



**UNIVERSIDAD DE CHILE**

**Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas**

**Departamento de Bioquímica y Biología Molecular**

**“EVALUACIÓN *IN VIVO* DE UN SHARN DIRIGIDO CONTRA I $\kappa$ B $\alpha$  COMO  
ADYUVANTE DE UNA VACUNA DE ADN ANTITUMORAL”**

***Memoria de título para optar al***

**Título de Químico Farmacéutico**

**Profesor patrocinante**

Javier Puente Piccardo PhD  
Facultad de Ciencias Químicas y  
Farmacéuticas  
Universidad de Chile

**Director de tesis**

Álvaro Lladser Caldera  
Laboratorio de Inmunoterapia  
Génica  
Fundación Ciencia & Vida

**FELIPE IGNACIO GÁLVEZ CANCINO**

**2016**

*Y, al principio, todo fue curiosidad.*

*Isaac Asimov*

## **AGRADECIMIENTOS**

A toda mi familia, pero en particular a mi madre Gimena, mi abuela Olga, mi hermana Carolina y mi esposa y mejor amiga Camila. Gracias por la crianza, la compañía y la paciencia.

A mis amigos de la vida, Benjamin y Jorge por estar conmigo desde la época del colegio. A Rafael, por todas las cervezas y las grandes reflexiones que hemos hecho. A James por su gran amistad y sus palabras siempre sabias

A la Doctora Gina Sanchez y sus técnicos de laboratorio, Rodrigo y Willy, muchas gracias por los consejos y la paciencia, si no hubiera hecho tantos experimentos mal en su laboratorio quizás no estaría tan enamorado de la ciencia como lo estoy hoy.

A mi tutor de tesis, Doctor Álvaro Lladser, gracias por creer en mí, por apoyarme, por aconsejarme y por darme la confianza de realizar mis ideas y aportar al desarrollo de los proyectos del laboratorio.

A los integrantes y exintegrantes del Laboratorio de Inmunoterapia Génica. A Nicole por su amistad, paciencia y enseñanzas. A Cesar por su amistad y gran sentido del humor. A Marioly por su gran amistad y por todo el tiempo que dedicó a enseñarme. A los que conforman hoy el grupo vacunas, Ernesto, Evelyn y Sebastian, ha sido un gusto formar parte del mismo equipo de trabajo, vienen más y mejores momentos.

## INDICE

1. ABREVIATURAS.....	6
2. RESUMEN .....	7
3. ABSTRACT.....	10
4. INTRODUCCIÓN.....	13
5. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS .....	29
6. MATERIALES.....	31
7. MÉTODOS.....	35
8. RESULTADOS .....	43
9. DISCUSIÓN .....	57
10. CONCLUSIONES .....	70
11. BIBLIOGRAFÍA.....	71

## INDICE DE FIGURAS

### **Figura 1. Análisis de las células dendríticas migratorias luego de realizar vacunación con ADN.**

Se inmunizaron ratones de la cepa C57BL/6 y se analizó la presencia de células dendríticas migratorias (mDC) en los nódulos linfáticos drenantes del sitio de vacunación.

- A.** Cinética de migración de células dendríticas migratorias (mDC: CD11c+MHCII<sup>hi</sup>), luego de realizar inmunización con pOVA en los días 1, 3 y 5. **B.** Análisis de las células dendríticas migratorias un día después de realizar inmunización intradérmica con los vectores pOVA, shCTRL and shIkB $\alpha$ . **C.** Figura representativa de las células dendríticas migratorias en las distintas condiciones analizadas en B. n=4-9 animales, cada valor está expresado como el promedio  $\pm$  EE, se utilizó Mann Whitney unpaired T-test para el análisis estadístico.....45

### **Figura 2. Frecuencia de los subtipos de DC de la piel en el nódulo linfático luego de realizar electroporación intradérmica con el shARN contra IkB $\alpha$ .**

Se inmunizaron ratones de la cepa C57BL/6con, un día después se obtuvieron los nódulos linfáticos drenantes del sitio de vacunación y en ellos se analizaron las diferentes poblaciones de DC **A.** Método de análisis de los distintos subtipos de DC migratorias en el nódulo linfático **B** Expresión de XCR1 en las dDC, LC.**C.** Frecuencia de las LC y de las dDC en los nódulos linfáticos drenantes del sitio de vacunación. Resultados obtenidos de dos experimentos independientes n=8, cada valor está expresado como el promedio  $\pm$  EE, se utilizó Mann Whitney unpaired T-test para el análisis estadístico.....49

### **Figura 3. Frecuencia de linfocitos T citotóxicos específicos para TRP2 productores de IFN- $\gamma$ y TNF- $\alpha$ en sangre de ratones vacunados mediante electroporación intradérmica de ADN.**

Se inmunizaron ratones de la cepa C57BL/6 dos veces con los vectores indicados al pie de cada figura con un intervalo de dos semanas entra cada vacunación. Se obtuvo sangre de la vena de la cola de cada animal y 12 días después mediante reestimulación *in vitro* con el péptido irrelevante OVA<sub>(257-264)</sub> o con el péptido TRP2<sub>(180-188)</sub> se analizaron los linfocitos T CD8<sup>+</sup> productores de IFN- $\gamma$  y TNF- $\alpha$  mediante citometría de flujo. **A.** Frecuencia de linfocitos T CD8<sup>+</sup> específicos 12 días después de la segunda inmunización (segundo sangrado). **B.** Detección de linfocitos T CD8<sup>+</sup> productores de IFN- $\gamma$  y TNF- $\alpha$  mediante citometría de flujo, en rojo se muestran las células estimuladas con el péptido irrelevante y en negro las células estimuladas con el péptido TRP2<sub>(180-188)</sub>. Figura representativa de los resultados obtenidos durante el segundo sangrado. Resultados obtenidos de dos experimentos independientes, n=10 animales, cada valor está expresado como el promedio  $\pm$  EE, se utilizó Mann Whitney unpaired T-test para el análisis estadístico.....52

### **Figura 4. Supresión de la metástasis pulmonar y del crecimiento tumoral luego de vacunar con una vacuna de ADN que codifica para TRP2 en conjunto con el shIkB $\alpha$ .**

Se inmunizaron ratones de la cepa C57BL/6 dos veces con los vectores indicados al pie de cada figura con un intervalo de dos semanas entra cada vacunación. En el caso del ensayo de metástasis pulmonar, las células de la línea celular tumoral B16-F10 fueron inyectadas de manera intravenosa en la cola de cada uno de los ratones previamente inmunizados con los

plásmidos indicados al pie de la figura un día después del sangrado. 3 semanas después del desafío tumoral, los animales fueron sacrificados en una cámara de CO<sub>2</sub>, se extrajeron los pulmones y se contaron los focos metastásicos. En el caso del ensayo de crecimiento tumoral, las células de la línea celular tumoral B16-F10 fueron inyectadas de forma subcutánea un día antes de la vacunación con los vectores indicados, el crecimiento tumoral se siguió durante doce días. **A.** Número de focos metastásicos en los diferentes grupos de animales inmunizados. **B.** Figura representativa de los pulmones obtenidos de los diferentes grupos de ratones inmunizados. **C.** El crecimiento tumoral fue medido 3 veces a la semana y graficado como volumen tumoral. **D.** Masa de los tumores, medida al día 12 post inoculación de las células. Resultados obtenidos de dos experimentos independientes, n=10 animales, cada valor está expresado como el promedio  $\pm$  EE, se utilizó Mann Whitney unpaired T-test para el análisis estadístico.....57

## 1. ABREVIATURAS

<b>DC:</b>	Célula dendrítica
<b>dDC:</b>	Células dendríticas dermales CD103+
<b>LC:</b>	Células de Langerhans
<b>mDC:</b>	Células dendríticas migratorias
<b>rDC:</b>	Células dendríticas residentes del nódulo linfático
<b>CTL:</b>	Linfocito T CD8 citotóxico
<b>MHC:</b>	Complejo mayor de histocompatibilidad
<b>TCR:</b>	Receptor de células T
<b>OVA:</b>	Proteína ovoalbúmina
<b>TRP2:</b>	Proteína TRP2
<b>OMS:</b>	Organización mundial de la salud
<b>NF-κB:</b>	De su nombre en inglés, <i>nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells</i>
<b>IκB:</b>	De su nombre en inglés, <i>inhibitor of kappa B</i>
<b>IFN-γ:</b>	Interferon-γ
<b>TNF-α:</b>	Factor de necrosis tumoral α
<b>IL-2:</b>	Interleuquina 2
<b>FasL:</b>	Fas ligando
<b>PFN:</b>	Perforina
<b>GMCSF:</b>	Factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos
<b>TLR-9:</b>	Receptor de tipo toll 9
<b>shARN:</b>	De su nombre en inglés, <i>short hairpin RNA</i>
<b>CMV:</b>	Citomegalovirus
<b>cGAS:</b>	De su nombre en inglés, <i>cyclic GMP-AMP synthase</i>
<b>DAI:</b>	De su nombre en inglés, <i>DNA-dependent activator of IFN-regulatory factors</i>
<b>STING:</b>	De su nombre en inglés, <i>stimulator of interferon genes</i>
<b>AIM2:</b>	De su nombre en inglés, <i>absent in melanoma 2</i>
<b>LRRFIP1:</b>	De su nombre en inglés, <i>leucine-rich repeat interacting protein-1</i>
<b>IFI 16:</b>	de su nombre en inglés, <i>IFN inducible protein 16</i>
<b>TBK-1:</b>	De su nombre en inglés, <i>Tank binding kinase 1</i>
<b>RIP-1:</b>	De su nombre en inglés, <i>receptor interacting protein-1 kinase</i>
<b>RHD:</b>	De su nombre en inglés <i>Rel homology domain</i>
<b>NLS:</b>	De su nombre en inglés <i>nuclear-localization sequences</i>
<b>NEMO:</b>	De su nombre en inglés <i>NF-κB essential modulator</i>

## 2. RESUMEN

Las vacunas de ADN son una terapia alternativa altamente atractiva para combatir el cáncer. Esta estrategia consiste en la entrega *in vivo* de ADN plasmidial codificante de antígenos tumorales que son expresados y presentados por células dendríticas (DC) con el fin de activar linfocitos T capaces de eliminar específicamente células tumorales. Un importante paso hacia la aplicación clínica de las vacunas de ADN ha sido el uso de la electroporación *in vivo*, un método de entrega altamente eficiente y clínicamente aplicable, que aumenta considerablemente el ingreso de plásmidos al interior de las células. Sin embargo, la mayoría de los antígenos tumorales son antígenos propios expresados en células normales, por lo que el sistema inmune es incapaz de discriminar a los tumores como agentes potencialmente peligrosos. Es así como los esfuerzos para resolver estos inconvenientes se han enfocado, en parte, en la búsqueda y elaboración de nuevas estrategias que sean capaces de promover eficientemente la inducción de linfocitos T específicos contra estos antígenos tumorales poco inmunogénicos.

El ADN usado en las vacunas puede ser reconocido por numerosos receptores de la inmunidad innata, los cuales al ser activados, señalizan a través del factor de transcripción NF- $\kappa$ B, induciendo la expresión de citoquinas proinflamatorias e interferones de tipo I. NF- $\kappa$ B es un regulador maestro de la función de las DC y

de la inducción de linfocitos T mediada por vacunas de ADN, por lo tanto, el desarrollo de adyuvantes que modulen su actividad representa una estrategia interesante para promover la inducción eficiente de linfocitos T antitumorales. I $\kappa$ B $\alpha$  es uno de los principales inhibidores de NF- $\kappa$ B, el cual además es un gen blanco de NF- $\kappa$ B, por lo que actúa en un sistema de retroalimentación negativa para detener la activación de esta vía. Por otro lado, el uso de shARN que silencian la expresión de reguladores negativos de las DC ha demostrado su capacidad como adyuvantes génicos en vacunas de ADN, al inducir una respuesta inmune antitumoral más potente. Por tanto, nuestra hipótesis plantea que un shARN contra I $\kappa$ B $\alpha$  es capaz de potenciar la activación de la inmunidad innata mediada por NF- $\kappa$ B y, como consecuencia, la magnitud de la respuesta inmune adaptativa específica contra el antígeno tumoral codificado.

En este proyecto se utilizaron plásmidos codificantes de un shARN contra I $\kappa$ B $\alpha$  como adyuvantes génicos para ser administrado junto a una vacuna de ADN que codifica para el antígeno tumoral TRP2. Se evaluó el efecto del silenciamiento de I $\kappa$ B $\alpha$  sobre la migración de las células dendríticas de la piel, particularmente sobre las células de Langerhans y sobre las células dendríticas dermales CD103+. La generación de linfocitos T específicos contra TRP2 se analizó en ratones vacunados mediante citometría de flujo y el efecto antitumoral *in vivo* se evaluó usando un modelo de profiláctico de melanoma metastásico y un modelo terapéutico de melanoma subcutáneo.

Los resultados de este trabajo indican que la administración de ADN plásmidial en la piel incrementa la migración de células dendríticas hacia los nódulos linfáticos drenantes y que la inhibición de la expresión de I $\kappa$ B $\alpha$  con un shARN en el sitio de vacunación incrementa la migración de células dendríticas dermales CD103+ hacia el nódulo linfático drenante. Además se observó que la coadministración del shARN contra I $\kappa$ B $\alpha$  en conjunto con una vacuna de ADN dirigida contra el antígeno tumoral TRP2 potencia la generación de linfocitos T CD8 específicos e incrementa la respuesta inmune antitumoral en ensayos de metástasis pulmonar y crecimiento tumoral utilizando el modelo de melanoma murino B16F10. Dada la gran capacidad de las células dendríticas dermales CD103+ para activar linfocitos T CD8 es posible correlacionar su incremento en los nódulos linfáticos drenantes del sitio de vacunación con una mayor generación de linfocitos T CD8 específicos contra TRP2 y con un incremento en la respuesta inmune antitumoral contra melanoma cuando se coadministra el shARN contra I $\kappa$ B $\alpha$  junto con una vacuna de ADN dirigida contra el antígeno tumoral TRP2.

### 3. ABSTRACT

DNA vaccines are a highly attractive therapeutic alternative to treat cancer. This strategy consists of *in vivo* delivering plasmid vectors encoding tumor antigens, which are expressed and presented by dendritic cells (DC) in order to activate T cells capable of specifically eliminating tumor cells. An important step towards the clinical application of DNA vaccines has been the use of *in vivo* electroporation, a highly efficient delivery method that is clinically applicable and considerably increases plasmid uptake in cells. However, most of tumor antigens are self-antigens expressed by normal cells, so that the immune system is unable to recognize tumors as potentially dangerous agents. Thus, the efforts to solve these inconveniences have been focused on developing new strategies to promote the induction of T cell responses specific against such poorly immunogenic tumor antigens.

DNA used for vaccines can be recognized by several innate immune receptors that, upon activation, signal through the transcription factor NF- $\kappa$ B which induces the expression of proinflammatory cytokines and type I interferons. NF- $\kappa$ B is a master regulator of both DC function and DNA vaccine-mediated induction of T cell responses, therefore the development of adjuvants that modulate NF- $\kappa$ B activity represents an interesting strategy to promote the efficient induction of antitumor T cell responses. I $\kappa$ B $\alpha$  is one of the major inhibitors and downstream

target genes of NF- $\kappa$ B, therefore acting in a negative feedback loop to stop NF- $\kappa$ B activation. The use of shRNA silencing negative regulators of DC function has demonstrated its potential as genetic adjuvants for DNA vaccines by inducing enhanced antitumor immune responses. Hence, our hypothesis states that a shRNA targeting I $\kappa$ B $\alpha$  is able to promote the NF- $\kappa$ B innate immune activation and, as a consequence, the magnitude of tumor antigen-specific adaptive immune responses.

In this project, plasmid-encoded shRNA targeting I $\kappa$ B $\alpha$  were generated as genetic adjuvants to be coadministered with a DNA vaccine encoding the tumor antigen TRP2. The effect of I $\kappa$ B $\alpha$  silencing was analyzed over the migration of skin dendritic cells, particularly Langerhans cells and CD103<sup>+</sup> dermal dendritic cells. Generation of TRP2-specific T cells was studied in vaccinated mice by flow cytometry and the *in vivo* antitumor effect was evaluated using prophylactic model of metastatic melanoma and a subcutaneous model of melanoma.

