

**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**

**Tratamiento del cáncer de mama con una vacuna de células
dendríticas en combinación con 5-Fluorouracilo**

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

Presenta:

Paloma Stephanie Almeida Luna

Ensenada, Baja California, México
2022

Tesis defendida por
Paloma Stephanie Almeida Luna

y aprobada por el siguiente Comité

Dr. Pierrick Gerard Jean Fournier
Director de tesis

Miembros del comité

Dra. Patricia Juárez Camacho

Dra. Karla Evelia Cervantes Luévano

Dr. Benjamín Barón Sevilla



Dra. Ana Denise Re Araujo
Coordinadora del Posgrado en Ciencias de la Vida

Dr. Pedro Negrete Regagnon
Director de Estudios de Posgrado

Resumen de la tesis que presenta **Paloma Stephanie Almeida Luna** como requisito parcial para la obtención del grado de Maestro en Ciencias en Ciencias de la Vida con orientación en Biomedicina y Bionanotecnología.

Tratamiento del cáncer de mama con una vacuna de células dendríticas en combinación con 5-Fluorouracilo

Resumen aprobado por:

Dr. Pierrick Gerard Jean Fournier
Director de tesis

El cáncer de mama (CM) es el tipo de cáncer más frecuente en mujeres y la segunda causa de muerte por cáncer en el mundo. Los tratamientos actuales para el CM son efectivos solo en etapas tempranas de la enfermedad y provocan efectos secundarios graves y toxicidad crónica, por eso es necesario buscar mejores tratamientos. La vacunación autóloga con células dendríticas (CDs) es una inmunoterapia que induce respuestas inmunológicas anti-tumorales; sin embargo, solo unos pocos ensayos clínicos han tenido buenos resultados. Se puede intentar eficientizar esta inmunoterapia utilizando coadyuvantes que aumenten la maduración de las CDs. Otra manera es utilizando tratamientos que reduzcan células inmunosupresoras del microambiente tumoral, como lo hace el 5-Fluorouracilo (5-FU) con las células MDSCs. El objetivo de este trabajo fue evaluar la combinación de una vacuna autóloga de CDs (DC-Vax) madurada con una vacuna profiláctica y el 5-FU para el tratamiento del CM en un modelo pre-clínico. Primero, se caracterizó el efecto de distintos coadyuvantes para madurar CDs *in vitro*, posteriormente se caracterizó el efecto de la DC-Vax madurada con una vacuna profiláctica en un modelo de CM y luego el efecto del 5-FU en un modelo de CM. Por último, se evaluó la combinación de la DC-Vax y el 5-FU en el tumor primario de CM. Se encontró que los coadyuvantes no incrementaron la maduración de las CDs, en comparación con el control. Por otro lado, la DC-Vax redujo el tamaño de los tumores de CM. El 5-FU también redujo los tumores de CM y las células MDSCs en ratones. Sin embargo, la combinación de DC-Vax/5-FU no fue efectiva para reducir más los tumores. Todos los tratamientos probados (5-FU, DC-Vax y DC-Vax/5-FU) aumentaron los niveles de anticuerpos anti-4T1, lo que sugiere una participación de la respuesta inmune humoral, que sería conveniente analizar más a fondo. El tratamiento con DC-Vax/5-FU incrementó los niveles de linfocitos T CD4⁺ y T CD8⁺ en los ratones, y estos linfocitos expresaban el marcador de agotamiento PD-1, por lo que podrían considerarse como linfocitos T antitumorales que tienen la capacidad de re-activarse si se utilizan inhibidores de puntos de control inmunológico.

Palabras clave: cáncer de mama, inmunoterapia, vacunación autóloga, células dendríticas, vacunas profilácticas, 5-FU.

Abstract of the thesis presented by **Paloma Stephanie Almeida Luna** as a partial requirement to obtain the Master of Science degree in Life Sciences with orientation in Biomedicine and Bionanotechnology.

Treatment of breast cancer with a dendritic cell vaccine in combination with 5-Fluorouracil

Abstract approved by:

Dr. Pierrick Gerard Jean Fournier
Thesis Director

Breast cancer (BC) is the most common type of cancer in women and the second leading cause of cancer death in the world. Current treatments for BC are effective only in early stages of the disease and can cause serious side effects and chronic toxicities, so it is necessary to search for better treatments. Autologous dendritic cell (DC) vaccination is an immunotherapy that induces anti-tumor immune responses; however, only a few clinical trials have had good results. Efforts can be made to make this immunotherapy more efficient by using adjuvants that increase the maturation of DCs. Another way is to use treatments that can reduce immunosuppressive cells in the tumor microenvironment, as 5-Fluorouracil (5-FU) does with MDSCs. The aim of this work was to evaluate the combination of an autologous DC vaccine (DC-Vax) matured with a prophylactic vaccine and the chemotherapeutic agent 5-FU for the treatment of BC in a pre-clinical model. First, we characterized the effect of different adjuvants to mature DCs *in vitro*, then we characterized the effect of a DC-Vax matured with a prophylactic vaccine in a BC model and then the effect of 5-FU in a BC model. Finally, the combination of a DC-Vax and 5-FU was evaluated in the primary BC tumor. We found that adjuvants did not increase the maturation of DCs compared to the control. On the other hand, the DC-Vax reduced the size of the BC tumors. The treatment with 5-FU also reduced the BC tumors and MDSCs in mice. However, the DC-Vax/5-FU combination was not effective in further shrinking the tumors. All treatments tested (5-FU, DC-Vax and DC-Vax/5-FU) increased anti-4T1 antibody levels, suggesting the participation of the humoral immune response, which would be convenient to analyze more thoroughly. Treatment with DC-Vax/5-FU increased the levels of CD4⁺ T and CD8⁺ T lymphocytes in mice, and these lymphocytes expressed the exhaustion marker PD-1, so they could be considered as antitumor T lymphocytes that could have the capacity to be reactivated if immune checkpoint inhibitors are used.

Keywords: breast cancer, immunotherapy, autologous vaccination, dendritic cells, prophylactic vaccines, 5-FU.

Dedicatoria

Para Mariel.

Agradecimientos

Al Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada (CICESE), al posgrado en Ciencias de la Vida y al Departamento de Innovación Biomédica por darme la oportunidad y las herramientas para el desarrollo de este trabajo.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca de manutención al CVU número 970143.

A mi director de tesis, Dr. Pierrick Gerard Jean Fournier, por su dedicación a mi formación como investigadora, pero sobre todo como persona. Gracias por la paciencia y la confianza que depositó en mi.

A los miembros de mi comité tutorial, la Dra. Patricia Juárez Camacho, la Dra. Karla Evelia Cervantes Luévano y el Dr. Benjamín Barón Sevilla, por las valiosas aportaciones a este trabajo, así como sus comentarios y asesoría.

A la M.C. Samanta Mireya Jiménez Flores por su apoyo en la realización de los experimentos *in vivo* y en el manejo y cuidado de los animales.

A la M.C. Danna Lyn Arellano Rodriguez, por su apoyo y compañía en la realización de mis experimentos más largos. Gracias por los consejos y por la complicidad.

A Olaf Pingarron Schumacher por facilitar las vacunas para realizar este proyecto.

A mis compañeros del P&P que me acompañaron a lo largo de todo el proceso.

A la familia que encontré en mis amigos del posgrado: Alan Hernández, Angy Hernández, Blanca Valdovinos, Erick Huerta, Gustavo Ramos, Joaquín López, Myriam Ochoa, Mayela Manzano, Paloma Acosta, Sebastián Álvarez y Tonatzin Zertuche. Gracias por las risas y los consejos, siempre supieron como aligerar la carga.

A mis padres María Isabel Luna Zamora y Leonardo Almeida Vega, y a mi hermana Wendy Nazareth Almeida Luna por el apoyo y las palabras de aliento, por creer en mi, aún en los tiempos en los que yo no lo hago.

A mi tía Margarita Almeida, por recibirme en Ensenada y estar al pendiente de mi durante toda la maestría.

A Aldo Gaxiola y Rogelio Pineda, por recibirme en su hogar y en su familia. Gracias por consentirme tanto y recordarme que esta bien relajarse de vez en cuando.

A mi esposo, Cesar Carreón, por levantarme cada vez que sentí que no podía. Por cuidarme y quererme en los días buenos, pero sobre todo en los días más difíciles y cansados. Este logro también es tuyo.

Tabla de contenido

	Página
Resumen en español.....	ii
Resumen en inglés.....	iii
Dedicatoria.....	iv
Agradecimientos.....	v
Lista de figuras.....	ix
Lista de tablas.....	xi
Lista de abreviaturas.....	xii
Capítulo 1. Introducción	
1.1 Introducción.....	1
1.1.1 El cáncer.....	1
1.1.2 El cáncer de mama.....	2
1.1.3 Tratamientos para el cáncer de mama.....	4
1.1.4 La respuesta inmune contra las células cancerosas.....	5
1.1.5 Inmunoterapias para el tratamiento del cáncer.....	7
1.2 Antecedentes.....	9
1.2.1 Vacunación autóloga con células dendríticas.....	9
1.2.2 Aumento de la maduración de las células dendríticas utilizando PAMPs como coadyuvantes.....	12
1.2.3 Oxidación de antígenos tumorales con ácido hipocloroso (HOCl) para aumentar la internalización por las por las células dendríticas	15
1.2.4 Modificación del microambiente tumoral: eliminación de las señales de inhibición del sistema inmune.....	15
1.3 Justificación.....	17
1.4 Hipótesis.....	17
1.5 Objetivos.....	18
1.5.1 Objetivo general	18
1.5.2 Objetivos específicos.....	18
Capítulo 2. Metodología	
2.1 Manejo y cuidado de ratones.....	19
2.2 Cultivo celular.....	19
2.3 Preparación de células 4T1 para inoculación.....	20

2.4 Formación de tumores primarios de cáncer de mama en los ratones.....	20
2.5 Inoculación intracardiaca para modelo de metástasis ósea.....	21
2.6 Medición de los tumores primarios de cáncer de mama.....	21
2.7 Obtención y digestión de tumores de células 4T1.....	21
2.8 Oxidación de células con ácido hipocloroso.....	22
2.9 Lisis de células 4T1 mediante ciclos de congelación descongelación.....	22
2.10 Diferenciación de células dendríticas a partir de células de médula ósea de ratón.....	23
2.11 Inducción de la maduración de células dendríticas con coadyuvantes.....	23
2.12 Preparación de vacunas autólogas con células dendríticas.....	24
2.13 Preparación de células para citometría de flujo.....	24
2.14 Análisis por citometría de flujo.....	25
2.15 Titulación de anticuerpos.....	27
2.16 Tratamientos con 5-Fluorouracilo.....	27
2.17 Medición de anticuerpos anti-4T1 en plasma de ratones.....	28
2.18 Análisis estadístico.....	28
Capítulo 3. Resultados	
3.1 Optimización de condiciones de digestión de tumores.....	29
3.2 Optimización de condiciones de oxidación de células tumorales.....	30
3.3 Preparación de células tumorales.....	33
3.4 Titulación de anticuerpos.....	33
3.5 Cinética de diferenciación de células dendríticas.....	35
3.6 Condiciones de activación de células dendríticas.....	37
3.7 Efecto de las vacunas profiláticas en la activación de células dendríticas <i>in vitro</i>	38
3.8 Efecto de la vacunación con células dendríticas activadas en un modelo ortotópico de cáncer de mama.....	42
3.9 Determinación de la dosis mínima de 5-FU para el tratamiento de cáncer de mama.....	45
3.10 Determinación de la dosis mínima de 5-FU para el tratamiento de la metástasis ósea de cáncer de mama.....	49
3.11 Efecto del tratamiento combinado de una vacuna con células dendríticas y el 5-FU en tumores primarios de cáncer de mama.....	52
Capítulo 4 . Discusión.....	57
Capítulo 5 . Conclusiones.....	63

Literatura citada.....	64
Anexos.....	71

Lista de figuras

Figura		Página
1	Etapas del desarrollo del cáncer de mama.....	2
2	Ciclo de la respuesta inmune antitumoral.....	6
3	Esquema de preparación de una vacuna autóloga con células dendríticas.....	11
4	Estrategia de análisis de las células dendríticas por citometría de flujo.....	25
5	Estrategia de análisis de las células supresoras derivadas de células mieloides (MDSCs) por citometría de flujo.....	26
6	Estrategia de análisis de los linfocitos, linfocitos T CD4 ⁺ y linfocitos T CD8 ⁺ por citometría de flujo.....	26
7	Optimización de la digestión de la digestión de tumores 4T1 con colagenasa II.....	29
8	Células 4T1 tratadas con diferentes concentraciones de ácido hipocloroso (HOCl)....	30
9	Inducción de muerte de células 4T1 con ácido hipocloroso (HOCl).....	31
10	Inducción de muerte de células 4T1 tumorales con ácido hipocloroso (HOCl).....	32
11	Titulación del anticuerpo CD11c.....	34
12	Titulación del anticuerpo MHC II.....	35
13	Células de médula ósea de ratón en proceso de diferenciación a células dendríticas...	36
14	Caracterización de las células dendríticas derivadas del cultivo de médula ósea.....	37
15	Activación de células dendríticas con LPS durante 24 y 48 horas.....	38
16	Células dendríticas tratadas con los diferentes coadyuvantes.....	39
17	Efecto de diferentes coadyuvantes en la maduración de las células dendríticas <i>in vitro</i>	40
18	Efecto del tratamiento de Vanguard Plus (2.5 % v/v) con LPS (0.5 µg/mL ó 1µg/mL) sobre la maduración de las células dendríticas.....	41
19	Los tratamientos con DC-Vax redujeron los tumores de cáncer de mama 4T1.....	42
20	Efecto de los tratamientos con DC-Vax en las poblaciones de linfocitos T en la sangre y en los tumores de los ratones.....	43
21	Los tratamientos con DC-Vax no incrementan la activación de las poblaciones de linfocitos T en los tumores.....	44
22	Los tratamientos con DC-Vax aumentan los niveles de IgG anti-4T1.....	45

23	El tratamiento con 5-FU reduce el tamaño los tumores de cáncer de mama.....	46
24	El tratamiento con 5-FU reduce el tamaño del bazo de los ratones con cáncer de mama.....	47
25	El tratamiento con 5-FU reduce las poblaciones de MDSC Polimorfonucleares y Monocíticas en los tumores.....	48
26	Efecto del 5-FU en las poblaciones de linfocitos T, linfocitos T CD4 ⁺ y linfocitos T CD8 ⁺ en los tumores de los ratones.....	49
27	El tratamiento con 5-FU reduce los bazos de los ratones con metástasis ósea de cáncer de mama.....	50
28	Efecto del 5-FU en las poblaciones de MDSC en la metástasis ósea y en su capacidad de producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) y óxido nítrico (NO).....	50
29	Efecto de los tratamientos con 5-FU en la metástasis ósea de cáncer de mama.....	51
30	Los tratamientos con DC-Vax, 5-FU y DC-Vax+5-FU no redujeron los tumores de cáncer de mama	52
31	Efecto de los tratamientos con DC-Vax, 5-FU y DC-Vax+5-FU en el bazo de ratones con cáncer de mama.....	53
32	Los tratamientos con 5-FU y DC-Vax+5-FU redujeron las poblaciones de MDSCs Polimorfonucleares y Monocíticas en la sangre de los ratones con cáncer de mama.....	53
33	Los tratamientos con 5-FU y DC-Vax+5-FU aumentaron las poblaciones y la activación de los linfocitos T de la sangre periférica de los ratones con cáncer de mama.....	55
34	Los tratamientos con DC-Vax, 5-FU y DC-Vax+5-FU incrementaron los niveles de IgG anti-4T1 en los ratones con tumores de cáncer de mama.....	56

Lista de tablas

Tabla		Página
1	Lista de coadyuvantes y concentraciones utilizadas para la activación de las células dendríticas.....	23
2	Características de las diferentes preparaciones de células tumorales.....	33
3	Anticuerpos utilizados para citometría de flujo.....	71
4	Nombre y formulación de las vacunas profilácticas utilizadas como coadyuvantes.....	73

Lista de abreviaturas

5-FU	5-Flourouracilo
ANOVA	<i>Del inglés, Analysis of Variance</i> , Análisis de varianza
APC	<i>Del inglés, Antigen presenting cell</i> , Célula presentadora de antígeno
BMV	<i>Del inglés, Brome Mosaic Virus</i> , Virus del mosaico de Brome
Bregs	Linfocitos B reguladores
BSA	<i>Del inglés, Bovine Serum Albumin</i> , Albúmina de suero bovino
CCMV	<i>Del inglés, Cowpea chlorotic mottle virus</i> , Virus de la clorosis moteada del caupí
CD	Célula dendrítica
CDU	<i>Del inglés, Collagen Digestion Units</i> , Unidades de digestión de colagenasa
CM	Cáncer de mama
CO₂	Dióxido de carbono
DC-Vax	Vacuna con células dendríticas
DMSO	Dimetilsulfóxido
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
EEM	Error estándar de la media
ELISA	<i>Del inglés, Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay</i> , Ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas
FACS	<i>Del inglés, Fluorescence-activated cell sorting</i> , Selección Celular Activada por Fluorescencia
FITC	<i>Del inglés, Fluorescein Isotiocyanate</i> , Isotiocianato de fluoresceína
FSC	<i>Del inglés, Forward scatter</i> , Dispersión frontal
g	Gramos
GM-CSF	<i>Del inglés, Granulocyte Macrophage Colony-Stimulating Factor</i> , Factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos
HCl	Ácido clorhídrico
HOCl	Ácido hipocloroso
ICIs	<i>Del inglés, Immune Checkpoint Inhibitors</i> , Inhibidores de puntos de control inmunológico
IFNγ	Interferón gamma
IgG	Inmunoglobulina G
IL	Interleucina
IMF	Intensidad Media de Fluorescencia
IP	Ioduro de propidio
kg	Kilogramo
LPS	Lipopolisacárido
MDSC	<i>Del inglés, Myeloid-derived suppressor cells</i> , Células supresoras derivadas de células mieloides
Mon	Monocíticas
PMN	Polimorfonucleares
mg	Miligramo

MHC	<i>Del inglés, Major histocompatibility complex, Complejo principal de histocompatibilidad</i>
mL	Mililitro
mM	Milimolar
MPO	Mieloperoxidasa
NaHCO₃	Bicarbonato de sodio
ng	Nanogramo
NGS	<i>Del inglés, Next generation sequencing, Secuenciación de nueva generación</i>
NH₄Cl	Cloruro de amonio
NO	Óxido nítrico
°C	Grados Celsius
OVA	Ovoalbúmina
PAMPs	<i>Del inglés, Pathogen-associated molecular patterns, Patrones moleculares asociados a patógenos</i>
PBMC	<i>Del inglés, Peripheral blood mononuclear cell, Célula mononuclear de sangre periférica</i>
PBS	<i>Del inglés, Phosphate-Buffered Saline, Tampón fosfato salino</i>
PE	<i>Del inglés, Phycoerythrin, Ficoeritrina</i>
PE-Cy5	<i>Del inglés, Phycoerythrin-Cyanine5, Ficoeritrina-cianina5</i>
PE-Cy7	<i>Del inglés, Phycoerythrin-Cyanine7, Ficoeritrina-cianina7</i>
PGE₂	<i>Del inglés, Prostaglandin E₂, Prostaglandina E²</i>
PRR	<i>Del inglés, Pattern recognition receptors, Receptores de reconocimiento de patrones</i>
RE	Retículo endoplásmico
RNA	<i>Del inglés, Ribonucleic acid, Ácido ribonucleico</i>
ROS	<i>Del inglés, Reactive oxygen species, Especies reactivas de oxígeno</i>
SFB	Suero fetal bovino
SSC	<i>Del inglés, Side scatter, Dispersión lateral</i>
TAA s	<i>Del inglés, Tumor-associated antigens, Antígenos asociados al tumor</i>
TCR	<i>Del inglés, T cell receptor, Receptor de linfocitos T</i>
TLR	<i>Del inglés, Toll-like receptor, Receptor tipo toll</i>
TNF	<i>Del inglés, Tumor necrosis factor, Factor de necrosis tumoral</i>
Tregs	Linfocitos T reguladores
TSA s	<i>Del inglés, Tumor-specific antigens, Antígenos específicos al tumor</i>
v/v	Volumen por volumen
VEGF	<i>Del inglés, Vascular Endothelial Growth Factor, Factor de crecimiento endotelial vascular</i>
μL	Microlitro
μM	Micromolar

Capítulo 1. Introducción

1.1 Introducción

1.1.1 El cáncer

Cáncer es el nombre de un grupo de enfermedades caracterizada por la división descontrolada de células y su diseminación desde el sitio de origen a otros órganos del cuerpo. El tejido donde se origina le da las características distintivas a cada tipo de cáncer; los carcinomas son los cánceres que surgen a partir de células epiteliales, los adenocarcinomas son un subtipo de carcinoma originado a partir de tejido glandular y los sarcomas se originan a partir de células del mesodermo (Pecorino, 2012).

Cada tipo de cáncer tiene características diferentes de acuerdo a su origen, además, para un mismo tipo de cáncer (como el cáncer de mama) también existen diferencias, por ejemplo, en los mecanismos moleculares de la carcinogénesis o el patrón de diseminación de las células desde el sitio primario a otros órganos. A pesar de esto, la mayoría de los tipos de cáncer comparten una serie de rasgos que nos ayudan a comprender la compleja biología de estas patologías: autonomía de señales de crecimiento, evasión de señales inhibitorias de crecimiento, reprogramación del metabolismo, evasión de la muerte celular programada, potencial replicativo ilimitado, angiogénesis, evasión de la destrucción por parte del sistema inmune, invasión y metástasis a otros tejido, inestabilidad y mutación genómica, capacidad de inducir inflamación, lo cual promueve el crecimiento tumoral (Hanahan y Weinberg, 2011). Recientemente se sumaron a esta lista de rasgos, la plasticidad fenotípica y diferenciación interrumpida, la reprogramación epigenética no mutacional, los microbiomas polimórficos y la senescencia celular (Hanahan, 2022).

El cáncer es la primera o segunda causa de muerte antes de los 70 años en 112 de 183 países reportados por la Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer (Sung et al., 2021). Se estima que, a nivel mundial, en el 2020, hubo 19.3 millones de nuevos casos de cáncer y alrededor de 10 millones de muertes por cáncer. El cáncer de mamá paso a ser el cáncer más diagnosticado a nivel mundial (con un estimado de 2.3 millones de nuevos casos, 11.7%) superando después de varios años, al cáncer de pulmón (11.4%), sin embargo este último sigue siendo la principal causa de muerte por cáncer a nivel mundial (18% del total de muertes por cáncer) (Sung et al., 2021).

1.1.2 El cáncer de mama

En la población femenina, el cáncer de mama (CM) es el tipo de cáncer más diagnosticado y la primera causa de muerte por cáncer a nivel mundial (Sung et al., 2021). En México es el tipo de cáncer más frecuente con 29,929 casos nuevos y 7,931 muertes registrados en 2020 (IARC, 2020). El CM es un tipo de cáncer sumamente heterogéneo que presenta características morfológicas y biológicas muy variables. La mayoría de los CM son adenocarcinomas originados en el epitelio lobular o ductal de la glándula mamaria (Tower et al., 2019; Yerukala Sathipati y Ho, 2018). Sin embargo, existen casos de CM tipo espinocelular, que tiene su origen en las células escamosas de la piel del tejido mamario. El CM espinocelular es poco frecuente, constituyendo el 0.1% de todos los casos de CM (Hennessy et al., 2005).

El CM está asociado con distintos factores de riesgo, que varían entre cada uno de los diferentes subtipos de CM que existen. Algunos factores de riesgo son la predisposición genética (como mutaciones de herencia autosómica dominante en genes supresores de tumores como BRCA1 y BRCA2); el estilo de vida (primer embarazo a edad avanzada, obesidad, inactividad física, consumo de alcohol y tabaco); y factores ambientales (exposición a radiación ionizante, turnos de trabajo nocturnos y exposición a disruptores endócrinos) (Fenga, 2016; Harbeck et al., 2019; Mcpherson et al., 2000). La formación de un tumor en el tejido mamario inicia con el desarrollo de una hiperplasia atípica, que consiste en una proliferación anormal de células en los ductos, las cuales pueden llegar a cubrir parcial o completamente el lumen del ducto (Figura 1). La hiperplasia puede progresar a carcinoma *in situ*, donde las células tumorales cubren completamente el ducto, llegando a distorsionarlo. Estas lesiones pueden removerse quirúrgicamente, pero es común que exista recurrencia. Cuando las células ya no se encuentran confinadas al ducto, han roto la membrana basal y han invadido el estroma que lo rodea, el carcinoma se considera como invasivo (Tower et al., 2019).

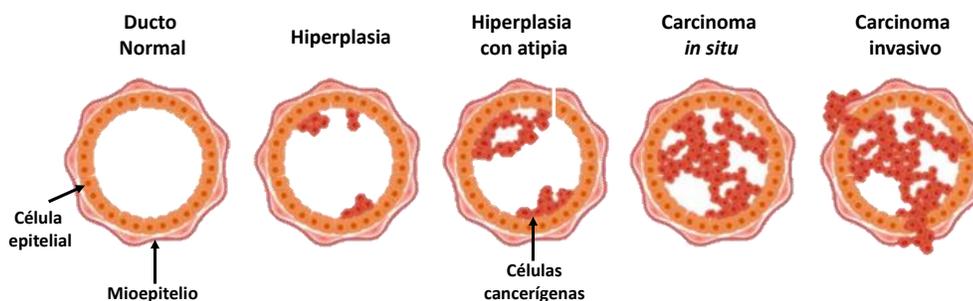


Figura 1. Etapas del desarrollo del cáncer de mama. La formación de un tumor en los ductos mamarios inicia con una hiperplasia, que después puede progresar a una hiperplasia con atipia, donde las células llegan a cubrir parcial o totalmente el ducto. Esta hiperplasia atípica puede progresar a carcinoma *in situ*, y, si las células rompen la membrana basal que las rodea y salen del ducto, el carcinoma se considera invasivo. Modificado de Tower et al. (2019).

El carcinoma invasivo se estadifica en 4 etapas (I-IV), la etapa se determina con base en el tamaño del tumor, si existen tumores en los nódulos linfáticos y si hay metástasis (Tomasichio et al., 2019; Yerukala Sathipati y Ho, 2018). En la etapa I, el tumor mide menos de 20 mm y está localizado en solo uno de los senos. En la etapa II el tumor es menor a 50 mm y puede existir una invasión de células cancerosas en los nódulos linfáticos axilares o cercanos al tejido mamario. En la etapa III, el tumor ha alcanzado un tamaño mayor que 50 mm y las células cancerosas han invadido los nódulos linfáticos axilares y/o otros nódulos linfáticos cercanos, también es posible que existan más tumores en otras áreas del tejido mamario. La etapa IV, es cuando el CM ha hecho metástasis a otros órganos, como pulmones, nódulos linfáticos, piel, hígado, cerebro o hueso (Tomasichio et al., 2019). El hueso es el sitio más común para la metástasis de CM. Aproximadamente del 65% al 75% de los pacientes que se encuentran en etapa avanzada desarrollan metástasis ósea (Brook et al., 2018; Scimeca et al., 2018). Además, se ha reportado que el 22% de los pacientes en etapas tempranas del CM desarrolló metástasis ósea en un periodo de 8.4 años. El pronóstico de los pacientes con metástasis ósea de CM es malo y la supervivencia media de estos pacientes es de 40 meses a partir del diagnóstico (Brook et al., 2018; Holen et al., 2016; Scimeca et al., 2018).

