

**Centro de Investigación Científica y de Educación
Superior de Ensenada, Baja California**



**Maestría en Ciencias
en Ciencias de la Vida
con orientación en Biomedicina y Bionanotecnología**

**Vacunas autólogas para el tratamiento del cáncer de mama y
la metástasis ósea**

Tesis
para cubrir parcialmente los requisitos necesarios para obtener el grado de
Maestro en Ciencias

Presenta:

Sarai Veronica Martínez Badillo

Ensenada, Baja California, México
2021

Tesis defendida por
Sarai Veronica Martínez Badillo

y aprobada por el siguiente Comité

Dr. Pierrick Gerard Jean Fournier
Director de tesis

Miembros del comité:

Dra. Patricia Juárez Camacho

Dr. Alexei Fedorovich Licea Navarro

Dra. Mónica Elizabeth Tentori Espinosa



Dra. Patricia Juárez Camacho
Coordinador del Posgrado en Ciencias de la Vida

Dra. Rufina Hernández Martínez
Directora de Estudios de Posgrado

Resumen de la tesis que presenta **Sarai Veronica Martínez Badillo** como requisito parcial para la obtención del grado de Maestro en Ciencias en Ciencias de la Vida con orientación en Biomedicina y Bionanotecnología

Vacunas autólogas para el tratamiento del cáncer de mama y la metástasis ósea

Resumen aprobado por:

Dr. Pierrick Gerard Jean Fournier
Director de tesis

El cáncer de mama es el tipo de cáncer con mayor prevalencia en mujeres y, en etapas avanzadas, el 70% desarrollan metástasis ósea siendo esta la causa de muerte. La metástasis ósea es la diseminación de las células cancerígenas del tumor primario hacia el hueso. Las células de cáncer afectan un ciclo en la respuesta inmune de los pacientes, estableciendo un proceso cíclico con la liberación de antígenos por las células de cáncer, estos antígenos activan a las células dendríticas (CD), especializadas en la presentación de antígenos a los linfocitos T, los cuales se trasladarán hasta el tumor y eliminarán a las células de cáncer, liberando nuevos antígenos. Este ciclo se ve inhibido o disminuido por varios factores en el ambiente tumoral. Para estimular la respuesta inmune contra el cáncer, se han desarrollado inmunoterapias que potencian esta respuesta contra las células tumorales. En este proyecto usamos vacunas autólogas como inmunoterapia, las cuales se han usado en otros modelos de cáncer por sus efectos antitumorales. El objetivo fue caracterizar la eficiencia de las vacunas autólogas para el tratamiento de cáncer de mama y metástasis ósea, para ello realizamos nueve preparaciones de vacunas a partir de la línea celular 4T1. Se prepararon células 4T1 parentales, transfectadas para expresar GM-CSF que activa a CD y células 4T1 derivadas de tumores. Los tres tipos de células fueron lisadas o fijadas con paraformaldehído o glutaraldehído. Evaluamos la capacidad de las preparaciones para activar CD *in vitro* por citometría de flujo y RT-qPCR y seleccionamos las preparaciones de células fijadas con paraformaldehído. En un modelo ortotópico de cáncer de mama, inmunizamos ratones durante tres semanas antes de inocularlos con células 4T1. Sin embargo, ninguna de las vacunas afectó el crecimiento tumoral comparado un placebo. Esta ausencia de efecto podría ser debido a una baja inmunogenicidad de las células de cáncer de mama o al microambiente tumoral que inhibe la respuesta inmune. Por esta razón, es necesario mejorar la formulación de las vacunas o combinar la vacunación con otras terapias antes de probar su eficiencia para el tratamiento de la metástasis ósea.

Palabras clave: metástasis ósea, sistema inmune, vacunas autólogas, cáncer de mama, células 4T1.

Abstract of the thesis presented by **Sarai Veronica Martínez Badillo** as a partial requirement to obtain the Master of Science degree in Life Science with orientation in Biomedicine and Bionanotechnology.

Autologous vaccine for the treatment of breast cancer and bone metastasis

Abstract approved by:

Dr. Pierrick Gerard Jean Fournier
Thesis Director

Breast cancer is the most prevalent type of cancer in women, and in advanced stages 70% develop bone metastasis, this being the cause of death. Bone metastasis is the dissemination of cancer cells from the primary tumor to the bone. Cancer cells cause a cycle in patients' immune response, beginning with antigens' release by cancer cells. These antigens activate dendritic cells, specialized in presenting antigens to T lymphocytes, which will move to the tumor and kill cancer cells, releasing new antigens. This cycle is inhibited by various factors in the tumor environment, so new therapies such as immunotherapies are being sought to enhance the immune response against cancer cells. In this project, we use autologous vaccines as immunotherapy, which have been used successfully for their antitumor effects. The aim was to characterize autologous the efficiency of vaccines against breast cancer cells and their bone metastasis, for which we made nine vaccine preparations from the 4T1 cell line. Parental 4T1 cells were prepared, transfected to express GM-CSF, which activates dendritic cells and tumor-derived 4T1 cells. All three cell types were lysed or fixed with paraformaldehyde or glutaraldehyde. We evaluated the preparations' ability to activate dendritic cells in vitro by flow cytometry and RT-qPCR and selected paraformaldehyde-fixed cell preparations. In an orthotopic breast cancer model, we immunized Balb/C mice for three weeks before inoculating them with 4T1 cells. However, none of the three vaccines affected the tumors' growth other than the mice that received a placebo. This lack of effect could be due to the low immunogenicity of breast cancer cells or the tumor microenvironment inhibiting the immune response. For this reason, it is necessary to improve the formulation of vaccines or combine vaccination with other therapies before testing their efficiency for the treatment of bone metastasis.

Keywords: Bone metastasis, immune system, autologous vaccines, breast cancer, 4T1 cells.

Dedicatoria

A mi familia, mis amigos y mis gatos.

Agradecimientos

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca otorgada durante mis estudios de posgrado, con número de registro **617672** del programa de becas de posgrado y por el apoyo a través del proyecto de Ciencia Básica con número de registro **241295**.

Al centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada (CICESE), al posgrado en Ciencias de la Vida y al departamento de Investigación Biomédica por brindarme las herramientas, las instalaciones y el personal académico necesario para completar exitosamente el posgrado.

A la Dra. Mónica Elizabeth Tentori Espinosa, la Dra. Patricia Juárez Camacho y al Dr. Alexei Fedorovich Licea Navarro, por ser parte de mi comité de tesis.

A Felipe Olvera del Departamento de Biología Molecular y Bioprocesos del Instituto de Biotecnología (UNAM, Cuernavaca, Morelos; México) y el Dr. Christofer David Wood del Laboratorio Nacional de Microscopía Avanzada en el Instituto de Biotecnología (UNAM, Cuernavaca, Morelos, México) por su apoyo y experiencia en el análisis de huesos por radiografía.

Al Dr. Pierrick por compartir su conocimiento y experiencia conmigo. Por aceptarme en su equipo de trabajo, por su paciencia y su dedicación. Aprendí mucho bajo su tutela.

A todos los miembros del PnP group, especialmente a Danna L. Arellano R. por toda su ayuda durante el posgrado.

Tabla de contenido

	Página
Resumen en español.....	ii
Resumen en inglés.....	iii
Dedicatorias.....	iv
Agradecimientos.....	v
Lista de figuras.....	viii
Lista de tablas.....	ix
Capítulo 1. Introducción	
1.1 Introducción general	1
1.1.1 Cáncer de mama y metástasis ósea	1
1.1.2 El microambiente en el hueso	3
1.1.3 Cáncer y el sistema inmune	6
1.1.4 Respuesta inmune y activación de linfocitos.....	9
1.2 Antecedentes.....	10
1.2.1 Vacunas contra el cáncer.....	10
1.2.2 Vacunas autólogas.....	12
1.2.3 Limitaciones de las vacunas autólogas y de la inmunoterapia como tratamiento contra el cáncer.....	14
1.3 Justificación	15
1.4 Hipótesis	15
1.5 Objetivos.....	16
1.5.1 Objetivo general	16
1.5.2 Objetivos específico.....	16
Capítulo 2. Metodología	
2.1 Cultivo celular.....	17
2.1.1 Líneas celulares y cultivo.....	17
2.1.2 Transfección de células.....	17
2.1.3 Análisis de expresión proteica por citometría de flujo.....	19
2.2 Preparación de células 4T1 tumorales	20
2.2.1 Obtención de tumores ortotópicos de cáncer de mama en ratones.....	20

2.2.2 Preparación de suspensión de células a partir de tumores.....	20
2.3 Preparación de vacunas autólogas	21
2.4 Obtención y activación de células dendríticas.....	21
2.4.1 Preparación de células de ratones.....	21
2.4.2 Generación de células dendríticas derivadas de médula ósea de ratón <i>ex vivo</i>	22
2.4.3 Análisis de células dendríticas por citometría de flujo.....	22
2.4.4 Análisis de expresión de marcadores de activación de células dendríticas por RT-qPCR.....	24
2.5 Evaluación de las vacunas en un modelo <i>in vivo</i> de cáncer de mama en ratones.....	25
2.5.1 Mantenimiento, reproducción y manejo de ratones.....	25
2.5.2 Medición de anticuerpos anti-4T1 circulantes.....	26
2.6 Metástasis ósea.....	26
2.7 Análisis estadístico.....	27
Capítulo 3. Resultados	
3.1 Preparación de vacunas con células de cáncer 4T1	28
3.1.1 Generación de células 4T1 con expresión de GM-CSF.....	28
3.1.2 Preparación de células 4T1 derivadas de tumores ortotópicos de ratones.....	35
3.1.3 Preparación de vacunas.....	36
3.2 Evaluación <i>in vitro</i> de los efectos de las formulaciones de vacunas en las células dendríticas.....	37
3.2.1 Células dendríticas primarias de ratones.....	37
3.2.2 Células dendríticas diferenciadas de médula ósea <i>ex vivo</i>	38
3.2.3 Evaluación del efecto de las vacunas en las células dendríticas por citometría de flujo.....	39
3.2.4 Evaluación del efecto de las vacunas en células dendríticas <i>in vitro</i> por expresión de genes de activación.....	42
3.3 Caracterización del efecto anti-tumoral de las vacunas en un modelo ortotópico de cáncer de mama.....	46
3.4 Compatibilidad del modelo de metástasis ósea con inmunización con vacunas autólogas.....	48
Capítulo 4 . Discusión.....	50
Capítulo 5. Conclusiones.....	54
Literatura citada.....	55

Lista de figuras

Figura		Página
1	Progresión del cáncer de mama desde el tumor primario en la glándula mamaria hasta la metástasis ósea.....	2
2	Mecanismos del tumor en el microambiente óseo.....	5
3	Ciclo del sistema inmunológico en respuesta a antígenos de células cancerosas.....	7
4	Estrategia para la selección de células dendríticas activadas	23
5	Optimización de las condiciones para sembrar células 4T1 en experimentos de transfección.....	29
6	Cantidad optima de ADN plasmídico para la transfección de células 4T1.....	30
7	Células 4T1 y 293T transfectadas con GFP y GM-CSF.....	32
8	Concentración mínima de higromicina que elimina células 4T1.....	33
9	Transfección de células 293T y 4T1 con el plásmido de GFP y GM-CSF después de la selección con higromicina.....	34
10	Obtención de células 4T1 tumorales.....	36
11	Detección de células dendríticas convencionales en tres tejidos de ratones Balb/C.....	38
12	Inducción de la diferenciación de células dendríticas convencionales <i>ex vivo</i> a partir de células de médula ósea.....	39
13	Visualización de células dendríticas activadas por citometría de flujo.....	40
14	Auto fluorescencia de células 4T1.....	41
15	ARN obtenido de células dendríticas con las vacunas.....	43
16	Amplificación y validación de los productos de RT-qPCR para la evaluación de vacunas <i>in vitro</i>	44
17	Evaluación de la activación de células dendríticas por RT-qPCR y selección de las preparaciones con mayor activación.....	45
18	Efecto anti-tumoral de vacunas contra el cáncer de mama en un modelo murino.....	47
19	Respuesta humoral provocada por las vacunas de cáncer de mama murino.....	48
20	Osteólisis en ratones de seis y nueve semanas de edad.....	49

Lista de tablas

Tabla		Página
1	Preparaciones de vacunas	37
2	Extracciones de ARN para evaluar la activación de células dendríticas por RT qPCR ...	42

Capítulo 1. Introducción

1.1 Introducción

1.1.1 Cáncer de mama y metástasis ósea

El cáncer de mama es un tipo de adenocarcinoma, donde el crecimiento y proliferación de células cancerígenas en la glándula mamaria es descontrolado (Tower et al, 2019). Según la Agencia Internacional para la Investigación en Cáncer, el cáncer de mama es el segundo tipo con mayor número de nuevos casos en el mundo (11.6 %). En México es el cáncer con mayor incidencia en mujeres y puede estar presente con menor frecuencia en hombres (Bray, 2018).

El cáncer de mama puede iniciar en el epitelio ductal del tejido normal, presentándose en una serie de eventos siendo la hiperplasia, donde las células de cáncer están confinadas en los ductos y no han roto la membrana basal. Posteriormente la hiperplasia con atipia es una etapa donde los ductos se reducen a menos de 2 mm y mayor proliferación de células que ocupan parcialmente el ducto. Este puede progresar a carcinoma *in situ*, donde los ductos están completamente llenos de células cancerígenas, las cuales causan la deformación del ducto. Una vez que las células dejan el confinamiento del ducto mamario, se clasifica como cáncer invasivo (Figura 1A) (Tower et al., 2019).

En un estado avanzado de cáncer, las células malignas se diseminan de un tumor primario a otras partes del cuerpo en un proceso conocido como metástasis (Coleman et al., 2020). La metástasis es la causa del 90% de las muertes por cáncer (Vicent et al., 2006). Las células metastásicas pueden invadir órganos o tejidos distantes como hígado, pulmones, cerebro y huesos específicos (columna, pelvis, cráneo, costillas, húmero y fémur) (Talmadge y Fidler, 2010; Coleman et al., 2020).

En casos de cáncer de mama y próstata, se produce metástasis ósea en más del 70 % de los pacientes (Coleman y Rubens, 1987). Esta propensión al hueso, indica que la diseminación del cáncer desde un tumor primario no es un proceso aleatorio, sino que debe existir afinidad entre las células tumorales y el tejido diana (Paget, 1889). Una vez que ocurre la metástasis ósea, generalmente es incurable y tiene consecuencias devastadoras para los pacientes. Entre los síntomas se incluyen fracturas, dolor, hipercalcemia y compresión de la médula espinal (Roodman, 2004).

La metástasis inicia en el tumor primario, donde las células tumorales producirán factores de crecimiento que activan células endoteliales, remodelando el tejido y promoviendo la invasión por los espacios modificados del estroma, así como la intravasación provocando permeabilidad transitoria y aumentando la capacidad migratoria de las células tumorales. Así, las células pasan a la circulación. Una vez en la circulación, las plaquetas pueden unirse a las células tumorales circulantes (CTC), protegerlas y mejorar su capacidad de establecerse en sitios secundarios. La última etapa es la extravasación, la llegada de células tumorales circulantes al nicho pre-metastásico en la médula ósea. Este nicho se puede preparar para la llegada de células tumorales por medio de exosomas u otros factores. Una vez en el nicho pre-metastásico ocurre una micro-metastásis, donde las células tumorales interactúan con células del hueso (osteoblastos y osteoclastos), las cuales, ayudan al establecimiento y colonización de las células de cáncer (Figura 1B) (Anderson et al., 2019).

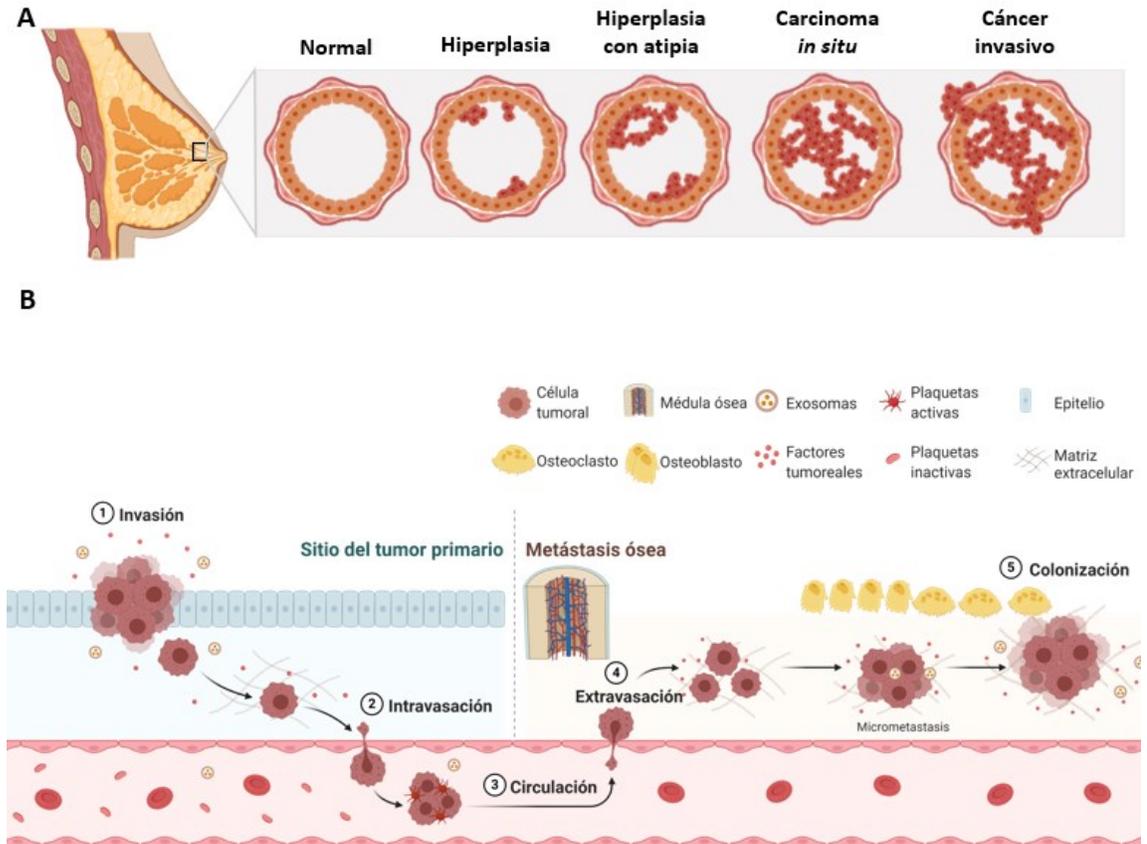


Figura 1. Progresión del cáncer de mama desde el tumor primario en la glándula mamaria hasta la metástasis ósea. (A) El cáncer de mama se desarrolla en una serie de eventos desde tejido normal, iniciando con hiperplasia, después pasa a hiperplasia con atipia y este puede progresar a carcinoma *in situ*. Una vez que las células dejan el confinamiento en el tumor primario inicia la invasión. (B). Posterior a la invasión se llevarán a cabo eventos como, la intravasación, la circulación, la extravasación y finalmente la colonización, aquí las células de cáncer interactúan con osteoblastos y osteoclastos, que ayudan a la colonización de las células de cáncer. Modificado de (A) Tower et al. (2019) y (B) Anderson et al. (2019).

1.1.2 El microambiente en el hueso

La afinidad de las células cancerosas por el microambiente óseo se debe a diversos factores que proporcionan un ambiente conveniente para el crecimiento de las células cancerosas, tales como: los tipos de células (osteoclastos y osteoblastos), factores de crecimiento, y otras moléculas que constituyen un medio adecuado para la proliferación celular tumoral (Mundy, 2002).

Primero, las células tumorales se adhieren a la médula ósea utilizando mecanismos fisiológicos similares a los que usan las células madre hematopoyéticas (HSC) para adherirse en el hueso (Weilbaecher et al., 2011). Uno de los mecanismos para la atracción de las células al hueso es la ruta de quimioatracción CXCL12-CXCR4 (Shiozawa et al., 2011).

El factor derivado del estroma 1 (SDF-1) o CXCL12 es una quimiocina producida en las células estromales de médula ósea (BMSC) y osteoblastos y su receptor CXCR4 que se expresa en células cancerosas (Shiozawa, 2011). El factor CXCL12 se expresa cuando se activa el factor inducible por hipoxia (HIF), incrementando los niveles de la quimiocina en la sangre. Este proceso lleva a la proliferación y diseminación de las células de cáncer de mama por la activación directa de su receptor CXCR4 (Devignes et al., 2018). Se ha demostrado que la sobreexpresión de CXCR4 junto con otros factores, provoca una actividad metastásica alta, dando como resultado lesiones óseas agresivas (Kang, et al., 2003).

Otra molécula en el proceso de adhesión de células de cáncer al hueso, es la integrina $\alpha v \beta 3$. Esta integrina es el receptor que reconoce componentes de la matriz extracelular, y es importante al ser uno de los receptores de adhesión expresado por células de cáncer y osteoclastos. Su expresión acelera el desarrollo de lesiones osteolíticas a través del aumento de la adhesión e invasión al hueso (Pecheur et al., 2002; Zhao et al., 2007).

Una vez que las células cancerosas se adhieren al hueso, entran en contacto con factores de crecimiento en el nicho premetastásico y con células de hueso. Se altera el funcionamiento en células como osteoclastos, encargadas de la destrucción o resorción ósea y osteoblastos encargadas de la formación de hueso, creando un desequilibrio en la resorción ósea (Mundy, 2002). Este desequilibrio ocasiona lesiones osteolíticas y osteoblásticas.

En solo el 25 % de casos con cáncer de mama donde ocurre metástasis ósea, existe demasiada formación de hueso, característica de lesiones osteoblásticas (Suva et al., 2011). Uno de los factores que promueven

este tipo de lesiones es la endotelina-1 (ET-1). Este es un vasoconstrictor producido por células óseas a las cuales afecta, ya que puede estimular la mitogénesis en osteoblastos y puede disminuir la actividad y motilidad de los osteoclastos, que al unirse a su receptor da respuesta con la formación de hueso (Yin et al., 2003). La ET-1 es un péptido que también es producido por el tumor, por lo que estimula la formación anormal del hueso a través del receptor de endotelina A (ET_AR) en osteoblastos (Yin et al., 2003).

Por otro lado, las lesiones osteolíticas son más frecuentes en la metástasis ósea por cáncer de mama. En la osteólisis las interacciones entre las células tumorales y las células óseas en el microambiente óseo, aumentan la destrucción del hueso (Mundy, 2002). Uno de los factores osteoclastogénicos es la PTHrP, que está regulada en el microambiente óseo, y se sobre expresa en metástasis ósea de cáncer de mama (Pluijm et al., 2001). Este factor es el responsable principal del incremento de la resorción ósea y la reducción de la secreción de calcio (Suva et al., 1987). La PTHrP induce la expresión de RANKL por osteoblastos, que inducen a precursores de osteoclastos con RANK, receptor de RANKL (Zhang et al., 2001). RANKL es el mediador fisiológico principal para la formación, función y sobrevivencia de los osteoclastos, además la mayoría de agentes pro osteoclastogénicos (Roodman y Dougall, 2008)

De esta manera las células tumorales inducen indirectamente la osteoclastogénesis e inducen la resorción ósea (Zhang et al., 2001).

Durante la resorción ósea, el nivel de calcio es elevado y estimula la producción de PTHrP, esta acción puede estar mediada por el receptor sensible al calcio (CaSR), el receptor es parte del ciclo vicioso que eleva los niveles de PTHrP e induce la resorción ósea, esto libera calcio y otros factores de crecimiento que favorecen la osteólisis (Sanders et al., 2000). Entre los factores de crecimiento liberados están el factor de crecimiento similar a la insulina (IGF) el cual, ejerce acciones mitogénicas y anti-apoptóticas en células cancerosas (Yu y Rohan, 2000) y el factor de crecimiento transformante beta (TGF- β), que promueve la metástasis en el hueso y es mediada por la producción de PTHrP por el tumor, siendo esta proteína una de las efectoras del TGF- β (Käkönen et al., 2002). El TGF- β también incrementa la expresión de factores osteolíticos, como la IL (interleucina)-11 (Kang et al., 2003). Estos factores inducen la expresión de RANKL e inhiben la expresión de osteoprotegerina en células madre de la médula ósea (BMSC) y osteoblastos, de este modo estimula a los osteoclastos activándolos para la destrucción del hueso

Por lo tanto, el TGF- β junto con otros factores de crecimiento liberados del hueso, aumentan la angiogénesis, la proliferación y la invasión de células cancerosas en el hueso (Hiraga, 2019).

Por medio del mecanismo que involucra la vía de señalización Jagged 1- Notch, donde Jagged 1 es expresado por células metastásicas de cáncer de mama y activa la vía Notch en las células óseas, incrementa la IL-6, que le confiere una ventaja de crecimiento a las células tumorales (Sethi et al., 2012). En un ensayo, se encontró que la IL-6, es un factor de pronóstico de cáncer de mama metastásico, es decir, si se presentan niveles séricos altos es un mal pronóstico para los pacientes con cáncer (Zhang y Adachi, 1999).

