antígenos/vectores adenovirales se ha demostrado que se potencia la co-activación de las CD sobre el reconocimiento humoral (Ali, Mei et al. 2014). Este hecho se fundamenta en lo descrito por Curiel (Chaurasiya and Hitt 2016), quien demuestra que las vacunas con vectores adenovirales son reconocidas por los TLR de las CD, permitiendo que el antígeno se exprese intracelularmente. Por el contrario, cuando se aumentan las dosis de vector adenoviral en las vacunas, se ha comprobado que se generan toxicidades graves (Wang, Feng et al. 2014) . Por este motivo, se decidió implementar el esquema de inmunización combinada, alternado antígeno/vector/antígeno, en tres inmunizaciones en los modelos animales propuestos.

La evaluación de los niveles de respuesta en base a anticuerpos tipo IgG, y subtipos IgG1 e IgG2 se realizaron mediante ELISA indirecto con el antígeno MUC16 purificado. La evaluación del curso temporal de los niveles de IgG total en todos los grupos experimentales mostró que, en los animales inmunizados con el antígeno MUC16his/CD154 se indujo una respuesta significativa desde el día 14 post-inmunización y continuó incrementándose hasta el día 42 en el modelo de inmunización preventiva. Sin embargo, los grupos controles negativos, e incluso los grupos inmunizados con las variantes MUC16his y CD154his, no generaron niveles de respuesta humoral similares a los animales inmunizados con el antígeno MUC16 y el co-estimulador CD154, tanto en el formato

covalentemente unido como en la variante administración conjunta de ambas moléculas en la misma inyección. Estos resultados demuestran el efecto co-estimulador del CD154 en la activación de la respuesta inmune humoral contra el antígeno MUC16. Al analizar la respuesta en base a IgG1 se obtuvieron resultados muy parecidos a al curso temporal de anticuerpos IgG total contra MUC16. Sin embargo, en el caso del subtipo IgG2, observamos que los animales inmunizados con la variante CD154his mostraron títulos superiores a todos los demás controles, positivos y negativos. Aunque menores que para las formulaciones de MUC16his/CD154 o MUC16his + CD154. Este efecto podría estar asociado que CD154 por si solo es capaz de inducir respuesta humoral al activar linfocitos B (Yin and Lloyd 2001) y al promover la expresión de IL12, un mediador importante para inducir respuestas de tipo TH1 (Wu, Miya et al. 1988)

En cuanto a la expresión de citoquinas es importante mencionar que los linfocitos T cooperadores (Th) pueden ser clasificados en dependencia del patrón de citoquinas que producen, definiéndose 2 poblaciones fundamentales: células Th1 que producen IL-2 e IFN γ y células Th2 que producen IL-4, IL-5, IL6, IL-10 y TGF β (Mosmann and Coffman 1989). Estas poblaciones celulares pueden diferenciarse a partir de las células Th0 (no estimulada con el antígeno), a través de vías controladas de diferenciación que involucran citocinas y moléculas co-estimuladoras (Lucey, Clerici et al. 1996).

Durante la evaluación de la respuesta inmune celular en nuestros ensayos de inmunización, se analizó la expresión relativa de citoquinas, permitiendo

diferenciar un perfil Th1 o Th2 (O'Garra and Arai 2000, Dienz and Rincon 2009, Zivcec, Safronetz et al. 2011). Se evaluó la expresión de las citoquinas proinflamatorias TNF α , IL-1 β , IL-6, IL-12, IFN γ y citoquinas antiinflamatorias IL-10, TGF β y VEGF. Estas moléculas pueden resultar activadoras o inhibidoras de la respuesta inmune contra el desarrollo del tumor que expresa MUC16 en un esquema de tratamiento terapéutico o en un esquema de tratamiento preventivo. El análisis de los factores solubles en el microambiente del tumor puede ayudarnos en la comprensión de la conducta del tumor y pudieran resultar útiles como factores pronósticos (Marrogi, Munshi et al. 1997).

El incremento significativo en los niveles de expresión relativos de ARNm de IFN γ , IL-1B, IL-6, IL-12 y TNF α sugiere un perfil de respuesta de tipo Th1 para ambos esquemas de tratamiento, preventivo o terapéutico. Estudios previos de la respuesta inmune celular en pacientes con cáncer, indican una disminución en la producción de citocinas Th1 en sangre periférica y en el microambiente del tumor y la presencia de un patrón de citocinas Th2 en el sitio del tumor que sugiere una inmunosupresión local (Huang, Wang et al. 1995). Además, en ensayos realizados con CD154 se demostró que esta molécula desplaza el medio de citoquinas tumorales desde un predominio de IL-10 y TGF- β hacia IL-12 e IFN γ ; favoreciendo, de esta forma, un microambiente antitumoral (Sun, Peng et al. 2000). En el caso de TGF β , se observó un aumento su expresión para el esquema de tratamiento preventivo y una disminución para el tratamiento terapéutico. Es importante mencionar que el factor de crecimiento transformante- β (TGF- β) es una citocina multifuncional que regula el crecimiento y la

diferenciación celular, la apoptosis, la motilidad celular, la producción de matriz extracelular, la angiogénesis y las respuestas inmunitarias celulares (Hinck 2012). Curiosamente, el TGF- β muestra una actividad paradójica ya que exhibe actividad supresora de tumores en las primeras etapas de la tumorigénesis. Sin embargo, en etapas posteriores promueve el crecimiento tumoral e induce un ambiente propicio para la invasión tumoral y la metástasis (Roberts and Wakefield 2003). Por lo tanto, la función pivotal de este factor de crecimiento hace difícil determinar cuál es la contribución real en el desarrollo de estos tumores.

Aun así, debido a la escasa cantidad de citoquinas analizadas, estos resultados son aún subjetivos. Se debe analizar un patrón más amplio de citoquinas para complementar esta información y caracterizar en detalle la respuesta inmune inducida por nuestro antígeno quimérico MUC16his/CD154. Sería interesante realizar un análisis más amplio de las citoquinas involucradas a distintos tiempos post-estimulación de linfocitos extraídos desde el bazo de ratones inmunizados, así como estudiar otras posibles reacciones inmunitarias que pudiesen activarse (activación de linfocitos T citotóxicos y citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos, por ejemplo). Los ensayos de respuesta inmune realizados hasta el momento, si bien constituyen un primer paso y se muestran alentadores, son limitados y requieren de más evaluaciones en el futuro. Es necesario caracterizar en mayor profundidad la respuesta inmune celular originada por el candidato vacunal.

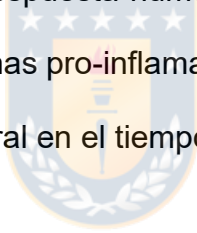
En cuanto al tamaño tumoral fue posible determinar que nuestro candidato vacunal poseía características preventivas pues durante todo el transcurso del

experimento el grupo presento un volumen similar cercano a cero. Resultados similares se documentaron por Rowse, et al. Donde ratones que expresaban MUC1 en células tumorales fueron inmunizados con candidatos vacunales que expresaban MUC1 unido a CD154, en este modelo se indujo una respuesta inmune que suprimió el crecimiento de células tumorales positivas al antígeno MUC1 humano (hMUC1) en el 100% de los ratones (Rowse, Tempero et al. 1998).



14. CONCLUSIÓN

El candidato vacunal quimérico diseñado en base a las secuencias del antígeno tumoral MUC16 y de la molécula coestimuladora CD154, induce una respuesta inmune sinérgica, humoral y celular, que incrementa significativamente el nivel efector contra el antígeno MUC16 en modelos murinos C57BL/6. Sin embargo, su efecto antitumoral resulta efectivo en un esquema de tratamiento preventivo, respecto a una aplicación como tratamiento terapéutico, tomando como base de comparación el nivel de la respuesta humoral anti-MUC16, la respuesta celular en base a los niveles citoquinas pro-inflamatorias presentes en el microambiente tumoral, y el desarrollo tumoral en el tiempo.