The results obtained in this work shows that the inhibition of I $\kappa$ B $\alpha$  using a shRNA increases the migration of CD103<sup>+</sup> dermal dendritic cells to the skin draining lymph nodes. Also the coadministration of the shRNA against I $\kappa$ B $\alpha$  and a DNA vaccine against TRP2 enhance the generation of TRP2 specific CD8 T cells increasing the antitumor immune response against melanoma. Finally due to the high ability of CD103<sup>+</sup> dermal dendritic cells to cross-present antigens and

activate CD8 T cell is possible to correlate their increase in the migration with higher levels of TRP2 specific CD8 T cells and higher antitumor immune response when the shRNA against I $\kappa$ B $\alpha$  is coadministered with a DNA vaccine against TRP2.

## **4. INTRODUCCIÓN**

### **4.1 Cáncer**

El cáncer es un conjunto de enfermedades en las que las células malignas se dividen sin control pudiendo diseminarse a otras partes del cuerpo a través de la sangre y la linfa.[1] Esta enfermedad se ha convertido en una de las principales causas de muerte en el mundo, estimándose que en 2015 murieron cerca de 9 millones de personas en el mundo.[2]

El melanoma maligno es un tumor que se desarrolla a partir de los melanocitos cutáneos y de células pigmentarias del iris y de la úvea. Aun cuando es de baja frecuencia es uno de los cánceres que ha presentado un mayor aumento en su incidencia a nivel mundial.[3, 4] En Chile, según estimaciones de la Organización Mundial de la Salud (OMS) la incidencia de esta enfermedad ha aumentado con una tasa de incidencia de 2,2 casos por cada 100000 habitantes y una tasa de mortalidad de 0,8 por cada 100000 habitantes. Su tratamiento no ha experimentado cambios significativos en los últimos 20 años, siendo su eficiencia dependiente del momento de detección y del procedimiento quirúrgico elegido, ya que cuando se encuentra en un estado avanzado es altamente resistente a la quimio y radio terapia, por lo que se hace indispensable el desarrollo de nuevas terapias.[5]

## **4.2 Inmunoterapia contra el cáncer**

La vacunación contra el cáncer representa una alternativa costo efectiva para inducir inmunidad mediada por linfocitos T CD8+ citotóxicos (CTL, del inglés *cytotoxic T lymphocyte*) con potencial de eliminar tumores primarios y diseminados.[6] La transferencia de linfocitos T autólogos y el bloqueo de señales inhibitorias con anticuerpos monoclonales ha dado resultados clínicos beneficiosos de larga duración en pacientes con melanoma, cáncer de próstata y cáncer de pulmón, donde otros tratamientos no han sido efectivos.[7, 8] Estos estudios clínicos han demostrado que los CTL reconocen y eliminan de manera específica las células que expresan antígenos tumorales. Algunos de los antígenos de melanoma contra los cuales es posible generar una respuesta mediada por CTL son MART-1, GP100, TRP1 y TRP2.

## **4.3 Células dendríticas e inicio de la respuesta inmune adaptativa**

Las células dendríticas (DC, del inglés *Dendritic Cell*) son células presentadoras de antígeno profesionales, con la capacidad de adquirir y procesar antígenos para ser presentados en las moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC, del inglés *Major Histocompatibility Complex*).[9] En el estado estacionario las DC captan continuamente antígenos propios, los degradan y los presentan en moléculas de MHC de tipo I y II a los linfocitos T CD4 y CD8 respectivamente, induciendo anergia, muerte o su diferenciación hacia linfocitos T reguladores,

educando al sistema inmune para evitar la autoinmunidad.[10] Por otro lado, luego de reconocer moléculas derivadas de un patógeno, incrementan la expresión de moléculas coestimuladoras, producen citoquinas y migran a los órganos linfáticos donde le presentan antígenos a los linfocitos T vírgenes, iniciando la respuesta inmune adaptativa.[11]

Las DC son una población heterogénea de células que puede ser clasificada de acuerdo a su ontogenia, distribución y función tanto en el estado estacionario como bajo condiciones patológicas.[12] La división principal hecha en base a su ontogenia divide a las DC en dos grupos, DC plasmocitoides (pDC) y DC convencionales (cDC).[13] La DC plasmocitoides dirigen la respuesta inmune antiviral, ya que son capaces de detectar distintas formas de ácidos nucleicos derivados de patógenos y secretar altos niveles de interferones (IFN) de tipo I.[14, 15] Las DC convencionales son altamente fagocíticas y especializadas en procesar y presentar péptidos derivados de los antígenos, se clasifican de acuerdo a su elevada expresión de la integrina CD11c y del MHC de tipo II (MHCII). Otra de sus características es su corta vida (3-5 días) y que son continuamente generadas en la médula ósea a partir de precursores que responden a la citoquina Flt3L.[16] Un subtipo adicional de DC son las de tipo inflamatorio que derivan de monocitos en los sitios de inflamación.[17]

Las DC convencionales residentes en los órganos linfoides pueden clasificarse como CD8<sup>+</sup> y CD4<sup>+</sup>. [18, 19] Las primeras son muy eficientes induciendo

inmunidad mediada por CTL a través de un proceso llamado presentación cruzada que implica la presentación de antígenos exógenos en MHC de tipo I (MHCI), mientras que las DC CD4 casi no realizan presentación cruzada, pero sí son capaces de activar linfocitos T CD4 mediante presentación directa de antígenos en moléculas de MHCII.[20]

En los tejidos periféricos las DC convencionales pueden clasificarse como CD11b+ y CD103+. [21] Las DC luego de captar un antígeno, maduran y migran a los nódulos linfáticos donde pueden activar a los linfocitos T.[22] Las DC migratorias CD103+ y las DC CD8+ residentes de los órganos linfoides comparten la habilidad para realizar presentación cruzada y activar linfocitos T CD8+, ambas secretan interleuquina 12 (IL12), citoquina que promueve la expansión clonal y la diferenciación de los linfocitos T CD8 y ambos subtipos de DCs poseen un programa de expresión génica similar comandado por los factores transcripcionales BATF3 e IRF8.[23]

El repertorio de linfocitos T consiste en cerca de  $10^{15}$  clones de linfocitos T CD8 vírgenes,[24] cada uno expresando un único receptor de células T (TCR, del inglés T Cell Receptor) que les permite reconocer péptidos de 8 a 10 aminoácidos presentados en moléculas del MHC de tipo I.[25] Los linfocitos T CD8 para adquirir funciones efectoras necesitan reconocer a través de su TCR péptidos derivados de antígenos presentados en moléculas de MHC de tipo I por las DC.[26] Luego reconocer el péptido se activan y proliferan alrededor de 10000

veces, en un proceso llamado “expansión clonal”.[27] Los linfocitos T CD8 que se han expandido clonalmente adquieren funciones citotóxicas, ya que son capaces de reconocer células que están expresando en sus moléculas de MHC de tipo I el mismo péptido contra el cual fueron educados y destruirlas a través de la secreción de moléculas citotóxicas como Fas ligando (FasL), perforina (PFN), granzima, interferón  $\gamma$  (IFN $\gamma$ ) y factor de necrosis tumoral  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ).[28]

#### **4.4 Vacunas de ADN**

Las vacunas de ADN son plásmidos que contienen la secuencia codificante de un antígeno (viral, tumoral, bacteriano, etc.) bajo el control de un promotor de mamíferos, usualmente el de citomegalovirus (CMV). Los vectores plasmidiales usados como vacunas de ADN son fáciles de generar, económicos en términos de producción a gran escala, altamente estables, no infecciosos, no integrativos y con la ventaja de que contienen propiedades adyuvantes intrínsecas. En la actualidad la FDA ha aprobado tres vacunas para uso veterinario, incluyendo una para melanoma en perros y un sinnúmero de estudios clínicos con vacunas dirigidas contra distintas patologías se encuentran en curso.[29-31]

Las principales limitantes para el éxito de las vacunas de ADN han sido su baja eficiencia de transfección *in vivo* y la tolerancia central y periférica que existe frente a los antígenos tumorales contenidos en estas vacunas. Con el fin de mejorar la eficiencia de transfección se han desarrollado sistemas que mejoren la entrega de los vectores al interior de las células del sitio de vacunación. La

electroporación *in vivo* ha surgido como un método simple, eficiente y clínicamente aplicable para la administración de las vacunas de ADN, ya que mejora considerablemente la entrada del ADN a las células, incrementa la expresión del antígeno y la respuesta inmune generada.[32, 33] Además la electroporación es capaz de inducir la llegada de células del sistema inmune al sitio de inmunización, promoviendo la producción de citoquinas proinflamatorias y quimioquinas que contribuyen a la inducción de una respuesta inmune eficiente.[34]

Dado que la mayoría de los antígenos tumorales son antígenos propios expresados en células normales, el sistema inmune es incapaz de discriminarlos como agentes peligrosos o dañinos, es por esto que los esfuerzos actuales se encuentran enfocados en desarrollar adyuvantes que sean capaces de promover la inducción de linfocitos T específicos contra los antígenos tumorales.[35, 36]

#### **4.5 Adyuvantes**

Una de las estrategias más ampliamente utilizada para mejorar la potencia de las vacunas y en particular la de las vacunas de ADN, ha sido el desarrollo de adyuvantes. Los cuales en la mayoría de los casos son proteínas inmunomoduladoras entregadas a través de otro plásmido o como un gen adicional codificado en el plásmido que contiene el gen del antígeno tumoral. Luego de la vacunación las células transfectadas con el plásmido que codifica para la molécula adyuvante la expresan y la secretan (si es que es secretable)

en la zona adyacente afectando a las DC del sitio de vacunación y a las DC del nódulo linfático drenante, potenciando su actividad.[37] Históricamente, el uso de los genes que codifican para quimioquinas, moléculas coestimuladoras o citoquinas como interleuquina 2 (IL-2, de su nombre en inglés *Interleukin-2*) o el factor estimulante de colonias de macrófagos y granulocitos (GM-CSF, de su nombre en inglés, *granulocyte-macrophage colony-stimulating factor*) han sido ampliamente usadas y validadas para mejorar la respuesta inmune contra el antígeno codificado en una vacuna de ADN.[38] Sin embargo, a pesar del gran número de estudios que dan cuenta de estas y otras moléculas, la acción concertada de múltiples moléculas inmunoestimuladoras genera una respuesta inmune más potente y completa. Por lo tanto, la coexpresión de receptores de ADN, moléculas adaptadoras y factores transcripcionales que controlan la expresión de numerosas moléculas simultáneamente, representa una ventaja comparativa respecto del uso de moléculas únicas.[39-41] De estos estudios, se desprende que la estimulación de las vías de señalización y mecanismos involucrados en el reconocimiento de ADN plasmidial representa una estrategia eficaz para el desarrollo de nuevos adyuvantes. La comprensión de las vías de señalización involucradas en la inmunidad innata, permitirá desarrollar nuevos adyuvantes capaces de generar respuestas inmunes más potentes.

## 4.6 Reconocimiento de ADN

La interacción entre el ADN y sus receptores es el paso inicial para la generación de una respuesta inmune adaptativa. Una vez que plásmido que contiene el antígeno es administrado, es capturado por las células del sitio de vacunación entre ellas por las DC, la cuales expresan el antígeno o lo captan de otras células muertas que lo expresaron. Adicionalmente el ADN actúa como adyuvante aportando el contexto proinflamatorio necesario para inducir la maduración de las DC. Se ha demostrado que el efecto inmunoestimulador del aluminio, uno de los pocos adyuvantes aprobados para su uso en humanos es mediado por la liberación de ADN desde las células que mueren en el sitio en que es administrado.

El receptor tipo toll 9 (TLR9, del inglés *Toll Like Receptor 9*) es el receptor de ADN más estudiado, reconoce preferencialmente los motivos ricos en citosina y guanina (motivos CpG) del ADN de origen bacteriano y viral que se encuentra dentro de las vesículas endocíticas, las que son una ruta común para el ingreso de patógenos al interior de las células. La activación de este receptor gatilla la activación de los factores transcripcionales NF- $\kappa$ B (de su nombre en inglés, *nuclear factor kappa light chain enhancer of activated B cells*) y AP-1 (de su nombre en inglés, *activator protein 1*) los que inducen la expresión de interferones de tipo I (IFN- $\alpha$  e IFN- $\beta$ ) y citoquinas proinflamatorias.[42] Estudios posteriores utilizando células y animales deficientes en TLR9 demostraron que estos eran

capaces de responder a la estimulación con ADN, por lo que debían existir otros receptores. Recientemente se han descrito diversos receptores intracelulares que reconocen ADN citoplasmático entre ellos cGAS (de su nombre en inglés, *cyclic GMP-AMP synthase*) [43], DAI (de su nombre en inglés, *DNA-dependent activator of IFN-regulatory factors*)[44], AIM2 (de su nombre en inglés *absent in melanoma 2*)[45-47], ARN polimerasa III [48, 49], LRRFIP1 (de su nombre en inglés, *leucine-rich repeat interacting protein-1*) [50], IFI16 (de su nombre en inglés, *IFN inducible protein 16*) y la helicasas DExD/H (DDX41, DHX9 y DHX36) las que si bien participan en el reconocimiento del ADN son específicas de ciertos tipos celulares y cumplen funciones accesorias gatillando vías diferentes a la producción de IFN como la activación de caspasa-1 o la de  $\beta$ -catenina. Además la proteína STING (de su nombre en inglés, *stimulator of interferon genes*) del retículo endoplásmico también posee afinidad por el ADN pudiendo actuar como un sensor.[51] cGAS e IFI16 reconocen ADN de doble hebra en el citoplasma y activan a STING el cual a su vez media la activación de NF- $\kappa$ B e IRF3 (de su nombre en inglés, *interferon regulatory factor 3*) los cuales inducen la producción de citoquinas proinflamatorias e interferones de tipo I.[52, 53] DAI, por su parte reconoce ADN de doble hebra independientemente de su secuencia pero sí de su largo, gatillando la producción de citoquinas e interferones a través de dos vías distintas, una que involucra a TBK-1 (de su nombre en inglés, *TANK binding kinase-1*) y la activación subsecuente de IRF3 y la segunda que involucra la fosforilación de RIP-1 (de su nombre en inglés, *receptor interacting protein-1*

*kinase*) el cual a su vez fosforila a I $\kappa$ B $\alpha$  con la subsecuente activación de NF- $\kappa$ B.[54] AIM2 reconoce ADN y activa el inflamasoma, un complejo multiproteico que activa a caspasa 1 e induce la proteólisis y secreción de IL-1 $\beta$  e IL-18. LRRFIP1 recluta y fosforila a  $\beta$ -catenina promoviendo la fosforilación de IRF3 y la inducción de interferones de tipo I.[50] La ARN polimerasa III por su parte transcribe las secciones ricas en adenina y timina del ADN de doble hebra citosólico en ARN de doble hebra rico en adenina y uracilo el cual es reconocido por el sensor de ARN citosólico RIG-1 que finalmente induce la producción de interferones de tipo I.[48, 49]

El rol de las vías de reconocimiento de ADN es relevante para la inmunogenicidad de las vacunas de ADN, ya que la respuesta inmune adaptativa mediada por vacunas de ADN en animales deficientes en TBK-1 o STING es casi completamente inexistente.[55] Datos de nuestro laboratorio dan cuenta de que NF- $\kappa$ B es esencial para la inducción de una respuesta inmune antitumoral mediada por CTL luego de realizar electroporación intradérmica de ADN.[56]

#### **4.7 NF- $\kappa$ B**

NF- $\kappa$ B es un factor de transcripción dimérico, cuyas subunidades son miembros de la familia de proteínas Rel. En mamíferos, la familia del factor transcripcional NF- $\kappa$ B está compuesta por cinco miembros diferentes: RelA (p65), RelB, c-Rel y las proteínas precursoras NF- $\kappa$ B1 (p105) y NF- $\kappa$ B2 (p100) las que son procesadas proteolíticamente para generar las subunidades p50 y p52,

respectivamente.[57] Las cinco subunidades comparten una región altamente conservada de 300 aminoácidos en su región N-terminal, llamado dominio de homología RHD (RHD, de su nombre en inglés *Rel homology domain*). Esta región contiene los dominios involucrados en la interacción entre el factor de transcripción y el ADN, la secuencia de localización nuclear (NLS, de su nombre en inglés *nuclear-localization sequences*) y las regiones necesarias para la interacción de las diferentes subunidades entre ellas.[58]

El dímero más ampliamente expresado en los diferentes tipos celulares es el formado por las subunidades p65 y p50, razón por la cual y dado que fue el primer heterodímero descrito se le conoce comúnmente como NF- $\kappa$ B.[59] El resto de los dímeros difieren en los sitios de unión al ADN y en sus cinéticas de translocación al núcleo y si bien su expresión es más baja o restringida a ciertos tipos celulares regulan genes y procesos de manera específica.[60]

#### **4.8 Proteínas represoras de NF- $\kappa$ B: La familia de I $\kappa$ B**

En la mayoría de las células, la asociación de NF- $\kappa$ B con las proteínas I $\kappa$ B tales como I $\kappa$ B $\alpha$ , I $\kappa$ B $\beta$  e I $\kappa$ B $\epsilon$  o los precursores de las proteínas Rel como p100 y 105 determinan su localización citosólica. Además, otros miembros atípicos de esta familia como Bcl-3 e I $\kappa$ B $\zeta$  pueden regular la actividad de NF- $\kappa$ B en el núcleo.

