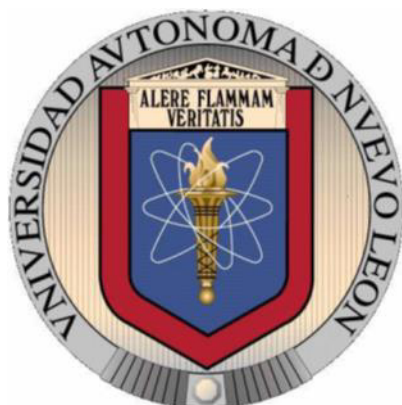


UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



**EFFECTO DE LA TERAPIA AUTÓLOGA CON LINFOCITOS T CD8+
ESTIMULADOS CON ANTÍGENO TUMORAL TOTAL E IL-21 EN
CANINOS CON TUMOR VENÉREO TRANSMISIBLE**

POR

MVZ ALEX JESÚS HERNÁNDEZ GRANADOS

COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO
DE MAESTRÍA EN CIENCIAS CON
ORIENTACIÓN EN INMUNOBIOLOGIA

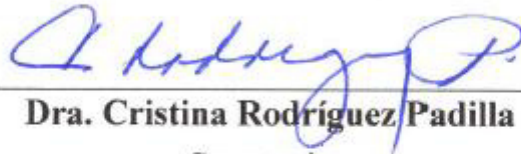
JULIO, 2015

"Efecto de la Terapia Autóloga con Linfocitos T CD8⁺ Estimulados con Antígeno Tumoral Total e IL-21 en caninos con Tumor Venéreo Transmisible"

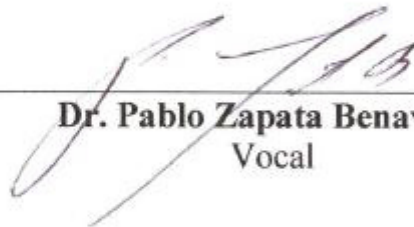
COMITÉ DE TESIS



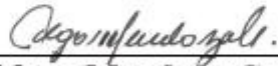
Dr. Moisés A. Franco Molina
Presidente



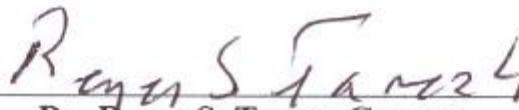
Dra. Cristina Rodríguez Padilla
Secretario



Dr. Pablo Zapata Benavides
Vocal



Dr. Edgar Mendoza Gamboa
Vocal



Dr. Reyes S. Tamez Guerra
Vocal



El presente trabajo fue desarrollado en el Laboratorio de Inmunología y Virología de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León, bajo la dirección de la Dra. Cristina Rodríguez Padilla.

TABLA DE CONTENIDO

Sección	Página
AGRADECIMIENTOS.....	viii
DEDICATORIA.....	ix
LISTA DE TABLAS.....	x
LISTA DE FIGURAS.....	xi
NOMENCLATURA.....	xiii
RESUMEN.....	xv
ABSTRACT.....	xvi
1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. ANTECEDENTES.....	3
2.1 Cáncer.....	3
2.1.1 Clasificación del cáncer.....	5
2.2 Inmunología del cáncer.....	5
2.2.1 Sistema inmune innato y adaptativo en cáncer.....	6
2.3 Linfocitos TCD8 ⁺	8
2.4 Células dendríticas (CD).....	11
2.5 Microambiente tumoral.....	12
2.5.1 Células madre tumorales (CSC).....	13
2.6 Inmunoterapia del cáncer.....	14
2.6.1 Tipos de inmunoterapia.....	15

2.6.2	Estudios de inmunoterapia en pacientes humanos.....	17
2.6.3	Ensayos de inmunoterapia en modelos animales.....	20
2.7	IL-21 y activación de linfocitos T.....	24
2.8	Tumor venéreo transmisible canino (TVT).....	26
2.8.1	Características clínicas y citológicas del TVT.....	29
2.8.2	Origen e inmunogenética del TVT.....	30
2.8.3	Inmunofenotipo del TVT.....	34
2.8.4	Etapas del CTVT: Crecimiento y regresión.....	35
3	HIPÓTESIS.....	38
4	OBJETIVOS.....	39
4.1	Objetivo General.....	39
4.2	Objetivos Específicos.....	39
5	MATERIAL Y MÉTODOS.....	40
5.1	Diseño experimental.....	40
5.2	Recolección del Tumor Venéreo Transmisible Canino.....	41
5.2.1	Cultivo primario de las células de TVT.....	42
5.3	Inoculación experimental de TVT en perros sanos.....	43
5.4	Extracción del antígeno total de TVT.....	43
5.5	Obtención de células mononucleares de sangre periférica.....	44
5.5.1	Generación de células dendríticas a partir de monocitos de sangre periférica...	42
5.5.2	Análisis de fenotipo de las células dendríticas obtenidas a partir de monocitos de sangre periférica.....	47

5.5.3	Activación de linfocitos T específicos contra el TVT <i>in vitro</i>	47
5.5.4	Aislamiento de linfocitos TCD8 ⁺ mediante selección negativa.....	48
5.6	Ensayo de citotoxicidad <i>in vitro</i> contra las células de TVT.....	49
5.7	Terapia autóloga con linfocitos TCD8 ⁺	50
5.7.1	Efectos secundarios por terapia celular autóloga.....	50
5.7.2	Evaluación del volumen tumoral.....	51
5.7.3	Evaluación de los linfocitos infiltrantes de tumor por histopatología.....	51
5.7.4	Análisis de las poblaciones CD4 ⁺ y CD8 ⁺ en sangre periférica.....	51
5.7.5	Determinación de los niveles IFN γ en suero por ELISA.....	52
5.8	Análisis estadístico.....	52
6	RESULTADOS.....	54
6.1	Evaluación de las células de TVT en cultivo primario.....	54
6.2	Inoculación experimental del TVT en hembras caninas.....	55
6.3	Obtención y titulación del antígeno tumoral total con 1-Butanol.....	56
6.4	Generación de células presentadoras de antígeno a partir de monocitos de sangre periférica.....	56
6.5	Activación de los linfocitos T en presencia de células presentadoras de antígeno cargadas con antígeno tumoral total.....	59
6.6	Aislamiento de Linfocitos T CD8 ⁺ específicos de tumor mediante selección negativa.....	60
6.7	Evaluación de la citotoxicidad de los Linfocitos T CD8 ⁺ específicos de tumor contra las células de TVT.....	61
6.8	Evaluación del efecto de la terapia autóloga con linfocitos T CD8 ⁺ específicos de TVT.....	64
7	DISCUSIÓN.....	71

8	CONCLUSIONES.....	79
9	PERSPECTIVAS.....	80
10	LITERATURA CITADA.....	81
11	RESUMEN BIOGRÁFICO.....	94

La vida es una Tómbola...
Diego Armando Maradona 10:23

AGRADECIMIENTOS

Muchas gracias a todas las personas que me hicieron sentir como en casa todo este tiempo, a mis compañeros y amigos.

Al Laboratorio de Inmunología y Virología (LIV) de la Facultad de Ciencias Biológicas de la UANL.

Gracias a la Dra. Cristina Rodríguez Padilla.

Gracias por el apoyo económico y de infraestructura.

Gracias...

DEDICATORIA

A mi familia y a todos los que me han apoyado durante tantos años, es para ustedes...

ALO

LISTA DE TABLAS

CONTENIDO	PÁGINA
Tabla 1. Caracterización inmunofenotípica del TVT.....	32
Tabla 2. Grupos de canidos.....	39

LISTA DE FIGURAS

CONTENIDO	PAGINA
Figura 1. Respuesta inmunológica innata y adaptativa contra tumores.....	8
Figura 2. Funciones y marcadores de superficie de los subtipos de linfocitos T CD8 ⁺ en sangre.....	10
Figura 3. Tumor con forma de coliflor característico de TVT en la vagina de una hembra.....	25
Figura 4. Microscopia de células de TVT con aspecto vacuolar en el citoplasma...27	
Figura 5. Amplificación por PCR de marcadores característicos de TVT, DLA clase I y II y line1 en perros con tumor.....	29
Figura 6. Relación de lobos y perros con TVT.....	30
Figura 7. Separación de leucocitos por gradiente en Ficoll-Hypaque.....	41
Figura 8. Ciclos de terapia adoptiva en perros con TVT.....	47
Figura 9. Células de TVT en cultivo primario.....	49
Figura 10. Implementación, desarrollo y crecimiento tumoral en perro inoculado experimentalmente con TVT.....	51
Figura 11. Aspectos morfológicos de las células dendríticas inmaduras y maduras obtenidas a partir de monocitos de sangre periférica.....	53
Figura 12. Fenotipificación de células dendríticas obtenidas a partir de monocitos de sangre periférica.....	54
Figura 13. Evaluación microscópica de la presentación del antígeno en co-cultivos de células dendríticas y linfocitos totales.....	55
Figura 14. Producción de IFN- γ por linfocitos T estimulados con	

células dendríticas cargadas con antígeno tumoral total.....	56
Figura 15. Separación magnética de Linfocitos T CD8 ⁺ específicos de tumor estimulados con IL-21 mediante selección negativa.....	57
Figura 16. Ensayo de citotoxicidad de linfocitos T CD8 ⁺ específicos de tumor estimulados con IL-21.....	59
Figura 17. Evaluación de la viabilidad de las células de TVT en presencia de Linfocitos T CD8 ⁺ específicos de tumor.....	60
Figura 18. Inhibición del crecimiento tumoral en perros inoculados con TVT posterior a la Terapia Autóloga con Linfocitos T CD8 ⁺	62
Figura 19. Evaluación de la regresión tumoral en perro inoculado con TVT posterior a la terapia autóloga con Linfocitos T CD8 ⁺	63
Figura 20. Evaluación de la Regresión tumoral en canino con TVT natural resistente a la Vincristina tratado con Terapia autóloga con linfocitos T CD8 ⁺	64
Figura 21. Evaluación histológica del TVT en perros con Terapia Celular Autóloga con Linfocitos T CD8 ⁺	64
Figura 22. Evaluación de las poblaciones CD4 ⁺ y CD8 ⁺ en sangre periférica en perros con TVT tratados con Terapia autóloga con Linfocitos T CD8 ⁺	65
Figura 23. Expresión en suero de IFN γ en perros con TVT tratados con Terapia celular autóloga con linfocitos T CD8 ⁺	66

NOMENCLATURA

Ag	Antígeno
AKM	Monocitos asesinos activados
Alo	Alon
CD	Célula Dendrítica
DMSO	Dimetilsulfóxido
CPA	Célula Presentadora de Antígeno
DNA	Ácido desoxirribonucleico
ELISA	Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas
Fas-L	Ligando de Fas
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
g	Gravedades
GM-CSF	Factor estimulante de colonias de granulocitos y monocitos
HLA	Antígeno leucocitario humano
IFN γ	Interferón gamma
Ig	Inmunoglobulina
IL21	Interleucina 21
Jak	Janus Kinasa
LAK	Linfocito activado por citocina
LDH	Lactato deshidrogenasa
LTC	Linfocito T citotóxico
LTh	Linfocitos T cooperadores
M	Molar
MHC	Complejo Mayor de Histocompatibilidad

mL	mililitro
Mm	milimolar
NaCl	Cloruro de sodio
NFκB	Factor nuclear kappa B
NK	Natural killer
nTregs	T reguladoras naturales
PBMC	Células Mononucleares de Sangre Periférica
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
Pg	Picogramos
PGE	Prostaglandina
rmp	Revoluciones por minuto
RNA	Ácido ribonucleico
RNAi	RNA de interferencia
SFB	Suero Fetal Bovino
STAT	Transmisoras de señal y activadoras de la transcripción
TAM	Macrófagos asociados a tumor
TCA	Terapia Celular Autóloga
TCR	Receptor de células T
TGF-β	Factor de crecimiento transformante beta
TIL	Linfocito Infiltrante de tumor
TNF-α	Factor de necrosis tumoral alfa
TRAIL	Ligando inductor de apoptosis relacionado a TNF
Tregs	T reguladoras
TVT	Tumor Venéreo Transmisible

RESUMEN

La Organización Mundial de la Salud declaró que el cáncer es una de las principales causas de muerte en el mundo, para el 2012 se presentó un total de 8.2 millones de defunciones. A pesar de la gran cantidad de recursos invertidos en investigación, la tasa de mortalidad no ha sido disminuida, por lo tanto es necesario el desarrollo de nuevas terapias efectivas contra el cáncer. Desde sus inicios, en el campo de la inmunoterapia se han realizado numerosos ensayos en humanos con cáncer y en modelos animales, obteniendo algunos casos de regresión tumoral completa. En el presente trabajo se evaluó el efecto de la terapia autóloga en perros inoculados experimentalmente con Tumor Venéreo Transmisible (TVT). Se inoculó 12 hembras de raza mixta con TVT (1×10^8 células) intragenital, una vez que el tumor alcanzó un volumen de 10 cm^3 , se colectó una biopsia con la cual se extrajo el antígeno tumoral total ($300 \mu\text{g/mL}$) el cual fue agregado ($30 \mu\text{g/mL}$) en cultivos de células dendríticas inmaduras. Linfocitos totales obtenidos del mismo paciente y CPAs (CD80^+ 80.3%, CD83^+ 76.4%, DLA II 86.5%) cargadas con antígeno tumoral fueron co-cultivadas en presencia de estímulos con IL-21 (50 ng/mL) o IL-2 (20 ng/mL), posterior a la activación de los linfocitos ($746.88 \text{ pg/mL IFN}\gamma$), las células T CD8^+ específicos de tumor fueron separadas por selección negativa (Dynabeads Untouched) con un 82.6% de pureza para finalmente ser expandidas con OKT3. Se llevó a cabo un ensayo de *in vitro* de la citotoxicidad de los Linfocitos T CD8^+ específicos de tumor contra las células de TVT, obteniendo 100% de lisis de la célula tumoral cultivada en presencia de linfocitos CD8^+ específicos de tumor estimulados con IL-21 y un 90% de citotoxicidad tumoral cuando los CD8^+ fueron específicos pero estimulados con IL-2, cuando los CD8^+ no fueron específicos de tumor el porcentaje de citotoxicidad fue muy poco (10%). *In vivo* el grupo 1 fue tratado con terapia autóloga, linfocitos T CD8^+ (5×10^7 células por ciclo) específicos de tumor estimulados con IL-21 y aplicados en 3 ciclos en intervalos de 2 semanas. Como grupos control se utilizaron perros con tumor sin tratamiento (grupo 2), perros con tumor tratados con suero glucosado (grupo 3) y perros con tumor tratados con transfusión sanguínea autóloga (grupo 4). Después de la terapia autóloga la inmunidad celular (CD4^+ y CD8^+) e $\text{IFN}\gamma$ fue incrementada observando regresión tumoral en los perros del grupo 1. Estos resultados indican que la terapia autóloga es eficaz en la destrucción del TVT.

ABSTRACT

The World Health Organization declared that cancer is a leading cause of death worldwide by 2012 presented a total of 8.2 million deaths. Despite the large amount of resources invested in research, the mortality rate has not been reduced, on the contrary is increasing, therefore the development of new effective therapies against cancer is necessary, proposing the immune system as the best tool to eliminate the disease. Since its inception, in the field of immunotherapy they have been numerous trials in humans with cancer and animal models, obtaining some cases of complete tumor regression in animal models and extending the life of the same. In this work the effect of autologous therapy in experimentally inoculated with transmissible venereal tumor (TVT) dogs was evaluated. 12 dog females mixed race TVT (1×10^8 cells) intragenital, once the tumor reached a volume of 10 cm^3 , a biopsy in which the total tumor antigen (300 ug/mL) was extracted which was added was collected was inoculated (30 ug/mL) in cultures of immature dendritic cells generated from peripheral blood monocytes for phagocytosis. Total lymphocytes obtained from the same patient and CPAs (CD80^+ 80.3% CD83^+ 76.4%, DLA II 86.5%) loaded with tumor antigen were co-cultured in the presence of stimulation with IL-21 (50 ng/mL) or IL-2 (20 ng/mL), after the activation of lymphocytes ($746.88 \text{ pg/ml IFN}\gamma$), CD8^+ T cells specific tumor were separated by negative selection (Dynabeads Untouched) with a 82.6% purity to be finally expanded with OKT3. Was conducted a test *in vitro* cytotoxicity of T lymphocytes specific CD8^+ tumor against cells TVT, obtaining 100% tumor cytotoxicity in the presence of CD8^+ tumor specific stimulated with IL-21 and 90% tumor cytotoxicity when specific CD8^+ stimulated with IL-2, when the CD8^+ were not specific to tumor the percentage of cytotoxicity was very low (10%). In vivo Group 1 was treated with autologous therapy, CD8^+ T cells (5×10^7 cells per cycle) tumor-specific stimulated with IL-21 and applied for 3 cycles at intervals of two weeks. As control groups were used dogs with untreated tumor (group 2), dogs with tumor treated with dextrose (group 3) and dogs with tumor treated with autologous blood transfusion (group 4). After therapy autologous cellular immunity (CD4^+ and CD8^+) and $\text{IFN}\gamma$ was increased tumor regression observed in dogs in group 1. These results indicate that autologous therapy has cytotoxic effect on TVT.

1. INTRODUCCIÓN

El cáncer a nivel mundial representa la segunda causa de muerte, después de las cardiopatías, las muertes por cáncer aumentan todos los años y se cree que a lo largo del siglo XXI el cáncer será la causa principal de muerte en los países desarrollados. Las enfermedades neoplásicas afectan a personas de todas las edades niños, jóvenes y adultos, sin embargo, el riesgo de desarrollar cáncer aumenta con la edad. De acuerdo con la organización mundial de la salud 8.2 millones de personas en el mundo murieron por cáncer en el 2012. El cáncer es una alteración celular que resulta por cambios genéticos en la célula, principalmente por mutaciones inducidas o espontáneas que se van acumulando en el material genético celular a través del tiempo, por lo cual la alteración en múltiples genes puede predisponer al desarrollo de tumores en los distintos tipos celulares. También existe la llamada “hipótesis etiológica infectiva del cáncer”, esta se refiere a que algunos virus tumorales inducen transformación maligna, al incorporarse directamente al genoma de la célula con la activación de oncogenes virales (Lu and Han, 2003). Las terapias convencionales como quimioterapia, la radioterapia y la cirugía siguen siendo los tratamientos más aceptados para el cáncer en la actualidad. La cirugía reduce el tamaño y la carga tumoral, la radiación destruye las células tumorales residuales y la quimioterapia elimina células tumorales a nivel local y sistémico eliminando células metastásicas que migraron a otros tejidos y órganos (Sondei *et al.*, 1989). No obstante la quimioterapia y radiación no son específicas del tumor, ambas destruyen también células normales, por ejemplo células de la médula ósea, tracto gastrointestinal y folículos pilosos, causando importantes efectos secundarios como pérdida de pelo, caquexia, anemia, leucopenia y en muchos casos la muerte (Emens and Jaffee, 2007).

La importancia de esta enfermedad sugiere la generación de nuevas terapias efectivas contra el cáncer, la inmunoterapia del cáncer; término que se refiere a la estimulación del sistema inmune para la eliminación del tumor es considerada la cuarta terapia del cáncer después de las antes mencionadas. Desde sus inicios, en el campo de la inmunoterapia se han desarrollado numerosos ensayos clínicos en humanos y en

modelos animales como ratones, ratas y cuyos para evaluar el efecto de la inmunoterapia celular y moduladora (Ross and Steele, 1984). Se han propuesto a los glóbulos blancos y sus factores inmunomoduladores como terapia para eliminar células cancerosas en glioma, mieloma múltiple, cáncer de pulmón, cáncer de mama triple negativo, adenocarcinoma (Chan *et al.*, 2003; Huang *et al.*, 2001; Ingram *et al.*, 2000; Xiaoyi *et al.*, 2013; Young *et al.*, 2007). En 1900 William Coley observó que algunos pacientes con cáncer, que accidentalmente contraían y desarrollaban alguna infección bacteriana, sobrevivían más tiempo que aquellos que no presentaron ninguna infección, relacionando la infección bacteriana como estimulación del sistema inmune y producción de un efecto antitumoral (Bergman, 2010). A principios de 1980 se llevó a cabo el desarrollo de técnicas y metodologías eficaces para proliferación y expansión de células efectoras linfoides *in vitro* para su empleo como terapia del cáncer (López *et al.*, 2004). Las primeras inmunoterapias utilizaron células asesinas activadas por linfocinas (LAK), monocitos asesinos activados (AKM) y Linfocitos infiltrantes de tumor (TIL) (Joannei and Wroblewski, 2004). Por lo anterior el propósito de este trabajo fue evaluar el efecto de la terapia autóloga con linfocitos T CD8⁺ estimulados con antígeno tumoral total e IL-21 en perros inoculados experimentalmente con Tumor Venéreo Transmisible (TVT).

2. ANTECEDENTES

2.1 Cáncer

Se le denomina cáncer a un grupo de enfermedades que se caracterizan por el crecimiento celular autónomo de manera descontrolada a nivel local y que puede ir acompañado de invasión a tejidos circundantes y dispersión de células a sitios distantes, denominándose metástasis. La célula cancerosa pierde el control de su propio desarrollo, de modo que se divide en gran cantidad de células a mayor velocidad que el resto del tejido al que pertenece sin cumplir con las funciones para la que fue creada (Lu and Han, 2003), el crecimiento anormal de células puede llegar a formar masas de tejidos llamados tumores, una característica del cáncer es la alteración de los mecanismos reguladores del crecimiento, proliferación y muerte celular programada, entre ellos destacan; la evasión de la apoptosis por alteración o mutación de los genes pro-apoptóticos (también llamados genes supresores de tumor) como p53, pRb, APC, NF1, WT1, DCC o en algunos casos la sobreexpresión de genes que inducen proliferación celular myc, jun, fos, sis, neu, N-ras, Kras y src, otro gen también relacionado con el cáncer es bcl-2 que en estado de hiperactividad participa en el desarrollo de una gran cantidad de patologías neoplásicas por supresión de la apoptosis (Erolesa *et al.*, 2012). El proceso por el cual se origina el cáncer (carcinogénesis) es causado por anomalías en el material genético de las células, el ADN, estas alteraciones pueden ser provocadas por distintos agentes carcinógenos, como la radiación ionizante, radiación ultravioleta, productos químicos procedentes de la industria, humo del tabaco por errores naturales que se producen durante el proceso de replicación del ADN y que no son reparados, o bien son heredadas y por consiguiente se presentan en todas las células desde el nacimiento y originan mayor probabilidad de que se presente la enfermedad (Harrington *et al.*, 2007). La dieta también se ha mencionado como un factor clave que puede predisponer al desarrollo de cáncer, las vitaminas pueden actuar como antioxidantes previniendo la aparición del cáncer, en cambio una dieta rica en carbohidratos puede predisponer a cáncer de colon y rectal, la inflamación crónica puede conducir a un estado de transformación maligna por aquellos metabolitos tóxicos o especies reactivas de oxígeno que se producen durante el proceso de inflamación en el combate de las células del

sistema inmune contra patógenos de difícil erradicación y que pueden lesionar al ADN de células normales circundantes (Jones and Cross, 2004). A nivel molecular el cáncer se desarrolla a partir de la acumulación de mutaciones genéticas en el ADN (deleciones, inserciones, sustituciones) de secuencias que codifican proteínas críticas para el control del crecimiento, proliferación y muerte celular, también se ha evidenciado que existen protooncogenes celulares que pueden ser activados por mutación y la expresión anormal de estos conduce a la transformación en una célula cancerosa, también algunos mecanismos celulares de reparación del ADN pueden verse afectados durante el proceso de replicación del ADN (falla en el rompimiento de doble cadena e inicio de reparación por recombinación, falta de eliminación de dímeros de timina generados por luz ultravioleta, etc.), por lo que hay mayor probabilidad del desarrollo tumoral (Meza *et al.*, 2006). También se han descrito otras causas de cáncer en donde figuran los agentes infecciosos, como el virus del papiloma humano o el virus de la hepatitis B, en el siglo pasado se descubrió que estos virus ADN o ARN son capaces de introducir oncogenes virales en el material genético de la célula, resultando en la transformación maligna de la célula y desarrollo de cáncer, por lo tanto el cáncer es una enfermedad multifactorial con características específicas que dependen de cada tipo de tumor y que de no atenderse a tiempo pueden terminar con la vida del individuo por falla del funcionamiento normal del tejido u órgano afectado, aunado a la compresión que pueden ejercer ciertos tumores sólidos sobre tejidos circundantes (sistema nervioso central y periférico) y a la complicación con infecciones secundarias oportunistas por los estados de inmunosupresión en los individuos con cáncer (Gillison, 2004). En la actualidad se conocen más de 200 tipos de cáncer. El 70% de todas las muertes por cáncer registradas en 2012 se produjeron en África, Asia, América Central y Sudamérica. Se prevé que los casos anuales de cáncer aumentarán de 14 millones en 2012 a 22 millones en las próximas dos décadas. Los cánceres que causan un mayor número anual de muertes son los de pulmón, hígado, estómago, colon y mama. Aproximadamente un 30% de las muertes por cáncer se deben a cinco factores de riesgo comportamentales y alimentarios (índice de masa corporal elevado, consumo insuficiente de frutas y verduras, falta de actividad física y consumo de tabaco y alcohol), por lo tanto, pueden prevenirse (Organización Mundial de la Salud, 2013).

2.1.1 Clasificación del cáncer

Todos los tumores, benignos y malignos, tienen dos componentes básicos en su estructura: las células proliferantes que forman el tumor propiamente dicho y las células que constituyen el parénquima y estroma de sostén, conformado por tejido conectivo y vasos sanguíneos, siendo tejidos no tumorales cuya formación ha sido inducida por el propio tumor. La nomenclatura oncológica se basa en el componente parenquimatoso, utilizando dos criterios de clasificación: la primera es con base en el tejido del cual derivan y como segundo su carácter benigno o maligno. Los tumores benignos son de crecimiento lento, crecen de manera ordenada y no se propagan a otros tejidos (Tobias, 2013). Los tumores malignos son de crecimiento rápido e invasivo que destruyen células normales y tejidos, crecen de manera desordenada y se propagan a otros tejidos distantes. Los Carcinomas son un tipo de cáncer maligno, de origen epitelial que representa el 80 % de los tumores malignos incluyendo; cáncer de mama, pulmón, próstata, etc. Los cánceres que derivan de los tejidos mesenquimatosos o capa mesodérmica se denominan sarcomas, estos cánceres se originan en tejidos conectivos y de apoyo, incluyendo los músculos, huesos, el cartílago y la grasa. Hoy en día la oncología es una de las áreas más investigadas en el campo de las ciencias biológicas y a la cual se le destinan muchos recursos económicos para tratar de disminuir los casos de muerte por cáncer (Loraine and Mendoza, 2010).

2.2 Inmunología del cáncer

Observaciones experimentales han demostrado que aunque las células tumorales derivan de células propias del hospedador, los tumores desencadenan respuestas inmunitarias que pueden conducir al rechazo o progresión del tumor, ya que en estudios histopatológicos se ha detectado la presencia de linfocitos infiltrantes de tumor (TIL), que en algunos casos puede ser de buen pronóstico pero en algunas ocasiones están implicados en el favorecimiento del crecimiento tumoral, quedando a debate el significado de los TIL en el microambiente tumoral (Yu and Hyun, 2013). Es bien conocido el papel del sistema inmunológico en el reconocimiento de moléculas extrañas, incluidas las proteínas propias alteradas producidas durante el crecimiento tumoral que se expresan de manera aberrante o excesiva en las células transformadas, las cuales son conocidas como antígenos asociados a tumor, por ejemplo; tirosinasa, gp100, HSP70, MAGE, BAGE, CEA y AFP.

También existen antígenos que son exclusivos de la célula tumoral y que no se expresan en una célula normal, llamados antígenos específicos de tumor, como ejemplo la fosfatasa ácida prostática, en cáncer de próstata, cuyo antígeno es utilizado en la producción de la primer vacuna terapéutica a base de células dendríticas aprobada por la FDA, Sipuleucel (Rescigno *et al.*, 2007). En condiciones normales se plantea como hipótesis que el sistema inmune puede desarrollar una eficaz respuesta antitumoral, es decir, el sistema inmune puede controlar y destruir a las células cancerígenas que se producen en un individuo, sin embargo la gran cantidad de muertes por cáncer hace pensar que esto no siempre ocurre así, por lo que deben existir mecanismos para evasión del sistema inmune. En primer lugar las células tumorales que se producen de manera natural al derivar de células normales tienden a ser poco inmunogénicas o casi indetectables para el sistema inmune, a menos que sean causadas por agentes virales, causando tolerancia inmunológica hacia el tumor y favoreciendo la progresión tumoral (Atsutaka *et al.*, 2014). Segundo, al ser genéticamente inestables las células tumorales tienden a cambiar la expresión de los antígenos tumorales para los que se ha desencadenado una respuesta inmune. Tercero, las células tumorales expresan bajas cantidades de co-estimuladores y moléculas del MHC clase I, por lo que no pueden ser reconocidos por el sistema inmune. Por último los productos del tumor como citocinas supresoras (IL-10 y TGF- β) tienden a producir una alteración e inactivación de las células del sistema inmune innato como células dendríticas, macrófagos, NK, TNK, que conduce a una falta de activación de células efectoras del sistema inmune adaptativo (Linfocitos T cooperadores y citotóxicos), favoreciendo la diferenciación de T reguladores y conllevando al crecimiento del tumor. Por el contrario también ha sido reportada la regresión espontánea de algunos tumores en individuos sin ninguna intervención terapéutica, atribuible a la respuesta inmune, sugiriendo que las células T han reconocido a las células tumorales como extrañas (Kaminski *et al.*, 2003).