15. BIBLIOGRAFÍA

- Aithal, A., S. Rauth, P. Kshirsagar, A. Shah, I. Lakshmanan, W. M. Junker, M. Jain, M. P. Ponnusamy and S. K. Batra (2018). "MUC16 as a novel target for cancer therapy." Expert Opinion on Therapeutic Targets **22**(8): 675-686.
- Ali, H. A. A., W. Mei, Y.-C. Zhang and Z.-W. Du (2014). "Antitumor Activity of Lentivirus-mediated Interleukin -12 Gene Modified Dendritic Cells in Human Lung Cancer in Vitro." Asian Pacific Journal of Cancer Prevention **15**(2): 611-616.
- Andrianifahanana, M., N. Moniaux and S. K. Batra (2006). "Regulation of mucin expression: Mechanistic aspects and implications for cancer and inflammatory diseases." Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer **1765**(2): 189-222.
- Apetoh, L., F. Ghiringhelli, A. Tesniere, M. Obeid, C. Ortiz, A. Criollo, G. Mignot, M. C. Maiuri, E. Ullrich, P. Saulnier, H. Yang, S. Amigorena, B. Ryffel, F. J. Barrat, P. Saftig, F. Levi, R. Lidereau, C. Nogues, J.-P. Mira, A. Chompret, V. Joulin, F. Clavel-Chapelon, J. Bourhis, F. André, S. Delaloge, T. Tursz, G. Kroemer and L. Zitvogel (2007). "Toll-like receptor 4-dependent contribution of the immune system to anticancer chemotherapy and radiotherapy." Nature Medicine **13**(9): 1050-1059.
- Argüeso, P., A. Guzman-Aranguez, F. Mantelli, Z. Cao, J. Ricciuto and N. Panjwani (2009). "Association of Cell Surface Mucins with Galectin-3 Contributes to the Ocular Surface Epithelial Barrier." Journal of Biological Chemistry **284**(34): 23037-23045.
- Argüeso, P., S. Spurr-Michaud, C. L. Russo, A. Tisdale and I. K. Gipson (2003). "MUC16 Mucin Is Expressed by the Human Ocular Surface Epithelia and Carries the H185 Carbohydrate Epitope." Investigative Ophthalmology & Visual Science **44**(6): 2487-2495.
- Avril, T., H. Floyd, F. Lopez, E. Vivier and P. R. Crocker (2004). "The Membrane-Proximal Immunoreceptor Tyrosine-Based Inhibitory Motif Is Critical for the Inhibitory Signaling Mediated by Siglecs-7 and -9, CD33-Related Siglecs Expressed on Human Monocytes and NK Cells." The Journal of Immunology **173**(11): 6841-6849.
- Baldus, S. E., K. Engelmann and F.-G. Hanisch (2004). "MUC1 and the MUCs: A Family of Human Mucins with Impact in Cancer Biology." Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences **41**(2): 189-231.
- Bansil, R. and B. S. Turner (2006). "Mucin structure, aggregation, physiological functions and biomedical applications." Current Opinion in Colloid & Interface Science **11**(2): 164-170.
- Bast, R. C., Jr., M. Feeney, H. Lazarus, L. M. Nadler, R. B. Colvin and R. C. Knapp (1981). "Reactivity of a monoclonal antibody with human ovarian carcinoma." The Journal of Clinical Investigation **68**(5): 1331-1337.
- Bast, R. C., Jr. and D. R. Spriggs (2011). "More than a biomarker: CA125 may contribute to ovarian cancer pathogenesis." Gynecologic Oncology **121**(3): 429-430.

- Bast, R. C., T. L. Klug, E. S. John, E. Jenison, J. M. Niloff, H. Lazarus, R. S. Berkowitz, T. Leavitt, C. T. Griffiths, L. Parker, V. R. Zurawski and R. C. Knapp (1983). "A Radioimmunoassay Using a Monoclonal Antibody to Monitor the Course of Epithelial Ovarian Cancer." New England Journal of Medicine **309**(15): 883-887.
- Basu, P. S., R. Majhi and S. K. Batabyal (2003). "Lectin and serum-PSA interaction as a screening test for prostate cancer." Clinical biochemistry **36**(5): 373-376.
- Behera, S. K., A. B. Praharaj, B. Dehury and S. Negi (2015). "Exploring the role and diversity of mucins in health and disease with special insight into non-communicable diseases." Glycoconjugate journal **32**(8): 575-613.
- Belisle, J. A., S. Horibata, G. A. A. Jennifer, S. Petrie, A. Kapur, S. André, H.-J. Gabius, C. Rancourt, J. Connor, J. C. Paulson and M. S. Patankar (2010). "Identification of Siglec-9 as the receptor for MUC16 on human NK cells, B cells, and monocytes." Molecular Cancer **9**(1): 118.
- Bell, S. L., G. Xu, I. A. Khatri, R. Wang, S. Rahman and J. F. Forstner (2003). "N-linked oligosaccharides play a role in disulphide-dependent dimerization of intestinal mucin Muc2." Biochemical Journal **373**(3): 893-900.
- Berek, J. S. (2004). "Immunotherapy of ovarian cancer with antibodies: a focus on oregovomab." Expert Opinion on Biological Therapy **4**(7): 1159-1165.
- Bhatia, R., S. K. Gautam, A. Cannon, C. Thompson, B. R. Hall, A. Aithal, K. Banerjee, M. Jain, J. C. Solheim, S. Kumar and S. K. Batra (2019). "Cancer-associated mucins: role in immune modulation and metastasis." Cancer and Metastasis Reviews **38**(1): 223-236.
- Birkeland, S. A., H. H. Storm, L. U. Lamm, L. Barlow, I. Blohmé, B. Forsberg, B. Eklund, O. Fjeldborg, M. Friedberg, L. Frödin, E. Glatte, S. Halvorsen, N. V. Holm, A. Jakobsen, H. E. Jorgensen, J. Ladefoged, T. Lindholm, G. Lundgren and E. Pukkala (1995). "Cancer risk after renal transplantation in the nordic countries, 1964–1986." International Journal of Cancer **60**(2): 183-189.
- Blalock, T. D., S. J. Spurr-Michaud, A. S. Tisdale, S. R. Heimer, M. S. Gilmore, V. Ramesh and I. K. Gipson (2007). "Functions of MUC16 in Corneal Epithelial Cells." Investigative Ophthalmology & Visual Science **48**(10): 4509-4518.
- Bocchia, M., T. Korontsvit, Q. Xu, S. Mackinnon, S. Y. Yang, A. Sette and D. A. Scheinberg (1996). "Specific human cellular immunity to bcr-abl oncogene-derived peptides." Blood **87**(9): 3587.
- Boivin, M., D. Lane, A. Piché and C. Rancourt (2009). "CA125 (MUC16) tumor antigen selectively modulates the sensitivity of ovarian cancer cells to genotoxic drug-induced apoptosis." Gynecologic Oncology **115**(3): 407-413.
- Boon, T., P. G. Coulie, B. J. V. d. Eynde and P. v. d. Bruggen (2006). "HUMAN T CELL RESPONSES AGAINST MELANOMA." Annual Review of Immunology **24**(1): 175-208.
- Bork, P. and L. Patthy (1995). "The SEA module: A new extracellular domain associated with O-glycosylation." Protein Science **4**(7): 1421-1425.
- Bradley, R. R., L. F. Maxfield, D. M. Lynch, M. J. Lampietro, E. N. Borducchi and D. H. Barouch (2012). "Adenovirus Serotype 5-Specific Neutralizing Antibodies

- Target Multiple Hexon Hypervariable Regions." Journal of Virology **86**(2): 1267-1272.
- Brasseur, F., M. Marchand, R. Vanwuck, M. Hérin, B. Lethé, P. Chomez and T. Boon (1992). "Letter to the editor." International Journal of Cancer **52**(5): 839-841.
- Bressan, A., F. Bozzo, C. A. Maggi and M. Binaschi (2013). "OC125, M11 and OV197 Epitopes Are Not Uniformly Distributed in the Tandem-Repeat Region of CA125 and Require the Entire SEA Domain." Disease Markers **34**(4).
- Bromberg, J. F., C. M. Horvath, Z. Wen, R. D. Schreiber and J. E. Darnell (1996). "Transcriptionally active Stat1 is required for the antiproliferative effects of both interferon alpha and interferon gamma." Proceedings of the National Academy of Sciences **93**(15): 7673-7678.
- Burnet, M. (1957). "Cancer—A Biological Approach." III. Viruses Associated with Neoplastic Conditions. IV. Practical Applications **1**(5023): 841-847.
- Burnette, W. N. (1981). "WESTERN BLOTTING - ELECTROPHORETIC TRANSFER OF PROTEINS FROM SODIUM DODECYL SULFATE-POLYACRYLAMIDE GELS TO UNMODIFIED NITROCELLULOSE AND RADIOGRAPHIC DETECTION WITH ANTIBODY AND RADIOIODINATED PROTEIN-A." Analytical Biochemistry **112**(2): 195-203.
- Burns, R. (2009). Immunisation strategies for Antibody Production. Plant Pathology: Techniques and Protocols. R. Burns. Totowa, NJ, Humana Press: 27-35.
- Cai, H., Z.-H. Huang, L. Shi, Z.-Y. Sun, Y.-F. Zhao, H. Kunz and Y.-M. Li (2012). "Variation of the Glycosylation Pattern in MUC1 Glycopeptide BSA Vaccines and Its Influence on the Immune Response." Angewandte Chemie International Edition **51**(7): 1719-1723.
- Cancer, I. A. f. R. o. (2018). "Data visualization tools for exploring the global cancer burden in 2020." from <https://gco.iarc.fr/today/home>.
- Capstick, V., G. D. Maclean, M. R. Suresh, D. Bodnar, S. Lloyd, L. Shepert, B. M. Longenecker and M. Krantz (1991). "Clinical evaluation of a new two-site assay for CA125 antigen." Int J Biol Markers **6**(2): 129-135.
- Carbone, E., G. Ruggiero, G. Terrazzano, C. Palomba, C. Manzo, S. Fontana, H. Spits, K. Kärre and S. Zappacosta (1997). "A New Mechanism of NK Cell Cytotoxicity Activation: The CD40–CD40 Ligand Interaction." The Journal of Experimental Medicine **185**(12): 2053.
- Carmeliet, P. and R. K. Jain (2000). "Angiogenesis in cancer and other diseases." Nature **407**(6801): 249-257.
- Carvalho, V. P. d., M. L. Grassi, C. d. S. Palma, H. H. A. Carrara, V. M. Faça, F. J. Candido dos Reis and A. Poersch (2019). "The contribution and perspectives of proteomics to uncover ovarian cancer tumor markers." Translational Research **206**: 71-90.
- Cedrés, S., I. Nuñez, M. Longo, P. Martinez, E. Checa, D. Torrejón and E. Felip (2011). "Serum Tumor Markers CEA, CYFRA21-1, and CA-125 Are Associated With Worse Prognosis In Advanced Non-Small-Cell Lung Cancer (NSCLC)." Clinical Lung Cancer **12**(3): 172-179.