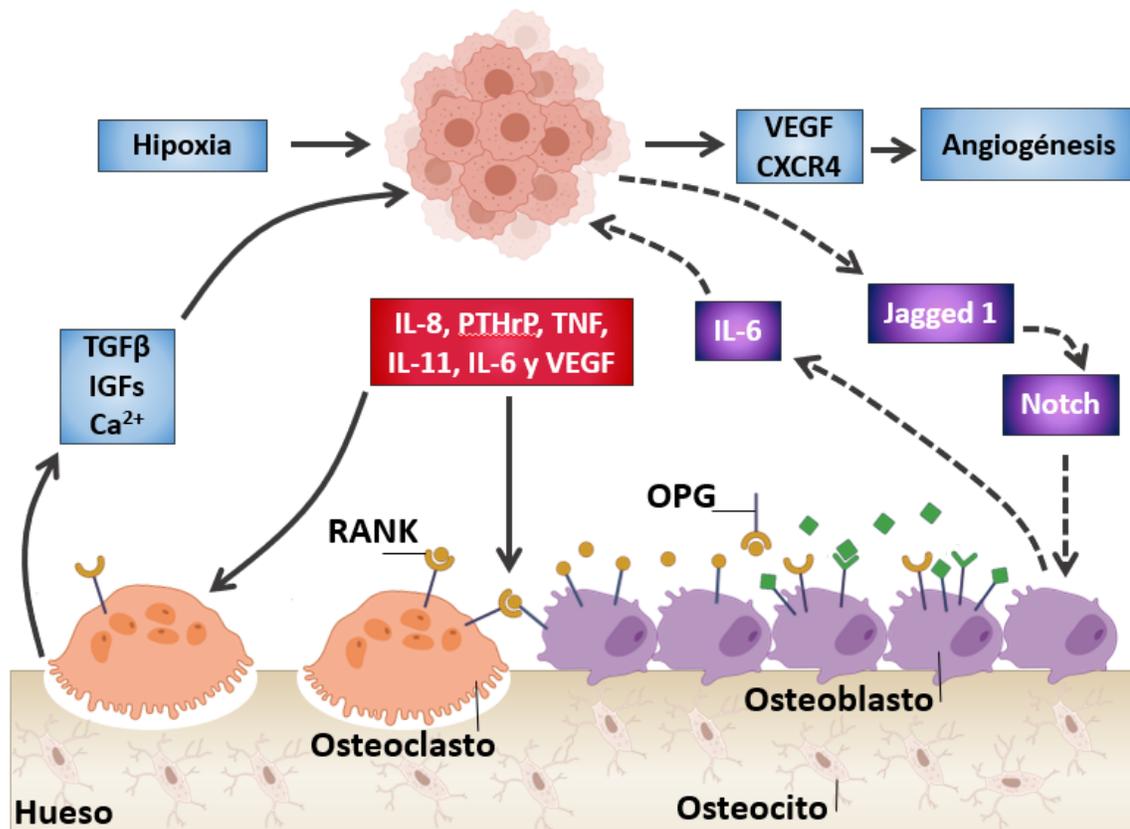


Figura 2. Mecanismos del tumor en el microambiente óseo. Las células tumorales en el hueso, secretan factores osteolíticos como la proteína relacionada a la hormona paratiroidea (PTHrP), interleucina (IL)- 11, IL-6 y IL-8, factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF), factor de necrosis tumoral (TNF), Jagged 1, que estimulan la resorción ósea de manera directa (indicada con las flechas continuas) e indirectamente (indicado con las flechas punteadas) por incremento en la concentración del activador del receptor de NF-κB ligando (RANKL) y disminución de la osteoprotegerina (OPG). La resorción ósea osteoclástica causa la liberación y activación del factor de crecimiento transformador (TGF-β), el factor de crecimiento similar a insulina (IGF) e iones como el calcio, que son almacenados en la matriz ósea mineralizada para mejorar el microambiente. El tumor asociado con la hipoxia y el factor inducible de hipoxia 1α (HIF1α) en conjunto con TGF-β, pueden incrementar la producción de VEGF y CXCR4 para incrementar la angiogénesis y el establecimiento del tumor. El ligando de Notch, Jagged 1 promueve el crecimiento tumoral al estimular la liberación de IL-6 por los osteoblastos. Modificado de Weilbaecher et al., (2011).

La liberación de factores como TGF- β , VEGF, IGF, TNF, y citocinas como IL-6, IL-8 y IL-11 (Jimi et al., 1999; Kang et al., 2005; Bendre et al., 2002) son liberados por células cancerosas, por plaquetas, y por linfocitos T y de igual manera, estos factores son liberados por componentes del ambiente óseo en el proceso de resorción ósea, causando la proliferación de las células de cáncer y mayor pérdida ósea. Durante el proceso de pérdida ósea, ya sea de manera directa o indirecta, se liberan a los mismos factores de crecimiento creando un sistema de retroalimentación positiva entre la proliferación celular tumoral y la resorción ósea, llamado el “ciclo vicioso” (Figura 2) (Weilbaeher et al., 2011).

Una vez que se establece el ciclo vicioso, es más difícil detener la progresión de la enfermedad. A la fecha existen tratamientos antirresortivos aprobados como los bifosfonatos, pero este es un tratamiento paliativo. Los bifosfonatos no afectan la progresión de la metástasis, por lo tanto, no son una respuesta terapéutica para tratar la enfermedad. Es por esto que se necesitan tratamientos nuevos e innovadores como la inmunoterapia, que incrementa y/o apoya la respuesta antitumoral por parte del sistema inmune.

1.1.3 Cáncer y el sistema inmune

El rol del sistema inmune en cáncer fue postulado desde el siglo XX, sin embargo, recientemente se describió el control de la progresión tumoral por el sistema inmune y la modulación de la respuesta del tumor (Schreiber et al., 2011). Actualmente las investigaciones proporcionan evidencia de como la respuesta inmune puede controlar o mejorar la inmunidad contra el cáncer, eliminando a las células de cáncer o a través del estímulo a células efectoras. Sin embargo, para que esta respuesta sea eficiente, se debe iniciar una serie de eventos escalonados, que deben ser continuos y expandirse de manera que se repitan varias veces, estos pasos conforman el ciclo de la respuesta inmune contra el cáncer (Chen y Mellman, 2013) (Figura 3).

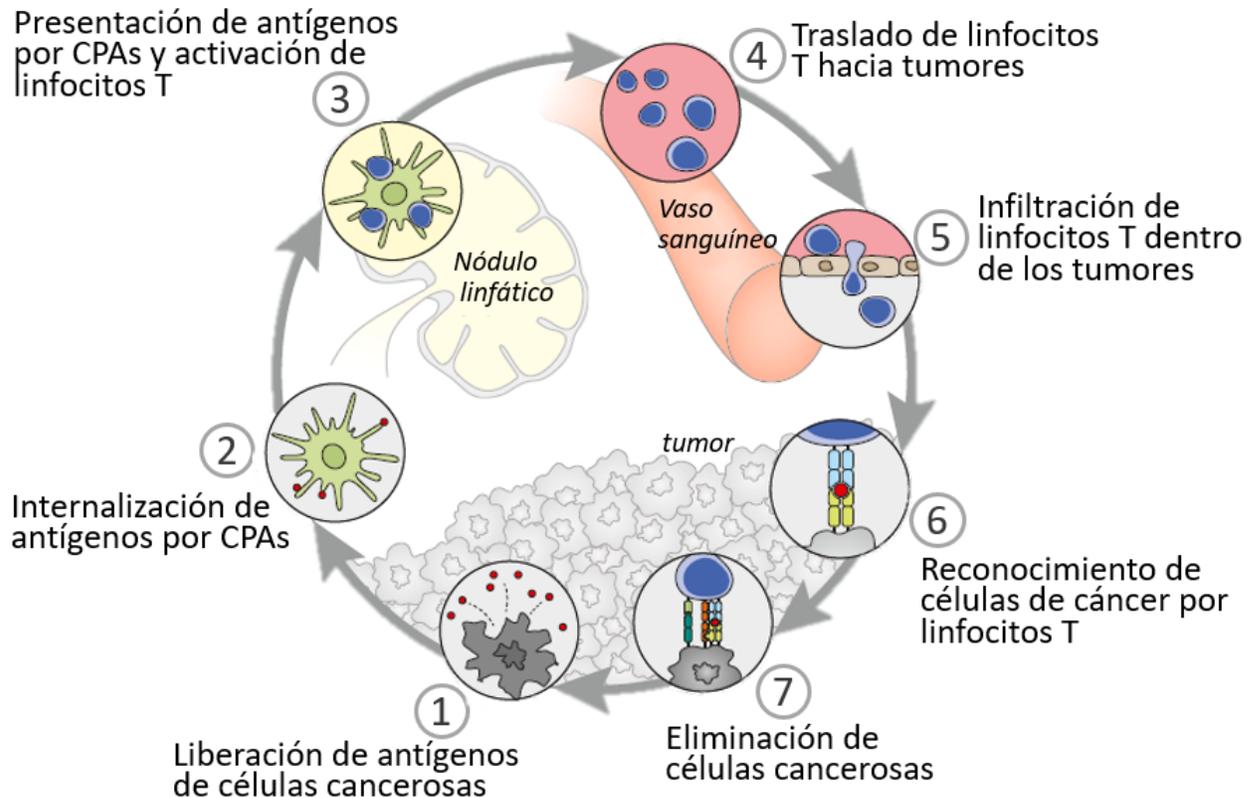


Figura 3. Ciclo del sistema inmunológico en respuesta a antígenos de células cancerosas. La inmunidad contra el cáncer es generada en un proceso cíclico, que puede ser dividido en siete pasos, (1) iniciando con la liberación de antígenos por las células de cáncer, (2) los antígenos son capturados e internalizados por células presentadoras de antígenos (CPAs), (3) viajan hacia los nódulos linfáticos donde presentan los antígenos a linfocitos T, estos son activados y (4) se trasladan hacia el sitio de los tumores, (5) los linfocitos T se infiltran dentro de los tumores y (6) realizan un reconocimiento de las células de cáncer, (7) para después eliminar a estas células tumorales e iniciar el ciclo nuevamente. Modificado de Chen y Mellman (2013).

El rechazo de las células tumorales por el sistema inmune requiere de eventos mediados por varios tipos de células, incluidas los linfocitos T ($CD4^+$ y $CD8^+$), células dendríticas (CD) (Melero et al., 2007). Los linfocitos T tienen diferentes mecanismos efectores, donde se requiere la detección de un antígeno (péptido reconocido como ajeno o extraño) por medio de un complejo único de proteínas en la superficie de células T, el receptor de células T (TCR), el TCR reconoce antígenos presentados por el complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) y participa en el desarrollo de células T (Waldman et al., 2020).

Por lo tanto, la inmunidad antitumoral implica que los tumores deben expresar antígenos que los TCR puedan reconocer como extraños (Burnet, 1970). Así, los antígenos tumorales son factores centrales en

el desarrollo de inmunoterapias contra el cáncer, dentro de los cuales se han caracterizado antígenos asociados a tumores (TAAs) y antígenos específicos de tumores (TSAs) (Valilou y Rezaei, 2019).

Los antígenos desencadenan la respuesta inmune cuando son presentados por células especializadas como las CD. Estas células son presentadoras de antígenos profesionales (CPAs) por su capacidad eficiente de procesar y presentar antígenos a linfocitos T (Vázquez et al., 2012).

Las CD cargadas con el antígeno inician el viaje a los ganglios linfáticos, cuando moléculas como el receptor de quimiocinas 7 (CCR7) guía a las CD hacia los órganos linfoides. Esta quimiocina dirige la localización de ganglios linfáticos a través de la linfa, promoviendo la migración de la CD y la unión al nódulo linfático. Esto se realiza a través de la unión a sus ligandos CCL19 y CCL21 en células endoteliales linfáticas para llegar hacia los linfocitos T, mostrando que la expresión de CCR7 es un indicador de CD maduras. (Förster et al., 2008; Ritter et al., 2004).

En la primera señal de activación de linfocitos T, las CD maduras presentan los antígenos tumorales en moléculas MHC de clase I (MHC-I) y moléculas de MHC de clase II (MHC-II) a los TCR en células T (Hu et al., 2018). En los humanos, el MHC es conocido como antígeno leucocitario humano (HLA). El MHC-I, se encuentra en todas las células nucleadas y presentan antígenos ante linfocitos T citotóxicos (LTC). Los LTC expresan la proteína CD8 en su superficie (linfocitos T CD8⁺), y son capaces de matar directamente a las células que expresen un antígeno específico (Hirschhorn-Cymernan et al., 2012). Esta muerte celular se da por medio de proteasas efectoras clave como la granzima A y la granzima B. Los linfocitos citotóxicos activados destruyen a la célula cancerosa por exocitosis de gránulos, así las proteasas se liberan, atraviesan la membrana de la célula a destruir a través de poros hechos por las perforinas e inducen la apoptosis (Hoves et al., 2012).

Por otro lado, las proteínas MHC de clase II se encuentran en las superficies de las células presentadoras de antígenos como los CD, linfocitos B y macrófagos. Estas células presentan antígenos a los linfocitos T cooperadores, que expresan la proteína CD4 (linfocitos T CD4⁺). Los linfocitos T CD4⁺ reconocen antígenos derivados de tumores y están asociados con la muerte indirecta de las células tumorales (Roche y Futura, 2015).

Una segunda señal co-estimuladora para activar linfocitos T, es a través de las interacciones de las proteínas de membrana de CD80 y CD86 en las CD y CD28, y CTLA4 (antígeno 4 de linfocito T citotóxico) en linfocitos T, lo que promueve la generación de la expansión de células T CD4⁺ y CD8⁺ (Hu et al, 2018).

Usualmente el sistema inmune identifica y destruye células malignas, sin embargo, los tumores generan y aprovechan los microambientes inmunosupresores para evadir esta respuesta inmune, por lo que, en muchos casos esta respuesta contra el cáncer no es suficiente (Garrido et al, 2017). Por otro lado, la inmunoterapia funciona como potenciador de la respuesta inmune en contra del cáncer. Se ha convertido en una importante alternativa para el tratamiento en oncología. Esto es debido a su especificidad para las células tumorales, y a la memoria inmunológica que puede proteger contra las recurrencias de cáncer (Wong et al., 2016).

1.1.4 Respuesta inmune y activación de linfocitos

Dentro de los tipos de inmunoterapias se encuentra el uso de anticuerpos monoclonales (mAc), inhibidores de puntos de control, transferencia adoptiva de células T y vacunas.

Los mAc, son proteínas IgG resistentes a la degradación en suero y tienen características que aseguran un período largo en la circulación. Están elaborados a partir de bibliotecas de fagos de mAc humanos o están producidos en ratones transgénicos. Los mAc pueden sobre activar señales co-estimuladoras e inactivar funciones co-inhibidoras de la respuesta inmune, en células diana específicas (Melero et al., 2007).

Otra terapia es el uso de inhibidores de puntos de control inmunitario, los cuales se han reconocido reguladores negativos de la activación de células T, los cuales actúan como “moléculas de puntos de control” para ajustar la respuesta inmune y regular la hiperactivación. Por ejemplo, CTLA4 y la molécula de muerte celular programada (PD1) y su ligando (PDL1), estos son puntos de control potentes que aseguran la respuesta de células T a la auto tolerancia, (Waldman et al., 2020). Uno de los tratamientos aprobados contra melanoma es nivolumab, probado en 631 pacientes en un estudio fase III, donde el 38 % de los pacientes tuvieron una respuesta objetiva en comparación con el 5% de pacientes que no recibieron el tratamiento (Weber et al., 2014).

Otro tipo de inmunoterapia es la transferencia adoptiva de células T. En esta terapia se extraen los linfocitos T infiltrantes de tumores (TILs), después se modifican genéticamente para expresar receptores de antígenos quiméricos sintéticos (CARs) y luego se expanden y se infunden al paciente (Waldman et al., 2020). Inicialmente los CARs eran receptores similares a TCRs, sin embargo, no eran muy efectivos en pruebas clínicas, por lo que los CARs fueron modificados para incluir dominios de proteínas CD28 y CD40

u otros reguladores positivos de la activación de células T (Kuwana et al., 1987). En un estudio realizado por Kuhn et al. (2019), diseñaron células T CAR para expresar CD40L y caracterizaron la eficacia en un modelo de leucemia en ratones, observando que el tratamiento evita el escape inmunitario del tumor y provoca la inducción de una respuesta inmune endógena durable.

Finalmente, la vacunación es una inmunoterapia que induce una respuesta inmune celular con la presentación de antígenos y provoca inmunidad tumoral a través de la activación de las células T, además genera rechazo a las células tumorales a largo plazo al generar células de memoria (Palucka y Bancherreau, 2013). Que es el tema donde e decidido hacer mi tesis.

1.2 Antecedentes

1.2.1 Vacunas contra el cáncer

Las vacunas tienen como objetivo inducir una respuesta inmune adaptativa *in vivo* contra un antígeno o un grupo de antígenos definidos. Esto implica aprovechar las funciones de las células presentadoras de antígenos profesionales (CPA) como células dendríticas (CD). Así se desencadenan respuestas de células T cooperadoras, y se apoya la producción de anticuerpos para inducir a células T efectoras citotóxicas (Vermaelen, 2019). En cáncer además se busca, proveer una inmunidad antitumoral duradera que sea capaz de brindar protección contra la recurrencia del tumor o la metástasis (Wong et al., 2016).

Para cumplir con este objetivo es necesario incluir componentes clave para el diseño de las vacunas, entre los que se encuentran adyuvantes, estrategias de aplicación y selección del antígeno (Hu et al, 2018).

El uso de adyuvantes activa a los receptores de reconocimiento de patrones de las CPAs que aumentan la expresión de ligandos co-estimulantes. La selección del adyuvante es importante, ya que causa estímulos inflamatorios y en ausencia de estos estímulos, los antígenos presentados por CD inmaduras inducen tolerancia en lugar de inmunidad (Hollingsworth y Jansen, 2019). Algunos ejemplos de adyuvantes son, las sales de aluminio, usadas en vacunas contra virus comunes (Dubensky y Reed, 2010). Otro tipo de adyuvante es el factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF) se usa en vacunas contra el cáncer (Wong et al., 2016). El colesterol, los fosfolípidos y la saponina con o sin antígeno constituyen complejos inmuno-estimuladores, tanto en respuesta humoral como celular, por ejemplo, el

adyuvante de Freund a base de aceites minerales, contiene en su forma completa *Mycobacterium tuberculosis* desactivado por calor, y desencadena la producción de citocinas pro inflamatorias y desencadenan la respuesta de linfocitos T CD8⁺ (Billiau y Matthys, 2001).

El diseño de las vacunas en cáncer requiere de una estrategia de vacunación, en este caso las vacunas pueden ser divididas en dos categorías, profilácticas las cuales se administran a pacientes sanos para prevenir la enfermedad. Un ejemplo es la vacuna profiláctica contra el VPH; el virus del VPH se asocia al 70% de los casos de cánceres de cuello uterino. Esta vacuna contiene los tipos de VPH de alto riesgo más prevalentes en los pacientes. Recientemente, para aumentar la cobertura de tipos de VPH oncogénicos, se agregaron 5 tipos adicionales para desarrollar una vacuna contra el VPH 9-valente (Zhang et al., 2017). Por otro lado, las vacunas terapéuticas se administran a pacientes enfermos, en el caso de las vacunas terapéuticas contra cáncer, están diseñadas para erradicar las células de cáncer y fortalecer la respuesta inmunitaria del paciente, por ejemplo, Sipuleucel-T, la primera vacuna aprobada por la Administración de Drogas y Alimentos (FDA) de Estados Unidos en casos de cáncer de próstata metastásico. Esta vacuna prolonga la supervivencia de los pacientes en 4.1 meses en comparación con el placebo (Cheever y Higano, 2011).

Para realizar la selección del antígeno, debemos saber que las vacunas en cáncer pueden clasificarse según su contenido, en vacunas basadas en proteínas o péptidos de TAA o TSA (Hu et al., 2018). Los TAA se expresan de forma aberrante o anormal en células cancerígenas, pero también pueden ser expresados en células normales (Hollingsworth y Jansen, 2019), por ejemplo, antígenos CT (cáncer/testículo) como MAGE-A1, MAGE-A3 y NY-ESO-1 (Gnjatic et al., 2010) o los antígenos que se sobreexpresan en células de cáncer, por ejemplo, hTERT y HER2 (Disis et al., 2009).

Los TSA son antígenos que solo se expresan en las células malignas, además los TSAs pueden inducir una respuesta inmune más potente por parte de los linfocitos T (Melief, 2017). Un ejemplo de TSA, son los antígenos oncovirales que actúan al inducir la producción de anticuerpos neutralizantes que evitan la entrada de un virus en las células huésped, en consecuencia, previenen la neoplasia mediada por el virus (Hollingsworth y Jansen, 2019). Otro tipo de antígenos son los oncofetales específicos de tumores, están presentes durante el desarrollo fetal con una expresión generalmente limitada en los tejidos adultos, pero aumenta en las células somáticas cancerosas (Hu et al., 2018). Por ejemplo, el antígeno oncofetal 5T4, se expresa en muchos cánceres diferentes, pero rara vez en tejidos adultos normales (Stern y Harrop, 2017).

También se encuentran las vacunas basadas en células tumorales completas, su ventaja es el potencial para presentar un amplio espectro de antígenos tumorales al sistema inmune del paciente (Guo et al 2014). Estas vacunas se pueden dividir en vacunas alógenas y autólogas; las vacunas alógenas contienen normalmente células de líneas celulares tumorales humanas establecidas, estas células se aíslan y son procesadas para que se administren a un paciente y así estimular la respuesta inmune citotóxica (Pardol, 1998). Por ejemplo, en un ensayo se trató a 55 pacientes con cáncer de próstata resistente a hormonas con una vacuna que combinó dos líneas celulares de cáncer de próstata transfectadas con el gen del GM-CSF (Gvax) (Small et al., 2007). Este factor ayuda en el reclutamiento de CD al sitio de inyección de la vacuna, promueve la maduración de las CD y la presentación de antígenos, lo que resulta en una mayor respuesta inmune adaptativa (Dranoff, 2002). La vacuna tipo Gvax aumento la sobrevivencia de los pacientes en 5 meses con dosis altas (vacuna con 100 mil células) y en 2.8 meses con dosis bajas (vacuna con 500 mil células) y se observó que la vacuna fue bien tolerada (Small et al., 2007).

Las preparaciones más comunmente usadas para el diseño de vacunas celulares son lisados celulares (Zhou et al., 2018) células fijadas con paraformaldehído (Wei et al., 2000) o glutaraldehído (Okaji et al., 2007) o irradiadas (Soiffer et al., 2003).

1.2.2 Vacunas autólogas

Las vacunas autólogas, por su parte son producidas mediante el aislamiento de células tumorales de un paciente, aquí las células se procesan y luego se administran al mismo individuo de donde se aislaron (Pardol, 1998). Las vacunas se generan a partir de células individuales de tumores autólogos, estas células tumorales completas inactivadas, proporcionan el conjunto total de antígenos expresados por el tumor (Si et al., 2017), por lo tanto, provocan respuestas del sistema inmune contra los antígenos presentes en los tumores (Kurtz et al., 2014). Por ejemplo, en un ensayo clínico fase I, se vacunaron a 34 pacientes con melanoma metastásico con células de melanoma autólogas irradiadas, diseñadas para secretar GM-CSF, como respuesta a la vacunación se observó la acumulación de linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺, por lo tanto, aumentó la inmunidad antitumoral en estos pacientes (Soiffer et al., 2003).

Otro tipo de vacunas autólogas son las que usan células dendríticas (CDs) del propio paciente, estas células son consideradas como un adyuvante natural por su potencial al presentar antígenos y estimular la respuesta inmune (Salcedo et al., 2006). En un estudio de Salcedo et al. (2006), las vacunas fueron

preparadas con CD autólogas derivadas de monocitos y cultivadas *ex vivo* con citocinas que ayudan a su diferenciación (GM-CSF y IL-13), para después ser cargadas con lisados de células tumorales alógenas o con una proteína de membrana del virus de hepatitis B; pacientes con melanoma recibieron la vacunación sin mostrar efectos adversos de nivel 3-4 a la vacuna. Todos los pacientes mostraron respuestas inmunes y en un paciente se observó la regresión completa de la metástasis hasta 18 meses después, apoyando la investigación la formulación de vacunas con CD.