Las proteínas I $\kappa$ B se caracterizan por poseer dominios repetidos de ankyrina a través de los cuales se asocian con los motivos RHD de los dímeros de NF- $\kappa$ B.

En términos generales se sabe que las proteínas I $\kappa$ B se asocian con dímeros particulares de NF- $\kappa$ B, I $\kappa$ B $\alpha$  e I $\kappa$ B $\beta$  inhiben los complejos c-Rel y p65, aunque I $\kappa$ B $\alpha$  posee mayor afinidad por los dímeros p65:p50 que por los dímeros de p65:65. RelB por su parte se une a p100, mientras que Bcl-3 e I $\kappa$ B $\zeta$  se asocia preferencialmente con los homodímeros de p50 y p52.[61, 62]

Las proteínas I $\kappa$ B $\alpha$ , I $\kappa$ B $\beta$  e I $\kappa$ B $\epsilon$  poseen residuos de serina conservados que pueden ser fosforilados por la subunidad IKK $\beta$  del complejo IKK durante la vía canónica de activación de NF- $\kappa$ B. Las proteínas fosforiladas son luego ubiquitinadas y degradadas en el proteosoma.[62]

#### **4.9 Activación de NF- $\kappa$ B**

Existe un sinnúmero de estímulos capaces de activar a NF- $\kappa$ B, siendo el número de genes blanco que éste regula aún mayor.[63] Sin embargo todas las vías de señalización de los distintos estímulos convergen en la activación de un único elemento regulador conocido como complejo quinasa I $\kappa$ B o IKK (de su nombre en inglés, *I $\kappa$ B kinase complex*). Este complejo se encuentra compuesto por tres subunidades, IKK $\alpha$  e IKK $\beta$  con actividad catalítica e IKK $\gamma$  (también conocida como NEMO, de su nombre en inglés *NF- $\kappa$ B essential modulator*) que actúa como un elemento regulador.[64, 65] Las subunidades IKK $\alpha$  e IKK $\beta$  son capaces de fosforilar *in vitro* a los tres miembros más comunes de la familia de I $\kappa$ B. En función de esta similitud estructural y la aparente inespecificidad de sustrato, se pensó que IKK $\alpha$  e IKK $\beta$  tendrían funciones superpuestas, sin embargo estudios

posteriores han revelado que se encuentran involucradas en dos vías diferentes de activación de NF- $\kappa$ B conocidas como vía canónica y no canónica o alternativa. La primera depende de IKK $\beta$  y NEMO, mientras que la segunda requiere la activación de IKK $\alpha$ . [65-67]

La vía canónica de activación de NF- $\kappa$ B depende de la degradación de proteínas I $\kappa$ B, particularmente de I $\kappa$ B $\alpha$  con la subsecuente traslocación de NF- $\kappa$ B al núcleo, principalmente del dímero formado por p50/RelA. Por otra parte la vía no canónica de activación de NF- $\kappa$ B activa el complejo RelB/p52 mediante el procesamiento de p100 en p52 independiente de I $\kappa$ B $\alpha$ . [68]

Una parte importante de los receptores del sistema inmune innato y adaptativo señalizan a través de NF- $\kappa$ B, de manera que se requiere una rápida activación para montar la respuesta correcta y a la vez una regulación apropiada que permita apagar los programas génicos puestos en marcha. La activación exacerbada de NF- $\kappa$ B se asocia con enfermedades inflamatorias como artritis reumatoide, asma y esclerosis múltiple, entre otras. [69] Uno de los mecanismos principales que controlan el tiempo de respuesta de NF- $\kappa$ B es el sistema de retroalimentación negativa generado por la síntesis de I $\kappa$ B $\alpha$  dependiente de NF- $\kappa$ B. I $\kappa$ B $\alpha$  es un gen blanco de NF- $\kappa$ B y es uno de los primeros en ser sintetizados cuando NF- $\kappa$ B se une a sus regiones promotoras. Los nuevos transcritos de I $\kappa$ B $\alpha$  sintetizados entran al núcleo en donde son capaces de interactuar con los dímeros de p65/p50 unidos al ADN, lo cual conduce a su inactivación y regreso

hacia el citoplasma gracias a la secuencia de exportación al citoplasma que posee I $\kappa$ B $\alpha$ . [70, 71]

#### **4.10 NF- $\kappa$ B en las células dendríticas**

NF- $\kappa$ B a través de sus distintas subunidades posee un rol central en la biología de las DC modulando su migración, su expresión de moléculas coestimuladoras, moléculas del MHC y citoquinas como la interleuquina 12p70. [72, 73] Se ha visto que la subunidad p50 de NF- $\kappa$ B actúa como un regulador negativo de la sobrevivencia, maduración y capacidad de activar linfocitos T de las DC ya que su ausencia incrementa la actividad de estos procesos. [74] Por otra parte, la subunidad RelB se encuentra altamente expresada en DC y posee un rol clave en su maduración. [75] Las DC derivadas de la médula ósea del ratón nocaout para RelB poseen una capacidad disminuida para realizar presentación cruzada. [76] Rel B también ha sido relacionado con las DC de la piel, donde se ha propuesto que los bajos niveles de moléculas coestimuladoras en células de Langerhans y su incapacidad para inducir linfocitos T CD4 de memoria se debe a su incapacidad para translocar RelB al núcleo, comparado con las células dendríticas de la dermis que luego de ser sensibilizadas presentan una rápida translocación de RelB al núcleo. [77]

Si bien p50 (vía canónica) y RelB (vía no canónica), poseen funciones aparentemente opuestas modulando la actividad de las DC. Recientemente se ha descrito que RelB en las DC, no solo modula la vía no canónica si no que se

asocia con p50 de una forma dependiente de I $\kappa$ B $\alpha$ , modulando genes relacionados con la activación y maduración de las DC.[78]

Es por lo anterior que modular la vía de NF- $\kappa$ B podría ser relevante para incrementar la potencia de las vacunas de ADN. Resultados de nuestro laboratorio demuestran que la administración de una vacuna de ADN en conjunto con un plásmido que codifica para una forma no degradable de la proteína I $\kappa$ B $\alpha$ , (de tal manera que la traslocación de NF- $\kappa$ B al núcleo se inhibe), reduce la generación de CTL.[56] Por lo tanto inhibir la actividad de I $\kappa$ B $\alpha$  en las células dendríticas del sitio de vacunación permitiría incrementar su activación y capacidad presentadora, incrementando la activación y proliferación de los linfocitos T.

#### **4.11 Silenciamiento génico mediado por ARN de interferencia**

Los ARN de interferencia (ARNi) son parte de un mecanismo post transcripcional de silenciamiento de la expresión génica que actúa sobre secuencias específicas. Este proceso es mediado por moléculas de 20-30 nucleótidos conocidas como ARN pequeños que no codifican proteínas y son generados a partir de precursores más grandes de doble hebra. En general se clasifican en tres grupos, microARN (miRNA, de su nombre en inglés, *microRNA*), ARN interferente pequeño (siRNA, de su nombre en inglés, *short interfering RNA*), ARN asociado a piwi (piRNA, de su nombre en inglés, *piwi-interacting RNA*).[79] Los siARN y los miARN son sintetizados en el núcleo y luego exportados hacia el citoplasma

donde reconocen a su ARN mensajero blanco mediante apareamiento de bases, esta molécula de doble hebra es luego reconocida por la proteína argonauta que se une para formar un complejo al que finalmente se asocia la proteína Dicer cuya función es degradar el ARN mensajero, modulando así la expresión génica.[80]

#### **4.12 ARN de interferencia como adyuvantes génicos**

Los ARN de interferencia han resultado ser útiles como herramientas para modular la inducción de respuesta inmune. Estudios en que se han silenciado moléculas proapoptóticas o inmunosupresoras en células dendríticas de origen murino han demostrado que es posible mejorar la inmunidad adaptativa mediada por CTL.[81, 82] El diseño de adyuvantes basados en ARNi, codificados en plásmidos como shARN (de su nombre en inglés, *small hairpin RNA*) o como ARNi sintéticos ha demostrado su utilidad en diversos estudios.[36, 83, 84]

Es por esto que en este proyecto se propuso desarrollar un shARN dirigido contra I $\kappa$ B $\alpha$  (shI $\kappa$ B $\alpha$ ), para ser administrarlo en conjunto con una vacuna de ADN antitumoral y amplificar la activación de NF- $\kappa$ B en el sitio de vacunación con el fin de promover la activación de las DC, incrementando su capacidad presentadora de antígenos y por lo tanto incrementando la generación de CTL antitumorales.

## **5. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS**

### **5.1 Hipótesis**

La coadministración de un shARN dirigido contra I $\kappa$ B $\alpha$  junto a una vacuna de ADN antitumoral entregada mediante electroporación intradérmica promueve la maduración y migración de células dendríticas de la piel, potenciando la generación de una respuesta de linfocitos T CD8 citotóxicos específicos .

### **5.2 Objetivo general**

Demostrar que un shARN dirigido contra I $\kappa$ B $\alpha$  puede actuar como un adyuvante capaz de promover la maduración y migración de las células dendríticas (DC) de la piel y la generación de una respuesta antitumoral mediada por linfocitos T CD8+ citotóxicos inducida por una vacuna de ADN.

### **5.3 Objetivos específicos**

Demostrar in vivo que la electroporación intradérmica con el shARN contra I $\kappa$ B $\alpha$  promueve la maduración y migración de células dendríticas de la piel en el sitio de electroporación y en los ganglios linfáticos inguinales (drenantes del sitio de vacunación).

Demostrar que coadministración del shARN contra I $\kappa$ B $\alpha$  con una vacuna de ADN contra TRP2 potencia la generación de linfocitos T CD8+ citotóxicos específicos.

Demostrar que la coadministración del shARN contra I $\kappa$ B $\alpha$  con una vacuna de ADN contra TRP2 mediante electroporación intradérmica promueve la respuesta antitumoral usando el modelo murino de melanoma B16F10.

## **6. MATERIALES**

### **6.1 Bacterias**

Bacterias: Las bacterias *Escherichia coli* cepa *NovaBlue*, fueron facilitadas por la Dra. Evelyn Silva, FCV (Santiago, Chile).

### **Plásmidos**

Los vectores utilizados en esta tesis fueron: pVAX1-shIkB $\alpha$ , pVAX1, pVAX1-mOVA, pVAX1-TRP2, pVAX1-shCTRL.

### **6.2 Medios de cultivo**

#### Medios de cultivo bacteriano y otros reactivos

Medio Luria-Bertani (LB): bacto triptona 10 g/L, extracto de levadura 5 g/L, NaCl 5 g/L.

Agar LB: bacto triptona 10 g/L, extracto de levadura 5 g/L, NaCl 5 g/L, agar 15 g/L.

Medio SOC: NaCl 10mM, KCl 2,5mM, MgCl<sub>2</sub> 10 mM, glucosa 20 mM.

Ampicilina (US Biological, Swampscott, MA, USA).

Kanamicina (Sigma-Aldrich CO. St. Louis, MO, USA).

### **6.3 Medios de cultivo celular y otros reactivos**

Los medios de cultivo DMEM + GlutaMAX™-I y RPMI 1640 junto con los reactivos: suero fetal bovino, aminoácidos no esenciales, azul de tripan 0,4%, L-glutamina 200mM, aminoácidos no esenciales 10 mM, penicilina 10.000 U/mL estreptomycin 10 mg/mL, piruvato de sodio 100 mM fueron obtenidos de Gibco Life Technologies (Carlsbad, CA, USA).

### **6.4 Soluciones y reactivos comerciales**

Tampón fosfato salino (PBS) 1X:  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1,06 mM,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  2,97 mM, NaCl 155,17 mM, pH 7,4 (Gibco, Carlsbad, CA, USA).

Tampón de lisis de glóbulos rojos: *RBC Lysis Buffer* (10X): pH 7,1 – 7,4 (BioLegend, San Diego, CA, USA).

Marcador de peso para ADN: *1 Kb Plus Ladder* (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, USA).

### **6.5 Tampones y otras soluciones**

#### Soluciones de lavado y fijación

PBS-SFB 2%: PBS 1X, Suero fetal bovino (SFB) 2%.

PBS-T: PBS 1X, Tween-20 0,05%.

Tampón Fekete: etanol 70%, paraformaldehído 3,7%, ácido acético glacial 0,75 M.

### Electroforesis de ADN

Tampón TE 1X: Tris-HCl 10 mM, Na<sub>2</sub>EDTA 1 mM, pH 8.

Tampón de carga de ADN 10X: azul de bromo fenol 4 mg/mL, glicerol 50%, tampón TE 1mM.

TAE 50X: Tris-Base 242 g/L, ácido acético glacial 57,1 mL/L, Na<sub>2</sub>EDTA (solución 500 mM, pH 8) 100 mL/L.

GelRed 10.000X (Biotium, Hayward, CA, USA).

## **6.6 Anticuerpos**

CD11c-PeCy7 (clon N418), CD11c-BV510 (Clon N418), CLEC9A-PE (Clon 7H11), CD80-PerCP (Clon 16-10 A1), CD8-PeCy7 (Clon 53-6,7), CD8-BV421 (Clon 53-6,7), CD8-APC/Cy7 (Clon 53-6,7), CD207-APC (Clon 4C7), CD207-PE (Clon 4C7), CD11b-APC/Cy7 (ClonM1/70), CD11b-FITC (Clon M1/70), CD103-PerCP (Clon 2E7), CD103-BV421 (Clon 2E7), XCR1-APC (Clon ZET), MHCII-PerCP (Clon M5/114.15.2), MHCII-APC/Cy7 (Clon M5/114.15.2), CD3-PerCP (Clon 17 A2), CD3-BV510 (Clon 17 A2), CD80-APC (Clon 16-10 A1), CD86-PerCP (Clon GL1), IFN- $\gamma$ -PE (Clon XMG1.2), TNF- $\alpha$ -BV421 (Clon MP6XT22), IL-6-PE (Clon MP520F3), IL-12-APC (Clon C15.6), Zombie Aqua, fueron obtenidos de Biolegend (San Diego, CA, USA).

## 6.7 Equipamiento

incubador de CO<sub>2</sub> (Thermo Scientific serie 8000 WJ modelo 3429TF); microcentrifuga para eppendorf (Brinkmann modelo 5415D); centrifuga refrigerada (Thermo Scientific MegaFuge 40R); agitador orbital (*Orbital shaker incubator*, MRC serie LOM-200/400); microscopio óptico (Olympus CKX41); lector multimodal para microplacas (BIO-TEK modelo Synergy 4); congelador -80 (*Ultra low temperature freezer*, Sanyo); citómetro de flujo (BD Biosciences modelo FACSCanto II); cámara de electroforesis horizontal para ADN (Select BioProducts modelo Midi 10); fuente de poder (Bio-Rad serie PowerPac HC Power Supply #164-5052); medidor de pH (Schott Instruments GmbH modelo CG 837); termociclador (MJ Research PTC-200); balanza analítica (Scientech SA210); cámara fotográfica (Canon PowerShot A480); transiluminador ultravioleta (IBI modelo UVT 400-M); electroporador Derma Vax *DNA Vaccine Skin Delivery System* (Cyto Pulse Sciences); electrodo con agujas paralelas de 2 mm (Cyto Pulse Sciences).

## 6.8 Péptidos

Péptido OVA<sub>(257-264)</sub> SIINFEKL (GenScript, Piscataway, NJ, USA).

Péptido TRP2<sub>(180-188)</sub> SVYDFFVWL (GenScript, Piscataway, NJ, USA).

## **6.9 Enzimas para biología molecular**

Las enzimas de restricción EcoRI, HindIII, XbaI, fueron obtenidas de la empresa Invitrogen Life Technologies (Carlsbad, CA, USA).

## **7. MÉTODOS**

### **7.1 Electroporación de bacterias**

Se tomaron 1,5 mL de un cultivo de bacterias *Escherichia coli* cepa *NovaBlue* crecidas durante la noche y se centrifugaron a 5000 g por 5 min a 4°C. En campana y en hielo se eliminó el sobrenadante y se resuspendió el pellet bacteriano en 1 mL de H<sub>2</sub>O bidestilada fría, este paso se repitió cuatro veces dejando las bacterias peleteadas. Se prendió el electroporador y se ajustaron las condiciones (25Uf, 200Ω y 2,5kV). Las bacterias se resuspendieron en 100 μL de H<sub>2</sub>O bidestilada, se colocaron en la cubeta de electroporación (previamente enfriada a -20°C) y se oprimieron los botones del electroporador hasta que generó el pulso. Inmediatamente se añadió 1 mL de medio de cultivo LB, se homogenizó y se dejó creciendo en el agitador por 1 h a 37°C. Finalmente las bacterias se centrifugaron 2 min a 3600 RPM, se eliminó el sobrenadante, se resuspendieron en el volumen remanente y se plaquearon en una placa de LB-Agar con el antibiótico correspondiente.