- Coelho, R., L. Marcos-Silva, S. Ricardo, F. Ponte, A. Costa, J. M. Lopes and L. David (2018). "Peritoneal dissemination of ovarian cancer: role of MUC16-mesothelin interaction and implications for treatment." Expert Review of Anticancer Therapy **18**(2): 177-186.
- Comamala, M., M. Pinard, C. Thériault, I. Matte, A. Albert, M. Boivin, J. Beaudin, A. Piché and C. Rancourt (2011). "Downregulation of cell surface CA125/MUC16 induces epithelial-to-mesenchymal transition and restores EGFR signalling in NIH:OVCAR3 ovarian carcinoma cells." British Journal Of Cancer **104**: 989.
- Corfield, A. P. (2015). "Mucins: A biologically relevant glycan barrier in mucosal protection." Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects **1850**(1): 236-252.
- Cotton, S., R. Azevedo, C. Gaiteiro, D. Ferreira, L. Lima, A. Peixoto, E. Fernandes, M. Neves, D. Neves, T. Amaro, R. Cruz, A. Tavares, M. Rangel, A. M. N. Silva, L. L. Santos and J. A. Ferreira (2017). "Targeted O-glycoproteomics explored increased sialylation and identified MUC16 as a poor prognosis biomarker in advanced-stage bladder tumours." Molecular Oncology **11**(8): 895-912.
- Chaurasiya, S. and M. M. Hitt (2016). 4 - Adenoviral Vector Construction I: Mammalian Systems. Adenoviral Vectors for Gene Therapy (Second Edition). D. T. Curiel. San Diego, Academic Press: 85-112.
- Chen, S.-H., W.-C. Hung, P. Wang, C. Paul and K. Konstantopoulos (2013). "Mesothelin Binding to CA125/MUC16 Promotes Pancreatic Cancer Cell Motility and Invasion via MMP-7 Activation." Scientific Reports **3**(1): 1870.
- Chen, S.-H., W.-C. Hung, P. Wang, C. Paul and K. Konstantopoulos (2013). "Mesothelin Binding to CA125/MUC16 Promotes Pancreatic Cancer Cell Motility and Invasion via MMP-7 Activation." Scientific Reports **3**: 1870.
- Chen, S. H., M. R. Dallas, E. M. Balzer and K. Konstantopoulos (2012). "Mucin 16 is a functional selectin ligand on pancreatic cancer cells." Faseb J **26**(3): 1349-1359.
- Chiang, C. L.-L., L. E. Kandalaf, J. Tanyi, A. R. Hagemann, G. T. Motz, N. Svoronos, K. Montone, G. M. Mantia-Smaldone, L. Smith, H. L. Nisenbaum, B. L. Levine, M. Kalos, B. J. Czerniecki, D. A. Torigian, D. J. Powell, R. Mick and G. Coukos (2013). "A Dendritic Cell Vaccine Pulsed with Autologous Hypochlorous Acid-Oxidized Ovarian Cancer Lysate Primes Effective Broad Antitumor Immunity: From Bench to Bedside." Clinical Cancer Research **19**(17): 4801-4815.
- Das, S. and S. K. Batra (2015). "Understanding the Unique Attributes of MUC16 (CA125): Potential Implications in Targeted Therapy." Cancer Research **75**(22): 4669-4674.
- Das, S., P. D. Majhi, M. H. Al-Mugotir, S. Rachagani, P. Sorgen and S. K. Batra (2015). "Membrane proximal ectodomain cleavage of MUC16 occurs in the acidifying Golgi/post-Golgi compartments." Scientific Reports **5**: 9759.
- Das, S., S. Rachagani, M. P. Torres-Gonzalez, I. Lakshmanan, P. D. Majhi, L. M. Smith, K.-U. Wagner and S. K. Batra (2015). "Carboxyl-terminal domain of MUC16 imparts tumorigenic and metastatic functions through nuclear translocation of JAK2 to pancreatic cancer cells." Oncotarget **6**(8).

- Deisseroth, A., Y. Tang, L. Zhang, H. Akbulut and N. Habib (2013). "TAA/ecdCD40L adenoviral prime-protein boost vaccine for cancer and infectious diseases." Cancer Gene Therapy **20**(2): 65-69.
- Denfeld, R. W., D. Hollenbaugh, A. Fehrenbach, J. M. Weiss, A. von Leoprechting, B. Mai, U. Voith, E. Schöpf, A. Aruffo and J. C. Simon (1996). "CD40 is functionally expressed on human keratinocytes." European Journal of Immunology **26**(10): 2329-2334.
- Diamond, M. S., M. Kinder, H. Matsushita, M. Mashayekhi, G. P. Dunn, J. M. Archambault, H. Lee, C. D. Arthur, J. M. White, U. Kalinke, K. M. Murphy and R. D. Schreiber (2011). "Type I interferon is selectively required by dendritic cells for immune rejection of tumors." The Journal of Experimental Medicine **208**(10): 1989.
- Dickgreber, N., P. Stoitzner, Y. Bai, K. M. Price, K. J. Farrand, K. Manning, C. E. Angel, P. R. Dunbar, F. Ronchese, J. D. Fraser, B. T. Bäckström and I. F. Hermans (2009). "Targeting Antigen to MHC Class II Molecules Promotes Efficient Cross-Presentation and Enhances Immunotherapy." The Journal of Immunology **182**(3): 1260.
- Dienz, O. and M. Rincon (2009). "The effects of IL-6 on CD4 T cell responses." Clinical Immunology **130**(1): 27-33.
- Dochez, V., H. Caillon, E. Vaucel, J. Dimet, N. Winer and G. Ducarme (2019). "Biomarkers and algorithms for diagnosis of ovarian cancer: CA125, HE4, RMI and ROMA, a review." Journal of Ovarian Research **12**(1): 28.
- Dudley, M. E., J. R. Wunderlich, T. E. Shelton, J. Even and S. A. Rosenberg (2003). "Generation of tumor-infiltrating lymphocyte cultures for use in adoptive transfer therapy for melanoma patients." Journal of immunotherapy (Hagerstown, Md. : 1997) **26**(4): 332-342.
- Dunn, G. P., A. T. Bruce, H. Ikeda, L. J. Old and R. D. Schreiber (2002). "Cancer immunoediting: from immunosurveillance to tumor escape." Nature Immunology **3**(11): 991-998.
- Dunn, G. P., L. J. Old and R. D. Schreiber (2004). "The Immunobiology of Cancer Immunosurveillance and Immunoediting." Immunity **21**(2): 137-148.
- Dunn, G. P., L. J. Old and R. D. Schreiber (2004). "The Three Es of Cancer Immunoediting." Annual Review of Immunology **22**(1): 329-360.
- Ehlen, T. G., P. J. Hoskins, D. Miller, T. L. Whiteside, C. F. Nicodemus, B. C. Schultes and K. D. Swenerton (2005). "A pilot phase 2 study of oregovomab murine monoclonal antibody to CA125 as an immunotherapeutic agent for recurrent ovarian cancer." International Journal of Gynecological Cancer **15**(6): 1023-1034.
- Ehrlich, P. (1909). "Ueber den jetzigen Stand der Karzinomforschung." Ned Tijdschr Geneesk **5**: 273-290.
- Elgueta, R., M. J. Benson, V. C. De Vries, A. Wasiuk, Y. Guo and R. J. Noelle (2009). "Molecular mechanism and function of CD40/CD40L engagement in the immune system." Immunological Reviews **229**(1): 152-172.