Por otro lado, tecnología innovadora permite la generación de neoantígenos específicos de cada paciente, estos neoantígenos son un tipo de TSAs, que surgen como consecuencia de mutaciones específicas del tumor, y son reconocidos como extraños por el sistema inmunológico (Schumacher y Schreiber, 2015). Las mutaciones somáticas de células tumorales se descubren por medio de la secuenciación de todo el exoma y la secuenciación de ARN (ARN-seq) reduce el enfoque a mutaciones de genes expresados (Hu et al., 2018). El uso de neoantígenos, permite la creación de una vacuna específica para cada paciente, la cual, puede inducir una respuesta de células T (CD8⁺ y CD4⁺) mayor a la observada con otras terapias inmunogénicas; por ejemplo, en un estudio donde pacientes con melanoma en estadio III o IV fueron vacunados con 20 neoantígenos por paciente en cuatro rondas de vacunación, mostrando en sus resultados que cuatro de los seis pacientes no tuvieron recurrencia al cáncer; con la vacuna demuestran la viabilidad, la seguridad, y la inmunogenicidad de hasta 20 neoantígenos de tumores predichos para el tratamiento de melanoma (Ott et al., 2017).

Se han realizado vacunas con neoantígenos creados a partir de bibliotecas de mutaciones en tumores cancerígenos. En un estudio de 515 pacientes, se identificaron neoantígenos de seis bases de datos de genomas tumorales. Con estos datos fueron construidos epítomos únicos a partir de ARN-seq para la formulación de la vacuna. Los resultados mostraron que no hay evidencia de infiltración de linfocitos T, sin embargo, el incremento en la supervivencia del paciente, está asociada a los epítomos creados (Brown et al., 2014).

Aún con la cantidad de datos preclínicos que respaldan a las vacunas contra el cáncer, no sorprende que la enorme complejidad de redes inmunosupresoras asociadas a tumores contribuya a que las vacunas terapéuticas proporcionen pocos beneficios a los pacientes con cáncer (Vermaelen, 2019), por lo que se deben tener claras las limitaciones de las vacunas para delinear los obstáculos a las respuestas inmunes eficaces.

1.2.3 Limitaciones de las vacunas autólogas y de la inmunoterapia como tratamiento contra el cáncer

Existen varios desafíos para formular una vacuna eficiente contra el cáncer, desde la variación en la inmunogenicidad del paciente, ya que, si los tumores de los pacientes tienen una tasa de mutación baja, las vacunas van a tener menor efecto (Kurtz et al., 2014). La heterogeneidad tumoral, es un desafío ya que está relacionada con la progresión del cáncer y la resistencia a los tratamientos (Stanta y Bonin, 2018). Es probable que la heterogeneidad tumoral contribuya a las dificultades encontradas en la validación de biomarcadores oncológicos y a contribuir con la selección de clones de células fármaco resistentes (Gerlinger et al., 2012).

Otro factor importante es el microambiente tumoral, que consta de factores externos a las células cancerosas, donde se incluyen diversas células inmunes y del estroma, la vasculatura, la matriz extracelular, las citocinas que influyen en la respuesta al tratamiento y las células inmunosupresoras que pueden disminuir la respuesta inmune antitumoral (Fares et al., 2019). Como es el caso de las células T, que son incapaces de proliferar y llevar a cabo la expansión clonal adecuadamente y esto contribuye probablemente a la resistencia de cáncer y a la activación deteriorada de las células T vírgenes a través del reclutamiento de CD (Spranger et al., 2015).

Existen limitaciones en cuanto a la respuesta del sistema inmunológico contra los mecanismos de evasión de las células de cáncer. En 2007, Koebel et al. (2007), en un modelo de ratones, realizan experimentos para comprobar la inmuno-edición de las células de cáncer, la cual consta de tres etapas, en la primera etapa las células de cáncer son eliminadas, aquí la inmunidad funciona como un supresor de células tumorales. En la segunda etapa llamada equilibrio, la inmunidad mantiene controlada la expansión de las células malignas transformadas. Finalmente, la tercera etapa, llamada escape es donde las variantes de las células de cáncer que tuvieron la capacidad de atenuar la respuesta inmune se convierten en cáncer diagnosticado clínicamente. Es decir, las células escapan del sistema inmune y establecen el cáncer.

Las limitantes principales son la identificación de los antígenos adecuados para utilizar en una vacuna y que la respuesta celular a la aplicación de la vacuna se observe en la mayoría de pacientes (Chen y Mellman, 2013). Por lo tanto, es importante hacer la adecuada selección del antígeno, el desarrollo de una terapia combinada eficiente, el desarrollo de un buen modelo preclínico y una producción de vacunas que sea eficiente en costo y distribución (Hu et al., 2018).

Estos son los retos que se deben enfrentar al realizar una vacuna efectiva contra el cáncer, sin embargo, la excelente tolerancia de los pacientes a las vacunas y la búsqueda de una memoria inmunológica protectora a largo plazo, puede transformar el control del cáncer en cura contra el cáncer (Vermaelen, 2019).

1.3 Justificación

El cáncer de mayor incidencia en las mujeres de México y del mundo es el cáncer de mama. El 70 % de los pacientes con esta enfermedad presentan metástasis ósea, la cual es una complicación que mata al 90 % de las pacientes con metástasis. Actualmente no hay cura para la metástasis ósea y los tratamientos actuales como radioterapia y quimioterapia son métodos agresivos que contribuyen de manera frecuente a disminuir la calidad de vida del paciente. Existe una necesidad creciente de tratamientos nuevos, eficientes y específicos que puedan curar el cáncer de mama, la metástasis ósea y/o aumentar la sobrevivencia de las pacientes. Las vacunas contra el cáncer son inmunoterapias de reciente exploración y mucho potencial que provocan una expansión de células T potente y duradera, y sus beneficios clínicos en otros tipos de cánceres están bien establecidos. Un tipo de vacunas, como las vacunas autólogas, ofrecen incrementar respuesta inmune específica de los pacientes de manera dramática, ayudando así a aumentar la sobrevivencia y calidad de vida de las pacientes con cáncer de mama y metástasis ósea. Dando pie a un tratamiento profiláctico o terapéutico eficiente, que eventualmente puede ser combinado con tratamientos probados contra el cáncer de mama, aumentando las probabilidades de cura.

1.4 Hipótesis

Basados en la evidencia, nosotros hipotetizamos que una vacuna autóloga aumentará la respuesta inmune contra el cáncer de mama y la metástasis ósea en comparación con el grupo control.

1.5 Objetivos

1.5.1 Objetivo general

Caracterizar la eficiencia de las vacunas autólogas para el tratamiento de cáncer de mama y metástasis ósea.

1.5.2 Objetivos específicos

- Preparar vacunas autólogas usando células de cáncer de mama en cultivo o de tumores primarios.
- Evaluar el efecto de las vacunas preparadas en la activación de células dendríticas *in vitro*.
- Caracterizar el efecto antitumoral de las vacunas en un modelo ortotópico de cáncer de mama.
- Evaluar la compatibilidad de la inmunización con vacunas autólogas usado en un modelo de metástasis ósea.

Capítulo 2. Metodología

2.1 Cultivo celular

2.1.1 Líneas celulares y cultivo

Se utilizó la línea celular de cáncer de mama triple negativo 4T1 (CRL-2539, American Type Cell Collection). Esta línea fue aislada de un tumor espontáneo de cáncer de mama de un ratón Balb/C (Pulaski y Ostrand-Rosenberg, 2000). La línea celular 4T1 (pase 46 y 49) se cultivó en un medio completo RPMI-1640 (Corning Cellgro) suplementado con 10% (v/v) de suero fetal bovino (Biowest) y 1% (v/v) de antibióticos/antimicótico (Corning Cellgro), estas células fueron llamadas 4T1^{parental}. Usamos también la línea celular 293T, derivada de células de riñón embrionario humano. Fueron cultivadas en un medio DMEM (Corning Cellgro) suplementado con 10% (v/v) de suero fetal bovino y 1% (v/v) de antibióticos/antimicótico. Ambas células fueron cultivadas a 37°C en atmósfera humidificada con 5% CO₂.

Se usó tripsina para despegar células confluentes en incubación, se lavó con PBS, después se agregó una solución de tripsina al 0.05% y EDTA a 0.53mM (Corning Cellgro), las células se incubaron de 5 a 8 min, después la tripsina fue neutralizada con medio suplementado, la suspensión celular fue homogenizada y transferida a un tubo Falcón, para después realizar la manipulación de células correspondiente.

2.1.2 Transfección de células

Para la expresión de la proteína fluorescente verde (GFP), usamos el plásmido pLenti-GFP-Hygro, una donación de los Drs. Eric Campeau y Paul Kaufman (Addgene plasmid # 17446) (Campeau et al., 2009). Para la expresión de la citocina de ratón GM-CSF en células 4T1, usamos el plásmido pCMV3-SP-N-HA-GM-CSF (Sino Biological) que contiene la secuencia codificante completa de GM-CSF (*Csf2*) de ratón con una etiqueta HA en la extremidad N terminal. Se usó el plásmido pLenti GFP hygro (GFP) como control fluorescente. Ambos plásmidos contienen un gene de resistencia a la higromicina para selección en células eucariotas y un gene de resistencia a la ampicilina para selección en bacterias. Un nanogramo de plásmido fue incubado con 50 µL de bacteria *E. coli* ER2738 competentes en hielo durante 30 min. Se hizo un choque térmico a 42° C durante 90 segundos antes de regresar las bacterias en hielo durante 5 min. Agregamos 950 µL de medio Luria Bertani (LB) y las bacterias se incubaron durante 1 hora, a 37° C, con

agitación. Se sembraron 50 μL de bacterias en una placa LB-agar conteniendo carbenicilina (0.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$), y las placas fueron incubadas 16 horas, a 37° C.

Se seleccionó una colonia para sembrar un cultivo líquido con 5 mL de medio LB-carbenicilina (0.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) durante 16 horas, con agitación a 800 rpm. A partir del cultivo de bacteria, se preparó un stock de bacteria en glicerol (25% v/v) para criopreservación a -80°C o se centrifugaron las bacterias (2,000g, 5 min, temperatura ambiente) para hacer una extracción de plásmido con el kit Miniprep Gene JET (ThermoFisher Scientific). La concentración del plásmido fue cuantificada en un espectrofotómetro Nanodrop Lite (ThermoFisher Scientific). Quedando listo para la transfección de células.

Por otro lado, se determinó la cantidad de células necesarias a sembrar para iniciar los experimentos de transfección, para esto las células de resuspendieron y se sembraron células 4T1 de 10,000 hasta 150,000 en una placa de 24 pozos por triplicado, el área de cada pozo es de 1.9 cm^2 . Se observó y se registró el crecimiento de las células durante 4 días en un microscopio EVOS XL (Invitrogen), realizándose un registro fotográfico de la confluencia de las células.

Una vez que se obtuvo la cantidad de células necesarias y los ADN plasmídicos, se realizó el experimento de transfección. Se sembraron células 4T1 en placas de 24 pozos. Primero se usó el método de fosfato de calcio, se preparó una solución de cloruro de calcio (CaCl_2) a 240mM con el plásmido a una concentración de 12.5 $\text{ng}/\mu\text{L}$. Se agregó la solución de plásmido gota a gota en un volumen igual de solución HBS (2x, HEPES 50 mM, NaCl 280 mM, Na_2HPO_4 1.5mM, pH 7), agitando con un vortex. Inmediatamente o después de 15 min de incubación a temperatura ambiente (TA), agregamos desde 20 μL hasta 80 μL de esta nueva solución de plásmido (correspondiendo a 125ng hasta 500ng de plásmido) en los pozos con células 4T1.

Se realizó el cambio de medio (DMEM suplementado) a las células, antes de poner la solución de transfección preparada, se dejaron incubando a 37°C en atmósfera humidificada con 5% CO_2 . Posteriormente se retiró el medio con la solución de transfección y se agregó RPMI suplementado, las células se dejaron a 37°C y 5% CO_2 por 48 horas.

Como segundo método de transfección, se utilizó el reactivo Sinofection (Sino Biological), el cual, es un reactivo de transfección catiónico superior a base de polímeros. Se preparó una solución A con el plásmido de interés (12.5 $\text{ng}/\mu\text{L}$) en medio DMEM sin suplementar (basal) hasta 125 μL , y la solución B, donde se mezcló el reactivo Sinofection de 3 μL en medio DMEM basal hasta 125 μL . La solución A y B se mezclaron para obtener la solución de transfección dejándose en incubación por 15 min a temperatura ambiente

(TA). Se intercambió el medio de las células por la solución de transfección y se dejaron en incubación a 37° C y 5% de CO₂ durante cinco horas. Una vez completado el periodo de incubación, se retiró la solución de transfección y se agregó RPMI suplementado, dejando las células en cultivo.

Las células transfectadas con GFP se observaron en un microscopio de fluorescencia (EVOS FLoid, Invitrogen); al encontrar células fluorescentes, se procedía a analizarlas por citometría de flujo para determinar el porcentaje de células GFP⁺. Como control positivo de transfección se utilizaron células 293T. Las células transfectadas con GM-CSF se nombraron 4T1^{GM-CSF}.

Una vez que la transfección fue realizada, se determinó la concentración de higromicina a usar para seleccionar a las células transfectadas. Para esto se sembraron 20,000 células 4T1 por pozo en una placa de 24 pozos, una vez confluentes el medio de cultivo fue sustituido por medio RPMI suplementado con concentraciones de higromicina desde 50 hasta 500 µg/mL. Se realizó cambio de medio con higromicina a las células cada tercer día durante 10 días. Se tomó un registro fotográfico de la confluencia de las células con un microscopio invertido de cultivo celular.

2.1.3 Análisis de expresión proteica por citometría de flujo

Para comprobar la expresión de GM-CSF en las células transfectadas, se realizó una tinción intracelular de las células. Se agregó Brefeldina A (5 nL/mL; Biolegend) al medio de las células transfectadas, y fueron incubadas durante 5 horas (37°C y 5 % de CO₂). Después se despegaron con tripsina y fueron resuspendidas en una solución amortiguadora de bloqueo; se añadió una solución amortiguadora de fijación (Biolegend). Las células se lavaron en solución amortiguadora de permeabilización 1x (Biolegend) y posteriormente fueron resuspendidas en solución amortiguadora de permeabilización con el anticuerpo (Ac) anti GM-CSF (clone MPI-22E9 Biolegend) conjugado con ficoeritrina (PE). Finalizada la incubación, las células se lavaron en una solución amortiguadora de permeabilización y fueron resuspendidas en una solución amortiguadora de aislamiento (PBS 1x, BSA 0.1% y EDTA 2mM, pH 7.6). Las células estuvieron listas para su análisis por citómetro de flujo en un equipo Attune Acoustic Focusing Cytometer (ThermoFisher Scientific). Esta técnica permite la identificación de grupos celulares, utilizando diferentes láseres y filtros, capaz de detectar características como granularidad y tamaño de las células, así como la detección de marcadores fluorescentes unidos a anticuerpos que reconocen alguna proteína celular, todas las

mediciones realizadas al mismo tiempo por cada célula, a una velocidad de 100 $\mu\text{L}/\text{min}$, en un citómetro de flujo

2.2 Preparación de células 4T1 tumorales

2.2.1 Obtención de tumores ortotópicos de cáncer de mama en ratones

Para obtener tumores ortotópicos de cáncer de mama de ratones, primero se sembraron células 4T1. Una vez confluentes fueron resuspendidas y transferidas a un tubo de 50 mL, se agregó PBS y la suspensión celular se centrifugó a 200 g por 20 min a 4°C; este proceso de lavado se repitió por 3 veces, asegurando células individuales. Finalmente, las células se contaron y resuspendieron a una concentración de 2×10^6 células/mL en PBS. Estas células se inocularon en 50 μL de la suspensión en la cuarta y octava glándula mamaria de ratones hembra Balb/C de seis semanas de edad. Durante tres semanas se registró el peso de los ratones y el crecimiento de los tumores.

2.2.2 Preparación de suspensión de células a partir de tumores

Una vez que los tumores fueron colectados, se procedió a la obtención de células individuales en suspensión, para esto nos basamos en el protocolo de Leelatian et al., (2017). Los tumores, se cortan en pequeños pedazos, se colectan en un tubo Falcon de 50 mL con medio RPMI y se centrifuga a 350 g por 5 min.

Los fragmentos de tumores fueron resuspendidos en 4.7 mL de medio de cultivo RPMI completo por 1cm^3 de tumor, se agregaron 250 μL de colagenasa II de *Clostridium histolyticum* (2500 CDU/mL, Sigma) y 50 μL de DNasa I (10,000 Kunitz/mL, Sigma). La digestión enzimática se realizó en un baño maría a 37°C, durante 1 hora, agitando el tubo cada 10 min. La suspensión celular fue triturada con la ayuda de una pipeta serológica de 10 mL y después fue pasada por un filtro de 70 μm de porosidad a un tubo Falcón de 50 mL nuevo y esteril. Para eliminar a los eritrocitos, las células fueron resuspendidas en 5 mL de RBCL (NH_4Cl 155mM, NaHCO_3 10mM y EDTA 1mM) durante 2 min, la reacción se detuvo con 10 mL de PBS 1x. Las células se lavaron en PBS y se tiñeron con azul tripano para contar células vivas, se preparó una suspensión

de células 4T1 tumorales a una concentración 2×10^7 células/mL. Las células individuales de tumor fueron llamadas 4T1^{tumor}.

2.3 Preparación de vacunas autólogas

Se realizó la preparación de tres tipos de vacunas con células 4T1^{parental}, 4T1^{GM-CSF} y 4T1^{tumor}. Primero se lisaron células en una concentración de 2×10^7 células/mL, las células se sometieron a cinco ciclos de congelación en nitrógeno líquido (≈ 60 seg) y descongelación en baño maría a 37°C (≈ 3 min). El lisado de células se conservó en PBS para las posteriores inmunizaciones. Por otro lado, se tomaron células 4T1^{parental}, 4T1^{GM-CSF} y 4T1^{tumor} en una concentración de 2×10^7 células/mL. Las suspensiones celulares fueron fijadas con paraformaldehído al 3% (polvo diluido en PBS; Sigma) o glutaraldehído al 0.025% (Stock al 25% diluido en PBS; Sigma), durante 20 min a temperatura ambiente. Después de la fijación, las células se lavaron tres veces con PBS para poder ser usadas en inyecciones de inmunización. Las preparaciones fueron conservadas a -80°C .

2.4 Obtención y activación de células dendríticas

2.4.1 Preparación de células de ratones

Para la obtención de CD primarias de ratones, se colectaron células de bazo, médula ósea y células mononucleares de sangre periférica (CMSP) de un ratón Balb/C, hembra de 6 semanas de edad.

Se eliminaron los eritrocitos de las muestras con RBCL durante 2 min. Una vez que se obtuvo la suspensión celular de los tres tejidos, las células fueron contadas en una cámara de Neubauer y posteriormente fueron resuspendidas en solución amortiguadora de aislamiento para la cuantificación de CD, por medio de citometría de flujo.

2.4.2 Generación de células dendríticas derivadas de médula ósea de ratón *ex vivo*

Para obtener CD convencionales (CD) *ex vivo*, se preparó una suspensión de células de médula ósea de ratones Balb/C, libre de eritrocitos; las células se sembraron en una placa de 48 pozos, con medio RPMI suplementado con o sin citocinas de diferenciación de CD: GM-CSF de ratón (20 ng/mL; BioLegend) y IL-4 de ratón (20 ng/mL; BioLegend); el medio fue renovado cada tres días por 9 días. Las células se resuspendieron y se prepararon para detectar CD por citometría de flujo.

Para probar el efecto de las preparaciones de vacunas en CD, se cultivaron CD *ex vivo*, después se pusieron en contacto con las nueve preparaciones de vacunas de células 4T1 en una proporción 1:1 durante 24 horas. Como control positivo, se utilizó el lipopolisacárido de *E. coli* O26:B6 (LPS, Sigma) en una concentración de 100 ng/mL. Al finalizar el periodo de incubación las células se prepararon para ser analizadas por citometría de flujo o para la extracción de ARN.

2.4.3 Análisis de células dendríticas por citometría de flujo

Para cuantificar CD, las células de médula ósea cultivadas *ex vivo*, las células frescas de médula ósea, bazo y CMSP se bloquearon en una solución de PBS con suero fetal bovino (5%) conteniendo un anticuerpo contra los receptores de anticuerpos CD16 y CD32 (clone 93, BioLegend).

Se realizó una tinción de las CD con anticuerpos anti-CD11c (clone N418, BioLegend) y anti-MHC-II (I-A/E, clone M5/114.15.2, BioLegend), conjugados con los fluoróforos isotiocianato de fluoresceína (FITC) y ficoeritrina-cianina 7 (PE-Cy7), respectivamente. Las células fueron incubadas por 30 min a 4° C. Después las células fueron analizadas con el citómetro de flujo Attune Acoustic Focusing Cytometer.

Posterior a la cuantificación de CD en las muestras, se procedió a la cuantificación de CD activadas, para ello usamos anticuerpos contra los marcadores CD80 (B7-1, clone 16-10A1, ThermoFisher Scientific) y CD86 (B7-2, clone GL-1, ThermoFisher Scientific), conjugados con los fluoróforos ficoeritrina (PE) y alofocianina (APC), respectivamente.

Para analizar células individuales en citometría de flujo, primero tienen que ser seleccionadas por el área y la altura de FSC (tamaño) en un crecimiento lineal, los eventos seleccionados se nombraron como

singlets FSC, se seleccionaron nuevamente por el área y la altura de SSC (complejidad), estos eventos fueron nombrados singlets SSC (Figura 4A). Para los experimentos con CD, los eventos individuales se representaron en una gráfica de puntos del área del SSC contra el área de FSC y para tener mayor sensibilidad de seleccionar CD, se ajustaron los voltajes. Los marcadores de CD y son I-A/I-E y CD11c; la detección de CD activadas se realizó por los marcadores CD80 y CD86, derivada de la gráfica de detección de CD (Figura 4B).

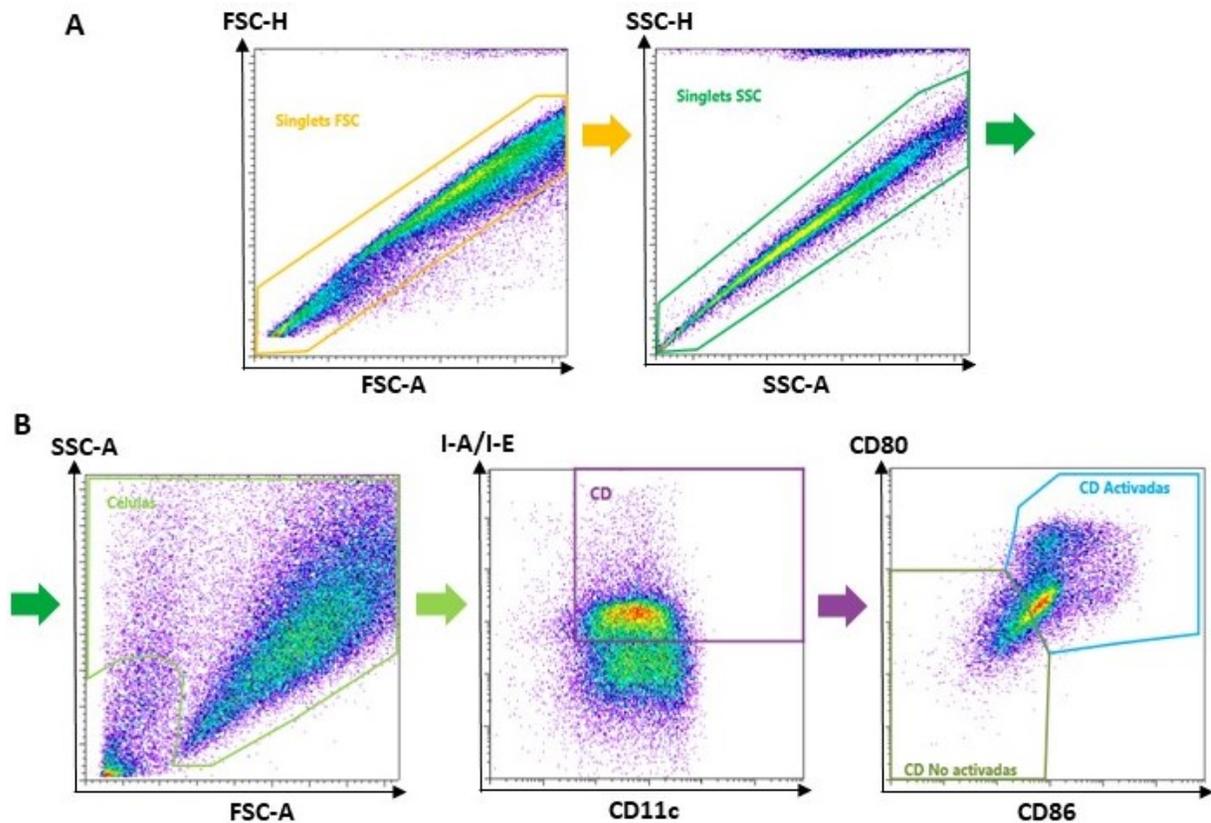


Figura 4. Estrategia para la selección de CD activadas y la detección de linfocitos T tumorales. La estrategia de "gating" consintió (A) en seleccionar eventos únicos en un aumento lineal de FSC (tamaño), los eventos se separaron nuevamente en un aumento lineal de SSC (granularidad). (B) Para encontrar poblaciones de células dendríticas (CD), se seleccionaron eventos en un aumento proporcional de FSC y SSC, las CD se seleccionaron con los marcadores fluorescentes CD11c-FITC y I-A/I-E-PE Cy7; la población activada de CD fue seleccionada con CD80-PE y CD86-APC para CD.