## **7.2 Extracción y purificación de ADN plasmidial**

Las bacterias *Escherichia coli* cepa *NovaBlue* transformadas con las distintas construcciones se crecieron en medio LB suplementado con ampicilina 100 µg/mL o kanamicina 50 µg/mL, según correspondiera. El volumen empleado para cada inóculo dependió de la cantidad de ADN plasmidial a extraer. Se emplearon 5 mL, 300 mL o 600 mL dependiendo del sistema de extracción y purificación utilizado. Los sistemas de extracción y purificación empleados para las diferentes preparaciones corresponden a: *NucleoSpin Plasmid (miniprep)*, *NucleoBond Xtra Midi EF (midiprep)* y *NucleoBond Xtra Maxi EF (maxiprep)*, todos obtenidos de la empresa Macherey-Nagel (Düren, Germany). La extracción y purificación se realizó según las especificaciones del fabricante (Macherey-Nagel, Düren, Germany). Finalizada esta etapa se determinó la concentración del ADN plasmidial mediante espectrofotometría a una longitud de onda de 260 nm (Synergy HT).

## **7.3 Animales**

Los ratones C57BL/6 fueron mantenidos a temperatura controlada y con un régimen alternado de luz y oscuridad de 12 h. Los animales tuvieron acceso a comida y agua *ad libitum*. Los procedimientos y normas generales de mantención están descritos en el protocolo de manejo y supervisión animal del proyecto

FONDECYT 11110525 aprobado por los Comités de Bioética de la Fundación Ciencia & Vida y de FONDECYT.

#### **7.4 Inmunización mediante electroporación intradérmica *in vivo***

Ratones de 6 – 12 semanas de edad se anestesiaron y se mantuvieron durante todo el procedimiento con sevoflurano 3 %. Los ratones se inyectaron intradérmicamente con una solución de PBS 1X los respectivos ADN plasmidiales utilizados. La inyección se realizó en dos sitios diferentes (20 µL en cada sitio) cercanos a la base de la cola. Luego de esto se colocó un electrodo con dos hileras de agujas paralelas de 2 mm (Cyto Pulse Sciences, Inc. Glen Burnie, MD, USA) dejando el sitio de inyección entre estas dos hilera. Se aplicaron 2 pulsos de 125 V/cm durante 0,05 ms seguidos de 8 pulsos de 275 V/cm durante 10 ms usando un electroporador Derma Vax DNA Vaccine Skin Delivery System (Cyto Pulse Sciences, Inc. Glen Burnie, MD, USA).

#### **7.5 Ensayos de desafío tumoral**

Los animales fueron inmunizados con 40 µg de ADN plasmidial. En los experimentos de tipo profiláctico, los animales fueron inmunizados dos veces con un intervalo de 2 semanas entre cada inmunización con los plásmidos pVAX1, pVAX1-shIkB $\alpha$ , pVAX1-shCTRL, y pVAX1-TRP2. Posteriormente, los ratones

fueron sangrados dos veces, doce días después de cada inmunización con el fin de obtener linfocitos periféricos específicos contra el antígeno TRP2 (descrito más adelante). El desafío tumoral con células murinas de la línea de melanoma B16-F10 se realizó 3 semanas después de la segunda inmunización. Cada ratón fue inyectado por vía intravenosa con  $4 \times 10^5$  células. Pasadas 3 semanas los ratones fueron sacrificados en una cámara de CO<sub>2</sub> y se obtuvieron sus pulmones los que fueron fijados y mantenidos en tampón Fekete con el fin de contar los focos metastásicos presentes. En los experimentos de tipo terapéutico, los animales fueron desafiados en el día 1 con  $2,5 \times 10^5$  células murinas de la línea de melanoma B16-F10, un día después los ratones fueron inmunizados con los plásmidos pVAX1, pVAX1-shIkB $\alpha$ , pVAX1-shCTRL y pVAX1-TRP2 y durante doce días se siguió el crecimiento tumoral, realizando tres mediciones por semana. Al día 12 los animales fueron sacrificados y se extrajeron los tumores, el bazo y los nódulos linfáticos drenantes del tumor de cada animal con el fin de analizar la presencia de linfocitos específicos contra el antígeno tumoral TRP2. El volumen tumoral fue calculado en base al largo (L), ancho (A) y a la altura (H) según la siguiente fórmula  $L \times A \times H/2$ .

## **7.6 Ensayos de migración de células dendríticas derivadas de la piel *in vivo***

Los animales fueron inmunizados con 80 µg de ADN plasmidial y posteriormente según el diseño de los experimentos fueron sacrificados y se extrajeron los nódulos linfáticos drenantes de del sitio de vacunación con el fin de analizar las diferentes poblaciones de CD provenientes de la piel.

## **7.7 Obtención de linfocitos desde sangre de ratones y reestimulación *in vitro***

Los ratones fueron sangrados mediante un corte en la cola usando un bisturí estéril y se recolectaron 250 – 500 µL de sangre en tubos de 1,5 mL conteniendo 70 µL de heparina a una concentración 500 U/mL (Laboratorio Sanderson, Santiago, Chile). La sangre se transfirió a tubos de 15 mL y se trató con 3 mL de *RBC Lysis Buffer 1X* (BioLegend, San Diego, CA, USA) por 10 min agitando de vez en cuando, luego se agregaron 10 mL de PBS 1X (Hyclone). A continuación, las muestras se centrifugaron a 400 G por 5 min. Se eliminó el sobrenadante y las células se resuspendieron en 5 mL de RPMI 1640 (Hyclone) suplementado SFB 10% (Hyclone), L-glutamina 2 mM (Hyclone), aminoácidos no esenciales 1 mM (Hyclone), piruvato 1 mM (Hyclone), penicilina 100 U/mL y estreptomina 0,1 mg/mL (Gibco, Life Technologies). Las células se centrifugaron a 400 G por 5 min y luego se resuspendieron en 250 µL de medio RPMI 1640 suplementado.

Se cultivaron 100  $\mu$ L de esta suspensión celular en placas de 96 pocillos con 100  $\mu$ L de medio RPMI 1640 completo, suplementado además, con el péptido de interés TRP2<sub>(180-188)</sub> o el péptido control OVA<sub>(257-264)</sub>, a una concentración final de 1  $\mu$ g/mL. Luego la placa con linfocitos se incubó a 37° C y 5% de CO<sub>2</sub> por 2 h. Posteriormente, cada pocillo de células se trató por 6 h con 50  $\mu$ L de medio RPMI 1640 completo suplementado con 0,25  $\mu$ L de *GolgiPlug* (BD Biosciences, San José, CA, USA) con el fin de inducir el acumulación intracelular de citoquinas. Pasado este periodo, las células fueron centrifugadas a 400 G por 5 min a 4°C y luego resuspendidas en 200  $\mu$ L de PBS-FBS 2%, para llevar a cabo posteriormente las tinciones de superficie e intracelular. Posteriormente las células fueron estimuladas con los respectivos péptidos y marcadas con los anticuerpos de superficie e intracelulares tal cual se hizo para la sangre.

### **7.8 Obtención de suspensiones celulares a partir de los nódulos linfáticos drenantes del sitio de vacunación**

Los ganglios inguinales drenantes del sitio de inmunización fueron extraídos y disgregados mecánicamente sobre una placa de seis pocillos conteniendo 1 mL de RPMI 1640 (Hyclone) suplementado SFB 10% (Hyclone), L-glutamina 2 mM (Hyclone), aminoácidos no esenciales 1 mM (Hyclone), piruvato 1 mM (Hyclone), penicilina 100 U/mL y estreptomycin 0,1 mg/mL (Gibco, Life Technologies) e incubados durante 30 minutos en una solución que contiene RPMI 1640 no suplementado, colagenasa IV 5 mg/mL (Gibco, Life Technologies), DNasa 5

$\mu\text{g/mL}$  (ApplyChem). Posteriormente la suspensión de células fue pasada a través de un Falcon™ cell strainer de 70  $\mu\text{m}$  con el fin de eliminar los restos de tejido conectivo y realizar tinción de superficie y/o intracelular.

### **7.9 Tinción de superficie e intracelular de células y análisis por citometría de flujo**

La tinción de superficie se realizó agregando 25  $\mu\text{L}$  de PBS-SFB 2% suplementado con los diferentes anticuerpos de superficie en su dilución apropiada durante 30 min, posteriormente se realizaron 3 lavados con PBS-SFB 2% y se analizó mediante citometría de flujo. La tinción intracelular se realizó posterior a la tinción de superficie, para esto, la células fueron permeabilizadas con la solución Fixation/Permeabilization (BD Biosciences, CA, USA) durante 20 min, luego fueron lavadas dos veces con la solución Perm/Wash™ Buffer (BD Biosciences, CA, USA) e incubadas durante 30 min con una solución de Perm/Wash™ Buffer (BD Biosciences, CA, USA) conteniendo los anticuerpos intracelulares. Finalmente se realizaron 3 lavados con la solución de Perm/Wash™ Buffer (BD Biosciences, CA, USA) y las muestras se analizaron mediante citometría de flujo. La cantidad de anticuerpo que se utilizó por cada 25  $\mu\text{L}$  de PBS-SFB 2% fue: CD11b-FITC 0,15  $\mu\text{L}$ , CD207-PE 0,25  $\mu\text{L}$ , CD103-PerCP 0,15  $\mu\text{L}$ , CD11c-PE-Cy7 0,1  $\mu\text{L}$ , XCR1-APC 0,15  $\mu\text{L}$ , MHCII-APC/Cy7 0,05  $\mu\text{L}$ , CD8-BV421 0,05  $\mu\text{L}$ , B220-BV510 0,25  $\mu\text{L}$ , CD3-BV510 0,25  $\mu\text{L}$ , Zombie Aqua 0,05  $\mu\text{L}$ , CD80-PerCP 0,05  $\mu\text{L}$ , CD80-APC 0,05  $\mu\text{L}$ , CD86-PECy7 0,05  $\mu\text{L}$ , CD86-

PerCP 0,05  $\mu$ L, PDL1-PECy7 0,05  $\mu$ L, TNF- $\alpha$ -BV421, 0,25  $\mu$ L, IL-6-PE 0,25  $\mu$ L, IL-12-APC 0,25  $\mu$ L, CD3-PerCP 0,15  $\mu$ L, CD8 PE-Cy7 0,15  $\mu$ L, CD8-APC/Cy7 0,1  $\mu$ L, IFN- $\gamma$ -PE 0,1  $\mu$ L, TNF- $\alpha$ -APC 0,1  $\mu$ L. En el caso de la tinción con dextrámero, se añadieron 0,5  $\mu$ L a cada muestra y se incubaron durante 15 min, posteriormente y sin lavar se añadieron los anticuerpos de superficie tal como se describió previamente.

### **7.10 Citometría de flujo**

Las mediciones de citometría de flujo se realizaron en un equipo BD FACSCanto II, utilizando el FlowJo versión X.0.7 (Tree Star, Inc. Ashland, OR, USA).

### **7.11 Análisis estadístico**

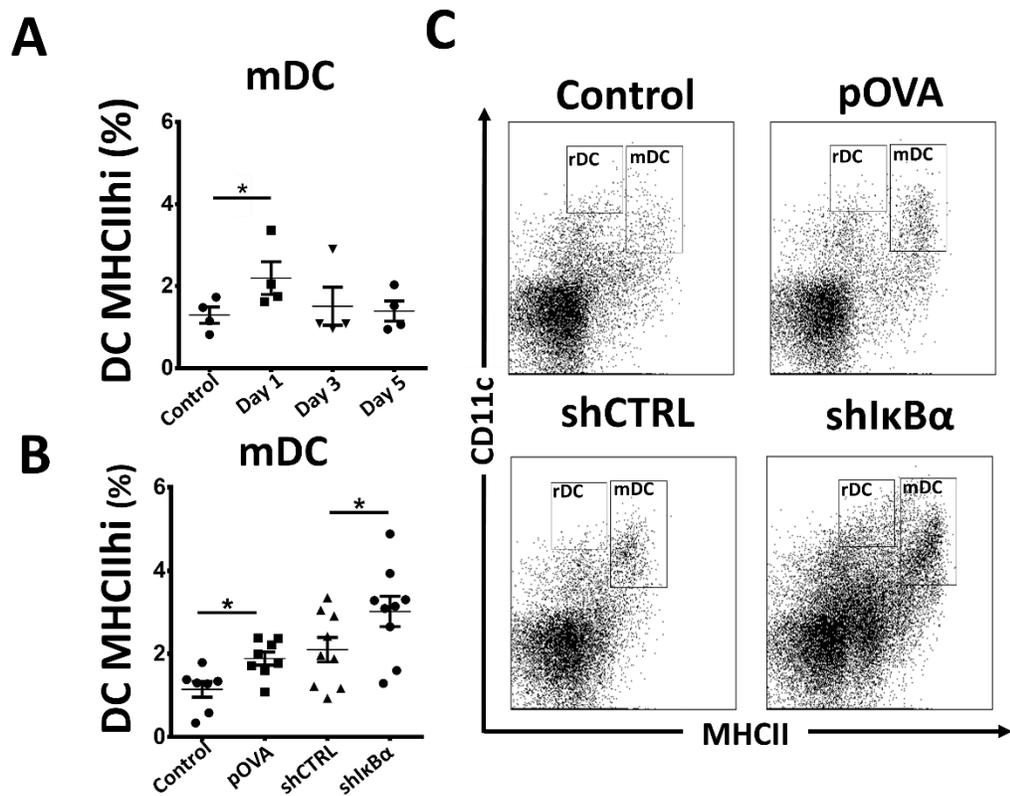
Los análisis estadísticos se realizaron usando el programa Graphpad Prism versión 6.01 (Graphpad Software Inc.). Los datos fueron comparados mediante las pruebas estadísticas: *t-Student*. Se consideraron significativos aquellos valores de p menores que 0,05 (\* $p < 0,05$ ).

## **8. RESULTADOS**

### **8.1 Las electroporación intradérmica de ADN incrementa las células dendríticas migratorias en los nódulos linfáticos.**

Dado que no existen antecedentes previos respecto del efecto de las vacunas de ADN sobre la migración de las DC nos propusimos en primer lugar evaluar si la electroporación intradérmica de ADN incrementa la llegada de DC migratorias (definidas como CD11c intermedio y MHCII alto) a los nódulos linfáticos drenantes del sitio de vacunación, esto con el fin de determinar posteriormente si el shkB $\alpha$  tiene algún efecto sobre la migración de estas células. Para esto se realizó una cinética de migración de DC con el fin de evaluar cómo cambian las poblaciones de DC migratorias del nódulo linfático 1 día, 3 días y 5 días post electroporación intradérmica de ADN, administrando 80  $\mu$ g de ADN y cuatro electroporaciones en la zona baja de la espalda.

La figura 1A muestra que las DC migratorias, caracterizadas por su alta expresión de MHCII (MHCII<sup>hi</sup>) y por su expresión intermedia de la molécula CD11c (CD11c<sup>int</sup>) se incrementan de forma estadísticamente significativa en el nódulo linfático drenante del sitio de vacunación 1 día luego de realizar inmunización intradérmica en comparación con el grupo control que no fue inmunizado, además se observa que estas células vuelven a niveles basales en los días 3 y 5 post vacunación.[85]



**Figura 1. Análisis de las células dendríticas migratorias luego de realizar vacunación con ADN.** Se inmunizaron ratones de la cepa C57BL/6 y se analizó la presencia de células dendríticas migratorias (mDC) en los nódulos linfáticos drenantes del sitio de vacunación. **A.** Cinética de migración de células dendríticas migratorias (mDC: CD11c+MHCIIhi), luego de realizar inmunización con pOVA en los días 1, 3 y 5. **B.** Análisis de las células dendríticas migratorias un día después de realizar inmunización intradérmica con los vectores pOVA, shCTRL and shIkBα. **C.** Figura representativa de las células dendríticas migratorias en las distintas condiciones analizadas en B. n=4-9 animales, cada valor está expresado como el promedio ± EE, se utilizó Mann Whitney unpaired T-test para el análisis estadístico.