- Eyler, C. E. and J. N. Rich (2008). "Survival of the Fittest: Cancer Stem Cells in Therapeutic Resistance and Angiogenesis." Journal of Clinical Oncology **26**(17): 2839-2845.
- Felder, M., A. Kapur, J. Gonzalez-Bosquet, S. Horibata, J. Heintz, R. Albrecht, L. Fass, J. Kaur, K. Hu, H. Shojaei, R. J. Whelan and M. S. Patankar (2014). "MUC16 (CA125): tumor biomarker to cancer therapy, a work in progress." Molecular Cancer **13**(1): 129.
- Felder, M., A. Kapur, J. Gonzalez-Bosquet, S. Horibata, J. Heintz, R. Albrecht, L. Fass, J. Kaur, K. Hu, H. Shojaei, R. J. Whelan and M. S. Patankar (2014). "MUC16 (CA125): tumor biomarker to cancer therapy, a work in progress." Molecular Cancer **13**: 129-129.
- Fendrick, J. L., K. A. Staley, M. K. Gee, S. R. McDougald, J. J. G. Quirk and B. T. J. O (1993). "Characterization of CA 125 Synthesized by the Human Epithelial Amnion WISH Cell Line." Tumor Biology **14**(5): 310-318.
- Ferlay, J., I. Soerjomataram, R. Dikshit, S. Eser, C. Mathers, M. Rebelo, D. M. Parkin, D. Forman and F. Bray (2015). "Cancer incidence and mortality worldwide: Sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012." International Journal of Cancer **136**(5): E359-E386.
- Fortner, R. T., A. Damms-Machado and R. Kaaks (2017). "Systematic review: Tumor-associated antigen autoantibodies and ovarian cancer early detection." Gynecologic Oncology **147**(2): 465-480.
- Frenkel, E. S. and K. Ribbeck (2015). "Salivary mucins in host defense and disease prevention." Journal of Oral Microbiology **7**(1): 29759.
- Frey, A., K. T. Giannasca, R. Weltzin, P. J. Giannasca, H. Reggio, W. I. Lencer and M. R. Neutra (1996). "Role of the glycocalyx in regulating access of microparticles to apical plasma membranes of intestinal epithelial cells: implications for microbial attachment and oral vaccine targeting." The Journal of Experimental Medicine **184**(3): 1045.
- Fuertes, M. B., A. K. Kacha, J. Kline, S.-R. Woo, D. M. Kranz, K. M. Murphy and T. F. Gajewski (2011). "Host type I IFN signals are required for antitumor CD8⁺ T cell responses through CD8^α+ dendritic cells." The Journal of Experimental Medicine **208**(10): 2005-2016.
- Gallegos, A. M. and M. J. Bevan (2006). "Central tolerance: good but imperfect." Immunological Reviews **209**(1): 290-296.
- Gasparri, M. L., I. Ruscito, K. Taghavi, A. A. Farooqi, A. Papadia, C. Focaccetti, V. Barnaba, P. B. Panici and M. D. Mueller (2017). The Immunobiology of Cancer: From Tumor Escape to Cancer Immunoediting Towards Immunotherapy in Gynecologic Oncology. Molecular Oncology: Underlying Mechanisms and Translational Advancements. A. A. Farooqi and M. Ismail. Cham, Springer International Publishing: 193-204.
- Gerosa, F., B. Baldani-Guerra, C. Nisii, V. Marchesini, G. Carra and G. Trinchieri (2002). "Reciprocal Activating Interaction between Natural Killer Cells and Dendritic Cells." Journal of Experimental Medicine **195**(3): 327-333.
- Gipson, I. K. (2005). "Human endocervical mucins." Ernst Schering Res Found Workshop **52**: 219-244.

- Gipson, I. K., T. Blalock, A. Tisdale, S. Spurr-Michaud, S. Allcorn, A. Stavreus-Evers and K. Gemzell (2008). "MUC16 Is Lost from the Uterodome (Pinopode) Surface of the Receptive Human Endometrium: In Vitro Evidence That MUC16 Is a Barrier to Trophoblast Adherence1." Biology of Reproduction **78**(1): 134-142.
- Gipson, I. K., S. Spurr-Michaud, A. Tisdale and B. B. Menon (2014). "Comparison of the Transmembrane Mucins MUC1 and MUC16 in Epithelial Barrier Function." PLOS ONE **9**(6): e100393.
- Godefroy, E., A. Moreau-Aubry, E. Diez, B. Dreno, F. Jotereau and Y. Guilloux (2005). "alpha v beta3-dependent cross-presentation of matrix metalloproteinase-2 by melanoma cells gives rise to a new tumor antigen." The Journal of Experimental Medicine **202**(1): 61-72.
- Govindarajan, B. and I. K. Gipson (2010). "Membrane-tethered mucins have multiple functions on the ocular surface." Experimental Eye Research **90**(6): 655-663.
- Graf, C., F. Heidel, S. Tenzer, M. P. Radsak, F. K. Solem, C. M. Britten, C. Huber, T. Fischer and T. Wölfel (2007). "A neoepitope generated by an FLT3 internal tandem duplication (FLT3-ITD) is recognized by leukemia-reactive autologous CD8⁺ T cells." Blood **109**(7): 2985.
- Graham, F. L. and L. Prevec (1995). "METHODS FOR CONSTRUCTION OF ADENOVIRUS VECTORS." Molecular Biotechnology **3**(3): 207-220.
- Graham, F. L., J. Smiley, W. C. Russell and R. Nairn (1977). "Characteristics of a Human Cell Line Transformed by DNA from Human Adenovirus Type 5." Journal of General Virology **36**(1): 59-72.
- Grammer, A. C., M. C. Bergman, Y. Miura, K. Fujita, L. S. Davis and P. E. Lipsky (1995). "The CD40 ligand expressed by human B cells costimulates B cell responses." The Journal of Immunology **154**(10): 4996.
- Greenberg, P. D. and J. L. Zieyler (1991). Cancer and Clinical Immunology. Basic and Clinical Immunology Seventh edition. D. P. Stites and A. I. Terr. New Jersey, Lance Med. Publication: 599.
- Gubbels, J. A., J. Belisle, M. Onda, C. Rancourt, M. Migneault, M. Ho, T. K. Bera, J. Connor, B. K. Sathyanarayana, B. Lee, I. Pastan and M. S. Patankar (2006). "Mesothelin-MUC16 binding is a high affinity, N-glycan dependent interaction that facilitates peritoneal metastasis of ovarian tumors." Molecular Cancer **5**(1): 50.
- Gubbels, J. A., M. Felder, S. Horibata, J. A. Belisle, A. Kapur, H. Holden, S. Petrie, M. Migneault, C. Rancourt, J. P. Connor and M. S. Patankar (2010). "MUC16 provides immune protection by inhibiting synapse formation between NK and ovarian tumor cells." Mol Cancer **9**(11): 1476-4598.
- Gückel, B., M. Lindauer, W. Rudy, A. Habicht, M. Siebels, S. Kaul, G. Bastert, S. C. Meuer and U. Moebius (1995). "CD80-transfected human breast and ovarian tumor cell lines: improved immunogenicity and induction of cytolytic CD8+ T lymphocytes." Cytokines Mol Ther **1**(3): 211-221.
- Hanahan, D. and R. A. Weinberg (2000). "The Hallmarks of Cancer." Cell **100**(1): 57-70.

- Hanahan, D. and Robert A. Weinberg (2011). "Hallmarks of Cancer: The Next Generation." Cell **144**(5): 646-674.
- Haridas, D., M. P. Ponnusamy, S. Chugh, I. Lakshmanan, P. Seshacharyulu and S. K. Batra (2014). "MUC16: molecular analysis and its functional implications in benign and malignant conditions." FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology **28**(10): 4183-4199.
- Hattrup, C. L. and S. J. Gendler (2008). "Structure and Function of the Cell Surface (Tethered) Mucins." Annual Review of Physiology **70**(1): 431-457.
- Häuselmann, I. and L. Borsig (2014). "Altered Tumor-Cell Glycosylation Promotes Metastasis." Frontiers in Oncology **4**: 28.
- Higashi, M., N. Yamada, S. Yokoyama, S. Kitamoto, K. Tabata, C. Koriyama, S. Batra and S. Yonezawa (2012). "Pathobiological Implications of MUC16/CA125 Expression in Intrahepatic Cholangiocarcinoma-Mass Forming Type." Pathobiology **79**(2): 101-106.
- Hinck, A. P. (2012). "Structural studies of the TGF- β s and their receptors – insights into evolution of the TGF- β superfamily." FEBS Letters **586**(14): 1860-1870.
- Hodge-Dufour, J., P. W. Noble, M. R. Horton, C. Bao, M. Wysoka, M. D. Burdick, R. M. Strieter, G. Trinchieri and E. Puré (1997). "Induction of IL-12 and chemokines by hyaluronan requires adhesion-dependent priming of resident but not elicited macrophages." The Journal of Immunology **159**(5): 2492-2500.
- Hollenbaugh, D., N. Mischel-Petty, C. P. Edwards, J. C. Simon, R. W. Denfeld, P. A. Kiener and A. Aruffo (1995). "Expression of functional CD40 by vascular endothelial cells." The Journal of Experimental Medicine **182**(1): 33.
- Hollingsworth, M. A. and B. J. Swanson (2004). "Mucins in cancer: Protection and control of the cell surface." Nature Reviews Cancer **4**(1): 45-60.
- Hoshino, I., M. Nagata, N. Takiguchi, Y. Nabeya, A. Ikeda, S. Yokoi, A. Kuwajima, M. Tagawa, K. Matsushita, Y. Satoshi and S. Hideaki (2017). "Panel of autoantibodies against multiple tumor-associated antigens for detecting gastric cancer." Cancer Science **108**(3): 308-315.
- Hsu, Y.-L., C.-Y. Wu, J.-Y. Hung, Y.-S. Lin, M.-S. Huang and P.-L. Kuo (2013). "Galectin-1 promotes lung cancer tumor metastasis by potentiating integrin $\alpha 6\beta 4$ and Notch1/Jagged2 signaling pathway." Carcinogenesis **34**(6): 1370-1381.
- Huang, A., P. Golumbek, M. Ahmadzadeh, E. Jaffee, D. Pardoll and H. Levitsky (1994). "Role of bone marrow-derived cells in presenting MHC class I-restricted tumor antigens." Science **264**(5161): 961-965.
- Huang, M., J. Wang, P. Lee, S. Sharma, J. T. Mao, H. Meissner, K. Uyemura, R. Modlin, J. Wollman and S. M. Dubinett (1995). "Human Non-Small Cell Lung Cancer Cells Express a Type 2 Cytokine Pattern." Cancer Research **55**(17): 3847-3853.
- Kabawat, S. E., R. C. Bast, W. R. Welch, R. C. Knapp and R. B. Colvin (1983). "Immunopathologic Characterization of a Monoclonal Antibody that Recognizes Common Surface Antigens of Human Ovarian Tumors of Serous, Endometrioid, and Clear Cell Types." American Journal of Clinical Pathology **79**(1): 98-104.