Existen tres principales subtipos de CM, clasificados con base en la presencia o ausencia de marcadores moleculares en las células: los receptores de estrógeno ($ER\alpha$) y progesterona (PR), y el factor de crecimiento humano epidermal 2 (ERBB2, antes Her2). Si existe al menos un 1% de células tumorales con marcadores de estrógeno o progesterona, el CM se clasifica como receptor hormonal positivo (HR^+), este tipo de cáncer se desarrolla en el 70% de los pacientes. Por otro lado, si hay amplificación o sobreexpresión de ERBB2, el cáncer se considera $ERBB2^+$, este tipo de CM se encuentra en el 15% - 20% de los pacientes. Por último, la ausencia de los marcadores moleculares antes mencionados se considera cáncer de mama triple negativo, este tipo de cáncer está presente en aproximadamente el 15% de los pacientes (Waks y Winer, 2019). Además, existe una subclasificación basada en los grupos de marcadores encontrados en las células cancerígenas: el CM luminal A y el luminal B. El CM luminal A incluye tumores que sobreexpresan genes relacionados con $ER\alpha$ y PR y tienen poca expresión de ERBB2 y genes relacionados con proliferación. Por otro lado, los tumores de CM luminal B presentan baja expresión de genes relacionados con $ER\alpha$, una expresión variable de genes relacionados con ERBB2 y una sobreexpresión de genes relacionados con proliferación (Hashmi et al., 2018; Vidal et al., 2016).

1.1.3 Tratamientos para el cáncer de mama

Las estrategias de tratamiento difieren de acuerdo a las características moleculares del subtipo de CM presente en cada paciente, las características histológicas de sus tumores y si existe o no metástasis (Harbeck et al., 2019).

Para el CM no metastásico, los tumores son removidos quirúrgicamente y se toman muestras o se extirpan los ganglios linfáticos axilares, con el fin de prevenir la recurrencia y eventos metastásicos. Además, es común que se administre radiación postoperatoria. La terapia sistémica se puede suministrar en la etapa pre o post operatoria, o en ambas. El subtipo de cáncer del paciente es la principal consideración que se tiene para definir la terapia sistémica, por ejemplo, aquellos pacientes con tumores HR⁺, reciben terapias endocrinas y pueden requerir también quimioterapias. Los tumores ERBB2⁺ reciben tratamientos basados en el anticuerpo monoclonal Trastuzumab (que se une al receptor ERBB2⁺ y lo bloquea), además reciben quimioterapias y, si también son HR⁺ reciben terapias endócrinas, mientras que los pacientes con CM triple negativo solamente son candidatos a quimioterapia (Waks y Winer, 2019). El CM metastásico, es una enfermedad incurable con los tratamientos que se tienen hasta el momento, por lo que el objetivo de las terapias es prolongar la vida de los pacientes y aliviar los síntomas de su enfermedad (Harbeck et al., 2019). Los pacientes con metástasis reciben las terapias sistémicas de acuerdo a su subtipo de cáncer, además se utilizan terapias locales como cirugía y radiación como tratamientos paliativos (Waks y Winer, 2019).

Como se mencionó, la cirugía es un tratamiento eficaz, pero su éxito se limita a etapas tempranas del cáncer de mama (Tomasicchio et al., 2019). Las terapias sistémicas como las terapias endócrinas o la quimioterapia pueden provocar efectos secundarios que pueden ir desde bochornos, dolores en las articulaciones, sequedad vaginal y dispareunia, hasta toxicidades agudas que provocan náusea y fatiga y toxicidades crónicas que pueden ocasionar infertilidad, cardiotoxicidad, neuropatías y disfunción cognitiva. Por otro lado, el uso de terapias locales como la radiación pueden provocar dermatitis, pneumonitis, fatiga y dolor crónico (Harbeck et al., 2019). Debido a esto es necesario continuar con la búsqueda de nuevas y mejores estrategias para tratar el cáncer de mama. En la última década, las inmunoterapias han surgido como el enfoque más prometedor para el tratamiento del cáncer. Estos tratamientos tienen como objetivo estimular o reactivar el sistema inmune del paciente contra el cáncer (Godoy-Calderón et al., 2019).

1.1.4 La respuesta inmune contra las células cancerosas

El sistema inmune es el conjunto de muchos tipos diferentes de células y sus mediadores, cuya función es reconocer lo propio de lo extraño, de esta manera protegen el cuerpo contra patógenos y mantienen una tolerancia ante antígenos propios. Las células tumorales pueden ser reconocidas por el sistema inmune por la presencia y abundancia de antígenos presentes en las células cancerígenas (Bjerregaard et al., 2017). Estos antígenos pueden ser péptidos normales sobreexpresados en las células tumorales, llamados antígenos asociados al tumor (TAAs), o neoantígenos conocidos como antígenos específicos de tumor (TSAs), que únicamente se expresan en las células tumorales y son consecuencia de la acumulación de mutaciones en las células o son derivados de proteínas víricas (Koury et al., 2018; Sahin y Türeci, 2018).

Para que las células tumorales puedan ser eliminadas por el sistema inmune, los antígenos tumorales tienen que ser presentados a través del complejo principal de histocompatibilidad de clase I o de clase II (MHC I o II) y que la unión antígeno-MHC sea reconocido por un receptor de linfocitos T (TCR) (Bjerregaard et al., 2017). El ciclo de la respuesta inmune antitumoral (Figura 2), inicia cuando los antígenos tumorales son liberados y capturados por células presentadoras de antígeno (APC), principalmente células dendríticas (CDs). Estas células procesan los antígenos en su interior y tienen un proceso de maduración en el que aumentan la expresión de diversas moléculas como el receptor de quimiocinas CCR7, que les permite migrar a los nódulos linfáticos donde pueden interactuar con los linfocitos T. Las CDs también aumentan la expresión de las moléculas del MHC y diversas moléculas coestimuladoras (como CD80 y CD86), esto les permite llevar a cabo la presentación antigénica vía el MHC I a los linfocitos T citotóxicos (T CD8⁺) o vía el MHC II a los linfocitos T cooperadores (T CD4⁺) (Chen y Mellman, 2013; Chen et al., 2021).

Los linfocitos T reconocen los antígenos tumorales presentados en las moléculas de MHC mediante sus TCR. Este reconocimiento resulta en la activación de los linfocitos T CD8⁺ o T CD4⁺, que posteriormente pueden salir de los nódulos linfáticos e infiltrarse en los tumores para ejercer su actividad (Chen et al., 2021).

Los linfocitos T CD8⁺ son una población celular que puede diferenciarse, dependiendo de los estímulos ambientales que reciben, en diversas subpoblaciones que varían en su función. El proceso de diferenciación de los T CD8⁺ es dictado por la fuerza antigénica, moléculas coestimuladoras y citocinas, estas señales ambientales activan factores de transcripción que estimulan la diferenciación de los T CD8⁺ a linfocitos Tc1, Tc2, Tc9, Tc17 o Tcreg. Entre estas subpoblaciones, la más caracterizada es la subpoblación de T CD8⁺ citotóxicos, también conocida como Tc1 (Mittrücker et al., 2014). Esta subpoblación tiene una

participación importante en la respuesta inmune antitumoral, ya que es capaz de reconocer y de unirse específicamente a las células cancerosas a través de la interacción de su TCR con el antígeno afín unido al MHC I. Después de este reconocimiento, eliminan las células tumorales mediante la exocitosis sináptica de gránulos compuestos por granzimas y perforinas, que atraviesan a la célula diana e inducen su apoptosis. También pueden inducir la muerte de las células de manera indirecta a través de la secreción de citocinas como el interferón gamma (IFN γ) o el factor de necrosis tumoral (TNF) (Durgeau et al., 2018). La muerte de las células tumorales libera más antígenos tumorales, lo que incrementa la respuesta antitumoral en las siguientes vueltas del ciclo antitumoral (Chen y Mellman, 2013).

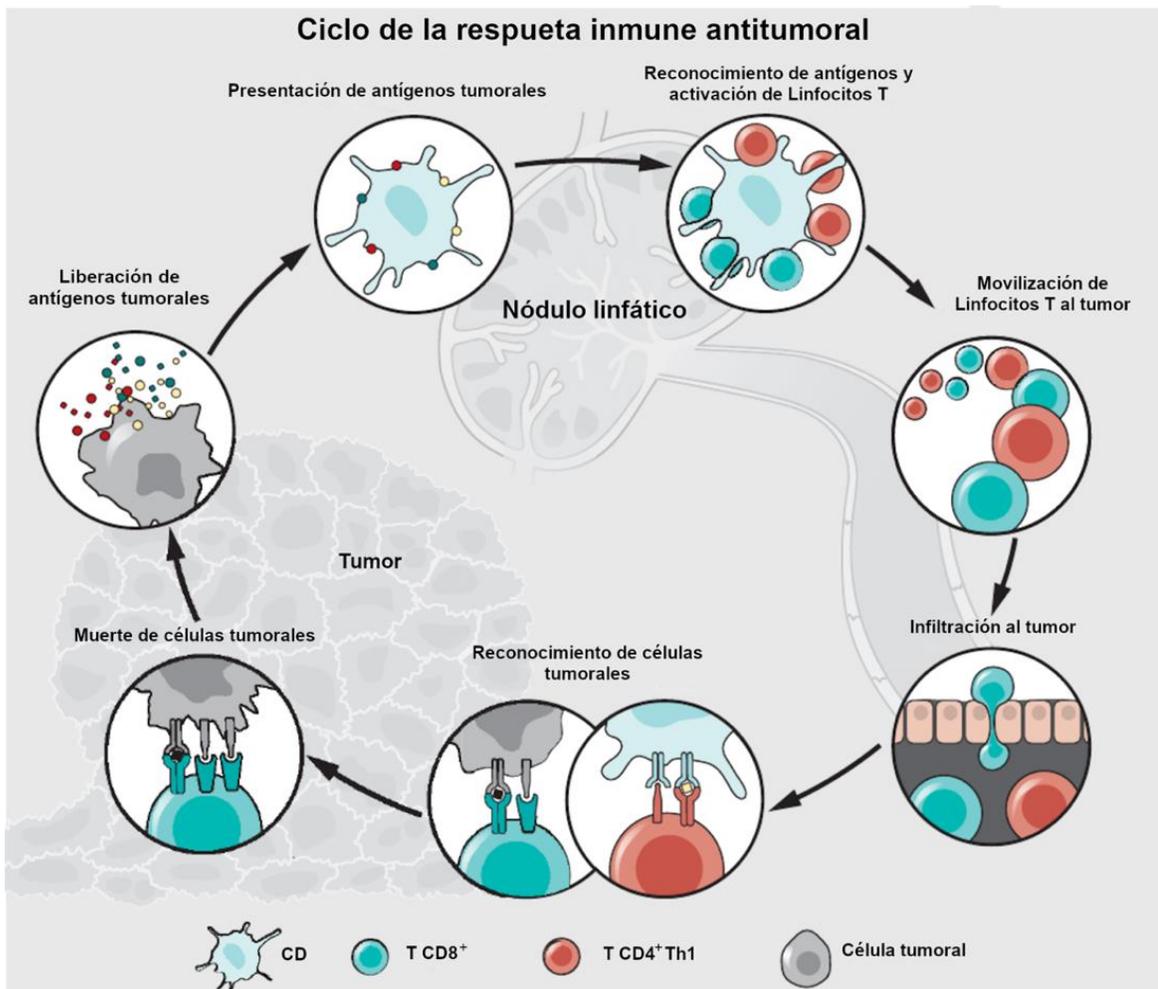


Figura 2. Ciclo de la respuesta inmune antitumoral. La respuesta inmune antitumoral es un proceso cíclico que comienza con la muerte de las células tumorales, las cuales liberan antígenos que son reconocidos por las células dendríticas. Las células dendríticas procesan estos antígenos y migran a los nódulos linfáticos donde pueden interactuar con los linfocitos T CD8⁺ y T CD4⁺. Después del reconocimiento antigénico por parte de los linfocitos T, estos se activan y pueden mobilizarse al lecho tumoral donde ejercen sus funciones efectoras y eliminan a las células tumorales. La muerte de las células libera más antígenos, lo que incrementa la respuesta antitumoral en las siguientes vueltas del ciclo. Modificado de Sahin y Türeci (2018).

Los linfocitos T CD4⁺ también tienen una participación importante en la respuesta inmune antitumoral. Los T CD4⁺ son una población celular versátil, que puede diferenciarse en diferentes subtipos celulares con actividades distintas, en respuesta a las señales que reciben. Los linfocitos Th1 pueden influenciar la actividad antitumoral de otras células y se ha observado que aumentan las funciones efectoras de los linfocitos T CD8⁺ (Ahrends et al., 2017). También secretan citocinas como IFN γ , TNF α e IL-2 que limitan el crecimiento tumoral y promueven el reclutamiento de APC, aumentan su capacidad fagocítica y promueven el procesamiento y presentación antigénica (Tower et al., 2019). Por otro lado, los subtipos Th2 y los linfocitos T reguladores (Tregs), afectan la respuesta inmune antitumoral. Los Th2 expresan IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 e IL-13, citocinas capaces de inhibir la citotoxicidad mediada por los linfocitos T CD8⁺. Por su parte los Tregs promueven un ambiente inmunosupresor en el lecho tumoral, al reducir las funciones efectoras de los linfocitos T CD8⁺ y de los linfocitos Th1 (Miggelbrink et al., 2021; Tower et al., 2019). Además de las CD4 y los linfocitos T, se pueden encontrar muchas otras células del sistema inmune infiltradas en el microambiente tumoral, como los linfocitos B, los linfocitos citolíticos naturales (también llamados células asesinas naturales) y los macrófagos tipo M1, que también tienen actividad antitumoral.

Las células tumorales pueden evadir la respuesta inmune e inclusive aprovechar mecanismos del sistema inmune para promover el crecimiento tumoral. Las células del sistema inmune que son capaces de promover el desarrollo de los tumores son los linfocitos T reguladores (Treg), los macrófagos tipo M2 y las células supresoras derivadas de mieloides (MDSCs), estas células liberan citocinas inmuno-inhibidoras pro-tumorales como TGF- β , VEGF, IL-6, IL-8 e IL-10 (Tower et al., 2019). Los mecanismos ejercidos por estas células hacen que el ciclo de inmunidad contra el cáncer no funcione correctamente. El propósito de las inmunoterapias contra el cáncer es iniciar o reiniciar un ciclo autosuficiente de inmunidad contra el cáncer, permitiendo que se amplifique y se propague lo suficiente para erradicar los tumores, pero no tanto como para generar una respuesta autoinmune inflamatoria (Chen y Mellman, 2013).

1.1.5 Inmunoterapias para el tratamiento del cáncer de mama

Las inmunoterapias son un conjunto de estrategias que tienen como objetivo estimular o reactivar el sistema inmune de un paciente para hacer frente a una enfermedad, incluyendo el cáncer. Su efectividad depende de la respuesta inmune basal del paciente y del microambiente tumoral, observándose diferentes niveles de respuesta ante las inmunoterapias, dependiendo del tipo, densidad y ubicación de las células del sistema inmune en los tumores (Galon y Bruni, 2019). Por ejemplo, se ha observado que, la presencia

de linfocitos T CD8⁺ infiltrados en tumores, está relacionada con un pronóstico favorable en algunos tipos de cáncer. Tume et al. (2014) analizaron muestras de 46 pacientes con melanoma, obtenidas antes y durante el tratamiento con un anticuerpo anti-PD-1, y encontraron que aquellos pacientes que, previo al tratamiento con la inmunoterapia, presentaban linfocitos T CD8⁺ en el margen y en el interior de los tumores, tuvieron una mejor respuesta antitumoral: sus linfocitos T CD8⁺ preexistentes proliferaron y produjeron una mayor disminución en los tumores. Del mismo modo se ha encontrado que los pacientes con cáncer con poca o nula infiltración de células inmunes en los tumores, o que poseen una infiltración predominante de células inmunosupresoras, presentan malos resultados ante las inmunoterapias (Galon y Bruni, 2019; Newman et al., 2020).

Una de las inmunoterapias más utilizadas actualmente son los inhibidores de puntos de control inmunológico (ICIs). Las moléculas de control inmunológico son componentes clave para la regulación de la actividad de los linfocitos T (Godoy-Calderón et al., 2019). Un ejemplo de una molécula de control inmunológico es la proteína de muerte celular programada 1 (PD-1) que se expresa en linfocitos T, células NK, células dendríticas y monocitos después de su activación y es considerada como un marcador de agotamiento celular. Cuando PD-1 se sobreexpresa en los linfocitos T, puede unirse al ligando de muerte celular programada 1 (PD-L1) expresado en las células cancerosas u otras células estromales en el tumor. Este reconocimiento desencadena una cascada de señalización que bloquea las funciones efectoras de los linfocitos T para destruir a las células tumorales, lo que le permite a las células cancerígenas escapar a la respuesta inmune antitumoral (Tume et al., 2014; Xing et al., 2015). La unión de los ICIs a estas proteínas neutraliza la inhibición de los linfocitos T para atacar a las células tumorales (Xing et al., 2015).

La terapia con ICIs ha probado ser una estrategia efectiva en diversos tumores sólidos avanzados, como en el melanoma. Sin embargo, en el CM se ha observado una modesta tasa de respuesta a esta inmunoterapia, debido principalmente a la baja tasa de mutación y la baja infiltración de linfocitos T en los tumores de la mayoría de los subtipos de CM (Ho et al., 2022; Zou et al., 2020). A pesar de esto, estudios recientes han reportado que algunos subtipos de CM pueden responder favorablemente a los ICIs. Tal es el caso del CM triple negativo, el cual presenta altas densidades de linfocitos T en los tumores y una mayor carga de mutaciones que otros subtipos (Zou et al., 2020). Schmid et al. (2020), encontraron que la combinación del inhibidor de PD-L1 atezolizumab, con la quimioterapia con nab-paclitaxel, aumentaba sustancialmente la supervivencia global de pacientes con CM triple negativo metastásico. Además, el tratamiento combinado aumentó la media de supervivencia libre de progresión de 5.5 meses a 7.2 meses, en comparación de aquellos pacientes que solo recibieron la quimioterapia.

Otro tipo de inmunoterapia son las vacunas contra el cáncer, estas tienen como objetivo estimular la respuesta efectora de los linfocitos Th1 y los linfocitos T CD8⁺ contra los antígenos tumorales. Una de las principales ventajas que presentan las vacunas contra el cáncer es la generación de una respuesta inmune adaptativa y la subsecuente generación de una memoria inmunológica que tendrá el potencial de controlar o eliminar la recurrencia del cáncer (Corti et al., 2022). Además, la respuesta y expansión en la cantidad de linfocitos T específicos contra los tumores, hacen de las vacunas contra el cáncer, buenas candidatas para su utilización en tratamientos combinados con otros tipos de inmunoterapias, como los ICIs (Tanyi et al., 2018).

1.2 Antecedentes

1.2.1 Vacunación autóloga con células dendríticas

La vacunación autóloga con células dendríticas consiste en la utilización de células dendríticas derivadas del propio paciente que son cargadas *in vitro* con antígenos tumorales. Como se mencionó anteriormente, las CD son células presentadoras de antígeno especializadas, capaces de reconocer patógenos mediante receptores de reconocimiento de patrones (PRR), procesarlos y luego presentar antígenos provenientes de estos patógenos a los linfocitos T, que al ser activados inician una respuesta inmune adaptativa para intentar combatir la infección (Roche y Furuta, 2015). En el caso del cáncer, las CD son una población celular clave en el inicio de la respuesta antitumoral (El Ansary et al., 2013).

Las CD son capaces de presentar antígenos provenientes de células tumorales vía el MHC I a los linfocitos T CD8⁺, mediante un proceso conocido como presentación cruzada. Las CD adquieren los antígenos de otras células mediante fagocitosis de detritos celulares o vía endocitosis mediada por receptores. Los antígenos internalizados son transferidos del fagolisosoma al citosol para su degradación por el proteosoma. Una vez degradados, los antígenos entran en el retículo endoplásmico (RE) donde pueden ser cargados en las moléculas del MHC I. Después de la unión del antígeno al MHC I, la molécula es transportada a la membrana celular para la presentación del antígeno a los linfocitos T CD8⁺ (Rock et al., 2016).

Las CD también presentan antígenos derivados de células tumorales a los linfocitos T CD4⁺ vía el MHC II. Los antígenos asociados al MHC II son derivados de proteínas degradadas por la vía endosomal. Las

moléculas del MHC II son ensambladas en el RE y posteriormente entran a la vía endosomal, al compartimento de procesamiento antigénico endosomal/lisomal donde encuentran los fragmentos de antígenos que ya han sido degradados por diversas proteasas. Ahí, con la ayuda de proteínas chaperonas, los antígenos son ensamblados en la molécula del MHC II y posteriormente el complejo MHC II-antígeno puede moverse a la membrana plasmática de la célula para ser reconocido por los TCR de los linfocitos T CD4⁺ (Roche y Furuta, 2015; Rock et al., 2016).

Las CDs son una opción inmunoterapéutica atractiva, ya que pueden cargarse con diferentes antígenos *in vitro* para resolver enfermedades *in vivo* (Tomasicchio et al., 2019). Las vacunas autólogas con células dendríticas cargadas con antígenos derivados de tumores de los pacientes, han probado su eficiencia al aumentar en 4.1 meses la supervivencia media de hombres con cáncer de próstata resistente a la castración (Kantoff et al., 2010). Aunado a esto, Tomasicchio et al. (2019) reportaron la eficacia *in vitro* de una vacuna autóloga con células dendríticas para tratar el cáncer de mama, demostrando que las células dendríticas derivadas de pacientes con CM son capaces de activar linfocitos T citotóxicos y eliminar las células tumorales.

Para la preparación de las vacunas autólogas con CDs, primero se requiere aislar células precursoras de CDs de los pacientes (Figura 3). Las células mononucleares de sangre periférica (PBMC) obtenidas a partir de la aféresis de los pacientes, son las células más ampliamente utilizadas como precursoras de CDs en ensayos clínicos (Nestle et al., 2005; Tanyi et al., 2018). Una vez obtenidas las cantidades necesarias de células precursoras, estas tienen que pasar por un proceso de crecimiento y diferenciación, por lo que son puestas en cultivo en presencia del factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF) y de interleucina 4 (IL-4) para poder generar CDs “inmaduras”. El proceso de diferenciación a CDs inmaduras toma entre 5 y 7 días (Cranmer et al., 2004). Luego, las CDs son sometidas a otro paso de diferenciación para obtener un fenotipo de CDs “maduras”, que sobreexpresan moléculas del MHC en su membrana, así como moléculas coestimuladoras y receptores de quimiocinas, que les permiten migrar a los nódulos linfáticos y activar a los linfocitos T (De Vries et al., 2003). El protocolo más común para madurar las CDs es suplementando el medio de diferenciación con un coctel de citocinas proinflamatorias entre las que destacan el factor de necrosis tumoral alfa (TNF α), la prostaglandina E₂, la Interleucina 1 β (IL-1 β) y la Interleucina 6 (IL-6). El proceso de maduración de las células dendríticas toma entre 24 y 48 horas. El fenotipo inmaduro y maduro de las CDs puede distinguirse por la expresión de los marcadores de maduración CD80 y CD86, detectados por citometría de flujo (Bol et al., 2016; Cranmer et al., 2004).

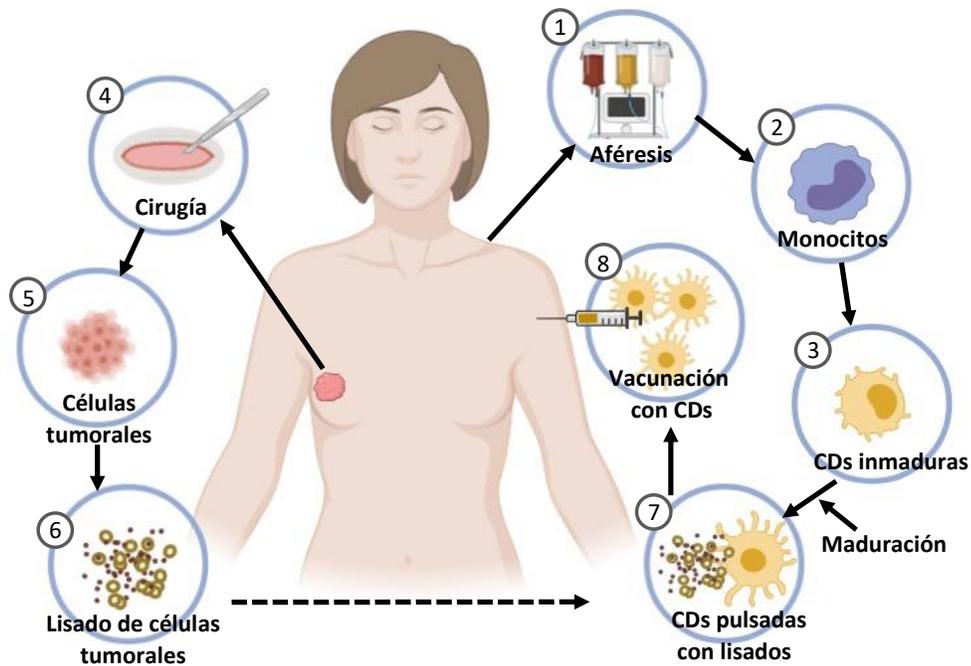


Figura 3. Esquema de preparación de una vacuna autóloga con células dendríticas. Primero se realiza una aféresis para el aislamiento de células precursoras de células dendríticas. Una vez obtenidas las células precursoras, se induce su diferenciación a CD's inmaduras en presencia del factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF) y de interleucina 4 (IL-4). Las células dendríticas inmaduras son tratadas con un coctel de citocinas pro inflamatorias para inducir su maduración y luego son cargadas con los lisados de células tumorales, posteriormente, las células pueden ser administradas a los pacientes. Modificado de Tanyi et al. (2018).

Posteriormente, las CD's son cargadas con los antígenos tumorales. Las preparaciones de los antígenos tumorales pueden ser definidas o indefinidas, de acuerdo a si se conoce o no la composición exacta de la preparación (Cranmer et al., 2004). En la actualidad, la mayoría de las vacunas contra el cáncer probadas han utilizado preparaciones definidas de antígenos asociados a tumor (TAAs), como el caso de MART-1 y gp100 para melanoma (Di Pucchio et al., 2006), CEA y MUC1 en cáncer colorectal (Morse et al., 2013) y HER2 en cáncer de mama (Czerniecki et al., 2007). Sin embargo, cuando las vacunas son dirigidas a TAAs, la eficacia de la vacunación suele ser baja, debido a que la reactividad de los linfocitos T a los autoantígenos es muy reducida, por los mecanismos de tolerancia del sistema inmune (Sarivalasis et al., 2019).

Las preparaciones de antígenos definidas también pueden realizarse con neoantígenos (TSAs) específicos de cada paciente, que pueden identificarse mediante secuenciación de nueva generación (NGS) y herramientas bioinformáticas. A partir de los neoantígenos identificados con estas herramientas, se pueden fabricar péptidos o RNA para cargar las CD's y de este modo obtener vacunas personalizadas contra

el cáncer. Esta técnica tiene como principales desventajas el costo del proceso de identificación de los neoantígenos y el tiempo que puede transcurrir entre la resección del tumor y la primera inyección de la vacuna, que puede tardar varios meses (Mastelic-Gavillet et al., 2019).

Las preparaciones indefinidas de antígenos tumorales para cargar las CDs, como los lisados completos de células tumorales, permiten la presentación simultánea de un espectro más amplio de antígenos tumorales a los linfocitos T CD8⁺ y T CD4⁺. Esto tiene como consecuencia un aumento en la respuesta inmune de los linfocitos T frente a antígenos tumorales, que no se obtendría pulsando a las CDs con un solo péptido tumoral (Cranmer et al., 2004). Tanyi et al. (2018) en un ensayo clínico piloto probaron una vacuna con células dendríticas pulsadas con el lisado de células tumorales autólogas de pacientes con cáncer de ovario. Ellos observaron que las vacunas generaban respuestas de los linfocitos T a los antígenos tumorales; y que la tasa de supervivencia media global a los dos años fue del 100% en los pacientes que respondieron a la inmunoterapia, mientras que fue del 25% en aquellos que no tuvieron respuesta.

A pesar de los buenos resultados del uso de vacunas con células dendríticas, estos solo se han confirmado en una proporción limitada de los pacientes sujetos a ensayos clínicos (Bol et al., 2016; Tanyi et al., 2018). Durante un periodo de 20 años (2000-2019) de ensayos clínicos de vacunas contra el CM, la tasa de respuesta estimada ha sido de alrededor del 9%, sin un claro beneficio en la supervivencia de los pacientes (Corti et al., 2022). Es por eso que se continúa en la búsqueda de hacer más eficiente esta inmunoterapia. Esto puede realizarse de diferentes maneras, ya sea mejorando la maduración de las células dendríticas, haciendo más inmunogénicos los antígenos tumorales o modificando el microambiente tumoral.