2.4.4 Análisis de expresión de marcadores de activación de células dendríticas por RT-qPCR

Para caracterizar la activación de CD por las preparaciones de vacunas por PCR cuantitativa en tiempo real (RT- qPCR). Primero se realizó la extracción de ARN con el kit RNeasy Plus Mini (Qiagen), a partir de las CD diferenciadas *ex vivo*, puestas en contacto 24 horas con las preparaciones de vacunas.

Las células se lisaron y se homogenizaron en una solución amortiguadora desnaturalizante de guanidín isotiocianato. El lisado se pasó a una columna que permite la eliminación de ADN genómico. Se agregó etanol y se colocó en una columna para extraer el ARN, este se eluyó en 30 μ L. Se realizó una cuantificación de la concentración de ARN en un Nanodrop Lite. Para observar las bandas del ARN se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 1.5% a 100 volts.

Se realizó la retrotranscripción del ARN extraído de las 11 muestras, para la síntesis de ADN complementario (ADNc). Para la reacción, se utilizó una mezcla de dNTP's 10mM (Promega) y 5 μ L de ARN a 100ng/mL. Esta mezcla se colocó en un termociclador a 65°C durante 5 min, al final de la incubación las muestras se pusieron en hielo. Se agregó una segunda mezcla que consta de First- Strand buffer, DTT y la enzima reverso-transcriptasa Super Script II (Invitrogen). Para completar la retrotranscripción, las muestras fueron puestas nuevamente en el termociclador, donde se incubaron a 42°C durante 75 min, después 70°C durante 15 min, al final se agregaron 4 volúmenes de agua y se almacenaron a -20°C.

Se obtuvieron muestras de ADNc de las preparaciones de vacunas con CD *ex vivo* para evaluar la expresión de los genes *Cd80* y *Ccr7* por medio de RT- qPCR. Los oligonucleótidos se diseñaron usando Primer-BLAST, CD80 (sentido: AGTTTCTCTTTTCAGGTTGTGAA; antisentido: ACATGATGGGGAAAGCCAGG) de 200 pb y CCR7 (sentido: TTGCCGTGGTGGTAGTCTTC; antisentido: GCAATGTTGAGCTGCTTGCT) de 124 pb.

Para la reacción de RT qPCR, se utilizó agua libre de nucleasas, un cebador antisentido y un cebador sentido, además del reactivo QuantiTECT SYBER Green (Qiagen). Las muestras fueron analizadas en un equipo 7500 Real Time PCR System (ThermoFisher Scientific). La expresión de los genes en las muestras por triplicado se determinó con curvas estándar usando diluciones en serie de ADNc. Como gen constitutivo se utilizó al gen beta 2 microglobulina (B2M; sentido: ACAGTTCCACCCGCTCACATT; antisentido: TAGAAAGACCAGTCCTTGCTGAAG).

2.5 Evaluación de las vacunas en un modelo *in vivo* de cáncer de mama en ratones

2.5.1 Mantenimiento, reproducción y manejo de ratones

Para los experimentos se utilizaron ratones hembras Balb/C AnNHsd, provenientes del Harlan-Envigo mantenidos en CICESE. La manipulación y los experimentos con ratones fueron realizados de acuerdo a la NOM-062-ZOO-1999. Los animales fueron monitoreados manteniendo siempre comida, agua y ambientes limpios; además, también se buscaron signos de estrés, pelea o enfermedad. La estrategia de reproducción fue colocar en una caja a dos hembras y un macho durante 2 semanas, para después colocar a las hembras en cajas individuales para tener sus crías. Las crías son separadas tres o cuatro semanas después, ya que son capaces de alimentarse ellas solas.

La estrategia de inmunización se realizó como un tratamiento profiláctico, aplicando una dosis cada semana, tres semanas antes de la inoculación de células cancerígenas en la glándula mamaria, y una última inmunización, una semana después de la inoculación. Se aplicaron 5 tratamientos, PBS, adyuvante de Freund y las tres vacunas seleccionadas para este experimento (n=6).

Las vacunas se prepararon mezclando volúmenes iguales de adyuvante de Freund (Sigma Aldrich) y preparaciones de células. Se inoculó a los ratones con 100µL de emulsión de manera subcutánea (s.c.), correspondiente a 10^6 células, 50 µL de emulsión en cada costado del ratón.

En todos los casos la primera vacuna se preparó con adyuvante de Freund completo (con residuos de *Mycobacterium tuberculosis*), las siguientes tres vacunas se prepararon con adyuvante de Freund incompleto (sin residuos de *M. tuberculosis*). Después de 27 días, se llevó a cabo la eutanasia de los ratones. Si la inoculación de células 4T1 fue intracardiaca, los ratones se sacrificaron 10 días después.

La eutanasia se realizó por medio de una sobredosis de pentobarbital (150 mg/kg), y por dislocación cervical, de acuerdo a los lineamientos establecidos por la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999.

Para determinar el efecto de las vacunas en el crecimiento de los tumores, se midió el ancho (A) y el largo (L) de los tumores con un vernier, tres veces por semana. El volumen de los tumores (V) fue calculado con la fórmula $V = (L \times A^2) / 2$ (Carlsson et al., 1983). El peso de los ratones fue tomado 3 veces a la semana.

2.5.2 Medición de anticuerpos anti-4T1 circulantes

El plasma que se obtuvo de los ratones, se analizó por medio de un ELISA (Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay). Primero se realizó un ensayo de proteínas para determinar la concentración de proteínas del lisado de células 4T1 con el kit Micro BCA Protein Assay (PIERCE). En una placa de 96 pozos se preparó una curva estándar y el lisado de las células 4T1, la placa se colocó en un lector de placa EPOC (Biotek) a 562 nm. Para el ensayo, se realizó el recubrimiento en una placa de 96 pozos para ELISA (Nunc MaxiSorp), con 10 µg de proteína de lisados de células 4T1 (1 noche, 4°C). Para la curva estándar, se recubrieron los pozos con diluciones de IgG de suero de ratón no inmunizado (Jackson ImmunoResearch laboratories) desde 10 µg/mL, hasta 0.041 µg/mL (1 noche a 4°C). Los pozos se lavaron tres veces con una solución de PBS-Tween 20 (0.05%) después de cada incubación; se realizó el bloqueo con una solución de BSA (1%) en PBS durante 2 horas. Se agregó plasma de ratones diluido (1:10) y se incubó por 90 min a 37° C. Se agregó el anticuerpo de detección policlonal de cabra que reconoce la fracción de un IgG de ratón conjugada a peroxidasa (Sigma) diluido 1:10,000 (2 horas a 37° C). Se agregó una solución de sustrato de peroxidasa 3,3', 5,5'-tetrametilbencidina (TMB, BioLegend), después se siguió el desarrollo de la reacción midiendo la densidad óptica a 620nm, con un lector de placa Epoch (Biotek). La reacción se detuvo agregando HCl (2M), y se leyó la densidad óptica a 450 nm. Cada muestra se analizó por triplicado.

2.6 Metástasis ósea

Para provocar metástasis ósea, se preparó una suspensión con 10^6 células/mL de células 4T1 parentales. Se anestesiaron ratones hembras Balb/C por inyección intraperitoneal con una mezcla de Ketamina (100 mg/kg) y Xilazina (10 mg/kg). Cuando estuvieron dormidos se les depiló el pecho y se inocularon células 4T1 de manera intracardiaca. Después de la inyección los ratones se mantuvieron en un tapete térmico y se monitorearon hasta pasada la anestesia. Durante el periodo de recuperación, los ratones se mantuvieron hidratados (PBS 1x intraperitoneal) y se aplicó una solución oftálmica para evitar resequeidad ocular.

Para evaluar el daño en el hueso causado por la metástasis ósea en ratones, se colectaron el fémur y la tibia de ambas patas y se enviaron al Laboratorio Nacional de Microscopia Avanzada (LNMA, UNAM) para tomar radiografías con el equipo de imagen In-Vivo Xtreme (Brucker). Una vez obtenidas las imágenes, se

detectó la presencia o ausencia de osteólisis, para determinar la proporción de ratones con metástasis ósea.

2.7 Análisis estadístico

Los resultados se expresan como el promedio \pm el error estándar de la media (EEM), y fueron analizados con el programa de estadísticas GraphPad Prism (v8.0). Primero se hizo una prueba de normalidad (pruebas de D'Agostino-Pearson y Shapiro-Wilk). Si hubo una distribución normal de los datos, se usaron pruebas paramétricas: la prueba t de Student (por 1 variable y 2 grupos), o un ANOVA de 1 vía (por 1 variable y ≥ 3 grupos) o de 2 vías (por ≥ 2 variables y ≥ 2 grupos) con la prueba post hoc recomendada. Si no hay una distribución normal, usamos pruebas no-paramétricas: la prueba U de Mann-Whitney (por 1 variable y 2 grupos), o una prueba de Kruskal-Wallis (por 1 variable y ≥ 3 grupos) con la prueba post hoc recomendada. La diferencia fue considerada significativa si el valor de P es inferior o igual a 0.05.

Capítulo 3. Resultados

3.1 Preparación de vacunas con células de cáncer 4T1

El objetivo fue obtener tres preparaciones de vacunas usando células de cáncer de mama 4T1 en cultivo y de tumores primarios. Las primeras son células 4T1 parentales que fueron preparadas directamente sin modificación; se sembraron y se expandieron para obtener el mayor número de células posible obteniéndose 218 millones de células, las cuales se nombraron 4T1^{parental}.

El segundo tipo de células son 4T1 con expresión de GM-CSF y las terceras son células 4T1 derivadas de tumores ortotópicos de ratones descritas a continuación.

3.1.1 Generación de células 4T1 con expresión de GM-CSF

Las células con secreción de GM-CSF proveen una respuesta inmune más potente y aumentan el reclutamiento de CD. Para obtener este tipo de células, primero necesitamos determinar la densidad de células 4T1 a sembrar. El número de células es importante porque, durante los experimentos de transfección la superficie donde se encuentran las células no debe tener el 100% de confluencia, ya que las células empiezan a morir.

Para esto se realizó un experimento de proliferación celular, donde sembramos diferentes cantidades de células, desde 25,000 células, hasta 150,000 células por pozo (área del pozo: 2 cm²) y durante 3 días se registró la confluencia de las células.

Los resultados muestran que las cantidades desde 75,000 células hasta 150,000 células llegan a una confluencia de 100 % en las primeras 24 horas; los pozos con 25,000 y 50,000 células, llegaron al 100% de confluencia en 48 horas, por lo que ninguna de las cantidades de células sembradas, es óptima para cumplir con el objetivo, ya que ocurría muerte celular (Figura 5A). Se realizó un segundo ensayo de proliferación con menor cantidad de células, se sembraron 10,000, 15,000 y 20,000 células/2 cm². Se observó en todos los casos que, las células no alcanzaron el 100 % de confluencia durante 3 días. También se observó que los pozos con 10,000 y 15,000 células/2cm², no alcanzan una confluencia del 70%, necesaria para posteriores experimentos de transfección en el mismo periodo de tiempo (3 días). Por otro

lado, en los pozos con 20,000 células se registró una confluencia del 70%, ideal para iniciar con el protocolo de transfección (Figura 5B). Por lo que decidimos continuar con el experimento de transfección sembrando 20,000 células 4T1/2cm².

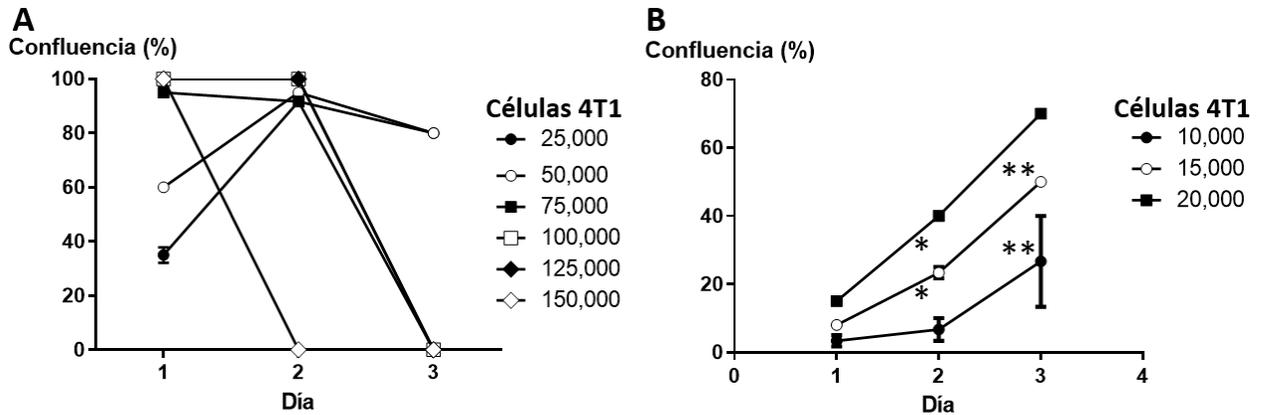


Figura 5. Optimización de las condiciones para sembrar células 4T1 en experimentos de transfección. Se sembraron (A) de 25,000 hasta 150,000 células/2cm² o (B) de 10,000 hasta 20,000 células/2cm² en placas de cultivo, y se cuantificó visualmente el porcentaje de confluencia en los pozos, durante los 3 días siguientes. Los resultados son presentados como el promedio de confluencia (\pm EE) (n=3). * P<0.05, ** P<0.01 vs 20,000 células/2cm² usando un ANOVA de 2-vías y una prueba post-hoc de Tukey.

Por otro lado, debíamos obtener el ADN plasmídico con la secuencia de la citocina de GM-CSF (*Csf2*) para insertar en células 4T1. Se obtuvo una concentración de 623.8 ng/ μ L (OD 260/280: 1.88) para GM-CSF y 525 ng/ μ L para GFP (OD 260/280: 1.91). Para determinar la cantidad a usar de ADN plasmídico para la transfección, se realizó un ensayo de transfección por medio de la precipitación de fosfato de calcio con ADN del plásmido de GFP en diferentes cantidades, 125 ng, 250 ng y 500 ng. Al observar las células en un microscopio de fluorescencia, no se logró detectar células brillantes. En cambio, se observó que entre mayor era la cantidad de ADN plasmídico, había mayor muerte celular. También se observaron precipitados de la solución de transfección en el fondo con las células 4T1 (Figura 6A).

Para resolver este problema, se realizó un segundo experimento con las mismas cantidades de ADN y el cambio de medio de transfección de RPMI a DMEM, probando también diferentes tiempos de incubación con la solución de transfección (5, 10 y 15 min).

Se observó que el cambio de medio, ayudó a que las células no murieran (Figura 6A). Por otro lado, se observaron células fluorescentes en el microscopio (Figura 6B). Las células se analizaron por citometría de

flujo (ACF), los resultados muestran mayor número de células GFP positivas (GFP⁺) con 15 min de incubación y una cantidad de 500 ng de ADN (Figura 6C), por lo que se usaron estos parámetros para continuar con los ensayos de transfección.

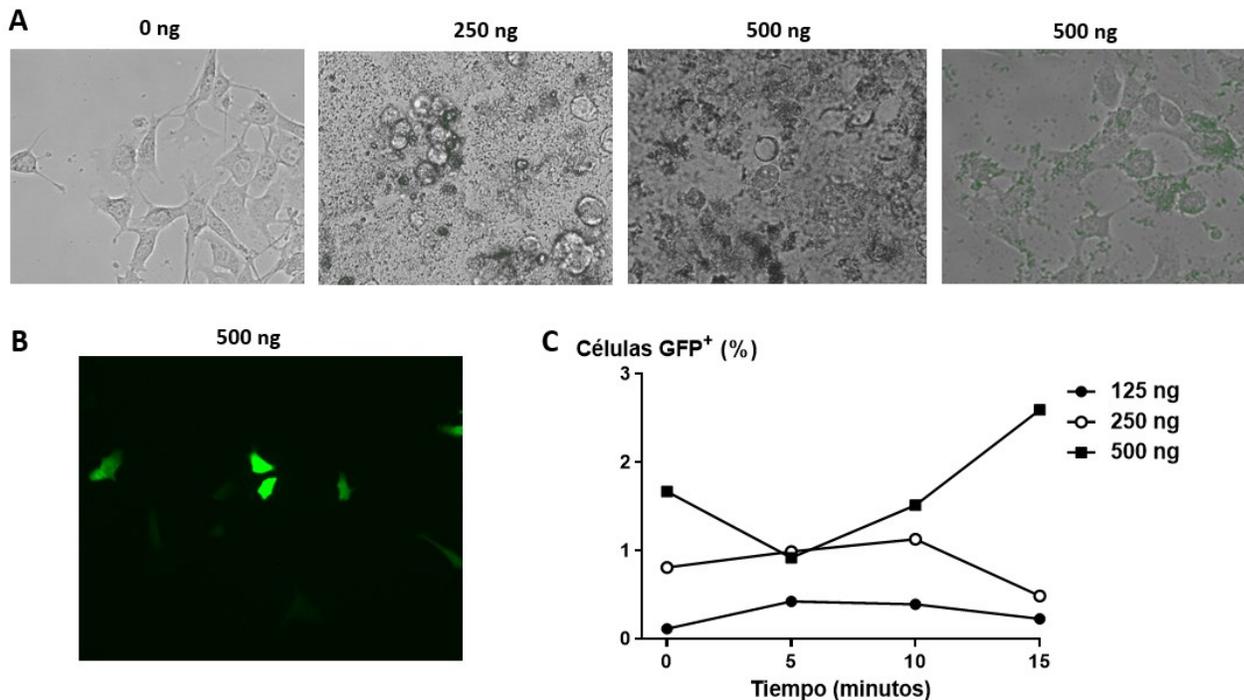


Figura 6. Cantidad óptima de ADN plasmídico para la transfección de células 4T1. (A) Se transfectaron células 4T1 en placas de 24 pozos (1.9 cm²) con 250 o 500 ng de plásmido pLenti GFP hygro con o sin cambio de medio (RPMI a DMEM) y 48 horas después se evaluaron por microscopía, los resultados se muestran en fotografías representativas. (B) Se transfectaron células 4T1 con GFP, 48 horas después las células se analizaron por microscopía de fluorescencia, el resultado se muestra en la fotografía representativa usando 500 ng de AND. (C) Células 4T1 fueron transfectadas con 125 a 500 ng de ADN de GFP y se dejaron incubar en la solución de transfección de 0 a 15 min; 48 horas después, se evaluó el porcentaje de transfección por citometría de flujo y los resultados se expresan en porcentaje de células fluorescentes. La técnica de transfección fue por fosfato de calcio.

Los porcentajes de células 4T1 GFP⁺ fueron menores al 3%, lo cuál es muy bajo, posiblemente por problemas con el método de transfección o con las células. Por esta razón se decidió utilizar células 293T como control positivo de transfección, ya que en trabajos anteriores dentro del equipo de laboratorio se consiguió más del 30% de células GFP⁺. Adicionalmente se utilizó un nuevo reactivo de transfección, llamado “Sinofection” por su nombre en inglés. El propósito de un nuevo reactivo es determinar si el método de transfección es la causa del bajo porcentaje de células transfectadas.

Al observar las células con los diferentes reactivos de transfección en el microscopio, no hubo campos con células 4T1 GFP⁺ con fosfato de calcio, sin embargo, usando el nuevo reactivo, se logró identificar células GFP⁺. En contraste, se observaron células 293T fluorescentes en todos los campos seleccionados, con ambos métodos de transfección, fosfato de calcio y Sinofection (Figura 7A).

Al detectar fluorescencia en las células, estas se prepararon para ser analizadas por citometría de flujo. En el análisis pudimos observar las poblaciones de células GFP⁺ delimitadas por un polígono verde. También se muestra el porcentaje de células 4T1 (fosfato de calcio: 2%, Sinofection: 0.8 %) y de células 293T (fosfato de calcio: 40 %, Sinofection: 31%) transfectadas (Figura 7B).

El experimento de transfección se realizó a la par con ADN plasmídico de GM-CSF. Para confirmar la transfección de células, se realizó una tinción intracelular por citometría de flujo, ya que la citosina se encuentra en el interior de las células.

Las células GM-CSF positivas (GM-CSF⁺) se muestran dentro del polígono azul, con porcentajes de células 4T1 (fosfato de calcio: 0.1%, Sinofection: 0.4 %) y de células 293T (fosfato de calcio: 25 %, Sinofection: 49%) transfectadas (Figura 7C). Esto nos indicó que las células 4T1 son más difíciles de transfectar con los métodos seleccionados comparado con las células 293T.

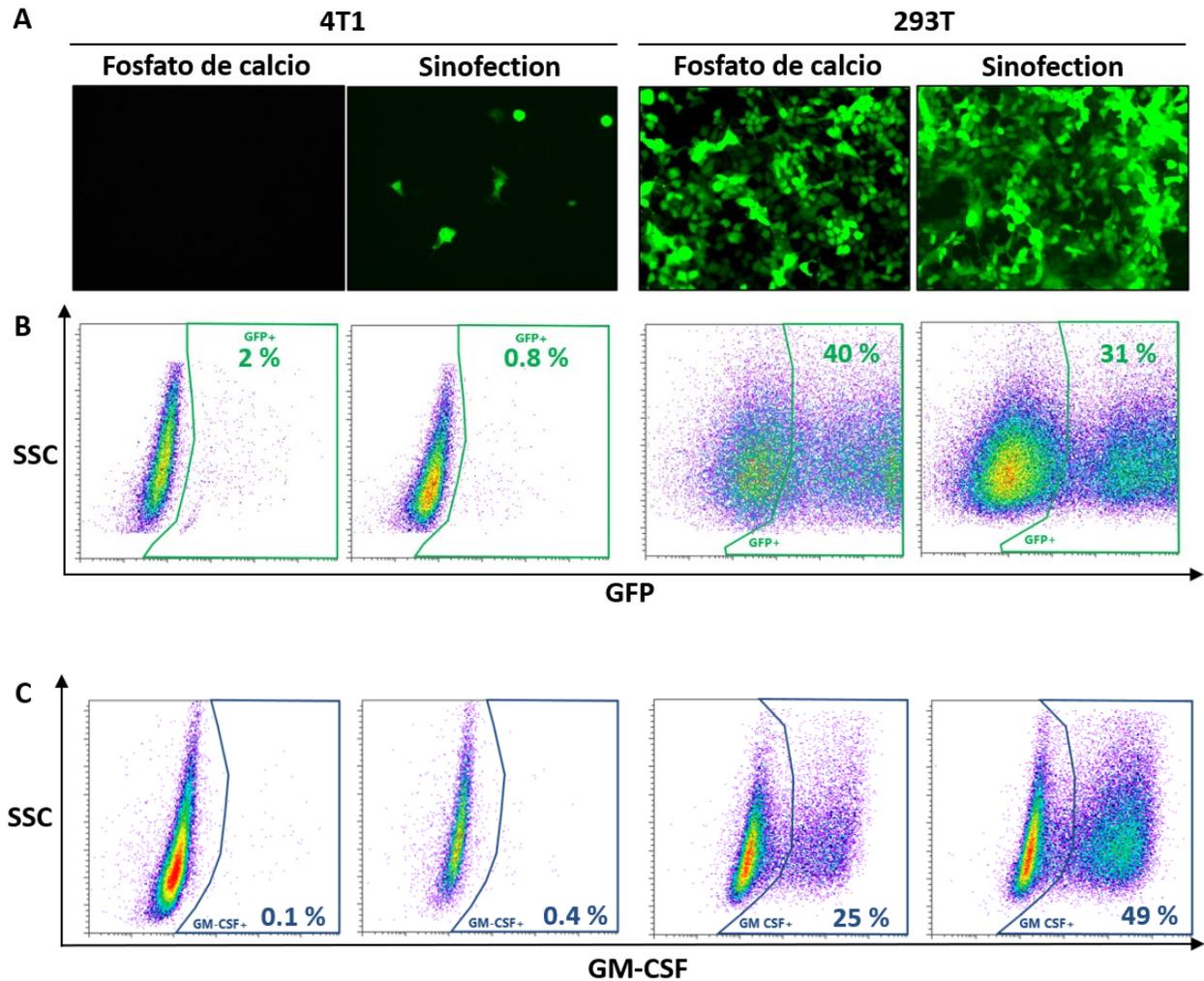


Figura 7. Células 4T1 y 293T transfectadas con GFP y GM-CSF. Se transfectaron células 4T1 y 293T con un plásmido para la expresión de la GFP (A, B) o GM-CSF (C) con el método de fosfato de calcio o con Sinofection. Dos días después se evaluó la expresión de la GFP por microscopía de fluorescencia (A) y por citometría de flujo (B). La expresión de GM-CSF fue analizada por tinción intra-celular y citometría de flujo (C). Los resultados se muestran con fotografías representativas (A) o por grafica de densidad en los cuales se indican el porcentaje de células positivas por GFP o GM-CSF (B, C).