2.2.1 Sistema inmune innato y adaptativo en cáncer

Se ha demostrado que las células del sistema inmune innato y adaptativo destruyen células tumorales *in vitro*. Los mecanismos de protección del sistema inmunológico se encuentran divididos en 2 grandes categorías: la respuesta inmune innata y la respuesta inmune

adaptativa (**Figura 1**); la primera es inespecífica y presenta componentes celulares como los macrófagos, neutrófilos, células dendríticas (CD), eosinófilos, basófilos, células cebadas, células asesinas naturales (NK), TNK y moléculas solubles que sintetizan como citocinas y factores de la inflamación (Kees and Egeblad, 2011). El sistema inmune adaptativo es específico y se divide a su vez en respuesta inmune celular y respuesta humoral; la respuesta celular esta mediada por los linfocitos TCD4⁺ (Th1, Th2 cooperadores, Th17) y CD8⁺ (citotóxicos), esta respuesta celular llevada a cabo por las células T es la más importante en el control y regresión del cáncer, finalmente la respuesta humoral está conformada por los linfocitos B y diversos anticuerpos que son secretados por las células plasmáticas (IgA, IgG, IgE, IgM e IgD) (Inui *et al.*, 2013). La respuesta inmune innata puede activarse por la estimulación de receptores de superficie como NKG2D y TLRs por ligandos producidos por las células tumorales, como MICA, MICB, ULBP y moléculas de stress como HSP70 y HMGB1, respectivamente. Las células NK participan en la respuesta inmune antitumoral empleando varios mecanismos efectores, perforinas, FASL y producción de IFN γ , estas células tienen la habilidad de destruir células con baja expresión de MHC clase I. Ratones deficientes en NK mostraron mayor susceptibilidad al desarrollo de tumores por metilcolantreno. Los linfocitos TNK son células que expresan un receptor de célula T invariante (V α 24-J α 18 en humanos y V α 14-J α 18 en ratones) y marcadores de células NK. Los TNK presentan un TCR específico para antígenos lipídicos que son expresados sobre una molécula CD1d en la superficie de una CPA o células tumorales, estas células median la destrucción tumoral a través de la producción de IFN γ que contribuye a la activación de CD8⁺ y NK con el rechazo del tumor (Sabry and Lowdell, 2013).

Los macrófagos pueden ser activados a través de la unión de moléculas de stress a receptores tipo toll, resultando en la producción de especies reactivas de oxígeno, como el óxido nítrico y citocinas inflamatorias como IFN α y TNF α . Los principales mecanismos involucrados en el rechazo tumoral son llevados a cabo por la respuesta inmune adaptativa que puede dirigir y aumentar una respuesta efectora citotóxica de tipo innata y por los linfocitos TCD8⁺. La respuesta adaptativa es iniciada por las CD que capturan células tumorales muertas, las procesan y presentan estos antígenos cargados en moléculas MHC

clase I y II a los linfocitos T en los ganglios linfáticos (Biswas *et al.*, 2008). Los linfocitos TCD4⁺ activados pueden secretar citocinas Th1 y Th2 con estimulación de la respuesta inmune celular y humoral, los linfocitos TCD8⁺ pueden ser activados por CD a través de la presentación cruzada de antígeno. La producción citocinas Th1 (IL2 e IFN γ) puede conducir a la activación y expansión clonal de linfocitos TCD8⁺ específicos de tumor con destrucción de células tumorales. La producción de anticuerpos contra antígenos tumorales es detectada en individuos con cáncer, la principal función de los anticuerpos son la activación del complemento y citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo por NK y macrófagos, ayudando a la regresión tumoral (Estrada *et al.*, 2002).

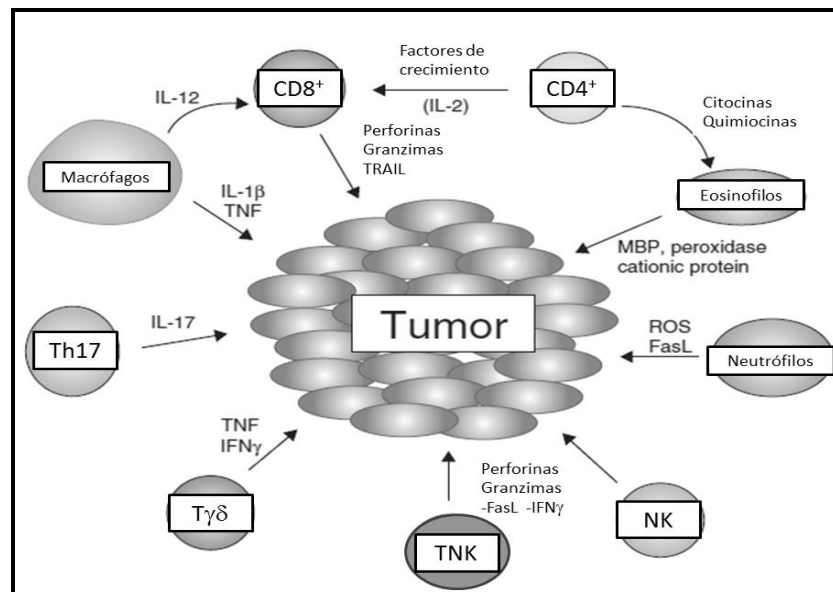


Figura 1. Respuesta inmunológica innata y adaptativa contra tumores
(Fotografía tomada y modificada de Darcy *et al.*, 2014).

2.3 Linfocitos TCD8⁺

La gran especificidad y sensibilidad de los Linfocitos T por sus antígenos hacen de estas células atractivos candidatos para utilizarlos como tratamiento del cáncer (Turtle and Riddell, 2011). Las principales funciones de los linfocitos T CD8⁺ o linfocitos T citotóxicos es destruir a las células infectadas por virus y también a las células tumorales que expresan en su superficie antígenos asociados a tumor, después de reconocer el antígeno en unión con MCH clase I, estas células experimentan cambios fenotípicos que reflejan mayor capacidad proliferativa y un incremento en la producción de citocinas

reguladoras, durante su división celular algunas células T se diferencian en células de memoria presentando marcadores de superficie $CD27^+$, $CD28^-$, $CCR7^+$, $CD45RA^-$ y células efectoras que presentan un fenotipo $CD27^-$, $CD28^-$, $CCR7^-$, $CD45RA^{+/-}$ (Parmigiani *et al.*, 2011). Los linfocitos $CD8^+$ antitumorales pueden ser expandidos *in vitro* y obtener grandes cantidades de células antígeno específicas para ser transferidas de manera autóloga con el fin de erradicar tumores que el organismo de manera natural no pudo eliminar (Toyoshima *et al.*, 2012). Diversos autores han identificado antígenos específicos de diversos tumores, por lo que estos antígenos pueden ser obtenidos en el laboratorio para la activación específica de los linfocitos T $CD8^+$ *in vitro* y posteriormente utilizar estas células citotóxicas *in vivo* (Mukaratirwaa and Gruys, 2003). Las células T proliferan en respuesta a la estimulación con células tumorales propias, secretando citocinas como IL-2, IFN- γ , factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF) y factor de necrosis tumoral-alfa (TNF- α) (Meehan *et al.*, 2013). Los linfocitos T citotóxicos presentan en la superficie el receptor de célula T (TCR), que se unen con antígenos, que se encuentran cargados en una molécula del MHC clase I, que es presentado sobre la superficie de una célula presentadora de antígeno (APC), como ejemplo las células dendríticas (CD), sin embargo la activación de los linfocitos T necesitan la presencia de moléculas co-estimuladoras, $CD80^+$, $CD86^+$ y $CD40^+$ (Harimoto *et al.*, 2013), la IL-2 y el GM-CSF mejoran la activación y proliferación de los linfocitos T (Kumar and Mason, 2012). Los linfocitos T citotóxicos presentan 2 mecanismos complementarios para eliminar a las células tumorales; la principal forma de citotoxicidad de un linfocito efector es a través de la excreción de proteínas tóxicas que se encuentran en el interior de gránulos preformados en su citoplasma y que son liberados ante el estímulo antigénico. Las proteínas más importantes dentro de estos gránulos son la perforina y la granzima B, la primera se polimeriza en la membrana plasmática de la célula blanco generando poros que permiten el paso de agua y electrolitos, induciendo un desbalance osmótico y muerte celular por lisis (Turtle and Riddell, 2011). La granzima B es una proteína que es parte del grupo de las catepsinas, que activa directamente la cascada de señalización de la apoptosis vía caspasas. Los linfocitos activos presentan el ligando Fas (FasL) que es una proteína de membrana, miembro de la Familia del Factor de Necrosis Tumoral (FNT), se encuentra en gran

cantidad en la superficie de linfocitos T citotóxicos, por lo cual su unión al receptor Fas (CD95) en la célula blanco, desencadenara la vía extrínseca de la apoptosis, activación de las cascada de caspasas y muerte de la célula blanco (Hernández and Becker, 2006). Las células T CD8⁺ se pueden dividir en aquellas que nunca han estado en contacto con el antígeno (**Figura 2**), células T naive (TN) CD45RA⁺, CD62L, CD3, que contienen la mayor diversidad de receptores de células T (TCR). También en linfocitos T de memoria que pueden subdividirse en células de memoria central (TCM) CD62L⁺, CD45RO y células efectoras de memoria (TEM) CD3, CD45RO (Cui and Kaech 2010). Los linfocitos T citotóxicos son las células más importantes del sistema inmunológico para la eliminación y destrucción del tumor, estas células efectoras reconocen epítopos antigénicos sintetizados de manera endógena en el tumor en unión con moléculas del MHC clase 1 (Harimoto *et al.*, 2013). Los linfocitos T citotóxicos tienen un rol crítico en la última fase de la respuesta inmunológica, resultando en la muerte de las células tumorales específicas para antígeno, por lo que son grandes candidatos para su uso en la inmunoterapia del cáncer. La terapia de células T autóloga es una estrategia de tratamiento para pacientes con diferentes tipos de cáncer, generando *in vitro* gran cantidad de células T específicas para tumor, con el objetivo de erradicar el tumor en los pacientes con cáncer (Hinrichs *et al*, 2010).

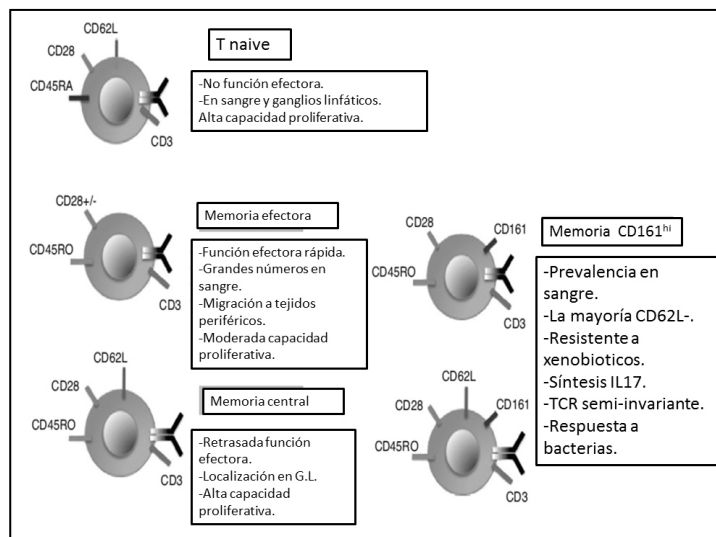


Figura 2. Funciones y marcadores de superficie de los subtipos de linfocitos T CD8⁺ en sangre
(Fotografía tomada y modificada de Turtle and Riddell, 2011).

2.4 Células Dendríticas (CD)

La recolección de células dendríticas de tejidos periféricos y linfoides no es una técnica viable y practica para su cultivo. Se ha demostrado con el empleo de monocitos marcados con moléculas fluorescentes que estos migran a tejido linfoide y son capaces de diferenciarse en células dendríticas funcionales, por lo que la habilidad de los monocitos para diferenciarse *in vitro* a células dendríticas bajo ciertas condiciones fisiológicas es un hecho (Tanaka *et al.*, 2000). Al hablar de linfocitos T citotóxicos específicos de antígeno en inmunoterapia del cáncer, no podemos dejar desapercibidas a las células dendríticas, cuyo papel principal es crítico para la activación de la respuesta inmune celular. En humanos y animales las células dendríticas (CD) son las células presentadoras de antígeno (APC) más importantes en el organismo, indispensables para producir una respuesta primaria por células T. Las células dendríticas se describieron por primera vez en 1973, observadas al microscopio presentaron una morfología redonda y a partir de su membrana plasmática se desprendían largas proyecciones. Se encuentran principalmente en bazo, ganglios linfáticos, mucosa, piel, placas de peyer e hígado (Hargadon, 2013).

Las CD se clasifican en 3 subtipos con características de fenotipo particular: las CD intersticiales, localizadas en piel y órganos linfoides, las CD de linaje plasmocitoide (CD11⁻ CD8⁺) y las CD de linaje mielóide (CD11⁺ CD8⁻) ambas localizadas en circulación. Una función primaria de las CD es vigilar en el medio celular la presencia de patógenos y células tumorales, por lo cual se convierten en un importante centinela del sistema inmune. Las CD son miembros del sistema inmune innato y estas células empiezan la cascada inmunológica que activa la respuesta inmune adaptativa (Granados and Delgado., 2008). Las CD llevan a cabo el procesamiento y presentación de antígeno a las células T, por la vía del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) clase I y clase II que activa a los linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺ respectivamente, por lo cual se produce una respuesta inmune antígeno específica. Son capaces de procesar antígenos exógenos y endógenos, captándolos por fagocitosis, pinocitosis y endocitosis. También inducen la diferenciación de los linfocitos B de memoria en células plasmáticas

productoras de anticuerpos. Una función de las CD es su capacidad para activar a las células NK en el sistema inmune innato (Rescigno *et al.*, 2007). En los años noventa se encontró la posibilidad de generar grandes cantidades de CD *in vitro* a partir de precursores monocitos, obteniendo células mononucleares de sangre periférica (PBMC) e incubando en RMPI en presencia de 1000 U/mL de GM-CSF y 500 U/mL de IL-4 durante, dichas células pueden ser utilizadas en terapia autóloga del cáncer.

2.5 Microambiente tumoral

Es bien conocido el estado de inmunosupresión en pacientes con cáncer, es por esto que la estrategia de inmunoterapia debe ser implementada con base en el tipo de tumor y microambiente tumoral, ya que la estimulación del sistema inmune puede verse afectado por diferentes factores asociados a tumor (Ochsenbein *et al.*, 1999). Sin embargo la radioterapia, quimioterapia y la edad del paciente también pueden afectar la estrategia de inmunoterapia. Las interacciones complejas entre los diferentes tipos de células y el microambiente tumoral regulan el crecimiento tumoral, progresión, metástasis y angiogénesis. El microambiente tumoral es considerado inflamatorio, por lo que la activación del sistema inmune innato (macrófagos y otros) juega un rol importante en la progresión del tumor (Harimoto *et al.*, 2013). Algunos estudios han descrito factores secretados por tumores implicados en la disfunción de las células presentadoras de antígenos. IL-10, VEGF y TGF β están relacionados con la inhibición en la diferenciación de las CD por supresión de la actividad de NF- κ B (factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras Kappa de las células B activadas) a partir de precursores mieloides. También factores solubles del tumor como TGF β , IL-1 β , IL-12, PG y ROS permiten la diferenciación de precursores mieloides en células con actividad inmunosupresora MDSC (CD11b, Gr-1 CD14-/+, CD15, CD33) que producen inactivación y anergia de linfocitos T efectoras y expansión de los T reguladores vía IDO (indoleamina 2,3-dioxigenasa) y arginasa (Yu *et al.*, 2013), otros factores asociados al tumor que participan en la inhibición de la maduración de CD son TGF β , ácido láctico, COX-2 y PGE2 (Hargadon, 2013). Finalmente *in vivo* las células dendríticas maduras, inmaduras, precursores linfoides y mieloides de pacientes con cáncer pueden ser transformadas en células dendríticas reguladoras mieloides (CD11c, B7-H1, B7-DC) y reguladoras plasmocitoides

(CD19, B220/CD45RBDC4-4) por secreción de factores tumorales y membranales como TGF β , PGE $_2$, CCL2, CXCL1, CXCL5, IL-6, IL-10, TNF α e IFN α (Wang *et al.*, 2013), por lo tanto estas células reguladoras producen una disfunción y depleción de las APC con disminución e inhibición de los linfocitos T efectores (CD4 $^+$ y CD8 $^+$) supresores de tumor y aumento los T reguladores (CD4 $^+$ CD25 $^+$ FOXP3 $^+$) que secretan IL-10 y TGF β suprimiendo la actividad citolítica de los CD8 $^+$ específicos de tumor con la consecuente formación de un microambiente tumoral con actividad inmunosupresora que permite la evasión del sistema inmune y progresión del tumor (Steinman, 2012).

Hay evidencia que sugiere que en el microambiente tumoral también existe una población de células que participan en la progresión del cáncer, un subtipo denominado macrófagos asociados a tumor (TAM) con fenotipo CD11b, CD206, CD68, CD163 (Liu *et al.*, 2009) que está relacionado con un pobre pronóstico para el paciente. Este subtipo celular expresa un perfil parecido con los macrófagos activados por la vía alternativa (M2), llevando a cabo la secreción de IL-10, TGF- β (implicadas en la diferenciación de Th2 y Tregs), presencia de receptores de manosa, arginasa, VEGF (angiogénesis), HIF, ROS y baja expresión de IL-12, esta población es diferenciada por factores asociados a tumor como IL-10. Por lo tanto el microambiente tumoral influye en el sistema inmune innato y adaptativo por lo que debe de ser considerado durante la selección del protocolo de inmunoterapia (Tang, 2013).

2.5.1 Células madre tumorales (CSC)

Últimas investigaciones han reportado que los tumores están conformados por diferentes tipos de células, de las cuales la gran mayoría están representadas por células cancerígenas diferenciadas, el otro subtipo celular se encuentra en menor cantidad y lo conforman células con capacidad de auto-renovación y diferenciación denominadas células madre del cáncer (CSC por sus siglas en inglés, Cáncer Stem Cell), esta subpoblación celular permite el inicio y crecimiento tumoral, también es responsable del desarrollo de metástasis, hay evidencia suficiente que demuestra que las CSC son resistentes a las terapias convencionales como la radioterapia y quimioterapia (Xiaoyi *et al.*, 2013), por la

cual pueden ser las responsables de la recurrencia de la enfermedad inclusive años más tarde de que el paciente se ha recuperado de la neoplasia, por lo tanto la eliminación completa de estas células madre del cáncer es indispensable para la erradicación del tumor y datos publicados en la actualidad (véase más adelante; Inmunoterapia en modelos animales) demuestran que la inmunoterapia es capaz de destruir a las células madre del cáncer (CSC), actuando de manera eficaz en modelos *in vivo*, produciendo regresión tumoral, mayor tasa de supervivencia y alargamiento de la vida de los individuos con cáncer sometidos a inmunoterapia (Huang *et al.*, 2013).

2.6 Inmunoterapia del cáncer

El objetivo de la inmunoterapia del cáncer es potenciar la respuesta inmunitaria débil del huésped frente a los tumores, logrando destruir las células cancerígenas con la recuperación clínica del paciente. Las respuestas inmunitarias frente a los tumores pueden ser específicas de antígenos tumorales y no dañan a la mayoría de las células normales, por lo tanto la inmunoterapia es considerada como un tratamiento específico del cáncer. La eliminación del cáncer por la estimulación y activación del sistema inmunológico fue observado desde el siglo XVIII, cuando se determinó que pacientes con cáncer que cursaban cierto padecimiento bacteriano presentaban un efecto antitumoral que permitía la regresión tumoral con recuperación clínica de la enfermedad, por ejemplo individuos con cáncer demostraron completa regresión tumoral después de recuperarse de una infección por *Erysipela* spp. (Ito and Chang., 2013). En un estudio se utilizó una endotoxina extraída de *Streptococcus* spp. y *Serratia marcescens* como vacuna terapéutica aplicada a más de 300 individuos con linfoma y sarcoma, observando una respuesta eficaz de regresión tumoral en 63% de los pacientes con sarcoma y de 52% en los pacientes con linfoma, actualmente se conoce que los PAMPs (patrones moleculares asociados a patógenos) presentes en los microorganismos producen una activación del sistema inmune innato inespecífico a través de las células dendríticas y macrófagos vía receptores tipo toll (TLR), NOD1 y NOD2, receptores de manosa y lectinas (Akira *et al.*, 2001), por lo cual estas células presentadoras de antígeno pueden expandirse y empezar a procesar antígenos tumorales y presentarlos al sistema inmune adaptativo, linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺. La cascada de activación de los leucocitos también permite la secreción de citocinas que

tienen como objetivo el reclutamiento y activación de más células citotóxicas con el consecuente rechazo tumoral, algunas células también implicadas en estos mecanismos son NK y TNK (Colvin *et al.*, 2009). Por lo tanto hoy en día la inmunoterapia es considerada la cuarta terapia del cáncer (después de la cirugía, quimioterapia y radioterapia) es una novedosa y eficaz alternativa para tratamiento del cáncer, que puede ser utilizada en etapas tempranas de la enfermedad o incluso en cáncer avanzado con metástasis, en los últimos años diversos científicos han publicado resultados prometedores sobre el uso de la inmunoterapia en pacientes humanos con cáncer (véase más adelante) (Engels and Uckert, 2007).

Uno de los principales problemas del uso de la inmunoterapia es debido a que en la clínica es utilizada como último recurso de terapia contra el cáncer, es decir, en etapas tardías de la neoplasia, en lugar de ser seleccionada como primer método de tratamiento (Friedmann and Eshhar, 2006). La terapia autóloga con células T es un tratamiento que se usa para ayudar al sistema inmunitario a combatir enfermedades tales como el cáncer e infecciones por virus (Leen *et al.*, 2006). Este procedimiento incrementa el número de células T *in vitro* con capacidad de destruir células cancerosas mediante efectos citotóxicos y favoreciendo el reclutamiento de más células antitumorales (Young *et al.*, 2007). Estos linfocitos T citotóxicos expandidos *in vitro* mediante el empleo de ciertas citocinas (véase abajo) se devuelven al paciente para ayudar al sistema inmunitario a combatir el cáncer (Zhang *et al.*, 2009). Por ejemplo a través del empleo de células de defensa, glóbulos blancos o sus moléculas producidas como: inmunomoduladores; IL-2, IL-6, IL 8, IL-12, IL-15, IFN γ , IFN α , TGF β etc. (Gao *et al.*, 2013).

2.6.1 Tipos de inmunoterapia

Existen diferentes tipos de inmunoterapia, como ejemplo el uso de citocinas exógenas (IL-2, IL-12, GM-CSF, TNF e IFN α) o el uso de células linfoides activadas *in vitro*, que surgen en los años 80s a partir del descubrimiento de la interleucina-2, se llevaron a cabo ensayos en ratones con sarcoma inducidos por metilcolantreno, en los cuales se aplicaba IL-2 hasta lograr suprimir el crecimiento del tumor (Bubenik, 1989), sin embargo, la administración exógena de IL-2 requiere de dosis periódicas muy altas para llevar a cabo

un efecto antitumoral, las cuales pueden ser muy tóxicas y causar la muerte del paciente. Años más tarde surgió un tipo de tratamiento contra el cáncer llamado terapia autóloga que consiste en extraer poblaciones celulares de leucocitos del paciente y después de haberlas expandido *ex vivo* reintroducirlas para el desarrollo de un efecto antitumoral (William *et al.*, 2006). Un ejemplo de las primeras inmunoterapias con células linfoides activadas *in vitro* son las células asesinas activadas por linfocina (LAK) con IL-2 utilizadas en protocolos de inmunoterapia en glioma maligno (Huang *et al.*, 2001) (véase adelante), también los monocitos asesinos activados (AKM) y linfocitos infiltrantes de tumor (TIL) (Joannei and Wroblewski, 2004) con resultados controversiales por la gran cantidad de células reguladoras en el microambiente tumoral que pueden favorecer la progresión del tumor. Algunas terapias utilizan linfocitos T citotóxicos (CTL) específicos de tumor como terapia autóloga, estimulados *in vitro* con anti CD3 en combinación con IL-2 recombinante a dosis bajas (Burger *et al.*, 1995); las células dendríticas (CD) diferenciadas y expandidas *ex vivo* obtenidas a partir de monocitos de sangre periférica también se utilizan actualmente como vacunas en el tratamiento de diferentes tipos de cáncer (vacuna contra cáncer de próstata, aprobada FDA) (Chun *et al.*, 2011), publicaciones recientes manifiestan el uso de células CIK (células asesinas inducidas por citocina) con actividad antitumoral y sin restricción al MHC como terapia de tumores sólidos, dicha población relacionada con el perfil de NK y TNK (Sangiolo, 2011). Inui *et al.*, 2013 sostiene que la inmunoterapia del cáncer debe ser un procedimiento personalizado, es decir, terapia individual para cada paciente, que será seleccionada en base al estado inmunológico del mismo y el tipo de tumor que presenta. Son dos los principales temas de la inmunoterapia del cáncer, la inmunización activa (por ejemplo; antígenos tumorales, células tumorales muertas, CPAs, vacunas de ADN), que depende de la capacidad del paciente *in vivo* para generar una respuesta inmune antígeno-específica que pueda lograr la regresión tumoral mediante diferentes estrategias de inmunización y la inmunoterapia pasiva (anticuerpos y linfocitos T) que es la transferencia de células autólogas específicas de tumor, que pueden ser expandidas y sensibilizadas *ex vivo* y devueltas a su hospedador, por ejemplo linfocitos T CD8⁺ citotóxicos específicos de tumor extraídos a partir de sangre periférica en terapia integral combinada con citocinas o el uso de anticuerpos monoclonales específicos de antígeno

tumoral, que pueden neutralizar ciertas moléculas tumorales o activar la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo (McLaughlin *et al.*, 2001; Kakimi *et al.*, 2009).

2.6.2 Estudios de inmunoterapia en pacientes humanos

En los últimos 20 años se han reportado numerosos casos de inmunoterapia en pacientes humanos con cáncer, los cuales después de varios meses o años de terapia convencional no observaron la regresión del tumor por lo que aceptaron someterse a algún tratamiento alternativo. Múltiples parámetros clínicamente modificables pueden comprender los protocolos de terapia celular autóloga, incluyendo la dosis celular y fenotipo, la técnica de aislamiento y expansión de células del sistema inmune, la reestimulación con antígeno *in vivo* y el apoyo en combinación con citocinas. Sin embargo, la contribución relativa de cada uno de estos componentes individuales a la magnitud de la respuesta antitumoral aún no se han cuantificado en la mayoría de los ensayos (Klebanoff *et al.*, 2011).

En un ensayo se llevó a cabo un protocolo de inmunoterapia interactiva en pacientes con edad avanzada, el cual consistió en 100ng GC-MAF, vía intramuscular por semana, combinada con terapia de células LAK por dos meses, 1×10^7 células por semana, altas dosis de vitamina C vía intravenosa por semana, ácido alfa lipóico (600mg) y vitamina D3 (10000UI) vía oral por semana. El paciente 1 (71 años) con carcinoma tímico con metástasis pulmonar, recibió 24 semanas de inmunoterapia integrativa, no se observó progresión del cáncer en los siguientes 12 meses después de finalizada la terapia. El paciente 2 de 74 años con cáncer de próstata con metástasis ósea, recibió inmunoterapia integrativa 12 semanas, 9 meses después del inicio de la terapia los tumores metastásicos habían desaparecido, el paciente 3 es una mujer de 72 años de edad, con cáncer de hígado, recibió 24 semanas de terapia integrativa combinada con radiación, 12 meses pos-terapia ya no mostró recurrencia local o metástasis (Kimura and Yamaguchi, 1995). Un estudio de inmunoterapia se llevó a cabo con células LAK e IL-2 en 105 pacientes con cáncer pulmonar primario, después de una resección no curativa. La mitad de los pacientes (grupo control) recibieron una terapia estándar de

dos ciclos (vindesina, cisplatino y mitomicina C), la otra mitad recibió inmunoterapia, 7×10^5 U/día de IL-2 vía intravenosa por tres días consecutivos, al segundo día $1-5 \times 10^9$ (dosis única) de células LAK vía intravenosa fue administrada, el criterio principal de valoración fue la supervivencia de los pacientes, los resultados indican que la tasa de supervivencia de 7 años fue estadísticamente mayor en el grupo de inmunoterapia que en el grupo control (39.1% vs. 12.7%, $P < 0.01$) (Ingram *et al.*, 2000).