1.2.2 Aumento de la maduración de las células dendríticas utilizando PAMPs como coadyuvantes

Algunos autores sugieren que los protocolos utilizados para generar células dendríticas maduras en los ensayos clínicos no son los mejores, ya que se emplean cocteles de citocinas pro inflamatorias como IL-1 β , IL-6, TNF α y prostaglandina E₂ (PGE₂) y estas citocinas podrían inducir respuestas subóptimas en la maduración de las células dendríticas y, en consecuencia, en las respuestas de los linfocitos Th1 y de linfocitos T citotóxicos (Bol et al., 2016).

Las CD maduras en presencia de ligandos de receptores tipo Toll (TLR) (como los patrones moleculares asociados a patógenos o PAMPs), encontrados en bacterias, virus o en las vacunas profilácticas, pueden inducir respuestas inmunes más potentes en modelos murinos, en contraste con las CD maduras con cocteles de citocinas (Bol et al., 2016). El reconocimiento de los PAMPs activa a las CD, las cuales inician un proceso de maduración y experimentan cambios drásticos en su morfología, desarrollando extensiones celulares que amplían su superficie celular y mejoran la interacción con los linfocitos T. El proceso de maduración también aumenta la expresión de receptores de quimiocinas (como CCR7) que facilitan la migración de las CD a los nódulos linfáticos donde pueden presentar los antígenos a los linfocitos T (De Vries et al., 2003).

Otro cambio importante es el aumento en la expresión de moléculas del MHC y moléculas coestimuladoras como CD80 (B7.1) y CD86 (B7.2). Las moléculas coestimuladoras participan en el proceso de presentación antigénica al unirse al receptor CD28 en los linfocitos T. La señal dada por este reconocimiento estimula la producción de IL-2, citocina que promueve la expansión y supervivencia de los linfocitos T. La activación de los linfocitos T requiere esta segunda señal dada por las moléculas coestimuladoras, ya que la unión del TCR al MHC en ausencia de la coestimulación hace que los linfocitos T respectivos sean anérgicos (Hubo et al., 2013).

El reconocimiento de los PAMPs por las CD también aumenta la producción de citocinas inflamatorias como el interferón- α o - β (IFN α o IFN β), el factor de necrosis tumoral (TNF) y la interleucina 1 (IL-1) que promueven la activación de las CD y además estimulan las respuestas de los linfocitos T (Spörri y Reis e Sousa, 2005). En un modelo murino se demostró que, aunque las DCs maduras con citocinas sobreexpresaban moléculas coestimuladoras e inducían la proliferación de los linfocitos T, los linfocitos T activados no se desarrollaban plenamente como células efectoras productoras de IFN γ . Sólo cuando las DCs se activaron a través de receptores TLRs, los linfocitos T fueron capaces de desarrollarse como células efectoras (De Vries et al., 2003).

Así, el proceso de maduración de las células es crucial para inducir una respuesta inmune efectiva (Bol et al., 2016; De Vries et al., 2003). Las vacunas profilácticas son aquellas que se utilizan para prevenir enfermedades infecciosas, funcionan generando una inmunidad adquirida contra un determinado patógeno. Las vacunas profilácticas contienen en su formulación múltiples ligandos de TLRs, por lo tanto, son capaces de actuar como coadyuvantes para la activación y maduración de las células dendríticas y pueden potenciar la respuesta inmune intratumoral y sistémica.

Newman et al. (2020) reportaron que la administración intratumoral de una vacuna contra la influenza reduce el tamaño de los tumores, al inducir la infiltración en el tumor de células dendríticas y linfocitos T CD8⁺ antígeno-específicos para péptidos tumorales. Además, reportaron que el tratamiento con la vacuna profiláctica redujo el crecimiento tumoral de metástasis de diferentes tipos de cáncer, incluyendo cáncer de mama de la línea celular 4T1. De este modo ellos demostraron que la vacuna profiláctica contra el virus de la influenza puede ser reutilizada para sensibilizar tumores resistentes a las inmunoterapias con inhibidores de puntos de control inmunológico (ICIs).

Por otro lado, Bol et al. (2016) en un ensayo clínico, evaluaron la eficacia de la vacunación con CDs maduras con 3 vacunas profilácticas (BCG contra tuberculosis, Typhim contra fiebre tifoidea y Act-HIB contra *H. influenzae*) y prostaglandina E₂, en pacientes con melanoma. Ellos monitorearon las respuestas de los linfocitos T específicos para antígenos tumorales en la sangre y piel de los pacientes y encontraron que la mayoría de ellos produjeron respuestas inmunes antígeno específicas y que estas respuestas coincidieron con un aumento en la supervivencia de los pacientes. Además, demostraron que las CDs maduras con las vacunas profilácticas y PGE₂ inducen la proliferación de linfocitos T CD4⁺ y su polarización a Th1 y la proliferación de linfocitos T CD8⁺ específicos para células tumorales.

Asimismo, Aleynick et al. (2019) evaluaron la capacidad *in vitro* de 20 vacunas profilácticas aprobadas por la FDA (BCG contra tuberculosis, MMR contra sarampión-paperas-rubéola, entre otras) para activar células dendríticas cargadas de antígenos tumorales de linfoma. Algunas de las vacunas profilácticas utilizadas provocaron una activación robusta de las células dendríticas, que presentaron el antígeno de forma cruzada a los linfocitos T, que fueron activados, proliferaron y destruyeron los tumores. Además, en un modelo *in vivo*, el tratamiento con una combinación de vacunas indujo la regresión tumoral en la mayoría de los ratones. Los PAMPs contenidos en las vacunas profilácticas fueron reconocidos por distintos PRR de las CDs, lo que tuvo como consecuencia una mayor activación y maduración de las CDs en comparación con aquellas activadas con PAMPs sintéticos. De esta manera demostraron que las vacunas profilácticas también se pueden utilizar para la vacunación *in situ* y pueden llevarse inmediatamente a la práctica clínica como adyuvantes naturales para inmunoterapias contra el cáncer.

1.2.3 Oxidación de antígenos tumorales con ácido hipocloroso (HOCl) para aumentar la internalización por las células dendríticas

Otra estrategia que se ha utilizado para aumentar la eficacia de la vacunación con células dendríticas es la oxidación de las células tumorales mediante un tratamiento con ácido hipocloroso (HOCl) (Tanyi et al., 2018). El HOCl es un potente oxidante, producido por los neutrófilos durante episodios de inflamación, se forma a partir de peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y ion cloruro (Cl^-) en una reacción catalizada por la enzima mieloperoxidasa (MPO) (Chiang et al., 2006). Se ha observado que el HOCl, además de actuar dentro de los fagolisosomas como un agente bactericida, se puede encontrar extracelularmente, resultando en modificaciones oxidativas de lípidos, enzimas y componentes de la matriz extracelular.

Prokopowicz et al. (2010) reportaron que la oxidación de la proteína ovoalbúmina (OVA) con HOCl, aumenta su inmunogenicidad al provocar modificaciones de la cadena lateral de carbohidratos ligados a asparagina (N). Dichas modificaciones hacen que la proteína OVA sea reconocida por un receptor de proteínas oxidadas en la superficie de las CDs. Después de este reconocimiento, las CDs pueden internalizar, degradar y presentar más eficientemente el antígeno a los linfocitos T.

Chiang et al. (2006) observaron que la oxidación con HOCl de las células tumorales de ovario SK-OV-3 (que expresan los antígenos MUC-1 Y HER-2/*neu*), también aumenta la inmunogenicidad de células, ya que son internalizadas más eficientemente por CDs que aquellas sin el tratamiento con HOCl. Aunado a lo anterior, Tanyi et al. (2008) desarrollaron una vacuna con células dendríticas pulsadas con lisados de células de cáncer de ovario oxidadas con HOCl. Estos autores desarrollaron un ensayo clínico piloto y aplicaron esta vacuna intranodalmente a pacientes con cáncer de ovario en combinación o no con bevacizumab, y observaron que la vacunación indujo la respuesta de los linfocitos T a los antígenos tumorales y se pudo asociar con una mayor supervivencia de los pacientes. Además, concluyeron que la utilización de vacunas con CDs pulsadas con lisados tumorales oxidados con HOCl son seguras y efectivas para evocar una fuerte respuesta antitumoral.

1.2.4 Modificación del microambiente tumoral: eliminación de las señales de inhibición del sistema inmune

Se ha reportado que los pacientes que presentan mejores respuestas a las inmunoterapias son aquellos que poseen un microambiente tumoral con una alta infiltración de células del sistema inmune,

particularmente células dendríticas (CDs) y linfocitos T CD8⁺. Este tipo de microambiente exhibe una presentación antigénica robusta y elevada activación de linfocitos T CD8⁺, que contribuye al desarrollo de una inmunidad tumor-específica y de memoria. La presencia de linfocitos infiltrados en tumores (TILs), específicamente linfocitos T CD8⁺, está relacionada con un pronóstico favorable en diferentes tipos de cáncer (Galon y Bruni, 2019; Newman et al., 2020). Por otro lado, los pacientes con poca infiltración de células del sistema inmune o infiltración predominante de células inmunosupresoras, como los linfocitos T reguladores (Tregs), linfocitos B reguladores (Bregs) y células supresoras derivadas de células mieloides (MDSCs) tienen malos resultados ante las inmunoterapias (Galon y Bruni, 2019; Newman et al., 2020).

Teniendo en cuenta lo anterior, otra forma de mejorar los índices de respuesta a la inmunoterapia es modificando el microambiente tumoral. Para lo cual se han utilizado los inhibidores de puntos de control inmune (ICIs), la inhibición de citocinas inmunosupresoras, como el TGF- β y la depleción de poblaciones celulares inmunosupresoras como las MDSCs (Galon y Bruni, 2019; Neuzillet et al., 2015; Vincent et al., 2010). Las MDSCs son una población de células mieloides inmaduras caracterizadas por su capacidad de inhibir linfocitos T CD8⁺. Se reconocen además, por la expresión de los marcadores de superficie Ly-6C/G y CD11b en ratones, y CD11b, CD33 y CD14 o HLA-DR en humanos (Bronte et al., 2016; Vincent et al., 2010). Diversas citocinas y factores de crecimientos secretados por los tumores modifican la diferenciación de las células mieloides y promueven la proliferación y expansión de las MDSCs (De Sanctis et al., 2016). Estas células se acumulan en la sangre, nódulos linfáticos, médula ósea y en los tumores en muchos tipos de cáncer y contribuyen con la inhibición de la inmunidad innata y adaptativa, particularmente tienen la capacidad de inhibir a los linfocitos T CD8⁺. Además, las MDSCs son capaces de promover el crecimiento tumoral al promover procesos como la angiogénesis y la metástasis (Vincent et al., 2010).

Safarzadeh et al. (2019) encontraron cantidades hasta 10 veces más grandes de MDSCs en la sangre de pacientes con cáncer de mama comparado con personas sanas. Además, observaron que las cantidades de estas células aumentan progresivamente conforme aumenta la etapa del cáncer de mama, y que están correlacionadas con malos pronósticos para los pacientes.

Vincent et al. (2010) reportaron que la utilización del agente anticancerígeno 5-fluorouracilo (5-FU), reduce el número de MDSCs (al provocar su apoptosis) en los tumores y el bazo de ratones inoculados con la línea celular de linfoma EL4. Además, la eliminación de esta población celular promueve un efecto antitumoral dependiente de los linfocitos T, ya que incrementa la producción de IFN γ por parte de los linfocitos T CD8⁺ infiltrados en los tumores. Estos resultados sugieren que, además de los efectos citotóxicos que el 5-FU ejerce sobre las células tumorales, este agente anticancerígeno tiene la capacidad

de promover la activación del sistema inmune. Aunado a lo anterior, Xu et al. (2020), reportaron que un tratamiento con 5-FU es capaz de reducir, además de las MDSCs, las poblaciones de células Tregs y Bregs en la médula ósea de ratones OB-Runx2^{-/-}.

1.3 Justificación

Los tratamientos actuales para el cáncer de mama consisten principalmente en cirugía, radiación y quimioterapias. El éxito de estos tratamientos se limita a pacientes en etapas tempranas del cáncer, y además pueden asociarse a efectos adversos como dolor crónico, náusea, fatiga, infertilidad, cardiotoxicidad, neuropatías y disfunción cognitiva, por lo que es necesario el desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas para el tratamiento del cáncer de mama. La vacunación autóloga con células es una inmunoterapia prometedora para el tratamiento del cáncer, capaz de inducir respuestas inmunológicas anti-tumorales en los pacientes, sin embargo, solo se han obtenido buenos resultados en un número limitado de ensayos clínicos. Para mejorar los índices de respuesta a esta inmunoterapia es posible utilizar coadyuvantes (como vacunas profilácticas) que permitan reforzar la maduración de las células dendríticas, además es posible utilizar tratamientos que nos permitan reducir poblaciones inmunosupresoras del microambiente tumoral, como lo hace el agente quimioterapéutico 5-Fluorouracilo. En este contexto, es importante investigar si la combinación de una vacuna autóloga con células dendríticas activada con una vacuna profiláctica, sumado a un tratamiento con el agente quimioterapéutico 5-Fluorouracilo podría ser eficiente para el tratamiento del cáncer de mama.

1.4 Hipótesis

Una vacuna autóloga de células dendríticas activadas con una vacuna profiláctica, en combinación con el agente quimioterapéutico 5-fluorouracilo es eficaz para el tratamiento del cáncer de mama.

1.5 Objetivos

1.5.1 Objetivo general

Desarrollar una vacuna con células dendríticas y combinarla con una vacuna profiláctica y un agente quimioterapéutico para el tratamiento del cáncer de mama en un modelo pre-clínico.

1.5.2. Objetivos específicos

1. Caracterizar el efecto *in vitro* de vacunas profilácticas en la maduración de células dendríticas.
2. Caracterizar el efecto *in vivo* de una vacuna con células dendríticas activadas con una vacuna profiláctica en un modelo ortotópico de cáncer de mama en ratones.
3. Caracterizar el efecto del tratamiento combinado de una vacuna con células dendríticas activadas con una vacuna profiláctica y el 5-Fluorouracilo en un modelo ortotópico de cáncer de mama en ratones.

Capítulo 2. Metodología

2.1 Manejo y cuidado de ratones

Se utilizaron ratones BALB/cAnNHsd (Harlan-Envigo) hembra de entre 5 y 6 semanas de edad, los cuales se reprodujeron en el CICESE y se alimentaron *ad libitum* con agua y alimento sólido (LabDiet). Los ratones se mantuvieron en jaulas con una cama compuesta por virutas de madera de Aspen para experimentos de laboratorio (Nepco o Harlan-Envigo) que fue cambiada cada 14 días. El medioambiente de las jaulas fue enriquecido añadiendo un rollo de cartón y un pañuelo de papel, los cuales eran renovados con cada cambio de caja. Los ratones se mantuvieron en una habitación a 22 °C y ciclos controlados de 12 horas luz/ 12 horas oscuridad y fueron manipulados y sacrificados de acuerdo a los lineamientos establecidos por la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999.

Para la reproducción de los ratones se utilizó un sistema de harem en donde se colocaron 1 macho con 2 a 3 hembras en una caja. El macho fue retirado de la caja una semana después de colocar el empadre y las hembras fueron separadas dos semanas y media después. Tres semanas después del nacimiento, las crías se separaron de la madre. Para determinar el número de machos y hembras requeridos para cada empadre por objetivo específico, se tomaron en cuenta los siguientes criterios: el número de ratones hembra necesarios en cada experimento (considerando que la proporción sexual de las crías por camada es de 1:1), el porcentaje de hembras embarazadas del total de madres (80%), el número promedio de crías por camada (6 a 7 crías) y el porcentaje de supervivencia de las crías durante los experimentos (90%).

2.2 Cultivo celular

Se utilizó la línea celular 4T1 (ATCC CRL-2539) derivada de un tumor de cáncer de mama espontáneo de un ratón de la cepa BALB/cfC3H. La línea celular se cultivó en un medio completo usando RPMI 1640 (Corning Cellgro) suplementado con 10% (v/v) de suero fetal bovino (SFB) (v/v) (Biowest) y 1% de antibiótico/antimicótico (Corning Cellgro), incubando a 37°C en una atmósfera húmeda de 5% CO₂. Cuando los cultivos celulares estuvieron confluentes se realizaron sub-cultivos. Para esto, las células fueron tripsinizadas con una solución de tripsina/EDTA (0.05% tripsina y 10mM EDTA, Corning Cellgro) a 37°C. La reacción se detuvo después de 4 minutos (o hasta que las células comenzaron a desprenderse de la caja

de cultivo) añadiendo medio RPMI 1640 completo. Las células luego se diluyeron 1:10 con medio completo y se sembraron en cajas de cultivo nuevas.

Para la criopreservación de las células, un cultivo celular confluyente se tripsinizó como se describió previamente y posteriormente fue centrifugado a 800 g por 5 minutos a temperatura ambiente. Los pellets celulares se resuspendieron en medio suplementado con DMSO (5% v/v). La suspensión celular se transfirió a crioviales y estos se colocaron en un contenedor con isopropanol para su congelación a -80 °C. Pasadas 24 horas los crioviales se transfirieron a criocajas normales.

2.3 Preparación de células 4T1 para inoculación

El día anterior a la inoculación se realizó un cambio de medio de cultivo. El día de la inoculación se realizaron dos lavados a las células con 6 mL de PBS (1X), se tripsinizaron con 1.5 mL de tripsina/EDTA y posteriormente se neutralizó la reacción con 3.5 mL de medio RPMI 1640. La suspensión celular se lavó dos veces con PBS (1X) frío y se centrifugó a 200 g por 10 min a 4 °C. El número de células se contó mediante tinción con azul tripano en una cámara de Neubauer y se ajustó a una concentración de 10^5 células/25 μ L de PBS (1X).

2.4 Formación de tumores primarios de cáncer de mama en los ratones

Se utilizó un modelo ortotópico de cáncer de mama, los ratones Balb/c hembra de 6 semanas de edad, fueron inoculados con 10^5 células 4T1/25 μ L de PBS (1X) en la cuarta glándula mamaria izquierda y derecha utilizando una jeringa de 300 μ L con una aguja de 30 G. La línea celular 4T1 se aisló de un tumor de cáncer de mama de un ratón Balb/c, por lo que el modelo de cáncer es singénico ya que las células se inocularon en ratones de la misma cepa de la que fueron aisladas.

2.5 Inoculación intracardiaca para modelo de metástasis ósea

Antes de la inoculación, los ratones fueron anestesiados vía intraperitoneal con ketamina 100 mg/kg y xilacina 10 mg/kg y se les depiló el área torácica. El ventrículo izquierdo del corazón se localizó utilizando como punto de referencia el punto medio entre el principio y final del esternón. A continuación se inocularon células de la línea 4T1 (10^5 células/100 μ l de PBS (1X)) en el ventrículo izquierdo del corazón (Mohammad et al., 2011) utilizando una jeringa de 1 mL con aguja 25 G. Después de retirar la jeringa se presionó el área inoculada para prevenir hemorragias. Luego de la inoculación los ratones se colocaron sobre un tapete térmico para evitar hipotermia y recibieron hidratación en los globos oculares con ungüento oftálmico e inyección intraperitoneal de PBS (1X) para hidratar y disminuir el efecto de la anestesia. Al despertar, los ratones se trasladaron a sus jaulas.

2.6 Medición de los tumores primarios de cáncer de mama

El crecimiento de los tumores fue monitoreado 3 veces por semana. Se midió el ancho (A) y largo (L) de los tumores con un calibrador Vernier. El volumen de los tumores (V) se calculó con la fórmula $V = \frac{(LxA^2)}{2}$. Los ratones fueron sacrificados a más tardar 4 semanas después del desafío tumoral, o si los tumores alcanzaban un volumen de 1000 mm³ o presentaban necrosis. Los ratones se sacrificaron por sobredosis de pentobarbital (150 mg/kg) o por inhalación de CO₂ y luego se realizaba una dislocación cervical, posteriormente los tumores fueron recolectados, medidos y pesados.

2.7 Obtención y digestión de tumores de células 4T1

Se inocularon ratones Balb/C hembras de 6 semanas de edad con 10^5 células 4T1/25 μ L de PBS (1X) como se describió previamente. Aproximadamente 4 semanas después de la inoculación los ratones fueron sacrificados y se colectaron los tumores utilizando pinzas y bisturí. Para preparar las suspensiones de células tumorales se siguió el protocolo de Leelatian et al. (2018), brevemente: los tumores se pesaron y se cortaron en pequeños fragmentos con una hoja de afeitar. Los fragmentos se transfirieron a tubos de 50 mL y se homogeneizaron con 2.35 mL de medio RPMI 1640 y 50 μ L de DNAsa I (10,000 Kunitz/mL, Sigma) por cada 0.25 cm³ de tumor. Se probaron diferentes concentraciones de colagenasa II de

Clostridium histolyticum (125-898 CDU/mL, Sigma) y tiempos de incubación de 30 o 60 minutos a 37 °C en baño María. Después de la incubación se separaron los fragmentos no digeridos utilizando un filtro de 70 µm de tamaño de poro. Las suspensiones celulares se pasaron a tubos de 15 o 50 mL y se centrifugaron a 400 g por 10 minutos a 4 °C. El pellet celular se resuspendió en una solución de lisis de eritrocitos (NH₄Cl 155 mM, NaHCO₃ 10 mM y EDTA 1 mM) que induce la lisis celular de los eritrocitos por efecto osmótico y la acumulación intracelular de NH₄. Esta suspensión se incubó por 2 minutos a temperatura ambiente y posteriormente se añadió un volumen de PBS (1X) para detener la reacción. Se centrifugó a 400 g por 10 minutos a 4 °C y se retiró el sobrenadante. El pellet fue resuspendido en RPMI 1640 y se contaron las células viables con azul tripano. Después del conteo las células fueron analizadas por citometría de flujo para cuantificar el porcentaje de células vivas y muertas mediante tinción con yoduro de propidio (1 µg/mL).

2.8 Oxidación de proteínas de células 4T1 con ácido hipocloroso (HOCl)

A partir de células 4T1 tumorales se prepararon alícuotas de 8x10⁵ células/mL y se les añadió el ácido hipocloroso (40 o 75 µM). Se realizaron incubaciones de 30 o 60 minutos a 37 °C en un baño María. Posteriormente las células se centrifugaron a 500 g por 5 minutos a temperatura ambiente y se lavaron 2 veces con PBS (1X). Las células se analizaron por citometría de flujo para diferenciar las células vivas y muertas mediante tinción con yoduro de propidio (1µg/mL) y se ajustaron a una concentración de 10x10⁶ células/mL y se almacenaron a -80 °C hasta su uso.

2.9 Lisis de células 4T1 mediante ciclos de congelación-descongelación

Las células 4T1 obtenidas a partir de la digestión y oxidación de los tumores fueron lisadas mediante cinco ciclos de congelación de 3 minutos en nitrógeno líquido y descongelación por 5 minutos en agua a 55 °C. Posteriormente los lisados fueron centrifugados a 1,800 g por 15 minutos a 4 °C para remover todos los residuos celulares. El sobrenadante se recolectó y se conservó a -20 °C hasta su uso.

2.10 Diferenciación de células dendríticas a partir de células de médula ósea de ratón

Se obtuvieron células de médula ósea por perfusión de los fémures y tibias de los ratones con medio RPMI 1640 completo. Las células se colectaron y fueron centrifugadas a 350 g por 8 minutos a 4 °C. Se retiró el sobrenadante, se agregó 1 mL de solución de lisis de eritrocitos y se incubaron las células 2 minutos a temperatura ambiente antes de añadir 4 mL de PBS (1X) frío para neutralizar la reacción y centrifugar a 350 g por 8 minutos a 4 °C. Se retiró el sobrenadante y las células se resuspendieron en RPMI 1640, se contaron las células vivas con azul tripano y posteriormente se sembraron 2×10^6 células en 1 mL de medio RPMI 1640 completo suplementado con GM-CSF (20 ng/mL, BioLegend) e IL-4 (20 ng/mL, BioLegend) en una placa de 12 pozos y se incubaron a 37°C en una atmósfera húmeda de 5% CO₂ durante 7 días. Los días 3 y 6 se recambió la mitad del medio de diferenciación. El día 7 las células fueron desprendidas de la caja de cultivo utilizando un levantador de células (Corning) para su análisis por citometría de flujo o fueron utilizadas para activarlas con coadyuvantes.

2.11 Inducción de la maduración de las células dendríticas con coadyuvantes

Se diferenciaron células dendríticas como se describió previamente, el día 7 se recuperaron las células y se analizó la cantidad de células dendríticas mediante citometría de flujo. Luego, las células dendríticas fueron pulsadas a una razón 1:3 (CD:4T1) con los lisados de células 4T1 generados a partir de tumores. Posteriormente se añadieron al cultivo los diferentes coadyuvantes (Tabla 1). Las células se mantuvieron en cocultivo con los coadyuvantes y los lisados durante 48 horas en una atmósfera húmeda de 5% CO₂. Pasado este tiempo se colectaron las células utilizando un levantador de células (Corning) y se analizó su activación por citometría de flujo.

Tabla 1. Lista de coadyuvantes y concentraciones utilizadas para la activación de las células dendríticas.

Coadyuvante	Fuente y detalles del coadyuvante	Concentraciones
Defensor 1	Vacuna contra la rabia, uso veterinario, Zoetis. México.	1.25% – 5 % (v/v)
Vanguard Plus 5/CV-L	Vacuna contra distemper, adenovirus tipo 2, coronavirus, parainfluenza, parvovirus canino, <i>Leptospira canicola</i> y <i>L. icterohaemorrhagiae</i> , uso veterinario, Zoetis, México.	1.25% – 5 % (v/v)
Partículas virales de CCMV	Virus completo, CNYN-UNAM	25 – 100 µg/mL
Partículas virales de BMV	Virus completo, CNYN-UNAM	25 – 100 µg/mL
Lipopolisacárido de <i>E. coli</i> O26:B6	Sigma-Aldrich L8274	0.5 - 1 µg/mL

2.12 Preparación de vacunas autólogas con células dendríticas

Se generaron células dendríticas a partir de cultivos de células de médula ósea como se describió previamente. En resumen, 27.5×10^6 células de médula ósea fueron sembradas en 14 mL de RPMI-SFB (10% v/v) suplementado con GM-CSF (20ng/mL) y IL-4 (20ng/mL) en 4 cajas de cultivo de 10 cm y se cultivaron en una atmósfera húmeda con CO₂ (5%). Los días 3 y 6 se recambió la mitad del medio de cultivo. El día 7 las células fueron pulsadas con lisados 4T1 a una tasa 1:3 (CD:4T1) y fueron tratadas con los coadyuvantes respectivos para su activación: Vacuna Vanguard Plus 5 CV-L (2.5% v/v, Zoetis) y/o LPS de *E. coli* O26:B6 (1µg/mL, Sigma). 48 horas después de la activación con los coadyuvantes, se desprendieron las células utilizando un levantador de células (Corning), se contaron con azul tripano y se ajustó una dosis de 1×10^6 células dendríticas/200µL de PBS (1X). Los ratones recibieron las dosis de la vacuna mediante una inyección por vía subcutánea en los flancos dorsales, los días 10 y 16 o 10 y 18 después de la inoculación con células 4T1 en las glándulas mamarias.