Después de la transfección, las células fueron seleccionadas con higromicina. Para determinar la concentración de higromicina que elimina a las células no transfectadas, se realizó previamente una curva de mortalidad en células 4T1 con concentraciones de higromicina de 50 hasta 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$, incluyendo un control negativo (sin higromicina; Figura 8A). El registro de confluencia durante 10 días muestra que, incluso la concentración de higromicina más baja (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$) elimina a las células sin resistencia a los 9 días (Figura 8B). La curva de mortalidad muestra que al día 8, la confluencia de todas las células disminuyó a menos del 40 % (Figura 8B), por lo que se decidió tomar la concentración más baja para seleccionar células transfectadas.

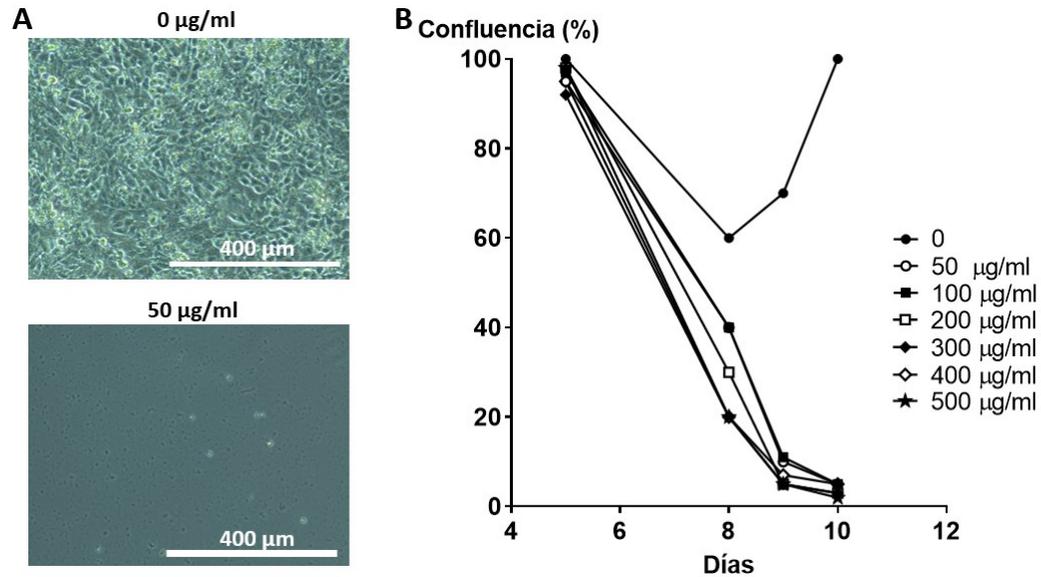


Figura 8. Concentración mínima de higromicina que elimina células 4T1. A células 4T1 en cultivo se les agregó diferentes concentraciones de higromicina (50 a 500 µg/ml), realizando cambios de medio con antibiótico cada 3 días, realizando también un registro fotográfico; **(A)** fotografías representativas de campos con células 4T1 100% confluentes y con restos de células 4T1. **(B)** los resultados se presentan como la confluencia en porcentaje registrada desde el día 5 hasta el día 10 de tratamiento con higromicina.

Después de mantener a las células transfectadas en selección con higromicina durante 10 días, se observó su fluorescencia nuevamente. En el caso de células 293T, se encontraron células fluorescentes en todos los campos, mientras que en células 4T1 se presenta el único campo con células brillantes (Figura 9A).

Las células transfectadas con GFP y GM-CSF se analizaron por citometría de flujo, encontrándose que la población de células 293T GFP⁺ aumento hasta 82 %, en caso contrario, las células 4T1 GFP⁺ disminuyeron hasta 0.01% (Figura 9B). Por otro lado, los resultados de la transfección con GM-CSF mostraron que la población de células 293T disminuyo a 21 % y la población de células 4T1 aumento a 78% (Figura 9C). Las células 4T1 transfectadas con GM-CSF se expandieron en placas Petri de 15 cm de diámetro para multiplicar el número de células. Se obtuvieron 129 millones de células y fueron llamadas 4T1^{GM-CSF}.

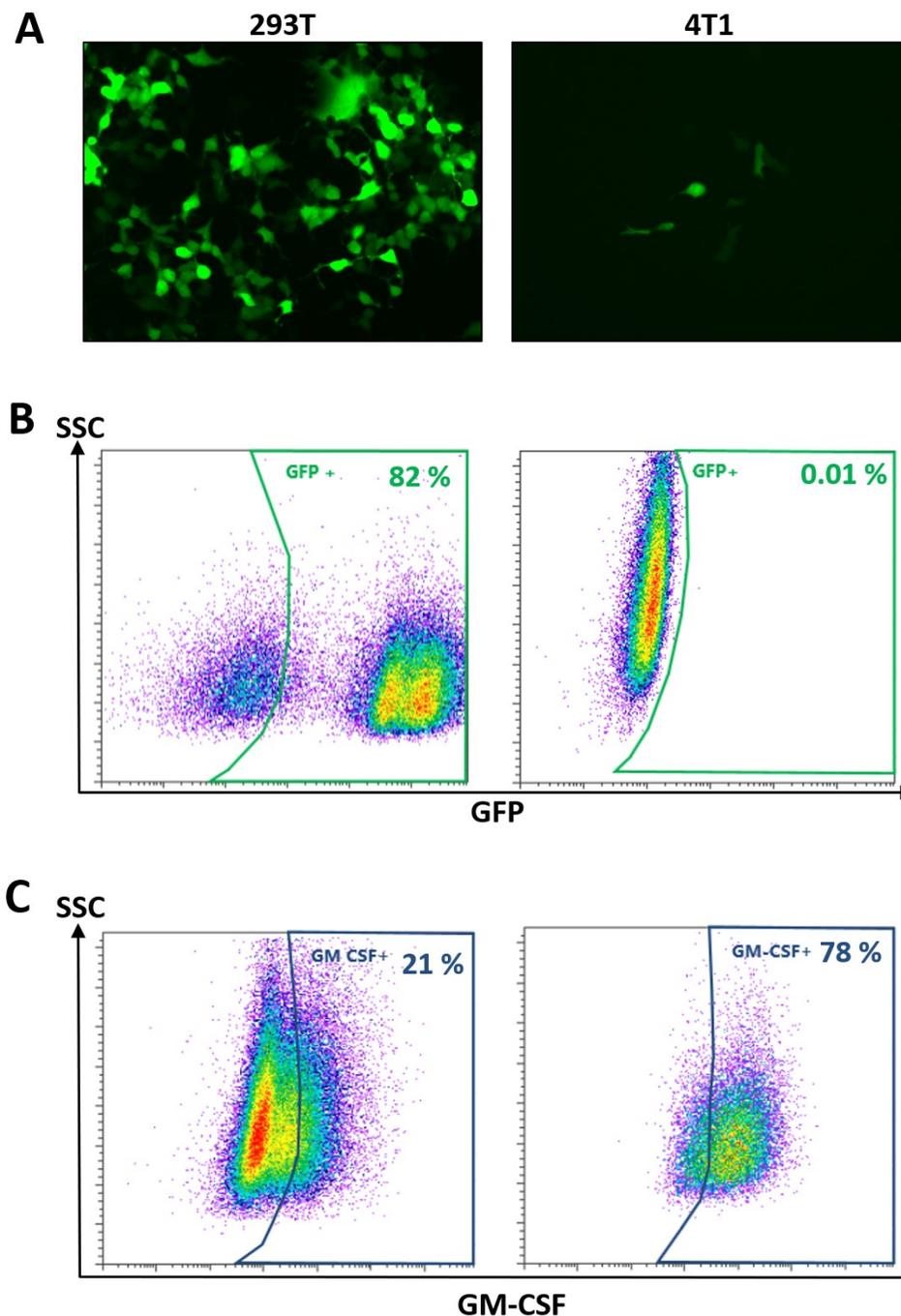


Figura 9. Transfección de células 293T y 4T1 con el plásmido de GFP y GM-CSF después de la selección con higromicina. Se transfectaron células 4T1 y 293T con un plásmido de GFP (**A**, **B**) o GM-CSF (**C**) y se seleccionaron durante 10 días con higromicina. Posteriormente se evaluó la expresión de GFP por microscopía de fluorescencia (**A**) y por citometría de flujo (**B**). La expresión de GM-CSF se analizó por tinción intracelular y citometría de flujo (**B**, **C**). Los resultados después de la selección se muestran en fotografías representativas (**A**) o por gráficas de densidad donde se indica el porcentaje de células positivas para GFP o para GM-CSF (**B**, **C**).

3.1.2 Preparación de células 4T1 derivadas de tumores ortotópicos de ratones

Considerando las diferencias entre las condiciones *in vitro* y en el ambiente tumoral, es probable que las células cancerosas no produzcan las mismas proteínas en ambas condiciones. Es posible que tengan perfiles antigénicos diferentes, por esta razón preparamos células 4T1 derivadas de tumores en ratones.

Se provocó el crecimiento de tumores en la glándula mamaria de ratones, se obtuvo el registro del crecimiento de los tumores, mostrando el volumen de cada uno durante 19 días (Figura 10A). En los resultados se puede observar que después de 15 días los tumores aumentan su tamaño, por lo que es necesario esperar al menos 20 días para la disección de los tumores.

Para obtener células individuales, los tumores diseccionados fueron digeridos con colagenasa y DNasa (Figura 10B). Adicionalmente se evaluó la relación entre número de células obtenido, con el tamaño de los tumores, mostrando una correlación positiva entre estos parámetros con una $P < 0.05$ (Figura 10C). Este resultado indica que hay un aumento en el número de células cuando los tumores son más grandes. Finalmente se obtuvieron 176 millones de células nombradas células 4T1^{tumor}.

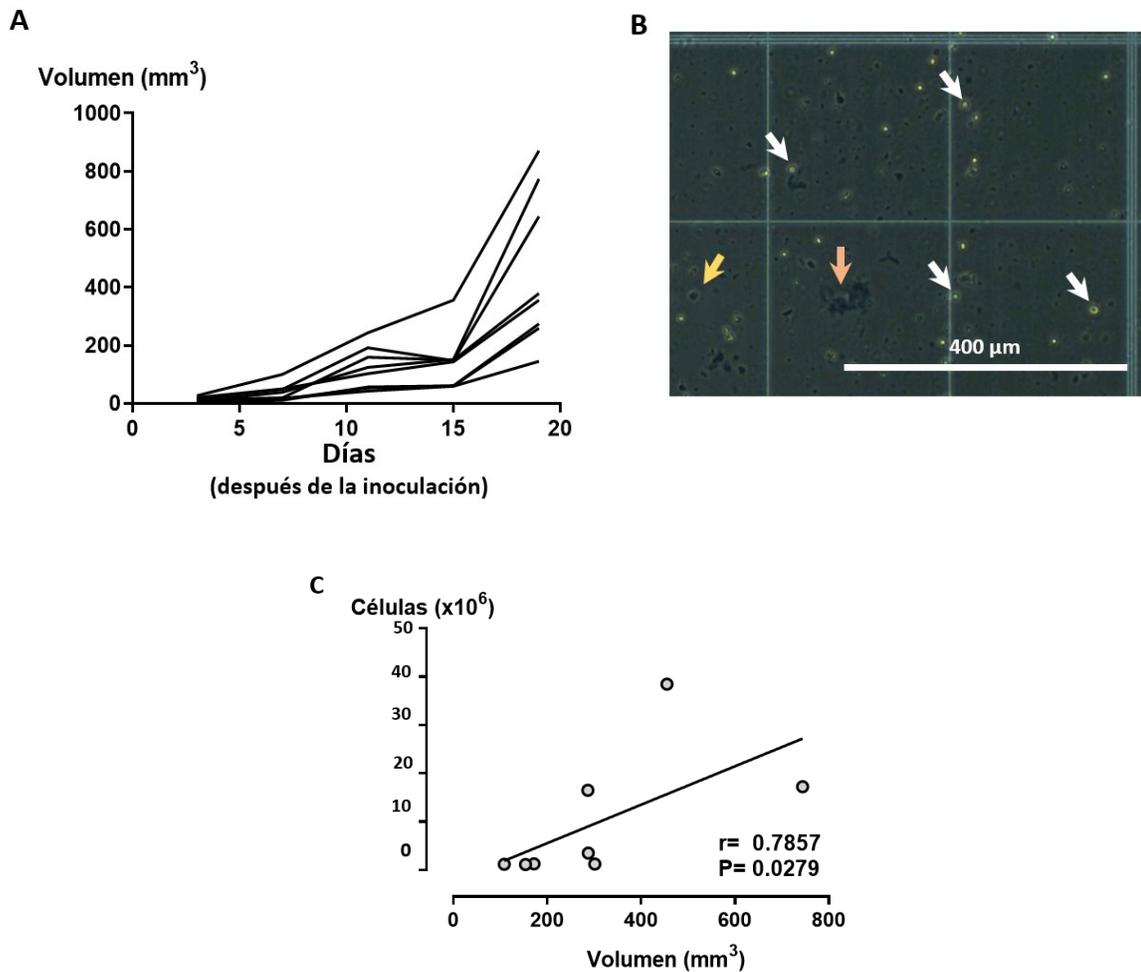


Figura 10. Obtención de células 4T1 tumorales. Se inocularon células 4T1 en la glándula mamaria de ratones hembra Balb/C (n=8), (A) el crecimiento de los tumores fue registrado cada 4 días hasta la eutanasia, los resultados se representan como el aumento del volumen después 19 días de crecimiento. (B) Se obtuvieron células individuales de tumores frescos, y se contaron en una cámara de Neubauer, en la fotografía se señalan células muertas (flecha amarilla), residuos (flecha naranja) y células vivas (flechas blancas). (C) Se realizó la correlación entre el volumen del tumor y el número de células (análisis de correlación de Spearman).

3.1.3 Preparación de vacunas

Una vez obtenidos los tres tipos de células, se realizó la formulación de nueva preparación de las vacunas. Para ello las células 4T1^{parental}, 4T1^{GM-CSF} y 4T1^{Tumor} se lisaron o se fijaron con paraformaldehído o glutaraldehído. Estos fijadores se utilizan para estabilizar las moléculas de la superficie celular o como excipientes de inactivación de antígenos. Se obtuvo el número de células necesario para realizar los siguientes experimentos (Tabla 1).

Tabla 1. Preparaciones de vacunas. Número de células preparadas, según el tipo de célula y el tipo de preparación. Se obtuvieron 9 preparaciones de vacunas.

	Lisadas	Paraformaldehído	Glutaraldehído
4T1 ^{parentales}	88x10 ⁶	55x10 ⁶	75x10 ⁶
4T1 ^{GM-CSF}	34x10 ⁶	61x10 ⁶	34x10 ⁶
4T1 ^{tumor}	22x10 ⁶	127x10 ⁶	27x10 ⁶

3.2 Evaluación *in vitro* de los efectos de las formulaciones de vacunas en células dendríticas

Se evaluó la eficiencia de activación de las preparaciones de vacunas *in vitro* en CD, ya que son las primeras células en internalizar y procesar antígenos antes de presentarlos a los linfocitos. Para ello fue necesario determinar la mejor fuente de CD.

3.2.1 Células dendríticas primarias de ratones

Primero se analizaron células primarias; se colectaron células de bazo, médula ósea (MO) y CMSP de un ratón Balb/C para detectar el número de CD en cada tejido, después fueron analizadas por citometría. Para confirmar los resultados, este experimento se realizó dos veces; en ambos se puede observar que el tejido con mayor proporción de CD es el bazo, en comparación con la médula ósea y CMSP. Además, se observó una disminución de CD en bazo en el segundo experimento (Figura 11).

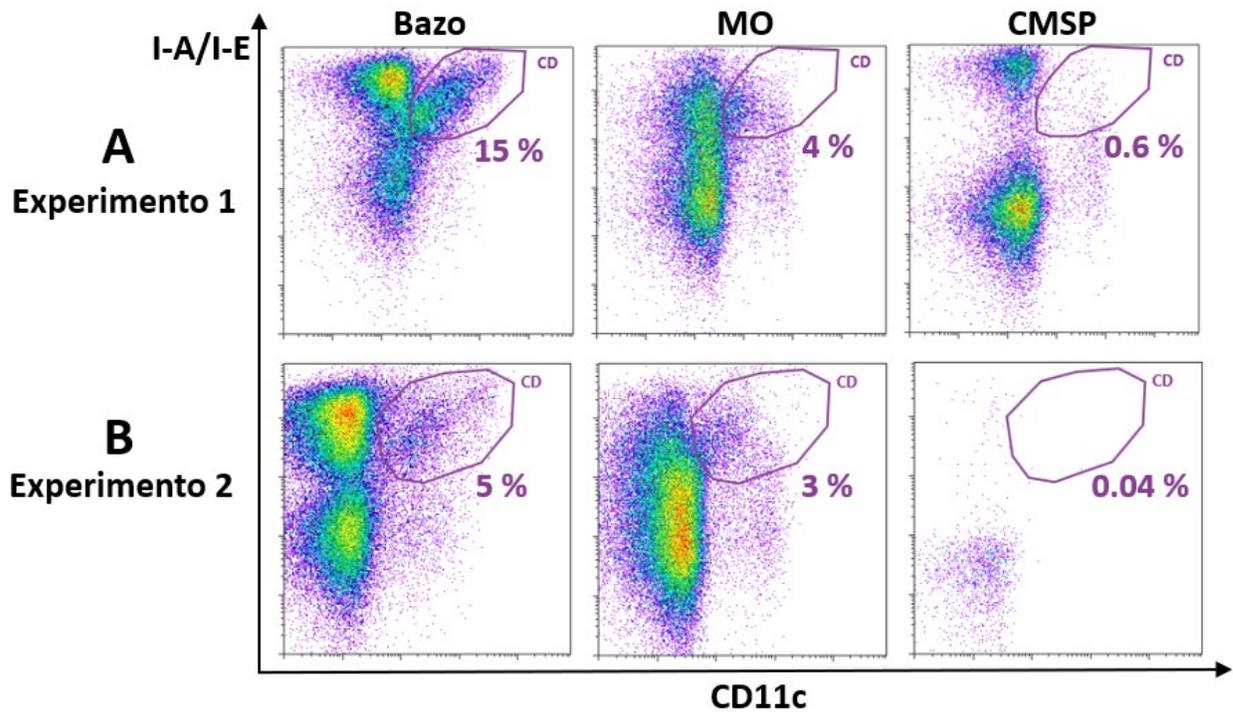


Figura 11. Detección de células dendríticas convencionales en tres tejidos de ratones Balb/C. Se prepararon células de bazo, médula ósea (MO) y células mononucleares de sangre periférica (CMSP), de ratones hembra. Para detectar células dendríticas (CD), se evaluaron por citometría de flujo y son presentadas en gráficas de puntos con el porcentaje de CD presentes. En el panel **A** se observan los resultados del primer experimento realizado y en el panel **B** se observan los resultados de la repetición del experimento. Los marcadores para la detección de CD convencionales son CD11⁺, I-A/I-E⁺.

3.2.2 Células dendríticas diferenciadas de médula ósea *ex vivo*

Por otro lado, se llevó a cabo la obtención de CD *ex vivo*. Se colectaron células de médula ósea de ratón y se cultivaron con o sin medio RPMI suplementado con GM-CSF y IL-4 para inducir la diferenciación de CD. Se muestra el registro fotográfico representativo del primer día de cultivo (día 0), donde podemos observar campos con células morfológicamente idénticas en ambos grupos; después de ocho días, las células sin medio de diferenciación murieron, en cambio se observaron cambios morfológicos, como células estrelladas o de mayor tamaño en células tratadas (Figura 12A). Las células diferenciadas se analizaron por citometría de flujo y se identificaron porcentajes de CD de hasta 84% (Figura 12B).

Al comparar los porcentajes de CD cultivadas *ex vivo* (84%) contra las CD primarias (15%) decidimos usar el método con mayor porcentaje de CD detectado para los experimentos posteriores.

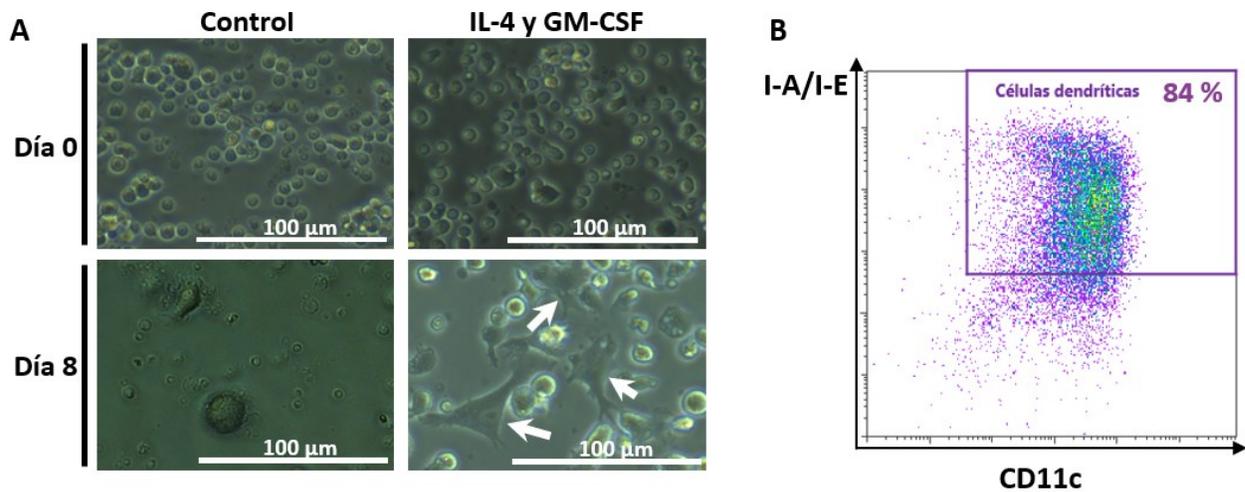


Figura 12. Inducción de la diferenciación de células dendríticas convencionales *ex vivo* a partir de células de médula ósea. Se cultivaron células de médula ósea de ratón en placas de 48 pozos con o sin IL-4 y GM-CSF (medio de diferenciación) durante 10 días. **(A)** Los resultados se muestran en fotografías representativas del día 0 y del día 8, donde se señalan células diferenciadas. **(B)** Después de 10 días las células se analizaron por citometría de flujo con los marcadores CD11⁺, I-A/I-E⁺, y se representan en la gráfica de puntos con el porcentaje de células dendríticas detectadas.

3.2.3 Evaluación del efecto de las vacunas en células dendríticas por citometría de flujo

Se realizó la evaluación de las preparaciones de vacunas para determinar el porcentaje de CD activadas. Las preparaciones de vacunas se pusieron en contacto con las CD durante 24 horas. Como control se usó PBS (control -) y LPS (control +), después se procedió al análisis de las muestras por citometría de flujo. Las CD activadas expresan moléculas de coactivación CD80 y CD86, por lo que para detectarlas se usaron los anticuerpos anti-CD80 y anti-CD86.

La Figura 13B, muestra la detección de las preparaciones de vacunas fijadas con glutaraldehído (4T1^{parental}GL, 4T1^{tumor}GL y 4T1^{GM-CSF}GL) que presentaban el porcentaje más alto de CD activadas, en comparación con los tratamientos de células fijadas con paraformaldehído o lisados (Figura 13B).

Para comprobar que las preparaciones de vacunas fijadas con glutaraldehído activaron a las CD y no eran células 4T1 auto-fluorescentes, realizamos preparaciones de células de MO, células 4T1 y células 4T1 fijadas con glutaraldehído (4T1-GL). Estas preparaciones fueron analizadas por citometría de flujo. Los resultados muestran las poblaciones de los tres diferentes tipos de células por separado, con los marcadores de CD y CD activadas (Figura 14A). Realizamos también una preparación de células de MO

combinadas con células 4T1 (MO+4T1) y células de MO con células 4T1 fijadas con glutaraldehído (MO+4T1-GL). En estas combinaciones podemos observar ambas poblaciones de células en un mismo gráfico, en estos resultados detectamos que las poblaciones de células 4T1-GL presentan auto fluorescencia, similar a las CD activadas (Figura 14B).