## **8.2 La electroporación intradérmica del shIkB $\alpha$ incrementa la llegada de células dendríticas a los nódulos linfáticos.**

Una vez demostrado que la electroporación intradérmica de ADN induce la migración de DC a los nódulos linfáticos drenantes del sitio de vacunación, se evaluó si el shIkB $\alpha$  incrementa esta migración, para esto se utilizaron cuatro grupos experimentales:

- Grupo 1 : No vacunado
- Grupo 2: pVAX1-OVA
- Grupo 3: pVAX1-shCTRL
- Grupo 4: pVAX1-shIkB $\alpha$

Cada grupo estuvo compuesto de 4-8 animales y cada animal recibió 80  $\mu$ g de ADN y cuatro electroporaciones, todo en la parte baja de la espalda, 24 horas después se obtuvieron los nódulos linfáticos inguinales (drenantes del sitio de vacunación) y se analizaron las poblaciones de células dendríticas presentes. La figura 1B muestra el incremento que se produce en las DC migratorias luego de administrar el shIkB $\alpha$  en los distintos grupos, se observa que 24 horas después de vacunar con el vector pVAX1-OVA se produce un incremento de las DC desde 0,8 % hasta 2% respecto del grupo no vacunado, similar a lo observado en la cinética de la figura 1. La administración del shIkB $\alpha$  genera un incremento

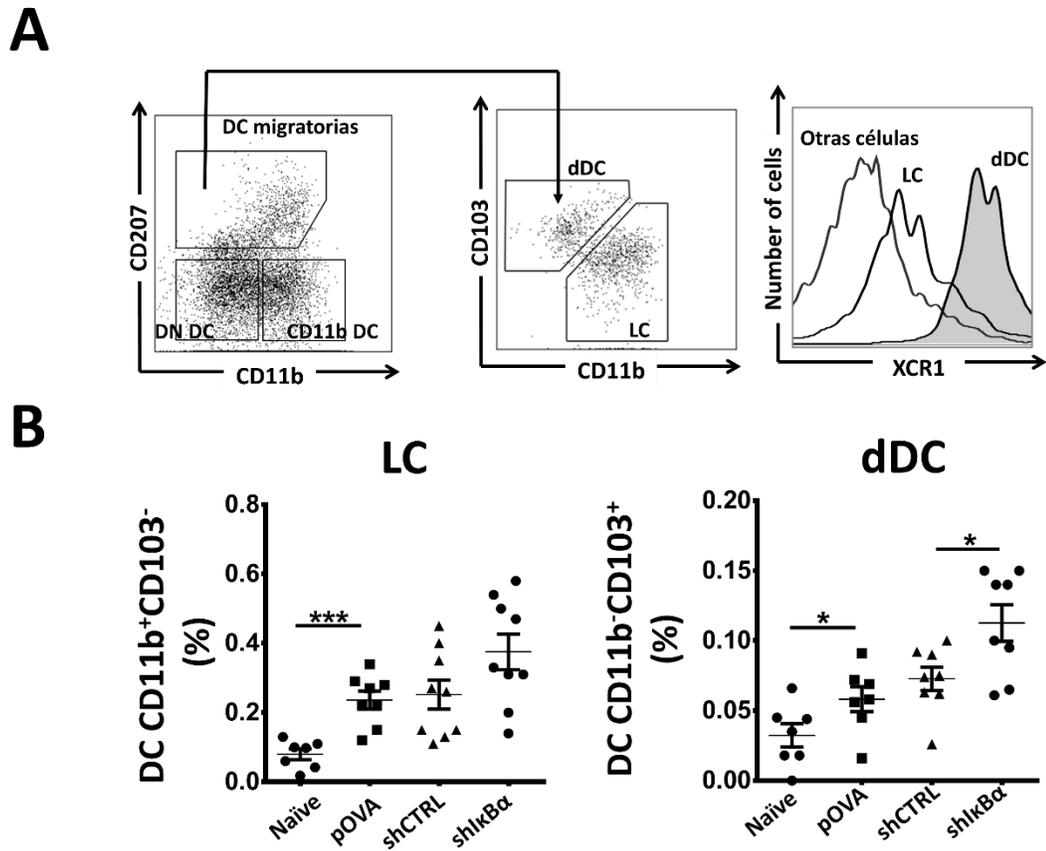
estadísticamente significativo desde un 2% hasta un 3% comparado con el grupo que recibió el vector pVAX1-OVA y el que recibió el shCTRL. La figura 1C muestra de forma representativa el incremento en las DC migratorias luego de administrar el shkB $\alpha$ .

La figura 2A muestra el método de análisis utilizado para distinguir los diferentes tipos de DC en el nódulo linfático, las DC migratorias provenientes de la piel se distinguieron basado en la expresión de los marcadores CD207 y CD11b, dentro de esta población se distinguieron las dDC y las LC basado en la expresión de CD103 y XCR1, observándose que solo las dDC son CD103+XCR1+, mientras que las LC son solo CD11b+, tal como se explicó previamente.[87]

La figura 2A muestra los niveles de expresión del receptor de quimioquinas XCR1, característico de las DC especializadas en realizar presentación cruzada de antígenos y que permite definir las y analizarlas con mayor claridad. Se observa que las DC CD8+ y las DC CD207+CD103+ expresan este receptor, mientras que las DC CD11b no lo expresan tal como ha sido previamente descrito.[88]

La figura 2B muestra que la electroporación intradérmica con ADN genera un incremento en las LC y en las dDC, respecto del control no vacunado y que solo el shkB $\alpha$  genera un incremento en la frecuencia de las dDC, y no en la frecuencia de las LC. En resumen los resultados sugieren que el shkB $\alpha$  incrementa la llegada de DC CD207+CD103+XCR1+ desde la piel a los nódulos linfáticos, lo que a la vez podría favorecer la generación de una respuesta más potente de

linfocitos T CD8<sup>+</sup> ya que estas células son especialistas realizando presentación cruzada de antígenos.



**Figura 2. Frecuencia de los subtipos de DC de la piel en el nódulo linfático luego de realizar electroporación intradérmica con el shARN contra  $I\kappa B\alpha$ .** Se inmunizaron ratones de la cepa C57BL/6con, un día después se obtuvieron los nódulos linfáticos drenantes del sitio de vacunación y en ellos se analizaron las diferentes poblaciones de DC **A**. Método de análisis de los distintos subtipos de DC migratorias en el nódulo linfático **B** Expresión de XCR1 en las dDC, LC. **C**. Frecuencia de las LC y de las dDC en los nódulos linfáticos drenantes del sitio de vacunación. Resultados obtenidos de dos experimentos independientes n=8, cada valor está expresado como el promedio  $\pm$  EE, se utilizó Mann Whitney unpaired T-test para el análisis estadístico.

### **8.3 El shIkB $\alpha$ potencia la generación linfocitos T CD8+ específicos contra el antígeno tumoral TRP2 *in vivo* inducidos por una vacuna de ADN.**

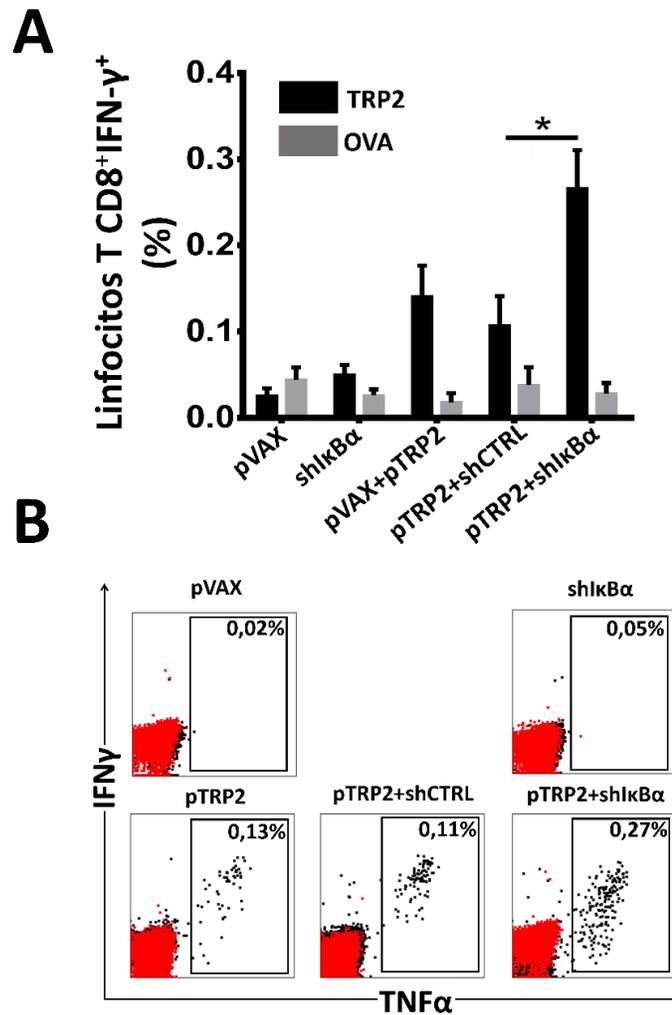
El objetivo del siguiente experimento consistió en evaluar si la coadministración del vector codificante del shIkB $\alpha$  en conjunto con una vacuna de ADN contra el antígeno de melanoma TRP2 potencia la generación de linfocitos T CD8 específicos contra este antígeno *in vivo*. Para esto, los animales fueron inmunizados dos veces con un intervalo de dos semanas y 12-13 días después de cada inmunización se colectó sangre de la vena de la cola de cada animal con el fin de analizar la presencia de linfocitos T CD8 productores de IFN- $\gamma$  y TNF- $\alpha$  específicos para TRP2. Los linfocitos fueron reestimulados *in vitro* con el péptido inmunodominante derivado de la proteína TRP2 (TRP2<sub>(180-188)</sub>) o con un péptido irrelevante, en este caso el péptido inmunodominante derivado de la proteína ovoalbúmina (OVA<sub>(257-264)</sub>) como control, con el fin de determinar el porcentaje de CTL específicos que se activan y producen IFN- $\gamma$  y TNF- $\alpha$  luego de reconocer el péptido contra el que fueron educados. En cada experimento se utilizaron ratones hembras C57BL/6 de 6-8 semanas a las cuales se le administraron los plásmidos indicados mediante electroporación intradérmica en dosis de 40  $\mu$ g. Los grupos utilizados en todos los experimentos fueron los siguientes:

- Grupo 1: pVAX1-vacio
- Grupo 2: pVAX1-vacio + pVAX1-shIkB $\alpha$
- Grupo 3: pVAX1-vacio + pVAX1-TRP2h

- Grupo 4: pVAX1-TRP2h + pVAX1-shCTRL
- Grupo 5: pVAX1-TRP2h + pVAX1-shIkB $\alpha$

La figura 3A muestra el resultado de la estimulación *in vitro* en el segundo sangrado, doce días después de la última vacunación. Se observa la presencia de una población de CTL productores de IFN- $\gamma$  y TNF- $\alpha$  en las muestras de los grupos que recibieron pVAX1-TRP2 estimuladas con el péptido TRP2<sub>(180-188)</sub> versus las muestras estimuladas con el péptido control OVA<sub>(257-264)</sub>, el grupo que recibió la vacuna de ADN contra TRP2 en combinación con el shIkB $\alpha$  posee un 0,27 % de linfocitos T CD8+ específicos para TRP2, lo cual en comparación con los grupos que recibieron solo la vacuna de ADN contra TRP2 o en combinación con el shCTRL (cuyos porcentajes de linfocitos específicos es 0,1 y 0,14, respectivamente) representa una diferencia estadísticamente significativa ( $p=0,0173$ ).

La figura 3B, representa de manera gráfica los linfocitos que expresan IFN- $\gamma$  y TNF- $\alpha$ , analizados sobre la población total de células CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>, representativos de cada grupo, obtenidos durante el segundo sangrado.



**Figura 3. Frecuencia de linfocitos T citotóxicos específicos para TRP2 productores de IFN- $\gamma$  y TNF- $\alpha$  en sangre de ratones vacunados mediante electroporación intradérmica de ADN.** Se inmunizaron ratones de la cepa C57BL/6 dos veces con los vectores indicados al pie de cada figura con un intervalo de dos semanas entra cada vacunación. Se obtuvo sangre de la vena de la cola de cada animal y 12 días después mediante reestimulación *in vitro* con el péptido irrelevante OVA<sub>(257-264)</sub> o con el péptido TRP2<sub>(180-188)</sub> se analizaron los linfocitos T CD8<sup>+</sup> productores de IFN- $\gamma$  y TNF- $\alpha$  mediante citometría de flujo. **A.** Frecuencia de linfocitos T CD8<sup>+</sup> específicos 12 días después de la segunda inmunización (segundo sangrado). **B.** Detección de linfocitos T CD8<sup>+</sup> productores de IFN- $\gamma$  y TNF- $\alpha$  mediante citometría de flujo, en rojo se muestran las células estimuladas con el péptido irrelevante y en negro las células estimuladas con el péptido TRP2<sub>(180-188)</sub>. Figura representativa de los resultados obtenidos durante el segundo sangrado. Resultados obtenidos de dos experimentos independientes, n=10 animales, cada valor está expresado como el promedio  $\pm$  EE, se utilizó Mann Whitney unpaired T-test para el análisis estadístico.

#### **8.4 El sh1kB $\alpha$ aumenta la eficacia antitumoral de una vacuna de ADN contra TRP2 en un modelo profiláctico de metástasis pulmonar con células de melanoma murino B16F10**

Una vez demostrado que la coadministración del sh1kB $\alpha$  en conjunto con una vacuna de ADN codificante del antígeno tumoral TRP2 incrementa el porcentaje de CTL específicos para este antígeno *in vivo* se evaluó el potencial antitumoral de esta respuesta. Para ello, los ratones C57BL/6 previamente inmunizados con las diferentes combinaciones de vectores (ver sección 6.3) fueron desafiados con células de melanoma murino B16-F10. Originalmente esta línea celular fue seleccionada por su capacidad para generar metástasis en los pulmones y porque debido a su alta pigmentación los focos generados son fáciles de identificar y enumerar, además estas células expresan altos niveles del antígeno TRP2 lo que las hace blanco de la actividad citotóxica de los CTL específicos para este antígeno.[89, 90]. Las células tumorales B16F10 fueron inyectadas por vía intravenosa 14 días después de la última vacunación, luego de tres semanas los ratones fueron sacrificados en una cámara de CO<sub>2</sub>, se les extrajeron los pulmones y se contó el número de focos metastásicos. La figura 4-A muestra el resultado del conteo de focos metastásicos correspondiente a dos experimentos independientes, de los cuales se obtuvo en promedio 20-40 focos metastásicos por pulmones en los ratones control. Se observa que todos los grupos que no recibieron la vacuna de ADN dirigida contra TRP2 poseen más focos metastásicos que aquellos grupos sí recibieron la vacuna, lo que representa una

diferencia estadísticamente significativa cuando se comparan los grupos que recibieron pVAX1 vacío y el shIkB $\alpha$  solo, con aquellos grupos que recibieron pVAX1-TRP2 solo o en conjunto con el shCTRL, además se observa una disminución estadísticamente significativa ( $p=0,00329$ ) en el número de focos metastásicos en los animales a los que se les administró la vacuna de ADN dirigida contra TRP2 en conjunto con el shIkB $\alpha$ , cuando se compara con el grupo que recibió la vacuna de ADN en conjunto con el shCTRL.

La figura 4B muestra de manera representativa los focos metastásicos en los diferentes grupos de animales usados.