Se reportó el caso de un joven con glioma maligno recurrente, el individuo no respondía a tratamientos intensos de quimioterapia, radiación y resección quirúrgica, recibió administración autóloga de linfocitos asesinos activados (LAK) en combinación con dosis bajas de IL-2, once meses después del inicio de la inmunoterapia el paciente alcanzó la remisión completa del tumor, confirmado por tomografía por emisión de positrones-glucosa (PET), veintiséis meses después el paciente continuo aún en estado de remisión (Huang *et al.*, 2001). Hayes *et al.*, 2001 utilizaron un protocolo de inmunoterapia celular adoptiva con LAK activados *in vitro* por 4-5 días en combinación con altas dosis de IL-2 en 28 pacientes con glioma maligno (pronóstico de vida 56 semanas pos-tratamiento convencional), refractarios a la terapia convencional, el protocolo consistió en ciclos cada dos semanas en un periodo de dos meses, los resultados indicaron que seis pacientes mostraron un periodo de vida de más de dos años pos-inmunoterapia, dos pacientes vivieron más de ocho años, adicionalmente se observó efectos secundarios de fiebre y dolor de cabeza con dosis altas de IL-2 que fueron controlados. En Hong Kong se realizó un estudio de inmunoterapia adoptiva en 21 pacientes con cáncer pulmonar de células no pequeñas (NSCLC) en atapa III y IV (pronóstico de vida un año), con previo tratamiento de quimioterapia y radiación, la inmunoterapia consistió en un ciclo de vacunas, células de tumor autólogas irradiadas, tomadas a partir de biopsia (ganglios linfáticos, hígado, pulmón y hueso), adicionalmente se aplicó GM-CSF al día uno, seguida por solo GM-CSF al día dos y cinco, el tratamiento se repitió a los 10-14 días posteriores. Los linfocitos fueron colectados dos semanas después de sangre periférica y expandidos *in vitro* con IL-2 y anti-CD3, los linfocitos activados fueron devueltos vía intravenosa. 19 de 21 pacientes presentaron reacciones de hipersensibilidad (DTH) después de la vacunación, la

sobrevivencia medio de todos los paciente fue de 18.6 meses con reducción de los tumores (Chan *et al.*, 2003). Un paciente de 52 años con presencia de melanoma recurrente y metástasis a pulmón, cavidad abdominal, cavidad pélvica y sistema nervioso central, diagnosticado por PET y CT, recibió una terapia autóloga de Linfocitos TCD4⁺ expandidos *in vitro*, específicos para antígeno tumoral de melanoma NY-ESO-1, el paciente recibió una única infusión de 3.3×10^9 células TCD4⁺ por m² de superficie corporal, 2 meses después de la inmunoterapia por medio de PET y CT se rebeló la no presencia de la enfermedad, 22 meses después no se mostró evidencia de recurrencia, a los 26 meses el estado de rendimiento del paciente era de 90-100%, no se observaron efectos autoinmunes secundarios (Hunder *et al.*, 2008).

Las células presentadoras de antígeno (CPA) juegan un papel crítico en el inicio de la respuesta inmune antitumoral. En un estudio se generaron células dendríticas a partir de precursores sanguíneos, con estímulos de varias citocinas (IL-4, GM-CSF, TNF α , IL-6) por 7 días y al final se mezclaron con células muertas de mieloma para captación y procesamiento de antígeno, se administraron como terapia autóloga para activar la respuesta inmune humoral y celular, seis pacientes humanos con mieloma múltiple en estado avanzado fueron sometidos a 1×10^8 células dendríticas por ciclo, vía subcutánea, por 4 ciclos, la respuesta inmunológica de CD4⁺ y CD8⁺ incremento después de la segunda inmunoterapia, se observó en cinco de los seis pacientes una reducción del 25% de proteína monoclonal del mieloma con un mejoramiento clínico los próximos meses después de la terapia (Rosenblatt, 2008). Se llevó a cabo la terapia celular autóloga con linfocitos infiltrantes de tumor (TIL) en pacientes con melanoma, en el pasado los TIL presentaron resultados controversiales en protocolos de terapia autóloga debido a la gran cantidad de células reguladoras en el microambiente tumoral, sin embargo, estudios anteriores mostraron una correlación entre periodos cortos de cultivo de TIL y una respuesta clínica. Por lo tanto, se utilizó una nueva técnica de producción de TIL en un periodo corto de cultivo (18 días). 20 pacientes con melanoma fueron transfundidos con un promedio de $20-40 \times 10^9$ TILs vía intravenosa. El 50% de los pacientes logró una respuesta clínica objetiva de acuerdo con los criterios de evaluación en tumores sólidos, incluyendo dos remisiones completas en curso y ocho respuestas

parciales. La mitad de los 20 pacientes que respondieron fueron aquellos que fueron infundidos con la mayor cantidad de células. Los 10 pacientes que respondieron actualmente (2013) siguen vivos. Cuatro pacientes demostraron estabilización de la enfermedad. Los efectos secundarios fueron transitorios y manejables (Besser *et al.*, 2010). Un ensayo de fase II examinó la viabilidad de la infusión de células expandidas *ex vivo* enriquecidas en células T NKG2D⁺ CD3⁺ CD8⁺, se infundieron 1×10^9 células por ciclo, 1, 2, 4 y 8 semanas, en combinación con dosis bajas de IL-2 (6×10^5 IU/m²/día) por 4 semanas. 19 pacientes con mieloma fueron evaluados, todos los pacientes terminaron el protocolo de inmunoterapia, todos los pacientes mostraron un aumento en el número de células circulantes NKG2D⁺ CD3⁺ CD8⁺ células/mL (P < 0.004), CD3⁺ CD8⁺ células/mL (P < 0.04), CD3⁺ CD8⁺ CD56⁺ células/mL (P < 0.004) y NKG2D⁺ CD3⁻ CD56⁺ células/mL (P < 0.003). La citotoxicidad dirigida por las células mononucleares circulantes a células de mieloma aumentó después del trasplante (P < 0.002). La adición de células enriquecidas para NKG2D⁺ CD3⁺ CD8⁺ aumentaron la inmunidad específica de tumor, como se demuestra por un aumento de la lisis de células de mieloma autólogas (P = 0.02) (Meehan *et al.*, 2013).

2.6.3 Ensayos de inmunoterapia en modelos animales

Los modelos animales juegan un papel crítico en la evaluación de la inmunoterapia. Dada la función como factor de crecimiento de los linfocitos T la IL-2 ha sido ampliamente utilizada en numerosos protocolos de inmunoterapia; en ratas Wistar con cáncer de mama (LDLX43) Grupo 2 (12 ratas): recibieron una dosis diaria intratumoral de IL-2 (5×10^5 IU /día) por 7 días, y 1×10^7 TIL (linfocitos infiltrantes de tumores) que fueron inyectados cada 2 días por 6 días. Grupo 1 (10 ratas): grupo control. El grupo con inmunoterapia respondió en un 42%, del cual el 25% mostró una regresión parcial del tumor y el 17% mostró una regresión completa tumoral, mostrando infiltración linfocitaria, indicando que las células T median la respuesta antitumoral (Liu *et al.*, 1996). El requerimiento de células T específicas para antígeno en la erradicación del cáncer ha sido demostrada en múltiples modelos animales, sin embargo, la combinación con células dendríticas en terapia de células T autóloga requiere de intervalos óptimos de administración para obtener un sinergismo de ambos tipos

celulares. En un modelo murino, inoculados con adenocarcinoma (MC38/CEA2) se estableció un protocolo de inmunoterapia con células dendríticas y transferencia de células T específicas (ensayo *in vitro* IFN- γ Elispot), los ratones fueron inyectados (iv) con 1×10^7 células T y siguiendo con 1×10^6 (sc) células dendríticas, al día 1, 3 y 7. La administración al mismo tiempo de ambas células mostró un efecto de sinergismo (55×10^5 T), cuando el tratamiento fue solamente con células dendríticas el valor fue de (23×10^5 T) y aplicando solo células T (15×10^5 T), en este estudio se observó que las células T empiezan a decrecer al día 7 de la aplicación final, sin embargo vuelven a incrementar ante una inyección de CD. *In vivo* la combinación de células dendríticas y células T mostró mayor inhibición del crecimiento del tumor comparándola con la aplicación de células dendríticas única (Young *et al.*, 2007). El CTVT (tumor venéreo transmisible canino) en la actualidad es utilizado como modelo para el estudio de cáncer, por su característica inusual de poder ser transmitido entre todos los individuos de la especie canina, sin importar el haplotipo del MHC. Las células NK destacan por su gran potencial para destrucción de células tumorales en el organismo, sin embargo algunas células cancerígenas han desarrollado diferentes estrategias para escapar del efecto antitumoral de las NK, por ejemplo, a través de un efecto inmunosupresor por secreción de Factor de crecimiento tumoral β (TGF- β) en el microambiente tumoral. Se realizó un estudio para evaluar los efectos de la inmunoterapia *in vivo*, utilizando plásmidos IL-6 y IL-15 en un modelo de tumor venéreo transmisible en caninos (TVT). Se inocularon 6 perros Beagle, con una concentración de 1×10^8 células de un cultivo fresco TVT, vía subcutánea en la parte dorsal en 6 sitios, 15 días posteriores a la inoculación cuando las masas tumorales median 2 cm aproximadamente, se prosiguió con el tratamiento intratumoral de plásmidos mediado por electroporación; Grupo A (3 perros) IL-6, IL-15 (1mg/mL/cada una), Grupo B control, sin plásmidos. Los resultados observados fueron que el tratamiento con plásmidos inhibió el crecimiento tumoral, pero el tratamiento sin plásmidos permitió el crecimiento tumoral progresivo (6 cm). La expresión de MHC en células tumorales se incrementó de un 5.9% a un 34%. La proporción de TIL también se elevó significativamente $6.96 \pm 0.23\%$ a $21.63 \pm 5.40\%$. La IL-6 es utilizada como un antagonista de TGF- β . La IL-15 tiene un efecto promotor y de estimulación de las NK (Chung *et al.*, 2009). En un modelo murino se

realizó la transferencia de células CD8⁺ expandidas *in vitro* como tratamiento de tumores grandes establecidos B16 de melanoma. Se comprobó que además de la dosis de células (10⁴, 10⁵, 10⁶, 10⁷) y la reestimulación *in vivo* de antígeno, también influyó la dosis y tipo de citocinas incluyendo IL-2, IL-7, IL-15, e IL-21 en la regresión del tumor. El mayor efecto antitumoral, tamaño del tumor y supervivencia se observó con una dosis celular de 1x10⁷. Se encontró que la dosis de células dependía del estado de diferenciación de las células T, encontrando un efecto similar antitumoral con el uso de 10⁴ células madre de memoria central (TCM) en comparación con los ratones infundidos con 10⁷ linfocitos T CD8⁺ población total. Sorprendentemente, aunque el número total de IL-2 dosis se correlacionó con la regresión del tumor, ningún beneficio significativo se observó después de la administración de la sexta dosis. Por otra parte, las demás citocinas mostraron un efecto significativo similar antitumoral, con un efecto dependiente del aumento de la dosis (Klebanoff *et al.*, 2011).

En el 2011 se evaluó un protocolo de inmunoterapia (vacuna terapéutica) basada en la administración de células híbridas de TVT/célula dendrítica, en 3 perros Beagle se inocularon 1x10⁸ células de TVT vía subcutánea, 3 perros se utilizaron como control sin vacunar, 2, 4 y 6 semanas posterior a la inoculación se realizó en esquema de vacunación (1x10⁸ células fusionadas) y se obtuvieron los resultados, el grupo vacunado mostro una regresión tumoral en la semana 5 comparado con la regresión tumoral del grupo control que ocurrió en la semana 7, en esta etapa el tamaño del tumor sin vacunar fue de 174cm³, comparado con los 52cm³ del grupo vacunado (Pai *et al.*, 2011). Se realizó un estudio de inmunoterapia en roedores TA2 con cáncer de mama triple negativo (TNBC), 60 ratones se dividieron al azar en 3 grupos: grupo1: GM-CSF combinado con antígenos asociados a las células madre del cáncer de pecho y CpG; Grupo 2: DC-CIK: Infusión de células dendríticas con citocina inductora de NK; Grupo 3: PBS control. Después de la terapia al día 17, los tumores en el grupo 1 y 2 eran más pequeños de tamaño en comparación con el grupo PBS, al día 27 los tumores del grupo 1 eran más pequeños que los del grupo 2 y 3, todos los ratones del grupo 3 murieron al día 32. Al día 60, 8/10 ratones del grupo uno estaban vivos y en 3/8 hubo regresión completa del tumor, en el grupo 2 solo 2/10 vivieron. Los linfocitos del bazo del grupo

1 y 2 fueron activados, mostrando un 93.86%, 85.39% y 56.73% de células T CD3⁺ CD8⁺ para el grupo 1, 2 y 3 respectivamente (Xiaoyi *et al.*, 2013). Yang *et al.*, 2013 realizaron un estudio *in vivo* en un modelo murino (Balb/C), en el cual utilizaron células NK92 insensibles al TGF- β por modificación genética de este subtipo celular, a todos los grupos de ratones se les administró una dosis única de 1×10^6 células Calu-6 (carcinoma pulmonar) subcutáneamente al día 0 (24 ratones), como tratamiento los ratones del grupo A recibieron solución salina, los del grupo B fueron administrados con 1×10^7 células NK-92 transfectadas con un vector vacío y los del grupo C recibieron 1×10^7 células NK-92 transfectadas con pIRES2-AcGFP-DNT β R1 administradas por la vena de la cola al día 10 y 17 después de la administración de Calu-6. Todos los animales se sacrificaron al día 65. El volumen del tumor mostró una media de .302 cm³, .147 cm³, .047 cm³ en el grupo A, B y C respectivamente, al día 7 después de la segunda aplicación de células NK92, demostrando que las células NK modificadas previnieron el crecimiento tumoral. En el grupo C se vio disminuida la metástasis pulmonar ($p = 0.008$) y se incrementó la supervivencia, en el análisis de inmunohistoquímica de las muestras tumorales de los 3 grupos, no hubo infiltración de linfocitos en el grupo A y B, en el grupo C se observó gran cantidad de linfocitos infiltrantes, concluyendo que la terapia adoptiva de células NK modificadas incremento la respuesta inmune antitumoral. El uso de vacunas de DNA se ha llevado a cabo mediante la inmunización con secuencias nucleotídicas en animales que codifican para una proteína contra la que se busca obtener protección, bacterias, virus y cáncer, despertando una respuesta inmune de tipo Th1 o Th2 de la vía de inoculación de la vacuna. En un estudio con DNA xenogénico de pollo se buscó superar la barrera de tolerancia inmunológica por antígenos asociados a tumor expresados por TVT en perros, proteína shock térmico 70 (HSP70), en TVT se ha reportado la sobre-expresión del antígeno propio HSP70. Se implementaron tres estrategias de vacunación con DNA xenogénico de pollo, la primera fue profiláctica en la cual se aplicó 100 μ g DNA en cada vacuna (3 dosis), la primera y segunda vacuna por vía intradérmica seguida con inoculación del TVT, 15 días después se aplicó una vacuna por vía intramuscular. El segundo esquema consistió en lo mismo pero la tercera vacuna se aplicó vía intradérmica también. El tercer esquema fue terapéutico se inoculo TVT en el día 1 y

una semana después se aplicó 100µg de DNA, la segunda y tercer vacuna fueron una y tres semanas después respectivamente, todas por vía intradérmica. Los resultados muestran inhibición del crecimiento tumoral utilizando la primera estrategia de vacunación, la cual fue terapéutica y utilizo como variante la vía intramuscular para inoculación del DNA, en esta el crecimiento tumoral fue suprimido a partir de la semana seis logrando una regresión completa a la semana doce post-inoculación del TVT, contrario al grupo control que presentaban constante crecimiento hasta la semana 18 que fue el fin del experimento. Los otros dos grupos experimentales no presentaron regresión tumoral (Ying *et al.*, 2011).

2.7 IL-21 y activación de linfocitos T

Las células dendríticas maduras presentan moléculas de MHC cargadas con antígeno a linfocitos T CD8⁺ actuando como señal 1 de activación, TCR-MHC, las moléculas co-estimuladoras (por ejemplo CD80⁺, CD68⁺) actúan como Señal 2 y finalmente las citocinas actúan como señal 3 en el proceso de generación de células T CD8⁺ efectoras funcionales. La principal función de los linfocitos T CD8⁺ citotóxicos linfocitos (CTL), es destruir células infectadas viralmente y células transformadas malignas. El encuentro con el antígeno entre una célula T CD8⁺ y una CD induce la adquisición de funciones efectoras citotóxicas. Estas funciones son predominantemente mediadas por la liberación de perforina, una proteína que altera la membrana y granzimas, una familia de proteasas de serina (Rochman *et al.*, 2009). Las citocinas son las proteínas de comunicación del sistema inmunitario, que tienen funciones importantes relacionadas con la proliferación, diferenciación y supervivencia. Las citocinas se secretan como moléculas de señalización con efectos decisivos sobre la hematopoyesis, la inmunidad innata y adaptativa (Boyman *et al.*, 2007). Aunque la IL-2 fue identificada en 1976 y aprobada para uso clínico en 1992, el entendimiento sobre su función efectora aún sigue evolucionando. IL-2 promueve la activación y proliferación de CD8⁺ y puede inducir la regresión del cáncer cuando se administra a pacientes. Sin embargo, la IL-2 también induce la muerte celular (AICD) y el desarrollo de las células T reguladoras (Waldmann, 2006), por lo que es necesario la evaluación de diferentes citocinas para el desarrollo de CD8⁺. La interleucina 21 (IL-21) es una novedosa citocina producida por

las células activadas del subtipo T CD4⁺, células T asesinas naturales (NKT) y CD. La IL-21 es parte de una familia de citocinas que incluyen a IL-2, IL-4, IL-7, IL-9 e IL-15 que tienen en similitud compartir el receptor de IL-2 cadena γ común (γ_c) también conocido como CD132. La glicoproteína γ_c es un miembro de la familia de receptores de citocina tipo 1 que se expresa en la mayoría de las poblaciones de linfocitos. Por otro lado el receptor de IL-21 (IL-21R) se expresa ampliamente tanto en células de linaje mieloide y linfoide (Spolski and Leonard, 2007). IL-21 tiene como acción la co-estimulación de la diferenciación de células B y producción de inmunoglobulinas, actúa como mitógeno de células T, estimulación de NK y diferenciación de T CD8⁺ citotóxicos. Inicialmente la IL-21 fue reconocida por su propiedad anti tumoral en varios modelos preclínicos de cáncer, que justifican su desarrollo clínico como una inmunoterapia del cáncer. Por otra parte, la IL-21 aumenta la capacidad de las células T CD8⁺ para mediar la regresión del tumor en la terapia autóloga. Por su capacidad para promover respuesta antitumoral mediada por CTL, la IL-21 ha entrado en ensayos clínicos humanos en pacientes con melanoma metastásico y carcinoma de células renales (Thompson *et al.*, 2008). La IL-21 al igual que la IL-2 están codificadas por genes adyacentes, separados por aproximadamente 180kb en los seres humanos y 95 kb en ratones, presentan secuencias similares de intrones y exones, lo que sugiere que surgieron por la duplicación de genes, también gran homología en cuanto a estructura. IL-21R está más estrechamente relacionada con la IL-2R β (Parrish *et al.*, 2002). Al igual que la IL-2, la IL-21 puede promover la función efectora de citotoxicidad en células T CD8⁺. Se sabe que la IL-21 regula positivamente la función efectora citotóxica y la expresión de la molécula co-estimuladora CD28. Por otra parte, IL-21 promueve la actividad antiviral del VIH-1 inhibiendo su replicación *in vitro*. Por lo tanto, la IL-21 puede ser una molécula favorable para la inmunoterapia y un adyuvante de vacuna adecuado en individuos infectados por el VIH. IL-21 induce su función por la fosforilación de STAT3. Por el contrario, las demás citocinas de la misma familia preferentemente activan STAT5 (Hinrichs *et al.*, 2008). En un estudio se comparó el potencial citotóxico de células T cultivadas con IL-21 o IL-2, IL-7, IL-1 y reactivadas con antiCD3. La lisis dirigida a células diana promovidos por los linfocitos T pre activados con antiCD3 y estimulados con IL-21 fue aproximadamente dos veces mayor

que lo observado por las otras citocinas ($p < 0.01$). La adición de ácido (EGTA) durante el ensayo de citotoxicidad redujo la lisis de las células blanco, lo que sugiere que la actividad de citotoxicidad promovido por la IL-21 es dependiente en gran medida del Ca^{2+} que induce la liberación de gránulos citotóxicos. Para confirmar estos datos, se analizó la transferencia de granzima B de LTc a las células diana. Las células efectoras y diana se co-cultivaron en una relación de 10:1 en presencia de solución de sustrato granzima B. la transferencia de la actividad de granzima B impulsado por las células T estimuladas con IL-21 fue significativamente más alto que el promovido por las células tratadas con IL-2 ($p < 0.05$). La adquisición de moléculas citotóxicas en la linfocitos T estimulados con IL-21 es acompañado por la expresión sostenida de marcadores característicos de las células T de memoria (BCL6, CD27⁺, CD28⁺, CD62L y CD127⁺).

Esta observación es consistente con otros estudios que describen la acumulación *in vivo* de células T CD8⁺ de memoria en ratones transgénicos que sobreexpresan IL-21. Las células T de memoria son capaces de auto-renovarse y mantener la capacidad para la proliferación y la diferenciación secundaria. Por lo tanto, la IL-21 se consideraría favorable para la inmunoterapia adoptiva con linfocitos T CD8⁺ citotóxicos estimulados por esta citocina (Parmigiani *et al.*, 2011).

2.8 Tumor Venéreo Transmisible (TVT)

El Tumor Venéreo Transmisible Canino (TVT) también conocido como linfosarcoma transmisible, sarcoma infeccioso, tumor de Stiker o granuloma venéreo es una enfermedad tumoral genital que se presenta en perros (*Canis familiaris*) de ambos sexos (Kennedy *et al.*, 1977). Aunque de manera experimental puede ser transmitido a miembros de la familia canidae como coyotes, lobos y zorros. Se describió por primera vez en 1876 por Nowinsky como un tumor cuya transmisión ocurre por trasplante de células tumorales viables entre perros durante el contacto físico-sexual (Harmelin *et al.*, 2002). Tumor venéreo transmisible (TVT) es conocido por ser un tumor inusual, con una característica transmisión diferente al resto de los tumores hasta la fecha estudiados, su propagación clonal ha perdurado desde su origen (250-2500 años atrás), junto con la enfermedad tumoral facial del demonio de Tasmania (DFTD) que afecta a miembros de la especie

Sarcophilus harrisii son los únicos tumores llamados cánceres contagiosos no inducidos por microorganismos (Murchison, 2009), ya que pueden trasplantarse entre todos los individuos de su respectiva especie sin importar el haplotipo del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) entre el donador y receptor (Hsiao *et al.*, 2002). Por lo tanto desde su descubrimiento científicos alrededor del mundo se han dado a la tarea de utilizar el TVT como un modelo popular de estudio del cáncer; enfocándose principalmente en los mecanismos de evasión utilizados por el TVT para escapar de la vigilancia del sistema inmunológico y estudios de trasplante de tumor antes del desarrollo de modelos singénicos de roedores, aunque para tener más de un siglo de haberse descrito, hoy en día su naturaleza de propagación clonal entre individuos y rompimiento de las reglas de la barrera conocida como MHC es pobremente entendido (Siddle and Kaufman, 2013), sin embargo, algunos autores apoyan esta teoría de la transmisión clonal del cáncer, donde proponen que el TVT es causado por la propia célula cancerígena que es trasplantada e implantada en el nuevo individuo, es decir, la misma célula tumoral es el agente infeccioso que se desarrolló como un parásito y adquirió la capacidad de poder ser transmisible, siendo el único tumor que puede ser trasplantado entre individuos de la misma especie superando la barrera del complejo mayor de histocompatibilidad (Mukaratirwa and Gruys, 2003). Por el contrario otros investigadores sugieren que el TVT tiene causa viral, ya que en estudios con células neoplásicas de TVT han encontrado la presencia de partículas virales de la familia del papilomavirus (Allejo and Gimbo, 1965), este tema todavía presenta controversia, por lo que el agente etiológico es aún desconocido.



Figura 3. Tumor con forma de coliflor característico de TVT en la vagina de una hembra
(Fotografía tomada y modificada de Pineda *et al.*, 2010).

La distribución del TVT es mundial, ha sido reportado en los cinco continentes y no tiene predisposición alguna, ya sea por raza o sexo dentro de la especie canina, pudiendo estar en mayor riesgo aquellos canidos que han pasado la etapa de madurez sexual y que están en constante contacto físico, se presenta con alta prevalencia en regiones tropicales, considerada endémica de estas zonas, encontrándose principalmente en poblaciones de canidos de vida libre (Chiang *et al.*, 2012). La exfoliación y trasplante de células es su principal forma de transmisión. Naturalmente su propagación ocurre entre canidos a través del contacto sexual (coito), sin embargo, también se menciona el contagio del tumor por mordeduras, lamidos o rascados de zonas infectadas por individuos susceptibles. La implantación del tumor se ve facilitada por la presencia de cualquier lesión en la mucosa o pérdida de su integridad. TVT presenta una localización predominante en las membranas mucosas de órganos genitales (**Figura 3**); la base del pene en machos y vestíbulo de la vagina en hembras, también se ha reportado metástasis en cachorros o perros inmunocomprometidos hacia regiones extragenitales como ojo, nariz, pulmón, hígado, cerebro, piel, bazo y ganglios linfáticos cercanos al tumor (Ramírez *et al.*, 2010).

Por otro lado de manera experimental el TVT presenta un comportamiento de crecimiento característico conformado por 3 etapas que culmina con su regresión espontánea a partir de las diecisiete semanas después de su inoculación; primero con una fase de crecimiento progresivo con duración de doce semanas, una fase estática sin disminución o crecimiento alguno (cinco semanas) y una fase de regresión tumoral que se presenta después de la semana diecisiete post-inoculación con un período de duración de dos a doce semanas, conociendo poco del mecanismo celular y molecular que conlleva a su regresión espontánea, sin embargo, no hay reportes que concluyan con datos, cifras o frecuencias sobre la aparición de una u otra forma de presentación: metastásica o de regresión espontánea del TVT en la naturaleza, aunque se cree que la aparición de una forma de presentación o la otra dependa del estado del sistema inmunológico (Linfocitos infiltrantes de tumor y citocinas, respuesta humoral), por ejemplo la metástasis aparece en perros irradiados o cachorros recién nacidos inoculados experimentalmente, o contrario aquellos individuos que se han recuperado de la enfermedad son protegidos frente a la re-

infección, también se ha observado menor susceptibilidad a la enfermedad en cachorros cuyas madres estuvieron expuestas al TVT (Salamanca *et al.*, 2008).

2.8.1 Características clínicas y citológicas del TVT

El TVT es un tumor con rara mortalidad, que responde de manera eficiente a protocolos de quimioterapia (90% efectividad) (sulfato de vincristina 0.5-0.7mg/m², cada semana por 2-8 semanas) y radioterapia, sin embargo, puede haber un 58-68% de recurrencia en los casos tratados (González *et al.*, 2000). El periodo de incubación es de 15-60 días después de su inoculación, puede crecer lentamente o ser rápidamente invasivo. El TVT es un tumor de órganos genitales vulva y pene de los canidos (presencia de descarga vulvar y prepucial). En la clínica se puede describir al tumor del TVT con la apariencia de una coliflor con un diámetro 10 cm o más, conformada por múltiples pequeños nódulos que pueden observarse a partir de los 15 días-6 meses después del contagio, la masa presenta una apariencia friable y coloración rojiza de la cual se desprende sangre de manera constante que fluye al exterior de la vagina o pene, siendo un signo clínico típico del TVT que puede ser confundido en hembras con la etapa de celo, en muchas ocasiones el tumor puede estar combinado con infecciones secundarias oportunistas que le dan a la zona genital una apariencia blanquecina y exudativa. En el macho puede aparecer como signo clínico la fimosis del pene (De la Sota *et al.*, 2000). Al análisis microscópico (**Figura 4**) se observa un cultivo de células con forma de redonda a poliédrica, con un núcleo central y prominente nucléolo, 1 o 2 nucléolos, el citoplasma es ligeramente granular, con presencia de vacuolas y eosinofílico, sin embargo, se han descrito 2 tipos de células en las diferentes etapas de TVT (progresión y regresión), en la primera con apariencia redonda y microvellosidades y en la etapa de rechazo con apariencia fusiforme. Al análisis histopatológico TVT es un tejido homogéneo cuyas células crecen con frecuencia en hileras. Como se comentó al principio el TVT no tiene predisposición por el sexo, pero algunos autores mencionan mayores casos de metástasis en hembras que en machos, sugiriendo sensibilidad hormonal, mientras que otros manifiestan mayor predisposición en machos. En perros con TVT con tumores voluminosos se puede observar en agrandamiento de ganglios linfáticos regionales (Harmelin *et al.*, 2002).