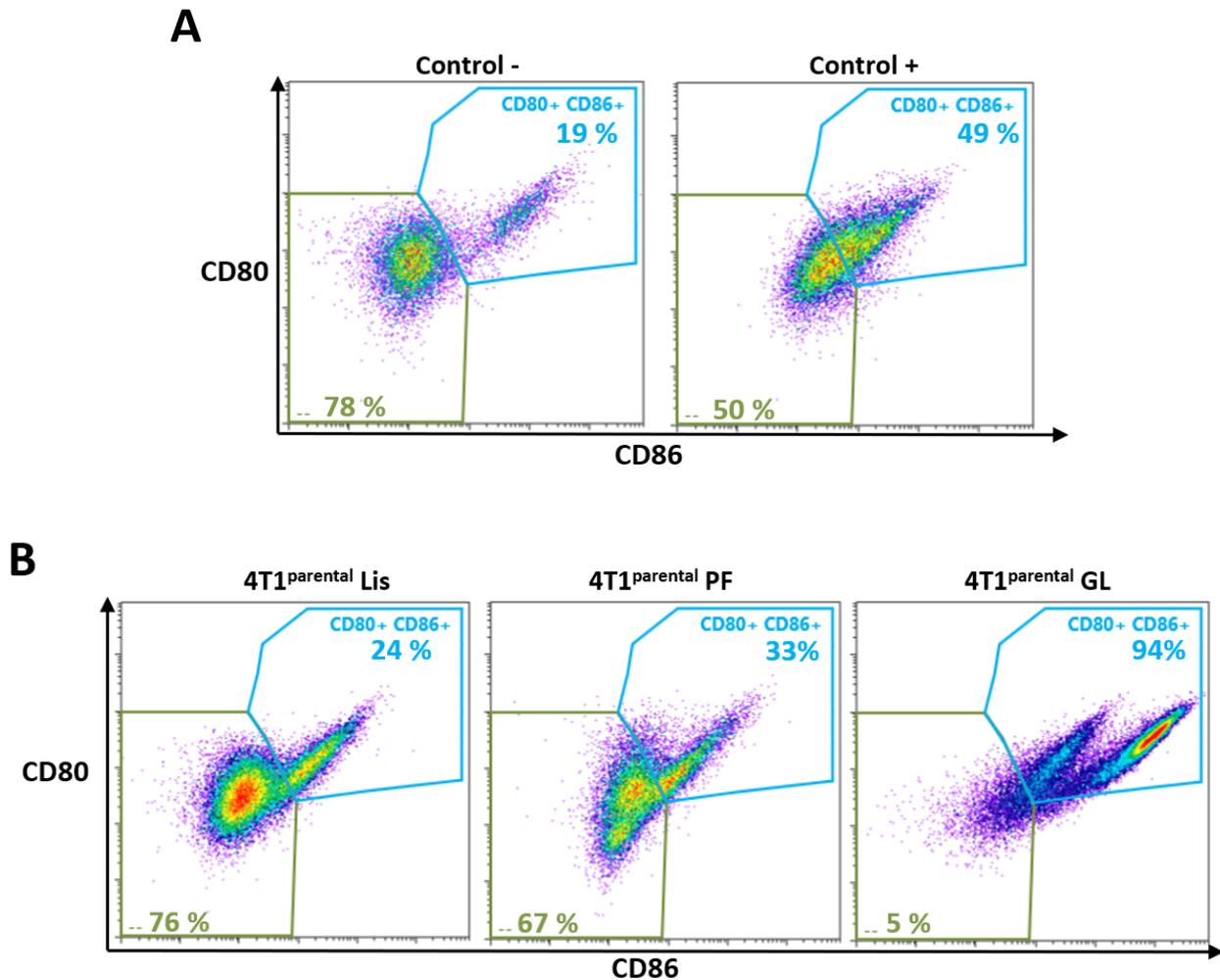


Figura 13. Visualización de células dendríticas activadas por citometría de flujo. Células de médula ósea cultivadas *ex vivo* se pusieron en contacto con las 9 vacunas 24 horas antes de ser analizadas por citometría de flujo, los resultados se presentan en gráficas de puntos representativas. En el panel **A** se observa el control negativo (PBS) y el control positivo (LPS), en el panel **B**, se muestran resultados de activación de las vacunas con células parentales 4T1. Los porcentajes de células dendríticas activadas (CD80⁺ y CD86⁺) y no activadas (--) se muestran en azul y verde respectivamente.

Por otro lado, los resultados que se obtuvieron en la activación de CD por las preparaciones de células lisadas y de células fijadas con paraformaldehído, no mostraron porcentajes de activación mayores al de

CD tratadas con LPS (Figura 13). Finalmente, los porcentajes de CD activadas con las preparaciones 4T1^{parental} Lis, 4T1^{parental}PF, 4T1^{GM-CSF} Lis, 4T1^{GM-CSF}PF, 4T1^{tumor}Lis y 4T1^{tumor}PF, no mostraron resultados consistentes en los experimentos realizados (resultados no mostrados).

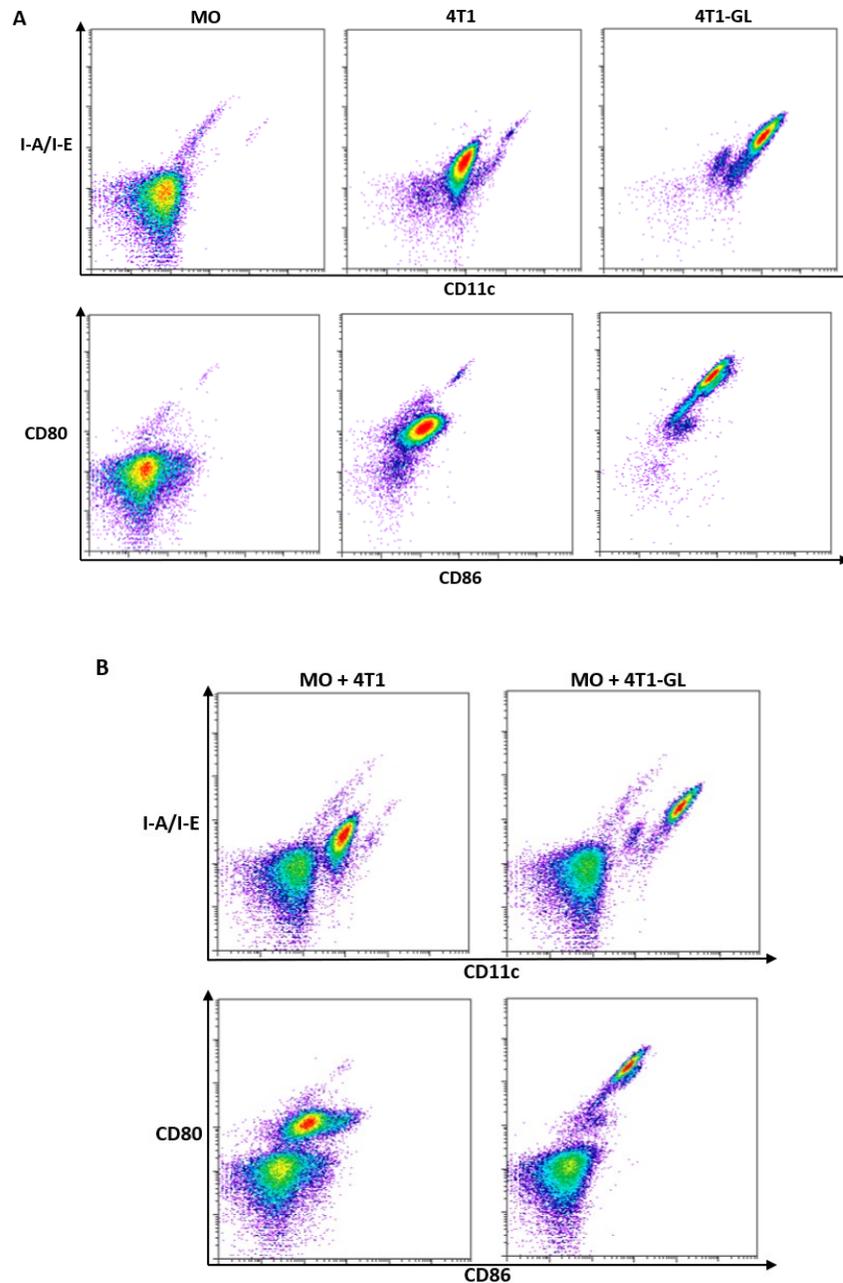


Figura 14. Auto fluorescencia de células 4T1. (A) Se analizaron células de médula ósea (MO), células 4T1 y células 4T1 fijadas con glutaraldehído (4T1-GL) por citometría de flujo, los resultados se muestran en gráficas de puntos donde se pueden observar las 3 poblaciones de células. (B) Se analizaron células de MO con células 4T1 y células de MO con células 4T1-GL, para detectar auto fluorescencia de las células 4T1 y 4T1-GL con respecto a la población de células de médula ósea. En ambos casos se simuló la detección de células dendríticas (I-A/I-E y CD11c) y su activación (CD80 y CD86).

Por lo tanto, debido a la inconsistencia de los resultados y el problema de células 4T1-GL auto fluorescentes, se decidió evaluar el efecto de las vacunas en la activación de CDs midiendo la expresión de genes por RT-qPCR.

3.2.4 Evaluación del efecto de las vacunas en células dendríticas *in vitro* por expresión de genes de activación

Para evaluar la activación de las CDs por las preparaciones de vacunas por RT-qPCR, se seleccionaron dos genes, el primero *Cd80* por su papel en la coactivación de linfocitos T (LT) y *Ccr7* por su papel clave en la localización de LT en los nódulos linfáticos por parte de CD maduras.

Las muestras se procesaron a partir de la extracción de ARN total de CD puestas en cultivo con las vacunas; Se obtuvo ARN (DO 260/280) en concentraciones mayores a 50ng/ μ L (Tabla 2); se comprobó la integridad del ARN por electroforesis de las 11 muestras obtenidas, donde se pueden observar bandas nítidas y bien separadas (Figura 15).

Tabla 2. Extracciones de ARN para evaluar la activación de células dendríticas por RT qPCR. Se cultivaron células dendríticas *ex vivo* con las preparaciones de las vacunas por 24 horas. Se realizó la extracción de ARN usando el RNeasy Plus Mini kit obteniendo buenas concentraciones de ARN.

Tratamiento	ARN (ng/ μ L)	DO _{260/280nm}
Control -	177.1	2.09
Control +	198.8	2.07
4T1 ^{parental} Lis	101.1	2.12
4T1 ^{parental} PF	77.3	2.10
4T1 ^{parental} GL	103.2	2.11
4T1 ^{GM-CSF} Lis	196.0	2.08
4T1 ^{GM-CSF} PF	215.1	2.09
4T1 ^{GM-CSF} GL	217.6	2.09
4T1 ^{tumor} Lis	145.9	2.09
4T1 ^{tumor} PF	206.5	2.09
4T1 ^{tumor} GL	230.1	2.09

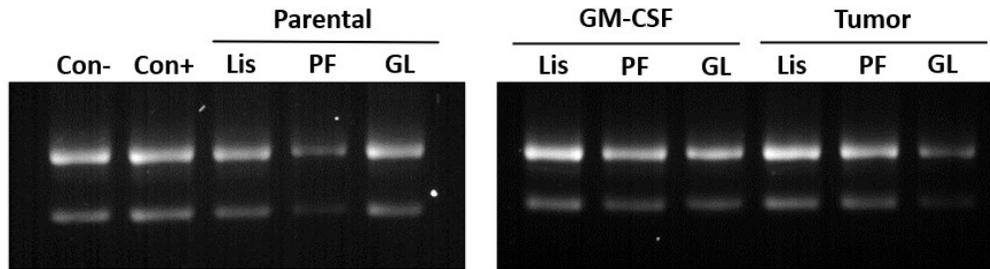


Figura 15. ARN obtenidos de células dendríticas con las vacunas. Se comprobó la integridad del ARN de las muestras por electroforesis en un gel de agarosa, los resultados se muestran en imágenes de todas las muestras obtenidas de los tratamientos aplicados a CD.

Una vez comprobada la integridad de las muestras, se realizó la retrotranscripción para obtener ADN complementario (ADNc). Posteriormente se realizó el análisis del ADNc por RT-qPCR, para validar la expresión de los genes *Cd80* y *Ccr7*.

En los resultados, lo primero que podemos observar es el número de ciclos con respecto a la fluorescencia en unidades arbitrarias, es decir, la expresión de *Cd80* inicia entre los 22 y 28 ciclos de reacción de PCR (Figura 16A). Por otro lado, los valores del umbral de fluorescencia con respecto a la cantidad, se expresan en una curva estándar. De manera representativa, se muestra la curva estándar de *Cd80* con valores de eficiencia y r^2 que nos indican el buen rendimiento de la prueba de PCR (Figura 16B). La curva de fusión es un parámetro que nos muestra la temperatura donde el 50% de ADN es desnaturalizado y el pico muestra la expresión de un solo gen, en el caso de *Cd80* la curva inicia en 77 °C y finaliza en 82 °C, siendo 80 °C el pico de desnaturalización (Figura 16C). Finalmente se muestra el gel de electroforesis de *Cd80* donde corroboramos que los oligonucleótidos presentes en el gene (Figura 16D). Solo se muestran los resultados representativos de *Cd80*.

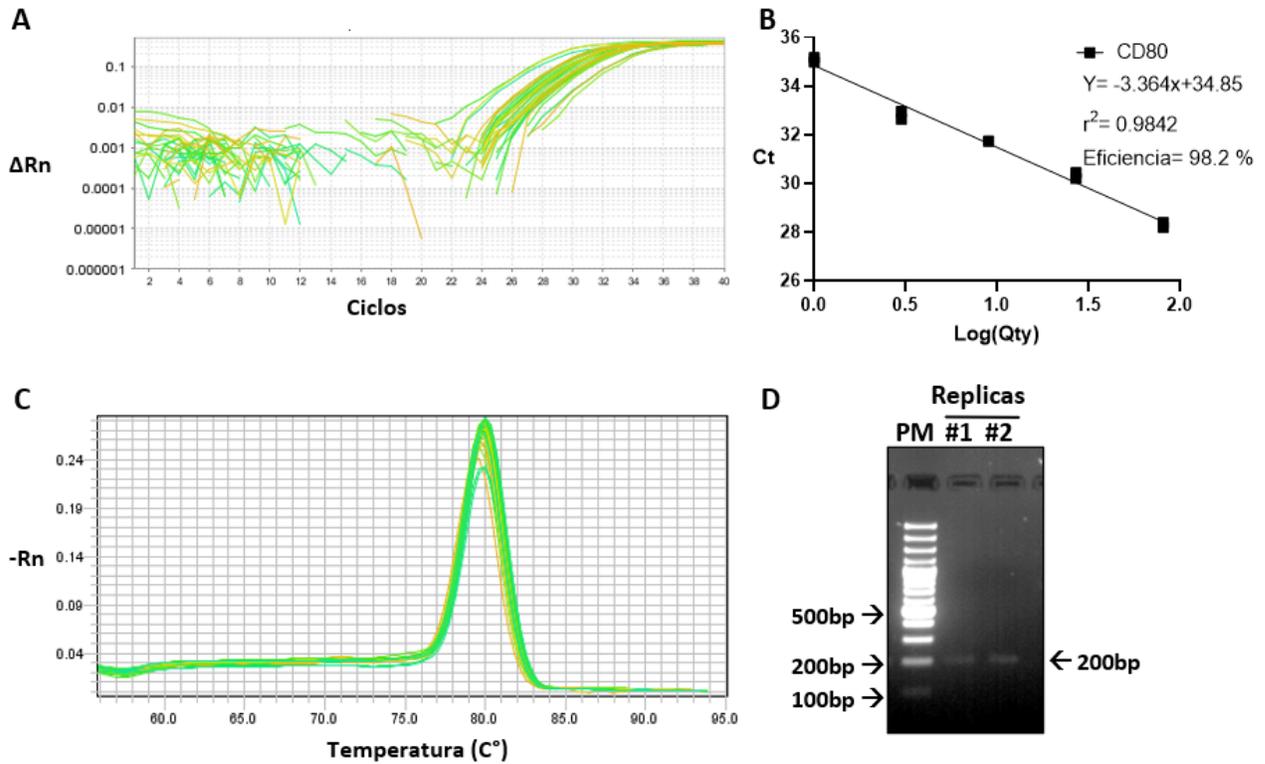


Figura 16. Amplificación y validación de los productos de RT qPCR para la evaluación de vacunas *in vitro*. (A) Se realizó la verificación de los oligonucleótidos de CD80, CCR7 con ADNc por triplicado por RT qPCR. (B) Se observa la curva estándar donde se muestran las concentraciones relativas de ADNc, con diluciones de 1-81 y un control negativo y los valores de CT. (C) Curva de fusión de desnaturalización del producto de PCR. (D) Gel de agarosa con el producto de PCR de CD80 por duplicado.

Una vez que evaluamos la reacción de RT qPCR, se procedió al análisis de la expresión de *Cd80* y *Ccr7* en CD.

Se evaluaron los resultados de dos experimentos independientes. Las vacunas que tuvieron un aumento significativo en la expresión de *Cd80* con respecto al grupo sin tratamiento en ambos experimentos fueron, 4T1^{parental}PF, 4T1^{GM-CSF}Lis, 4T1^{GM-CSF}PF y 4T1^{tumor}GL (Figura 17A). Por otro lado, la expresión de *Ccr7* presentó un aumento significativo en todos los casos, excepto con la vacuna 4T1^{GM-CSF}GL del segundo experimento (Figura 17B).

Para reducir el número de ratones a utilizar en la evaluación de las vacunas en un modelo ortotópico de cáncer de mama, se seleccionaron únicamente tres vacunas. Esta selección se realizó por medio de la correlación de la expresión de *Cd80* y *Ccr7*. El resultado de esta relación nos indicó que las vacunas

4T1^{parental} PF, 4T1^{GM-CSF}PF y 4T1^{tumor}PF tuvieron un mejor desempeño y reproductibilidad en cada experimento (Figura 17C).

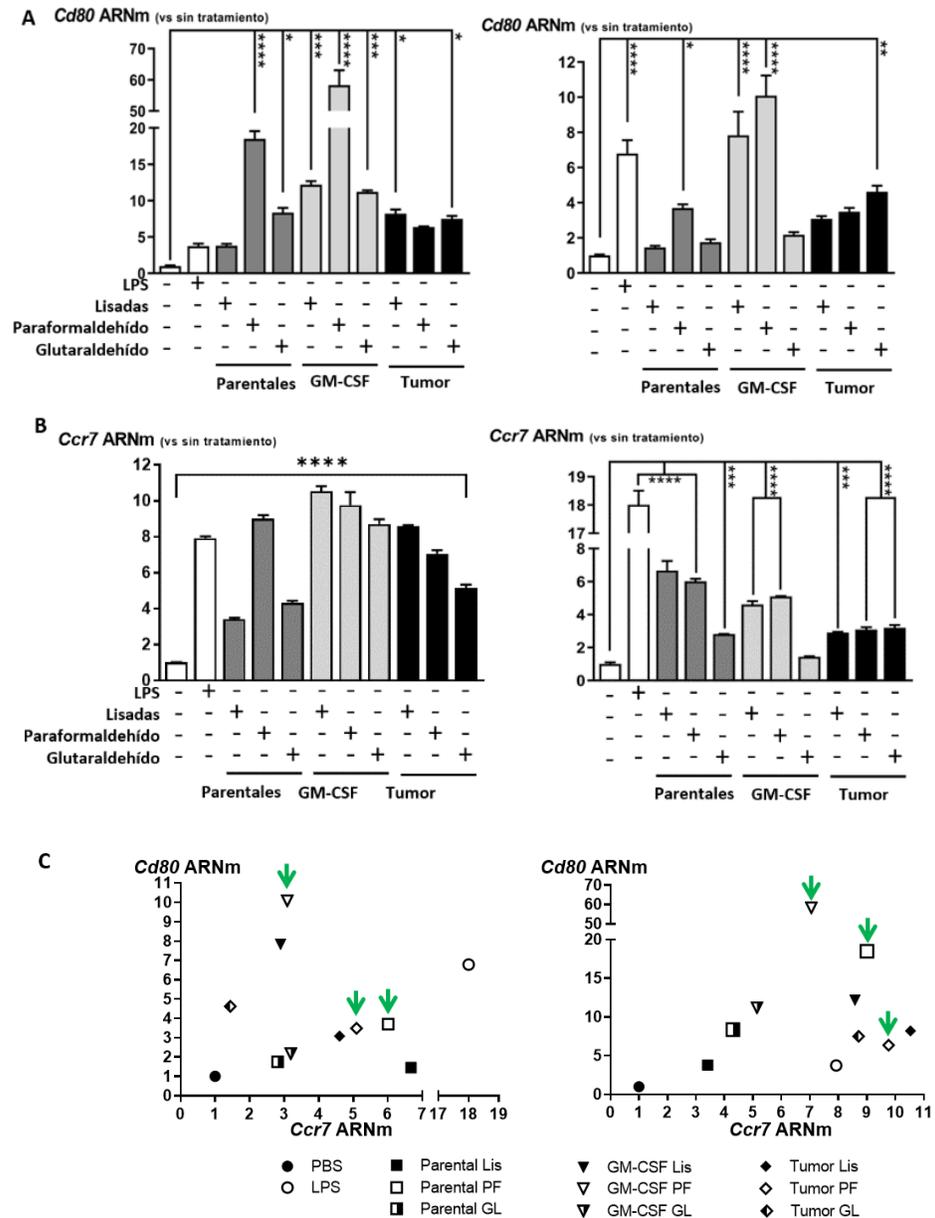


Figura 17. Evaluación de la activación de células dendríticas por RT-qPCR y selección de las preparaciones con mayor activación. Los resultados se presentan como la expresión de **(A)** CD80 en y la expresión de **(B)** CCR7 en dos experimentos de activación de células dendríticas, por triplicado. Los resultados son presentados como el promedio de la expresión (\pm EE). * $P < 0.05$, ** $P < 0.005$, *** $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$ usando un ANOVA de 1-vías y una prueba post-hoc de Tukey. **(C)** Las preparaciones de vacunas con mayor expresión de CD80 y CCR7 fueron seleccionadas para probar en un modelo *in vivo* (flecha verde).

3.3 Caracterización del efecto antitumoral de las vacunas en un modelo ortotópico de cáncer de mama.

Para investigar los efectos antitumorales de las vacunas, se usó un modelo de cáncer de mama con ratones Balb/C hembras. Se asignaron 5 tratamientos (n=6); el control negativo (PBS), el control positivo (Adyuvante de Freund) y las tres preparaciones de vacunas que elevaron más la expresión de CD80 y CCR7.

Los ratones fueron inmunizados los días -21, -14, -7 (profiláctico) y 7 (terapéutico). El día 0 se realizó la inoculación de células 4T1 en la mama.

Los resultados nos muestran que los pesos de los ratones inmunizados con las vacunas, no cambiaron significativamente durante el experimento con respecto a los grupos control (Figura 17A). También se registró el aumento del volumen de los tumores y se observó que no hay diferencia significativa entre tratamientos (Figura 17B). Los tumores se colectaron y pesaron. No se encontraron diferencias en el volumen y peso de los tumores entre tratamientos y que en los grupos control los datos se encuentran más dispersos (Figura 18C). Estos resultados muestran que no hay respuesta en la disminución del tamaño del tumor ante el tratamiento profiláctico.