2.13 Preparación de células para citometría de flujo

Para analizar muestras de células por citometría de flujo, se preparó una suspensión de entre 125,000 a 500,000 células 4T1 o de células de bazo, tumor o sangre de los ratones. Posteriormente se les añadió un volumen de 500 µL de solución amortiguadora de aislamiento (Solución FACS: PBS (1X), BSA (0.1% w/v), EDTA (2mM), H₂O). Las células se mantuvieron en hielo y luego se centrifugaron a 350 g por 5 minutos a 4 °C, luego se retiró el sobrenadante y se añadieron 40 µL de solución de bloqueo (SFB (10% v/v), anti-CD16/32 de ratón (1µg/10⁶ células), Solución FACS (1X)) durante 10 minutos a temperatura ambiente. La incubación con la solución de bloqueo evita la unión inespecífica de los receptores CD16/32 con la fracción cristalizable (Fc) de los anticuerpos. Después del bloqueo las células se tiñeron durante 45 minutos a 4 °C con los anticuerpos correspondientes (Anexo, Tabla 3). Pasada la incubación se añadieron 500 µL de solución FACS fría y las muestras se centrifugaron a 350 g durante 8 minutos a 4 °C, se retiró el sobrenadante y las células se resuspendieron en 600 µL de solución FACS fría. Por último, las muestras se analizaron en un citómetro de flujo Attune Acoustic (Thermo Fisher Scientific).

2.14 Análisis por citometría de flujo

La citometría de flujo es una técnica que permite analizar poblaciones celulares mediante la identificación de características morfológicas (como tamaño y granularidad) o por la presencia de marcadores en las células (como proteínas) que pueden ser reconocidos con el uso de distintos anticuerpos acoplados a fluoróforos. Para los análisis de las diferentes poblaciones celulares se utilizó el citómetro de flujo Attune Acoustic (Thermo Fisher Scientific). La estrategia de análisis fue la siguiente: primero se seleccionaron los singletes de células, graficando la altura contra el área de la señal FSC y se eligieron eventos que mostraron un aumento lineal de altura y área. Esos eventos se etiquetaron como “singlets FSC” y se utilizaron para subgraficar (mediante una gráfica de densidad) la altura contra el área de la señal de SSC. Los eventos que mostraron un aumento lineal de altura y área se etiquetaron como “singlets SSC”. Los “Singlets SSC” se subgraficaron en una gráfica de densidad con el área SSC contra el área FSC, para discriminar los residuos celulares, las células se etiquetaron como “Cells” y estas se subgraficaron en gráficas de densidad o histogramas de las poblaciones que interesaba analizar por la expresión de marcadores en cada uno de los experimentos (Figura 4, 5 y 6).

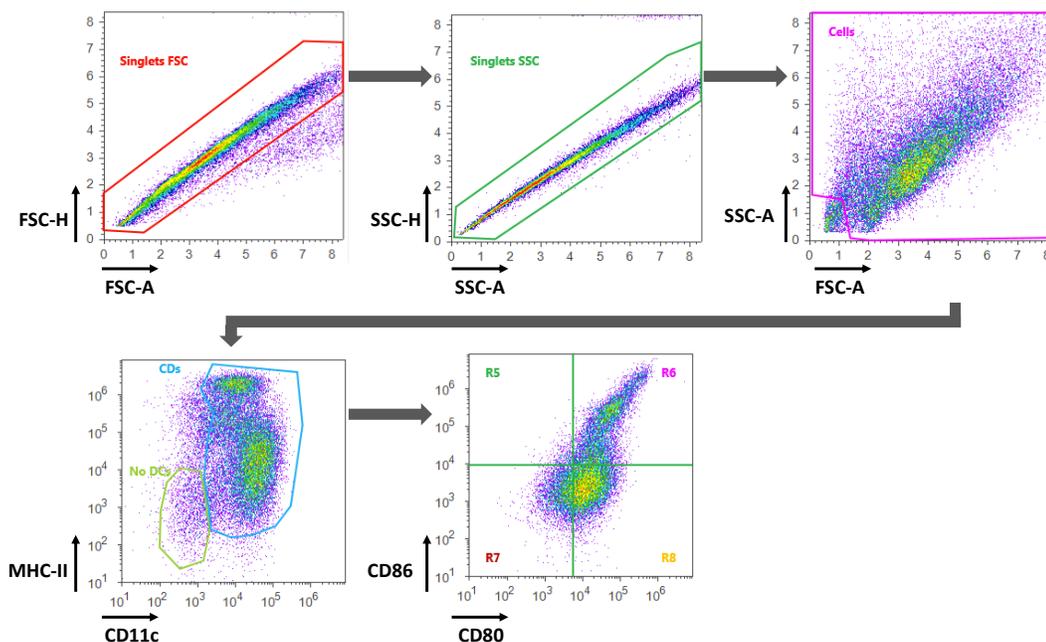


Figura 4. Estrategia de análisis de las células dendríticas por citometría de flujo. Se observan gráficas de densidad donde se pueden identificar en orden: los singlets FSC, los singlets SSC, las células totales de la muestra analizada, las células dendríticas dentro de la muestra analizada por la expresión de los marcados CD11c y MHC II y por último los niveles de activación de las células dendríticas por la expresión de CD80 y CD86.

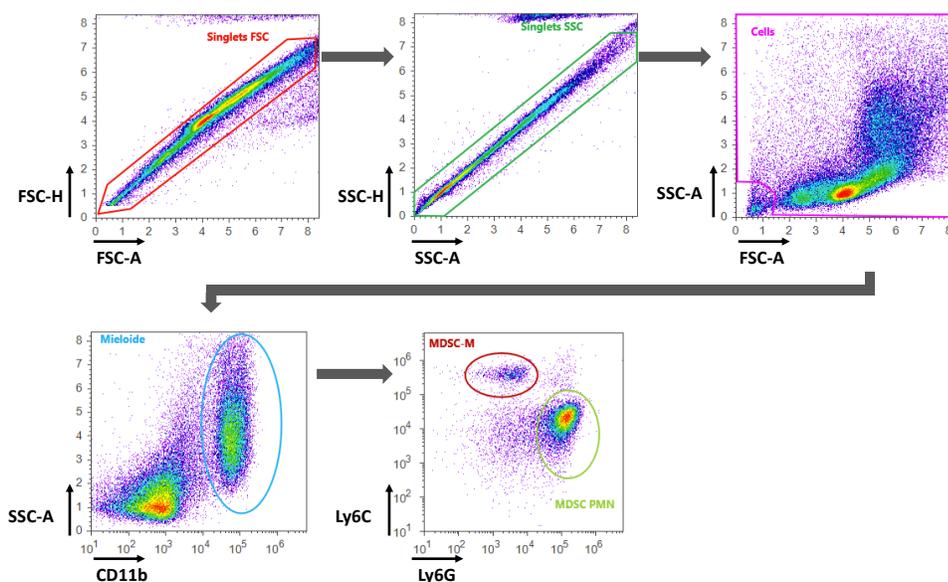


Figura 5. Estrategia de análisis de las células supresoras derivadas de células mieloides (MDSC) por citometría de flujo. Se observan gráficas de densidad donde se pueden identificar en orden: los singlets FSC, los singlets SSC, las células totales de la muestra analizada, las células mieloides dentro de la muestra analizada por la expresión del marcador CD11b y las poblaciones de MDSCs Monocíticas y Polimorfonucleares por la expresión de los marcadores Ly6C y Ly6G.

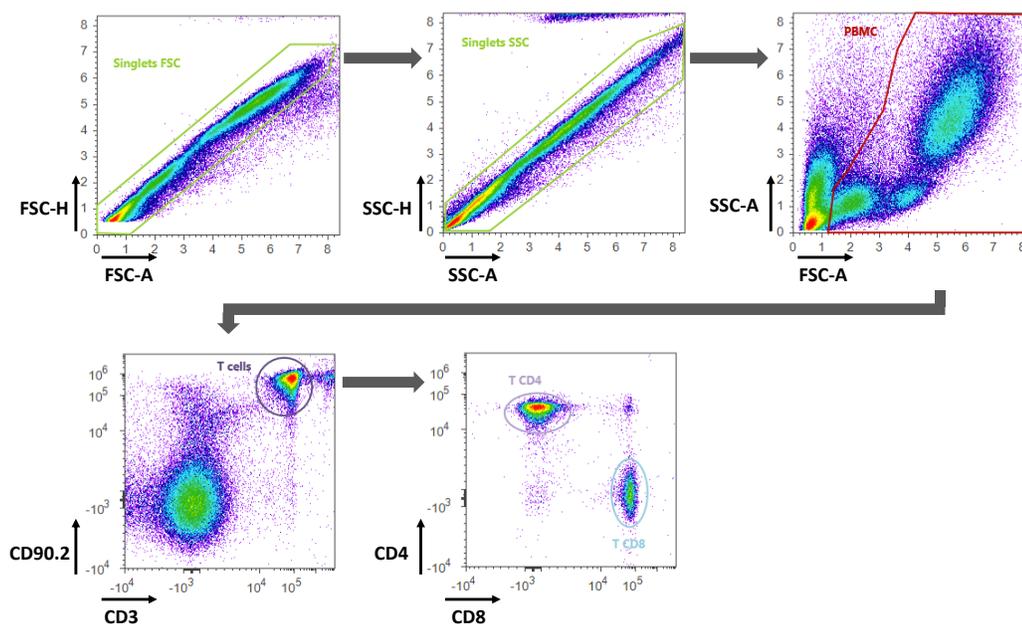


Figura 6. Estrategia de análisis de los linfocitos, linfocitos T CD4⁺ y linfocitos T CD8⁺ por citometría de flujo. Se observan gráficas de densidad donde se pueden identificar en orden: los singlets FSC, los singlets SSC, las células totales de la muestra analizada, los linfocitos T dentro de la muestra analizada por la expresión de los marcadores CD90.2 y CD3 y las poblaciones de linfocitos T CD4⁺ y linfocitos T CD8⁺ por la expresión de los marcadores CD4 y CD8.

2.15 Titulación de anticuerpos

Para la titulación de los anticuerpos anti-CD11c y anti-MHC II se diferenciaron células dendríticas durante 7 días como se describió anteriormente. El día 7 las células fueron colectadas y se realizó un conteo con azul tripano. Se ajustó una suspensión celular de 250,000 células y se tiñeron con las diferentes diluciones de los anticuerpos anti-CD11c FITC (desde 31.25 ng/10⁶ células hasta 250 ng/10⁶ células) y anti-MHC II PE-Cy7 (desde 7.5 ng/10⁶ células hasta 60 ng/10⁶ células) siguiendo el protocolo para preparación de células por citometría de flujo.

Para la titulación de los anticuerpos anti-CD86 y anti-CD80, primero se obtuvieron células de bazo de un ratón Balb/c y estas se cultivaron durante 48 horas en medio RPMI 1640 10% SFB suplementado con LPS (1µg/mL) para inducir la activación de las células. 48 horas después, las células fueron colectadas y se tiñeron con diferentes diluciones de los anticuerpos (desde 7.5 ng/10⁶ células hasta 60 ng/10⁶ para cada uno de los tres anticuerpos). Posteriormente fueron analizadas por citometría de flujo.

2.16 Tratamientos con 5-fluorouracilo

A los ratones que habían recibido una inoculación intracardiaca con células 4T1 o habían recibido inoculaciones en las glándulas mamarias izquierda y derecha, se les suministraron distintas dosis de 5-fluorouracilo (50 mg/kg, 25 mg/kg o 10 mg/kg, diluyente: PBS (1X) DMSO 1%) o un tratamiento placebo (PBS (1X) DMSO-1%), cada tercer día a partir de la inoculación intracardiaca o a partir del día 14 después de la inoculación en las glándulas mamarias y hasta el día de su eutanasia. Al final de los experimentos los ratones fueron sacrificados por sobredosis de pentobarbital (150 mg/kg) y dislocación cervical, se colectaron los bazos y se obtuvieron las células de médula ósea o células tumorales. Las suspensiones celulares se utilizaron para el análisis por citometría de flujo de las poblaciones de MDSCs y su capacidad de producir especies reactivas de oxígeno (ROS) y la producción de óxido nítrico (NO). En breve, 2.5x10⁵ células fueron puestas en cultivo en presencia de DAF-2 diacetate (1.25 µM, Cayman Chemical) para detección de NO en MDSCs Mon, y 5x10⁵ células se cultivaron en presencia de CellRox-Orange (2.5 µM, Invitrogen) para detección de ROS en MDSCs PMN, durante 30 minutos a 37 °C. Después de la incubación, las células fueron lavadas con solución FACS fría y luego fueron bloqueadas y teñidas con los anticuerpos correspondientes (Anexo, Tabla 3) para el análisis de cada población celular por citometría de flujo como fue descrito previamente.

2.17 Medición de anticuerpos anti-4T1 en plasma de ratones

En los experimentos en los que se suministraron las vacunas con células dendríticas, se realizó un análisis de los anticuerpos anti-4T1 circulantes. Para esto, se recolectó sangre periférica (~70 μ L) del seno retro-orbital de los ratones con un capilar de vidrio con heparina, 3 días antes de la inoculación con células 4T1 y 3 días antes del fin de los experimentos. Después de la recolección, la sangre se centrifugó a 2,000 g por 15 minutos a 4°C para separar el plasma de los componentes celulares. El plasma fue almacenado a -20 °C hasta la realización del ELISA (Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay).

Pozos de placas de 96 pozos para ELISA (Nunc MaxiSorp) fueron recubiertos con 10 μ g de proteína de lisados de células 4T1 durante 1 noche a 4°C. Los pozos para la curva estándar se recubrieron con diluciones de IgG de suero de ratón no inmunizado (Jackson Immunoresearch Laboratories) desde 0.041 μ g/mL hasta 10 μ g/mL durante 1 noche a 4°C. Después de cada incubación, los pozos se lavaron tres veces con una solución de PBS-Tween 20 (0.05%). Se realizó un bloqueo con una solución de BSA (1% p/v) en PBS (1X) durante 2 horas. Se agregaron 100 μ L de plasma de los ratones diluido (1:15) en PBS-Tween 20 (0.05%) BSA (0.1% p/v) y se incubó por 90 minutos a 37° C. Se agregó un anticuerpo anti-IgG de ratón conjugado a una peroxidasa (Sigma) diluido (1:10,000) en PBS-Tween 20 (0.05%) y se incubó durante 2 horas a 37 °C. Posteriormente se agregó una solución de sustrato de peroxidasa 3,3', 5,5'-tetrametilbencidina (TMB, BioLegend) y se incubó durante 10-15 minutos a 37°C, la reacción se detuvo agregando 50 μ L de HCl (2M) y se leyó la densidad óptica a 450 nm, con un lector de placa Epoch (Biotek). Cada muestra se analizó por duplicado.

2.18 Análisis estadístico

Para evaluar la normalidad de los datos se aplicó una prueba de normalidad D'Agostino-Pearson o Shapiro-Wilk. Se utilizó una prueba paramétrica *t* de Student (cuando hubo una sola variable y 2 grupos), ANOVA de una vía (si hubo una variable y ≥ 3 grupos) o ANOVA de dos vías (si hubo ≥ 2 variables y ≥ 2 grupos). Todos los datos se analizaron utilizando el programa computacional GraphPad Prism v6 y los valores de $p \leq 0.05$ se consideraron estadísticamente significativos.

Capítulo 3. Resultados

3.1 Optimización de condiciones de digestión de tumores

Se optimizó un protocolo de digestión con colagenasa, con el fin de obtener una suspensión de células tumorales de buena calidad y en cantidades suficientes para realizar el pulsado de las células dendríticas que se utilizaron en el proyecto. Se probaron diferentes concentraciones de colagenasa (125-898 CDU/mL) y tiempos de incubación (30 y 60 minutos).

Mediante el conteo celular con azul tripano, se identificó una mayor cantidad de células por miligramo de tumor con las concentraciones de 466 y 682 CDU/mL (Figura 7). En los resultados de la citometría de flujo se observaron poblaciones bien definidas y similares tanto en morfología, como en el porcentaje de células vivas a partir de los 466 CDU/mL (Figura 7). Esto indica que se pueden obtener cantidades similares de células a partir de una concentración de 466 CDU/mL, sin afectar la viabilidad celular. Se decidió utilizar la concentración de 466 CDU/mL de colagenasa para realizar el resto de las digestiones tumorales.

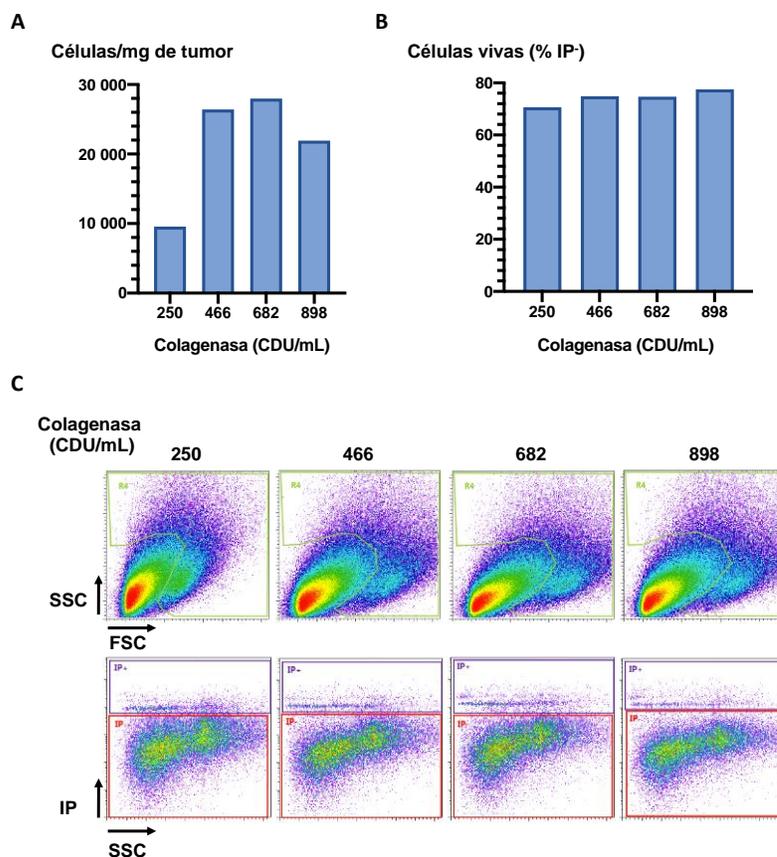


Figura 7. Optimización de la digestión de tumores 4T1 con colagenasa II. A) Cantidad de células por miligramo de tumor obtenidas de la digestión de tumores con diferentes concentraciones de colagenasa II. B) Porcentaje de células vivas (IP⁻) a las distintas concentraciones de colagenasa. C) Gráficas de densidad de las características morfológicas de la población celular a distintas concentraciones de colagenasa. Se muestran los resultados de un experimento. IP, ioduro de propidio.

3.2 Optimización de condiciones de oxidación de células tumorales

La oxidación de células tumorales mediante tratamientos con ácido hipocloroso (HOCl) induce la muerte celular y facilita la internalización de los antígenos tumorales por parte de las CD8 (Tanyi et al., 2018). Con el objetivo de optimizar las condiciones de oxidación de células 4T1 con HOCl, se realizaron cinco experimentos independientes utilizando concentraciones de HOCl (25 μ M-300 μ M), a 37 °C por 30 o 60 minutos.

Al observar las células teñidas con azul tripano, se confirmó que el tratamiento con HOCl induce la muerte celular y que la cantidad de células muertas aumentó conforme aumentó la concentración y el tiempo en que estuvieron bajo el tratamiento (Figura 8).

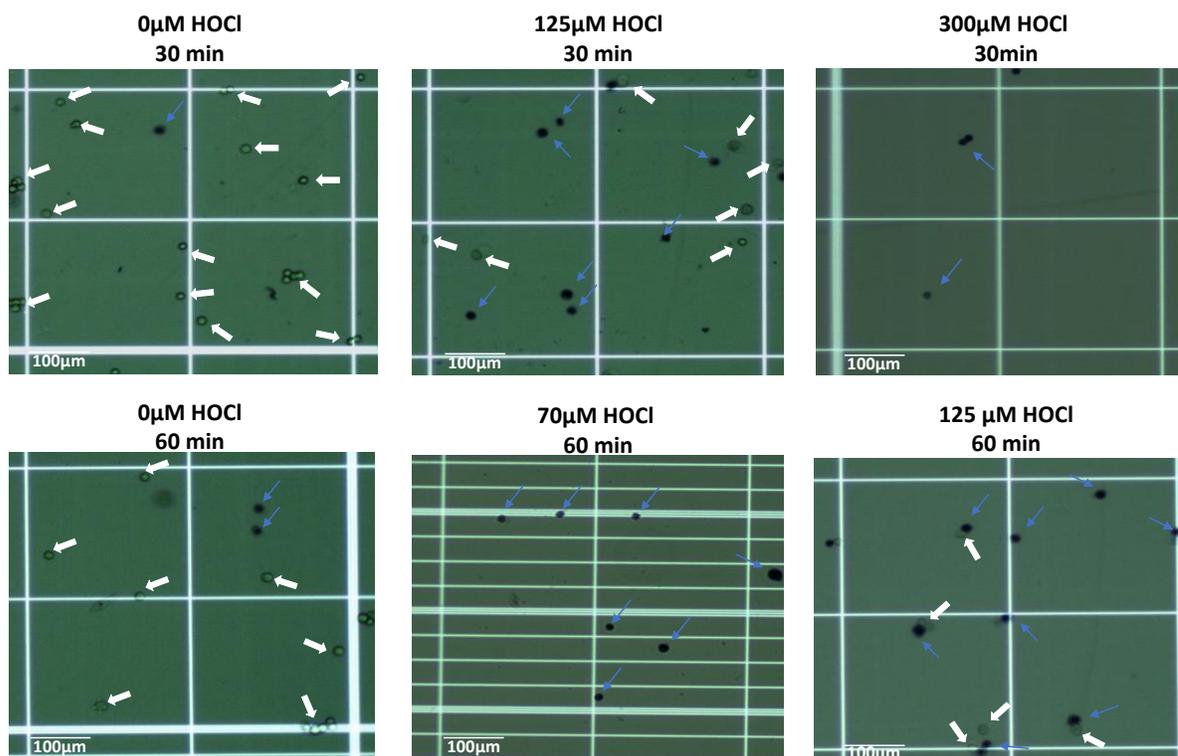


Figura 8. Células 4T1 tratadas con diferentes concentraciones de ácido hipocloroso (HOCl). Fotos representativas de cinco experimentos diferentes. Se observan células 4T1 muertas (teñidas con azul tripano, indicadas con flechas azules) y vivas (indicadas con flechas blancas).

Sin embargo, también se observó que el número de células disminuyó conforme aumentaba la concentración. Esto fue confirmado con el análisis mediante citometría de flujo, donde se identificó que, aunque existían altos porcentajes de células muertas a partir de los 75 μ M, también había una notable

disminución en la concentración celular conforme aumentaban las concentraciones de HOCl, haciéndose más notorio a partir de 100 μM (Figura 9). Este efecto se puede deber a que, a partir de esta concentración, la oxidación de las células fue tan alta que no solo las mataba, sino que las destruía. Se observó que, a una concentración de 75 μM durante 60 minutos de incubación se producía un alto porcentaje de células muertas (78%), sin una pérdida considerable de células por lo que se decidió seguir trabajando con estas condiciones.

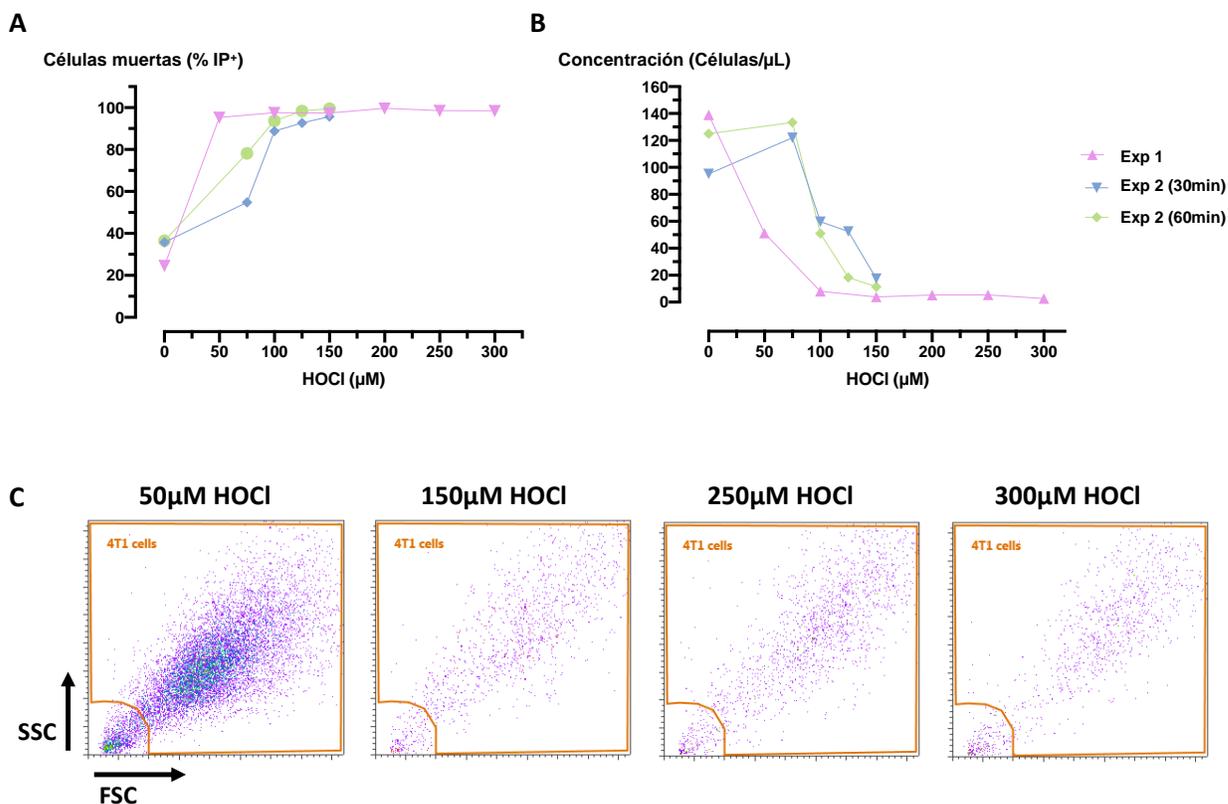


Figura 9. Inducción de muerte de células 4T1 con ácido hipocloroso (HOCl). A) Porcentajes de células 4T1 muertas (IP⁺) a diferentes concentraciones de HOCl (n=1). B) Concentración de las células 4T1 (células/ μL) tratadas con diferentes concentraciones de HOCl (n=1). C) Gráficas de densidad de la población celular bajo diferentes concentraciones de HOCl. IP, Ioduro de propidio.

Estas condiciones se implementaron durante las primeras 5 preparaciones de células tumorales, sin embargo, se observó que se perdían muchas células (un promedio del 58%) entre la digestión de los tumores y el tratamiento con HOCl, probablemente porque las células tumorales ya se encontraban dañadas después del proceso de digestión con colagenasa y muchas eran destruidas en el proceso de oxidación con HOCl. Por tal motivo, se decidió realizar un ensayo probando las concentraciones de HOCl

en las células 4T1 provenientes de tumores, y no de un cultivo celular como se había probado en la optimización del protocolo (Figura 10). En este ensayo se analizaron concentraciones de HOCl de 0-75 μ M, con tiempos de incubación de 30 y 60 minutos. Se encontró que el porcentaje de células muertas y la concentración celular fue similar entre los dos tiempos en que se dieron los tratamientos, y que la concentración celular disminuía a partir de los 50 μ M de HOCl. Con estos resultados, se decidió utilizar una concentración de 40 μ M de HOCl por 30 minutos de incubación y con estas condiciones se realizaron los últimos 3 ensayos para obtención de células tumorales (Tabla 2). Este cambio en la concentración de HOCl para tratar a las células tumorales, permitió reducir la pérdida de células por miligramo de tumor de un 58% a un 33%.