- Kesimer, M., M. Scull, B. Brighton, G. DeMaria, K. Burns, W. O'Neal, R. J. Pickles and J. K. Sheehan (2009). "Characterization of exosome-like vesicles released from human tracheobronchial ciliated epithelium: a possible role in innate defense." The FASEB Journal **23**(6): 1858-1868.
- Khong, H. T. and N. P. Restifo (2002). "Natural selection of tumor variants in the generation of "tumor escape" phenotypes." Nature Immunology **3**(11): 999-1005.
- Kim, J.-S., S.-H. Lee, Y.-S. Cho, Y. H. Kim and J.-H. Lee (2001). "Ectopic Expression of the Coxsackievirus and Adenovirus Receptor Increases Susceptibility to Adenoviral Infection in the Human Cervical Cancer Cell Line, SiHa." Biochemical and Biophysical Research Communications **288**(1): 240-244.
- Kim, N., Y. Hong, D. Kwon and S. Yoon (2013). "Somatic Mutaome Profile in Human Cancer Tissues." Genomics Inform **11**(4): 239-244.
- Kinlough, C. L., P. A. Poland, S. J. Gendler, P. E. Mattila, D. Mo, O. A. Weisz and R. P. Hughey (2011). "Core-glycosylated Mucin-like Repeats from MUC1 Are an Apical Targeting Signal." Journal of Biological Chemistry **286**(45): 39072-39081.
- Kleef, R., W. B. Jonas, W. Knogler and W. Stenzinger (2001). "Fever, Cancer Incidence and Spontaneous Remissions." Neuroimmunomodulation **9**(2): 55-64.
- Knowles, M. R. and R. C. Boucher (2002). "Mucus clearance as a primary innate defense mechanism for mammalian airways." The Journal of Clinical Investigation **109**(5): 571-577.
- Konishi, I., J. L. Fendrick, T. H. Parmley, J. G. Quirk, Jr. and T. J. O'Brien (1994). "Epidermal growth factor enhances secretion of the ovarian tumor-associated cancer antigen CA125 from the human amnion WISH cell line." J Soc Gynecol Investig **1**(1): 89-96.
- Krieg, A. M. (2003). "CpG motifs: the active ingredient in bacterial extracts?" Nature Medicine **9**(7): 831-835.
- Kui Wong, N., R. L. Easton, M. Panico, M. Sutton-Smith, J. C. Morrison, F. A. Lattanzio, H. R. Morris, G. F. Clark, A. Dell and M. S. Patankar (2003). "Characterization of the Oligosaccharides Associated with the Human Ovarian Tumor Marker CA125." Journal of Biological Chemistry **278**(31): 28619-28634.
- Kumar, A., M. Commane, T. W. Flickinger, C. M. Horvath and G. R. Stark (1997). "Defective TNF- α -Induced Apoptosis in STAT1-Null Cells Due to Low Constitutive Levels of Caspases." Science **278**(5343): 1630-1632.
- Kyewski, B. and L. Klein (2006). "A CENTRAL ROLE FOR CENTRAL TOLERANCE." Annual Review of Immunology **24**(1): 571-606.
- Lakshmanan, I., M. P. Ponnusamy, S. Das, S. Chakraborty, D. Haridas, P. Mukhopadhyay, S. M. Lele and S. K. Batra (2012). "MUC16 induced rapid G2/M transition via interactions with JAK2 for increased proliferation and anti-apoptosis in breast cancer cells." Oncogene **31**(7): 805-817.
- Lakshmanan, I., S. Rachagani, R. Hauke, S. R. Krishn, S. Paknikar, P. Seshacharyulu, S. Karmakar, R. K. Nimmakayala, G. Kaushik, S. L. Johansson, G. B. Carey, M. P. Ponnusamy, S. Kaur, S. K. Batra and A. K. Ganti (2016). "MUC5AC interactions with integrin β 4 enhances the migration of lung cancer cells through FAK signaling." Oncogene **35**(31): 4112-4121.

- Lakshmanan, I., P. Seshacharyulu, D. Haridas, S. Rachagani, S. Gupta, S. Joshi, C. Guda, Y. Yan, M. Jain, A. K. Ganti, M. P. Ponnusamy and S. K. Batra (2015). "Novel HER3/MUC4 oncogenic signaling aggravates the tumorigenic phenotypes of pancreatic cancer cells." Oncotarget; Vol 6, No 25.
- Lamblin, G., S. Degroote, J.-M. Perini, P. Delmotte, A. Scharfman, M. Davril, J.-M. Lo-Guidice, N. Houdret, V. Dumur, A. Klein and P. Rousse (2001). "Human airway mucin glycosylation: A combinatorial of carbohydrate determinants which vary in cystic fibrosis." Glycoconjugate Journal **18**(9): 661-684.
- Lee, J.-W., M. Epardaud, J. Sun, J. E. Becker, A. C. Cheng, A.-r. Yonekura, J. K. Heath and S. J. Turley (2006). "Peripheral antigen display by lymph node stroma promotes T cell tolerance to intestinal self." Nature Immunology **8**: 181.
- Lee, J.-W., M. Epardaud, J. Sun, J. E. Becker, A. C. Cheng, A.-r. Yonekura, J. K. Heath and S. J. Turley (2007). "Peripheral antigen display by lymph node stroma promotes T cell tolerance to intestinal self." Nature Immunology **8**(2): 181-190.
- Levitin, F., O. Stern, M. Weiss, C. Gil-Henn, R. Ziv, Z. Prokocimer, N. I. Smorodinsky, D. B. Rubinstein and D. H. Wreschner (2005). "The MUC1 SEA Module Is a Self-cleaving Domain." Journal of Biological Chemistry **280**(39): 33374-33386.
- Liu, B., J. Nash, C. Runowicz, H. Swede, R. Stevens and Z. Li (2010). "Ovarian cancer immunotherapy: opportunities, progresses and challenges." Journal of hematology & oncology **3**: 7-7.
- Loeb, L. A. (1991). "Mutator Phenotype May Be Required for Multistage Carcinogenesis." Cancer Research **51**(12): 3075-3079.
- Loeb, L. A. and F. C. Christians (1996). "Multiple mutations in human cancers." Mutation Research-Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis **350**(1): 279-286.
- Lucey, D. R., M. Clerici and G. M. Shearer (1996). "Type 1 and type 2 cytokine dysregulation in human infectious, neoplastic, and inflammatory diseases." Clinical Microbiology Reviews **9**(4): 532-562.
- Macdonald, J. S. (1999). "Carcinoembryonic antigen screening: pros and cons." Seminars in oncology **26**(5): 556-560.
- MacKie, R. M., R. Reid and B. Junor (2003). "Fatal Melanoma Transferred in a Donated Kidney 16 Years after Melanoma Surgery." New England Journal of Medicine **348**(6): 567-568.
- Madsen, C. B., K. Lavrsen, C. Steentoft, M. B. Vester-Christensen, H. Clausen, H. H. Wandall and A. E. Pedersen (2013). "Glycan Elongation Beyond the Mucin Associated Tn Antigen Protects Tumor Cells from Immune-Mediated Killing." PLOS ONE **8**(9): e72413.
- Malmberg, K.-J. (2004). "Effective immunotherapy against cancer." Cancer Immunology, Immunotherapy **53**(10): 879-892.
- Marcos-Silva, L., S. Ricardo, K. Chen, O. Blixt, E. Arigi, D. Pereira, E. Høgdall, U. Mandel, E. P. Bennett, S. Y. Vakhrushev, L. David and H. Clausen (2015). "A novel monoclonal antibody to a defined peptide epitope in MUC16." Glycobiology **25**(11): 1172-1182.