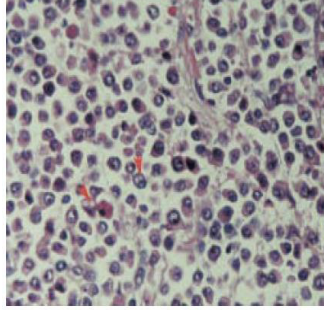


Figura 4. Microscopia de células de TVT con aspecto vacuolar en el citoplasma (Fotografía tomada y modificada de Salamanca *et al.*, 2008).

2.8.2 Origen e inmunogenética del TVT

Los genes DLA (Dog leukocyte antigens) clase I y clase II en el perro (complejo mayor de histocompatibilidad) son altamente polimórficos. Genes clase I: DLA12, DLA79, DLA88 y DLA64. Genes clase II: DLA-DRB1, DLA-DQA1, DLA-DQB1 y DLA-DRA1. Hasta la fecha han sido reportadas, 100 DLA-DRB1, 18 DLA-DQA1 y 47 DLA-DQB1 secuencias alélicas para clase II. DLA 88 clase I es el más polimórfico clase I, 51 alelos han sido identificados (Wagner *et al.*, 2000). El TVT se clasifica en el grupo de tumoraciones de células redondas junto con los linfosarcomas, mastocitomas e histiocitomas. El cariotipo aneuploide del TVT a través de los años ha permanecido estable, se analizaron perros de Europa, Asia, América, Sudamérica y África y todos presentaron 57-59 cromosomas difiriendo con las 78 cromosomas presentes en las células normales del perro, este cariotipo incluye 15-17 cromosomas metacéntricos difiriendo de los 2 cromosomas metacéntricos del perro, estas similitudes encontradas en todas las muestras procedentes de los 5 continentes sugieren un origen común del TVT (Bridgett and Ostrander, 2006). La hipótesis de que el TVT es causado por la propia célula que puede ser trasplantada como un aloinjerto se basa de estudios en los cuales se analizaron microsatélites, DNA mitocondrial y el locus del complejo mayor de histocompatibilidad del perro (DLA) y de una célula con TVT. Un dato importante es que el tumor solo puede ser trasplantado por células viables de TVT y no por células muertas o filtrados celulares, como se mencionó antes el cariotipo aneuploide de 59 cromosomas se mantiene en todas las muestras tomadas de distintas partes del mundo, un marcador utilizado como diagnóstico molecular

de TVT es la inserción de LINE 1 (transposable genetic element sequence) cerca del oncogen Myc-c (5' primer exón) se ha encontrado en todos los especímenes analizados hasta la fecha, pero que no se encuentra en las células normales del hospedador, todas estas características sugieren que el agente causal del TVT es la misma célula Murgia *et al.*, 2006).

Mukaratirwa and Gruys, 2003 mencionan resultados similares analizando muestras de TVT de Francia, Jamaica, Japón, Kenia, Nigeria, Uganda, URSS y EUA, mismo número de cromosomas en todos los tumores (59 cromosomas), misma frecuencia de cromosomas metacéntricos, esto se mantiene después de varios pasajes *in vitro* e *in vivo*. El número de cromosomas se mantiene en el lugar primario y durante la metástasis a tejidos distantes (cerebro). Rearreglos del ADN que se mantienen en todos los tumores (Line 1 cerca de c-Myc). Incluso en un modelo de xenoinjerto de TVT, en ratones SCID, las células tumorales de TVT retienen las características antes mencionadas. En un análisis de comparación con muestras de TVT de diferentes países, se evaluó el DLA (4 genes) de los hospedadores con tumor y los genes del MHC de la célula de TVT y se mostró que en todos los casos el DLA (MHC clase I los exones 2 y 3 DLA88, MHC clase II exón 2 de DRB1, DQB1, DQA1) de todas las muestras el haplotipo del hospedador y de la célula de TVT era diferente, pero se confirmó que haplotipo de todos los tumores era el mismo (**Figura 5**). Se llevó a cabo la amplificación por PCR de 21 microsatélites que están dispersos en diferentes cromosomas en la célula normal del perro y se compararon en 11 perros de 5 los continentes las secuencias del tejido normal y las secuencias del tejido afectado con TVT, mostrando que los tumores y el tejido normal están genéticamente separados, logrando agrupar todas las muestras tumorales y presentando similitudes genéticas las neoplasias evaluadas de los 5 continentes (Chianga *et al.*, 2013).

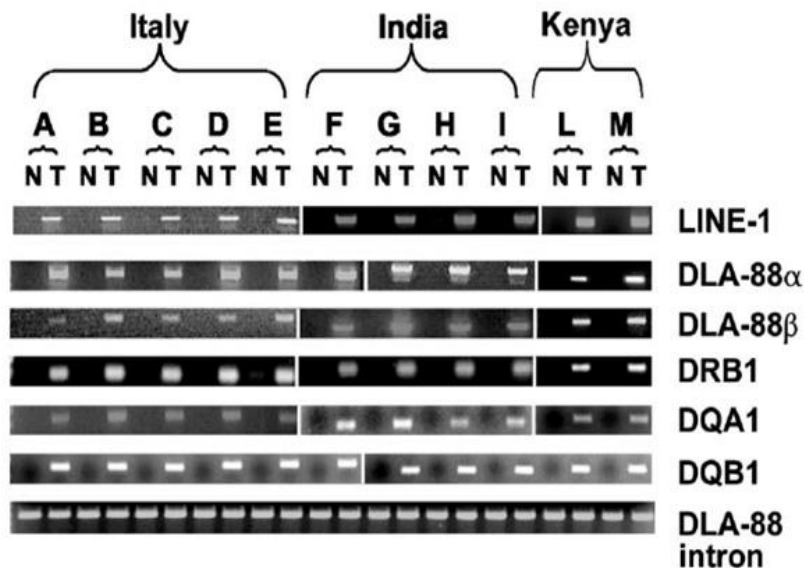


Figura 5. Amplificación por PCR de marcadores característicos de TVT, DLA clase I y II y line1 en **perros con tumor** (Fotografía tomada y modificada de Murgia *et al.*, 2006).

Algunos autores han propuesto que debido a la diferencia marcada en el DLA y secuencias de microsatélites entre el perro y el TVT este último puede que presente un origen diferente a su hospedador, el alelo DQB1 ha sido reportado en el lobo gris (*Canis lupus*) de Norteamérica y DQA1 ha sido reportado en perros de Asia (Huskies), el TVT presenta 2 alelos no descritos en el DLA del perro: DLA88 y DRB1 que están relacionados en el lobo gris y con perros de Asia, este análisis de DLA sugiere que el origen del TVT está en el *Canis lupus* o algunas cruces de razas antiguas de perros de Asia (**Figura 6**) y que todos los tumores en la actualidad de TVT datan de una célula ancestral común que surgió hace 250-2500 años (Murgia *et al.*, 2006). Choi and Kim, 2002 demostraron una mutación del gen *p53* a nivel del codón 316 (posición de nucleótido 964 de una T a una C, una mutación en este punto cambia el aminoácido codificado de fenilalanina a serina) en la célula de TVT, sugiriendo ser la razón etiológica del TVT. Sin embargo, recientemente (Vásquez-Mota *et al.*, 2008) han demostrado que esta mutación pudo ser adquirida en un estadio tardío del origen clonal del TVT. Además, argumentan que dada la alta mutabilidad de este gen se pueden generar diversas variantes genéticas del TVT en diferentes partes del mundo.

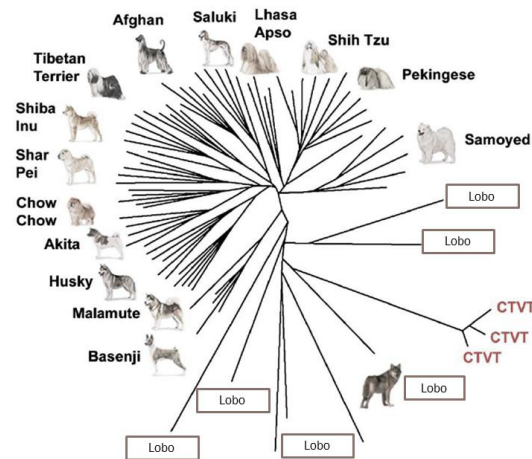


Figura 6. Relación de lobos y perros con TVT (Fotografía tomada y modificada de Murgia *et al.*, 2006).

Las proteínas de shock térmico son moléculas relacionadas con el stress celular, etapa en la cual son abundantes, ejemplos de estas son HSP60, HSP70, HSP90 y HMGB1 que activan a macrófagos y células dendríticas a través de los TLR (receptores tipo Toll) y estimulan la secreción de IL-12. Algunas células tumorales son caracterizadas por la liberación de moléculas de stress (melanoma, carcinoma renal), TVT es caracterizado por la secreción de HSP60, HSP70 por lo cual se puede utilizar estas proteínas como marcadores moleculares ya que en tejidos normales del hospedador la presencia de ambas proteínas son indetectables, HSP60 está relacionada con la etapa de regresión tumoral.

Las células de TVT son termoresistentes por lo cual esta característica puede estar conferida por HSP60 y HSP70. Con base en las proteínas de shock térmico en TVT, esta puede ser utilizada como antígeno para el desarrollo de vacunas a base de ADN xenogénico (Chu *et al.*, 2001). Mayor cantidad de linfocitos infiltrantes de tumor, moléculas de MHC II y anticuerpos son detectados en la fase de regresión tumoral del TVT comparado con la fase de progresión tumoral en la cual la cantidad de TIL es menor, esto fue confirmado en un estudio de inmunohistoquímica en el que se evaluó la presencia de linfocitos T CD3⁺, linfocitos B (CD79⁺), macrófagos (L1), subclases de IgG2, IgG3, IgG4 y MHCII utilizando anticuerpos específicos, obteniendo como resultado que el

número de células y moléculas reactivas fue más alto en la etapa de regresión tumoral ($p < 0.05$), sugiriendo que estas células y moléculas están implicadas en el proceso de rechazo del TVT, con la participación de macrófagos, linfocitos T en conjunto con (linfocitos B) células plasmáticas productoras de IgG2, IgG3, IgG4 (vía citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo) (Perez *et al.*, 1998).

2.8.3 Inmunofenotipo del TVT

En un estudio de 14 casos de TVT se emplearon diferentes anticuerpos monoclonales para una variedad de antígenos de superficie y citoplasmáticos (**Tabla 1**), encontrando reactividad al antígeno ACM1 en 11 de 14 casos (sistema fagocítico mononuclear), lisozima en todos los casos (histiocito), enolasa neuronal específica en 11 de 14 (neuronas y células de schwann), vimentina en 10 de 14 (células mesenquimales), proteína ácida glial fibrilar (4 de 14) y desmina (1 de 14), sugiriendo un origen histiocítico (Marchal *et al.*, 1997). También se ha reportado la presencia del marcador A-1 antitripsina en células de TVT (Mukaratirwa and Gruys, 2003). Los antígenos MHC se expresan en muy bajo porcentaje en células de tumor venéreo transmisible, por lo que esta característica puede llevar a cabo con éxito el trasplante tumoral en perros adultos inmunocompetentes. En la fase 1 de progresión las células tumorales carecen ambas clases de MHC, pero en la fase de regresión las células expresan de un 30-40% de MHC de ambas clases, por lo que esto puede producir una respuesta inmune adicional que permita el rechazo del tumor (Pérez *et al.*, 1998).

Tabla 1. Caracterización inmunofenotípica del TVT (Fotografía tomada y modificada de Mukaratirwa and Gruys, 2003).

Marcadores del TVT

Ab específico	Especificidad celular	Resultado
Queratina	Células epiteliales	-
Vimentina	Células mesenquimales	+
Desmina	Células musculares	-
α -SMC	Células musculares	-
CD3	Linfocitos T	-
IgG e IgM	Linfocitos B	-
Lisozima	Histiocitos	+
ACM1	Histiocitos	+
α -lantitripsina	Histiocitos	+

2.8.4 Etapas del TVT: Crecimiento y regresión

El TVT de forma experimental es caracterizado por una fase de rápido crecimiento (Progresiva, P) que ocurre después de la implantación de las células viables sobre la mucosa epitelial, durante la cual solo un pequeño porcentaje de células 1-3% presentan moléculas del MHC clase I y MHC clase II sobre su superficie plasmática, algunos tumores llevan a cabo el silenciamiento de genes relacionados con el procesamiento del antígeno como TAP 1 y 2, LMP 2 y 7, calnexina, $\beta 2$ microglobulina o cadenas de MHC, por lo cual no pueden ser formadas las moléculas del MHC o estas no pueden exponerse de manera estable en la superficie celular (Hsiao *et al.*, 2002), esto trae como resultado la evasión del sistema inmune que no puede reconocer al CTVT como aloMHC y llevar a cabo su rechazo debido a la poca cantidad de las moléculas de histocompatibilidad en células tumorales por lo cual la inmunidad adaptativa por medio de los linfocitos TCD8+ son incapaces de montar una respuesta de citotoxicidad, por otro lado algunos investigadores han relacionado la secreción de TGF- $\beta 1$ por parte de las células tumorales tanto en la etapa de progresión como en la etapa de regresión (R), TGF- $\beta 1$ es reconocida por sus efectos reguladores del sistema inmune, inhibición de generación de células dendríticas a partir de monocitos, inhibición de la actividad de NK y células LAK, disminución de la maduración y proliferación de timocitos y células B, mayor apoptosis de NK y menor transcripción de Bcl-2 (Liao *et al.*, 2003). Sin embargo, la citocina inmunosupresora TGF- β estaría relacionada con el bloqueo de las células del sistema inmune innato NK (natural killer), estas tienen como blanco la lisis de células que expresan bajas cantidades de MHC en la superficie, por lo cual la disminución de expresión de MHC clase I y II aunado a la secreción del TGF- β son necesarias para escapar de la inmunovigilancia por parte del tumor manteniendo un estado de inmunosupresión en el microambiente tumoral y conllevando a una ineficacia por parte de la inmunidad innata y adaptativa en esta etapa de progresión tumoral, se ha investigado la presencia de linfocitos infiltrantes de tumor (TIL) en las etapas del TVT (Hsiao *et al.*, 2004), sugiriendo la presencia de CD5⁺/CD25⁺ reguladores en la etapa de crecimiento tumoral. La etapa antes mencionada es seguida por una fase de estasis tumoral (S) la cual se caracteriza por no haber crecimiento ni disminución del tamaño tumoral, con una duración de 5 semanas. En algunos casos el rechazo de tumor se lleva a

cabo de manera espontánea, etapa de regresión (R), la principal característica de esta fase es el aumento de moléculas del MHC clase I y II en la superficie de las células (40%), la secreción de TGF- β es sostenida aquí también, se ha demostrado la presencia de subpoblaciones de TIL (CD4⁺, Th1) secretadores de citocinas neutralizantes de TGF- β , como la IL-6, que estaría relacionada de manera indirecta y sinérgica en el funcionamiento y actividad del IFN γ sobre las células tumorales con aumento de expresión de MHC clase I y II, activación de macrófagos, cambios de subclase de IgG por linfocitos B y mayor diferenciación a Th1, también se ha reportado la presencia de IL-15 que presenta un papel crítico que conduce a la activación de células NK y manteniendo la actividad antiapoptótica Bcl-2, por lo tanto se atribuye el rechazo del tumor a la vía linfocitos TCD8⁺ y células NK, aunado a una respuesta humoral, participando en conjunto la inmunidad adaptativa e innata. Se ha demostrado que la IL-6 es una importante molécula iniciadora de la reversión tumoral que participa en la transición de la etapa de progresión hacia regresión, algunos genes involucrados en la activación de la IL6 por los TIL son PLTP que participa como mediador de la inflamación, GPNMB (expresado en células dendríticas participando también en la diferenciación a Th2) y TIMD-4 secretado por células T y macrófagos. Algunos autores mencionan en la etapa de regresión la presencia de células Th17 que están implicadas en patologías autoinmunes y que son generadas en presencia de IL-6 y TGF- β , los genes expresados por Th17 fueron detectadas mediante RT-PCR amplificando IL-17C, IL-17A e IL-21 por lo que las Th17 pudieran también participar en el rechazo del TVT (Hsiao *et al.*, 2008 c). Las células dendríticas participan en la respuesta inmune innata y adaptativa, teniendo un papel crítico en la presentación de antígenos específicos de tumor e inicio de la respuesta inmune por los linfocitos T. TGF- β 1 es un factor secretado por TVT que participa en disminución de maduración de células dendríticas (CD) a través de menor expresión de CD1a, CD40, CD83, CD86, CD80 y MCH II sobre la superficie de estas, con una consecuente baja habilidad para llevar a cabo sus funciones. Se ha encontrado relación en la expresión de IL-6 con la restauración de la actividad funcional de CD, atribuido al bloqueo de translocación del factor nuclear Smad 2/3 en célula dendríticas (Lin *et al.*, 2013). En un estudio se evaluó en sangre periférica la población de linfocitos B y anticuerpos después de la inoculación con el tumor, en etapa de progresión y regresión de TVT, la proporción de linfocitos B decreció después de la

inoculación con TVT, lo mismo ocurrió con la concentración de anticuerpos, después de la regresión tumoral los linfocitos B y anticuerpos retornaron a sus niveles normales, se reportó la presencia de una molécula citotóxica sensible al calor proteinasa K que destruye los linfocitos B de sangre periférica (Liao *et al.*,2003). El suero de perros en fase de crecimiento tumoral inhibió la respuesta de linfocitos a células viables de TVT, sin embargo el suero de perros en fase de regresión tumoral mostró mayor actividad del sistema inmune inhibitoria contra células de TVT, sugiriendo la participación de la respuesta humoral *in vivo* en el rechazo de TVT, por lo cual una manera de evadir la respuesta inmune por parte del tumor es la depleción de linfocitos B con disminución en la concentración de anticuerpos para prevenir su rechazo.

3. HIPOTESIS

La terapia autóloga con linfocitos T CD8⁺ estimulados con antígeno tumoral total e IL-21 afecta el crecimiento del tumor en caninos inoculados con TVT.

4. OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GENERAL

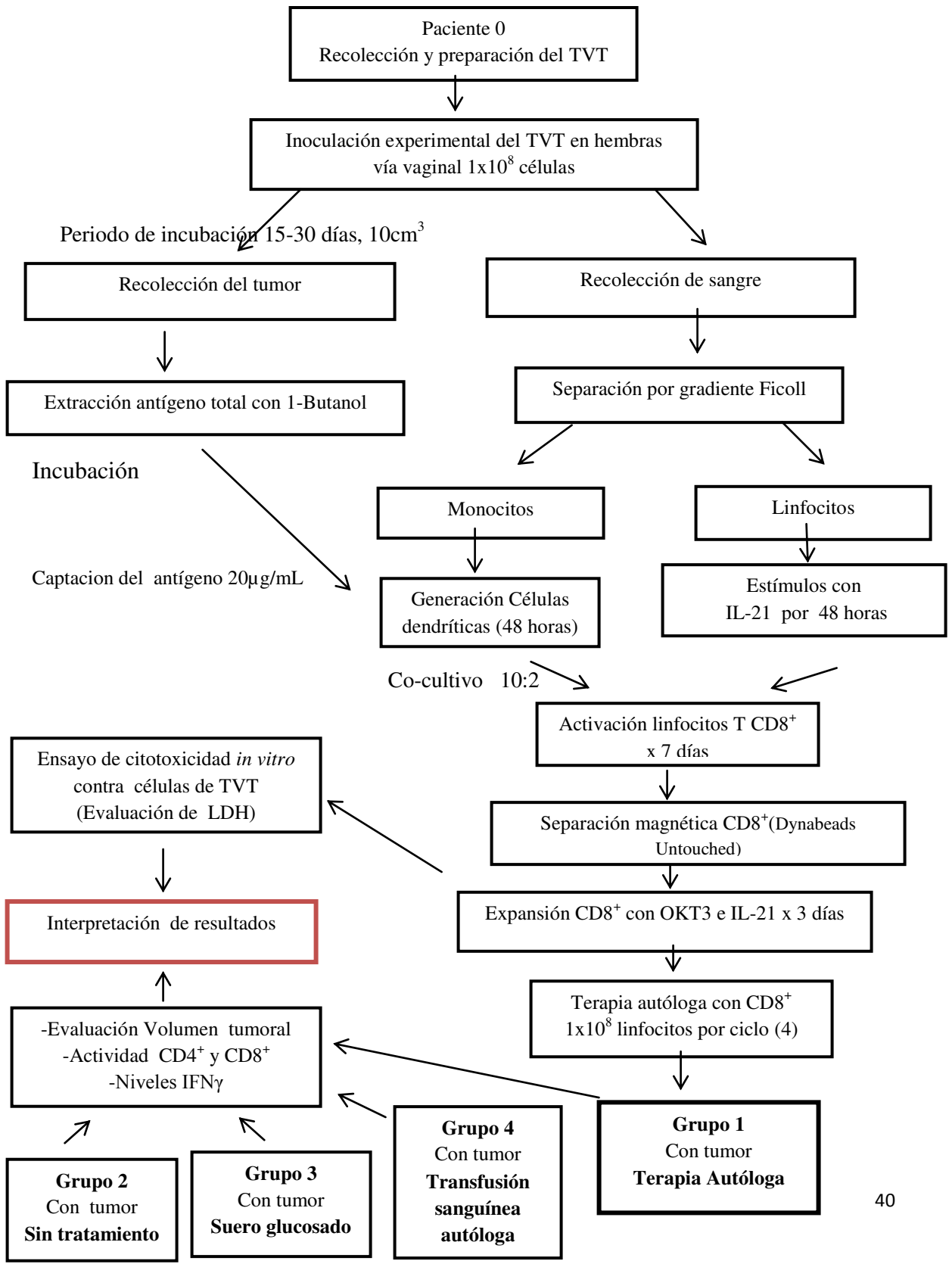
Evaluar el efecto antitumoral de la terapia autóloga con linfocitos T CD8⁺específicos de tumor en caninos inoculados con TVT.

4.2 OBJETIVOS PARTICULARES

- Generar linfocitos T CD8⁺ específicos del TVT utilizando CPAs y estímulos de IL-21.
- Determinar la actividad citotóxica de los linfocitos T CD8⁺ contra las células de TVT *in vitro*.
- Comparar el volumen tumoral en caninos con o sin terapia autóloga específica de TVT.
- Cuantificar las poblaciones de linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺ en sangre periférica de caninos con terapia autóloga específica de TVT.
- Determinar la actividad de los linfocitos T mediante cuantificación de los niveles de IFN- γ en suero de caninos con terapia autóloga específica de TVT.

5. MATERIAL Y METODOS

5.1 Diseño experimental



5.2 Recolección del Tumor Venéreo Transmisible

Una muestra tumoral se obtuvo de una hembra canina labrador de 3 años de edad con Tumor venéreo transmisible canino (paciente 0), este paciente no recibió previo tratamiento de cirugía, quimioterapia o radioterapia, la muestra tumoral tomada de la vagina fue preparada y cultivada en DMEM (véase adelante), posterior a esto se realizó un conteo de exclusión celular con azul de tripan y se prepararon alícuotas de células tumorales de TVT (1×10^8 células) las cuales se inocularon a los animales descritos en los grupos de trabajo (Hsiao *et al.*, 2002). La muestra tumoral fue identificada y diagnosticada como TVT por la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la UANL presentando las siguientes características: localización del tumor en órgano genital vagina en la cual se encontraron múltiples nódulos de 2-3 cm con aspecto de coliflor los cuales presentaron una consistencia friable con zonas de hemorragias. En la histopatología se encontró una morfología celular; 14-30 μ M, redonda a poliédrica, núcleo central, 1 o 2 nucléolos, citoplasma ligeramente granular con presencia de vacuolas, también se encontraron múltiples linfocitos que infiltraban al tumor.

El presente estudio fue implementado con perros de raza mixta (hembras) de 1-3 años de edad, adquiridos en el centro antirrábico del municipio de Guadalupe, Nuevo León, los cuales fueron seleccionados con base en los siguientes criterios: libre de las enfermedades infecciosas; Parvovirus canino, Destemper canino y Erliquiosis determinado con el uso del kit comercial prueba rápida IDEXX, libre de endoparásitos y ectoparásitos, condición corporal 3 según el sistema de medición 1-5, aparato reproductor completo y sexualmente maduros. Se utilizaron 12 perros distribuidos en los diferentes grupos de trabajo (**Tabla 2**). Durante el desarrollo del experimento los animales tuvieron acceso libre al agua limpia y alimento 2 veces al día, mañana y tarde. Los perros fueron mantenidos individualmente en jaulas de cemento: 1.20m x90cm x90cm, las instalaciones corresponden al Centro Antirrábico del municipio de Guadalupe, Nuevo León, a cargo del MVZ Rubén Hernández, los animales fueron supervisados diariamente durante el tiempo del experimento y siempre actuando en

favor de las necesidades de cada animal, atendiendo y fomentando el bienestar de los mismos (Chou *et al.*, 2009).

Tabla 2. Grupos de cánidos.

Grupos	Tratamientos	Animales por grupo
1. Experimental con Tumor	Terapia autóloga	3
2. Control con tumor	Sin Tratamiento	3
3. Control con tumor	Suero glucosado	3
4. Control con tumor	Transfusión sanguínea autóloga	3

5.2.1 Cultivo primario de las células de TVT

Una muestra tumoral de 10 gramos fue tomada de la vagina, la biopsia tumoral fue extraída quirúrgicamente de la hembra con TVT (paciente 0), el canido fue tranquilizado con xilazina al 10% y anestesiado localmente con lidocaína, como analgésico se utilizó carprofeno vía subcutánea, todo el proceso se realizó de manera aséptica, el tejido tumoral fue depositado en 90 mL de solución PBS 1X estéril la cual contiene 100 UI/mL de penicilina, 100UI/mL de estreptomycinina y 25 µg/mL de anfotericina B (anti-anti Gibco 100X), posteriormente la muestra se sometió a digestión mecánica y enzimática con tripsina (tripsina-EDTA .25%, Gibco) incubando a 37°C por 5 minutos, continuando la disgregación del tejido con la ayuda de pinzas y tijeras metálicas, después la suspensión se filtró a través de una membrana milipore de 30µM, se tomaron 8 mL de la suspensión celular y se mezcló con 4 mL de Ficoll (Sigma Histopaque, densidad 1.077) para separación por gradiente, se centrifugó a 820 x g a 18°C por 25 minutos, después de la centrifugación las células de TVT se depositaron en la interface y los TIL en el fondo, las células de TVT fueron colectadas y lavadas 2 veces con 10 mL PBS 1X estéril, un tercer lavado se realizó con 10mL de medio

DMEM (Gibco), al final se obtuvieron células purificadas de TVT que se incubaron en placas de 6 pozos en un volumen final de 2 mL de medio DMEM suplementado con suero fetal bovino al 10% a 37°C por 48 horas en una atmósfera de 5% de CO₂. Pasadas las 48 horas de incubación se determinó la concentración celular por medio del método de exclusión celular de azul de tripan, ajustando a 1×10^8 células/mL (Harmelin *et al.*, 2002).

5.3 Inoculación experimental de TVT en perros sanos

Una alícuota de células de TVT (1×10^8 x sitio) recién cultivadas (48 horas) fueron inoculadas en cada animal de los grupos antes mencionados, se inocularon las células de TVT intragenital en 2 sitios (pared izquierda y derecha) por vía intramucosa, con previa sedación y anestesia local con xilazina al 10% y lidocaína respectivamente, antes de la inoculación el área fue desinfectada con iodopovidona y alcohol al 70%, para evitar la contaminación del inoculo de TVT (Chou *et al.*, 2009).