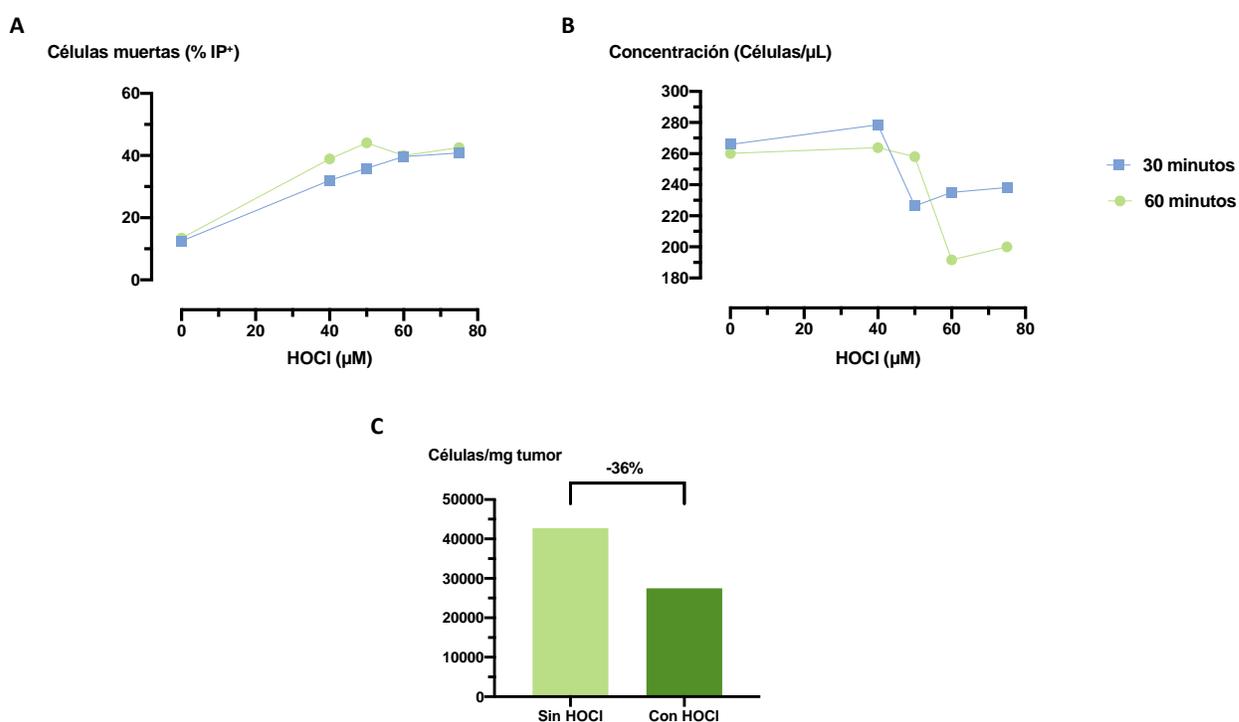


Figura 10. Inducción de muerte de células 4T1 tumorales con ácido hipocloroso (HOCl). A) Porcentajes de células tumorales muertas (IP⁺) a diferentes concentraciones de HOCl. B) Concentración de células tumorales (Células/ μ L) a diferentes concentraciones de HOCl. C) Número de células por miligramo de tumor aplicando la concentración de 40 μ M de HOCl. Se muestran los resultados de un experimento. IP, Ioduro de propidio.

3.3 Preparación de células tumorales

Una vez determinadas las condiciones óptimas para la digestión y oxidación de las células tumorales, se procedió a la inoculación de los ratones con las células 4T1, para la obtención de suspensiones de células tumorales, su posterior lisis y utilización en la preparación de las vacunas con células dendríticas.

Se realizaron 8 experimentos independientes en donde se inocularon un total de 46 ratones con células 4T1. Se obtuvieron 822 millones de células tumorales preparadas, correspondiente, en promedio, a 16,992 células por mg de tumor y se ajustaron a una concentración de 10 millones de células por mililitro (Tabla 2).

Tabla 2. Características de las diferentes preparaciones de células tumorales.

Número de experimento	Ratones inoculados	Masa de tumor (g)	Células después de la digestión ¹	Células después de la oxidación ²	Células preparadas/mg de tumor
1	3	3.89	114.0x10 ⁶	108.0x10 ⁶	27,7634
2	5	6.34	110.7x10 ⁶	64.2x10 ⁶	10,126
3	1	0.63	63.0x10 ⁶	10.4x10 ⁶	16,534
4	8	12.99	313.3x10 ⁶	134.4x10 ⁶	10,343
5	5	4.94	94.0x10 ⁶	67.8x10 ⁶	13,716
6	3	3.61	153.9x10 ⁶	99.0x10 ⁶	27,461
7	9	11.00	301.3x10 ⁶	209.3x10 ⁶	19,030
8	12	11.80	183.3x10 ⁶	129.3x10 ⁶	10,960
Total	46	55.20	1.33x10⁹	822.0x10⁶	n.a.

¹ Suma de células obtenidas a partir de los tumores de los ratones de cada preparación después de la digestión con Colagenasa II.

² Suma de células obtenidas a partir de los tumores de los ratones de cada preparación después de la oxidación con ácido hipocloroso (HOCl).

n.a. no aplica.

3.4 Titulación de anticuerpos

Durante el desarrollo de este proyecto se utilizaron distintos anticuerpos para identificar poblaciones celulares mediante citometría de flujo. En el caso de las células dendríticas se utilizaron los anticuerpos

anti-CD11c y anti-MHC II y para caracterizar su estado de activación los anticuerpos anti-CD80 y anti-CD86. Con el fin de reducir la concentración de anticuerpos recomendada por el fabricante para teñir las células, fue necesario hacer la titulación de los anticuerpos antes mencionados.

Aunque la concentración del anticuerpo anti-CD11c recomendada por el fabricante fue de 250 ng/10⁶ células, una concentración de 125 ng/10⁶ células, permitió obtener una señal similar tanto de intensidad media de fluorescencia como de tasa señal/ruido (Figura 11). Cuando se utilizaron cantidades menores del anticuerpo la señal decreció considerablemente. Debido a esto, para continuar trabajando con este anticuerpo, se seleccionó la concentración de 125 ng/10⁶ células.

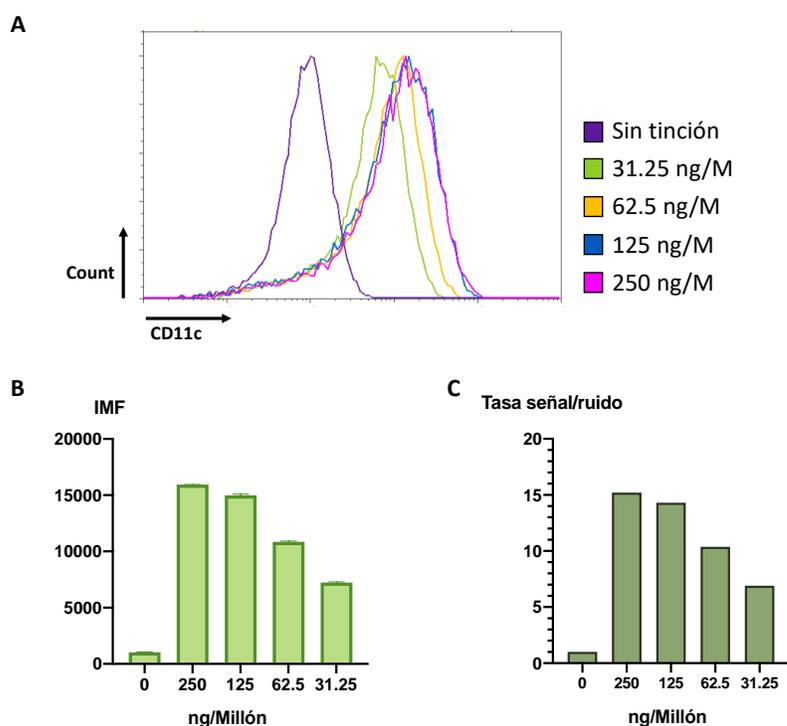


Figura 11. Titulación del anticuerpo CD11c. A) Histogramas de las diferentes diluciones del anticuerpo anti-CD11c. B) Intensidad media de fluorescencia (IMF) de las diferentes diluciones del anti-CD11c, se muestra el promedio \pm EEM. C) Tasa de señal/ruido de las diferentes diluciones del anti-CD11c.

Para el anticuerpo anti-MHC II la cantidad recomendada por el fabricante era de 60 ng/10⁶ células. Una concentración de 30 ng/10⁶ células arrojó una tasa de señal/ruido similar a la obtenida con la concentración recomendada por el fabricante. A pesar de esto, se identificó que con la concentración de 60 ng/10⁶ existe una población más definida de células y más separada de la población autofluorescente, por lo que se decidió trabajar con la concentración de 60 ng/10⁶ (Figura 12).

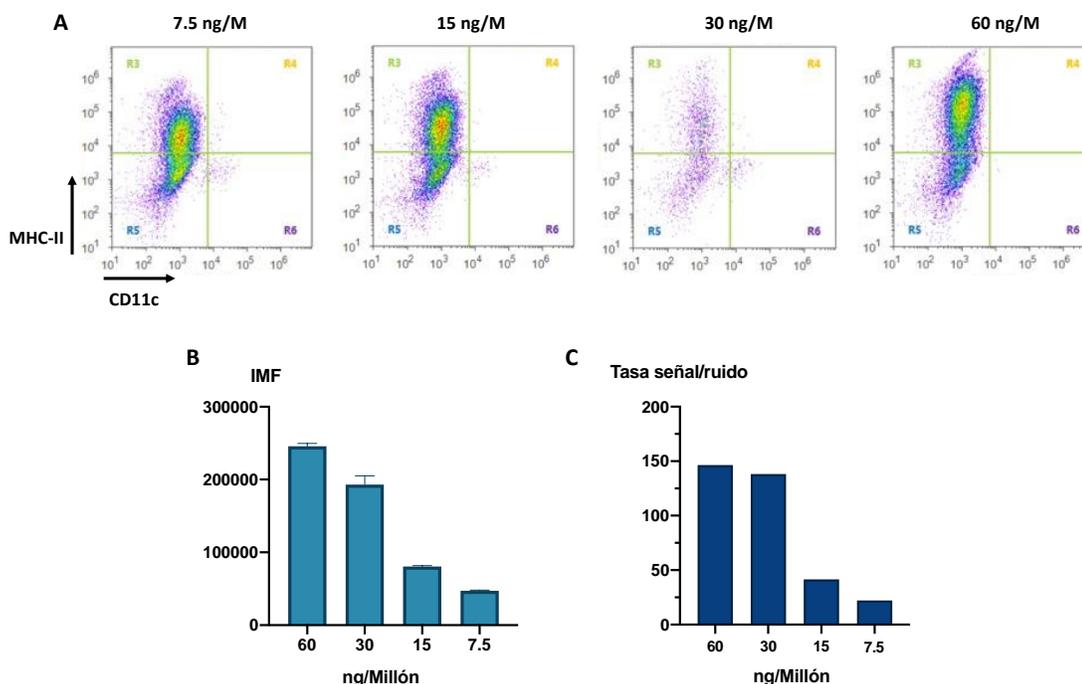


Figura 12. Titulación del anticuerpo MHC II. A) Gráficas de densidad de la población de células MHC II⁺ a las diferentes diluciones del anticuerpo. B) Intensidad media de fluorescencia (IMF) de las diferentes diluciones del anti-MHC II, se muestra el promedio \pm EEM. C) Tasa de señal/ruido de las diferentes diluciones del anti-MHC II.

De manera similar se hizo la titulación de los anticuerpos anti-CD80 y anti-CD86 conjugado con PE-Cy5 o APC. Analizando los histogramas, la intensidad media de fluorescencia y la tasa de señal/ruido, se encontró que los tres anticuerpos podrían diluirse hasta dos veces lo recomendado por el fabricante (60 ng/10⁶ células), por lo que la concentración con la que se siguió trabajando fue de 30 ng/10⁶ células.

3. 5 Cinética de diferenciación de células dendríticas

Al analizar diversos protocolos para diferenciar células de médula ósea a CDs se encontró que la duración del proceso variaba de entre 5 a 9 días (De Vries et al., 2003; Song et al., 2018; Tomasicchio et al., 2019). Para determinar el tiempo óptimo de diferenciación y el porcentaje más alto de CDs, se realizó un ensayo de cinética de diferenciación. Los días 5, 7, 9 y 11 se recolectaron las células y se preparó una suspensión para su análisis por citometría de flujo.

En la Figura 13 se muestran imágenes de las CDs durante el día 1 y 6 del proceso de diferenciación. Analizando los cultivos en el microscopio, se encontró que a partir del día 5 hubo células con la morfología

característica de CDs. Esta morfología también se observó el resto de los días de la cinética. Los días 6, 7 y 9 se observaron confluencias y morfologías similares en los pozos de las cajas de cultivo. Sin embargo, el día 11 se encontraron muchas células flotando en el medio de cultivo, lo que es indicativo de muerte celular. Al analizar las muestras por citometría de flujo se observó que conforme avanzaban los días de diferenciación hubo un incremento en el porcentaje de células dendríticas (CD11c⁺MHC II⁺), con los mayores porcentajes el día 7 (84%) y el día 11 (88%) (Figura 14).

Tomando en cuenta que después de la diferenciación, las células se activarían por 24 o 48 horas con los coadyuvantes, se decidió mantener su diferenciación hasta el día 7, de este modo las células nunca estuvieron más de 9 días en cultivo, lo que redujo el riesgo de tener una menor cantidad de células, como ocurrió al mantener las células en diferenciación hasta el día 11.

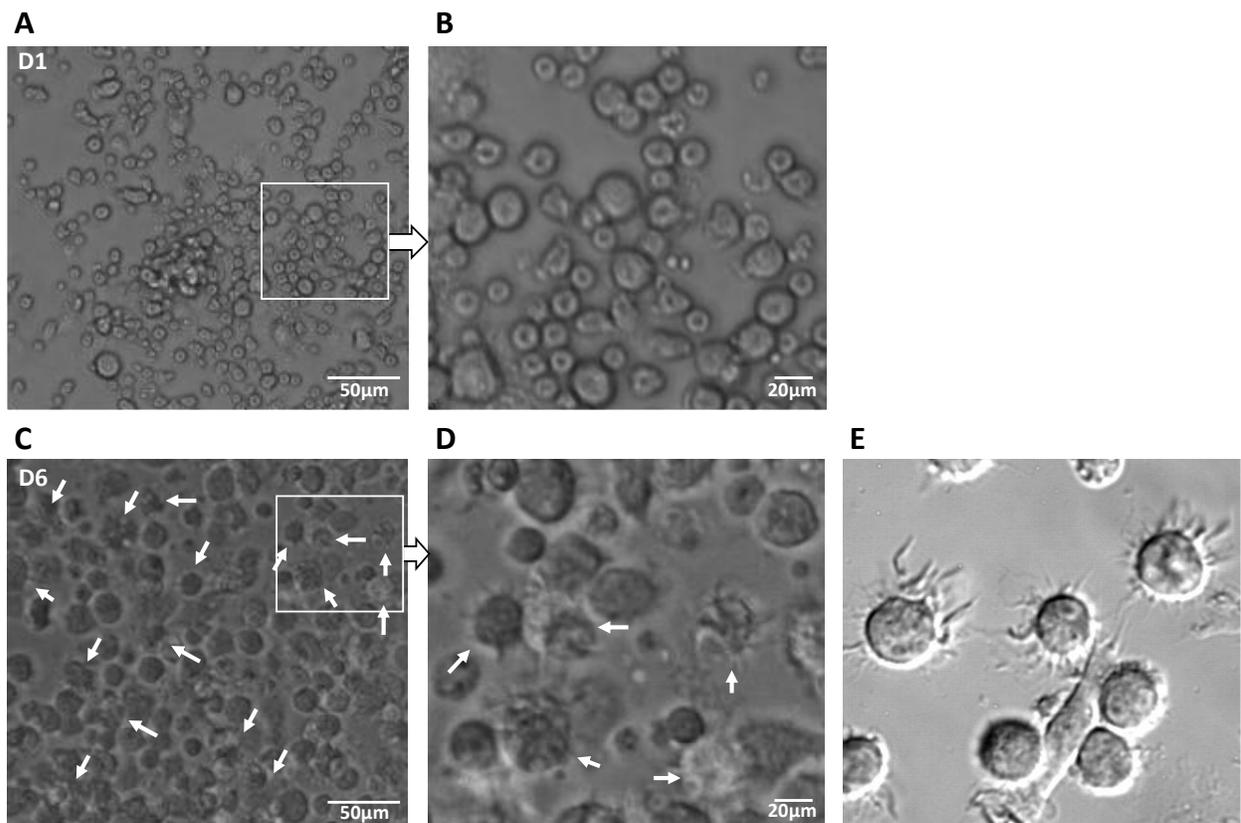


Figura 13. Células de médula ósea de ratón en proceso de diferenciación a células dendríticas. A) Cultivo de CDs derivadas de células de médula ósea el día uno de diferenciación B) Ampliación de la imagen A. C) Cultivo de CDs derivadas de células de médula ósea el día seis de diferenciación, las flechas blancas señalan las CDs. D) Ampliación de la imagen C. E) CDs derivadas de médula ósea el día seis de diferenciación, imagen modificada de Paharkova-Vatchkova et al. (2004).

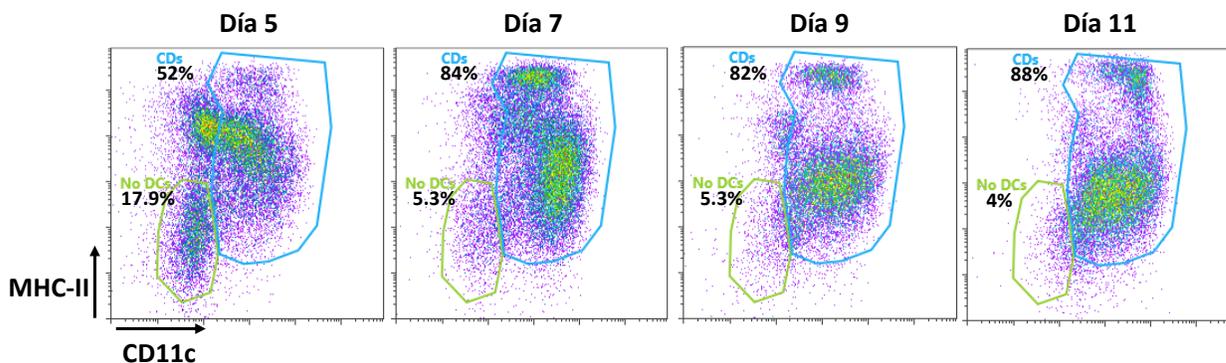


Figura 14. Caracterización de las células dendríticas derivadas de cultivo de médula ósea. Gráficas de densidad de los porcentajes de células dendríticas obtenidos durante la cinética de diferenciación (n=1).

3.6 Condiciones de activación de células dendríticas

Del mismo modo que con la diferenciación de las células dendríticas, diversos protocolos difieren en cuanto al tiempo que las células dendríticas se mantienen en activación (Schreibelt et al., 2010; Song et al., 2018). Se realizó un ensayo para evaluar el efecto de activación de las CDs con LPS por 24 o 48 horas y se analizaron los porcentajes de CDs doble positivas para los marcadores de activación CD80 y CD86 por citometría de flujo.

Se observó que los lisados de células 4T1 por si solos no aumentaron la activación de las CDs (Figura 15). Además, hubo un aumento en la activación de las células tratadas con LPS y las que se trataron con LPS y lisados 4T1 con respecto a las que no se trataron, tanto a las 24 como a las 48 horas. No hubo diferencia entre la activación de las CDs por 24 o 48 horas.

Con este experimento se concluyó que el LPS es efectivo para activar a las células dendríticas y se utilizó como control positivo para los experimentos con las vacunas profilácticas y antígenos de virus de plantas como tratamientos. Debido a que se desconoce la cinética de activación de las CDs con los coadyuvantes, en los experimentos posteriores las CDs se mantuvieron en activación durante 48 horas.

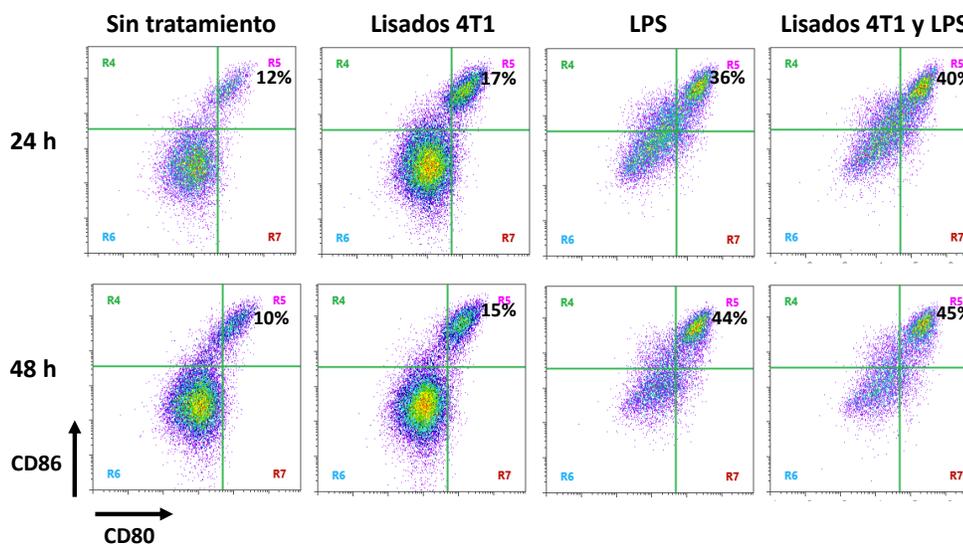


Figura 15. Activación de células dendríticas con LPS durante 24 y 48 horas. Gráficas de densidad de las células dendríticas $CD80^+CD86^+$ bajo los distintos tratamientos y tiempos de activación ($n=1$).

3.7 Efecto de las vacunas profilácticas en la activación de células dendríticas *in vitro*

Como se mencionó anteriormente, algunos autores reportan la capacidad de diversas vacunas profilácticas (BCG, MMR, entre otras) para activar células dendríticas *in vitro* (Schreibelt et al., 2010). Para este experimento se evaluó el efecto de las vacunas profilácticas Defensor 1 (contra la rabia) y Vanguard Plus (contra 7 patógenos) (Anexo, Tabla 4) sobre la activación de las CDs. También se ha reportado la capacidad de algunas partículas virales de plantas, como las del virus de la clorosis moteada del caupí (CCMV, Nuñez-Rivera et al., 2020), de activar macrófagos *in vitro*. Por tal motivo también se decidió evaluar el efecto de las partículas virales de los virus CCMV y del virus del mosaico de Brome (BMV) en la activación de las CDs.

En la Figura 16 se muestra la morfología de las células expuestas a los diferentes tratamientos. Las células que cambiaron más de morfología fueron las tratadas con LPS y con Vanguard Plus. Al observar las células bajo las diferentes concentraciones probadas de Vanguard Plus, se encontró que al 5% (v/v) de la vacuna hubo muchas células muertas en el medio.

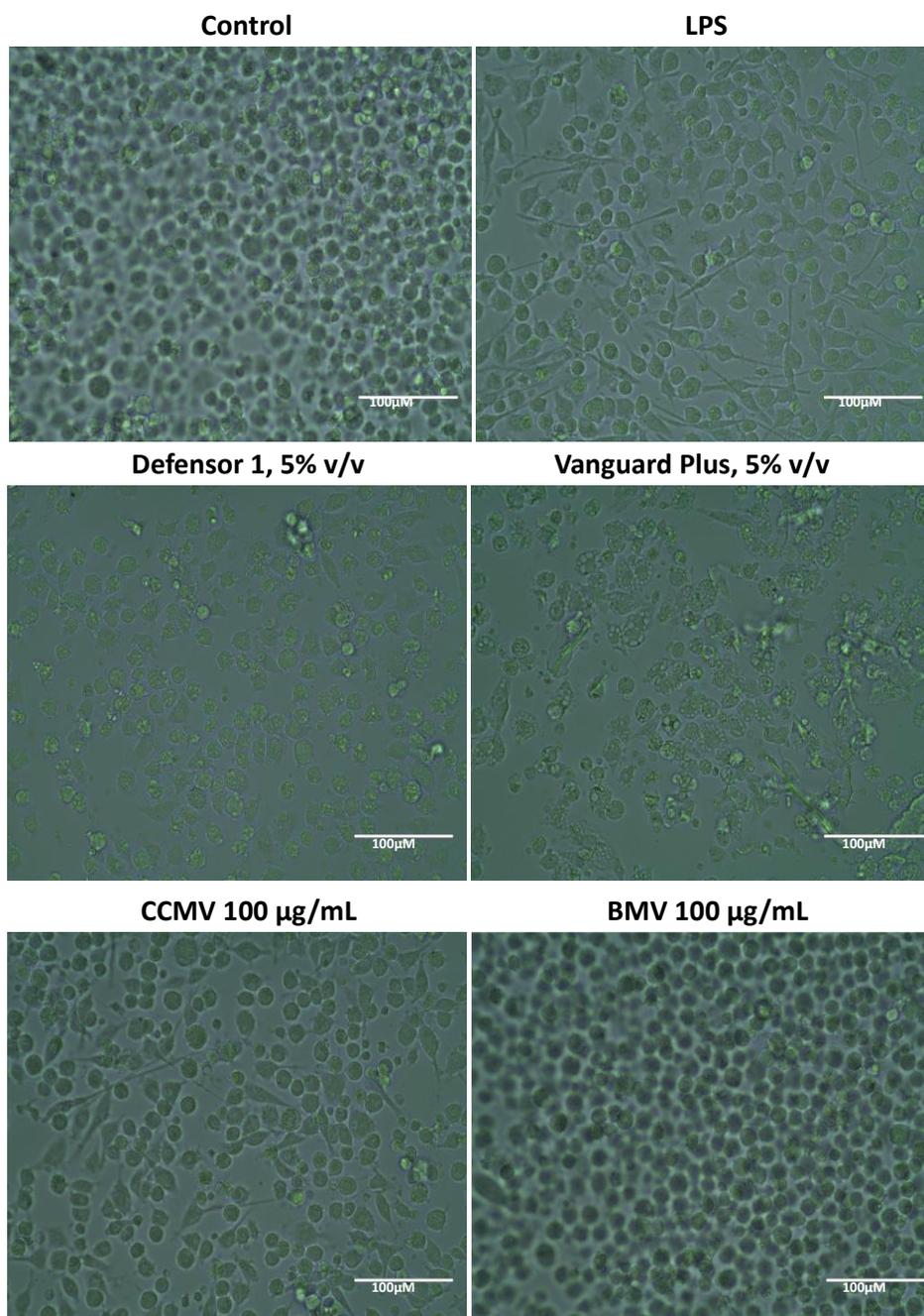


Figura 16. Células dendríticas maduras con los diferentes coadyuvantes. Fotos de las células dendríticas después de 48 horas de activación con cada coadyuvante.

El análisis de los datos de citometría de flujo indicó que ninguna de las partículas virales aumentó los porcentajes de CDs CD80⁺ o CD86⁺ (Figura 17). Por lo que se refiere a las dos vacunas profilácticas analizadas, ninguna aumentó los porcentajes de CDs CD80⁺, pero la vacuna Vanguard Plus fue capaz de aumentar los porcentajes de las CDs CD86⁺ (Figura 17).