- Marrogi, A. J., A. Munshi, A. J. Merogi, Y. Ohadike, A. El-Habashi, O. L. Marrogi and S. M. Freeman (1997). "Study of tumor infiltrating lymphocytes and transforming growth factor- β as prognostic factors in breast carcinoma." International Journal of Cancer **74**(5): 492-501.
- Matte, I., D. Lane, M. Boivin, C. Rancourt and A. Piche (2014). "MUC16 mucin (CA125) attenuates TRAIL-induced apoptosis by decreasing TRAIL receptor R2 expression and increasing c-FLIP expression." BMC Cancer **14**(234): 1471-2407.
- Matzinger, P. (1994). "Tolerance, Danger, and the Extended Family." Annual Review of Immunology **12**(1): 991-1045.
- Mazzei, G. J., M. D. Edgerton, C. Losberger, S. Lecoanet-Henchoz, P. Graber, A. Durandy, J.-F. Gauchat, A. Bernard, B. Allet and J.-Y. Bonnefoy (1995). "Recombinant Soluble Trimeric CD40 Ligand Is Biologically Active." Journal of Biological Chemistry **270**(13): 7025-7028.
- McDonald, D. M., S. N. Byrne and R. J. Payne (2015). "Synthetic self-adjuvanting glycopeptide cancer vaccines." Frontiers in Chemistry **3**(60).
- Mittal, S. K., M. R. McDermott, D. C. Johnson, L. Prevec and F. L. Graham (1993). "Monitoring foreign gene expression by a human adenovirus-based vector using the firefly luciferase gene as a reporter." Virus Research **28**(1): 67-90.
- Monjazeb, A. M., H.-H. Hsiao, G. D. Sckisel and W. J. Murphy (2012). "The role of antigen-specific and non-specific immunotherapy in the treatment of cancer." Journal of Immunotoxicology **9**(3): 248-258.
- Moore, R. G., S. MacLaughlan and R. C. Bast, Jr. (2010). "Current state of biomarker development for clinical application in epithelial ovarian cancer." Gynecologic Oncology **116**(2): 240-245.
- Morath, C., M. Mueller, H. Goldschmidt, V. Schwenger, G. Opelz and M. Zeier (2004). "Malignancy in Renal Transplantation." Journal of the American Society of Nephrology **15**(6): 1582-1588.
- Mosmann, T. R. and R. L. Coffman (1989). Heterogeneity of Cytokine Secretion Patterns and Functions of Helper T Cells. Advances in Immunology. F. J. Dixon, Academic Press. **46**: 111-147.
- Myron Kauffman, H., M. A. McBride, W. S. Cherikh, P. C. Spain, W. H. Marks and A. M. Roza (2002). "Transplant tumor registry: donor related malignancies." Transplantation **74**(3): 358-362.
- NationalCancerInstitute. (2015, 9 february 2015). "What Is Cancer?", from <https://www.cancer.gov/about-cancer/understanding/what-is-cancer>.
- Nauts, H. C. and J. R. McLaren (1990). Coley Toxins — The First Century. Consensus on Hyperthermia for the 1990s: Clinical Practice in Cancer Treatment. H. I. Bicher, J. R. McLaren and G. M. Pigliucci. Boston, MA, Springer US: 483-500.
- Niakan, B. (1998). "A Mechanism of the Spontaneous Remission and Regression of Cancer." Cancer Biotherapy and Radiopharmaceuticals **13**(3): 209-210.
- Nichols, L. A., Y. Chen, T. A. Colella, C. L. Bennett, B. E. Clausen and V. H. Engelhard (2007). "Deletional Self-Tolerance to a Melanocyte/Melanoma Antigen Derived from Tyrosinase Is Mediated by a Radio-Resistant Cell in Peripheral and Mesenteric Lymph Nodes." The Journal of Immunology **179**(2): 993-1003.

- Nustad, K., Y. Lebedin, K. O. Lloyd, K. Shigemasa, H. W. de Bruijn, B. Jansson, O. Nilsson, K. H. Olsen and T. J. O'Brien (2002). "Epitopes on CA 125 from cervical mucus and ascites fluid and characterization of six new antibodies. Third report from the ISOBM TD-1 workshop." *Tumour Biol* **23**(5): 303-314.
- O'Brien, T. J., J. B. Beard, L. J. Underwood, R. A. Dennis, A. D. Santin and L. York (2001). "The CA 125 gene: an extracellular superstructure dominated by repeat sequences." *Tumour Biol* **22**(6): 348-366.
- O'Brien, T. J., J. B. Beard, L. J. Underwood and K. Shigemasa (2002). "The CA 125 gene: a newly discovered extension of the glycosylated N-terminal domain doubles the size of this extracellular superstructure." *Tumour Biol* **23**(3): 154-169.
- O'Brien, T. J., J. W. Hardin, G. A. Bannon, J. S. Norris and G. Quirk (1986). "CA 125 antigen in human amniotic fluid and fetal membranes." *American Journal of Obstetrics and Gynecology* **155**(1): 50-55.
- O'Garra, A. and N. Arai (2000). "The molecular basis of T helper 1 and T helper 2 cell differentiation." *Trends in Cell Biology* **10**(12): 542-550.
- Old, L. J. and E. A. Boyse (1964). "Immunology of Experimental Tumors." *Annual Review of Medicine* **15**(1): 167-186.
- Osorio, L. M., C. Ordonez, C. A. Garcia, M. Jondal and S. C. Chow (1995). "Evidence for Protein Tyrosine Kinase Involvement in CD6-Induced T Cell Proliferation." *Cellular Immunology* **166**(1): 44-52.
- Paijens, S. T., N. Leffers, T. Daemen, W. Helfrich, H. M. Boezen, B. J. Cohlen, C. J. M. Melief, M. de Bruyn and H. W. Nijman (2018). "Antigen-specific active immunotherapy for ovarian cancer." *Cochrane Database of Systematic Reviews*(9).
- Patankar, M. S., Y. Jing, J. C. Morrison, J. A. Belisle, F. A. Lattanzio, Y. Deng, N. K. Wong, H. R. Morris, A. Dell and G. F. Clark (2005). "Potent suppression of natural killer cell response mediated by the ovarian tumor marker CA125." *Gynecologic Oncology* **99**(3): 704-713.
- Patel, A., H. L. Kaufman and M. L. Disis (2017). "Next generation approaches for tumor vaccination." *Chinese Clinical Oncology* **6**(2): 6.
- Peracaula, R., G. Tabarés, L. Royle, D. J. Harvey, R. A. Dwek, P. M. Rudd and R. de Llorens (2003). "Altered glycosylation pattern allows the distinction between prostate-specific antigen (PSA) from normal and tumor origins." *Glycobiology* **13**(6): 457-470.
- Perez-Vilar, J. and R. L. Hill (1999). "The Structure and Assembly of Secreted Mucins." *Journal of Biological Chemistry* **274**(45): 31751-31754.
- Perisetti, A., M. Bellamkonda, M. Konda, S. Edwards, S. Ali Khan, P. Bansal, Z.-D. Hu and H. Goyal (2020). "Tumor-associated antigens and their antibodies in the screening, diagnosis, and monitoring of esophageal cancers." *European Journal of Gastroenterology & Hepatology* **32**(7).
- Pham, S. M., R. L. Kormos, R. J. Landreneau, A. Kawai, I. Gonzalez-Cancel, R. L. Hardesty, B. G. Hattler and B. P. Griffith (1995). "Solid tumors after heart transplantation: Lethality of lung cancer." *The Annals of Thoracic Surgery* **60**(6): 1623-1626.

- Pinchuk, L. M., S. J. Klaus, D. M. Magaletti, G. V. Pinchuk, J. P. Norsen and E. A. Clark (1996). "Functional CD40 ligand expressed by human blood dendritic cells is up-regulated by CD40 ligation." The Journal of Immunology **157**(10): 4363.
- Pose, A. G., J. N. Gómez, A. V. Sánchez, A. V. Redondo, E. R. Rodríguez, R. M. Seguí, E. M. G. Ramos, M. P. R. Moltó, E. S. Rodríguez, L. R. Cordero, A. R. Mallón and C. B. Nordelo (2011). "Subunit influenza vaccine candidate based on CD154 fused to HAH5 increases the antibody titers and cellular immune response in chickens." Veterinary Microbiology **152**(3): 328-337.
- Probst-Kepper, M., V. Stroobant, R. Kridel, B. Gaugler, C. Landry, F. Brasseur, J.-P. Cosyns, B. Weynand, T. Boon and B. J. Van den Eynde (2001). "An Alternative Open Reading Frame of the Human Macrophage Colony-Stimulating Factor Gene Is Independently Translated and Codes for an Antigenic Peptide of 14 Amino Acids Recognized by Tumor-Infiltrating Cd8 T Lymphocytes." The Journal of Experimental Medicine **193**(10): 1189.
- Qin, Z. and T. Blankenstein (2000). "CD4⁺ T Cell-Mediated Tumor Rejection Involves Inhibition of Angiogenesis that Is Dependent on IFN γ Receptor Expression by Nonhematopoietic Cells." Immunity **12**(6): 677-686.
- Radoja, S., T. D. Rao, D. Hillman and A. B. Frey (2000). "Mice Bearing Late-Stage Tumors Have Normal Functional Systemic T Cell Responses In Vitro and In Vivo." The Journal of Immunology **164**(5): 2619-2628.
- Rao, T. D., H. Tian, X. Ma, X. Yan, S. Thapi, N. Schultz, N. Rosales, S. Monette, A. Wang, D. M. Hyman, D. A. Levine, D. Solit and D. R. Spriggs (2015). "Expression of the Carboxy-Terminal Portion of MUC16/CA125 Induces Transformation and Tumor Invasion." PLOS ONE **10**(5): e0126633.
- Redmond, W. L. and L. A. Sherman (2005). "Peripheral Tolerance of CD8 T Lymphocytes." Immunity **22**(3): 275-284.
- Reinartz, S., S. Failer, T. Schuell and U. Wagner (2012). "CA125 (MUC16) gene silencing suppresses growth properties of ovarian and breast cancer cells." European Journal of Cancer **48**(10): 1558-1569.
- Reinartz, S., S. Köhler, H. Schlebusch, K. Krista, P. Giffels, K. Renke, J. Huober, V. Möbus, R. Kreienberg, A. duBois, P. Sabbatini and U. Wagner (2004). "Vaccination of Patients with Advanced Ovarian Carcinoma with the Anti-Idiotypic ACA125." Immunological Response and Survival (Phase Ib/II) **10**(5): 1580-1587.
- Rhodes, J. M. (1999). "Usefulness of novel tumour markers." Ann Oncol **4**: 118-121.
- Richardson, M. A., T. Ramirez, N. C. Russell and L. A. Moyer (1999). "Coley toxins immunotherapy: a retrospective review." Altern Ther Health Med **5**(3): 42-47.
- Roberts, A. B. and L. M. Wakefield (2003). "The two faces of transforming growth factor β in carcinogenesis." Proceedings of the National Academy of Sciences **100**(15): 8621-8623.
- Rose, M. C. and J. A. Voynow (2006). "Respiratory Tract Mucin Genes and Mucin Glycoproteins in Health and Disease." Physiological Reviews **86**(1): 245-278.
- Rosenberg, S. A. (1999). "A New Era for Cancer Immunotherapy Based on the Genes that Encode Cancer Antigens." Immunity **10**(3): 281-287.