5.4 Extracción del antígeno total de TVT

Una vez que los animales del grupo 1 desarrollaron las masas tumorales con un volumen de 10cm³ (periodo de incubación 15-30 días aprox.) (Kahan *et al.*, 1982) fue extraída una pequeña muestra del tumor de cada paciente (terapia autóloga) para preparación del antígeno tumoral total. Un gramo de tumor fue mezclado con 9 mL de solución PBS 1X estéril con 100 UI/mL de penicilina, 100UI/mL de estreptomicina y 25 µg/mL de anfotericina B (anti-anti Gibco 100X), la muestra fue disgregada mecánicamente en un sistema automatizado de cuchillas (Becton Dickinson, Medimachine) separando el tejido y creando una suspensión de células que fueron filtradas a través de membrana milipore 30µM, 8 mL de la suspensión celular se mezcló con 4 mL de Ficoll (Sigma Histopaque, densidad 1.077) para separación por gradiente, se centrifugó a 820 x g por 25 minutos a 18°C, después de la centrifugación las células de CTVT se depositaron en la interface y los TIL en el fondo, se realizó el conteo y ajuste de células (1×10^8) en 50mL y se incubaron a 37°C por 30 minutos en 5mL de colchicina 1µM para disrupción de la organización de microtúbulos en el citoesqueleto y liberación de antígenos, seguido de este pre-tratamiento se realizó un lavado con PBS

1X estéril y se incubaron a 37°C por 5 minutos en 5 mL 1-butanol (2.5% v/v) (Kahan *et al.*, 1982). Después las células se centrifugaron a 500g por 10 minutos, se tomó el sobrenadante (50mL) y se realizó una diálisis 1:10 (Spectra/Por, MWCO 12-15KD) en 500 mL de sacarosa 50% por 24 horas a 4°C, seguida de una equilibración contra PBS (1:10) a 4°C por 24 horas y recuperando la solución dentro de la bolsa. Continuando con un ultracentrifugado a 165,000 g (Max) por una hora, tomando el sobrenadante y produciendo una preparación denominada antígeno total de TVT, la suspensión fue titulada por el método de Bradford, se formaron alícuotas con 300µg de antígeno suspendido en 1mL PBS 1X de cada animal del grupo 1. A la par se tomó 20 mL de sangre periférica para generación células dendríticas y activación de linfocitos TCD8⁺ *in vitro* reactivos contra el TVT. Parte de la sangre extraída de cada individuo fue analizada determinando los niveles de IFN-γ y evaluando de las poblaciones de CD3⁺/CD4⁺/CD8⁺ en sangre periférica. Todo el procedimiento de aquí en adelante se realizó de manera individual (Hinrichs *et al.*, 2008).

5.5 Obtención de células mononucleares de sangre periférica

Para la obtención de células mononucleares de sangre periférica (PMBC). Se colectaron 40 mL de sangre periférica de cada paciente del grupo 1 (terapia autóloga) por medio de punción venosa utilizando tubos al vacío heparinizados. Se colocaron 20 mL de Ficoll-Hypaque en 1 tubo 50 de mL de fondo cónico. Se tomaron 20 mL de la muestra de sangre periférica heparinizada y se vierten despacio por la pared del tubo de 50 mL que contienen Ficoll-Hypaque (Thacker *et al.*, 2009). Se centrifugó a 400 x g por 30 minutos a una temperatura de 20°C. Una vez que transcurren los 30 minutos, se observaron en los tubos 4 capas (**Figura 7**): la capa superior que es el plasma rico en plaquetas, la siguiente capa que es densa y de color blanco que es donde se encuentran los linfocitos y monocitos, la siguiente capa es el reactivo Ficoll-Hypaque donde se encuentran en su mayoría células granulocíticas y en el fondo del tubo los eritrocitos (Zavala *et al.*, 2008).

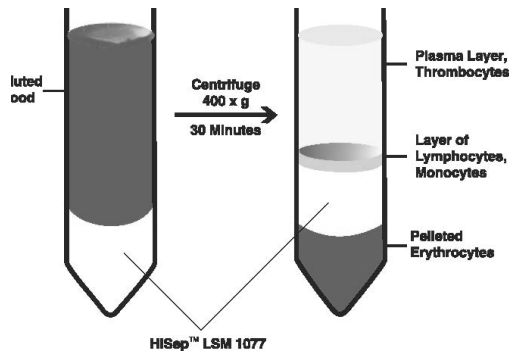


Figura 7. Separación de leucocitos por gradiente en Ficoll-Hypaque (Fotografía tomada y modificada de Tanaka *et al.*, 2000).

Con la micropipeta de 1000 μL , se colectaron en un tubo de 15 mL de fondo cónico, la segunda capa que son las células mononucleares (linfocitos y monocitos). Una vez que se colectó la capa de células mononucleares, se realizaron dos lavados utilizando PBS 1X estéril. Para el primer lavado, se añadió un volumen de 10mL de PBS 1X a los tubos de 15 mL que contienen las células mononucleares y se llevaron a centrifugación a 400 x g por 10 minutos a 20°C. Transcurridos los 10 minutos, se decantó el sobrenadante y se conservó el pellet celular. El pellet se resuspendió en 10 mL de PBS 1X y fue llevado nuevamente a centrifugación, a 200 x g por 10 minutos a 20°C (Klebanoff *et al.*, 2011).

Transcurridos los 10 minutos, se decantó el sobrenadante y el pellet celular se resuspendió en medio RPMI 1640 suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB). Se tomó una alícuota de 20 μL , la cual fue utilizada para contar el número total de células mononucleares que se tienen por mL por medio del método de exclusión con azul tripan, las células fueron teñidas y contadas en un hemocitometro (Tanaka *et al.*, 2000). Una vez que se determinó el número total de células obtenidas en la separación, se ajustó el número a $1.5\text{-}2 \times 10^6$ células y se sembró en placas de cultivo de 12 pozos en un volumen final de 1mL de medio RPMI 1640 suplementado con 10% de SFB por pozo. Estas placas se incubaron por un período de 2 horas, en una incubadora con atmósfera de 5% de CO_2 y una temperatura de 37°C (Oberling, 1997). Tras este período de incubación de 2 horas, los monocitos que son células con capacidad de adherencia al plástico, quedaron pegadas a la superficie de la placa, el resto de las células,

principalmente linfocitos permanecieron suspendidas en el medio. Se retiraron los sobrenadantes de las placas y fueron transferidas a un tubo de 50 mL de fondo cónico. A este tubo de 50 mL que contiene los linfocitos fue sometido a un lavado, agregando 10 mL de PBS 1X estéril y centrifugando a 1600 rpm por 10 minutos a 20°C. Se contaron el número de células recolectadas por el método de exclusión por azul tripan y se ajustó la cantidad a $1-1.5 \times 10^6$ células que fueron cultivadas en placas de 12 pozos en un volumen final de medio de 1 ml de RPMI 1640 suplementado con 10% de SFB que fueron mantenidos en presencia de los estímulos de IL-21 o IL-2 (R&DSistemas) durante 48 horas, tiempo de generación de las células dendríticas (Rasmussen *et al.*, 2010).

5.5.2 Generación de células dendríticas a partir de monocitos de sangre periférica

Las células que permanecieron adheridas a la superficie plástica de la placa, fueron lavadas 2 veces con PBS 1X estéril utilizando la micropipeta de 1000 μ L y tratando de barrer todas aquellas células que no fueron adheridas. Finalmente se agregó 1 mL de medio RPMI 1640 suplementado con 10% de SFB a los pozos con las células adherentes y estas fueron sometidas a un proceso rápido de generación de células dendríticas en 48 horas (Dauer *et al.*, 2005). Las placas que contienen las células adherentes fueron incubadas a 37°C en una atmósfera de 5% de CO₂ en donde el primer lapso de 24 horas de incubación, se estimularon con GM-CSF recombinante canina (R&DSistemas) a una concentración de 1000 U/mL e IL-4 recombinante canina (R&DSistemas) a una concentración de 500 U/mL. Una vez transcurridas las primeras 24 horas, se agregó el antígeno total de TVT para la captación por las células dendríticas inmaduras en una concentración de 30 μ g/mL por 2 horas, lo siguiente fue incubar las células por 24 horas más, bajo los estímulos de IL-1 β recombinante canina (R&DSistemas) a una concentración de 10 ng/mL, TNF- α recombinante canina (R&DSistemas) a una concentración de 1000 U/mL y PGE₂ en una concentración 1 μ M y KLH 20 μ g/mL. Transcurrido el segundo período de 24 hrs. de incubación se evaluó la viabilidad celular por el método de exclusión por azul tripan, se evaluó la morfología por medio de visualización en el microscopio invertido (Figura 11) y finalmente se llevó a cabo una fenotipificación de la diferenciación hacia célula dendrítica (Figura 12) (Ramadan, 2011).

5.5.3 Análisis del fenotipo de las células dendríticas obtenidas a partir de monocitos de sangre periférica

Tras la incubación de 48 horas bajo los estímulos de las citocinas antes mencionadas, las células fueron lavadas 2 veces con PBS (1600 rpm por 10 minutos), ajustando la cantidad de células a 5×10^5 - 1×10^6 y resuspendido en 100 μ L de PBS en un tubo de poliestireno de 5 mL e incubando por lapsos de 20 minutos en hielo y en obscuridad con 5 μ L de anticuerpo. Tras la incubación con el primer anticuerpo, se lavó con 1 mL de PBS 1X centrifugando a 1600 rpm por 10 minutos, se descartó el sobrenadante para eliminar el exceso de anticuerpo, se resuspendió el pellet nuevamente en 100 μ L de PBS 1X y se agregó el siguiente anticuerpo. El panel de anticuerpos que se utilizó para la fenotipificación de células dendríticas fueron dirigidos contra el epítipo monomérico DLAII/FITC de Serotec (**clon YKIX334.2**) y CD80/PE, CD83/PE-Cy y CD14/FITC (BD Bioscience). Como control negativo, se utilizaron tres tubos con 5×10^5 células marcadas con un anticuerpo de ratón anti-humano IgG1/FITC e IgG2/PE (BD Bioscience), con esto se determinó las zonas de positividad y negatividad de los histogramas para los marcadores antes mencionados. Las muestras fueron lavadas y finalmente fueron sujetas a un análisis fenotípico por citometría de flujo (Accuri C6 Becton Dickinson), la intensidad de la fluorescencia fue evaluada con el software BD Accuri C6, Michigan USA.

5.5.4 Activación de linfocitos T específicos contra el TVT *in vitro*.

Una vez que fueron generadas las células dendríticas maduras (cargadas con Ag de TVT), fue reemplazado el medio de estos pozos y fue resuspendido en 500 μ L de medio RPMI 1640 suplementado con 10% de SFB. Se recolectaron las células de las placas de 12 pozos que contienen los linfocitos de sangre periférica y se ajustaron a 1×10^6 células en 500 μ L, los cuales fueron agregados a las placas que contienen células dendríticas en una concentración de 2×10^5 células. La relación final de este co-cultivo entre linfocitos de sangre periférica y células dendríticas fue de 10:2. Estas placas de 12 pozos que contienen ambas poblaciones celulares se incubaron en una atmósfera de 5% de CO₂ a 37°C durante 7 días bajo los estímulos de IL-21 o IL-2. Cada tercer día fue reemplazado la mitad del medio en cada pozo y se volvió estimular con IL-21 o IL-2 (Parmigiani *et*

al., 2011). Al finalizar el período de 7 días, las placas se centrifugaron a 1600 rpm por 10 minutos a 20°C, se retiró por completo el medio con ayuda de una micropipeta de 1000 μL , y se reemplazó con 1 mL de medio RPMI 1640 suplementado con 10% de SFB que contenga 2×10^5 células dendríticas frescas preparadas según el protocolo correspondiente. Se incubaron nuevamente las placas en una atmósfera de 5% de CO_2 a una temperatura de 37°C por 24 horas más. Transcurridas las 24 horas, las placas se centrifugaron a 1600 rpm por 10 minutos y se recolectó una muestra de 500 μL del sobrenadante (Ho *et al.*, 2006). Se agregaron 500 μL de medio fresco RPMI 1640 suplementado con 10% de SFB para reemplazar la alícuota tomada y la placa se mantuvo en incubación en una atmósfera de 5% de CO_2 a 37°C. Los sobrenadantes de cada pozo se analizaron por un ensayo de ELISA para detectar la producción de $\text{IFN-}\gamma$, lo cual representa la señal que indica que los linfocitos T están activados. Una vez que se identificaron los pozos productores de $\text{IFN-}\gamma$ se colectaron las células en suspensión de cada uno de ellos y estos linfocitos T específicos contra el TVT fueron sometidos a un protocolo de aislamiento de la población CD8^+ mediante selección negativa.

5.5.5 Aislamiento de linfocitos T CD8^+ mediante selección negativa.

Las células no adherentes fueron separadas por selección negativa con Dynabeads Untouched para obtener los linfocitos T CD8^+ . Las Dynabeads fueron lavadas antes de su uso. Se resuspendió las Dynabeads en el vial proporcionado en el kit en vortex por 30 segundos. Se transfirió el volumen deseado para el aislamiento (250 μL estándar para 5×10^7 PBMC) a un tubo eppendorf de 2 mL. Se añadió la misma cantidad de buffer de aislamiento y se mezcla. Se colocó el tubo en el magneto por un minuto y se retiró el sobrenadante. Se retiró el tubo del magneto y se resuspendieron las Dynabeads lavadas en el mismo volumen de buffer de aislamiento que el volumen inicial que se tomó de Dynabeads. Las células de cada pozo se ajustaron a $1-2 \times 10^6$ células en 500 μL de buffer de aislamiento. Se transfirió 500 μL $1-2 \times 10^6$ células en buffer de aislamiento a un tubo de poliestireno de 5 mL. Se añadió 50 μL de suero fetal bovino inactivado. A continuación se añade 20 μL de la mezcla de anticuerpos del vial de 2 mL contenido en el kit. Se mezcló e incubó por 20 min a 2-8 °C. Lo siguiente fue lavar las células añadiendo 3 mL de buffer de aislamiento. Se mezcló rotando el tubo varias veces y se

centrifugó a 350 x g por 8 minutos a 2-8 °C. Al terminar se descartó el sobrenadante. Se resuspendieron las células en 500 µL de buffer de aislamiento. Se añadió 100 µL de Dynabeads MyOne Depletion SA previamente lavadas. Se incubó por 15 minutos a 18-25 °C agitando y rotando gentilmente. Se resuspendieron las células que se unieron a las Dynabeads pipeteando vigorosamente más de 10 veces con una pipeta de 1000 µL en un área estéril y utilizando puntas estériles. Se añadió 1 mL de buffer de aislamiento. Lo siguiente fue poner el tubo en el magneto por 2 minutos. Se retiró el sobrenadante que contiene las células CD8⁺ untouched y se transfirió a un tubo nuevo y estéril. Se añadió al tubo que contiene las Dynabeads atadas a las células 1 mL de buffer de aislamiento. Se resuspendió pipeteando vigorosamente como se hizo previamente. Se colocó nuevamente el tubo en el magneto por 2 minutos. Se retiró el sobrenadante y se combinó con el primero. Al finalizar la separación magnética, se obtuvieron linfocitos T CD8⁺ (véase más adelante). Se contaron el número de células recolectadas por el método de exclusión por azul tripan y se ajustó la cantidad a 1-1.5 x 10⁶ células que fueron cultivadas en placas de 12 pozos en un volumen final de medio de 1 mL de RPMI 1640 suplementado con 10% de SFB cultivándolos por 3 días más en una atmósfera de 5% de CO₂ a 37°C y en presencia de estímulos del anticuerpo anti-CD3 (OKT3), finalmente se evaluó la eficacia citotóxica de los CD8⁺ contra las células de TVT *in vitro* (Teschner et al., 2011).

5.6 Ensayo de citotoxicidad *in vitro* contra las células de TVT

El incremento en la actividad de lactato deshidrogenasa (LDH) en el sobrenadante del cultivo es proporcional al número de células lisadas. Esta enzima está presente normalmente en el citoplasma de las células vivas y se libera al medio de cultivo al permeabilizarse la membrana de las células muertas. Células de TVT frescas y purificadas con Ficoll-Hypaque (vea el protocolo correspondiente) fueron utilizadas como blanco de linfocitos TCD8⁺ específicos de tumor en un ensayo de citotoxicidad celular *in vitro*. Las células obtenidas de TVT (5x10³ células ajustadas en 100µL de medio RPMI 1640) fueron incubadas en placas de 96 pozos por 2 horas a 37°C en una atmósfera de 5% de CO₂. Transcurridas las 2 horas los linfocitos TCD8⁺ generados con CD cargadas con antígeno tumoral total e IL21 (tratamiento 1), linfocitos TCD8⁺

generados con CD sin antígeno y con IL-21 (tratamiento 2), CD8⁺ estimulados solo con IL-21 (tratamiento 3), la misma secuencia de tratamientos fue utilizada con el uso de la IL-2. Finalmente fueron transferidos en los pozos con células de TVT en una relación TVT: CD8⁺1:10, fueron incubados por 6 horas más a 37°C, 5% CO₂, por triplicado, como control adicional se utilizó células de TVT sin tratamiento y linfocitos T CD8⁺ con el objetivo de evaluar la liberación espontánea de LDH. Posterior al período de incubación se realizó el ensayo de medición de la actividad de LDH en el medio de cultivo, se utilizó el kit comercial TOX7 de SIGMA ALDRICH (preparado según instrucciones del fabricante) que tuvo como fundamento la conversión de lactato a pirúvico por la LDH y consecuentemente NAD⁺ en NADH y H⁺, en un segundo paso la formación de NADH se puede medir mediante una reacción acoplada en la que la sal de tetrazolium (amarilla) se reduce hasta un producto de formazan (rojo) que puede ser medido. La cantidad e intensidad de color debido al formazan solubilizado puede medirse espectrofotométricamente a 490 nm. Los resultados se expresaron como porcentaje de citotoxicidad celular (Putnam *et al.*, 2002).

5.7 Terapia autóloga con Linfocitos TCD8⁺

Una vez que la masa tumoral presento un tamaño de 3cm, se llevó a cabo la activación y expansión *in vitro* de linfocitos TCD8⁺ reactivos contra el CTVT, 14 (+2) días después, una vez listo el cultivo de linfocitos TCD8⁺ se administró la terapia celular (1x 10⁸ células por ciclo) en los perros del grupo 1. Se aplicaron 4 ciclos de terapia autóloga al día 14, 21, 35 y 56 tomando como base el día 0 antes mencionado. Los linfocitos TCD8⁺ (1x 10⁸ células) fueron mezclados con 250mL de suero glucosado y se administraron lentamente vía intravenosa en un tiempo de 15-30 minutos previa tranquilización de los perros (**Figura 8**).

5.7.1 Efectos secundarios por terapia celular autóloga

Durante y después de la administración de los linfocitos T CD8⁺ se llevó a cabo el monitoreo de posibles efectos secundarios como fiebre, inflamación, anafilaxis, anorexia, letargia, vómito, diarrea.

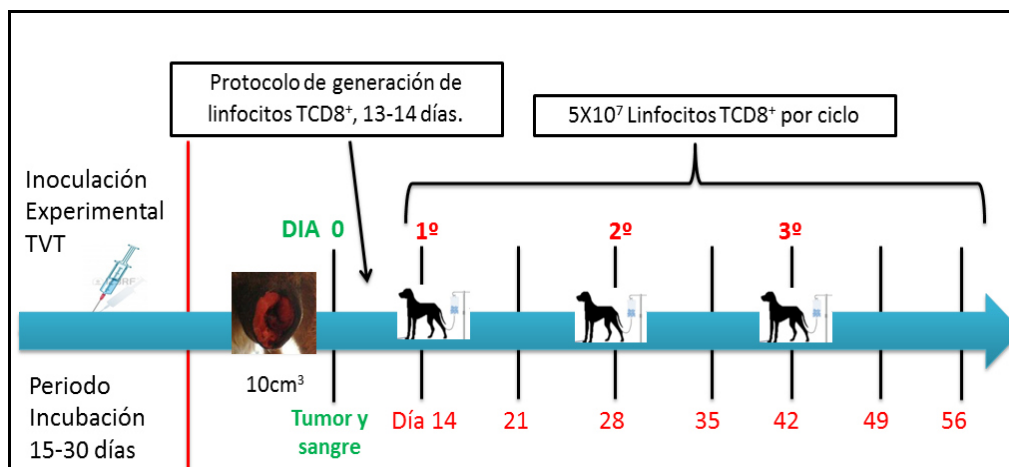


Figura 8. Ciclos de terapia celular autóloga en perros con TVT.

5.7.2 Evaluación del volumen tumoral

Se midió el volumen tumoral cada 3 días después de aplicado el tratamiento con terapia celular autóloga, midiendo el diámetro y calculando el volumen del tumor (mm) utilizando la siguiente fórmula: longitud (mm) x anchura (mm) x altura (mm) x $\pi/4$, con el uso de calipers, finalmente se comparó el volumen de la masa tumoral entre los perros de los diferentes grupos (Chou *et al.*, 2009).

5.7.3 Evaluación de los linfocitos infiltrantes de tumor por histopatología

Se tomó una muestra tumoral antes y después de la terapia celular autóloga (día 0, 28 y 56) tomando como base el día 0 anteriormente mencionado con el objetivo de comparar mediante histopatología los agregados linfocitarios dentro del tumor posterior al tratamiento, una muestra de .5cm fue fijada en formaldehído al 10% durante 8 horas, posterior a esto se realizaron cortes del tejido de un tamaño de 5-8 μ m los cuales fueron fijados en un portaobjetos para posteriormente ser teñidos con hematoxilina y eosina y ser vistos al microscopio.

5.7.4 Análisis de las poblaciones CD4⁺ y CD8⁺ en sangre periférica

Se realizó un análisis por citometría de flujo con el propósito de evaluar las poblaciones de linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺ en sangre periférica utilizando anticuerpos monoclonales antiCD3, antiCD4, antiCD8, antes y después de la terapia autóloga (día 0, 35 y 70). Se

utilizó un kit comercial triple de anticuerpos monoclonales anti canino CD3⁺:FITC/ CD4⁺:RPE/ CD8⁺:Alexa Fluor de Serotec, que fue preparado y utilizado con base en las instrucciones dadas por el fabricante. Los porcentajes de células CD4⁺ y CD8⁺ serán analizados por citometría de flujo (Accuri C6 Becton Dickinson), la intensidad de la fluorescencia será evaluada con el software BD Accuri C6, Michigan USA (Chun *et al.*, 2011).

5.7.5 Determinación de los niveles IFN γ en suero por ELISA

Se llevó a cabo la evaluación de la actividad de los linfocitos T mediante determinación de los niveles de IFN γ del suero de perros sometidos a terapia autóloga. El análisis se llevó a cabo antes de la terapia al día 0 y después de la terapia al día 35 y 70 por ELISA sándwich en fase sólida. El nivel de IFN γ se determinó mediante el uso de un kit comercial, ELIPACK de R&D System, específico para IFN γ canino, con una sensibilidad de 60 pg/mL, siguiendo las recomendaciones del fabricante. 50 μ L del diluyente del ensayo fueron agregados a cada pozo, lo siguiente fue agregar 50 μ L de suero canino a cada pozo, golpear suavemente la placa por 1 minuto gentilmente, se cubrió con una tapa para placas e incubo a temperatura ambiente durante 2 horas. Lo siguiente fue aspirar cada pozo y lavar 5 veces. Se Agregó 100 μ L del conjugado a cada pozo y se cubrió con un nuevo sellador de placas incubando a temperatura ambiente durante 1 hora. Se aspiró y lavó 5 veces. Se Agregó 100 μ L de streptevindina a cada pozo y se cubrió con un nuevo sellador de placas y se incubo a temperatura ambiente durante 30 minutos. Se aspiró y lavó 5 veces más. Se añadió 100 μ L de solución sustrato a cada pozo. Se incubo a temperatura ambiente durante 30 minutos. Protegiendo de la luz. Finalmente se agregó solución stop a cada pozo. Los niveles de IFN γ se analizaran en un lector de 450nm inmediatamente (Hsiao *et al.*, 2008).

5.8 Análisis estadístico

Para comprobar estadísticamente si existe o no una diferencia significativa en el uso de la terapia autóloga con CD8⁺específicosde tumor y perros sin tratamiento en caninos inoculados experimentalmente con TVT se llevó a cabo el siguiente análisis estadístico entre los grupos; Grupo 1: con tumor y terapia celular autóloga, grupo 2: con tumor sin

tratamiento, grupo 3: con tumor y suero glucosado, grupo 4 con tumor y transfusión sanguínea autóloga. Para el presente trabajo se utilizó ANOVA de una vía y se determinó si existe diferencia significativa mediante T-student. La diferencia fue considerada como estadísticamente significativa cuando $p < 0.05$.

6. RESULTADOS

6.1 Evaluación de las células de TVT en cultivo primario

En la actualidad no existe una línea celular establecida del TVT, por lo cual en el presente estudio se realizó un cultivo primario a partir de una biopsia de TVT diagnosticada por histopatología (**Figura 9**). Teniendo como objetivo llevar a cabo un ensayo de citotoxicidad celular y la inoculación experimental en hembras caninas. Al microscopio se observaron células con un diámetro de 15-30 μ m con una morfología redonda, formando algunas ocasiones racimos, con un núcleo prominente el cual ocupaba la mayoría del citoplasma mismo que presentaba un aspecto eosinofílico el cual se encontraba vacuolado.

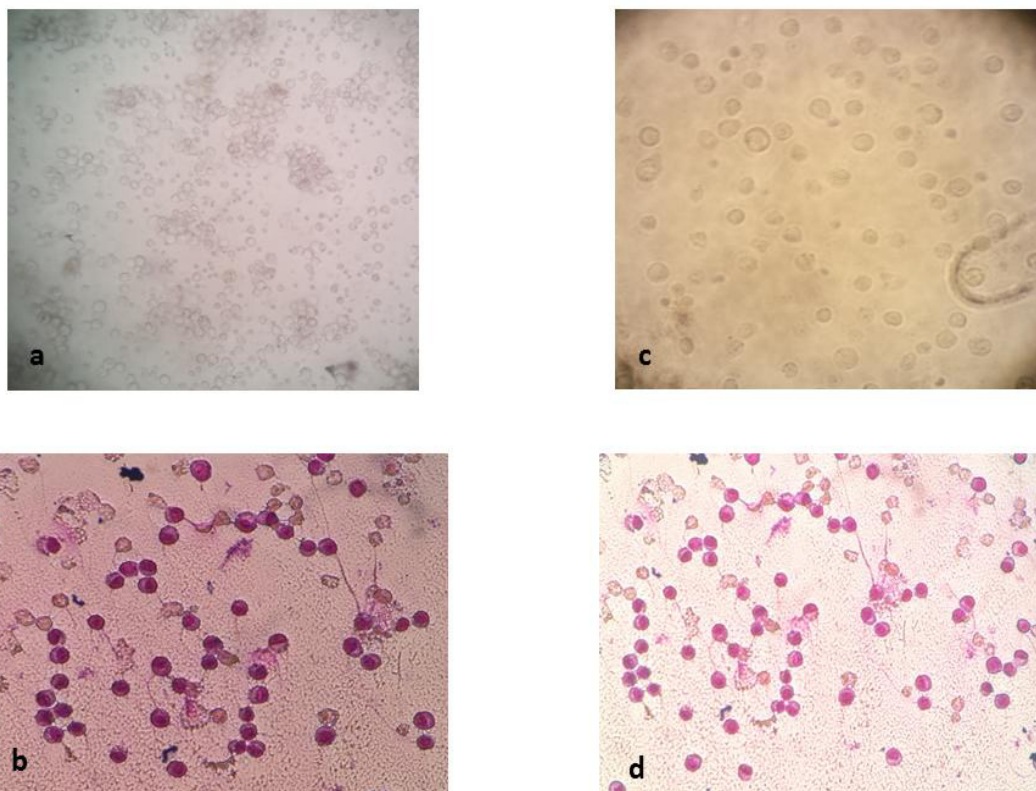


Figura 9. Células de TVT en cultivo primario. Se observó el cultivo celular a los 0 días (a) sin tinción, a los 2 días (b) sin tinción, a los 5 días (c) con tinción de Giemsa y a los 10 días (d) con tinción de Giemsa.

6.2 Inoculación experimental del TVT en hembras caninas

Para llevar a cabo el ensayo *in vitro* de citotoxicidad celular y la terapia celular autóloga fue necesario implementar un modelo de inoculación experimental en hembras caninas, las cuales fueron inoculadas con TVT.

Una vez inoculado el tumor en la vagina del animal, se observó un crecimiento tumoral dentro de las 3 y 5 semanas post inoculación. A los 30 días se observó una pequeña nodulación con un volumen de 10-12cm³ en la mayoría de los perros, periodo en el cual se inició el protocolo de terapia autóloga en los perros del grupo 1, la masa tumoral se implantó en la pared vaginal y presentó una consistencia laxa de aspecto redondo-ovalado lo cual indicaba un desarrollo y crecimiento tumoral en el espacio subcutáneo. Los perros de los grupos 2, 3 y 4 fungieron como control por lo cual el desarrollo tumoral a través de los siguientes meses fue similar. En ellos a los 3 meses se observaron múltiples nodulaciones de 1cm de diámetro con una consistencia suave las cuales comenzaron a formar racimos. Para los 4 meses el crecimiento tumoral fue incrementando, el tejido epitelial presentaba ulceración por lo cual la masa de tumor comenzó a presentar una forma de coliflor con una consistencia friable de la cual emanaban una gran cantidad de vasos sanguíneos. A los 6 meses post inoculación la estructura normal de la vagina fue pérdida, la masa tumoral estaba conformada por múltiples racimos de nodulaciones con aspecto rojizo-morado debido a la gran cantidad de hemorragias presentes en el tumor (**Figura 10**). Por lo cual se confirmó que el modelo de inoculación experimental de TVT implementado en este estudio fue el correcto, mencionando que un perro del grupo 2 fue el donador de sangre y tumor con lo cual se llevó a cabo el ensayo de citotoxicidad *in vitro*, véase más adelante resultados de terapia celular autóloga.