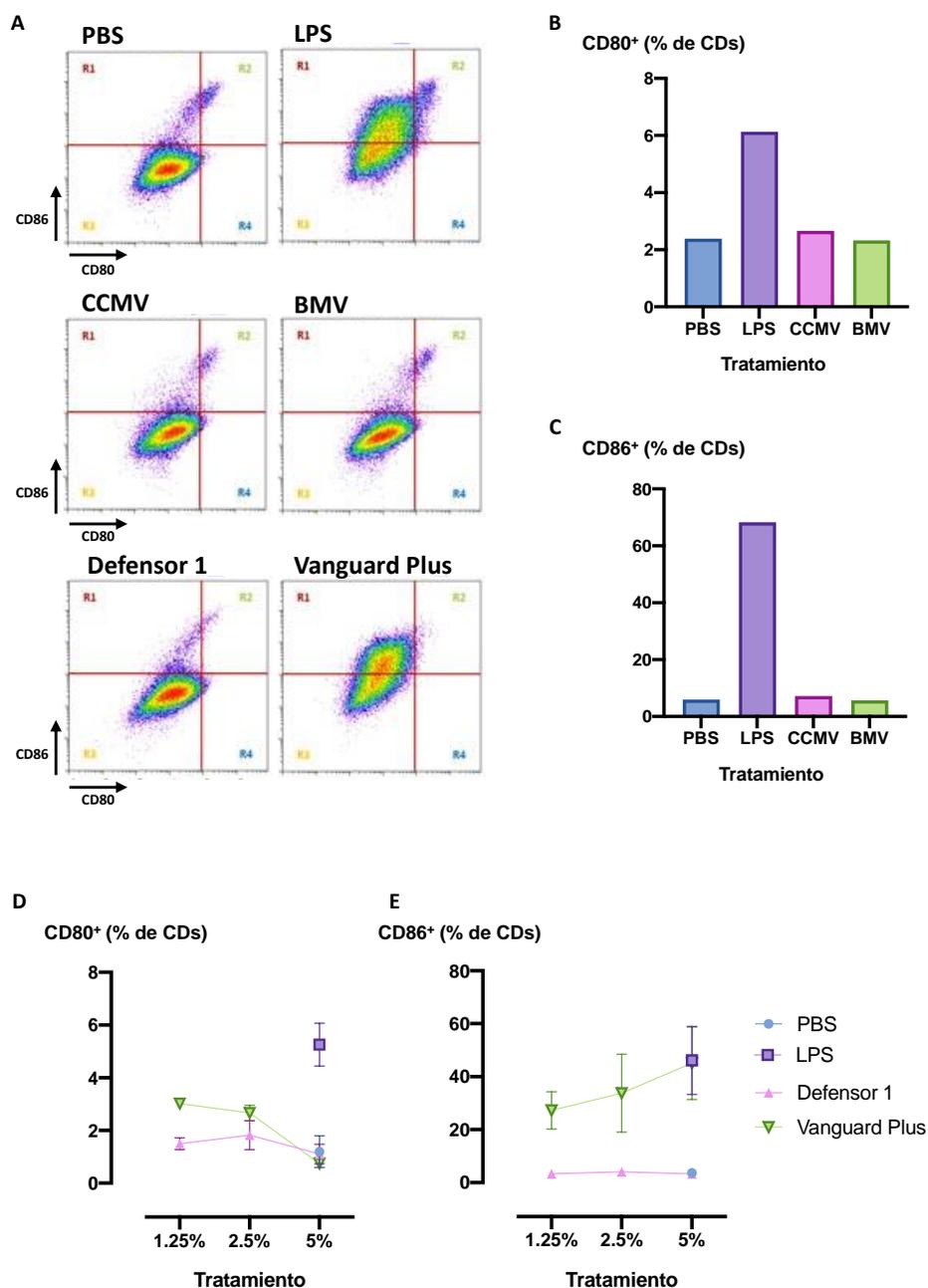


Figura 17. Efecto de diferentes coadyuvantes en la maduración de las células dendríticas *in vitro*. A) Gráficas de densidad de las CDs activadas con los diferentes coadyuvantes, se muestra la concentración más alta de cada tratamiento. B y C) Porcentaje de CDs CD80⁺ y CD86⁺ tratadas con las partículas virales CCMV y BMV (100µg/mL) (n=1). D y E) Porcentaje de CDs CD80⁺ y CD86⁺ tratadas con las diferentes concentraciones de las vacunas profilácticas Defensor 1 y Vanguard Plus, se muestra el promedio ± EEM (n=3). CCMV, *Virus de la clorosis moteada del caupí*; BMV, *Virus del mosaico de Brome*; LPS, *lipopolisacárido*.

Los porcentajes de CDs que expresan CD86 aumentan de manera dependiente a la dosis de la vacuna Vanguard Plus, observándose que, los cultivos celulares tratados con 5% v/v alcanzan casi el mismo nivel de activación que los que recibieron el tratamiento con LPS, el control positivo de activación. Estos

resultados sugieren que la vacuna Vanguard Plus se puede usar para activar a las CDs *in vitro* y posteriormente probarlas en el modelo ortotópico de cáncer de mama. Tomando en cuenta que al activar las células con la concentración de 5% v/v de Vanguard Plus, se observaron muchas células muertas en el medio de cultivo, se decidió trabajar con la concentración de 2.5% v/v de este coadyuvante.

Para averiguar si era posible obtener niveles más altos de activación, se probó una combinación de la vacuna Vanguard Plus (2.5% v/v) con dos concentraciones de LPS (0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ó 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) (Figura 18). La combinación de estos dos adyuvantes aumentó ligeramente los porcentajes de CDs CD86⁺, por lo que se trabajó con la combinación de Vanguard Plus (2.5% v/v) y LPS (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) para los ensayos *in vivo*.

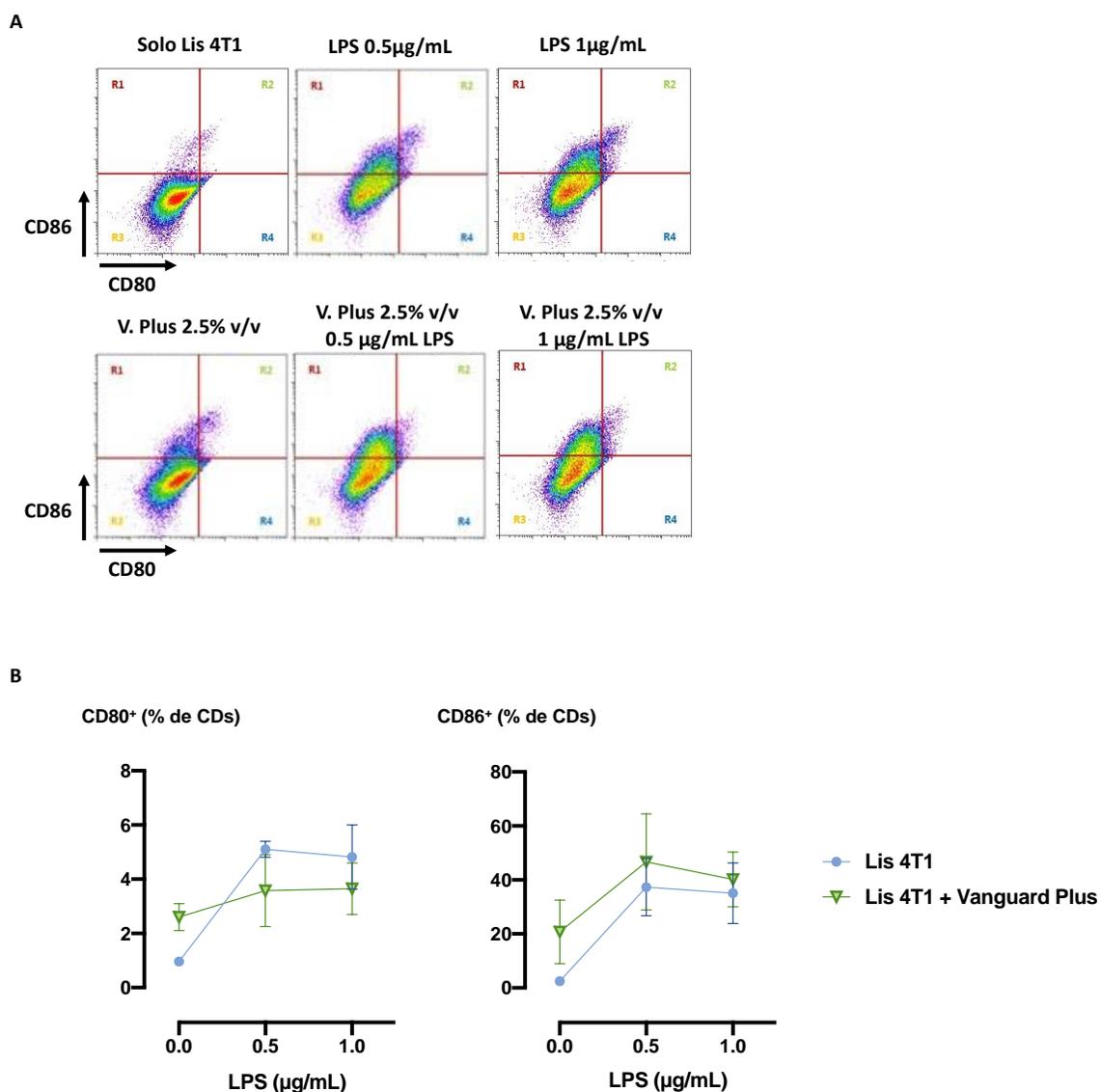


Figura 18. Efecto del tratamiento con Vanguard Plus (2.5 % v/v) y LPS (0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ó 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) sobre la maduración de las células dendríticas *in vitro*. A) Gráficas de densidad de las CDs CD80⁺CD86⁺ con las diferentes combinaciones de V. Plus y LPS utilizados. B) Porcentaje de células dendríticas CD80⁺ y CD86⁺ bajo las distintas combinaciones de tratamientos utilizados, se muestra el promedio \pm EEM (n=2).

3.8 Efecto de la vacunación con células dendríticas activadas en un modelo ortotópico de cáncer de mama

El objetivo de este ensayo fue determinar si la vacunación autóloga con CD's activadas con la vacuna profiláctica Vanguard Plus y LPS (DC-Vax LPS-Vgd) tiene un mayor efecto en la eliminación de los tumores primarios de cáncer de mama, que las CD's activadas solo con LPS (DC-Vax LPS).

Ninguno de los tratamientos con las DC-Vax tuvo efecto en el peso de los ratones, lo que indica que los tratamientos no impactaron negativamente en la salud general de los ratones (Figura 19). Los ratones que recibieron las DC-Vax tuvieron tumores más pequeños comparados con aquellos a los que se les administró el placebo. La vacuna DC-Vax LPS-Vgd redujo significativamente en un 16% los tumores, comparado con el grupo placebo ($p=0.029$) (Figura 19). Además, los tumores de los ratones tratados con las DC-Vax pesaron menos que los tumores de los ratones a los que se les administró el placebo, esta reducción en el peso fue significativa ($p=0.03$) para el grupo tratado con DC-Vax LPS, que disminuyó en un 17%. Los tumores de los ratones tratados con DC-Vax LPS-Vgd disminuyeron su peso en un 13% ($p=0.12$).

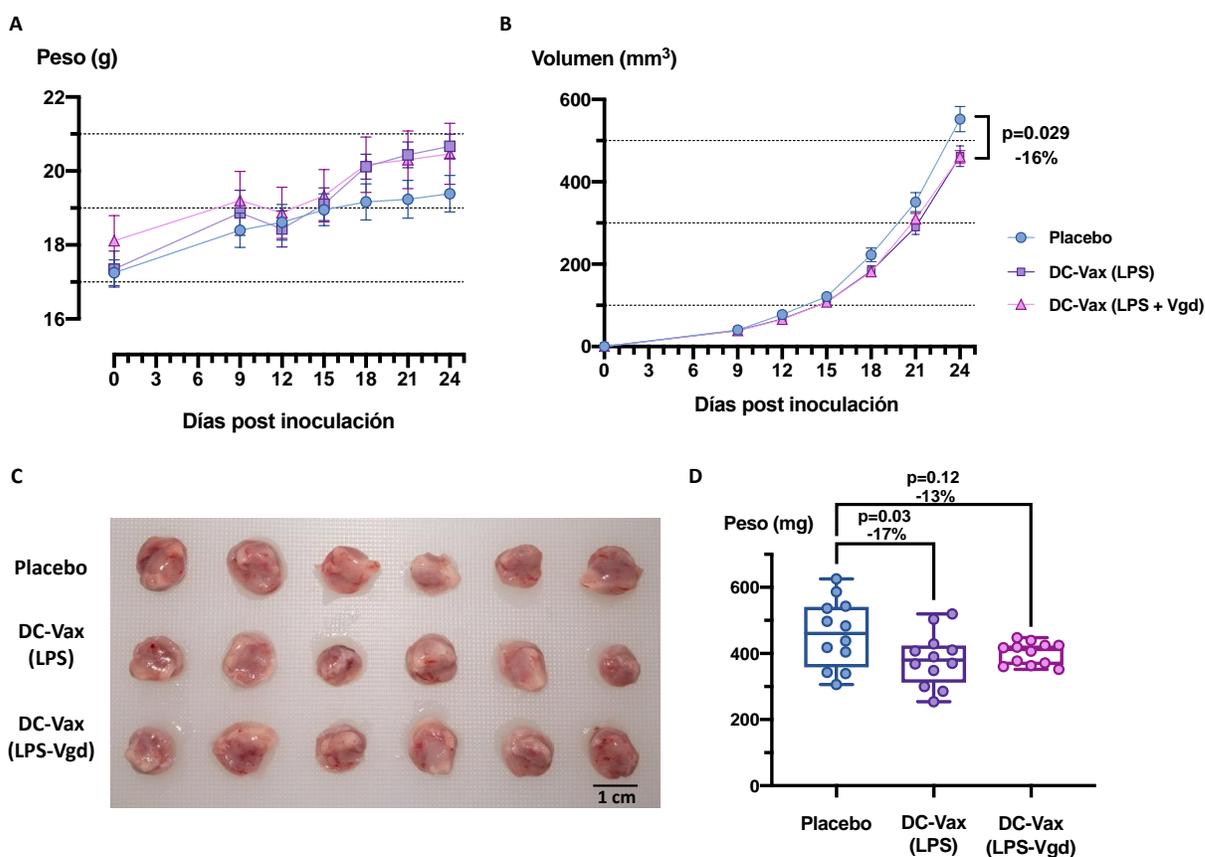


Figura 19. Los tratamientos con DC-Vax redujeron los tumores de cáncer de mama 4T1. A) Pesos promedios (\pm EEM) de los ratones de los distintos grupos a lo largo del experimento ($n=6$). B) Volúmenes promedios (\pm EEM) de los tumores a lo largo del experimento. C) Imagen de los tumores el día de la eutanasia. D) Pesos de los tumores el día de la eutanasia presentados con un diagrama de caja. Los resultados se analizaron usando un ANOVA de dos vías con un post-test de Dunnett (A y B) o un ANOVA de una vía con un post-test de Dunnett (D) ($n=12$).

Se analizaron las poblaciones de linfocitos T ($CD90.2^+CD3^+$), linfocitos T cooperadores ($CD4^+$) y linfocitos T citotóxicos ($T CD8^+$) en sangre y en los tumores de los ratones. No se observaron cambios en los porcentajes de ninguna de las poblaciones de linfocitos T analizadas, ni en la sangre ni en el tumor (Figura 20). También se evaluó la activación de las distintas poblaciones de linfocitos infiltrados en los tumores, mediante el aumento en los porcentajes celulares de los linfocitos $CD62L^-$ y $PD-1^+$. Los tratamientos con las DC-Vax no afectaron la activación de ninguna de las poblaciones de linfocitos T en la sangre ni en los tumores. (Figura 21).

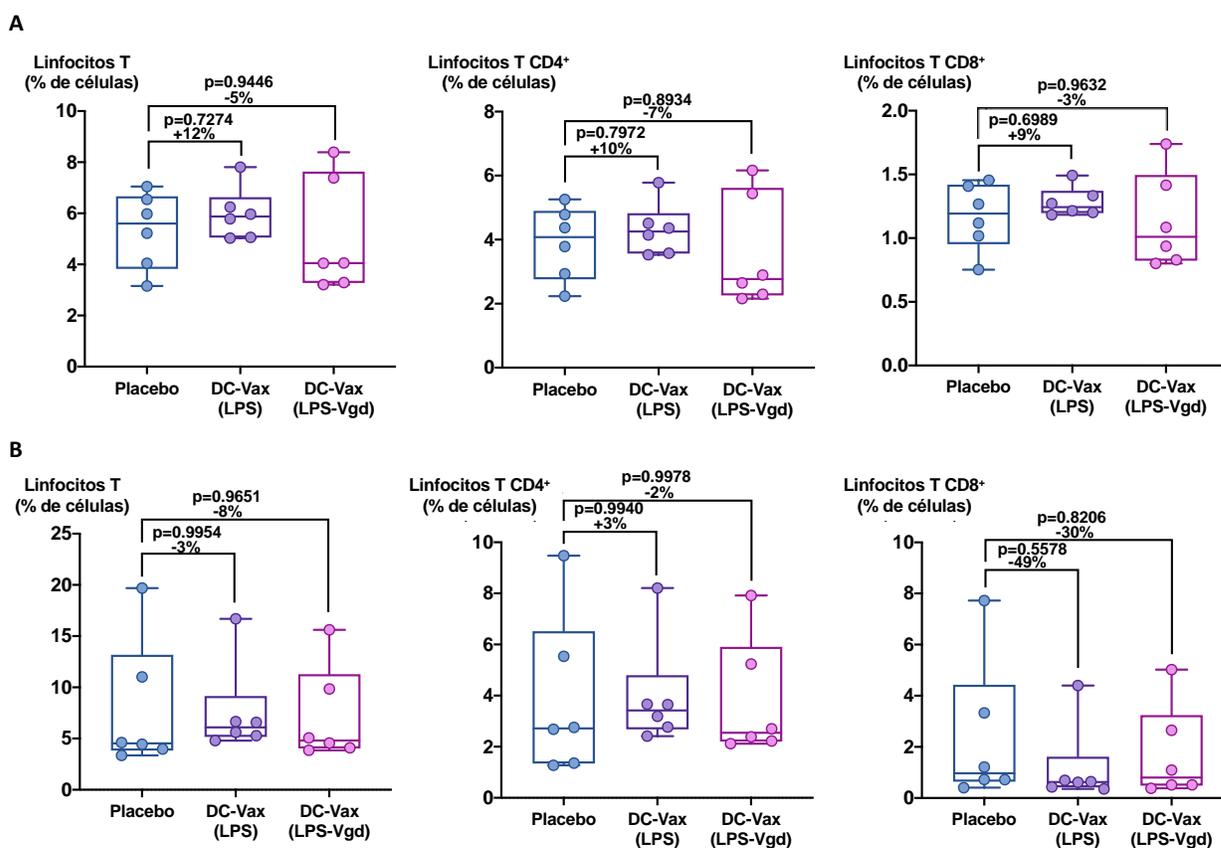


Figura 20. Efecto de los tratamientos con DC-Vax en las poblaciones de linfocitos T en la sangre y en los tumores de los ratones. A) Porcentajes de linfocitos T, linfocitos T CD4⁺ y T CD8⁺ en la sangre de los ratones tratados con las vacunas. B) Porcentajes de linfocitos T, linfocitos T CD4⁺ y T CD8⁺ en los tumores de los ratones tratados con las vacunas. Los resultados se presentan con diagramas de cajas y todos fueron analizados usando un ANOVA de una vía con un post-test de Dunnett (n=6).

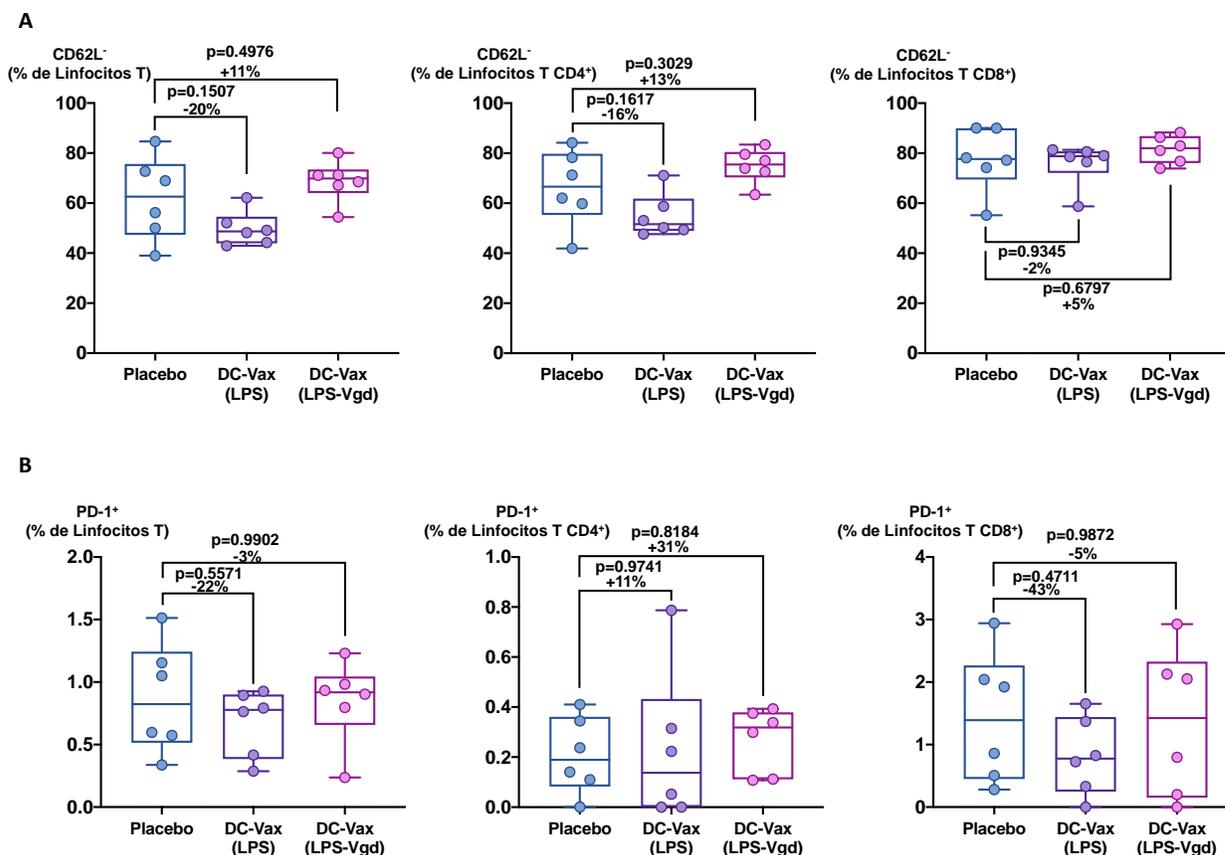


Figura 21. Los tratamientos con DC-Vax no incrementan la activación de las poblaciones de linfocitos T en los tumores. A) Porcentajes de linfocitos T CD62L⁻, linfocitos T CD4⁺ CD62L⁻ y T CD8⁺ CD62L⁻ en los tumores. B) Porcentajes de linfocitos T PD-1⁺, linfocitos T CD4⁺ PD-1⁺ y T CD8⁺ PD-1⁺ en los tumores. Los resultados se presentan con diagramas de cajas y todos fueron analizados usando un ANOVA de una vía con un post-test de Dunnett (n=6).

Se analizaron los niveles de anticuerpos anti-4T1 antes y después de los tratamientos. Los ratones que recibieron los tratamientos con las DC-Vax presentaron cantidades significativamente mayores de IgG anti-4T1 que aquellos que recibieron el placebo. El aumento en los anticuerpos anti-4T1 fue del 66% para los ratones que recibieron el tratamiento con la DC-Vax LPS ($p=0.0002$), mientras que fue de un 69% para los que recibieron el tratamiento con DC-Vax LPS-Vgd ($p=0.0001$). No hubo diferencias significativas entre los dos grupos al final de los tratamientos (Figura 22).

Con los resultados de este experimento se puede concluir que el tratamiento con las DC-Vax reduce los tumores de cáncer de mama. Sin embargo, esta reducción es muy pequeña, por lo que no es suficiente el suministro de esta inmunoterapia para eliminar las células cancerígenas. Para mejorar el efecto de las vacunas, se propuso combinar el uso de esta inmunoterapia con un agente quimioterapéutico como el 5-Fluorouracilo, que además de eliminar las células cancerosas del tumor primario, podría ser capaz de

reducir poblaciones de células inmunosupresoras como MDSCs, que podrían estar inhibiendo la actividad de los linfocitos T CD8⁺ en los tumores y favoreciendo el crecimiento tumoral.

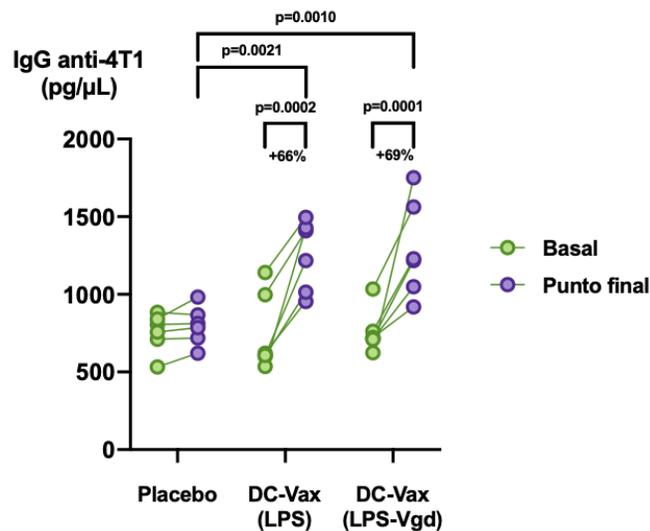


Figura 22. Los tratamientos con DC-Vax aumentan los niveles de IgG anti-4T1. Niveles de anticuerpos anti-4T1 observados en los ratones antes y después de los tratamientos con las DC-Vax. Se muestran los valores individuales de anticuerpos anti-4T1 al inicio y al final del experimento. Para la comparación de los niveles basales y finales de anticuerpos dentro de un mismo grupo se utilizó un ANOVA de dos vías con un post-test de Sidak (n=6). Para la comparación de los niveles finales de anticuerpos entre los distintos grupos se utilizó un ANOVA de dos vías con un post-test de Tukey (n=6).

3.9 Determinación de la dosis mínima de 5-FU para el tratamiento del cáncer de mama

El agente quimioterapéutico 5-fluorouracilo (5-FU) además de tener efectos citotóxicos sobre las células tumorales, es capaz de inducir la apoptosis de las células inmunosupresoras MDSCs. Esto sugiere que tiene la capacidad de promover la activación del sistema inmune, por lo que podría ser una buena opción para combinarlo con la vacunación autóloga con CDs. En este ensayo se analizó el efecto de tres dosis de 5-FU (10, 25 o 50 mg/kg) en los tumores primarios de cáncer de mama y en las poblaciones de MDSCs en los tumores, para poder determinar una dosis mínima que pueda contribuir a la eliminación de células cancerígenas y de células inmunosupresoras en los tumores.

Las dosis de 25 y 50 mg/kg de 5-FU disminuyeron el tamaño de los tumores en comparación con el placebo (Figura 23). Los ratones que recibieron la dosis de 25 mg/kg presentaron una reducción del 18% (p=0.011)

y los que recibieron la dosis de 50 mg/kg presentaron una reducción del 33% ($p=0.002$) comparado con el grupo placebo. Al analizar el peso promedio de los tumores, se observó que en los ratones tratados con 50 mg/kg de 5-FU los tumores fueron 44% menos pesados que en el grupo placebo ($p\leq 0.0001$) (Figura 23). Lo que significa que el 5-FU es un agente quimioterapéutico efectivo para la eliminación de células de cáncer de mama.