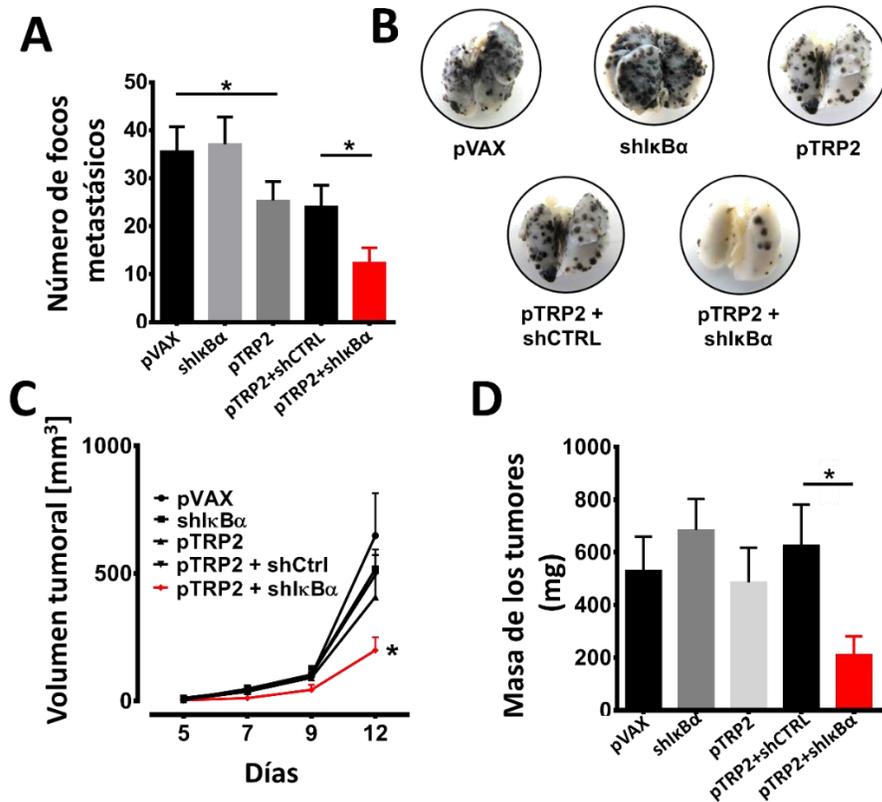
### **8.5 El shARN contra IkB $\alpha$ aumenta la eficacia antitumoral de una vacuna de ADN dirigida contra el antígeno tumoral TRP2 en un modelo terapéutico de melanoma murino B16F10**

El siguiente experimento consistió en evaluar la eficacia de la coadministración del plásmido codificante de TRP2 en conjunto con el shIkB $\alpha$  en un modelo terapéutico de melanoma murino, para esto se inyectaron células B16F10 de manera subcutánea en el costado derecho de los animales y un día después se administraron las diferentes combinaciones de vectores (ver sección 6.3). Se realizó el seguimiento del crecimiento tumoral durante 12 días, a través de la medición del ancho, el alto y la altura de los tumores para posteriormente calcular y graficar el volumen tumoral. Al día 12 se sacrificaron todos los animales, se extrajeron los tumores y se masaron. La figura 4C muestra el crecimiento tumoral

de los diferentes grupos desde el día 0 hasta el día 12, todos los grupos salvo el que recibió el adyuvante mostraron un crecimiento tumoral constante, mientras que el grupo que recibió la vacuna de ADN dirigida contra TRP2 en conjunto con el shIkB $\alpha$  presentó un claro retraso en el crecimiento de los tumores. El volumen promedio de los tumores para cada grupo fue de 417,5 cm<sup>3</sup> para el grupo que recibió el vector vacío, 325,4 cm<sup>3</sup> para el grupo que recibió el shIkB $\alpha$ , 293,2 cm<sup>3</sup> para el grupo que recibió el pVAX-TRP2, 286,4 para el grupo que recibió el pVAX-TRP2 en conjunto con el shCTRL y 52,9 cm<sup>3</sup> para el grupo que recibió el pVAX-TRP2 en conjunto con el shIkB $\alpha$ . El volumen tumoral de los animales que recibieron el adyuvante en conjunto con la vacuna de ADN dirigida contra TRP2 comparado con el grupo que recibió la vacuna de ADN dirigida contra TRP2 en conjunto con el shCTRL representa una diferencia estadísticamente significativa ( $p=0,0001$ ). Además se observa que la vacuna de ADN dirigida contra TRP2 por sí sola no ejerce protección antitumoral en este modelo, ya que al compararla con los grupos que recibieron el vector vacío o el adyuvante solos, no se observan diferencias significativas.

La figura 4D muestra la masa de los tumores medida en miligramos, se observa que el grupo que recibió la vacuna de ADN dirigida contra TRP2 en conjunto con el shIkB $\alpha$  posee menor masa tumoral que el grupo que recibió la vacuna de ADN dirigida contra TRP2 en conjunto con el shCTRL, diferencia que resulta ser estadísticamente significativa, sin embargo no se observan diferencias entre el grupo que recibió el vector vacío y el que fue vacunado con pVAX1-TRP2, lo que

concuerta con el resultado del crecimiento tumoral y con el hecho de que aparentemente esta vacuna no funciona en un modelo terapéutico de melanoma subcutáneo.



**Figura 4. Supresión de la metástasis pulmonar y del crecimiento tumoral luego de vacunar con una vacuna de ADN que codifica para TRP2 en conjunto con el shIkBα.** Se inmunizaron ratones de la cepa C57BL/6 dos veces con los vectores indicados al pie de cada figura con un intervalo de dos semanas entra cada vacunación. En el caso del ensayo de metástasis pulmonar, las células de la línea celular tumoral B16-F10 fueron inyectadas de manera intravenosa en la cola de cada uno de los ratones previamente inmunizados con los plásmidos indicados al pie de la figura un día después del sangrado. 3 semanas después del desafío tumoral, los animales fueron sacrificados en una cámara de CO<sub>2</sub>, se extrajeron los pulmones y se contaron los focos metastásicos. En el caso del ensayo de crecimiento tumoral, las células de la línea celular tumoral B16-F10 fueron inyectadas de forma subcutánea un día antes de la vacunación con los vectores indicados, el crecimiento tumoral se siguió durante doce días. **A.** Número de focos metastásicos en los diferentes grupos de animales inmunizados. **B.** Figura representativa de los pulmones obtenidos de los diferentes grupos de ratones inmunizados. **C.** El crecimiento tumoral fue medido 3 veces a la semana y graficado como volumen tumoral. **D.** Masa de los tumores, medida al día 12 post inoculación de las células. Resultados obtenidos de dos experimentos independientes, n=10 animales, cada valor está expresado como el promedio ± EE, se utilizó Mann Whitney unpaired T-test para el análisis estadístico

## **9. DISCUSIÓN**

### **9.1 Aspectos generales**

Los resultados obtenidos en este trabajo sugieren que utilizar un shARN que inhiba la expresión de I $\kappa$ B $\alpha$  como adyuvante de una vacuna de ADN antitumoral contra el antígeno TRP2 promueve la migración de DC dermales CD103+ especializadas en activar linfocitos T CD8 a los nódulos linfáticos drenantes del sitio de vacunación incrementando la generación de CTL y mejorando la respuesta inmune antitumoral.[91]

Si bien se ha establecido que las vacunas de ADN pueden generar una respuesta inmune contra un antígeno particular en numerosos modelos, han fallado al generar respuestas inmunes potentes.[92]

Dentro de las alternativas para mejorar la potencia de una vacuna de ADN se encuentra la coexpresión de moléculas inmunoestimulantes.[31, 35] Sin embargo esta estrategia conlleva el riesgo potencial de generar una respuesta inmune contra la molécula coestimuladora usada como adyuvante dado que es expresada de la misma forma que el antígeno contra el cual se desea generar la respuesta inmune. Se ha descrito que la coexpresión de la quimioquina CXCL10 induce una respuesta inmune en su contra, generándose un efecto inmunosupresor contra el antígeno coexpresado.[93] Es por esto que el desarrollo de adyuvantes basados en el silenciamiento génico de moléculas que

actúan como reguladores negativos de la respuesta inmune representa una alternativa para potenciar la respuesta mediada por CTL de una vacuna de ADN antitumoral. Diversos autores han probado la eficacia de esta estrategia mediante la combinación de vacunas de ADN y moléculas de ARN interferente como siARN o shARN con buenos resultados.[36, 83, 94]

La interferencia por ARN (ARNi) ha revolucionado el campo de la biología por sus aplicaciones entre las que destacan la intervención terapéutica, el tratamiento de enfermedades como el cáncer y el control de plagas en el área agrícola, entre otras. Comparado a otras técnicas de silenciamiento génico, el uso de ARN interferentes destaca por su relativa facilidad para generarse y aplicarse experimentalmente. Una gran cantidad de estudios han dado cuenta del rol de esta tecnología a través del uso de siARN sintéticos para silenciar la expresión de determinados genes. Sin embargo el uso de siARN tiene ciertas limitantes, entre las que se encuentran, la complejidad para ser sintetizados, su alto costo de producción, su moderada eficiencia de transfección, su baja estabilidad y la ausencia de mecanismos de replicación o amplificación al interior de las células, por lo que su uso se ve limitado en terapias a largo plazo.[95] Sin embargo el uso de vectores codificantes de shARN que a través de la maquinaria celular generan un ARN interferente capaz de modular la expresión de un gen particular con una eficiencia mayor que su respectivo siARN sintético ha permitido solucionar en parte los problemas descritos.[96, 97]

En este trabajo se usó un shARN contra I $\kappa$ B $\alpha$  que es la proteína que retiene a NF- $\kappa$ B en el citoplasma, con el fin de incrementar la actividad transcripcional de NF- $\kappa$ B. Estudios publicados por nuestro grupo muestran que la inducción de CTL específicos para un antígeno tumoral es independiente de la presencia de moléculas como TLR9, Myd88, IRF3 o el receptor de IFN- $\alpha/\beta$ , sin embargo el bloqueo de NF- $\kappa$ B mediante un vector que codifica para una forma no degradable de la proteína I $\kappa$ B $\alpha$  en el sitio de vacunación inhibe drásticamente la generación de CTL y la protección contra el desafío tumoral con células B16-F10 de melanoma murino.[56]

Se sabe que la vía de NF- $\kappa$ B es relevante para los procesos de maduración y migración de DC. [72, 73, 98, 99] Por lo que incrementar su actividad transcripcional inhibiendo I $\kappa$ B $\alpha$  en el sitio de vacunación representa una estrategia interesante para mejorar la potencia de las vacunas de ADN, en este trabajo hemos demostrado mediante un shARN contra esta proteína que la migración de las DC dermales CD103+ especializadas en realizar presentación cruzada y activar linfocitos T CD8<sup>+</sup> se ve aumentada.[91, 100] Además nuestros resultados muestran que este subtipo de DC expresa el receptor de quimioquinas XCR1, lo que confirma que las DC que migran luego de administrar el shARN contra I $\kappa$ B $\alpha$  son potentes activadores de linfocitos T CD8<sup>+</sup> vírgenes.[101, 102]

## **9.2 Las electroporación intradérmica de ADN incrementa la llegada de células dendríticas migratorias a los nódulos linfáticos.**

Los resultados muestran por primera vez que la administración de ADN a través de electroporación intradérmica incrementa la llegada de células dendríticas migratorias a los nódulos linfáticos drenantes del sitio de vacunación. Se observa que 24 horas post vacunación ocurre un peak de DC migratorias en el nódulo linfático (Figura 1A) lo que concuerda con la literatura que indica que ciertos tipos de DC de la piel, entre ellos las DC dermales CD103+ migran rápidamente luego de recibir un estímulo proinflamatorio.[103] También se observa que luego de las 24 horas el porcentaje de estas DC decrece hasta los niveles basales, resultado que podría explicarse porque las DC mueren poco tiempo después de llegar al nódulo linfático.[104]

Si bien existe un arribo de DC migratorias al nódulo linfático, esto no confirma que sean estas las que activan a los linfocitos T CD8<sup>+</sup> que posteriormente van dar origen a la respuesta inmune antitumoral, diversos estudios han mostrado que existe el traspaso de antígenos o moléculas de MHC cargadas con péptidos entre células presentadoras, por lo que aunque exista un peak de DC de la piel en el nódulo linfático, esto no demuestra su relevancia en la activación de linfocitos T CD8, es posible que las células que llegan desde la piel actúen como entes transportadores de antígenos que transfieren péptidos o moléculas de

MHC cargadas a otras DC en el nódulo linfático y que sean estas últimas las que activan a los linfocitos T CD8 vírgenes.[105-107]

### **9.3 La inhibición de I $\kappa$ B $\alpha$ en el sitio de vacunación incrementa la llegada de células dendríticas a los nódulos linfáticos.**

Los resultados de la figura 1B muestran que 24 horas luego de administrar el shI $\kappa$ B $\alpha$  se produce un incremento en el porcentaje de DC en los nódulos linfáticos, mayor que el que se produce cuando se administra solo ADN plasmidial, lo que sugiere que la inhibición de I $\kappa$ B $\alpha$  en el sitio de vacunación incrementa la migración de las DC hacia los nódulos linfáticos drenantes.

Con respecto a los subtipos de DC que llegan a los nódulos linfáticos, se observa que la electroporación intradérmica de ADN incrementa el porcentaje de LC. Con respecto al incremento de las dDC se observa que su fenotipo corresponde al de las DC dermales caracterizadas por la expresión de CD207+CD103+ especializadas en realizar presentación cruzada, lo que además fue corroborado mediante el análisis del receptor de quimioquinas XCR1. Estas células se incrementan con la electroporación de ADN por si sola y además se incrementan cuando se administra el shI $\kappa$ B $\alpha$ .

La figura 2B muestra que la inmunización con ADN incrementa la frecuencia de LC y dDC en los nódulos linfáticos drenantes del sitio de vacunación, además cuando se comparan los grupos que recibieron el shI $\kappa$ B $\alpha$  con los grupos que no fueron inmunizados se observa que todas las DC se incrementan, lo que sugiere

tal como se había descrito previamente en DC derivadas de médula ósea que un incremento en la actividad transcripcional de NF- $\kappa$ B incrementa su migración. Además se debe mencionar que cuando se administra un shARN, no solo hay un efecto dado por el ADN que se administra y por la proteína cuya expresión se inhibe, si no que existe un efecto dado por el ARN que se genera dentro de las células ya que existen sensores de ARN en el citoplasma que lo detectan como una señal de peligro activando vías proinflamatorias que en el caso de las DC podrían aportar a su maduración y migración.[108]

#### **9.4 El silenciamiento de I $\kappa$ B $\alpha$ en el sitio de vacunación potencia la generación de CTL contra el antígeno tumoral TRP2 *in vivo*.**

Con el fin de determinar si la administración del shI $\kappa$ B $\alpha$  en conjunto con una vacuna de ADN dirigida contra el antígeno tumoral TRP2 potencia la generación de CTL, se evaluó la presencia de CTL específicos contra TRP2 en la sangre de los animales inmunizados. Para esto el diseño experimental incluyó la inmunización de cinco grupos de animales, uno con el vector pVAX1 vacío, un grupo de animales con el shI $\kappa$ B $\alpha$  sin la vacuna de ADN, un grupo de animales inmunizados solo con la vacuna de ADN contra TRP2 (pVAX1-TRP2), un grupo de animales inmunizados con una mezcla de plásmidos incluyendo el shCTRL más la vacuna de ADN contra TRP2 y finalmente un grupo de animales inmunizado con el shI $\kappa$ B $\alpha$  en conjunto con la vacuna de ADN contra TRP2. A cada animal se le administraron 40  $\mu$ g de ADN plasmidial total y en el caso de los

grupos que recibieron mezclas de plásmidos se administraron 20 µg de cada uno. El grupo que recibió solo la vacuna de ADN contra TRP2 se le administró una mezcla que incluía 20 µg de pVAX1-TRP2 y 20 µg de pVAX1, esto con el fin que todos los grupos recibieran 20 µg de vacuna. Los ratones fueron inmunizados dos veces con un intervalo de dos semanas y se les extrajo sangre de la vena de la cola, 12 días después de cada inmunización con el fin de determinar la presencia de CTL en la sangre.