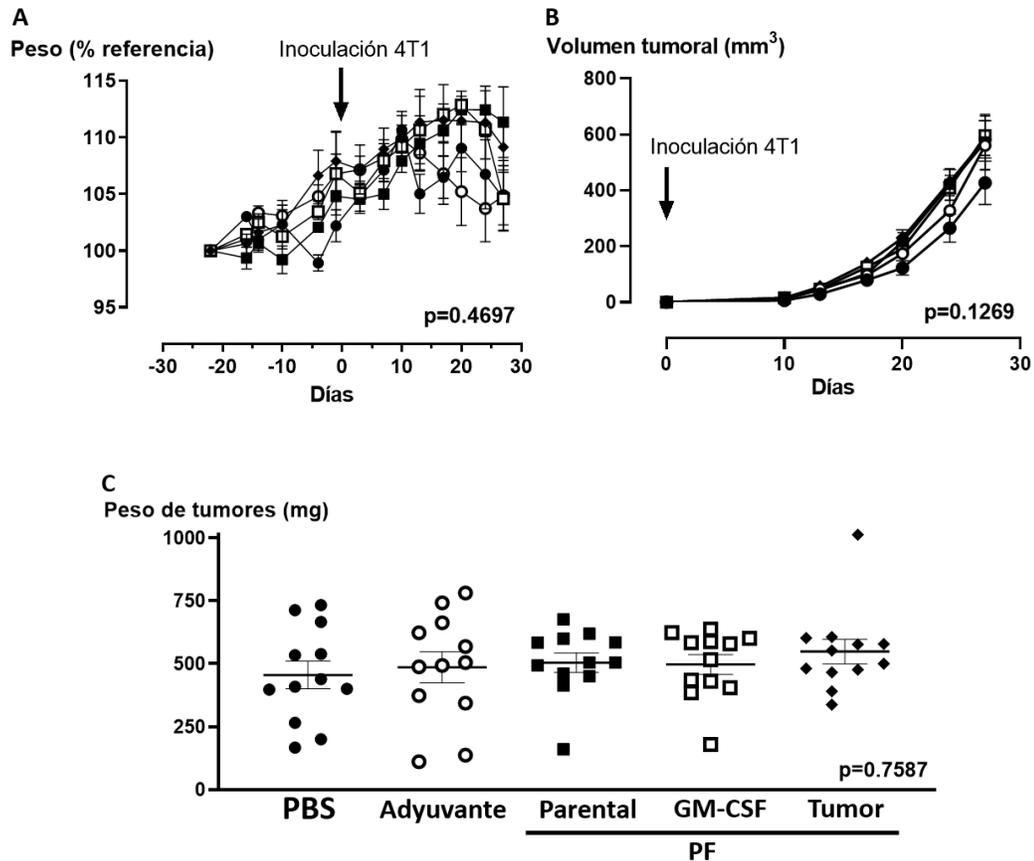


Figura 18. Efecto anti-tumoral de vacunas contra el cáncer de mama en un modelo murino. Grupos de ratones hembra Balb/C ($n=6$) fueron inmunizados de manera profiláctica y terapéutica con las vacunas $4T1^{\text{parental}}\text{PF}$, $4T1^{\text{GM-CSF}}\text{PF}$ y $4T1^{\text{tumor}}\text{PF}$; se usó PBS y adyuvante de Freund como controles. El día 0 los ratones fueron inoculados con células 4T1 en dos glándulas mamarias. **(A)** Se tomó el peso de los ratones cada cuarto día durante 27 días y el resultado se expresa en promedio de los porcentajes de variación de peso con respecto al peso inicial. **(B)** Se midió el tamaño del tumor después de la inoculación hasta la eutanasia, los resultados se expresan en promedio de volumen tumoral (mm^3). **(C)** Se tomó el peso final de los tumores y se expresa como el promedio del peso por tratamiento. Se usó ANOVA de 1- y 2 vías y pruebas post-test de Dunnett.

Posteriormente se usó la prueba de ELISA para determinar la concentración de anticuerpos anti-4T1 en el plasma de los ratones. Se tomaron muestras de plasma antes y después de aplicar los tratamientos. La comparación entre tratamientos nos indica que los anticuerpos específicos contra células 4T1 del tratamiento con $4T1^{\text{parental}}\text{PF}$ se elevaron con respecto al grupo PBS, sin embargo, la diferencia no es significativa. Los resultados entre de los grupos tratados antes y después de la vacunación, muestran que los anticuerpos anti-4T1 en los tratamientos $4T1^{\text{parental}}\text{PF}$ y $4T1^{\text{tumor}}\text{PF}$ se elevaron comparación con los anticuerpos detectados antes de iniciar los tratamientos de inmunización (Figura 19). Lo que nos indica una respuesta humoral mayor en los ratones inmunizados con vacunas $4T1^{\text{parental}}\text{PF}$ y $4T1^{\text{tumor}}\text{PF}$.

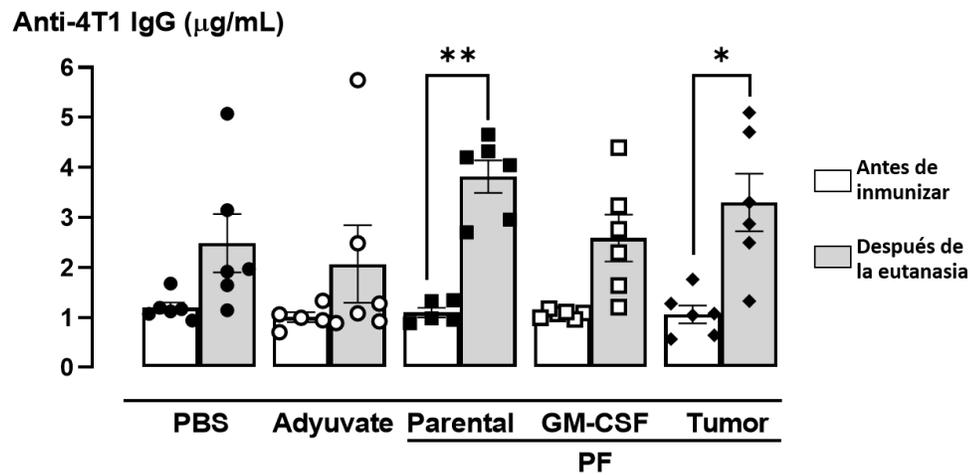


Figura 19. Respuesta humoral provocada por las vacunas en cáncer de mama murino. Se colectaron células de sangre periférica de ratones antes de inmunizar y después de la eutanasia, se separó el plasma sanguíneo y fue analizado por medio de ELISA, los resultados se muestran como la concentración de anticuerpos anti-4T1 IgG, en dos puntos temporales por tratamiento. Tumor PF, $P= 0.05$; Parental PF, $P= 0.01$, ANOVA de una vía con una prueba post-test de Tukey.

3.4 Compatibilidad del modelo de metástasis ósea con inmunización con vacunas autólogas

Una vez evaluadas las vacunas en cáncer de mama, se requiere pasar a un siguiente nivel de la enfermedad, en un modelo de metástasis ósea. Caracterizar las vacunas en un modelo de metástasis ósea en ratones requiere probar el modelo de metástasis ósea con respecto a la edad de los ratones, con los cuales se inicia el tratamiento a las seis semanas de edad.

Una vez que se aplica la primera inmunización pasan tres semanas para que los ratones sean inoculados con células 4T1 y así, provocar metástasis ósea. En este diseño profiláctico de vacunación, los ratones tendrían nueve semanas de edad al ser inoculados. Sin embargo, comunicaciones personales con otros investigadores en metástasis ósea, sugieren que los ratones más viejos desarrollan menos metástasis ósea en modelos de inoculación intracardiaca.

Para confirmar la información de otros laboratorios, se inocularon ratones hembra Balb/C de seis y nueve semanas de edad ($n= 7$) con células 4T1 de manera intracardiaca y los ratones se mantuvieron durante 10 días. No hubo diferencia de peso entre los grupos hasta el día cuatro, donde los ratones de nueve semanas ganaron peso, mientras que los ratones de seis semanas se mantuvieron en su peso. Entre los días siete y

nueve del experimento, los ratones de nueve semanas mantuvieron su peso, mientras que los ratones de seis semanas disminuyeron su peso significativamente (Figura 20A), lo que implica una salud deteriorada.

Posteriormente se realizó la colecta del fémur y la tibia de ambas patas de todos los ratones, y se hicieron radiografías para detectar presencia o ausencia de osteólisis. Las imágenes que se obtuvieron nos muestran que el 100 % de los ratones de seis semanas desarrollaron osteólisis en comparación a los ratones de nueve semanas, donde solo se detectaron lesiones en el 26 % (2/7) de los ratones (Figura 20B).

Estos resultados nos indican que, en los ratones viejos hay menos osteólisis que en ratones jóvenes. Por lo tanto, ratones de seis semanas de edad, se pueden inducir con metástasis ósea con mayor éxito.

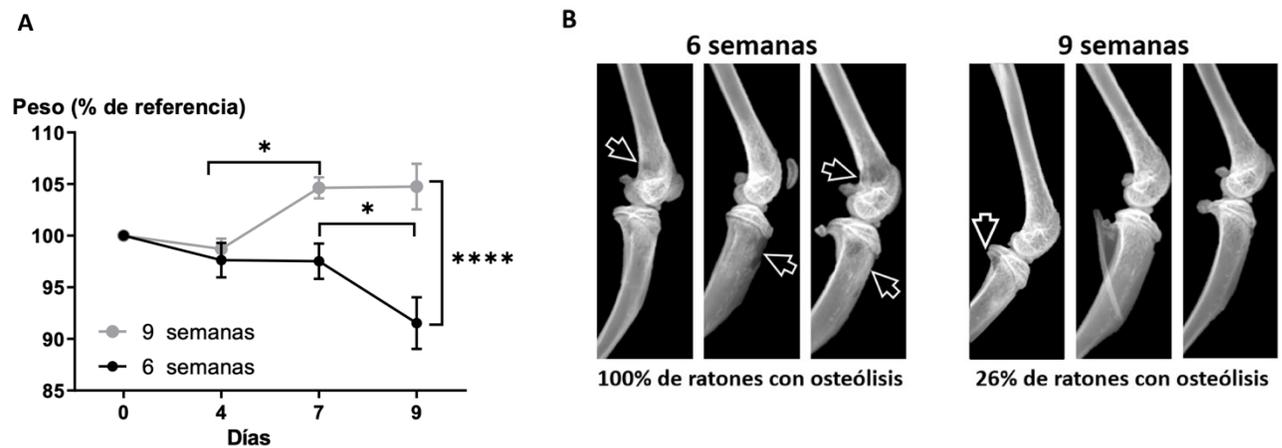


Figura 20. Osteólisis en ratones de seis y nueve semanas de edad. Se inocularon células 4T1 de forma intracardiaca a ratones hembra Balb/C de seis y nueve semanas de edad (n=7), (A) se registró el peso de los ratones y los resultados se presentan como el promedio de porcentajes con respecto al peso inicial, durante nueve días. Se realizó una prueba ANOVA de dos vías con una prueba post-test de Tukey ($P < 0.0001$; $P < 0.05$) (B) Las tibias y fémures de los ratones fueron colectados y se les realizó una radiografía; se muestran tres fotografías de cada grupo señalando con flechas negras el área de osteólisis.

Capítulo 4. Discusión

Las vacunas contra el cáncer son un tipo de inmunoterapia prometedora. En comparación con otras terapias como quimioterapias o radioterapias, las vacunas de células tumorales tienen una fuerte especificidad, amplio espectro antitumoral y ha tenido éxito en ensayos clínicos (Frankel, 2013). Sin embargo, también se han obtenido resultados decepcionantes, ya que el éxito de las vacunas depende de su formulación y de la estrategia terapéutica para cada tipo de cáncer (Vermaelen, 2019).

En este proyecto, seleccionamos células tumorales 4T1 completas modificadas, para formular vacunas autólogas. Para después caracterizar su efecto en contra del cáncer de mama y la metástasis ósea causada por las mismas células 4T1.

Para esto modificamos células 4T1 para que expresaran GM-CSF; se realizaron repeticiones de experimentos hasta darnos cuenta que los métodos de transfección seleccionados no eran ideales para las células 4T1, ya que los porcentajes de células transfectadas fueron bajos. También corroboramos que la transfección por fosfato de calcio o Sinofection en células 4T1 con el plásmido de GFP es ineficiente, ya que las células pierden la fluorescencia después de 10 días de selección con higromicina. Otros investigadores detectaron la misma dificultad para transfectar células 4T1, por lo que optan por otros métodos con mayor eficiencia como transducción lentiviral (Quezada et al., 2006) o realizan una transfección con baja eficiencia, y mantienen a las células en selección hasta por tres semanas hasta obtener el 100 % de células transfectadas (Gao-Gao et al., 2011). A pesar de las dificultades, por medio del mantenimiento de las células en selección con el antibiótico se logró tener la transfección del 78 % de células 4T1 con GM-CSF.

Por otro lado, obtuvimos nueve formulaciones de vacunas para probar su efecto en la activación de CD *in vitro*, con la finalidad de elegir a las tres mejores vacunas para aplicar en un modelo *in vivo*. En estos resultados se detectó que las preparaciones fijadas con glutaraldehído mostraban una población de célula activada, más que las células 4T1 no fijadas. Esta población de células nos hizo sospechar que las células 4T1 presentaban auto fluorescencia. Esto quedó confirmado al comparar las poblaciones de células individualmente (CD, 4T1 y 4T1-GL), mostrando a la población de células 4T1-GL en posición similar a las CD de médula ósea activadas por las vacunas preparadas con glutaraldehído. Anteriormente se reportaron problemas en células fijadas con glutaraldehído, por lo que se realizó un estudio para saber si células de ojo de cangrejos fijadas con glutaraldehído emitían fluorescencia, determinando que parámetros como la longitud de onda (540-560 nm) y el pH (alcalino) de las soluciones usadas pueden llevar a células fijadas a

tener auto fluorescencia. Por lo que se recomienda evitar este reactivo en inmunofluorescencia, a menos que presente otros beneficios que se quieran probar (Collins y Goldsmith, 1981). Por ejemplo en el estudio de Zhou et al. (2018), donde prueban células fijadas con glutaraldehído en la preparación de vacunas y muestran que son las segundas mejores vacunas de las cuatro probadas, en un modelo de cáncer de hígado y cáncer de pulmón.

Para continuar con la evaluación de células fijadas con glutaraldehído se deben tener en cuenta estas referencias para saber si es conveniente o no seguir evaluando las preparaciones por medio de citometría de flujo o elegir otra manera de evaluación. En nuestro caso, decidimos realizar la evaluación de este experimento por medio de RT-qPCR.

De la evaluación de la activación de CD por RT qPCR se obtuvo que las preparaciones con mayor efecto en la expresión de CD80 y CCR7 son 4T1^{parental}PF, 4T1^{GM-CSF}PF y 4T1^{tumor}PF, todas fijadas con paraformaldehído. En comparación a los resultados por Zhou et al. (2018), muestran a las vacunas de células fijadas con paraformaldehído como la tercera mejor opción, después de las preparaciones de células fijadas con glutaraldehído y células lisadas, estas últimas tienen el mayor efecto inmunogénico. En otro estudio, de Si et al. (2017), en una comparación entre vacunas de células lisadas y células fijadas con glutaraldehído, las células lisadas ofrecieron mejores resultados en cuanto a eficiencia antitumoral en cáncer de hígado. Estos resultados muestran la especificidad requerida de antígeno para cada padecimiento.

Las tres vacunas seleccionadas se probaron en un modelo ortotópico de cáncer de mama *in vivo* en una combinación de tratamiento profiláctico y terapéutico. En los resultados podemos observar los mecanismos antitumorales en cuanto a la respuesta celular, donde vemos el crecimiento de los tumores y la infiltración de linfocitos T. En estos resultados no se observan efectos antitumorales con respecto al peso y volumen de los tumores, en cambio se muestra un crecimiento uniforme de los tumores, y un peso final que no fue diferente con los tratamientos, lo que nos dice que las vacunas no tuvieron un efecto positivo en la respuesta celular. En caso contrario en un estudio de Tian et al. (2013), demuestran que células LL/2 (cáncer de pulmón de Lewis) que expresan GM-CSF y IL-8 disminuyen el tamaño de los tumores en ratones, y detectan que los mecanismos anti tumorales dependen principalmente de los linfocitos T CD8⁺ y CD4⁺. En cuanto a la respuesta humoral, los anticuerpos circulantes anti-4T1 de los grupos con tratamiento no mostraron un incremento significativo contra el grupo control; únicamente la vacuna 4T1^{parental}PF elevó las concentraciones de anticuerpos circulantes (no significativo), mostrando ser la vacuna con mejor efecto antitumoral. En comparación a un estudio de Chablani et al. (2019) donde aplican una vacuna contra el cáncer de mama en un tratamiento profiláctico y terapéutico donde

muestran resultados significativos. Los resultados demuestran el aumento de anticuerpos en el suero después de cinco dosis de inmunización a los ratones. Concluyen que la presentación de antígenos depende de la ruta de administración.

El efecto de las tres vacunas probadas un modelo de cáncer de mama demostró no ser efectivo en cuanto a respuesta celular y respuesta humoral, por lo tanto, no es suficiente para activar el sistema inmune en el tumor primario. Esto se puede explicar, primero porque el ambiente tumoral juega un rol importante en cuanto a las interacciones celulares que ocurren. Por ejemplo, en un estudio de Barak et al., (2019) demuestran que las CD de médula ósea interactúan con células de cáncer y ayudan al mantenimiento de la leucemia linfocítica crónica. Si bien las CD son fundamentales en la activación y mantenimiento de la inmunidad, sus funciones se ven disminuidas o suprimidas por factores que se encuentran en el ambiente tumoral (Wylie et al., 2019). En otro estudio en Fase II realizaron una vacuna con el péptido NY-ESO-1 altamente inmunogénico y el adyuvante ISCOMATRIX contra melanoma fase IV, y encontraron que la proporción de linfocitos T reguladores (Tregs) aumenta en pacientes más avanzados, esto pasa en varios tipos de cáncer y sugieren que la inmunosupresión inducida por tumores puede ser sistémica (Nicholaou et al., 2009). También muestran que las poblaciones de células Tregs y células supresoras derivadas de células mieloides provocan la supresión de la respuesta inmune contra el cáncer (Vermaelen, 2019).

El ambiente tumoral inmunosupresor representa un obstáculo para las vacunas, que tienen poca efectividad para la activación de células T, sin embargo, no se puede esperar a que actúen como monoterapia para un conjunto de mecanismos inmunosupresores presentes en el ciclo de la respuesta inmune. Se deben combinar estrategias como moduladores de puntos de control, especialmente de CTL4 y PD1/PDL1. En un estudio se aplicó el inhibidor de PD-1 (pembrolizumab), el cual, causó una respuesta contra el cáncer de mama triple negativo en el 18.5 % en 32 pacientes, sin embargo, en la siguiente fase la respuesta fue de 5.3% en 170 pacientes, mostrando que los inhibidores de puntos de control inmunológico tienen eficiencia en la primera línea contra la metástasis (Keenan y Tolaney, 2020). El desarrollo de los inhibidores del punto de control cataliza el progreso de la terapia y maximiza la eficacia de las vacunas contra el cáncer. También se han usado quimioterapias y radioterapias combinados con vacunas, ya que son los tratamientos estándar para pacientes con cáncer, mostrando mayor respuesta contra la enfermedad (Sharma y Allison, 2018; Hollingsworth y Jansen, 2019; Hu et al., 2018; Vermaelen, 2019; Melief et al., 2015).

Es conocido que el micro ambiente en metástasis ósea es más inmunosupresor, por lo que se necesitan preparaciones de vacunas con mayor efecto anti tumoral y otra alternativa es la inmunización con CD

cargadas con antígenos. En estas formulaciones, las CD son pre activadas para que pasen de CD inmaduras a CD maduras por medio del contacto con antígenos y después son inoculadas a los pacientes para provocar una respuesta inmune potente (Liu et al., 2020; Gu et al., 2020). Estas son estrategias para realizar en futuros ensayos en el laboratorio.

Nuestros resultados indican que obtener una respuesta inmune eficiente contra el cáncer es complejo, ya que existen múltiples factores como la misma preparación de la vacuna, la selección del antígeno, el microambiente tumoral, además de mecanismos de evasión de células de cáncer, como la inmuno-edición y la misma tolerancia que pueda generar el organismo para la terapia. Sin embargo, nos indican también los siguientes pasos a elegir, para aumentar la respuesta inmune y trasladar el diseño de inmunización a un modelo de metástasis ósea. Es por esto que se dieron los primeros pasos para establecer un modelo adecuado de metástasis ósea donde se pueda probar la eficiencia de las vacunas que fueron efectivas en un modelo ortotópico de cáncer de mama.

Es por esto que, para probar la eficiencia de la vacuna en metástasis ósea por cáncer de mama, se debe tener un modelo de metástasis compatible con el protocolo de inmunización de los ratones. Nuestros resultados muestran que los ratones de nueve semanas de edad no desarrollan metástasis en los huesos en comparación con los ratones de seis semanas. En modelos de metástasis ósea por cáncer de mama en murinos, la edad recomendada con inoculaciones intracardiacas o intravenosa es de 4 a 6 semanas de edad, ya que la absorción del tumor se reduce notablemente después de 6 semanas, pero de manera general, se utilizan ratones de 6 a 8 semanas de edad (Wright et al, 2016; Pulaski y Ostrand-Rosenberg, 2000; Farhoodi et al., 2020). Esto implica que se debe diseñar un plan de vacunación donde ratones jóvenes puedan recibir el tratamiento.

Los resultados presentados hasta ahora en el modelo de metástasis ósea, son importantes ya que nos ayudan determinar los parámetros para la implementación a futuro del plan de vacunación en ensayos preclínicos de metástasis ósea en ratones. Siendo esta enfermedad la causa principal de muerte en pacientes con cáncer de mama avanzado.

Capítulo 5. Conclusiones

Durante este proyecto se logró determinar que el plásmido GFP no funciona como control positivo de transfección de células 4T1, ya que las células perdían fluorescencia con el tiempo.

Se realizó la formulación de nueve preparaciones de vacunas a partir de células 4T1.

La evaluación de las preparaciones de vacunas en la activación de CD por medio de citometría de flujo no resulta confiable si las células se fijan con glutaraldehído, ya que las células mostrarán auto fluorescencia.

Por otro lado, la evaluación de la activación por medio de RT-qPCR con los marcadores de CD80 y CCR7 resultó confiable para obtener un listado de las vacunas según su eficiencia en la expresión de estos genes.

Las vacunas no tuvieron efecto antitumoral significativo en un modelo de cáncer de mama, por lo que se debe seguir buscando alternativas de formulación de vacunas para elevar su eficiencia.

Los ratones viejos tienden a producir menos osteólisis que ratones más jóvenes, por lo que se deben usar ratones jóvenes en un modelo de metástasis ósea.

Los datos anteriormente presentados nos dirigen a realizar las modificaciones pertinentes para formular una vacuna con mayor potencial inmunogénico. Primero con la presentación de antígeno, como CD precargadas con el antígeno; elegir un nuevo adyuvante como GM-CSF; una terapia complementaria de combate utilizando inhibidores de puntos de control inmunológicos; poder llevar a cabo la evaluación de la respuesta celular por medio de los linfocitos T infiltrados y un diseño de inmunoterapia que se acople al modelo de metástasis ósea por cáncer de mama.