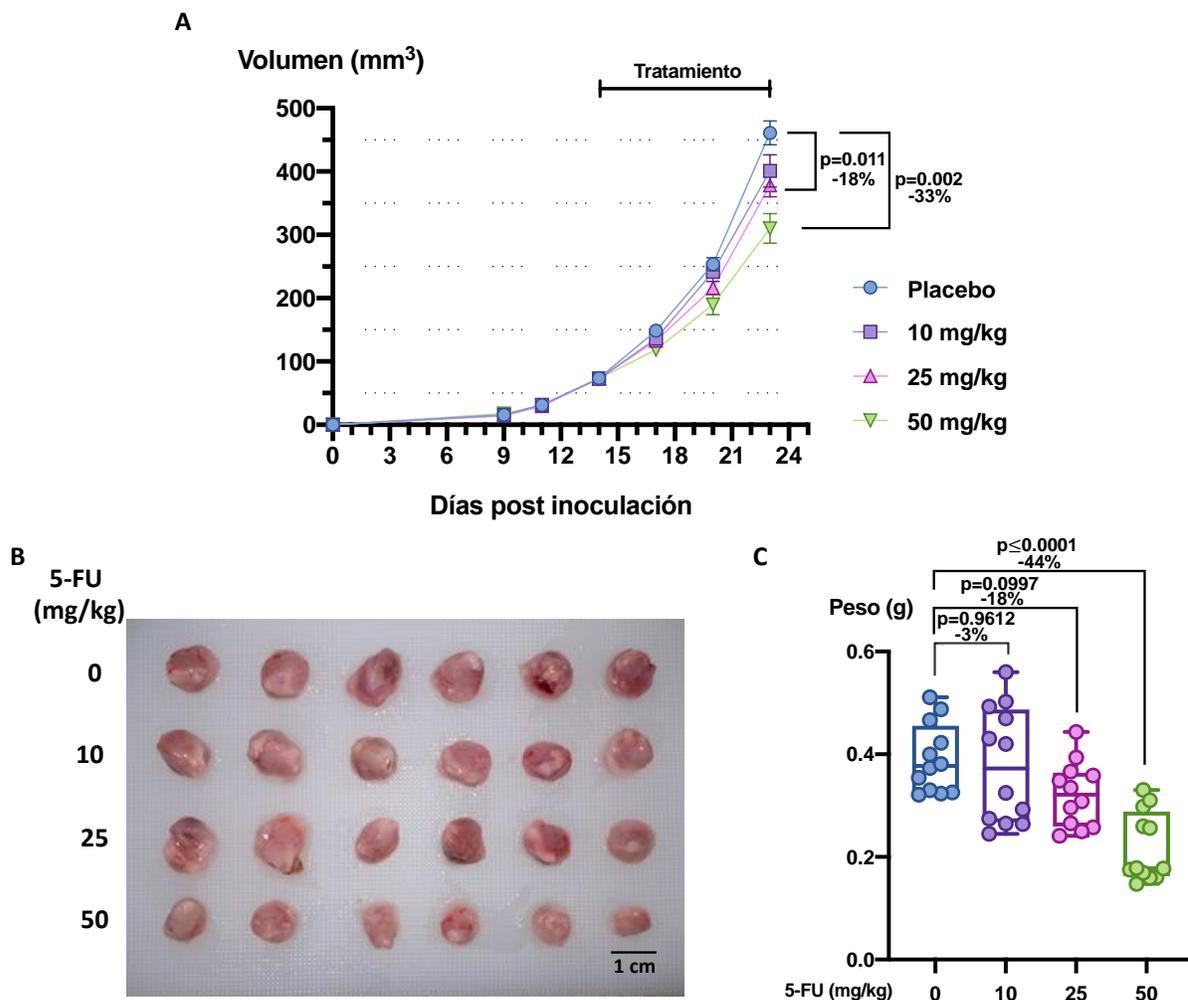


Figura 23. El tratamiento con 5-FU reduce el tamaño de los tumores de cáncer de mama. A) Volúmenes promedios (\pm EEM) de los tumores de cáncer de mama a lo largo del experimento. B) Imágenes de los tumores de los ratones tratados con las distintas concentraciones del 5-FU. C) Pesos de los tumores el día de la eutanasia presentados con un diagrama de caja. Los resultados se compararon mediante un ANOVA de dos vías con post-test de Dunnett (A) o un ANOVA de una vía con un post-test de Dunnett (C) ($n=12$).

El día de la eutanasia se recolectó el bazo de los ratones y se encontró que los tratamientos redujeron significativamente el peso de los bazos en comparación con el grupo que recibió el placebo. Los ratones

tratados con 10, 25 y 50 mg/kg tuvieron una reducción del bazo del 19% ($p=0.007$), 42% ($p\leq 0.0001$) y 75% ($p\leq 0.0001$) respectivamente (Figura 24).

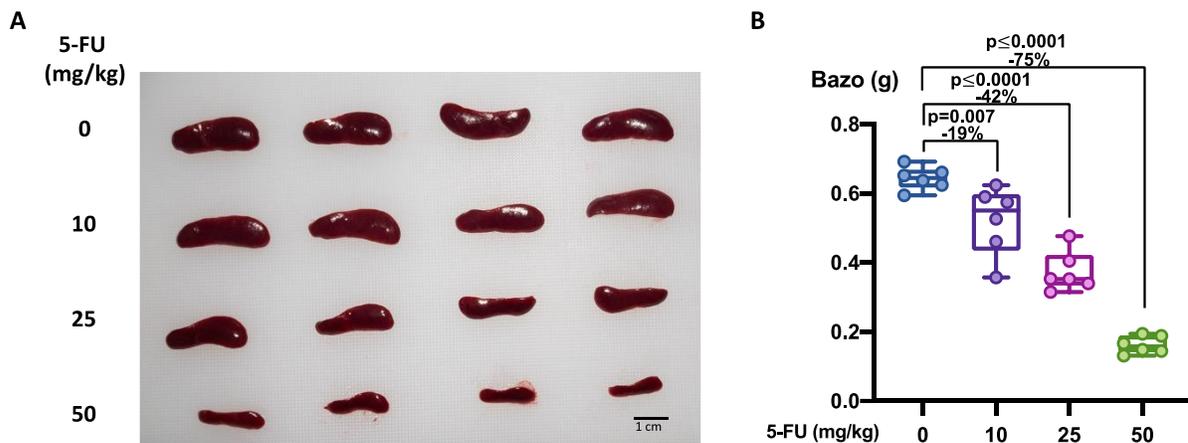


Figura 24. El tratamiento con 5-FU reduce el tamaño del bazo de ratones con cáncer de mama. A) Imágenes de los bazos de los ratones en los diferentes grupos. B) Pesos de los bazos en los diferentes grupos presentados en un diagrama de caja. Los resultados fueron comparados usando un Anova de una vía con post-test de Dunnett ($n=6$).

El día de la eutanasia, se analizaron por citometría de flujo las poblaciones de MDSC Polimorfonucleares ($CD11b^+Ly6G^+Ly6C^{low}$) y la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) y MDSC Monocíticas ($CD11b^+Ly6G^-Ly6C^{high}$) así como producción de óxido nítrico (NO) en los tumores (Figura 25). En todos los grupos que recibieron el tratamiento de 5-FU se redujeron las poblaciones de MDSC PMN, sin embargo, en los grupos que recibieron 25 y 50 mg/kg esta reducción fue más marcada, de un 33% ($p=0.046$) y 41% ($p=0.012$) respectivamente, en comparación con el placebo. Los tratamientos no afectaron la producción de ROS en las poblaciones de MDSC PMN. En cuanto a las MDSCs Mon, solo hubo una reducción en el grupo que recibió la dosis de 50 mg/kg, esta población celular fue reducida en un 50% ($p=0.017$), comparado con el placebo. No se observó una reducción en la capacidad de producir NO en las poblaciones de MDSC Mon bajo los diferentes tratamientos.

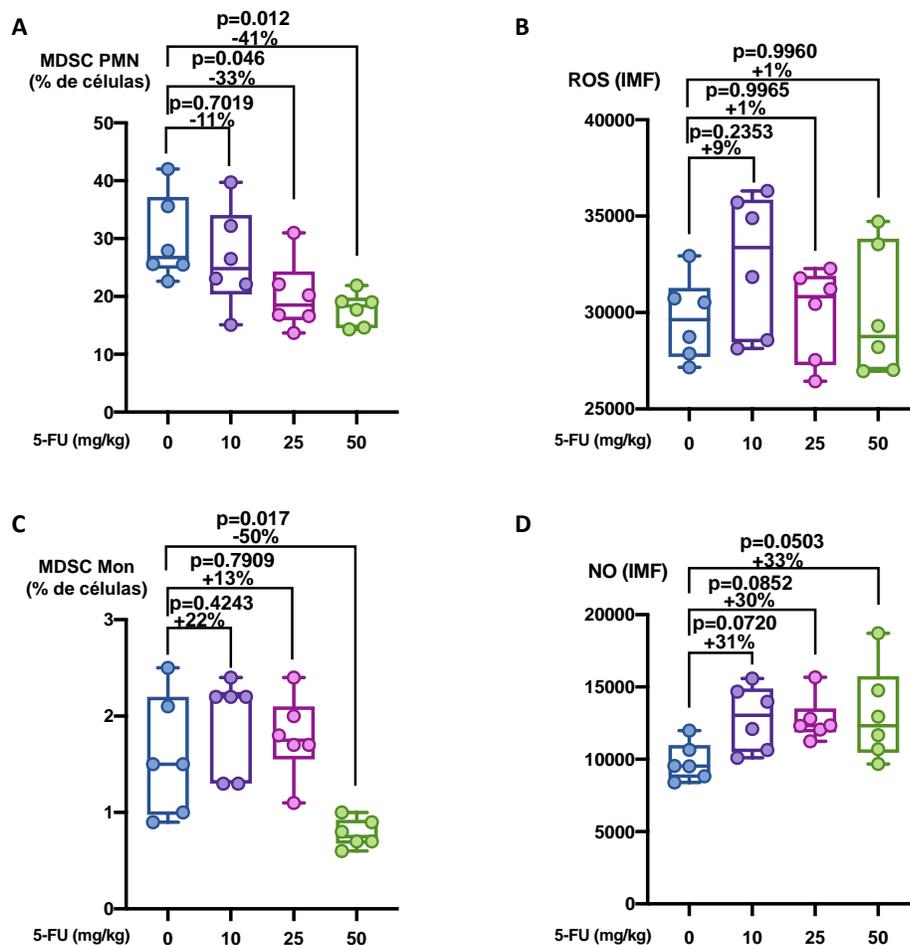


Figura 25. El tratamiento con 5-FU reduce las poblaciones de MDSC Polimorfonucleares y Monocíticas en los tumores. A) Porcentajes de MDSC PMN en los tumores bajo los distintos tratamientos. B) Gráfica con la Intensidad Media de Fluorescencia de ROS en los diferentes grupos. C) Porcentajes de células MDSC Mon en tumores bajo los distintos tratamientos. D) Gráfica con la Intensidad Media de Fluorescencia de NO en los diferentes grupos. Todos los resultados se presentan en diagramas de cajas y fueron analizados utilizando un ANOVA de una vía con un post-test de Dunnett (n=6).

Los resultados de este ensayo sugieren que el 5-FU es un buen candidato para ser utilizado en conjunto con la inmunoterapia de vacunación autóloga con células dendríticas, y que se podrían utilizar dosis de 25 a 50 mg/kg. Ya que el objetivo de este ensayo era determinar una dosis mínima para utilizar en conjunto con la inmunoterapia, y debido a que se observaron resultados significativos con la dosis de 25 mg/kg, tanto en la reducción de los tumores como de las poblaciones de MDSC, se decidió utilizar esta dosis para realizar los ensayos combinados en un modelo ortotópico de cáncer de mama.

Aunado a lo anterior, se analizaron las poblaciones de linfocitos T (CD90.2⁺CD3⁺), linfocitos T cooperadores (CD4⁺) y linfocitos T citotóxicos (T CD8⁺) en los tumores de los ratones que recibieron las diferentes dosis

de 5-FU. Hubo un ligero incremento de las tres poblaciones celulares en los tumores de los ratones que recibieron las dosis de 10 y 25 mg/kg comparado con el grupo placebo, particularmente, la población de linfocitos T CD4⁺ aumentó significativamente en los tumores de los ratones que recibieron el tratamiento con 25 mg/kg ($p=0.0077$). Además, hubo un menor porcentaje celular de las tres poblaciones de linfocitos cuando se aplicó la dosis de 50 mg/kg, comparado con el grupo placebo. Esto sugiere que 50 mg/kg es una dosis muy alta para estas células y refuerza la decisión de continuar trabajando con la dosis de 25 mg/kg combinada con la vacunación autóloga con células dendríticas (Figura 26).

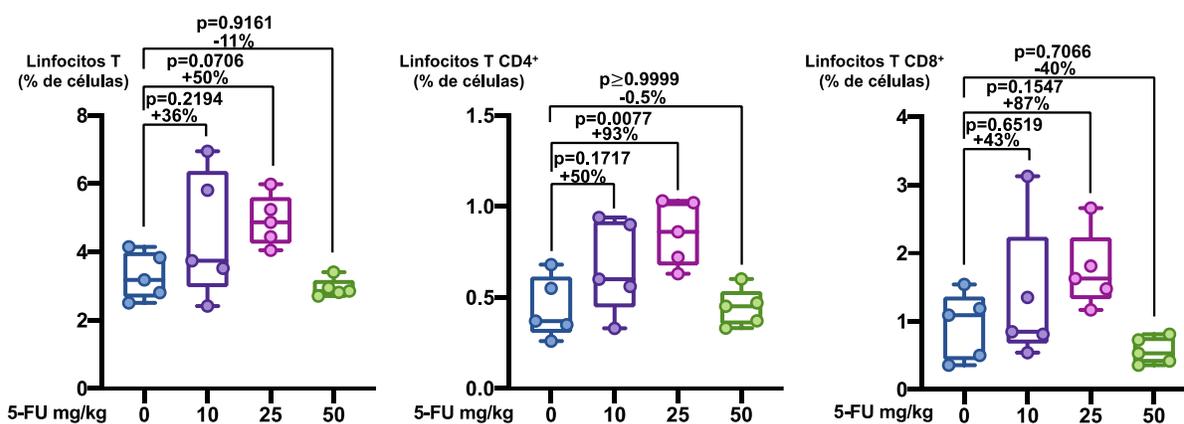


Figura 26. Efecto del 5-FU en las poblaciones de linfocitos T, linfocitos T CD4⁺ y linfocitos T CD8⁺ en los tumores de los ratones. Porcentajes celulares de las tres poblaciones de linfocitos T, se presentan con diagramas de caja. Los resultados se compararon usando un ANOVA de una vía con post-test de Dunnett ($n=5$).

3.10 Determinación de la dosis mínima de 5-FU para el tratamiento de la metástasis ósea de cáncer de mama

Se decidió evaluar el efecto del 5-FU en las células inmunosupresoras de la metástasis, por lo cual se realizó un ensayo de determinación de dosis mínima de 5-FU en ratones con metástasis ósea de cáncer de mama. Para esto se realizó una inoculación intracardiaca de células 4T1 en ratones Balb/c hembras, para inducir la formación de metástasis ósea. A los ratones se les aplicaron intraperitonealmente las diferentes dosis de 5-FU (10, 25 o 50 mg/kg) o el placebo (PBS-DMSO 1%).

El tratamiento con 25 mg/kg de 5-FU fue el único que redujo significativamente el peso del bazo de los ratones, comparado con el grupo placebo, esta reducción fue del 26% ($p=0.023$) (Figura 27). Al analizar los porcentajes celulares de la población de MDSCs PMN en médula ósea se identificó una tendencia a su reducción, que se hizo más pronunciada conforme se incrementó la dosis de 5-FU, sin embargo, no fue

significativa. Ocurrió lo mismo para la población de MDSCs MON, se identificó una tendencia a la reducción de la población dependiente de la dosis, pero esta reducción no fue significativa. Tampoco se observó un cambio en la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) por parte de los MDSCs PMN, ni en la producción de óxido nítrico (NO) por parte de los MDSCs Mon (Figura 28).

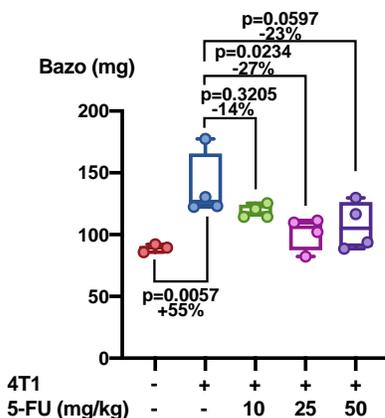


Figura 27. El tratamiento con 5-FU reduce los bazos de los ratones con metástasis ósea de cáncer de mama. Pesos de los bazos de los diferentes grupos al día de la eutanasia, presentados en un diagrama de caja. Los resultados fueron comparados usando un Anova de una vía con post-test de Dunnett (n=4).

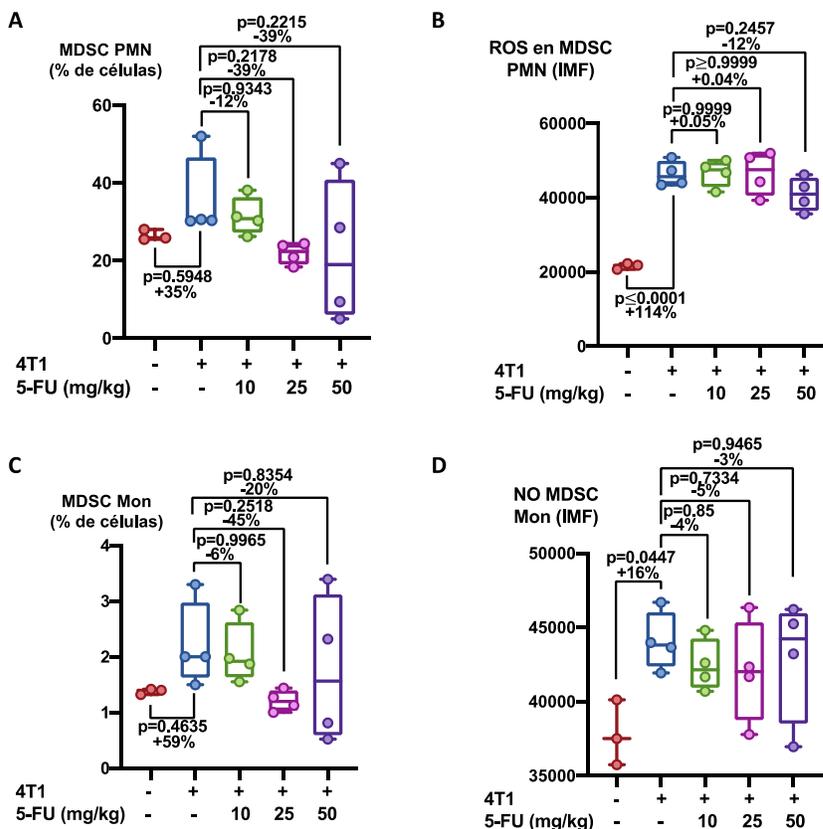


Figura 28. Efecto del 5-FU en las poblaciones de MDSC en la metástasis ósea y en su capacidad de producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) y óxido nítrico (NO). A) Porcentajes de MDSC PMN en la metástasis ósea bajo las distintas dosis de 5-FU. B) Intensidad Media de Fluorescencia de las ROS en las células MDSC PMN de los diferentes grupos. C) Porcentajes de MDSC MON en la metástasis ósea bajo los distintos tratamientos con 5-FU. D) Intensidad Media de Fluorescencia del NO en las células MDSC Mon en los diferentes grupos. Todos los resultados se presentan en diagramas de cajas y fueron analizados utilizando un ANOVA de una vía con un post-test de Dunnett (n=4).

El analizar las radiografías del fémur y tibia de los ratones de los diferentes grupos (Figura 29), no se observó osteólisis notable en la mayoría de los huesos, lo que indica que no hubo un buen desarrollo de la metástasis ósea y esto podría explicar los efectos tan moderados observados en este ensayo.

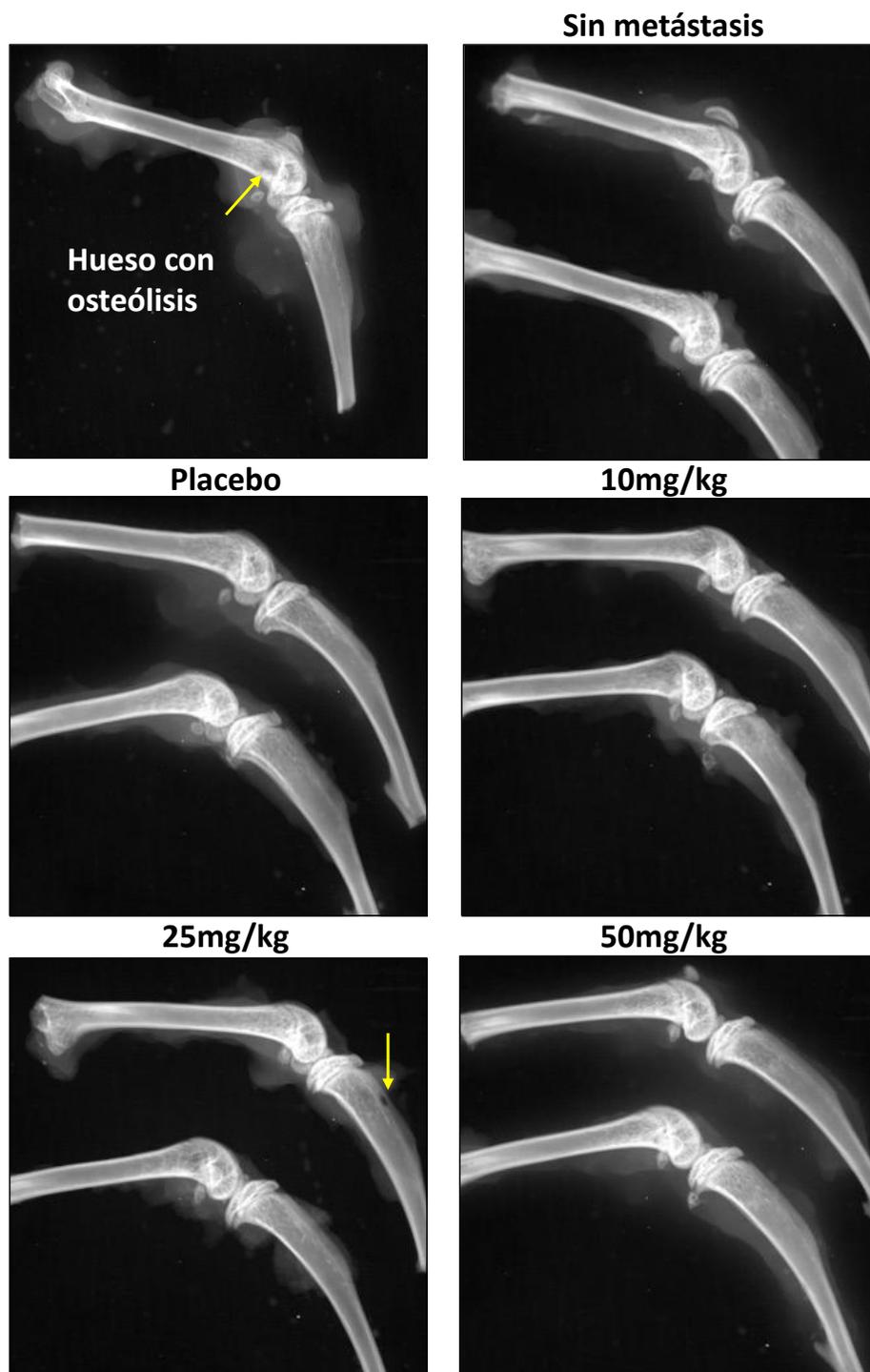


Figura 29. Efecto de los tratamientos con 5-FU en la metástasis ósea de cáncer de mama. Radiografías representativas del fémur y la tibia de los ratones con metástasis ósea que recibieron las diferentes dosis de 5-FU. En el panel superior izquierdo se muestra una imagen representativa de un hueso con osteólisis.

3.11 Efecto del tratamiento combinado de una vacuna con células dendríticas y el 5-FU en tumores primarios de cáncer de mama

Numerosos estudios han probado la eficacia de combinar diferentes terapias para tratar el cáncer. En este ensayo se evaluó el efecto de la combinación de la vacunación autóloga con células dendríticas maduras con LPS y el agente quimioterapéutico 5-Fluorouracilo (5-FU) en tumores primarios de cáncer de mama.

Los tratamientos administrados no afectaron el crecimiento de los tumores, ya sea su volumen o su peso, no se observaron diferencias significativas entre los grupos que recibieron los distintos tratamientos (Figura 30). Por otro lado, hubo una reducción significativa ($p=0.0196$) en el tamaño de los bazos del grupo que recibió el tratamiento con el 5-FU comparado con el grupo que recibió el placebo. También se observó un aumento significativo ($p\leq 0.0001$) en el tamaño de los bazos del grupo que recibió el tratamiento con la DC-Vax comparado con el grupo que recibió el placebo (Figura 31).

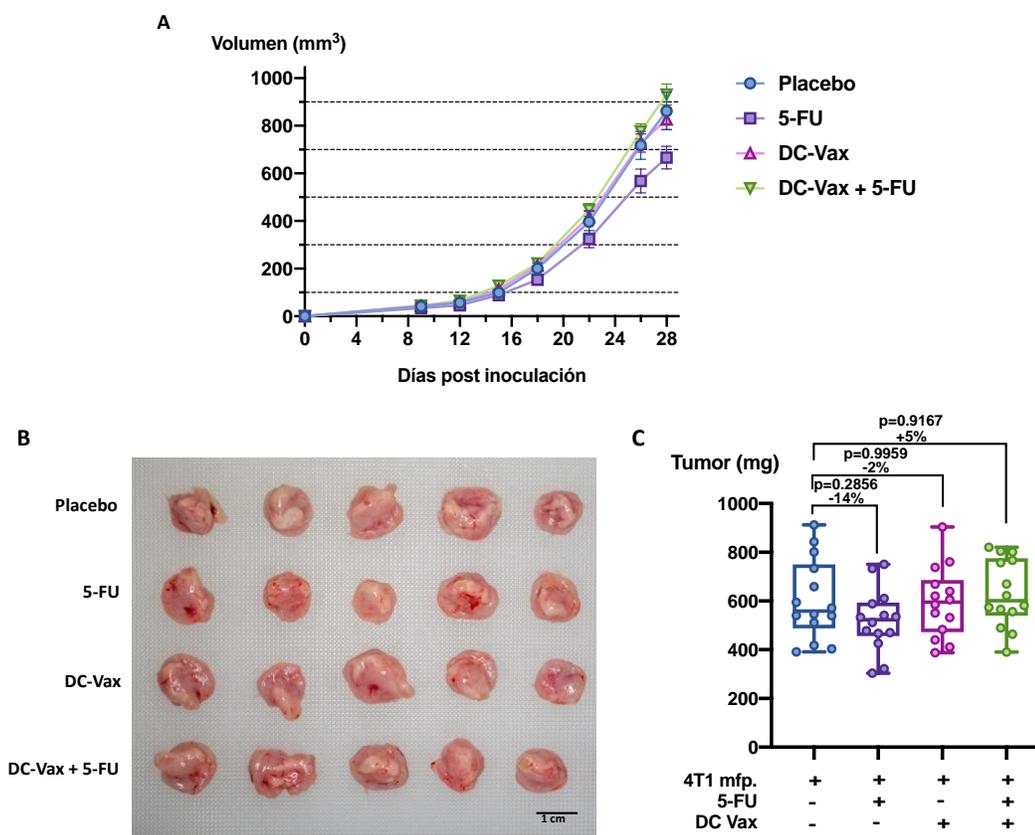


Figura 30. Los tratamientos con DC-Vax, 5-FU y DC-Vax+5-FU no redujeron los tumores de cáncer de mama. Volúmenes promedio (\pm EEM) de los tumores de cáncer de mama a lo largo del experimento. B) Imágenes representativas de los tumores de los ratones bajo los distintos tratamientos. C) Peso de los tumores el día de la eutanasia presentados con un diagrama de caja. Los resultados se compararon mediante un ANOVA de dos vías con post-test de Dunnett (A) o un ANOVA de una vía con un post-test de Dunnett (C) ($n=14$).