Figura 10. Implementación, desarrollo y crecimiento tumoral en perro inoculado experimentalmente con TVT. Las fotografías fueron tomadas de un perro del grupo 2 el cual se utilizó como control y al cual no se le administró ningún tratamiento. Se observó el crecimiento y progresión tumoral al mes (a), a los 3 meses (b), a los 4 meses (c) y a los 6 meses (d).

6.3 Obtención y titulación del antígeno tumoral total con 1-butanol

Una vez finalizado el protocolo de extracción mencionado anteriormente se obtuvo una sustancia denominada antígeno total de TVT. A continuación se tituló una muestra de dicho antígeno por medio del ensayo de Bradford, obteniendo una concentración final de $300\mu\text{g/mL}$ de extracto proteico, el cual fue repartido en alícuotas de $30\mu\text{g}/100\mu\text{L}$ suspendidas en PBS 1X para su posterior uso en el protocolo de generación de linfocitos TCD8^+ específicos de TVT.

6.4 Generación de células presentadoras de antígeno a partir de monocitos de sangre periférica

Se realizó una caracterización morfológica con tinción de Giemsa en monocitos y células dendríticas a las 0 horas y 48 horas respectivamente, con la cual se observaron cambios morfológicos que sugieren una diferenciación completa hacia el linaje de célula dendrítica

madura; en la cual se aprecian cambios muy marcados (**Figura 11**), aumento del tamaño celular, citoplasma ovalado-alargado a partir del cual se proyectan largas prolongaciones características de las células dendríticas, núcleo denso y eosinofílico, observando al microscopio una diferenciación celular de un 85% a las 48 horas de incubación. Como criterio final de obtención de células presentadoras de antígeno se realizó un comparativo fenotípico de los monocitos y células dendríticas maduras evaluando la expresión de algunos marcadores característicos de ambas poblaciones celulares (CD14⁺, CD80⁺, CD83⁺, DLA II) utilizando anticuerpos monoclonales (véase materiales y métodos) y evaluando por citometría de flujo. Las células adherentes a las 0 horas, expresaron el marcador CD14⁺ en un 80.1%, CD80⁺ (15.6%), CD83⁺ (0.4%) y DLA II (1.8%), resultados esperados debido a que la mayoría de las células a las 0 horas son monocitos que expresan en gran porcentaje la glicoproteína CD14⁺ característica del linaje monocito, mientras que los demás marcadores son típicos de células presentadoras de antígeno. Se realizó una evaluación a las 48 horas transcurrido el tiempo que tarda la generación hacia célula dendrítica madura incrementándose la expresión de los marcadores CD80⁺ (80.3%), CD83⁺ (76.4%), DLAI (86.5%) mismos que son típicos de CPAs actuando como co-activadores y estimulando la activación de los linfocitos CD4⁺ respectivamente, mientras que la expresión del marcador CD14⁺ disminuyó hasta un 8.7%. Por lo tanto se sugiere que las células dendríticas generadas en el presente estudio presentan gran posibilidad de ser CPAs eficaces capaces de activar linfocitos T (**Figura 12**). Trabajos anteriores en nuestro laboratorio demostraron que a las 24 horas de incubación con el GM-CSF e IL-4 las células dendríticas inmaduras tienen la capacidad de fagocitosis por lo cual en este periodo se pulso a dichas células con el antígeno tumoral total para que este sea procesado, degradado y cargado en moléculas del MHC clase I y II para posteriormente llevar a cabo la activación de los linfocitos TCD8⁺ y CD4⁺, respectivamente.

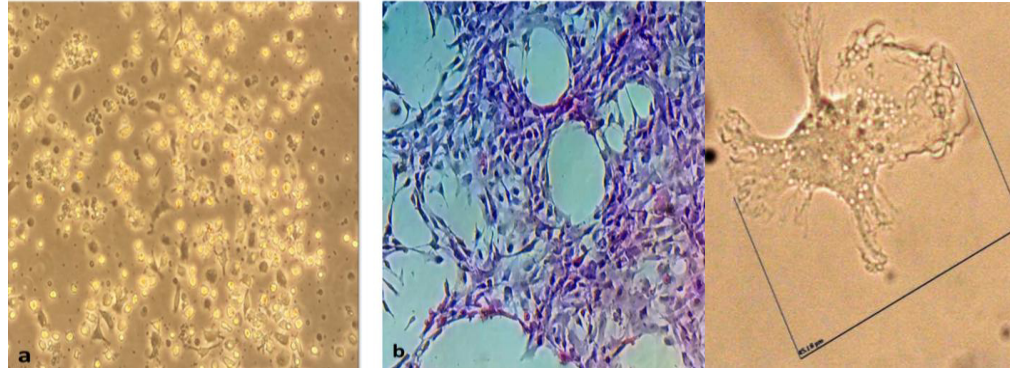


Figura 11. Aspectos morfológicos de las células dendríticas inmaduras y maduras obtenidas a partir de monocitos de sangre periférica. Células dendríticas inmaduras sin teñir en 10x (a), células dendríticas maduras teñidas con giemsa en 10x (b) y célula dendrítica en microscopio de campo claro 100x.

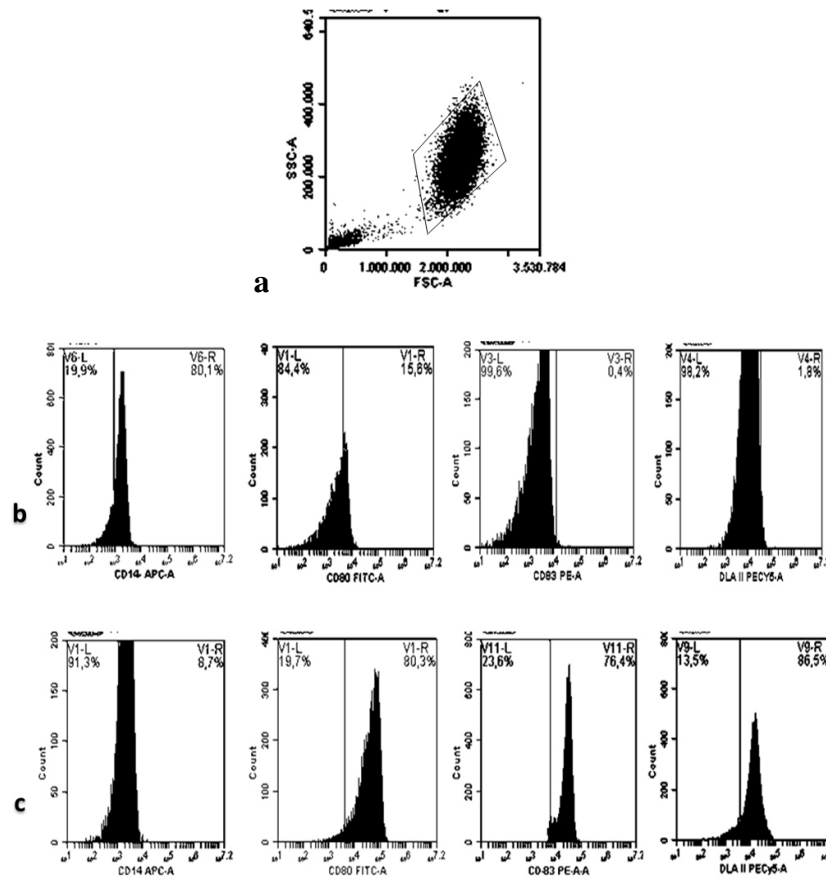


Figura 12. Fenotipificación de células dendríticas obtenidas a partir de monocitos de sangre periférica. La muestra que fue analizada (a), histogramas en los cuales se analizan marcadores de superficie de las células adherentes (monocitos) al inicio del protocolo (b), histogramas en los cuales se analizan la expresión de marcadores de superficie de las células dendríticas maduras (c).

6.5 Activación de los linfocitos T en presencia de células presentadoras de antígeno cargadas con antígeno tumoral total

A los 4 días de incubación se observaron células dendríticas maduras rodeadas en su periferia y en cercanía de linfocitos en lo cual se sugiere que el proceso de presentación de antígeno fue realizado, para el sexto día de incubación se observó un cambio morfológico en las células dendríticas las cuales presentaron formación de velos (células dendríticas veliformes), es decir, células dendríticas maduras muy eficaces, que es representativo de que los linfocitos T están siendo activados (**Figura 13**). A los 7 días de incubación se tomó una muestra de sobrenadante de los diferentes pozos y se analizó la producción de IFN- γ ya que esta citocina es secretada por linfocitos activados. Se obtuvo una alta producción de IFN- γ de 446.88 pg/mL cuando los linfocitos estuvieron en co-cultivo con células dendríticas pulsadas con antígeno tumoral total y estimulados con IL-21, cuando los linfocitos estuvieron en co-cultivo con células dendríticas que no fueron pulsadas con antígeno o cuando los linfocitos solo fueron estimulados con citocina la producción fue inferior 265.83pg/mL y 28.87 pg/mL respectivamente, se utilizó la IL-2 como control observando mayor producción de IFN γ (**Figura 14**).

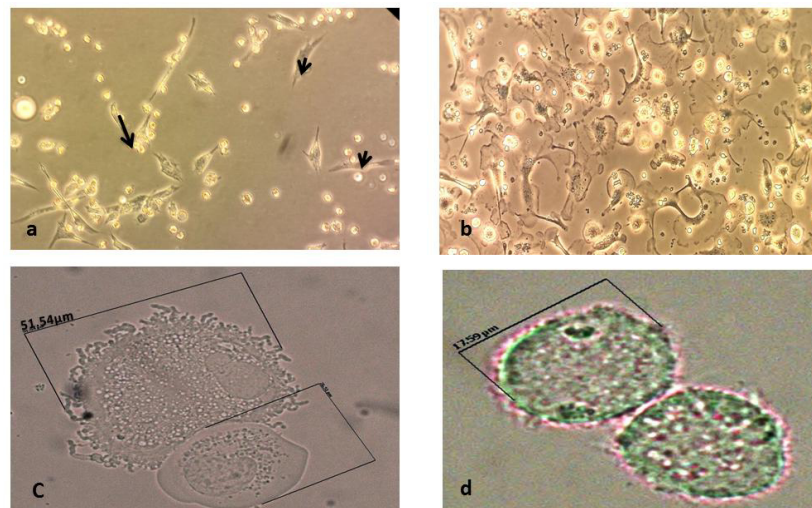


Figura 13. Evaluación microscópica de la presentación del antígeno en co-cultivos de células dendríticas y linfocitos totales. Células dendríticas maduras que en su periferia están rodeadas de linfocitos en lo cual se sugiere está ocurriendo el proceso de presentación de antígeno (a), células dendríticas veliformes formadas al sexto día de co-cultivo debido a que los linfocitos T están siendo activados y estos ayudan a maximizar la eficacia de las CPAs en una activación mutua (b).

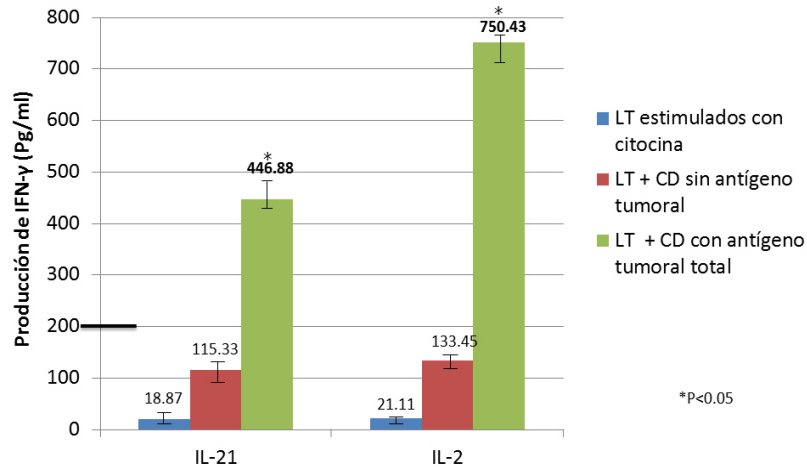


Figura 14. Producción de IFN- γ por linfocitos T estimulados con células dendríticas cargadas con antígeno tumoral total. Las barras en verde muestran la producción de IFN- γ en co-cultivos de linfocitos en presencia de células dendríticas pulsadas con antígeno tumoral total ya sea estimuladas con IL-21 o IL-2, las barras en rojo muestran la producción de IFN- γ de los linfocitos en presencia de células dendríticas que no fueron pulsadas con el antígeno y finalmente las barras en azul muestran la producción de IFN- γ de los linfocitos que solo fueron estimulados con citocina IL-21 50ng/mL o IL-2 20ng/mL. Al finalizar el séptimo día la concentración de IFN- γ fue medida por medio de ensayos de ELISA tomando los valores de $P < 0.05$ como significativos.

6.6 Aislamiento de Linfocitos T CD8⁺ específicos de tumor mediante selección negativa

Una vez que los linfocitos T son activados fueron sometidos a un protocolo de aislamiento de los linfocitos T CD8⁺ mediante selección negativa utilizando un kit comercial conformado por una serie de magnetos en los cuales quedan atrapados por conjugados de anticuerpos biotinilados todas las células que no presentan el marcador CD8⁺ permitiendo el paso de todas las células que presentan el marcador CD8⁺ sin ser tocadas. Los linfocitos T que fueron activados con células dendríticas maduras pulsadas con antígeno tumoral total e IL-21 fueron sometidos al proceso de selección negativa magnética (**Figura 15**), obteniendo un 82.6% de pureza de aislamiento, estos linfocitos T CD8⁺ fueron expandidos con anti-CD3 para llevar a cabo el ensayo de citotoxicidad o para utilizarlos en los ciclos de terapia celular autóloga.

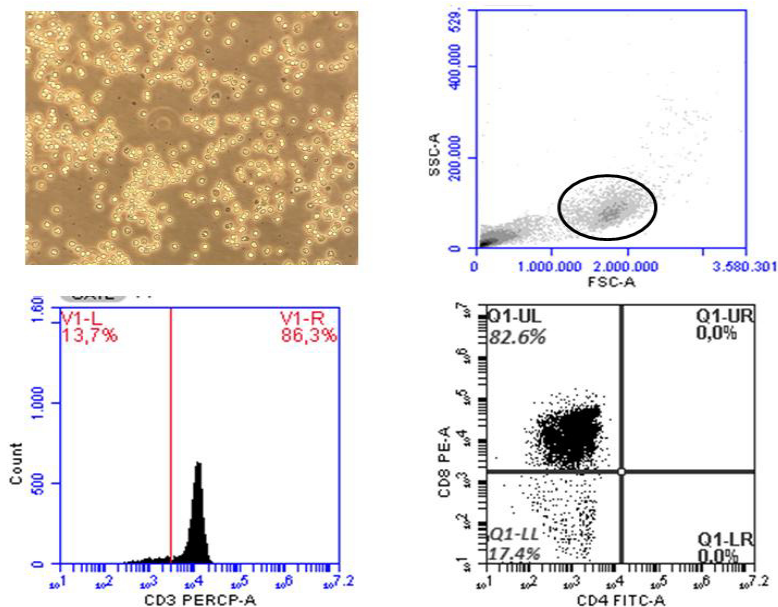


Figura 15. Separación magnética de Linfocitos T CD8⁺ específicos de tumor estimulados con IL-21 mediante selección negativa. De los pozos activados (IFN- γ 446.88 pg/mL) se tomó el sobrenadante con las células en suspensión y estas fueron sometidas a un proceso de selección negativa. Las células aisladas fueron ajustadas a 1×10^6 y teñidas con 20 μ L anticuerpo anti-CD3, antiCD4 y anti-CD8 para corroborar la pureza del aislamiento y después de un lavado con PBS 1X para retirar el exceso de anticuerpo fueron evaluadas por citometría de flujo utilizando Accuri C6 Becton Dickinson. Resultados representativos de 1 de 3 experimentos.

6.7 Evaluación de la citotoxicidad de los Linfocitos T CD8⁺ específicos de tumor contra las células de TVT

Se formaron co-cultivos con ambas poblaciones celulares en una relación 1:10 a favor de los linfocitos, tras un periodo de incubación de 6 horas se midieron los niveles de liberación de lactato deshidrogenasa al medio y a través de una serie de fórmulas descritas anteriormente se obtuvieron los porcentajes de citotoxicidad de la célula de TVT (**Figura 16**). Obteniendo 100% de lisis celular de la célula tumoral cultivada en presencia de linfocitos CD8⁺ específicos de tumor estimulados con IL-21, es decir, linfocitos que fueron activados en presencia de células dendríticas pulsadas con el antígeno tumoral total y un 80% de citotoxicidad de la célula tumoral cuando los CD8⁺ fueron específicos pero estimulados con IL-2, cuando los CD8⁺ no fueron específicos de tumor, es decir,

linfocitos estimulados en presencia de células dendríticas que no fueron pulsadas con antígeno tumoral el porcentaje de citotoxicidad fue de 10% ya sea estimulados con IL-21 o IL-2, observando un resultado similar de 10% de citotoxicidad del TVT cuando estuvieron en co-cultivo con CD8⁺ que solo fueron estimulados con citocina IL-21 o IL-2, lo cual demuestra una respuesta específica contra la célula de TVT dependiente del antígeno por parte de los linfocitos TCD8⁺ que estuvieron 7 días en co-cultivo con CPAs que expresaban el antígeno tumoral total de TVT. Por otra parte el 10% de citotoxicidad por parte de los linfocitos CD8⁺ no específicos de tumor puede deberse a reacciones de aloreactividad debido a que algunos autores mencionan que la célula de TVT presenta algunas moléculas del MHC diferentes al haplotipo del huésped. A continuación se realizó una prueba de viabilidad celular con el objetivo de confirmar que la célula de TVT es la que está siendo blanco en los ensayos de citotoxicidad celular y también para evaluar la eficacia de los linfocitos TCD8⁺ específicos de tumor en detener el crecimiento tumoral a un tiempo mayor de co-cultivo de 48 horas. Después de colectar una muestra de sobrenadante a las 6 horas para evaluación de la LDH esos mismos co-cultivos fueron mantenidos por más tiempo hasta alcanzar las 48 horas de incubación, al finalizar este periodo se evaluó la viabilidad celular por microscopia de epifluorescencia utilizando bromuro de etidio y naranja de acridina. Las fotografías (**Figura 17**) muestran las poblaciones celulares a las 48 horas, los controles CD8⁺ y TVT por separado observando las células vivas en color verde. Mostrando gran cantidad de células de TVT muertas en color rojo cuando estuvieron en presencia de linfocitos TCD8⁺ específicos de tumor estimulados con IL-21, siendo menos eficientes los linfocitos TCD8⁺ específicos de tumor estimulados con IL-2 para detener el crecimiento tumoral ya que se observa una proporción similar de células vivas y muertas, por lo que se podría pensar que los linfocitos generados con IL-2 podrían ser de un fenotipo efector y también regulador ya que a las 6 horas se obtiene un 80% de muerte de la célula de TVT pero conforme pasa el tiempo el tumor pudiera ejercer mecanismos para evadir a los CD8⁺ superándolos, sin embargo, también podría deberse a que los T reguladores comienzan a ejercer una función supresora sobre los T efectores quedando esto como sugerencia y perspectiva para el análisis del subtipo funcional y fenotípico de linfocitos CD8⁺ generados con IL-21 o IL-2.

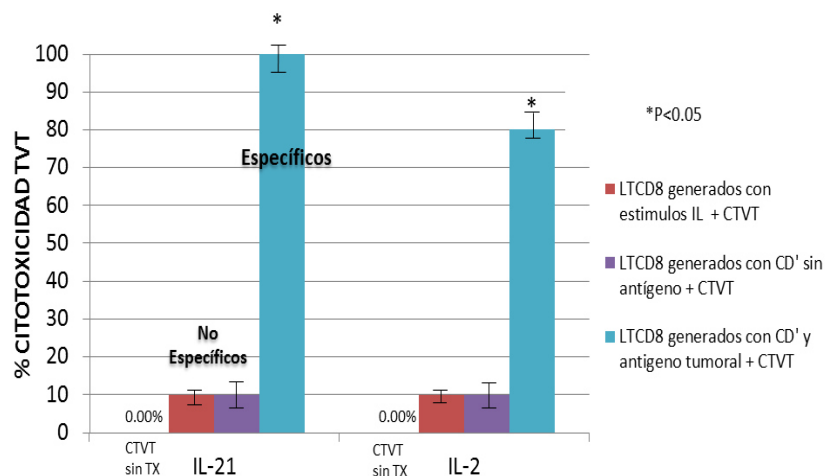


Figura 16. Ensayo de citotoxicidad de linfocitos T CD8⁺específicos de tumor estimulados con IL-21.

Transcurridas las 2 horas fueron agregados los linfocitos TCD8⁺ generados con CD cargadas con antígeno tumoral total e IL21 (tratamiento 1), linfocitos TCD8⁺ generados con CD sin antígeno y con IL-21 (tratamiento 2), linfocitos CD8⁺ estimulados solo con IL-21 (tratamiento 3), en una relación 1:10, la misma secuencia de tratamientos fue utilizada con el uso de la IL-2. Finalmente los co-cultivos fueron incubados por 6 horas más a 37°C, 5% CO₂, por triplicado, como control adicional se utilizó células de TVT sin tratamiento y linfocitos T CD8⁺ con el objetivo de evaluar la liberación espontanea de LDH, al finalizar el tiempo establecido se tomaron 50µL del sobrenadante para analizar dicha enzima utilizando el kit comercial TOX7 de SIGMA ALDRICH midiendo la intensidad de color a 490 nm. Resultados representativos 1 de 3 experimentos independientes. Los resultados se expresaron como porcentaje de citotoxicidad celular, tomando los valores de p <0.05 (*) como significativos.

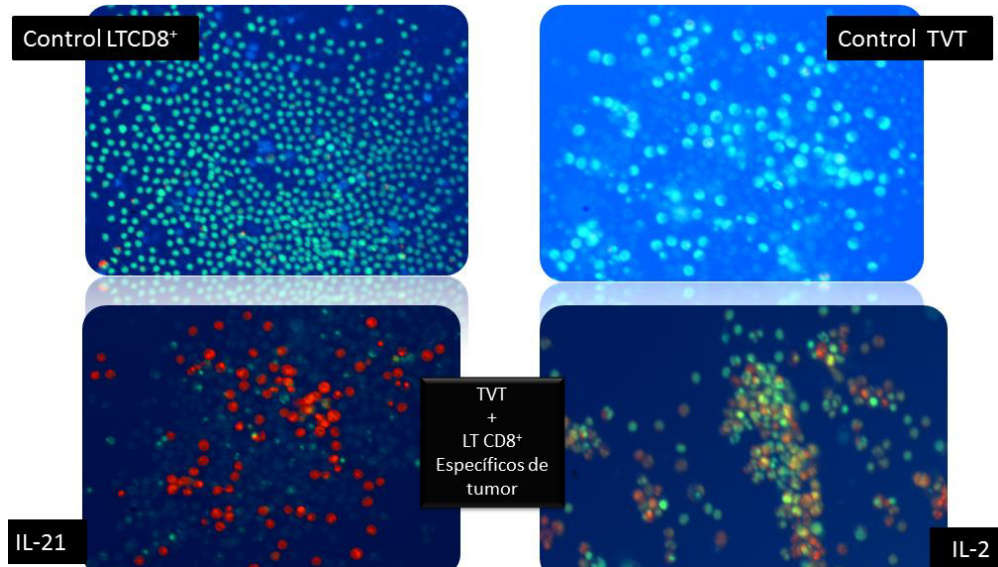


Figura 17. Evaluación de la viabilidad de las células de TVT en presencia de Linfocitos T CD8⁺ específicos de tumor. Al finalizar este periodo las células fueron teñidas con naranja de acridina y bromuro de etidio y fueron observadas con el microscopio de epifluorescencia determinando la viabilidad de las células de TVT y de los linfocitos CD8⁺.

6.8 Evaluación del efecto de la terapia autóloga con linfocitos T CD8⁺ específicos de TVT

Durante la terapia celular autóloga 5×10^7 linfocitos TCD8⁺específicos de tumor fueron administrados en cada tratamiento a la semana 2, 4 y 6 tomando como base el día 0 anteriormente mencionado. Posterior a la terapia celular se realizaron exámenes físicos y de sangre periódicamente no presentando efectos secundarios exacerbados que pusieran en riesgo la vida de los caninos, solo se presentó un caso de fiebre que fue controlado inmediatamente, en general los caninos presentaron apariencia general y buen apetito. Después de la terapia celular el crecimiento del tumor en los perros tratados con Linfocitos TCD8⁺ fue tempranamente suprimido. A partir de la primera semana posterior al tratamiento se observó una diferencia significativa en el volumen tumoral de los perros con terapia autóloga comparados con los grupos control ($p < 0.05$) (**Figura 18**). A las 3 semanas de iniciado el tratamiento el volumen tumoral de los perros con terapia autóloga fue de 2.3 cm^3 comparado con los grupos control con un

volumen de 60.6-61.6cm³ mostrando una clara diferencia significativa ($p < 0.05$). Cabe recalcar que a partir de la primera terapia el crecimiento tumoral fue totalmente inhibido y posterior a la aplicación del tercer tratamiento se observó una regresión tumoral completa en todos los perros del grupo 1 comparando con los grupos control en los cuales el tumor continuó su crecimiento durante todo el experimento (**Figura 19**). Al final del experimento (14 semanas) el tumor de los perros con terapia autóloga mostro una regresión tumoral completa y el volumen tumoral en los grupos control alcanzó un tamaño máximo de 125.5cm³. Como un caso aislado un canino con TVT infectado de manera natural y resistente a la quimioterapia con vincristina fue tratado con terapia celular autóloga con linfocitos T CD8⁺ logrando una regresión tumoral a partir de los 9 días posterior a la terapia, dicha regresión tumoral fue evidente a los 28 días logrando disminuir en un 50% la masa tumoral (**Figura 20**). También se llevó a cabo un análisis histopatológico del tumor a partir de una biopsia tomada antes y después de la terapia celular, mostrando antes de la terapia una gran densidad de células de TVT ordenadas y apiladas en cordones, rodeadas por una densa matriz extracelular, presentando una morfología ovalada-redonda con prominente citoplasma eosinofílico y muy pocos linfocitos infiltrantes (Figura 21), posterior al primer tratamiento (3 días después) se encontró una gran acumulación temprana de linfocitos infiltrantes de tumor (TILs) mismos que formaron agregados por toda la masa tumoral, observando cambios en la arquitectura histológica del tumor, como perdida en el orden de la estructura de los gruesos cordones debido a la muerte de las células de TVT, también fue evidente la degradación de la matriz extracelular que desembocó en menor rigidez de la masa, posterior a la segunda terapia se observaron focos de necrosis tumoral. Cabe recalcar que durante y al final del experimento las biopsias de tumor tomadas de los grupos control no presentaron ningún cambio o alteración en la estructura tumoral. Para complementar el estudio se tomaron muestras de sangre de los caninos que recibieron la terapia autóloga y los grupos control analizando las poblaciones de linfocitos T CD3⁺, CD4⁺ y CD8⁺ en sangre periférica, así como también para determinar los niveles de IFN γ en suero. Se mostró un incremento significativo ($p < 0.05$) a los 15 días posterior a la terapia autóloga en el número de linfocitos T CD3⁺, CD4⁺ y CD8⁺ en sangre periférica

(Figura 22), mostrando un 32.5% de células positivas para CD4⁺ en los caninos con terapia autóloga contrastando con un 26.7% (p <0.05) en los grupos control. Los linfocitos TCD8⁺ en sangre periférica fueron claramente incrementados 17.5% en los perros con terapia autóloga comparado con los grupos control 6.5% (P<0.05), también se mostró diferencia significativa (P<0.05) en el número absoluto de linfocitos totales en los perros con terapia celular comparado con los del grupo control (Figura 22). Por último examinamos los niveles de IFN γ a la semana 0, 2, 4, 6 y 8 mostrando una diferencia significativa (P<0.05) a partir de la primera terapia entre el grupo tratado con Linfocitos TCD8⁺ (110 pg/mL) y los grupos control (10 pg/mL), alcanzando un pico máximo de 150 pg/mL de IFN γ en la semana 8 en los caninos con terapia autóloga, las concentraciones de IFN γ en el suero de los caninos control fueron muy bajas durante todo el experimento (Figura 23).