- Rowse, G. J., R. M. Tempero, M. L. VanLith, M. A. Hollingsworth and S. J. Gendler (1998). "Tolerance and Immunity to MUC1 in a Human MUC1 Transgenic Murine Model." Cancer Research **58**(2): 315-321.
- Rump, A., Y. Morikawa, M. Tanaka, S. Minami, N. Umesaki, M. Takeuchi and A. Miyajima (2004). "Binding of Ovarian Cancer Antigen CA125/MUC16 to Mesothelin Mediates Cell Adhesion." Journal of Biological Chemistry **279**(10): 9190-9198.
- Sabado, R. L., S. Balan and N. Bhardwaj (2017). "Dendritic cell-based immunotherapy." Cell Research **27**(1): 74-95.
- Sallusto, F., C. R. Mackay and A. Lanzavecchia (2000). "The Role of Chemokine Receptors in Primary, Effector, and Memory Immune Responses." Annual Review of Immunology **18**(1): 593-620.
- Sánchez-Paulete, A. R., A. Teijeira, F. J. Cueto, S. Garasa, J. L. Pérez-Gracia, A. Sánchez-Arráez, D. Sancho and I. Melero (2017). "Antigen cross-presentation and T-cell cross-priming in cancer immunology and immunotherapy." Annals of Oncology **28**: xii44-xii55.
- Savelyeva, N., A. Allen, W. Chotprakaikiat, E. Harden, J. Jobsri, R. Godeseth, Y. Wang, F. Stevenson and C. Ottensmeier (2017). Linked CD4 T Cell Help: Broadening Immune Attack Against Cancer by Vaccination. Cancer Vaccines. N. Savelyeva and C. Ottensmeier. Cham, Springer International Publishing: 123-143.
- Schlitzer, A. and F. Ginhoux (2014). "Organization of the mouse and human DC network." Current Opinion in Immunology **26**: 90-99.
- Scholler, N. and N. Urban (2007). "CA125 in ovarian cancer." Biomarkers in Medicine **1**(4): 513-523.
- Schreiber, R. D., L. J. Old, A. C. Hayday and M. J. Smyth (2004). "Response to 'A cancer immunosurveillance controversy'." Nature Immunology **5**(1): 4-5.
- Shankaran, V., H. Ikeda, A. T. Bruce, J. M. White, P. E. Swanson, L. J. Old and R. D. Schreiber (2001). "IFN γ and lymphocytes prevent primary tumour development and shape tumour immunogenicity." Nature **410**(6832): 1107-1111.
- Shimizu, A., S. Hirono, M. Tani, M. Kawai, K.-I. Okada, M. Miyazawa, Y. Kitahata, Y. Nakamura, T. Noda, S. Yokoyama and H. Yamaue (2012). "Coexpression of MUC16 and mesothelin is related to the invasion process in pancreatic ductal adenocarcinoma." Cancer Science **103**(4): 739-746.
- Shojaeian, S., A. H. Zarnani, M. Jeddi-Tehrani, F. Fereidooni, E. Torkabadi, M. M. Akhondi, A. S. Tabatabaei-Panah and A. Allameh (2009). "Heterologous immunization, a way out of the problem of monoclonal antibody production against carcinoma antigen 125." Iran J Immunol **6**(4): 174-185.
- Shojaeian, S., A. H. Zarnani, M. Jeddi-Tehrani, F. Fereidooni, E. Torkabadi, M. M. Akhondi, A. S. Tabatabaei-Panah and A. Allameh (2009). "Heterologous immunization, a way out of the problem of monoclonal antibody production against carcinoma antigen 125." Iranian journal of immunology : IJI **6**(4): 174-185.
- Smyth, M. J., N. Y. Crowe and D. I. Godfrey (2001). "NK cells and NKT cells collaborate in host protection from methylcholanthrene-induced fibrosarcoma." International Immunology **13**(4): 459-463.

- Stanley, P. (2011). "Golgi Glycosylation." Cold Spring Harbor Perspectives in Biology **3**(4).
- Steinman, R. M. (2012). "Decisions About Dendritic Cells: Past, Present, and Future." Annual Review of Immunology **30**(1): 1-22.
- Steinman, R. M. and J. Banchereau (2007). "Taking dendritic cells into medicine." Nature **449**(7161): 419-426.
- Sternlicht, M. D. and Z. Werb (2001). "How matrix metalloproteinases regulate cell behavior." Annual Review of Cell and Developmental Biology **17**: 463-516.
- Stratford-Perricaudet, L. D., I. Makeh, M. Perricaudet and P. Briand (1992). "Widespread long-term gene transfer to mouse skeletal muscles and heart." The Journal of Clinical Investigation **90**(2): 626-630.
- Strausberg, R. L., A. J. G. Simpson, L. J. Old and G. J. Riggins (2004). "Oncogenomics and the development of new cancer therapies." Nature **429**(6990): 469-474.
- Streppel, M. M., A. Vincent, R. Mukherjee, N. R. Campbell, S.-H. Chen, K. Konstantopoulos, M. G. Goggins, I. Van Seuning, A. Maitra and E. A. Montgomery (2012). "Mucin 16 (cancer antigen 125) expression in human tissues and cell lines and correlation with clinical outcome in adenocarcinomas of the pancreas, esophagus, stomach, and colon." Human Pathology **43**(10): 1755-1763.
- Sun, Y., D. Peng, J. Lecanda, V. Schmitz, M. Barajas, C. Qian and J. Prieto (2000). "In vivo gene transfer of CD40 ligand into colon cancer cells induces local production of cytokines and chemokines, tumor eradication and protective antitumor immunity." Gene Therapy **7**(17): 1467-1476.
- Tagliani, E., P. Guermonprez, J. Sepúlveda, M. López-Bravo, C. Ardavin, S. Amigorena, F. Benvenuti and O. R. Burrone (2008). "Selection of an Antibody Library Identifies a Pathway to Induce Immunity by Targeting CD36 on Steady-State CD8 α Dendritic Cells." The Journal of Immunology **180**(5): 3201-3209.
- Taniguchi, T., A. M. Woodward, P. Magnelli, N. M. McColgan, S. Lehoux, S. M. P. Jacobo, J. Mauris and P. Argüeso (2017). "N-Glycosylation affects the stability and barrier function of the MUC16 mucin." Journal of Biological Chemistry **292**(26): 11079-11090.
- Thériault, C., M. Pinard, M. Comamala, M. Migneault, J. Beaudin, I. Matte, M. Boivin, A. Piché and C. Rancourt (2011). "MUC16 (CA125) regulates epithelial ovarian cancer cell growth, tumorigenesis and metastasis." Gynecologic Oncology **121**(3): 434-443.
- Togami, S., M. Nomoto, M. Higashi, M. Goto, S. Yonezawa, T. Tsuji, S. K. Batra and T. Douchi (2010). "Expression of mucin antigens (MUC1 and MUC16) as a prognostic factor for mucinous adenocarcinoma of the uterine cervix." Journal of Obstetrics and Gynaecology Research **36**(3): 588-597.
- Torre, L. A., F. Bray, R. L. Siegel, J. Ferlay, J. Lortet-Tieulent and A. Jemal (2015). "Global cancer statistics, 2012." CA: A Cancer Journal for Clinicians **65**(2): 87-108.