Los resultados muestran que todos los grupos que recibieron la vacuna de ADN poseen CTL productores de IFN-γ y TNF-α, citoquinas clave en la respuesta citotóxica y en la erradicación de los tumores, por lo que sería esperable que ante un encuentro con una célula que expresa y presenta este antígeno, estos CTL se activen y la destruyan.[109]

Luego de la primera vacunación no se observan diferencias significativas entre los grupos, salvo en aquel que recibió la vacuna de ADN comparado con el que recibió el vector vacío (datos no mostrados), sin embargo luego de la segunda inmunización hay un incremento en los CTL en el grupo que recibió la vacuna contra TRP2 más el shIkBα comparado con el grupo que recibió la vacuna contra TRP2 más el shCTRL y comparado con el resto de los grupos. Este resultado valida la hipótesis de que la coadministración de un shARN que inhibe la expresión de IkBα y por lo tanto incrementa la actividad de NF-κB en el sitio de vacunación, en conjunto con una vacuna de ADN contra TPR2 incrementa la

generación de CTL específicos, además concuerda con lo publicado por nuestro grupo donde al coadministrar un plásmido que codifica para una forma no degradable de I $\kappa$ B $\alpha$  en conjunto con una vacuna de ADN inhibe la inducción de CTL específicos, por lo que NF $\kappa$ B y su rol en la producción de interferón de tipo I tendría un rol central en la generación de inmunidad en este modelo de electroporación intradérmica de ADN.[56]

Una explicación para el hecho de que se observan diferencias estadísticamente significativas entre el grupo que recibió la vacuna y el shI $\kappa$ B $\alpha$  y el grupo que recibió la vacuna más el shCTRL luego del segundo sangrado puede ser el hecho de que durante la primera vacunación los linfocitos T vírgenes existentes son educados contra el antígeno porque se activan proliferan y se diferencian en linfocitos T efectores y de memoria, luego de la segunda inmunización donde se administran los mismos plásmidos, la respuesta generada se amplifica dado que los linfocitos T de memoria poseen una mayor capacidad para proliferar y las diferencias se amplían haciendo que lo que antes no era significativo después de la segunda inmunización sí lo sea.[110]

Con respecto a los porcentajes de CTL presentes en la sangre de los animales inmunizados, estos se encuentran más bajos respecto de lo previamente publicado por nuestro grupo donde los porcentajes de CTL específicos contra TRP2 generados luego de dos inmunizaciones con pVAX1-TRP2 alcanzan el 0,4%[39, 56] mientras que los porcentajes que se muestran en este trabajo, para

la misma condición experimental alcanzan apenas el 0,15%, esto podría deberse a que los experimentos publicados fueron hechos en el Instituto Karolinska de Suecia, por lo que las condiciones de bioterio y cuidado de los animales podrían ser distintas y estar influyendo en los resultados, se sabe que factores como el tamaño de la jaula, luz, ruido, ventilación, temperatura, humedad y la presencia de una flora bacteriana determinan el bienestar de los animales influenciando su capacidad para generar inmunidad contra un antígeno.[111]

#### **9.5 Eficiencia de la vacuna de ADN para suprimir el desarrollo tumoral en un modelo profiláctico de melanoma murino**

La línea celular B16-F10 de melanoma murino es un modelo tumoral altamente agresivo usado como modelo de metástasis debido a su capacidad para colonizar los pulmones luego de ser administradas por vía intravenosa.[90] Experimentalmente, se usan como modelo de metástasis en pulmones ya que debido a su alta pigmentación, los focos generados son fáciles de identificar y enumerar. Estas células expresan altos niveles del antígeno TRP2 y por ende son blanco de la actividad citotóxica de los CTL específicos para TRP2 generados con la vacuna de ADN contra TRP2 utilizada.[89, 112] De esta manera, los ratones previamente inmunizados (descritos en la sección anterior) fueron desafiados con células B16-F10 por vía intravenosa dos días después del segundo sangrado y se sacrificaron tres semanas después con el fin de realizar el conteo de los focos metastásicos. Se observa que los animales que recibieron

la mezcla de la vacuna de ADN contra TRP2 en conjunto con el shIkB $\alpha$  poseen una disminución del 50% en el número de focos metastásicos comparado con los animales que recibieron la mezcla de la vacuna de ADN contra TRP2 y el shCTRL, esta diferencia es estadísticamente significativa y representativa de dos experimentos independientes, lo que confirma la hipótesis de que la inhibición de IkB $\alpha$  en el sitio de vacunación incrementa la generación de CTL. Se observa además que la vacuna de ADN por sí sola no es capaz de inducir protección antitumoral ya que la reducción que genera en el número de focos metastásicos no es significativa comparada con los grupos que recibieron el vector vacío o el shIkB $\alpha$  en solitario, lo cual podría explicarse por la variabilidad del experimento o porque la coadministración del shIkB $\alpha$  junto con la vacuna de ADN estimula potencia la respuesta inmune mediada por otras células, como por ejemplo la generación de linfocitos T CD4 $^{+}$  que potencian la respuesta inmune mediada por linfocitos T CD8 $^{+}$ . [113-115] Sin embargo la presencia de linfocitos T CD4 $^{+}$  no se evaluó en este trabajo porque no existe un péptido derivado de TRP2 conocido que permita estimular *in vitro* estos linfocitos.

Con respecto al número de focos metastásicos en los pulmones de los animales en promedio fue de 26 focos, mientras que el promedio de focos en los animales que no recibieron vacuna fue de 38, estos números se encuentran muy por debajo en comparación con lo publicado en otros estudios donde el promedio de focos metastásicos alcanza los 100, [116, 117] sin embargo esta diferencia puede ser debida a que las células inyectadas en los grupos que no recibieron la vacuna

formaron grandes masas tumorales en los pulmones y no focos metastásicos dificultando el conteo (figura 4B).

### **9.6 Eficiencia de la vacuna de ADN para suprimir el desarrollo tumoral en un modelo terapéutico de melanoma murino**

Dado que la vacunación profiláctica no es una práctica común en la clínica para tratar el melanoma, se evaluó el potencial adyuvante del shkB $\alpha$  en conjunto con la vacuna de ADN contra TRP2 en un modelo terapéutico donde los animales han sido inoculados con células tumorales antes de ser inmunizados. Para esto todos los ratones fueron inoculados de manera subcutánea con  $2,5 \times 10^5$  células B16-F10 y 24 horas después fueron inmunizados con las mismas combinaciones de plásmidos descritas en la sección anterior, posteriormente se siguió el crecimiento de los tumores hasta el día 12 donde los animales fueron sacrificados y se determinó la presencia de CTL en el bazo y la masa de los tumores.

Se observa que los tumores en todos los grupos aparecen al día 5, crecen lentamente hasta el día 9 y en el intervalo comprendido entre los días 9 y 12 disparan su crecimiento en casi todos los grupos, menos en aquel que recibió la vacuna de ADN contra TRP2 más el shkB $\alpha$ , como se observa en la figura 6A, este incremento en la velocidad de crecimiento se puede explicar a través del concepto de inmuoedición del cáncer que incluye tres fases llamadas eliminación, equilibrio y escape [120], la primera corresponde a los primeros días post inoculación de los tumores donde las células tumorales son eliminadas por

el sistema inmune de los animales, sin embargo algunas sobreviven porque desarrollan mutaciones o secretan factores que les permiten mantenerse vivas y reclutar células del sistema inmune para que no las destruyan, de tal forma que en términos netos el tumor y la respuesta inmune contra este se mantienen en equilibrio hasta que al día 12 todos los tumores crecen sin control porque han escapado al sistema inmune. Siguiendo este razonamiento se puede decir que el shIkB $\alpha$  en conjunto con la vacuna de ADN contra TRP2 retrasa la etapa de escape del tumor porque incrementa la inmunidad contra este, sin embargo la respuesta generada no elimina todas las células tumorales porque los animales desarrollan tumores de todas formas

Al analizar la masa de los tumores (figura 4D) se observa una disminución estadísticamente significativa solo en el grupo que recibió el adyuvante más la vacuna de ADN, lo que valida una vez más la hipótesis de que la inhibición de IkB $\alpha$  en el sitio de vacunación potencia la eficacia de una vacuna de ADN antitumoral con TRP2. El incremento en la eficacia de esta vacuna se explicaría por un incremento en el número de CTL que infiltran el tumor y destruyen las células tumorales, sin embargo no se observaron diferencias significativas en los CTL específicos para TRP2 comparado con el grupo que recibió el vector vacío, ni en los grupos que recibieron el adyuvante (datos no mostrados). Otra posibilidad es que los CTL no sean las únicas células responsables de la disminución en el tamaño tumoral ya que se ha descrito que los linfocitos T CD4 también participan en la inmunidad antitumoral y que su depleción reduce la

capacidad citotóxica y de generar memoria de los CTL, [122-124] también se ha descrito que las células NK aun cuando pertenecen a la inmunidad innata participan activamente en la destrucción de los tumores y su depleción resulta en un crecimiento tumoral acelerado.[125]

## **9.7 CONSIDERACIONES FINALES**

En conjunto los resultados de este trabajo muestran que la administración de una vacuna de ADN por sí sola incrementa la llegada de células dendríticas de la piel a los nódulos linfáticos drenantes del sitio de vacunación, observándose un incremento en el total de células dendríticas migratorias y un incremento en las LC y en las DDC. Además se observó que la vía de NF- $\kappa$ B modula la migración de las células dendríticas dermales ya que la administración del shIkB $\alpha$  que incrementa la señalización a través de esta vía incrementa la llegada de DDC a los nódulos linfáticos drenantes del sitio de vacunación, este resultado es posible correlacionarlo con el incremento en la generación de CTL que se produce cuando se coadministra el shIkB $\alpha$  en conjunto con una vacuna de ADN contra el antígeno tumoral TRP2 ya que las DDC son células dendríticas expertas en realizar presentación cruzada y activar linfocitos T CD8. Por lo tanto la modulación de la vía de NF- $\kappa$ B con el fin de potenciar la respuesta inmune mediada por linfocitos T CD8 es una alternativa válida en el desarrollo de vacunas de ADN administradas a través de electroporación intradérmica.

## 10. CONCLUSIONES

1. 24 horas luego de realizar electroporación intradérmica de ADN se produce un peak de células dendríticas dermales CD207+CD103+XCR1+ en los nódulos linfáticos drenantes del sitio de vacunación.
2. La migración de las células dendríticas dermales CD207+CD103+XCR1+ se incrementa al aumentar la actividad de la vía de NF- $\kappa$ B inhibiendo la expresión de I $\kappa$ B $\alpha$ .
3. El uso de un shARN contra I $\kappa$ B $\alpha$  como adyuvante de una vacuna de ADN antitumoral dirigida contra el antígeno tumoral TRP2 incrementa la generación de linfocitos T CD8+ específicos.
4. El uso de un shARN contra I $\kappa$ B $\alpha$  como adyuvante de una vacuna de ADN antitumoral dirigida contra el antígeno tumoral TRP2 incrementa la protección antitumoral en un modelo profiláctico de metástasis pulmonar.
5. El uso de un shARN contra I $\kappa$ B $\alpha$  como adyuvante de una vacuna de ADN antitumoral dirigida contra el antígeno tumoral TRP2 incrementa la protección antitumoral en un modelo terapéutico de melanoma murino B16F10.

## 11. BIBLIOGRAFÍA

1. NCI, *What Is Cancer?*, in *Journal of the National Cancer Institute* 2012.
2. Ferlay J., et al., *GLOBOCAN 2008 v1.2, Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC CancerBase No. 10* in *International Agency for Research on Cancer* 2010.
3. López, M., et al., *Avances en inmunoterapia celular contra el melanoma maligno*. *Revista médica de Chile*, 2004. **132**: p. 1115-1126.
4. Berrocal, A., et al., *Melanoma: Diagnosis, Staging, and Treatment. Consensus group recommendations*. *Adv Ther*, 2014.
5. Olszanski, A.J., *Current and future roles of targeted therapy and immunotherapy in advanced melanoma*. *J Manag Care Pharm*, 2014. **20**(4): p. 346-56.
6. Tacke, P.J. and C.G. Figdor, *Targeted antigen delivery and activation of dendritic cells in vivo: steps towards cost effective vaccines*. *Semin Immunol*, 2011. **23**(1): p. 12-20.
7. Kantoff, P.W., et al., *Sipuleucel-T immunotherapy for castration-resistant prostate cancer*. *N Engl J Med*, 2010. **363**(5): p. 411-22.
8. Brahmer, J.R., et al., *Safety and activity of anti-PD-L1 antibody in patients with advanced cancer*. *N Engl J Med*, 2012. **366**(26): p. 2455-65.
9. Steinman, R.M., *Decisions about dendritic cells: past, present, and future*. *Annu Rev Immunol*, 2012. **30**: p. 1-22.
10. Idoyaga, J., et al., *Specialized role of migratory dendritic cells in peripheral tolerance induction*. *J Clin Invest*, 2013. **123**(2): p. 844-54.
11. Mellman, I. and R.M. Steinman, *Dendritic cells: specialized and regulated antigen processing machines*. *Cell*, 2001. **106**(3): p. 255-8.
12. Shortman, K. and Y.J. Liu, *Mouse and human dendritic cell subtypes*. *Nat Rev Immunol*, 2002. **2**(3): p. 151-61.
13. Naik, S.H., et al., *Development of plasmacytoid and conventional dendritic cell subtypes from single precursor cells derived in vitro and in vivo*. *Nat Immunol*, 2007. **8**(11): p. 1217-26.
14. Cella, M., et al., *Plasmacytoid monocytes migrate to inflamed lymph nodes and produce large amounts of type I interferon*. *Nat Med*, 1999. **5**(8): p. 919-23.
15. Facchetti, F., et al., *Plasmacytoid monocytes (so-called plasmacytoid T-cells) in Kikuchi's lymphadenitis. An immunohistologic study*. *Am J Clin Pathol*, 1989. **92**(1): p. 42-50.
16. Shurin, M.R., et al., *FLT3 ligand induces the generation of functionally active dendritic cells in mice*. *Cell Immunol*, 1997. **179**(2): p. 174-84.
17. Tamoutounour, S., et al., *Origins and functional specialization of macrophages and of conventional and monocyte-derived dendritic cells in mouse skin*. *Immunity*, 2013. **39**(5): p. 925-38.

18. Vremec, D., et al., *The surface phenotype of dendritic cells purified from mouse thymus and spleen: investigation of the CD8 expression by a subpopulation of dendritic cells*. J Exp Med, 1992. **176**(1): p. 47-58.
19. Crowley, M., et al., *The cell surface of mouse dendritic cells: FACS analyses of dendritic cells from different tissues including thymus*. Cell Immunol, 1989. **118**(1): p. 108-25.
20. Dudziak, D., et al., *Differential antigen processing by dendritic cell subsets in vivo*. Science, 2007. **315**(5808): p. 107-11.
21. Ginhoux, F., et al., *The origin and development of nonlymphoid tissue CD103+ DCs*. J Exp Med, 2009. **206**(13): p. 3115-30.
22. Lee, H.K., et al., *Differential roles of migratory and resident DCs in T cell priming after mucosal or skin HSV-1 infection*. J Exp Med, 2009. **206**(2): p. 359-70.
23. Hildner, K., et al., *Batf3 deficiency reveals a critical role for CD8alpha+ dendritic cells in cytotoxic T cell immunity*. Science, 2008. **322**(5904): p. 1097-100.
24. Zarnitsyna, V.I., et al., *Estimating the diversity, completeness, and cross-reactivity of the T cell repertoire*. Front Immunol, 2013. **4**: p. 485.
25. Neefjes, J., et al., *Towards a systems understanding of MHC class I and MHC class II antigen presentation*. Nat Rev Immunol, 2011. **11**(12): p. 823-36.
26. Kelsall, B.L., et al., *Dendritic cells at the host-pathogen interface*. Nat Immunol, 2002. **3**(8): p. 699-702.
27. Murali-Krishna, K., et al., *Counting antigen-specific CD8 T cells: a reevaluation of bystander activation during viral infection*. Immunity, 1998. **8**(2): p. 177-87.
28. Zhang, N. and M.J. Bevan, *CD8(+) T cells: foot soldiers of the immune system*. Immunity, 2011. **35**(2): p. 161-8.
29. Liu, M.A., *Immunologic basis of vaccine vectors*. Immunity, 2010. **33**(4): p. 504-15.
30. Liu, M.A., *Gene-based vaccines: Recent developments*. Curr Opin Mol Ther, 2010. **12**(1): p. 86-93.
31. Kim, T.J., et al., *Clearance of persistent HPV infection and cervical lesion by therapeutic DNA vaccine in CIN3 patients*. Nat Commun, 2014. **5**: p. 5317.
32. Luxembourg, A., C.F. Evans, and D. Hannaman, *Electroporation-based DNA immunisation: translation to the clinic*. Expert Opin Biol Ther, 2007. **7**(11): p. 1647-64.
33. Yarmush, M.L., et al., *Electroporation-based technologies for medicine: principles, applications, and challenges*. Annu Rev Biomed Eng, 2014. **16**: p. 295-320.
34. Frelin, L., et al., *Electroporation: a promising method for the nonviral delivery of DNA vaccines in humans?* Drug News Perspect, 2010. **23**(10): p. 647-53.