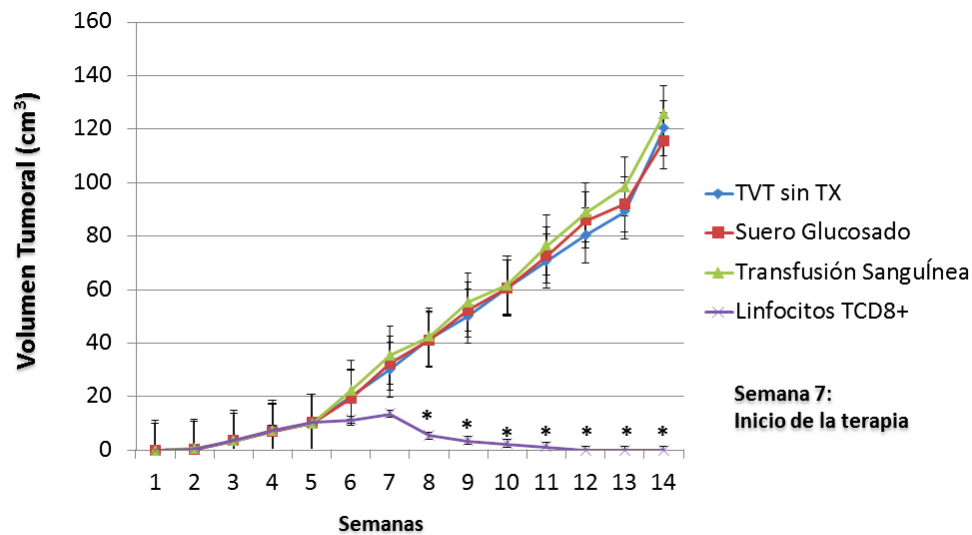


Figura 18. Inhibición del crecimiento tumoral en perros inoculados con TVT posterior a la Terapia Autóloga con Linfocitos T CD8⁺. El esquema de vacunación se muestra en la Figura 8, al inicio de la semana 7 se administró la terapia celular autóloga, 5×10^7 linfocitos TCD8⁺ específicos de TVT fueron administrados por vía intravenosa. Los resultados fueron analizados por ANOVA de una vía tomando como significativos los valores de p<0.05.



Figura 19. Evaluación de la regresión tumoral en perro inoculado con TVT posterior a la terapia autóloga con Linfocitos T CD8⁺. Se inició el protocolo de generación de Linfocitos T CD8⁺ específicos de tumor y 2 semanas después se aplicó la terapia celular autóloga, a continuación se muestra la regresión tumoral de un caso independiente. Tumor antes de la terapia (a), 3 días post-terapia celular (b), 5 días post-terapia celular (c), 28 días post-terapia celular (d).

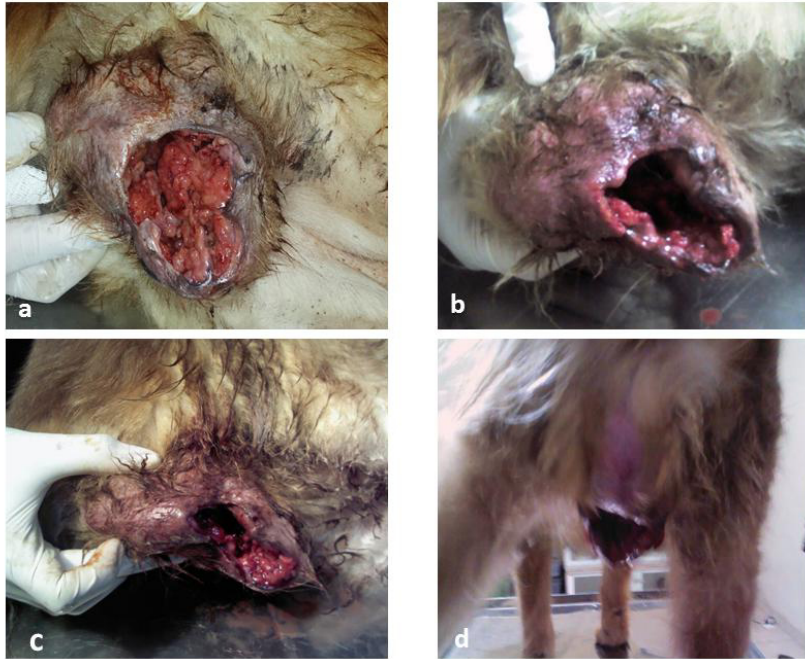


Figura 20. Evaluación de la Regresión tumoral en canino con TVT natural resistente a la Vincristina tratado con Terapia autóloga con linfocitos T CD8⁺. Se llevó a cabo la terapia celular autóloga en una hembra de la raza Labrador con TVT infectado de manera natural, tras 1 año de progresión tumoral etapa avanzada se sometió a quimioterapia con vincristina, sin embargo el tratamiento no fue un éxito debido a la alta progresión tumoral después de la quimioterapia. A continuación se muestra el efecto de la terapia con linfocitos TCD8 sobre el tamaño tumoral. Antes de la terapia (a), 9 días post terapia (b), 16 días post-terapia (c) y 28 días post-terapia (d).

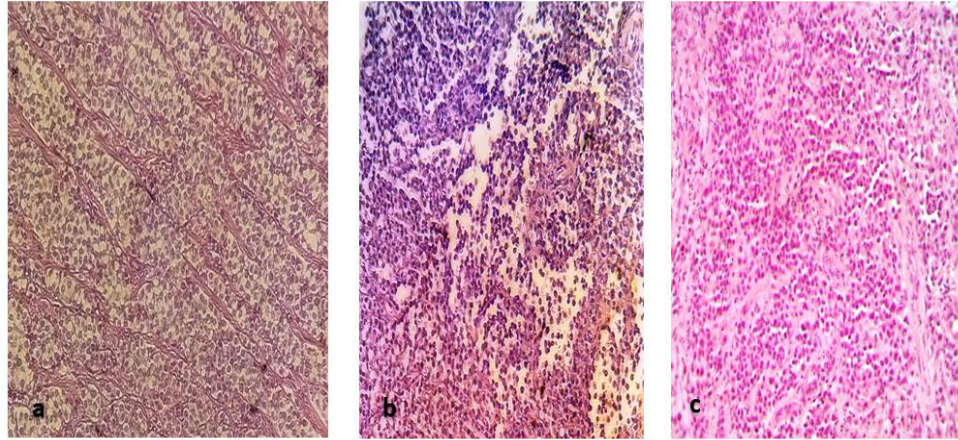


Figura 21. Evaluación histológica del TVT en perros con Terapia Celular Autóloga con Linfocitos T CD8⁺. Muestras del tumor fueron tomadas antes y después de la terapia autóloga y fueron fijadas en formalina, posteriormente se realizaron cortes de 5 μ m del tumor y finalmente fueron teñidas con hematoxilina y eosina y observadas en 20X. Antes de la terapia autóloga (a), 5 días post-terapia autóloga (b), al final de la terapia autóloga (c).

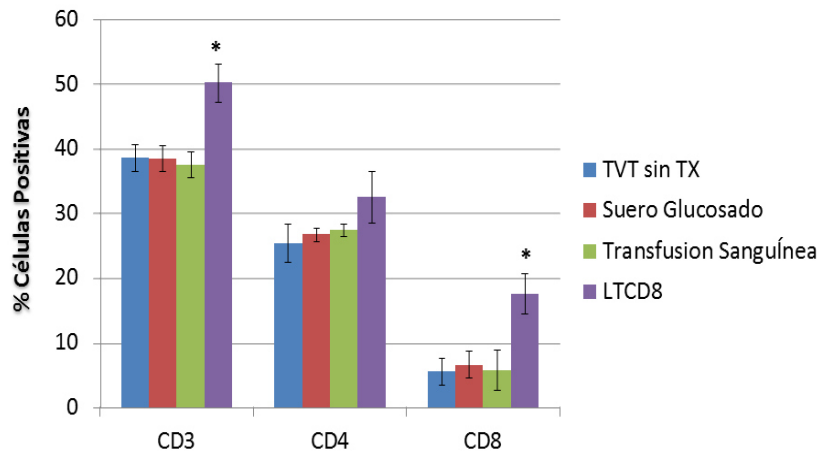


Figura 22. Evaluación de las poblaciones CD3⁺, CD4⁺ y CD8⁺ en sangre periférica en perros con TVT tratados con Terapia autóloga con Linfocitos T CD8⁺. La respuesta celular fue evaluada 2 semanas después de administrar la terapia celular autóloga. Para monitorear el sistema inmune adaptativo de los caninos inoculados con TVT se tomaron 20 mL de sangre periférica, posteriormente fue separada por gradiente de densidad con ficoll y se obtuvieron las PBMC, las cuales fueron ajustadas 1×10^6 y teñidas con 20 μ L anticuerpo anti-CD3, anti-CD4 y anti-CD8 (Abcam), se realizó un lavado con PBS 1X para retirar el exceso de anticuerpo y fueron evaluadas por citometría de flujo utilizando Accuri C6 Becton Dickinson. Resultados representativos de 1 de 3 experimentos.

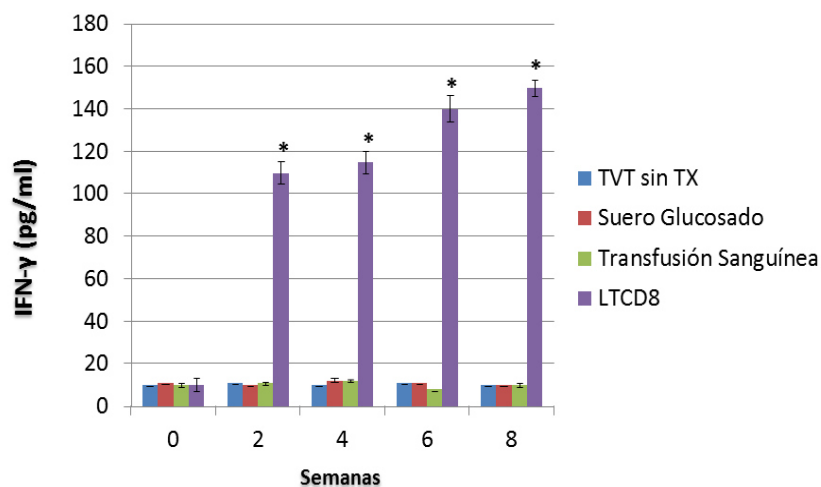


Figura 23. Expresión en suero de IFN γ en perros con TVT tratados con Terapia celular autóloga con linfocitos T CD8⁺. Se evaluaron los niveles de IFN γ en los caninos antes y después de la terapia celular autóloga con el objetivo de evaluar la activación y función de los linfocitos TCD8 que fueron devueltos a los caninos con TVT. Se tomaron 5mL de sangre periférica en tubos sin anticoagulante, después de 15 minutos se retiró el sobrenadante con el suero. La muestra fue analizada por ELISA sándwich en fase sólida. El nivel de IFN γ se determinó mediante el uso de un kit comercial, ELIPACK de R&D System, específico para IFN γ canino siguiendo las recomendaciones del fabricante. Finalmente se agregó solución stop a cada pozo y los niveles de IFN γ fueron analizados en un lector de 450nm inmediatamente.

7. DISCUSIÓN

Nuestro trabajo se enfocó en determinar la efectividad de la terapia celular autóloga con linfocitos T CD8⁺ como tratamiento del cáncer en perros inoculados experimentalmente con TVT. La parte inicial de este trabajo fue obtener una biopsia del TVT y realizar un cultivo primario, debido a que en la actualidad no existe una línea celular de TVT establecida. Solo logrando mantener viable el cultivo primario durante un periodo corto, diferente a lo reportado por Adams *et al* en el 2008 los cuales lograron mantener viable las células de TVT por varios meses, sugiriendo que el establecimiento de líneas celulares puede deberse principalmente a características únicas de estabilidad que son propias de las clonas aisladas de hospedadores y no precisamente como característica constitutiva de todas las células de un tipo de tumor (Parmigiani *et al.*, 2011). Debido a que en la mayoría de los estudios con TVT la vía de inoculación experimental es subcutánea en la parte dorsal de los animales (Chung *et al.*, 2009), lo siguiente fue implementar un modelo de inoculación del tumor en la zona genital externa. Se logró la implantación del tumor en el sitio natural, mismo que continuó con su crecimiento a lo largo de los meses, resultados que difieren a los realizados por (Hsiao *et al*, 2002), los cuales inocularon el TVT en perros Beagle observando una regresión espontánea del tumor a las pocas semanas después de la inoculación, tal vez debido a que el lugar de inoculación del TVT fue en un sitio diferente al de su origen natural, esto sugiere que la implantación del tumor pudiera crear un microambiente poco favorable para el mantenimiento y progresión del tumor (Sabry and Lowdell, 2013), encontrando que la regresión espontánea del tumor estaba correlacionada con la gran cantidad de linfocitos infiltrantes de tumor (Rescigno *et al.*, 2007), mismos que secretan una sustancia termolábil la cual aumenta la expresión de las moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad clase I y II, por lo cual el sistema inmune podía reconocer al tumor de una manera antígeno específica. Tang, 2013 encontraron que dicha sustancia estaba compuesta principalmente por IL-6 e IFN γ citocinas que participan en el aumento en la expresión de moléculas del MHC en el microambiente tumoral. Cabe mencionar que este es el primer trabajo en su tipo, en el cual el tratamiento con linfocitos TCD8⁺ estimulados con antígeno tumoral total e IL-21 es

administrado en perros inoculados experimentalmente con TVT en la zona genital, sitio de origen donde ocurre el crecimiento del tumor de manera natural.

Hoy en día no existe un antígeno específico del TVT y debido a que en la mayoría de los casos es complicado encontrar un antígeno universal para cada tipo de tumor (Biswas *et al.*, 2008) y añadiendo que un tipo de tumor puede expresar antígenos diferentes entre los individuos con el mismo cáncer (Salamanca *et al.*, 2008), nosotros proponemos el uso de los lisados celulares para la obtención de los antígenos proteicos tumorales, ya que los péptidos son las únicas moléculas con la capacidad para activar a un linfocito T con receptor $\alpha\beta$ (Jones and Cross, 2004), se logró obtener eficazmente una sustancia denominada antígeno tumoral total con una alta concentración proteica que fue utilizada para pulsar a las células dendríticas (Thompson *et al.*, 2008), compartiendo esta metodología de manera parcial con (Tamura *et al.*, 2008) los cuales generaron células dendríticas de perros utilizando un lisado tumoral de una línea de melanoma canino, administrando las CDs *in vivo* como una vacuna la cual fue efectiva en la inducción de una respuesta inmune de tipo celular permitiendo el reclutamiento de linfocitos CD4⁺ y CD8⁺. Harimoto *et al.* 2013 menciona la eficacia del uso de los lisados tumorales debido a la gran diversidad de antígenos tumorales propios del tumor que podrían ser utilizados como blancos terapéuticos por diferentes clonas de Linfocitos TCD8⁺ y con esto superar los mecanismos de evasión tumoral como la inmunoedición que ha sido reportada en muchos tipos de cánceres, contrario a lo reportado por Harmelin *et al.*, 2002 que utilizan WT1 como único blanco antigénico contra cáncer pulmonar, en una terapia específica de antígeno tumoral disminuyendo los riesgos de reacciones en contra de antígenos propios.

Continuando con nuestro estudio se llevó a cabo la estandarización y generación de células dendríticas maduras caninas derivadas de monocitos de sangre periférica. Nosotros somos los primeros en demostrar una diferenciación eficaz tanto morfológica como funcional de las CDm caninas utilizando de manera parcial un protocolo rápido de generación de células dendríticas en 48 horas implementado por Dauer *et al.* en el 2005 los cuales generaron CDm de humanos en tan solo dos días, sin embargo a diferencia de ellos nosotros implementamos el uso del KLH como adyuvante mejorando y haciendo más

eficiente la maduración de las células dendríticas, debido a que esta reportado (Spolski and Leonard, 2007) su papel inmunogénico promoviendo la activación y maduración de las CDs a través de la expresión de $CD80^+$, $CD83^+$, $CD86^+$ y $CD40^+$ y favoreciendo la respuesta celular Th1 con una consecuente activación de los linfocitos T citotóxicos (Meehan *et al.*, 2013). Los resultados mostraron una visible y exitosa diferenciación morfológica de las CDs similar a lo reportado por Wang *et al* en el 2007 los cuales también generaron CDm caninas, pero a diferencia de nosotros utilizaron un protocolo largo de diferenciación utilizando LPS como adyuvante, sustancia que no está aprobada para su implemento en protocolos de inmunoterapia. Besser *et al.*, 2010 han reportado la generación de CDm humanas con diferencias morfológicas mínimas, contrario a lo observado en nuestro estudio en el cual el estadio de maduración de las CDm caninas llegó hasta un estado morfológico parecido al de una célula dendrítica veliforme, las cuales en humanos han sido reportadas como células presentadoras de antígeno muy eficaces para la activación de los linfocitos T (Ingram 2000), siendo nosotros los primeros en reportar CD caninas con aspecto veliforme equiparable a las CD veliformes en humanos. Para corroborar la generación eficaz de las CDm caninas se llevó a cabo un análisis fenotípico por citometría de flujo evaluando algunos marcadores de superficie característicos de los monocitos y CDm, $CD14^+$, $CD80^+$, $CD83^+$ y DLA II. Expresando el marcador $CD14^+$ en alto porcentaje en los monocitos de sangre periférica, pero disminuyendo dramáticamente su expresión en las CDm caninas, resultado que concuerda con Wang *et al* en el 2007 los cuales observaron una disminución dramática del $CD14^+$ conforme las células dendríticas caninas maduran, difiriendo de Banchereau *et al* en el 2004 el cual reportó la expresión del marcador $CD14^+$ en CDm caninas. Mientras tanto el receptor de activación $CD80^+$ si fue expresado pero en baja cantidad por los monocitos de sangre periférica, similar con los datos reportados por Juan *et al* en el 2009 los cuales también observaron la expresión de $CD80^+$ desde los estadios tempranos de diferenciación, sin embargo, al finalizar el periodo de generación se presentó una homogenización en la expresión, debido a que la mayoría de las CDm expresaron la molécula de activación $CD80$, difiriendo con lo reportado por Chávez *et al* en el 2005 los cuales reportan CDm caninas con poca expresión del marcador $CD80^+$, sugiriendo que esta poca expresión es debido a que el LPS no sobregula la expresión $CD80^+$ en CDm caninas, mecanismo que

también es reportado en humanos y ratones . Con respecto a los marcadores CD83⁺ y DLA II estos no fueron expresados por lo monocitos de sangre periférica, sin embargo, conforme avanzaba el periodo de transición a CDM ambos marcadores fueron sobreexpresados en la superficie de las CDs, resultados que concuerdan con los datos reportados por Hunder *et al.*, 2008 debido a que estas moléculas han sido reportadas como marcadores característicos de células presentadoras de antígeno (Xiaoyi *et al.*, 2013). Charlo *et al* en el 2012 menciona que la expresión del DLA II se presenta de manera constitutiva en todos los linfocitos en el perro. Los resultados anteriormente mencionados nos indican que fue posible la aplicación del protocolo rápido de generación de células dendríticas humanas en monocitos de sangre periférica de caninos, sugiriendo que el protocolo de generación de 48 horas fue eficaz tanto funcional como morfológicamente en la diferenciación de CDM caninas permitiendo un ahorro en tiempo, costos y menor exposición a la contaminación.

Una vez generadas las CDM caninas fue posible llevar a cabo la formación de co-cultivos con CPAs y linfocitos totales de sangre periférica, permitiendo llevar cabo el proceso de presentación del antígeno a los linfocitos T y generando CD8⁺ específicos de tumor. Tomando como parámetro de activación de los linfocitos T la liberación y secreción de IFN γ en el medio de cultivo, debido a que esta citocina es secretada por los linfocitos T cuando el receptor de células T ha sido estimulado de una manera antígeno específica (Ingram *et al.*, 2000). Cabe recalcar que en este estudio se utilizaron IL-21 e IL-2 como terceras señales de activación de los linfocitos T. Nosotros proponemos el uso de la IL-21 proporcionando terceras señales en la activación de los linfocitos TCD8⁺*in vitro* ya que se ha reportado que promueve en linfocitos vírgenes la diferenciación hacia un fenotipo T de memoria central CD127, CD62L, con aumento de la sobrevivencia (Steinman, 2012), también debido a que la IL-21 no promueve la diferenciación de T reguladores (Parrish *et al.*, 2002), promueve una respuesta Th1 y finalmente la IL-21 conduce a los CD8⁺ hacia un potente efecto citotóxico a través de la activación el factor de transcripción EOMES (Gillison, 2004). Se detectaron niveles incrementados de IFN γ en co-cultivos de CPAs pulsadas con antígeno tumoral total y linfocitos de sangre periférica estimulados con IL-2, disminuyendo significativamente la producción de IFN γ en los co-cultivos con ambas

poblaciones pulsadas con antígeno pero estimuladas con IL-21, resultados que concuerdan con los datos reportados por Harimoto *et al* 2013 los cuales mencionan una máxima expresión de IFN γ en linfocitos estimulados con IL-2 correlacionado con la proliferación de T reguladores, mientras tanto la producción de IFN γ por la IL-21 fue más controlada debido a la activación de vías diferentes como STAT 1, STAT 3 y STAT 5 activando funciones críticas de citotoxicidad pero regulando la homeostasis en la producción del IFN γ . Guarú *et al* 2004 menciona que la IL-21 impide una expresión excesiva del IFN γ como mecanismo de regulación de la respuesta inmune. Góngora *et al* en el 2005 establecieron valores mínimos de producción de IFN γ como parámetro de selección de linfocitos T para ser utilizados en inmunoterapia del cáncer, similar a nosotros mencionan que cultivos de linfocitos T que secretan niveles incrementados de IFN γ son buenos candidatos para TCA. Cuando los linfocitos T estuvieron en co-cultivo con CPAs que no fueron pulsadas con antígeno tumoral total, la producción de IFN γ disminuyó dramáticamente de manera independiente a los estímulos con IL-2 o IL-21, resultados por debajo de los valores mínimos de selección del IFN γ y que concuerdan con Magón *et al* en el 2007 los cuales reportan que la falta de una estimulación antigénica en el receptor de células T conlleva a una falta de activación de los linfocitos T, anergia y muerte celular por lo cual la disminución en la producción de IFN γ fue evidente, además cuando los linfocitos T fueron estimulados solo con IL2 o IL-21 la producción de IFN γ apenas fue perceptible. Resultados que nos permiten sugerir una activación completa por los linfocitos T debido a que estos recibieron las tres señales, de activación; estimulación específica de su TCR, estimulación de receptores de activación y estimulación con citocinas, quedando como perspectiva el subtipo de población de los linfocitos TCD8⁺ generados con cada una de las citocinas en este estudio. Continuando con nuestro trabajo lo siguiente fue evaluar la actividad citotóxica de los linfocitos TCD8⁺ específicos de tumor aislados por separación magnética y estimulados con IL-21 o IL-2. Los resultados mostraron un 100% de lisis de la célula tumoral cultivada en presencia de linfocitos CD8⁺ específicos de tumor estimulados con IL-21 y un 80% de citotoxicidad de la célula tumoral cuando los CD8⁺ fueron específicos de tumor pero estimulados con IL-2, resultados que concuerdan con Parmigiani *et al* en el 2011 los cuales reportan un incremento en la muerte de las células blanco cultivadas con linfocitos TCD8⁺ estimulados con IL-21 observando un menor

efecto cuando los linfocitos T fueron estimulados con IL-2, IL-7 o IL-15. Cuando los CD8⁺ no fueron específicos de tumor el porcentaje de citotoxicidad disminuyó significativamente de manera independiente a IL-21 o IL-2, esta respuesta puede deberse a la interacción de los CD8⁺ con las células dendríticas permitiendo la estimulación de receptores de activación pero sin promoverse la activación completa de los CD8⁺ (Erolesa *et al.*, 2012). Por otra parte puede deberse también a reacciones de aloreactividad debido a que algunos autores mencionan que la célula de TVT presenta algunas moléculas del MHC diferentes al haplotipo del huésped. A continuación se realizó una prueba de viabilidad celular con el objetivo de confirmar que la célula de TVT es la que está siendo blanco en los ensayos de citotoxicidad. Se confirmó la muerte de la célula de TVT mostrando mayor eficacia de los linfocitos TCD8⁺ específicos de tumor estimulados con IL-21 para detener el crecimiento tumoral durante mayor tiempo, observando menor eficacia de los CD8⁺ estimulados con IL-2 para controlar el crecimiento tumoral, por lo que se puede sugerir que la población de CD8⁺ generados con IL-2 podría estar conformada por una mezcla de linfocitos efectores y reguladores debido a que en el inicio de la interacción se obtiene gran cantidad de muerte de las células de TVT pero conforme transcurre el tiempo los T reguladores comienzan a ejercer una función supresora sobre la parte efectora, otra explicación es debido a que los CD8⁺ estimulados con IL-2 son más susceptibles a los mecanismos de evasión tumoral, sugiriendo nuevos trabajos para el análisis del subtipo funcional y fenotípico de linfocitos CD8⁺ generados con IL-21 o IL-2.

Los resultados muestran una exitosa y temprana inhibición del crecimiento tumoral aumentando la respuesta antitumoral, demostrando una regresión tumoral completa a diferencia de los grupos control en los cuales el tumor continuo con su crecimiento, relacionando esto con la gran acumulación de linfocitos infiltrantes de tumor, sugiriendo la participación del sistema inmune innato y adaptativo debido a que todo proceso canceroso que es eliminado es obra de una participación completa del sistema inmunológico total (Colvin *et al.*, 2009), también se demostró un incremento en las poblaciones de CD4⁺ y CD8⁺ en sangre periférica sugiriendo que puede ser debido a la función citotóxica de los linfocitos TCD8⁺ específicos de antígeno que desemboca en una amplificación de la

respuesta inmune innata y adaptativa (Hinrichs *et al.*, 2008), el gran incremento en la concentración de IFN γ en el suero de los caninos con terapia celular sugiere la activación de la respuesta celular debido al estímulo de los linfocitos T, Pedro *et al* argumentando la tormenta de diversas citocinas Th1 (IL1 β , TNF α , IL-6 e IFN γ) que son liberadas tras la lisis de las células tumorales, activación del sistema innato y consecuente activación de los linfocitos T. Los resultados indican que los linfocitos TCD8⁺ generados en el laboratorio tienen la habilidad *in vivo* para eliminar el TVT de una manera acelerada similar a lo reportado por Hsiao *et al* los cuales demostraron una temprana erradicación del TVT posterior a la administración de una vacuna conformada por una fusión de células dendríticas y tumorales mismas que activaron una respuesta específica contra el tumor conformada por una gran acumulación de linfocitos infiltrantes resultando en la necrosis tumoral. Harol *et al* recientemente llevaron a cabo un estudio de inmunoterapia utilizando plásmidos que codifican IL-6 e IL-15 en perros inoculados con TVT, bloqueando la actividad de TGF β , estimulando la actividad de células NK y similarmente aumentando la población de linfocitos T CD8⁺ infiltrantes de tumor e incrementando la concentración de IFN γ en suero. Otra característica del TVT es la poca expresión de moléculas del complejo principal de histocompatibilidad en la superficie celular lo cual hace difícil su reconocimiento por el sistema inmune adaptativo, sin embargo, los linfocitos T CD8⁺ una vez activados secretan IFN γ el cual aumenta los niveles de expresión de las moléculas del MHC y a continuación el tumor puede ser reconocido y destruido (Klebanoff *et al.*, 2011), tras la lisis celular se lleva a cabo la liberación de las alarminas las cuales a su vez pueden activar a células del sistema inmune innato como células dendríticas, macrófagos, natural killer y linfocitos B con la consecuente activación de los linfocitos T vírgenes específicos de antígenos tumorales convirtiéndose en una retroalimentación con la amplificación de la respuesta inmunológica (Meza *et al.*, 2006). Rissuto *et al* mencionan algunos factores clave para el éxito de la terapia celular autóloga con linfocitos T CD8⁺ en el tratamiento del cáncer destacando el número de células, estatus de diferenciación y reestimulación antigénica, no encontrando diferencia significativa en la función citotóxica y efectora de los CD8⁺pulsados con IL-2, IL-7, IL-15 o IL-21. Por el contrario Parmigiani *et al* menciona a la IL-21 como una molécula muy favorable para la inmunoterapia debido a la

activación de los linfocitos T con potente efecto citotóxico y función efectora, gran actividad antitumoral y antiviral así como la predisposición de diferenciación en linfocitos T de memoria central.