- Torres, M. P., S. Chakraborty, J. Soucek and S. K. Batra (2012). "Mucin-based targeted pancreatic cancer therapy." Current pharmaceutical design **18**(17): 2472-2481.
- Traversari, C., P. van der Bruggen, I. F. Luescher, C. Lurquin, P. Chomez, A. Van Pel, E. De Plaen, A. Amar-Costesec and T. Boon (1992). "A nonapeptide encoded by human gene MAGE-1 is recognized on HLA-A1 by cytolytic T lymphocytes directed against tumor antigen MZ2-E." The Journal of Experimental Medicine **176**(5): 1453-1457.
- Tulchinsky, T. H. (2018). Chapter 19 - Maurice Hilleman: Creator of Vaccines That Changed the World. Case Studies in Public Health. T. H. Tulchinsky, Academic Press: 443-470.
- Tyler, C., A. Kapur, M. Felder, J. A. Belisle, C. Trautman, J. A. A. Gubbels, J. P. Connor and M. S. Patankar (2012). "The Mucin MUC16 (CA125) Binds to NK Cells and Monocytes from Peripheral Blood of Women with Healthy Pregnancy and Preeclampsia." American Journal of Reproductive Immunology **68**(1): 28-37.
- Uhlén, M., L. Fagerberg, B. M. Hallström, C. Lindskog, P. Oksvold, A. Mardinoglu, Å. Sivertsson, C. Kampf, E. Sjöstedt, A. Asplund, I. Olsson, K. Edlund, E. Lundberg, S. Navani, C. A.-K. Szigyanto, J. Odeberg, D. Djureinovic, J. O. Takanen, S. Hober, T. Alm, P.-H. Edqvist, H. Berling, H. Tegel, J. Mulder, J. Rockberg, P. Nilsson, J. M. Schwenk, M. Hamsten, K. von Feilitzen, M. Forsberg, L. Persson, F. Johansson, M. Zwahlen, G. von Heijne, J. Nielsen and F. Pontén (2015). "Tissue-based map of the human proteome." Science **347**(6220): 1260419.
- van den Broeke, L. T., C. D. Pendleton, C. Mackall, L. J. Helman and J. A. Berzofsky (2006). "Identification and Epitope Enhancement of a PAX-FKHR Fusion Protein Breakpoint Epitope in Alveolar Rhabdomyosarcoma Cells Created by a Tumorigenic Chromosomal Translocation Inducing CTL Capable of Lysing Human Tumors." Cancer Research **66**(3): 1818-1823.
- van Kooten, C. and J. Banchereau (2000). "CD40-CD40 ligand." Journal of Leukocyte Biology **67**(1): 2-17.
- Vesely, M. D., M. H. Kershaw, R. D. Schreiber and M. J. Smyth (2011). "Natural Innate and Adaptive Immunity to Cancer." Annual Review of Immunology **29**(1): 235-271.
- Vicari, A. P. and C. Caux (2002). "Chemokines in cancer." Cytokine & Growth Factor Reviews **13**(2): 143-154.
- Wagner, C. E., K. M. Wheeler and K. Ribbeck (2018). "Mucins and Their Role in Shaping the Functions of Mucus Barriers." Annual Review of Cell and Developmental Biology **34**(1): 189-215.
- Wagner, U., H. Schlebusch, S. Kohler, J. Schmolling, U. Grunn and D. Krebs (1997). "Immunological Responses to the Tumor-Associated Antigen CA15 in Patients with Advanced Ovarian Cancer Induced by the Murine Monoclonal Anti-idiotypic Vaccine ACA125." Hybridoma **16**(1): 33-40.
- Wang, R.-F., X. Wang and S. A. Rosenberg (1999). "Identification of a Novel Major Histocompatibility Complex Class II-restricted Tumor Antigen Resulting from a Chromosomal Rearrangement Recognized by

- CD4⁺ T Cells." The Journal of Experimental Medicine **189**(10): 1659.
- Wang, Y., F. Feng, X. Zhao, Z. Ye, H. Zeng, Z. Li, X. Jiang and Z. Peng (2014). "Combined detection tumor markers for diagnosis and prognosis of gallbladder cancer." World J Gastroenterol **20**(14): 4085-4092.
- Wang, Z.-Q., M. Bachvarova, C. Morin, M. Plante, J. Gregoire, M.-C. Renaud, A. Sebastianelli and D. Bachvarov (2014). "Role of the polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase 3 in ovarian cancer progression: possible implications in abnormal mucin O-glycosylation." Oncotarget **5**(2).
- Wculek, S. K., F. J. Cueto, A. M. Mujal, I. Melero, M. F. Krummel and D. Sancho (2020). "Dendritic cells in cancer immunology and immunotherapy." Nature Reviews Immunology **20**(1): 7-24.
- Wei, H., S. Wang, D. Zhang, S. Hou, W. Qian, B. Li, H. Guo, G. Kou, J. He, H. Wang and Y. Guo (2009). "Targeted Delivery of Tumor Antigens to Activated Dendritic Cells via CD11c Molecules Induces Potent Antitumor Immunity in Mice." Clinical Cancer Research **15**(14): 4612.
- Weiland, F., K. Martin, M. K. Oehler and P. Hoffmann (2012). "Deciphering the Molecular Nature of Ovarian Cancer Biomarker CA125." International Journal of Molecular Sciences **13**(8): 10568-10582.
- Wrenshall, L. E., R. B. Stevens, F. B. Cerra and J. L. Platt (1999). "Modulation of macrophage and B cell function by glycosaminoglycans." Journal of Leukocyte Biology **66**(3): 391-400.
- Wu, J. T., T. Miya, J. A. Knight and D. P. Knight (1988). "Improved specificity of the CA 125 enzyme immunoassay for ovarian carcinomas by use of the ratio of CA 125 to carcinoembryonic antigen." Clinical Chemistry **34**(9): 1853.
- Wurz, G. T., C.-J. Kao, M. Wolf and M. W. DeGregorio (2014). "Tecemotide: An antigen-specific cancer immunotherapy." Human Vaccines & Immunotherapeutics **10**(11): 3383-3393.
- Yang, B., J. Jeang, A. Yang, T. C. Wu and C.-F. Hung (2014). "DNA vaccine for cancer immunotherapy." Human Vaccines & Immunotherapeutics **10**(11): 3153-3164.
- Yellin, M. J., S. Winikoff, S. M. Fortune, D. Baum, M. K. Crow, S. Lederman and L. Chess (1995). "Ligation of CD40 on fibroblasts induces CD54 (ICAM-1) and CD106 (VCAM-1) up-regulation and IL-6 production and proliferation." Journal of Leukocyte Biology **58**(2): 209-216.
- Yin, B. W. T., A. Dnistrian and K. O. Lloyd (2002). "Ovarian cancer antigen CA125 is encoded by the MUC16 mucin gene." International Journal of Cancer **98**(5): 737-740.
- Yin, B. W. T. and K. O. Lloyd (2001). "Molecular Cloning of the CA125 Ovarian Cancer Antigen: IDENTIFICATION AS A NEW MUCIN, MUC16." Journal of Biological Chemistry **276**(29): 27371-27375.
- Young, L. S., A. G. Eliopoulos, N. J. Gallagher and C. W. Dawson (1998). "CD40 and epithelial cells: across the great divide." Immunology Today **19**(11): 502-506.
- Yun, S. and B. Peter (2015). "TNF Superfamily Protein-Protein Interactions: Feasibility of Small- Molecule Modulation." Current Drug Targets **16**(4): 393-408.

- Zeier, M., W. Hartschuh, M. Wiesel, T. Lehnert and E. Ritz (2002). "Malignancy after renal transplantation." American Journal of Kidney Diseases **39**(1): e5.1-e5.12.
- Zeimet, A. G., F. A. Offner, E. Müller-Holzner, M. Widschwendter, B. Abendstein, L. C. Fuith, G. Daxenbichler and C. Marth (1998). "Peritoneum and Tissues of the Female Reproductive Tract as Physiological Sources of CA-125." Tumor Biology **19**(4): 275-282.
- Zervos, E., S. Agle, A. G. Freistaedter, G. J. B. Jones and R. L. Roper (2016). "Murine mesothelin: characterization, expression, and inhibition of tumor growth in a murine model of pancreatic cancer." Journal of Experimental & Clinical Cancer Research **35**(1): 39.
- Zhang, Y., H. J. Cao, B. Graf, H. Meekins, T. J. Smith and R. P. Phipps (1998). "Cutting Edge: CD40 Engagement Up-Regulates Cyclooxygenase-2 Expression and Prostaglandin E₂ Production in Human Lung Fibroblasts." The Journal of Immunology **160**(3): 1053.
- Zinkernagel, R. M. and H. Hengartner (2001). "Regulation of the Immune Response by Antigen." Science **293**(5528): 251-253.
- Zivcec, M., D. Safronetz, E. Haddock, H. Feldmann and H. Ebihara (2011). "Validation of assays to monitor immune responses in the Syrian golden hamster (*Mesocricetus auratus*)." Journal of Immunological Methods **368**(1): 24-35.