Literatura citada

- Anderson, R.L., Balasas, T., Callaghan, J., Coombes, R.C., Evans, J., Hall, J.A., Kinrade, S., Jones, D., Jones, P.S., Jones, R., Marshall, J.F., Panico, M.B., Shaw, J.A., Steeg, P.S., Sullivan, M., Tong, W., Westwell, A.D., Ritchie, J.W. A. 2019. A framework for the development of effective anti-metastatic agents. *Nature Reviews Clinical Oncology*, 16(3), 185–204. doi:10.1038/s41571-018-0134-8
- Barak, A. F., Lewinsky, H., Perpinial, M., Huber, V., Radomir, L., Kramer, M. P., Sever, L., Wolf, Y., Shapiro, M., Herishanu, Y., Jung, S., Becker-Herman, S., Shachar, I. 2019. Bone marrow dendritic cells support the survival of chronic lymphocytic leukemia cells in a CD84 dependent manner. *Oncogene*, 39(9), 1997–2008. doi:10.1038/s41388-019-1121-y
- Bendre, M.S., Margulies, A.G., Walser, B., Akel, N.S., Bhattacharyya, S., Skinner, R.A., Swain, F., Ramian, V., MohammadK.S., Wessner, L.L., Martinez, A., Guise, T.A., Chirgwin, J.M., Gaddy, D. Suva, L.J. 2005. Tumor-derived interleukin-8 stimulates osteolysis independent of the receptor activator of nuclear factor- κ B ligand pathway. *Cancer Research*, 65(23), 11001–11010
- Billiau, A., Matthys, P. 2001. Modes of action of Freund's adjuvants in experimental models of autoimmune diseases. *Journal of Leukocyte Biology*, 70(6), 849–860. doi:10.1189/jlb.70.6.849
- Bray, F., Ferlay, J., Soerjomataram, I., Siegel, R.L., Torre, L.A., Jemal, A. 2018. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: Cancer Journal for Clinicians*, 68(6), 394–424. doi:10.3322/caac.21492
- Brown, S.D., Warren, R.L., Gibb, E.A., Martin, S.D., Spinelli, J.J., Nelson, B.H., y Holt, R.A. 2014. Neo-antigens predicted by tumor genome meta-analysis correlate with increased patient survival. *Genome Research*, 24(5), 743–750. doi: 10.1101/gr.165985.113
- Burnet, F.M. 1970. The concept of immunological surveillance. En: Schwartz, R.S. (Ed): *Immunological Aspects of Neoplasia*. Progress in Experimental Tumor Research. Karger, Basel. vol 13. pp. 1–27. doi: 10.1159/000386035
- Campeau, E., Ruhl, V.E., Rodier, F., Smith, C.L., Rahmberg, B.L., Fuss, J.O., Campisi, J., Yaswen, P., Cooper, P.K., Kaufman, P.D. 2009. A versatile viral system for expression and depletion of proteins in mammalian cells. *PLoS ONE*, 4(8). doi:10.1371/journal.pone.0006529
- Carlsson G, Ekelund L, Stigsson L, Hafström, L. 1983. Vascularization and tumour volume estimations of solitary liver tumours in rats. *Annales Chirurgiae et Gynaecologiae*, 72(4):187-91.
- Chablani, L., Tawde, S.A., Akalkotkar, A., Souza, M.J.D. 2019. Evaluation of a particulate breast cancer vaccine delivered via skin. *The AAPS Journal*, 21(2):12. doi:10.1208/s12248-018-0285-7
- Cheever, M.A., Higano, C.S. 2011. PROVENGE (sipuleucel-T) in prostate cancer: The first FDA-approved therapeutic cancer vaccine. *Clinical Cancer Research*, 17(11), 3520–3526. doi:10.1158/1078-0432.CCR-10-3126

- Chen, D.S., Mellman, I. 2013. Review oncology meets immunology: the cancer-immunity cycle. *Immunity*, 39(1), 1–10.
- Coleman, R.E. y Rubens, R.D. 1987. The clinical course of bone metastases from breast cancer. *British Journal of Cancer*, 55, 61–66.
- Collins, J.S., Goldsmith, T.H. 1981. Spectral properties of fluorescence induced by glutaraldehyde fixation. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, 29(3), 411–414. doi:10.1177/29.3.6787116
- Devignes, C., Aslan, Y., Brenot, A., Devillers, A., Schepers, K., Fabre, S. 2018. HIF signaling in osteoblast-lineage cells promotes systemic breast cancer growth and metastasis in mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 115 (5), doi:10.1073/pnas.1718009115
- Disis, M.L., Wallace, D.R., Gooley, T.A., Dang, Y., Slota, M., Lu, H., Coveler, A.L., Childs, J.L. Higgins, D.M., Fintak, P.A., de la Rosa, C., Tietje, K., Link, J., Waisman, J., Salazar, L.G. 2009. Concurrent trastuzumab and her2 / neu -specific vaccination in patients with metastatic breast cancer. *Journal of Clinical Oncology*, 27(28),4685-4692.
- Dranoff, G. 2002. GM-CSF-based cancer vaccines. *Immunological Reviews*, 5, 147–154.
- Dubensky, T.W., Reed, S.G. 2010. Adjuvants for cancer vaccines. *Seminars in Immunology*, 22(3), 155–161. doi:10.1016/j.smim.2010.04.007
- Ehata, S., Hanyu, A., Fujime, M., Katsuno, Y., Fukunaga, E., Goto, K., Ishikawa, Y., Nomura, K., Yokoo, H., Shimizu, T., Ogata, E., Miyazono, K., Shimizu, K., Imamura, T. 2007. Ki26894, a novel transforming growth factor- beta type I receptor kinase inhibitor, inhibits *in vitro* invasion *in vivo* bone metastasis of a human breast cancer cell line. *Cancer Science*, 98(1), 127–133.
- Fares, C.M., Van Allen, E.M., Drake, C.G., Allison, J.P., Hu-Lieskovan, S. 2019. mechanisms of resistance to immune checkpoint blockade: why does checkpoint inhibitor immunotherapy not work for all patients? *American Society of Clinical Oncology Educational Book*, 39, 147–164. doi:10.1200/edbk_240837
- Farhoodi, H.P., Segaliny, A.I., Wagoner, Z.W., Cheng, J.L., Liu, L., Zhao, W. 2020. Optimization of a syngeneic murine model of bone metastasis. *Journal of Bone Oncology*, 23, 100298. doi:10.1016/j.jbo.2020.100298
- Förster, R., Davalos-Misslitz, A.C., Rot, A. 2008. CCR7 and its ligands: Balancing immunity and tolerance. *Nature Reviews Immunology*, 8(5), 362–371. doi:10.1038/nri2297
- Frankel, C.J. 2013. Cancer immunotherapy. *Science*, 342(6165), 1432–1433. doi:10.1126/science.342.6165.1432

- Gao-Gao, Z., Tian, L., Hu, J., Park, I.S. y Bae, Y.H. 2011. Prevention of metastasis in a 4T1 murine breast cancer model by doxorubicin carried by folate conjugated pH sensitive polymeric micelles. *Journal of Control Release*, 152(1), 84-89, doi:10.1016/j.jconrel.2011.01.021
- Garrido, F., Perea, F., Bernal, M., Sánchez-Palencia, A., Aptsiauri, N., Ruiz-Cabello, F. 2017. The escape of cancer from T cell-mediated immune surveillance: HLA class I loss and tumor tissue architecture. *Vaccines (Basel)*, 5(1), doi:10390/vaccines5010007
- Gerlinger, M., Rowan, A., Horswell, S., Larkin, J., Endesfelder, D., Gronroos, E., D., Martinez, P., Matthews, N., Stewart, A., Tarpey, P., Varela, I., Phillimore, B., Begum, S., McDonald, N., Butler, A., Jones, D., Raine, K., Latimer, C., Santos, C., Nohadani, M., Eklud, A., Spender-Dene, B., Downward Julian., Futreal, A., y Swanton, C. 2012. Intratumor heterogeneity and branched evolution revealed by multiregion sequencing. *The New England journal of Medicine*, 336(10), 883-892, doi:10.1056/NEJMoa1113205
- Gnjatic, S., Ritter, E., Büchler, M.W., Giese, N.A., Brors, B., Frei, C., Murray, A., Halama, N., Zörning, I., Chen, Y.T., Andrews, C., Ritter, G., Old, L.J., Ondusi, K. 2010. Seromic profiling of ovarian and pancreatic cancer. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(11), 1–6.
- Gu, Y. Zhuo, Zhao, X., Song, X. rong. 2020. Ex vivo pulsed dendritic cell vaccination against cancer. *Acta Pharmacologica Sinica*, 41(7), 959–969. doi: 10.1038/s41401-020-0415-5
- Hiraga, T. 2019. Bone metastasis: interaction between cancer cells and bone microenvironment. *Journal of Oral Biosciences*, 61(2), 95-98.
- Hirschhorn-cymerman, D., Budhu, S., Kitano, S., Liu, C., Zhao, F., Zhong, H., Lesokhin, A.M., Connors, F.A., Yuan, J., Li, Y., Houghton, A.N., Merghoub, T., Wolchok, J. D. 2012. Induction of tumoricidal function in CD4 + T cells is associated with concomitant memory and terminally differentiated phenotype. *Journal of Experimental Medicine*, 209(11), 2113.
- Hollingsworth, R.E., Jansen, K. 2019. Turning the corner on therapeutic cancer vaccines. *Npj Vaccines*, 4,7, doi: 10.1038/s41541-019-0103-y
- Hoves, S., Sutton, V.R., Trapani, J.A. 2012. A novel role for granzymes in anti-tumor immunity. *Oncoimmunology*, 1(2),219–221.
- Hu, Z., Ott, P.A., y Wu, C.J. 2018. Towards personalized, tumor-specific, therapeutic vaccines for cancer. *Nature Reviews Immunology*, 18(3),168-182
- Jimi, E., Nakamura, I., Duong, L.T., Ikebe, T., Takahashi, N., Rodan, G.A., Suda, T. 1999. Interleukin 1 induces multinucleation and bone-resorbing activity of osteoclasts in the absence of osteoblasts / stromal cells. *Experimental Cell Research*, 93, 84–93.

- Käkönen, S. M., Selander, K. S., Chirgwin, J. M., Yin, J. J., Burns, S., Rankin, W. A., Grubbs, B. G., Dallas, M., Cui, Y., Guise, T. A. 2002. Transforming growth factor- β stimulates parathyroid hormone-related protein and osteolytic metastases via smad and mitogen-activated protein kinase signaling pathways. *Journal of Biological Chemistry*, 277(27), 24571–24578. doi:10.1074/jbc.M202561200
- Kang, Y., He, W., Tulley, S., Gupta, G.P., Serganova, I., Chen, C., Manova-todorova, K., Blasber, R., Gerald, W.L., Massague, J. 2005. Breast cancer bone metastasis mediated by the smad tumor suppressor pathway. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 102(39),13909–13914
- Kang, Y., Siegel, P.M., Shu, W., Drobnjak, M., Kakonen, S.M., Guise, T. A., Massague, J. 2003. A multigenic program mediating breast cancer metastasis to bone. *Cancer Cell*, 3(6), 537–549.
- Keenan, T.E., Tolaney, S.M. 2020. Role of immunotherapy in triple-negative breast cancer. *Journal of the National Comprehensive Cancer Network*, 18(4), 479–489. doi: 10.6004/jnccn.2020.7554
- Koebel, C.M., Vermi, W., Swann, J.B., Zerafa, N., Rodig, S.J., Old, L.J., Schreiber, R.D. 2007. Adaptive immunity maintains occult cancer in an equilibrium state. *Nature*, 450, 903–908.
- Kurtz, S.L., Ravindranathan, S., Zaharoff, D.A., 2014. Current status of autologous breast tumor cell-based vaccines. *Expert Review of Vaccines*, 13, 1439-1445, doi:10.1586/14760584.2014.969714
- Leelatian, N., Doxie, D.B., Greenplate, A.R., Sinnaeve, J., Ihrie, R.A., Irish, J.M. 2017. Preparing viable single cells from human tissue and tumors for cytomic analysis. *Current Protocols in Molecular Biology*. 118, 25C.1.1-25C.1.23. doi:10.1002/cpmb.37.
- Liu, F., Sun, J., Yu, W., Jiang, Q., Pan, M., Xu, Z., Mo, F., Liu, X. 2020. Quantum dot-pulsed dendritic cell vaccines plus macrophage polarization for amplified cancer immunotherapy. *Biomaterials*, 242, 119928. doi: 10.1016/j.biomaterials.2020.119928
- Mcallister, S.S., Gifford, A.M., Greiner, A.L., Kelleher, S.P., Saelzler, M.P., Ince, T.A., Reinhardt, F., Harrys, L.N., Hylander, B.L., Repasky, E.A. 2008. Systemic endocrine instigation of indolent tumor growth requires osteopontin. *Cell*, 133(6),994–1005.
- Melero, I., Hervas-Stubbs, S., Glennie, M., Pardoll, D. M., Chen, L. 2007. Immunostimulatory monoclonal antibodies for cancer therapy. *Nature Reviews Cancer*, 7(2), 95–106. doi: 10.1038/nrc2051
- Melief, C.J.M. 2017. Precision T-cell therapy targets tumours. *Nature*, 547, 165-167.
- Melief, C.J.M., Hall, T. Van, Arens, R., Ossendorp, F., Burg, S.H. Van Der. 2015. Therapeutic cancer vaccines. *Journal Clinical Investigation*, 125(9), 3401–3412. doi: 10.1172/JCI80009
- Mundy, G.R. 2002. Metastasis to Bone: Causes, consequences and therapeutic opportunities. *Nature Reviews Cancer*. 2(8),584–593

- Nicholaou, T., Ebert, L.M., Davis, I.D., McArthur, G.A., Jackson, H., Dimopoulos, N., Tan, B., Maraskovsky, E., Miloradovic, L., Hopkins, W., Pan, L., Venhaus, R., Hoffman, E.W., Chen, W., Cebon, J. 2009. Regulatory T-cell-mediated attenuation of T-cell responses to the NY-ESO-1 ISCOMATRIX vaccine in patients with advanced malignant melanoma. *Clinical Cancer Research*, 15(6), 2166–2173. doi:10.1158/1078-0432.CCR-08-2484
- Okaji, Y., Tsuno, N.H., Tanaka, M., Yoneyama, S., Matsushashi, M., Kitayama, J., Shinsuke, S., Nagura, Y., Tsuchita, T., Yamada, J., Tanaka, J., Yoshikawa, N., Nishikawa, T., Shuno, Y., Todo, T., Saito, N., Takahashi, K., Nagawa, H. 2007. Pilot study of anti-angiogenic vaccine using fixed whole endothelium in patients with progressive malignancy after failure of conventional therapy. *European Journal of Cancer*, 44, 383-390, doi: 10.1016/j.ejca.2007.10.018
- Ott, P.A., Hu, Z., Keskin, D.B., Shukla, S.A., Sun, J., Bozym, D.J., Wu, C.J. 2017. An Immunogenic personal neoantigen vaccine for patients with melanoma. *Nature*, 547(7662), 217–221
- Paget, S. 1889. Distribution of secondary growths in cancer of the breast. *The Lancet*, 133(3421), 571–573.
- Palucka, K., Bancherreau, J. 2013. Dendritic-cell based therapeutic cancer vaccines. *Immunity*, 39(1), 38-48.
- Pardoll, D.M. 1998. Cancer vaccines. *Nature Medicine*, 4, 525-531.
- Pécheur, I., Peyruchaud, O., Serre, C.M., Guglielmi, J., Volland, C., Bourre, F., Margue, C., Cohen-Solal, M., Buffet, A., Kieffer, N., Clézardin, P. 2002. Integrin alpha (v) beta3 expression confers on tumor cells a greater propensity to metastasize to bone. *The FASEB Journal*, 16(10), 1266–1268. doi:10.1096/fj.01-0911fje
- Pluijm, G.V.D., Sijmons, B., Vloedgraven, H., Deckers, M. 2001. Monitoring metastatic behavior of human tumor cells in mice with species-specific polymerase chain reaction: elevated expression of angiogenesis and bone resorption stimulators by breast cancer in bone metastases. *Journal of Bone and Mineral Research*, 16(6), 1077-1091.
- Pulaski, B.A., Ostrand-Rosenberg, S. 2000. Mouse 4T1 breast tumor model. *Current Protocols in Immunology*, 39(1). doi:10.1002/0471142735.im2002s39
- Quezada, S.A., Peggs, K.S., Curran, M.A., Allison, J. P. 2006. CTLA4 blockade and GM-CSF combination immunotherapy alters the intratumor balance of effector and regulatory T cells. *The Journal of Clinical Investigation*. 116(7), 1935-1945.
- Ritter, U., Wiede, F., Mielenz, D., Kiafard, Z., Zwirner, J., Körner, H. 2004. Analysis of the CCR7 expression on murine bone marrow-derived and spleen dendritic cells. *Journal of Leukocyte Biology*, 76(2), 472–476. doi:10.1189/jlb.0104037
- Roche, P.A., Furuta, K. 2015. The ins and outs of MHC class II mediated antigen processing and presentation. *Nature Review Immunology*, 15, 203-216. doi:10.1038/nri3818

- Roodman, G. D., Dougall, W. C. 2008. RANK ligand as a therapeutic target for bone metastases and multiple myeloma. *Cancer Treatment Reviews*, 34(1), 92–101. doi:10.1016/j.ctrv.2007.09.002
- Roodman, G.D. 2004. Mechanisms of bone metastasis. *The New England Journal of Medicine*. 350 (16), 1655–1664.
- Salcedo, M., Bercovici, N., Taylor, R., Vereecken, P., Massicard, S., Duriau, D., Vernel-Pauillac, F., Boyer, A., Baron-Bodo, V., Mallard, E., Bartholeyns, J., Goxe, B., Latour, N., Leroy, S., Prigent, D., Martiat, P., Sales, F., Laporte, Bruyns, C., Romet-Lemonne, J.L., Abastado, J.P., Lehmann, F., Velu, T. 2006. Vaccination of melanoma patients using dendritic cells loaded with an allogeneic tumor cell lysate. *Cancer Immunology, Immunotherapy*, 55(7), 819–829. doi:10.1007/s00262-005-0078-6
- Sanders, J.L., Chattopadhyay, N., Kifor, O., Yamaguchi, T., Butters, R.R., Brown, E.M. 2000. Extracellular calcium-sensing receptor expression and its potential role in regulating parathyroid hormone-related peptide secretion in human breast cancer. *Endocrinology*. 141(12),4357–4364.
- Schadendorf, D., Hodi, F.S., Robert, C., Weber, J.S., Margolin, K., Hamid, O., Patt, D., Chen, T.T., Berman, D.M., Wolchok, J. D. 2015. Pooled analysis of long-term survival data from phase II and phase III trials of ipilimumab in unresectable or metastatic melanoma. *Journal of Clinical Oncology*, 33(17), 1889–1894. doi:10.1200/JCO.2014.56.2736
- Schreiber, R.D., Old, L.J., Smyth, M. J. 2011. cancer immunoediting: integrating immunity's roles in cancer suppression and promotion. *Science*. 331(6024), 1565-1570.
- Schumacher, T.N., Schreiber, R.D. 2015. Neoantigens in cancer immunotherapy. *Science*. 348(6230), 69-74.
- Sethi, N., Dai, X., Winter, C., Kang, Y. 2012. Tumor-derived jagged1 promotes osteolytic bone metastasis of breast cancer by engaging notch signaling in bone cells. *Cancer Cell*. 19(2), 192–205.
- Sharma, P., Allison, J.P. 2018. Immune checkpoint tarfeting in cancer therapy: towards combination strategies with curative potencial. *Cell*. 161(2), 205–214. doi: 10.1016/j.cell.2015.03.030.
- Shiozawa, Y., Pedersen, E.A., Havens, A.M., Jung, Y., Mishra, A., Joseph, J., Kim, J.K., Patel, L.R., Ying, C., Ziegler, A.M., Pienta, M.J., Song, J., Wang, J., Loberg, R.D., Krebsbach, P.H., Pienta, K.J., Taichman, R.S. 2011. Human prostate cancer metastases target the hematopoietic stem cell niche to establish footholds in mouse bone marrow find the latest version: Human prostate cancer metastases target the hematopoietic stem cell niche to establish footholds in mouse bone marrow. *The Journal of Clinical Investigation*. 121(4), 1298-1312.
- Si, C., Xu, M., Lu, M., Yu, Y.A.N., Yang, M. 2017. In vivo antitumor activity evaluation of cancer vaccines prepared by various antigen forms in a murine hepatocellular carcinoma model. *Oncology Letters*. 14(6),7391–7397.

- Soiffer, R., Hodi, F.S., Haluska, F., Jung, K., Gillessen, S., Singer, S., Tanabe, K., Duda, R., Mentzer, S., Jaklitsch, M., Bueno, R., Clift, S., Hardy, S., Neuberg, D., Mulligan, R., Webb, I., Mihm, M., Dranoff, G. 2003. Vaccination with irradiated, autologous melanoma cells engineered to secrete granulocyte-macrophage colony-stimulating factor by adenoviral-mediated gene transfer augments antitumor immunity in patients with metastatic melanoma. *Journal of Clinical Oncology*, 21(17), 3343–3350. doi:10.1200/JCO.2003.07.005
- Spranger, S., Bao, R., y Gajewski, T.F. 2015. Melanoma-intrinsic b-catenin signaling prevents anti-tumors immunity. *Oncoimmunology*. 523(10), 231-235.
- Stanta, G., Bonin, S. 2018. Overview on clinical relevance of intra-tumor heterogeneity. *Frontiers in Medicine*. 6 (5),1-10.
- Stern, P.L., Harrop, R. 2017. 5T4 oncofetal antigen: an attractive target for immune intervention in cancer. *Cancer Immunology, Immunotherapy*, 66(4), 415–426. doi:10.1007/s00262-016-1917-3
- Suva, L.J., Washam, C., Nicholas, R.W., Griffin, R.J. 2011. Bone metastasis: mechanisms and therapeutic opportunities. *Nature Review Endocrinology*, 7(4), 208–218. doi:10.1038/nrendo.2010.227.Bone
- Talmadge, J.E., Fidler, I.J. 2010. The biology of cancer metastasis: historical perspective. *Cancer Research*. 70(14),5649–5670.
- Tian, H., Shi, G., Yang, G., Zhang, J., Li, Y., Du, T., Wang, J., Xu, F., Cheng, L. 2013. Cellular immunotherapy using irradiated lung cancer cell vaccine co-expressing GM-CSF and IL-18 can induce significant antitumor effects. *BMC Cancer*, 14(48), 1-13. doi: 10.1186/1471-2407-14-48.
- Tower, H., Ruppert, M., Britt, K. 2019. The immune microenvironment of cancer. *Cancers*, 11(1375), 1–15.
- Valilou, S.F. y Rezaei, N. 2019. Tumor antigens. En: Rezaei, N., Keshavarz-Fathi, M. (Eds.), *Vaccines for cancer immunotherapy*. Academic Press. pp. 61-74.
- Vázquez, M. B., Sureda, M., Rebollo, J. 2012. Dendritic cells I: basic biology and functions. *Immunology*, 31(1), 21–30. doi: 10.1016/j.inmuno.2011.10.001
- Vermaelen, K. 2019. Vaccine strategies to improve anti-cancer cellular immune responses. *Frontiers in Immunology*. 10, 1–17.
- Vicent, S., Antón, I., Hernández, I., Martínez, S., Rivas, J. De. 2006. Las metástasis óseas del cáncer. Bone metastases. *Anales del Sistema Sanitario de Navarra*. 29, 177–188.
- Waldman, A.D., Fritz, J.M., Lenardo, M.J. 2020. A guide to cancer immunotherapy: from T cell basic science to clinical practice. *Nature Reviews Immunology*, 20(11), 651–668. doi:10.1038/s41577-020-0306-5

- Weber, J.S., D'Angelo, S.P., Minor, D., Hodi, F.S., Gutzmer, R., Neyns, B., Hoeller, C., Khushalani, N.I., Miller, W.H., Lao, C.D., Linette, G.P., Thomas, L., Lorigan, P., Grossmann, K.F., Hassel, J.C., Maio, M., Sznol, M., Ascierto, P.A., Mohr, P., Chmielowski, B., Bryce, A., Svane, I., Grob, J.J., Krackhardt, A., Horak, C., Lambert, A., Larkin, J. 2015. Nivolumab versus chemotherapy in patients with advanced melanoma who progressed after anti-CTLA-4 treatment (CheckMate 037): a randomised, controlled, open-label, phase 3 trial. *The Lancet Oncology*, 16(4), 375–384. doi: 10.1016/S1470-2045(15)70076-8
- Wei, Y.Q., Wang, Q.R., Zhao, X., Yang, L., Tian, L., Lu, Y., Kang, B., Lu, C.L., Huang, M.J., Lou, Y.Y., Xiao, F., He, Q.M., Shu, J.M., Xie, X.J., Mao, Y.Q., Lei, S., Luo, F., Zhou, L.Q., Liu, C.E., Zhou, H., Jiang, Y., Peng, F., Yuan, L.P., Li, Q., Wu, Y. y Liu, J.Y. 2000. Immunotherapy of tumors with xenogeneic endothelial cells as a vaccine. *Nature Medicine*. 6(10), 1160-1166. doi:10.1038/80506
- Weilbaecher, K.N., Guise, T.A., Mccauley, L.K. 2011. Cancer to bone: a fatal attraction. *Nature Reviews Cancer*. 11,411–425.
- Wong, K.K., Li, W. A., Mooney, D. J., y Dranoff, G. 2016. Advances in therapeutic cancer vaccines. En: *Tumor Immunology*, 1st ed. *Advances in Immunology*. 130, 191-249.
- Wright, L.E., Ottewell, P.D., Rucci, N., Peyruchaud, O., Pagnotti, G.M., Chiechi, A., Buijs, J.T., Sterling, J.A. 2016. Murine models of breast cancer bone metastasis. *Bone Key Reports*, 5, 1–11, doi:10.1038/bonekey.2016.31
- Wylie, B., Macri, C., Mintern, J. D., Waithman, J. 2019. Dendritic cells and cancer: from biology to therapeutic intervention. *Cancers*, 11(4), 1–21. doi:10.3390/cancers11040521
- Yin, J.J., Mohammad, K.S., Käkönen, S.S., Harris, S., Wu-Wong, J.R., Wessale, J.L. Padley, R.J., Garret, I.R., Chirgwin, J.M., Guise, T.A. 2003. A causal role for endothelin-1 in the pathogenesis of osteoblastic bone metastases. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100(19),10954-10959.
- Yu, H., Rohan, T. 2000. Role of the Insulin-Like Growth Factor Family in Cancer Development and Progression. *Journal of the National Cancer Institute*, 92(18), 1472-1482.
- Zhang, G.J., Adachi, I. 1999. Serum intelukin-6 levels correlate to tumor progression and prognosis in metastatic breast carcinoma. *Anticancer Research*, 19(2B), 1427-1432.
- Zhang, J., Dai, J., Qi, Y., Lin, D. L., Smith, P., Strayhorn, C., Mizokami, A., Fu, Z., Westman, J., Keller, E. T. 2001. Osteoprotegerin inhibits prostate cancer-induced osteoclastogenesis and prevents prostate tumor growth in the bone. *Journal of Clinical Investigation*, 107(10), 1235–1244. doi:10.1172/JCI11685
- Zhang, Z., Zhang, J., Xia, N., Zhao, Q. 2017. Expanded strain coverage for a highly successful public health tool: prophylactic 9-valent human papillomavirus vaccine. *Human Vaccines and Immunotherapeutics*, 13(10), 2280–2291. doi:10.1080/21645515.2017.1346755

- Zhao, Y., Bachelier, R., Treilleux, I., Pujuguet, P., Peyruchaud, O., Baron, R., Clément-Lacroix, P., Clézardin, P. 2007. Tumor $\alpha\beta 3$ integrin is a therapeutic target for breast cancer bone metastases. *Cancer Research*. 67(12),5821–5831.
- Zhou, L., Si, C., Li, D., Lu, M., Zhong, W., Xie, Z., Guo, L. 2018. Assessment of *in vivo* anti-tumor activity of human umbilical vein endothelial cell vaccines prepared by various antigen forms. *European Journal of Pharmaceutical Science*. 114, 228–237.