8. CONCLUSIONES

- Se logró implementar el modelo de inoculación experimental del TVT en su sitio de origen natural en caninos sanos.
- Se estandarizo el protocolo de generación de células dendríticas en un periodo corto de 48 horas en monocitos de sangre periférica de caninos.
- Se logró generar linfocitos TCD8⁺específicos de antígeno estimulados con IL-21 con capacidad citotóxica contra las células de TVT.
- Se implementó la terapia celular autóloga en caninos con TVT utilizando linfocitos TCD8⁺incrementando la inmunidad celular y logrando la regresión tumoral completa.

9. PERSPECTIVAS

- Establecer un cultivo primario de las células de Tumor Venéreo Transmisible debido a que en la actualidad no existe alguno.
- Eficientizar y economizar el protocolo de generación de células dendríticas maduras a partir de monocitos de sangre periférica debido a su importancia en la TCA.
- Evaluar el subtipo y capacidad funcional de los linfocitos TCD8⁺ generados con estímulos de IL-21.
- Llevar a cabo nuevas investigaciones de la Terapia Celular Autóloga con linfocitos TCD8⁺ con el objetivo de probar su eficacia y esta pueda ser implementada de manera rutinaria con seguridad y éxito en pacientes humanos con cáncer.

10. LITERATURA CITADA

1. Ajello, P., and Gimbo, A, 1965. Presenza di particelle virali nelle cellule del tumore di Sticker. *Atti. Soc. Ital. Sci. Nat*; 19:736–739.
2. Akira S, Takeda K, Kaisho T. 2001. Toll-like receptors: critical proteins linking innate and acquired immunity. *Nat. Immunol*; 2:675–80.
3. Atsutaka N, Toru K, Keiko N, Masashi S, Kazuro I, Ryuji M, Takashi K, Shigenori G, 2014. Impaired and imbalanced cellular immunological status assessed in advanced cancer patients and restoration of the T cell immune status by adoptive T-cell immunotherapy. *International Immunopharmacology*; 18:90-97.
4. Bergman PJ, 2010. Cancer Immunotherapy. *Vet Clin Small Anim*; 40:507–518.
5. Biswas SK, Sica A, Lewis CE, 2008. Plasticity of macrophage function during tumor progression: regulation by distinct molecular mechanisms. *J Immunol*; 4:11-17.
6. Boghossian S, Robinson S, Von Delwig A, Manas D, White S, 2012. Immunotherapy for treating metastatic colorectal cancer. *Surgical Oncology*; 21:67-77.
7. Boyman O, Purton JF, Surh CD, Sprent J, 2007. Cytokines and T-cell homeostasis. *Curr Opin Immunol*; 19:320-326.
8. Bridgett M. Ostrander EA, 2006. The Singular History of a Canine Transmissible Tumor. *CELL*; 146:445-447.
9. Bubenik J, 1989. Local immunotherapy of cancer with interleukin 2. *Immunol. Lett*; 21:267-273.
10. Burger UL, Chang MP, Goedegebuure PS, Eberlein TJ, 1995. Recruitment of host CD8 + T cells by tumor-infiltrating lymphocytes and recombinant

interleukin-2 during adoptive immunotherapy of cancer. *SURGERY*; 117:325-333.

11. Chan B, Leel W, Yeung DW, 2003. Adoptive cellular immunotherapy for non-small cell lung cancer: a pilot study. *Cytotherapy*; 5:46 – 54.
12. Chen SL, Fan A, Shan W, Chuang TF, Chiang Y, Chu RM, 2013. IL-6 restores dendritic cell maturation inhibited by tumor-derived TGF-b through interfering Smad 2/3 nuclear translocation. *Cytokine*; 62:352–359.
13. Chiang HC, Wang YS, Chou HC, Liao AT, Chu RM, Lin CS, 2012. Overexpression of chemokine ligand 7 is associated with the progression of canine transmissible venereal tumor. *BMC Veterinary Research*; 8:216-220.
14. Chianga HC, Ching AT, Jana TR, Wangd YS, Lei HJ, Tsaic MH, Chena MF, Leeb CH, Linb CY, Chua RM, Lin CS, 2013. Gene-expression profiling to identify genes related to spontaneous tumor regression in a canine cancer model. *Veterinary Immunology and Immunopathology*; 151:207– 216.
15. Chu RM, SunTS, Yang HY, Wang DG, LiaoKW, ChuangTF, LinCH, Lee WC, 2001. Heat shock proteins in canine transmissible venereal; 28:9–21.
16. Chun PC, Fu Kuob T, Simon JT. Fu Chuanga T, Lina CS, Chua RM, 2011 Immunopathogenic behaviors of canine transmissible venereal tumor in dogs following an immunotherapy using dendritic/tumor cell hybrid. *Veterinary Immunology and Immunopathology*; 139:187–199.
17. Chung CP, Chuang TF, Rong TJ, Chan GH, Chun HY, Jon HL, Yin WC, Min RC, 2009. Effects of immunotherapy of IL-6 and IL-15 plasmids on transmissible venereal tumor in beagles. *Veterinary Immunology and Immunopathology*; 130:25–34.
18. Colvin GA, Berz D, Ramanathan M, Winer ES, Fast L, Gerald J. Elfenbein, P J, 2009. Nonengraftment Haploidentical Cellular Immunotherapy for Refractory Malignancies: Tumor Responses without Chimerism. *Biology of Blood and Marrow Transplant*; 15:421–431.
19. Cui W, Kaech SM, 2010. Generation of effector CD8+ T cells and their conversion to memory T cells. *Immunol Rev*; 236:151-166.

20. Dauer M, Schad K, Herten J, Junkmann J, Bauer C, Kiefl R, Endres S, Eigler A, 2005. FastDC derived from human monocytes within 48 h effectively prime tumor antigen-specific cytotoxic T cells. *Journal of Immunological Methods*; 302:145– 155.

21. De la Sota P; Amigo G, Adagio L, Noia M, Gobello C, 2000. Tumor venéreo transmisible en el perro. *Ciencia Veterinaria*; 6:1515-1883.

22. Emens LA, Jaffee EM, 2007. Immunotherapy and Cancer Therapeutics: Why Partner? *Cancer Immunotherapy*, Elsevier; Chapter 12:207-233.

23. Engels B, Uckert W, 2007. Redirecting T lymphocyte specificity by T cell receptor gene transfer – A new era for immunotherapy. *Molecular Aspects of Medicine*; 28:115–142.

24. Erolesa P, BoschA, Fidalgob AP,Lluch A, 2012. Molecular biology in breast cancer: Intrinsic subtypes and signaling pathways. *Cancer Treatment Reviews*; 6:698–707.

25. Estrada RB, Escudero M, Connor JE, Dasi F, Fenollosa B, Nagore E, Onofre S, Sevilla A, Guillén C, 2002. Estudio del patrón de citocinas (Th1/Th2) producido por linfocitos T periféricos y del existente en tejido tumoral de pacientes con melanoma en diferentes estadios. *Actas Dermosifiliogr*; 93:87-101.

26. Friedmann MD, Eshhar Z, 2006. Adoptive immunotherapy of cancer using effector lymphocytes redirected with antibody specificity. *Up date on cancer therapeutics*; 1:25–32.

27. Gao J, Bernatchez C, Sharma P, Radvanyi LG, Hwu P, 2013. Advances in the development of cancer immunotherapies. *Trends in Immunology*; 34:290–98.

28. Gillison ML, 2004. Human papillomavirus-associated head and neck cáncer is a distinct epidemiologic, clinical and molecular entity. *Semin Oncol*; 31:744-754.

29. Gonzalez CM, Griffey SM, Naydan DK, Flores E, Cepeda R, Cattaneo G, Madewell BR, 2000. Canine Transmissible Venereal Tumour:a Morphological and ImmunohistochemicalStudy of 11 Tumours in Growth Phase and during Regression after Chemotherapy *J. Comp. Path*; 122:241–248.

30. Granados D, Delgado G, 2008. Células Dendríticas (CDs) diferenciadas a partir de Monocitos humanos como herramienta para el estudio de agentes antileishmaniales. *Ciencias Biomédicas*; 6:101-116.
31. Harmelin A, Pinthus JH, Friedmann MD, Kaufman K, Brenner O, 2002. Lack of MHC expression and retention of ultrastructural characteristics by xenograft transmissible venereal tumor cells in SCID mice; 86:4245–249.
32. Hargadon KM, 2013. Tumor-altered dendritic cell function: implications for anti-tumor immunity *Frontiers in immunology*; 192doi: 10.3389/fimmu.2013.00192.
33. Harimoto H, Shimizu M, Nakagawa Y, Nakatsuka K, Wakabayashi A, Sakamoto C, Takahashi H, 2013. Inactivation of tumor-specific CD8⁺ CTLs by tumor-infiltrating tolerogenic dendritic cells. *Immunology and Cell Biology*; 1:23-28.
34. Harrington K, Jankowska P, Hingorani M, 2007. Molecular Biology for the Radiation Oncologist: the 5Rs of Radiobiology meet the Hallmarks of Cancer. *Clinical Oncology*;19; 561–571.
35. Havranek EG, Whelan MA, Greenhalgh R, Dalglish AG, Pandha H, 2002. Advances in prostate cancer immunotherapy. *Surgical Oncology*; 11: 35–45.
36. Hayes RL, Arbit E, Odaimi M, Pannullo S, Scheff R, Kravchinskiy D, Zaroulis C, 2001. Adoptive cellular immunotherapy for the treatment of malignant gliomas. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*; 39: 31–42.
37. Hernández JR, Becker I, 2006. CD8⁺ cytotoxic lymphocytes in cutaneous leishmaniasis. *Salud pública de México*; 48: 12-18.
38. Hinrichs CH, Spolski R, Paulos C, Gattinoni L, Kerstann DC, Klebanoff C, Rosenberg S, Leonard W, Restifo R, 2008. IL-2 and IL-21 confer opposing differentiation programs to CD8 T cells for adoptive immunotherapy. *Blood*; 111: 5326-5333.

39. Hinrichs CS, Borman ZA, Gattinoni L, Yu Z, Burns WR, Huang J, Klebanoff CA, Johnson LA, Kerkar SP, Yang S, 2010. Human effector CD8+ T cells derived from naive rather than memory subsets possess superior traits for adoptive immunotherapy. *Blood. Nat Med*;15:808-813.
40. Ho WY, Nguyen HN, Wolf M, Kuball J, Greenberg PD, 2006. In vitro methods for generating CD8+ T-cell clones for immunotherapy from the naïve repertoire. *Journal of Immunological Methods*; 310: 40–52.
41. Hsiao YW, Liao KW, Hung SW, Chu RM, 2002. Effect of tumor infiltrating lymphocytes on the expression of MHC molecules in canine transmissible venereal tumor cells. *Veterinary Immunology and Immunopathology*; 87:19–27.
42. Hsiao YW, Liao, Shao KW-Min CW, 2004. Tumor-Infiltrating Lymphocyte Secretion of IL-6 Antagonizes Tumor-Derived TGF- β 1 Killing Activity and Restores the Lymphokine-Activated J *Immunol*; 172:1508-1514.
43. Huang YA, Hayes RL, Wertheim SD, Arbit E, Scheff RF, 2001. Treatment of refractory recurrent malignant glioma with adoptive cellular immunotherapy: a case report. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*; 57: 17–23.
44. Huang J, Li C, Wang Y, Lv H, Guo Y, Dai H, Wicha M, Chang A, Li Q, 2013. Cytokine-induced killer (CIK) cells bound with anti-CD3/anti-CD133 bispecific antibodies target CD133 high cancer stem cells in vitro and in vivo. *Clinical Immunology*; 149: 1156–168.
45. Hunder N, Wallen H, Cao J, Hendricks DW, Reilly JZ, Rodmyre R, Jungbluth A, Gnjjatic S, Thompson JA, Yee C, 2008. Treatment of Metastatic Melanoma with Autologous CD4+ T Cells against NY-ESO-1. *N Engl J Med*; 358: 2698-2703.
46. Ingram M, Bishai MB, Techy GB, Narayan KS, SaroufeemR, Yazan O, Marshall CE, 2000. Lymphocytic infiltration of bladder after local cellular immunotherapy. *Cytotherapy*; 2: 297–302.

47. Inui T, Kuchiike D, Kubo K, Mette M, Uto W, Hori H, Sakamoto N, 2013. Clinical Experience of Integrative Cancer Immunotherapy with GcMAF. *Anticancer Research*; 33: 2917-2920.
48. Ito F, Chang A, 2013. Cancer Immunotherapy: Current Status and Future Direction. *Surgical Oncology Clinics of North America*; 22: 765–783.
49. Joannei JR, Wroblewski M, 2004. On the road to a tumor cell vaccine: 20 years of cellular immunotherapy. *Vaccine*; 23: 97–113.
50. Jones AV, Cross NC, 2004. Oncogenic derivatives of platelet-derived growth factor receptors. *Cell Moll Life Sci*; 61: 2912-23.
51. Kahan D, Pellis NR, Legrue SR, Tanaka T, 1982. Immunotherapeutic effects of tumor-specific transplantation antigens released by i-butanol. *Cáncer*; 49:1168-1173.
52. Kakimi K, Nakajima J, Wada H, 2009. Active specific immunotherapy and cell-transfer therapy for the treatment of non-small cell lung cancer. *Lung Cancer*; 65: 1–8.
53. Kaminski JM, Summers JB, Ward MB, Huber MR, Minev B, 2003. Immunotherapy and prostate cancer. *Cancer Treatment Reviews*; 29: 199–209.
54. Kees T, Egeblad M, 2011. Innate Immune Cells in Breast Cancer From Villains to Heroes?. *J Mammary Gland Biol Neoplasia*; 16:189–203.
55. Kennedy TR, Yang TJ, Allen PR, 1977. Canine transmissible venereal sarcoma: electron microscopic changes with time after transplantation. *Br. J. Cancer*; 36:375-379.
56. Kimura H, Yamaguchi Y, 1995. Adjuvant immunotherapy with interleukin 2 and lymphokine-activated killer cells after noncurative resection of primary lung cancer. *Lung Cancer*; 13: 31–44.

57. Klebanoff CA, Gattinoni L, Palmer DC, 2011. Determinants of Successful CD8+ T-Cell Adoptive Immunotherapy for Large Established Tumors in Mice. *Clin Cancer Res*; 17: 5343-5352.

58. Kumar S, Mason M, 2012. Principles of cancer treatment by immunotherapy. *SURGERY*; 30: 198-202.

59. Leen AM, Myers GD, Sili U, Huls MH, Weiss H, Leung KS, 2006. Monoculture-derived T lymphocytes specific for multiple viruses expand and produce clinically relevant effects in immunocompromised individuals. *Nat Med*; 12:1160–6.

60. LeGrue SJ, Kahan BD, 1985. Extraction of a Murine Tumor-specific Antigen from Cells and Plasma Membranes Using 1-Butanol: Augmentation of Antigen Yield by Colchicine. *Cancer Res*; 45:1926-1929.

61. LeGrue SJ, Pellis NR, Riley LR, 1985. Biochemical Characterization of 1-Butanol-extracted Murine Tumor-specific Transplantation Antigens *Cancer Res*; 45: 3164-3172.

62. Liao K, Hunga SW, Hsiao YW, Bennettb M, Chua RM, 2003. Canine transmissible venereal tumor cell depletion of B lymphocytes: molecule(s) specifically toxic for B cells. *Veterinary Immunology and Immunopathology*; 92:149–162.

63. Liu D, Yangb MQ, Eberhardtc J, Perssonc B, 1996. Repeated immunotherapy using intratumoural injection with recombinant interleukin-2 and tumour-infiltrating lymphocytes inhibits growth of breast cancer and induces apoptosis of tumour cells. *Zancer Letters*; 3; 31-36.

64. Liu Q, Zhang C, Sun A, Zheng Y, Wang L, Cao X, 2009. Tumoreducated CD11bhighIalow regulatory dendritic cells suppress T cell response through arginase I. *J Immunol*;182:6207–6216.

65. López M, Escobar A, Alfaro J, Fodor M, Larrondo M, Ferrada C, Salazar-Onfray F, 2004. Advances in cellular immunotherapy for malignant melanoma. *Revista Médica Chile*; 132: 1115-1126.

66. Loraine S, Mendoza EJ, 2010. Medicinal plants as potential agents against cancer, relevance for Mexico. *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas*; 41:18-27.
67. Lu Y, Han J, 2003. Cancer classification using gene expression data. *Information Systems*; 28: 243–268.
68. Marchal T, Chabanne L, Kaplanski C, Rigal D, Magnol JP, 1997. Immunophenotype of the canine transmissible venereal tumour. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 57: 1-11.
69. McLaughlin MJ, Kroesen BJ, Harmsen MC, Leij LF, 2001. Cancer immunotherapy: insights from transgenic animal models. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*; 40: 53–76.
70. Meehan KR, Talebian L, Tosteson T, Hill JM, Szczepiorkowski Z, Sentman CL, Ernstoff MS, 2013. Adoptive Cellular Therapy using Cells Enriched for NKG2D β CD3 β CD8 β T Cells after Autologous Transplantation for Myeloma. *Biol Blood Marrow Transplant*; 19: 129-137.
71. Meza JJ, Montano LA, Aguayo GA, 2006. Molecular basis of cáncer. *rev. invest. Clín*; 58: 56-70.
72. Mukaratirwaa AS, Gruys E, 2003. Canine transmissible venereal tumour: Cytogenetic origin, immunophenotype, and immunobiology. *Veterinary Quarterly*; 25: 101-111.
73. Murchison EP, 2009. Clonally transmissible cancers in dogs and Tasmanian devils. *Oncogene*; 27: 19–30.
74. Murgia C, Pritchard JK, Kim SY, Fassati A, Weiss RA, 2006. Clonal Origin and Evolution of a Transmissible Cancer Cell; 126: 477–487.
75. Oberling F, 1997. Monocyte/ Macrophages as effector cells in cáncer immunotherapy. *Transfus. Sci*; 18:243-250.

76. Ochsenshein AF, Klenerman P, Karrer U, Ludewig B, Pericin M, Hengartner H, 1999. Immune surveillance against a solid tumor fails because of immunological ignorance. *Proc Natl Acad Sci U S A*; 96: 2233–2238.
77. [Online]. Disponible en:
<http://www.organizacionmundialdelasalud.org/dlib/July2013/07weibel.html>
78. Pai C, Kuob TF, Maoc JT, Chuanga TF, Lina CS, Chua RM, 2011. Immunopathogenic behaviors of canine transmissible venereal tumor in dogs following an immunotherapy using dendritic/tumor cell hybrid. *Veterinary Immunology and Immunopathology*; 139: 187–199.
79. Parmigiani A, Pallin M, Schmidtmayerova H, Lichtenheld M, Pahwa S, 2011. Interleukin-21 and cellular activation concurrently induce potent cytotoxic function and promote antiviral activity in human CD8 T cells. *Human Immunology*; 72: 115–123.
80. Parrish-Novak J, Foster DC, Holly RD, Clegg CH, 2002. Interleukin-21 and the IL-21 receptor: novel effectors of NK and T cell responses. *J Leukoc Biol*; 72: 856-863.
81. Pérez J, Day MJ, Mozos E, 1998. Immunohistochemical study of the local inflammatory infiltrate in spontaneous canine transmissible venereal tumour at different stages of growth; 64: 133–147.
82. Perou CM, Sorlie T, Eisen MB, 2000. Molecular portraits of human breast tumours. *Nature*; 406: 747–752.
83. Putnam KP, Bombick DW, Doolittle DJ, 2002. Evaluation of eight in vitro assays for assessing the cytotoxicity of cigarette smoke condensate. *Toxicology in Vitro*; 16: 599–607.
84. Ramadan G, 2011. Generation of functional monocyte-derived dendritic cells suitable for clinical application in the absence of interleukin-6. *Cytotechnology*; 63: 513–521.
85. Ramírez RR, García JS, Nevárez GA, Rodríguez TL 2010. Transmissible venereal tumor with metastasis to a spleen hemangioma in a bitch. *Vet. Méx*; 41: 23-28.

86. Ramos AP, Castrillón LE, Becerril DE, Zamora R, Aguirre RM, Espinosa VK, González J, Padilla C, 2012. Estimulación de células mononucleares humanas in vitro con extracto total y péptidos liberados al medio por *Candida albicans*. *Dermatol Rev Mex*; 56: 377-384.
87. Rasmussen AM, Borelli G, Hoel HJ, Lislud K, Gaudernack G, Kvalheim G, Aarvak T, 2010. Ex vivo expansion protocol for human tumor specific T cells for adoptive T cell therapy. *Journal of Immunological Methods*; 355: 52–60.
88. Rescigno M, Avogadri F, Curigliano G, 2007. Challenges and prospects of immunotherapy as cancer treatment. *Biochimica et Biophysica*; 1776: 108–123.
89. Rochman Y, Spolski R, Warren J, 2009. New insights into the regulation of T cells by γ c family cytokines. *Nat Rev Immunol*; 9: 480-488.
90. Rosenblatt J, 2008. Cellular immunotherapy for multiple myeloma. *Best Practice & Research Clinical Haematology*; 21: 559–577.
91. Ross DS, Steele G, 1984. Experimental Models in Cancer Immunotherapy. *Journal of surgical research*; 37: 415-430.
92. Sabry M, Lowdell MW, 2013. Tumor-primed NK cells: waiting for the green light. *Frontiers in immunology*; 4: 408-412.
93. Salamanca S, Santader BA, Triana PA, Romero S, Rondón B, 2008. Transmittable venereal tumour (TVT) with pulmonary metastasis: a case report. *Orinoquia*; 12:162-170.
94. Sangiolo D, 2011. Cytokine Induced Killer Cells as Promising Immunotherapy for Solid Tumors. *JOURNAL OF CANCER*; 2: 363-368.
95. Siddle HV, Kaufman J, 2013. A tale of two tumours: Comparison of the immune escape strategies of contagious cancers *Molecular Immunology*; 55:190– 193.

96. Sondei PM, Hank JA, Kohler PC, Sosman JA, Hillman GW, Fisch P, 1989. The cellular immunotherapy of cancer: current and potential uses of interleukin-2; 9: 13-18.
97. Spolski R, Leonard WJ, 2007. Interleukin-21: basic biology and implications for cancer and autoimmunity. *Annu Rev Immunol*. DOI 10.1146/annurev.immunol.26.021607.090316.
98. Steinman RM, 2012. Decisions About Dendritic Cells: Past, Present, and Future. *Annu. Rev. Immunol*; 30: 1–22.
99. Tanaka H, Demeure CE, Rubio M, Delespesse G, Sarfati M, 2000. Human Monocyte-derived Dendritic Cells Induce Naive T Cell Differentiation into T Helper Cell Type 2 (Th2) or Th1/Th2 Effectors: Role of Stimulator/Responder Ratio. *J. Exp. Med*; 192: 405–411.
100. Tang X, 2013. Tumor-associated macrophages as potential diagnostic and prognostic biomarkers in breast cancer. *Cancer Letters*; 332: 3–10.
101. Teschner D, Wenzel G, Distler E, Schnrer E, Theobald M, Neurauter N, Schjetne K, Herr W, 2011. In Vitro Stimulation and Expansion of Human Tumour-Reactive CD8+ Cytotoxic T Lymphocytes by Anti CD3/CD28/CD137 Magnetic Beads *Scandinavian Journal of Immunology*; 74: 155–164.
102. Thacker EE, Nakayama M, Smith BF, Bird RC, Muminova Z, Strong TV, Timares L, Korokhovi N, O'Neill AM, Gruijl T, Glasgow JN, Tani K, Curiel DT, 2009. A genetically engineered adenovirus vector targeted to CD40 mediate transduction of canine dendritic cells and promotes antigen-specific immune responses in vivo. *Vaccine*; 27: 7116–7124.
103. Thompson JA, Curti BD, Redman BG, Bhatia S, Weber JS, Agarwala SS, 2008. Phase I study of recombinant interleukin-21 in patients with metastatic melanoma and renal cell carcinoma. *J Clin Oncol*; 26: 2034–2039.
104. Tobias ES, 2013. Chapter 17 – The Molecular Biology of Cancer *Emery and Rimoin's Principles and Practice of Medical Genetics*; 15: 1–44.

105. Toyoshima AT, Kumamarub W, Hayashida J, Moriyama MA, Kitamura RA, Tanaka HA, Yamada AC, Nakamura SA, 2012. In vitro induction of specific CD8+ T lymphocytes by tumor-associated antigenic peptides in patients with oral squamous cell carcinoma. *Cancer Letters*; 322: 86–91.
106. Turtle CJ, Riddell SR, 2011. Genetically retargeting CD8+ lymphocyte subsets for cancer immunotherapy. *Current Opinion in Immunology*; 23: 299–305.
107. Wagner JL, Creer SA, Storb R, 2000. Dog class I gene DLA-88 histocompatibility typing by PCR-SSCP and sequencing. *Tissue Antigens*; 55: 564–567.
108. Waldmann TA 2006. The biology of interleukin-2 and interleukin-15: implications for cancer therapy and vaccine design. *Nat Rev Immunol*; 6: 595–601.
109. Wang Y, Deng B, Tang W, Liu T, Shen X, 2013. TGF- β 1 secreted by hepatocellular carcinoma induces the expression of the Foxp3 gene and suppresses antitumor immunity in the tumor microenvironment. *DigDis*; 58: 1644–52.
110. William YH, Nguyen HN, Wolf M, Kuball J, Greenberg P, 2006. In vitro methods for generating CD8+ T-cell clones for immunotherapy from the naïve repertoire. *Journal of Immunological Methods*; 310: 40–52.
111. Xiaoyi L, Jianxia H, Weihong C, Huili Q, Yu W, Zhongliang M, Funian L, 2013. Effects of two different immunotherapies on triple negative breast cancer in animal model. *Cellular Immunology*; 284: 111–118.
112. Ya-Wen Hsiao · Kuang-Wen Liao · Tien-Fu Chung · Chen-Hsuan Liu · Chia-Da Hsu · Rea-Min Chu, 2008. Interactions of host IL-6 and IFN- γ and cancer-derived TGF- β 1 on MHC molecule expression during tumor spontaneous regression. *Cancer Immunol Immunother*; 57: 1091–1104.
113. Yang B, Liu H, Shi W, Wang Z, Sun S, Zhang G, Hu Y, Liu T, Jiao S, 2013. Blocking transforming growth factor- β signaling pathway augments antitumor effect of adoptive NK-92 cell therapy. *International Immunopharmacology*; 17: 198–204.

114. Ying Y, Chuanga TF, Guichardb C, El-Garchb H, Tiernyc D, Taiching L, Lina C, Chioud KH, Tsaid C, Hsuan L, Chiuan L, Fischerb L, Chua RM, 2011. Chicken HSP70 DNA vaccine inhibits tumor growth in a canine cancer model. *Vaccine*; 29: 3489–3500.
115. Young P, Chang K, Jung H, Seong T, SungGK, Tai GK, 2007. The optimal interval for dendritic cell vaccination following adoptive T cell transfer is important for boosting potent anti-tumor immunity. *Vaccine*; 42: 7322–7330.
116. Yu J, Du W, Yan F, Wang Y, Li H, Cao S, 2012. Myeloid-derived suppressor cells suppress antitumor immune responses through IDO expression and correlate with lymph node metastasis in patients with breast cancer. *J Immunol*; 190: 3783–97.
117. Yu Y, Hyun C, Dapeng W, Kane K, Claudio A, Esteban C, Xue ZY, 2013. Adoptive transfer of Tc1 or Tc17 cells elicits antitumor immunity against established melanoma through distinct mechanisms. *The Journal of Immunology*; 180: 1715–1728.
118. Zavala LM, Villatoro J, Gamez A, Franco MA, Rangel B, Gutierrez Y, Montes RL, Valdez JF, Saucedo CO, 2009. Production of biologically active human lymphotactin (XCL1) by *Lactococcus lactis*. *Biotechnol Lett*; 31: 215–220.
119. Zhang H, Hong H, Li D, Ma S, Di Y, Stoten A, 2009. Comparing pooled peptides with intact protein for accessing cross-presentation pathways for protective CD8⁺ and CD4⁺ T cells. *J Biol Chem*; 284: 9184–9191.

11. RESUMEN BIOGRÁFICO

Alex Jesús Hernández Granados

Candidato para el Grado de

Maestría en Ciencias con Orientación en Inmunobiología

Tesis: EFECTO DE LA TERAPIA AUTÓLOGA CON LINFOCITOS T CD8+ ESTIMULADOS CON ANTÍGENO TUMORAL TOTAL E IL-21 EN CANINOS CON TUMOR VENÉREO TRANSMISIBLE.

Campo de Estudio: Inmunobiología del Cáncer

Datos Personales: Nacido en Monterrey Nuevo León, México, el 12 de Julio de 1989 hijo de Alejandro Hernández Serrano y Beatriz Granados Martínez.

Educación: Egresado de la Universidad Autónoma de Nuevo León, grado obtenido de Médico Veterinario y Zootecnista en 2013, estudiante talento durante toda mi licenciatura, con mención honorífica y mérito académico por primer lugar de generación 2008-2012.

Experiencia Profesional: Médico Veterinario y Zootecnista en México.