35. Villarreal, D.O., et al., *Alarmin IL-33 acts as an immunoadjuvant to enhance antigen-specific tumor immunity*. *Cancer Res*, 2014. **74**(6): p. 1789-800.
36. Wang, S.T., et al., *RNA interference-mediated silencing of Foxo3 in antigen-presenting cells as a strategy for the enhancement of DNA vaccine potency*. *Gene Ther*, 2011. **18**(4): p. 372-83.
37. Flingai, S., et al., *Synthetic DNA vaccines: improved vaccine potency by electroporation and co-delivered genetic adjuvants*. *Front Immunol*, 2013. **4**: p. 354.
38. Iwasaki, A., et al., *Enhanced CTL responses mediated by plasmid DNA immunogens encoding costimulatory molecules and cytokines*. *J Immunol*, 1997. **158**(10): p. 4591-601.
39. Lladser, A., et al., *DAI (DLM-1/ZBP1) as a genetic adjuvant for DNA vaccines that promotes effective antitumor CTL immunity*. *Mol Ther*, 2011. **19**(3): p. 594-601.
40. Takeshita, F., et al., *Toll-like receptor adaptor molecules enhance DNA-raised adaptive immune responses against influenza and tumors through activation of innate immunity*. *J Virol*, 2006. **80**(13): p. 6218-24.
41. Sasaki, S., et al., *Regulation of DNA-raised immune responses by cotransfected interferon regulatory factors*. *J Virol*, 2002. **76**(13): p. 6652-9.
42. Kumagai, Y., O. Takeuchi, and S. Akira, *TLR9 as a key receptor for the recognition of DNA*. *Adv Drug Deliv Rev*, 2008. **60**(7): p. 795-804.
43. Sun, L., et al., *Cyclic GMP-AMP synthase is a cytosolic DNA sensor that activates the type I interferon pathway*. *Science*, 2013. **339**(6121): p. 786-91.
44. Takaoka, A., et al., *DAI (DLM-1/ZBP1) is a cytosolic DNA sensor and an activator of innate immune response*. *Nature*, 2007. **448**(7152): p. 501-5.
45. Burckstummer, T., et al., *An orthogonal proteomic-genomic screen identifies AIM2 as a cytoplasmic DNA sensor for the inflammasome*. *Nat Immunol*, 2009. **10**(3): p. 266-72.
46. Fernandes-Alnemri, T., et al., *AIM2 activates the inflammasome and cell death in response to cytoplasmic DNA*. *Nature*, 2009. **458**(7237): p. 509-13.
47. Hornung, V., et al., *AIM2 recognizes cytosolic dsDNA and forms a caspase-1-activating inflammasome with ASC*. *Nature*, 2009. **458**(7237): p. 514-8.
48. Ablasser, A., et al., *RIG-I-dependent sensing of poly(dA:dT) through the induction of an RNA polymerase III-transcribed RNA intermediate*. *Nat Immunol*, 2009. **10**(10): p. 1065-72.
49. Chiu, Y.H., J.B. Macmillan, and Z.J. Chen, *RNA polymerase III detects cytosolic DNA and induces type I interferons through the RIG-I pathway*. *Cell*, 2009. **138**(3): p. 576-91.

50. Yang, P., et al., *The cytosolic nucleic acid sensor LRRFIP1 mediates the production of type I interferon via a beta-catenin-dependent pathway*. Nat Immunol, 2010. **11**(6): p. 487-94.
51. Abe, T., et al., *STING recognition of cytoplasmic DNA instigates cellular defense*. Mol Cell, 2013. **50**(1): p. 5-15.
52. Unterholzner, L., et al., *IFI16 is an innate immune sensor for intracellular DNA*. Nat Immunol, 2010. **11**(11): p. 997-1004.
53. Xiao, T.S. and K.A. Fitzgerald, *The cGAS-STING pathway for DNA sensing*. Mol Cell, 2013. **51**(2): p. 135-9.
54. Kaiser, W.J., J.W. Upton, and E.S. Mocarski, *Receptor-interacting protein homotypic interaction motif-dependent control of NF-kappa B activation via the DNA-dependent activator of IFN regulatory factors*. J Immunol, 2008. **181**(9): p. 6427-34.
55. Ishii, K.J., et al., *TANK-binding kinase-1 delineates innate and adaptive immune responses to DNA vaccines*. Nature, 2008. **451**(7179): p. 725-9.
56. Ligtenberg, M.A., et al., *NF-kappaB activation during intradermal DNA vaccination is essential for eliciting tumor protective antigen-specific CTL responses*. Hum Vaccin Immunother, 2013. **9**(10): p. 2189-95.
57. Siebenlist, U., G. Franzoso, and K. Brown, *Structure, regulation and function of NF-kappa B*. Annu Rev Cell Biol, 1994. **10**: p. 405-55.
58. Oeckinghaus, A., M.S. Hayden, and S. Ghosh, *Crosstalk in NF-kappaB signaling pathways*. Nat Immunol, 2011. **12**(8): p. 695-708.
59. Oeckinghaus, A. and S. Ghosh, *The NF-kappaB family of transcription factors and its regulation*. Cold Spring Harb Perspect Biol, 2009. **1**(4): p. a000034.
60. Ghosh, S. and D. Baltimore, *Activation in vitro of NF-kappa B by phosphorylation of its inhibitor I kappa B*. Nature, 1990. **344**(6267): p. 678-82.
61. Malek, S., et al., *X-ray crystal structure of an IkappaBbeta x NF-kappaB p65 homodimer complex*. J Biol Chem, 2003. **278**(25): p. 23094-100.
62. Hoffmann, A., G. Natoli, and G. Ghosh, *Transcriptional regulation via the NF-kappaB signaling module*. Oncogene, 2006. **25**(51): p. 6706-16.
63. Pahl, H.L., *Activators and target genes of Rel/NF-kappaB transcription factors*. Oncogene, 1999. **18**(49): p. 6853-66.
64. Chen, Z.J., L. Parent, and T. Maniatis, *Site-specific phosphorylation of IkappaBalpha by a novel ubiquitination-dependent protein kinase activity*. Cell, 1996. **84**(6): p. 853-62.
65. Israel, A., *The IKK complex, a central regulator of NF-kappaB activation*. Cold Spring Harb Perspect Biol, 2010. **2**(3): p. a000158.
66. Hayden, M.S. and S. Ghosh, *Shared principles in NF-kappaB signaling*. Cell, 2008. **132**(3): p. 344-62.
67. Vallabhapurapu, S. and M. Karin, *Regulation and function of NF-kappaB transcription factors in the immune system*. Annu Rev Immunol, 2009. **27**: p. 693-733.

68. Sun, S.C., *Non-canonical NF-kappaB signaling pathway*. Cell Res, 2011. **21**(1): p. 71-85.
69. Li, Q. and I.M. Verma, *NF-kappaB regulation in the immune system*. Nat Rev Immunol, 2002. **2**(10): p. 725-34.
70. Casani Martinez, C., et al., [*Lumbosacral dermal sinus as entry point of purulent meningitis. Report of 3 cases*]. An Esp Pediatr, 1991. **34**(1): p. 68-70.
71. Ruland, J., *Return to homeostasis: downregulation of NF-kappaB responses*. Nat Immunol, 2011. **12**(8): p. 709-14.
72. Rescigno, M., et al., *Dendritic cell survival and maturation are regulated by different signaling pathways*. J Exp Med, 1998. **188**(11): p. 2175-80.
73. Ouaz, F., et al., *Dendritic cell development and survival require distinct NF-kappaB subunits*. Immunity, 2002. **16**(2): p. 257-70.
74. Larghi, P., et al., *The p50 subunit of NF-kappaB orchestrates dendritic cell lifespan and activation of adaptive immunity*. PLoS One, 2012. **7**(9): p. e45279.
75. Carrasco, D., R.P. Ryseck, and R. Bravo, *Expression of relB transcripts during lymphoid organ development: specific expression in dendritic antigen-presenting cells*. Development, 1993. **118**(4): p. 1221-31.
76. Zanetti, M., et al., *The role of relB in regulating the adaptive immune response*. Ann N Y Acad Sci, 2003. **987**: p. 249-57.
77. Shklovskaya, E., et al., *Langerhans cells are precommitted to immune tolerance induction*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2011. **108**(44): p. 18049-54.
78. Shih, V.F., et al., *Control of RelB during dendritic cell activation integrates canonical and noncanonical NF-kappaB pathways*. Nat Immunol, 2012. **13**(12): p. 1162-70.
79. Carthew, R.W. and E.J. Sontheimer, *Origins and Mechanisms of miRNAs and siRNAs*. Cell, 2009. **136**(4): p. 642-55.
80. Wilson, R.C. and J.A. Doudna, *Molecular mechanisms of RNA interference*. Annu Rev Biophys, 2013. **42**: p. 217-39.
81. Peng, S., et al., *Vaccination with dendritic cells transfected with BAK and BAX siRNA enhances antigen-specific immune responses by prolonging dendritic cell life*. Hum Gene Ther, 2005. **16**(5): p. 584-93.
82. Shen, L., et al., *Silencing of SOCS1 enhances antigen presentation by dendritic cells and antigen-specific anti-tumor immunity*. Nat Biotechnol, 2004. **22**(12): p. 1546-53.
83. Huang, T.T., et al., *Skin delivery of short hairpin RNA of indoleamine 2,3 dioxygenase induces antitumor immunity against orthotopic and metastatic liver cancer*. Cancer Sci, 2011. **102**(12): p. 2214-20.
84. Singh, A., et al., *Efficient modulation of T-cell response by dual-mode, single-carrier delivery of cytokine-targeted siRNA and DNA vaccine to antigen-presenting cells*. Mol Ther, 2008. **16**(12): p. 2011-21.

85. Ohl, L., et al., *CCR7 governs skin dendritic cell migration under inflammatory and steady-state conditions*. *Immunity*, 2004. **21**(2): p. 279-88.
86. Shortman, K. and W.R. Heath, *The CD8+ dendritic cell subset*. *Immunol Rev*, 2010. **234**(1): p. 18-31.
87. Malissen, B., S. Tamoutounour, and S. Henri, *The origins and functions of dendritic cells and macrophages in the skin*. *Nat Rev Immunol*, 2014. **14**(6): p. 417-28.
88. Tullett, K.M., M.H. Lahoud, and K.J. Radford, *Harnessing Human Cross-Presenting CLEC9A(+)XCR1(+) Dendritic Cells for Immunotherapy*. *Front Immunol*, 2014. **5**: p. 239.
89. Bronte, V., et al., *Genetic vaccination with "self" tyrosinase-related protein 2 causes melanoma eradication but not vitiligo*. *Cancer Res*, 2000. **60**(2): p. 253-8.
90. Overwijk, W.W. and N.P. Restifo, *B16 as a mouse model for human melanoma*. *Curr Protoc Immunol*, 2001. **Chapter 20**: p. Unit 20 1.
91. Bedoui, S., et al., *Cross-presentation of viral and self antigens by skin-derived CD103+ dendritic cells*. *Nat Immunol*, 2009. **10**(5): p. 488-95.
92. Rosenberg, S.A., et al., *Inability to immunize patients with metastatic melanoma using plasmid DNA encoding the gp100 melanoma-melanocyte antigen*. *Hum Gene Ther*, 2003. **14**(8): p. 709-14.
93. Shigihara, T., et al., *CXCL10 DNA vaccination prevents spontaneous diabetes through enhanced beta cell proliferation in NOD mice*. *J Immunol*, 2005. **175**(12): p. 8401-8.
94. Huang, B., et al., *RNA interference-mediated in vivo silencing of fas ligand as a strategy for the enhancement of DNA vaccine potency*. *Hum Gene Ther*, 2008. **19**(8): p. 763-73.
95. Borna, H., et al., *Therapeutic face of RNAi: in vivo challenges*. *Expert Opin Biol Ther*, 2015. **15**(2): p. 269-85.
96. Cullen, B.R., *Induction of stable RNA interference in mammalian cells*. *Gene Ther*, 2006. **13**(6): p. 503-8.
97. Siolas, D., et al., *Synthetic shRNAs as potent RNAi triggers*. *Nat Biotechnol*, 2005. **23**(2): p. 227-31.
98. Tas, S.W., et al., *Selective inhibition of NF-kappaB in dendritic cells by the NEMO-binding domain peptide blocks maturation and prevents T cell proliferation and polarization*. *Eur J Immunol*, 2005. **35**(4): p. 1164-74.
99. Yoshimura, S., et al., *Effective antigen presentation by dendritic cells is NF-kappaB dependent: coordinate regulation of MHC, co-stimulatory molecules and cytokines*. *Int Immunol*, 2001. **13**(5): p. 675-83.
100. Flacher, V., et al., *Murine Langerin+ dermal dendritic cells prime CD8+ T cells while Langerhans cells induce cross-tolerance*. *EMBO Mol Med*, 2014. **6**(9): p. 1191-204.

101. Bachem, A., et al., *Expression of XCR1 Characterizes the Batf3-Dependent Lineage of Dendritic Cells Capable of Antigen Cross-Presentation*. *Front Immunol*, 2012. **3**: p. 214.
102. Yamazaki, C., et al., *Critical roles of a dendritic cell subset expressing a chemokine receptor, XCR1*. *J Immunol*, 2013. **190**(12): p. 6071-82.
103. Apte, S.H., et al., *Subcutaneous cholera toxin exposure induces potent CD103(+) dermal dendritic cell activation and migration*. *Eur J Immunol*, 2013. **43**(10): p. 2707-17.
104. Tomura, M., et al., *Tracking and quantification of dendritic cell migration and antigen trafficking between the skin and lymph nodes*. *Sci Rep*, 2014. **4**: p. 6030.
105. Mazzini, E., et al., *Oral tolerance can be established via gap junction transfer of fed antigens from CX3CR1(+) macrophages to CD103(+) dendritic cells*. *Immunity*, 2014. **40**(2): p. 248-61.
106. Li, L., et al., *Cross-dressed CD8alpha+/CD103+ dendritic cells prime CD8+ T cells following vaccination*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2012. **109**(31): p. 12716-21.
107. Allan, R.S., et al., *Migratory dendritic cells transfer antigen to a lymph node-resident dendritic cell population for efficient CTL priming*. *Immunity*, 2006. **25**(1): p. 153-62.
108. Buschow, S.I. and C.G. Figdor, *Dendritic cell subsets digested: RNA sensing makes the difference!* *Immunity*, 2010. **32**(2): p. 149-51.
109. Zhang, B., et al., *IFN-gamma- and TNF-dependent bystander eradication of antigen-loss variants in established mouse cancers*. *J Clin Invest*, 2008. **118**(4): p. 1398-404.
110. Dale, C.J., et al., *Prime-boost strategies in DNA vaccines*. *Methods Mol Med*, 2006. **127**: p. 171-97.
111. Castelhana-Carlos, M.J. and V. Baumans, *The impact of light, noise, cage cleaning and in-house transport on welfare and stress of laboratory rats*. *Lab Anim*, 2009. **43**(4): p. 311-27.
112. Steitz, J. and T. Tuting, *Biolistic DNA vaccination against melanoma*. *Methods Mol Biol*, 2013. **940**: p. 317-37.
113. Darcy, P.K., et al., *Manipulating immune cells for adoptive immunotherapy of cancer*. *Curr Opin Immunol*, 2014. **27**: p. 46-52.
114. Marzo, A.L., et al., *Tumor-specific CD4+ T cells have a major "post-licensing" role in CTL mediated anti-tumor immunity*. *J Immunol*, 2000. **165**(11): p. 6047-55.
115. Antony, P.A., et al., *CD8+ T cell immunity against a tumor/self-antigen is augmented by CD4+ T helper cells and hindered by naturally occurring T regulatory cells*. *J Immunol*, 2005. **174**(5): p. 2591-601.
116. Seong, I., et al., *Sox10 controls migration of B16F10 melanoma cells through multiple regulatory target genes*. *PLoS One*, 2012. **7**(2): p. e31477.
117. Takeda, Y., et al., *Diminished metastasis in tetraspanin CD151-knockout mice*. *Blood*, 2011. **118**(2): p. 464-72.

118. Oyarbide-Valencia, K., et al., *Therapeutic implications of autoimmune vitiligo T cells*. *Autoimmun Rev*, 2006. **5**(7): p. 486-92.
119. Kawakami, Y., et al., *T cell immune responses against melanoma and melanocytes in cancer and autoimmunity*. *Pigment Cell Res*, 2000. **13 Suppl 8**: p. 163-9.
120. Vesely, M.D., et al., *Natural innate and adaptive immunity to cancer*. *Annu Rev Immunol*, 2011. **29**: p. 235-71.
121. Dunn, G.P., C.M. Koebel, and R.D. Schreiber, *Interferons, immunity and cancer immunoediting*. *Nat Rev Immunol*, 2006. **6**(11): p. 836-48.
122. Sun, J.C., M.A. Williams, and M.J. Bevan, *CD4+ T cells are required for the maintenance, not programming, of memory CD8+ T cells after acute infection*. *Nat Immunol*, 2004. **5**(9): p. 927-33.
123. Keene, J.A. and J. Forman, *Helper activity is required for the in vivo generation of cytotoxic T lymphocytes*. *J Exp Med*, 1982. **155**(3): p. 768-82.
124. Sharma, R.K., et al., *CD4+ T cells play a critical role in the generation of primary and memory antitumor immune responses elicited by SA-4-1BBL and TAA-based vaccines in mouse tumor models*. *PLoS One*, 2013. **8**(9): p. e73145.
125. Miller, G.M., M.L. Andres, and D.S. Gridley, *NK cell depletion results in accelerated tumor growth and attenuates the antitumor effect of total body irradiation*. *Int J Oncol*, 2003. **23**(6): p. 1585-92.