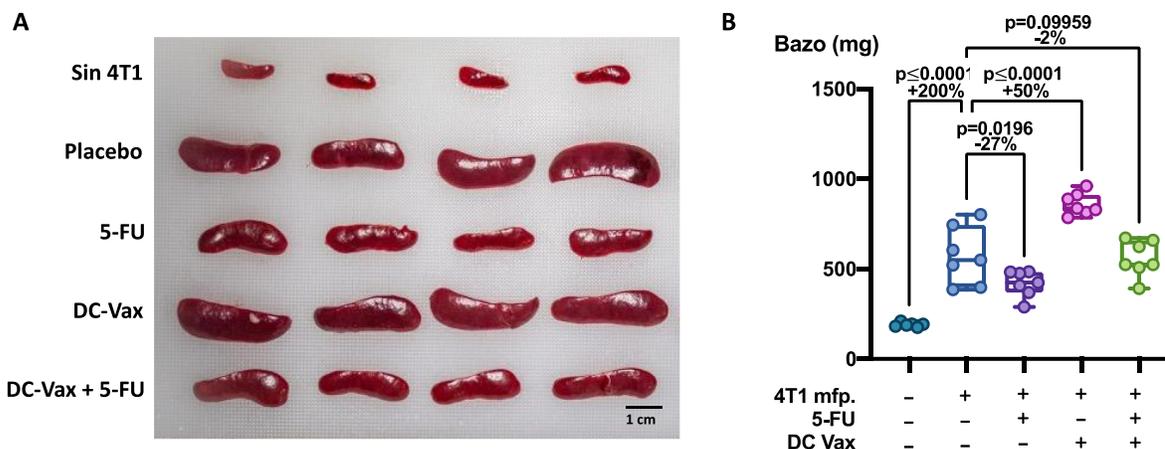


Figura 31. Efecto de los tratamientos con DC-Vax, 5-FU y DC-Vax+5-FU en el bazo de ratones con cáncer de mama. A) Imágenes representativas de los bazos de los ratones bajo los diferentes tratamientos. B) Peso de los bazos de los ratones en los diferentes grupos, presentados en un diagrama de caja. Los resultados se analizaron usando un ANOVA de una vía con post-test de Dunnett ($n=7$).

Se analizaron las poblaciones de células MDSC PMN ($CD11b^+Ly6G^+Ly6C^{low}$) y MDSC Mon ($CD11b^+Ly6G^-Ly6C^{high}$) en la sangre mediante citometría de flujo. Se observó una reducción significativa del 31% ($p=0.0040$) en las células MDSC PMN en el grupo que recibió el tratamiento con 5-FU. No se observó una reducción en los grupos que recibieron el tratamiento con DC-Vax+5-FU. En el caso de las poblaciones de células MDSCs Mon se identificó una reducción significativa del 40% ($p=0.0003$) en el grupo que recibió el tratamiento con DC-Vax+5-FU (Figura 32).

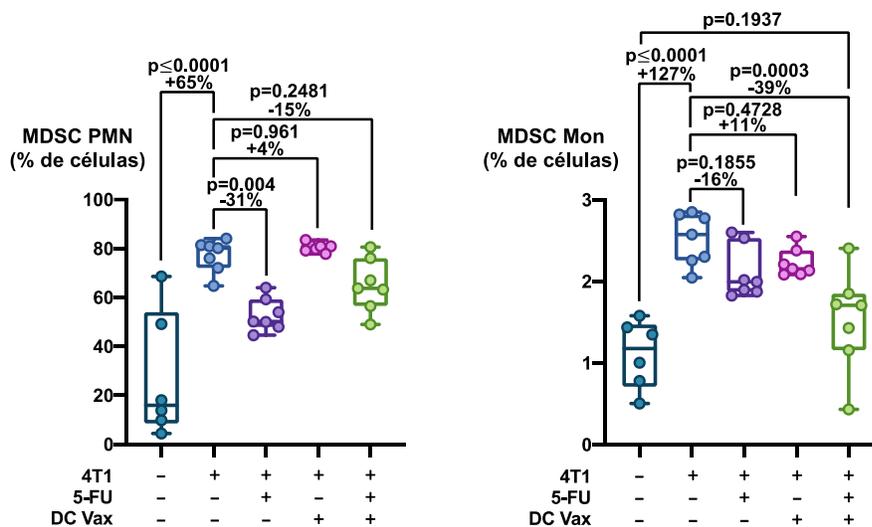


Figura 32. Los tratamientos con 5-FU y DC-Vax+5-FU redujeron las poblaciones de MDSCs Polimorfonucleares y Monocíticas en la sangre de los ratones con cáncer de mama. A) Concentraciones de MDSCs Polimorfonucleares y MDSCs Monocíticas en sangre de los ratones bajo los diferentes tratamientos, se presentan en diagramas de caja. Los resultados se analizaron utilizando un ANOVA de una vía con post-test de Dunnett ($n=7$).

También se analizaron las poblaciones de linfocitos T ($CD90.2^+CD3^+$), linfocitos T cooperadores ($CD4^+$) y linfocitos T citotóxicos ($CD8^+$) en la sangre de los ratones. Los tratamientos con 5-FU y con DC-Vax+5-FU provocaron un aumento significativo en los porcentajes de las tres poblaciones de linfocitos, comparados con el grupo placebo (Figura 33). Ya que este aumento pudo ser debido a un artefacto ocasionado por la disminución en los porcentajes de células MDSCs en sangre, se decidió analizar la concentración (Células/ μ L) de las tres poblaciones de linfocitos. Al analizar las poblaciones de linfocitos de esta manera, se comprobó que los ratones que recibieron los tratamientos con 5-FU y con la DC-Vax+5-FU si tuvieron un incremento significativo en las tres poblaciones, comparado con el grupo placebo. Además, se observó que la concentración de linfocitos T y linfocitos T $CD4^+$ fue comparable a la del grupo sin 4T1 (Figura 33). También se analizaron las poblaciones de linfocitos T $CD4^+PD-1^+$ y T $CD8^+PD-1^+$ y se observó un aumento significativo en los porcentajes de ambas poblaciones, en los grupos que recibieron los tratamientos con 5-FU y DC-Vax+5-FU, comparados con el grupo placebo (Figura 33).

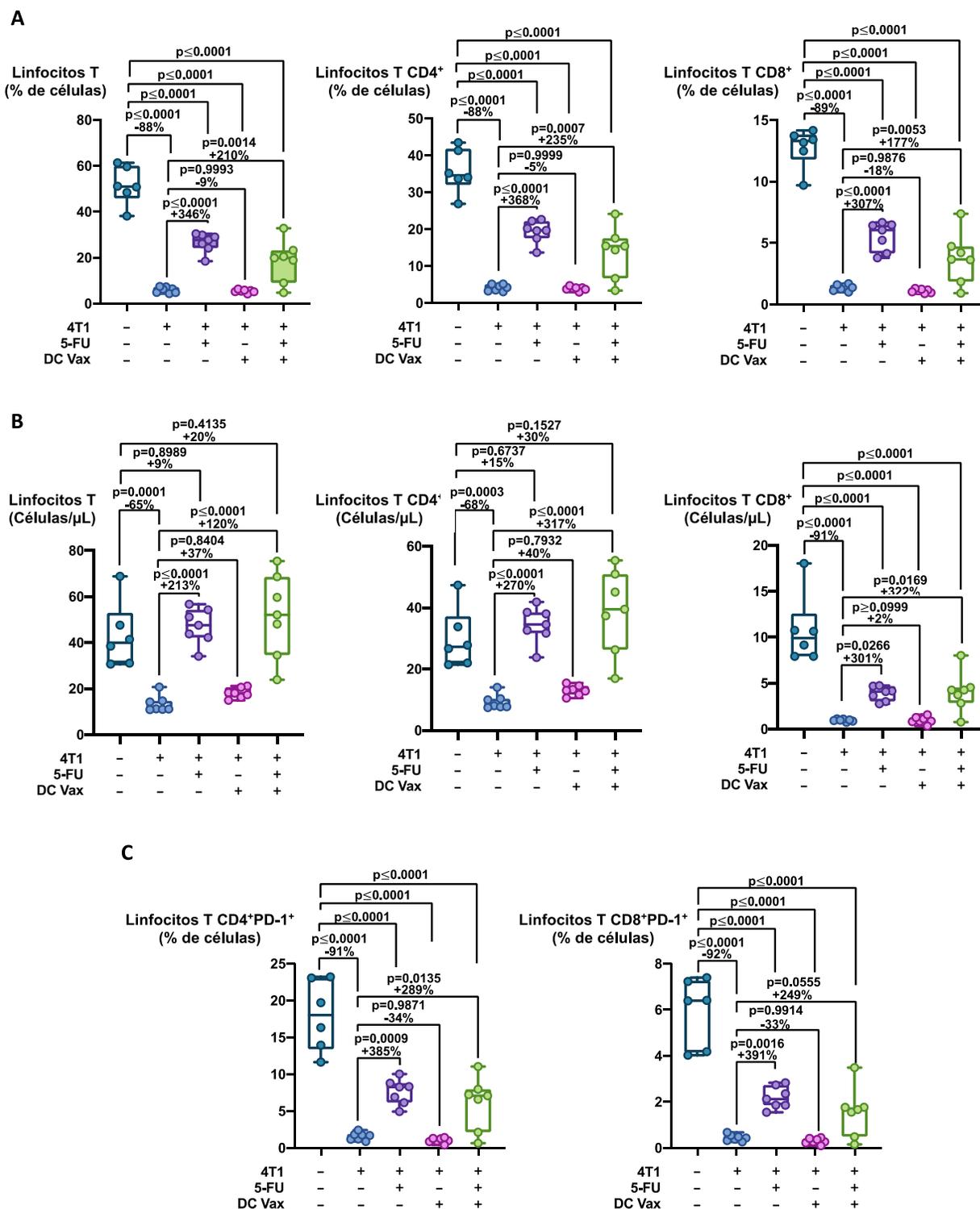


Figura 33. Los tratamientos con 5-FU y DC-Vax+5-FU aumentaron las poblaciones y la activación de los linfocitos T de la sangre periférica de los ratones con cáncer de mama. A) Porcentajes de las poblaciones de linfocitos T en sangre de los ratones con cáncer de mamá después de los tratamientos. B) Concentraciones en sangre de cada población de linfocitos T después de los tratamientos. C) Porcentaje de células T CD4⁺PD-1⁺ y T CD8⁺PD-1⁺ en sangre de los ratones con cáncer de mama después de los tratamientos. Todos los resultados se presentan en diagramas de caja y fueron analizados utilizando un ANOVA de una vía con post-test de Dunnett (n=7).

Al analizar los niveles de anticuerpos anti-4T1, se encontró que los ratones que recibieron los tratamientos con el 5-FU, la DC-Vax y la DC-Vax+5-FU tuvieron mayores cantidades de anticuerpos anti-4T1 que al inicio del experimento, sin embargo, solo los grupos que recibieron el tratamiento con DC-Vax y DC-Vax+5-FU presentaron cantidades significativamente mayores ($p \leq 0.0001$) que aquellos que recibieron el tratamiento placebo (Figura 34).

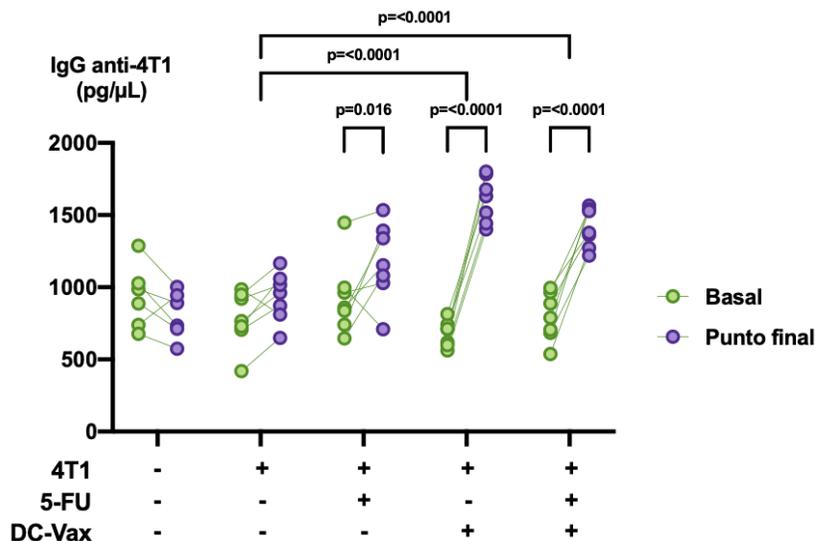


Figura 34. Los tratamientos con DC-Vax, 5-FU y DC-Vax+5-FU incrementaron los niveles de IgG anti-4T1 en los ratones con tumores de cáncer de mama. Gráficas de los niveles de anticuerpo anti-4T1 observados en los ratones antes y después de los tratamientos. Para la comparación de los niveles basales y finales de anticuerpos dentro de un mismo grupo se utilizó un ANOVA de dos vías con un post-test de Sidak ($n=7$). Para la comparación de los niveles finales de anticuerpos entre los distintos grupos se utilizó un ANOVA de dos vías con un post-test de Tukey ($n=7$).

Aunque no hubo cambios en los volúmenes de los tumores entre los diferentes grupos, si hubo cambios a nivel de las poblaciones de células inmunes en los ratones. Se observó una reducción en los niveles de MDSCs en los ratones que recibieron los tratamientos con 5-FU y DC-Vax+5-FU, y esto coincide con el aumento en los niveles de linfocitos T, linfocitos T CD4⁺ y linfocitos T CD8⁺. También se observó un aumento en las poblaciones de linfocitos T CD4⁺ PD1⁺ y T CD8⁺ PD1⁺ en los grupos que recibieron estos mismos tratamientos, lo que indica que estas células estuvieron activadas. En esos mismos grupos se observó un aumento en los niveles de anticuerpos anti-4T1, lo que sugiere que existe una participación de la respuesta inmune humoral. Aunque se obtuvieron buenos resultados con el uso del 5-FU, teniendo en cuenta resultados previos de este proyecto, se esperaban cambios más drásticos en el tamaño de los bazo y en las proporciones de las poblaciones de células MDSCs, por lo que se propone aumentar la concentración de la dosis de 5-FU. Además, fue imposible replicar los resultados previos que se obtuvieron con las vacunas con CDs. Lo que justificaría la búsqueda de mejores coadyuvantes para su maduración, para ver si es posible obtener mejores respuestas con este tipo de inmunoterapia.

Capítulo 4. Discusión

La vacunación autóloga de CD80 es un tipo de inmunoterapia que consiste en la inoculación de CD80 cargadas con antígenos tumorales a pacientes con cáncer, con la intención de inducir una respuesta antigénica específica de los linfocitos T y de los linfocitos B. Aunque este tipo de terapia es capaz de inducir respuestas inmunológicas anti-tumorales en pacientes, solo se han visto buenos resultados en un número limitado de ensayos clínicos (Bol et al., 2016; Kantoff et al., 2010; Lesterhuis et al., 2008). Es por eso que se busca hacer más eficiente esta inmunoterapia. En este trabajo se desarrolló una vacuna con CD80 y se utilizaron tres estrategias para intentar aumentar su eficacia: incrementar la maduración de las CD80 utilizando vacunas profilácticas como coadyuvantes, oxidar los antígenos tumorales con HOCl para hacerlos más inmunogénicos y utilizar el agente quimioterapéutico 5-FU para eliminar células inmunosupresoras del microambiente tumoral. Posteriormente la combinación de estas estrategias fue evaluada en un modelo ortotópico de cáncer de mama.

Se probaron dos vacunas profilácticas y dos tipos de partículas virales de plantas para aumentar la maduración de las CD80 derivadas de células de médula ósea *in vitro*. Solo la vacuna Vanguard Plus fue capaz de aumentar la expresión del marcador de activación CD86 en las CD80. Estos resultados concuerdan con los reportados por Schreiber et al. (2010) quienes probaron la capacidad de 15 vacunas profilácticas para madurar las CD80, y concluyeron que solo tres de ellas (BCG-SSI, Influxac y Typhim) eran capaces de inducir la maduración de CD80 y aumentar la expresión de los marcadores de maduración CD80, CD86, CD83 y la secreción de IL-12. Estos resultados también concuerdan con los reportados por Wang et al. (2019a), quienes observaron que nanopartículas del virus de mosaico del caupí son capaces de aumentar los porcentajes de células dendríticas *in vitro*, pero no sus niveles de activación.

Después de analizar los resultados de la activación *in vitro* de las CD80 con los diferentes coadyuvantes, se evaluó el tratamiento con la vacuna de CD80 activadas con la vacuna profiláctica Vanguard plus y LPS en el modelo ortotópico de CM. Este tratamiento provocó una ligera reducción en el tamaño de los tumores primarios de CM, sin embargo, no hubo diferencias entre la utilización de la DC-Vax activada solo con LPS o la DC-Vax activada con LPS y Vanguard Plus. Tampoco se observaron cambios en los porcentajes de poblaciones de linfocitos T, linfocitos T cooperadores, ni linfocitos T citotóxicos, ni en la expresión de los marcadores CD62L⁺ o PD1.

La ligera reducción en el tamaño de los tumores primarios de CM tratados con las DC-Vax lleva a pensar que, por sí solo, este tratamiento es insuficiente para eliminar las células cancerígenas y justifica la

necesidad de combinar esta inmunoterapia con otro tratamiento que permita eliminar las células tumorales. Estos resultados concuerdan con lo reportado por Song et al. (2018), quienes observaron que una vacuna autóloga de CDs pulsadas con lisados de células 4T1 y activadas con LPS no generaba una reducción significativa en el tamaño de los tumores de CM, comparado con el grupo placebo. Sin embargo, cuando administraron un tratamiento combinado de la vacuna de CDs con el agente quimioterapéutico Dasatinib, sí observaron una reducción significativa en el tamaño de los tumores y en el tiempo de supervivencia de los ratones con CM. En su estudio, Song et al. (2018) eligieron el Dasatinib, ya que se ha reportado que además de tener propiedades citotóxicas para las células cancerígenas, también tiene propiedades inmunoestimuladoras en diversas células inmunes.

Al revisar la literatura, se identificó el 5-Fluorouracilo (5-FU), otro agente quimioterapéutico que, además de tener propiedades citotóxicas para las células tumorales, afecta ciertas poblaciones de células del sistema inmune. Este fármaco induce la apoptosis de las células MDSCs, importantes células inmunosupresoras que inhiben a poblaciones de células del sistema inmune, particularmente a los linfocitos T CD8⁺, y que son un marcador de mal pronóstico en diversos tipos de cánceres, incluyendo el cáncer de mama (Tower et al., 2019).

Antes de combinar el 5-FU con la vacuna autóloga de CDs, se analizó el efecto del 5-FU en el desarrollo de los tumores primarios de CM y se determinó una dosis mínima para combinarse con la DC-Vax. Los ratones que recibieron las dosis de 25 mg/kg o 50 mg/kg de 5-FU presentaron una reducción significativa de los tumores, comparado con el grupo placebo, lo que significa que el 5-FU es un fármaco que elimina las células de CM. Además, se observó una reducción significativa de las poblaciones de MDSC PMN y MDSCs Mon en los tumores de los ratones que recibieron las dosis de 25 mg/kg y de 50 mg/kg. No se observó efecto en la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) o óxido nítrico (NO) con ninguna de las dosis administradas. También se analizaron las poblaciones de linfocitos T, T CD4⁺ y T CD8⁺ en los tumores y se observó un ligero incremento de las tres poblaciones celulares en los ratones que recibieron las dosis de 10 y 25 mg/kg y un menor porcentaje celular de las tres poblaciones con la dosis de 50 mg/kg. Esto sugiere que la dosis de 50 mg/kg es demasiado alta para las poblaciones de linfocitos, por lo se decidió trabajar con la dosis de 25 mg/kg para combinar con la DC-Vax activada con LPS.

Cuando se evaluó la combinación de la DC-Vax y el 5-FU en el modelo ortotópico de CM, no se observaron cambios significativos en los volúmenes de los tumores. Sin embargo, se observó un aumento en las poblaciones de linfocitos T CD4⁺ y T CD8⁺ en los grupos que recibieron el tratamiento con 5-FU y con DC-Vax+5-FU. Estos grupos tuvieron concentraciones de linfocitos T en sangre, comparables con los

observados en los ratones sanos. Este aumento no se observó en el grupo al que se le administró la DC-Vax por sí sola, lo que sugiere que el aumento en los niveles de linfocitos es consecuencia del tratamiento con el 5-FU. Dado que el 5-FU también fue capaz de reducir significativamente los niveles de MDSCs PMN y Mon de los ratones que recibieron ese tratamiento, podría ser que la reducción de las poblaciones de MDSCs es lo que está contribuyendo directamente al aumento en los niveles de linfocitos T. Vincent et al. (2010) también observaron que el efecto antitumoral observado en su modelo de linfoma EL4, tratados con 5-FU, fue ocasionado por la eliminación de los MDSCs en los tumores de los ratones, lo cual promovió un efecto antitumoral dependiente de los linfocitos T CD8⁺ infiltrados en los tumores.

Lo anterior también concuerda con lo reportado por Xu et al. (2020), quienes observaron que el tratamiento con 30 mg/kg de 5-FU cada 3 días por 2 a 4 semanas es suficiente para reducir significativamente la población de MDSCs, linfocitos Treg y Breg en la médula ósea de ratones OB-Runx2^{-/-}. También observaron una reducción en la expresión de los marcadores de agotamiento PD-1 y TIM 3 en los linfocitos T CD8⁺ de los ratones que recibieron este tratamiento. Sin embargo, los resultados de este estudio difieren con los de Xu et al. (2020), en el sentido de que se observó un aumento en las poblaciones de linfocitos T de sangre periférica que expresan PD-1, en los grupos tratados con 5-FU y DC-Vax+5-FU.

La proteína de muerte celular programada (PD-1) es una proteína de membrana presente en linfocitos T, células NK, células dendríticas y monocitos después de su activación. La unión de PD-1 con su ligando PD-L1 o PD-L2 activa una vía inhibitoria de señalización que disminuye la actividad de los linfocitos T. Muchos tumores continúan creciendo a pesar de la presencia de linfocitos T CD8⁺ antígeno-específicos en el microambiente tumoral. Se ha reportado que PD-1 está sobreexpresado en los linfocitos infiltrados en tumores y que PD-L1 está sobreexpresado en mucho tipos diferentes de tumores, lo que resulta en la inhibición de las respuestas antitumorales por parte de los linfocitos T (Xing et al., 2015).

Gros et al. (2016) reportaron la presencia de linfocitos T CD8⁺PD-1⁺ en la sangre de pacientes con melanoma. Ellos observaron que, tanto las especificidades de los antígenos tumorales como los repertorios de TCR de los linfocitos T CD8⁺PD-1⁺ en sangre y de los linfocitos T CD8⁺PD-1⁺ infiltrados en los tumores de los pacientes fueron similares, lo que indica que los linfocitos T CD8⁺PD-1⁺ en sangre periférica podrían proporcionar un acercamiento a los linfocitos anticancerígenos infiltrados en los tumores. La expresión de PD-1 puede considerarse como un biomarcador de linfocitos T antitumorales específicos de cada paciente en la sangre periférica, proporcionando una estrategia no invasiva para desarrollar terapias personalizadas utilizando linfocitos reactivos a neoantígenos tumorales o TCRs para tratar el cáncer.

De acuerdo con lo anterior, las poblaciones de T CD4⁺ PD-1⁺ y T CD8⁺ PD-1⁺ en la sangre de los grupos que recibieron los tratamientos con el 5-FU y DC-Vax+5-FU, podrían ser consideradas como linfocitos T antitumorales. Además, la expresión de PD-1 indica que estas células pasaron por un proceso de activación celular y que posteriormente sufrieron un proceso de agotamiento, pero que podrían ser activadas utilizando anticuerpos que bloqueen esta proteína. En este sentido, Zhu et al. (2019), probaron un tratamiento con una vacuna denominada STDENVANT que comprende una vacuna autóloga de células dendríticas activadas con CpG y pulsada con lisados de células madre de glioma, en un modelo ortotópico de cáncer de glioma. Ellos observaron que STDENVANT aumentó la supervivencia de los ratones y promovió la regresión de los tumores, pero además aumentó la expresión de PD-1 en linfocitos T, células dendríticas y el tejido de glioma. Posteriormente, combinaron la STDENVANT con el anticuerpo anti-PD-L1 y esto resultó en una supervivencia aumentada y en la disminución de las poblaciones de linfocitos T reguladores en el cerebro, lo que indica que el bloqueo de PD-L1 en combinación con la vacunación de células dendríticas puede promover la regresión tumoral.

En la clínica se ha observado que una infiltración de linfocitos T en los tumores puede ser indicador de un buen pronóstico, sin embargo, cuando estos linfocitos están agotados y presentan marcadores de agotamiento como PD-1, fallan en erradicar los tumores. Huang et al. (2017) reportan que el bloqueo de la vía PD-1 con el inhibidor de puntos de control inmune Pembrolizumab, puede devolver la actividad a los linfocitos T exhaustos de pacientes en etapa IV de melanoma, sin embargo, también observaron que el éxito o fracaso del tratamiento depende directamente de la razón entre los linfocitos T reactivados y la carga tumoral, ya que aquellos pacientes con menor carga tumoral fueron los que experimentaron una mejor respuesta y una mayor supervivencia.

En cuanto la respuesta humoral generada con los tratamientos administrados, se observó que, los ratones que recibieron los tratamientos con las DC-Vax, el 5-FU o la DC-Vax+5-FU presentaron cantidades significativamente mayores de IgG anti-4T1 que aquellos que recibieron el placebo. Esto indica que hubo una respuesta de los linfocitos B, que se diferenciaron a células plasmáticas y que produjeron anticuerpos tumor-específicos (Wang et al., 2019b). Esto sugiere que la respuesta humoral podría estar contribuyendo en la eliminación de las células tumorales, ya sea por acción directa de los anticuerpos sobre las células tumorales, induciendo su apoptosis, o mediante otros mecanismos de inmunidad como la inducción de la fagocitosis en otras células del sistema inmune, activación del complemento o activación de linfocitos T o células NK (Scott et al., 2012; Tower et al., 2019). Por lo que en un futuro sería conveniente analizar con más detalle la respuesta humoral que se genera en los ratones que reciben este tipo de tratamiento.

En conjunto, estos resultados sugieren que la combinación de la vacunación autóloga de células dendríticas con el agente quimioterapéutico 5-Fluorouracilo no es suficiente para ejercer una respuesta antitumoral efectiva contra las células de cáncer de mama. Sin embargo, debido a que los resultados previos con las vacunas de CDs y con el 5-FU por sí solos, no fueron reproducibles, es conveniente volver a realizar el último experimento para poder validar los resultados. Teniendo en cuenta los resultados previos de este proyecto, se esperaban cambios más drásticos en el tamaño del bazo, volumen de los tumores y en el porcentaje de poblaciones de células MDSCs con el uso del 5-FU, por lo que se propone valorar la concentración de la dosis entre 30 y 40 mg/kg para análisis futuros.

Aunado a lo anterior, se esperaban cambios en el tamaño de los tumores solo con la administración de las vacunas autólogas de CDs, lo cual no pasó, esto también justificaría la repetición del último experimento, pero además justificaría probar una mayor estimulación de la maduración de las CDs con mejores coadyuvantes. Aunque se observó un aumento en la expresión del marcador CD86 de las CDs utilizando la vacuna Vanguard Plus, nunca se superaron los niveles de activación obtenidos con LPS (utilizado como control de activación), por lo que sería conveniente buscar otra manera de aumentar niveles de maduración. Para esto se podría evaluar, además de otras vacunas profilácticas, otros coadyuvantes como los oligonucleótidos con motivos CpG. Estas moléculas son reconocidas por el receptor tipo Toll 9 (TLR 9) de las CDs y actúan como potentes inmunomoduladores, promoviendo su maduración y facilitando la presentación antigénica (Dearman et al., 2009). La vacunación con CDs activadas con estos oligonucleótidos ya se ha evaluado en diversos estudios, como el de Zhu et al. (2019), donde probaron una vacuna de CDs pulsada con lisados de células madre de glioma y activadas con oligonucleótidos con motivos CpG en un modelo ortotópico de glioma y observaron que esta vacuna mejoraba la sobrevivencia de los ratones y producía una regresión de sus tumores.

Además, para tener una mejor valoración del nivel de maduración de las CDs también sería conveniente medir, más marcadores de activación y la producción de citocinas y quimiocinas, que son producidas por las CDs maduras (Bol et al., 2016; De Vries et al., 2003). En este sentido, Dearman et al. (2009) realizaron un estudio en donde probaron la activación de células dendríticas derivadas de células de médula ósea vía la unión de ligandos para diferentes tipos de receptores tipo Toll: TLR 1-2, TLR 4, TLR 5, TLR 6, TLR 7, y TLR 9. Para medir los niveles de activación utilizaron los marcadores de membrana MHC II, CD80, CD86, CD40 y CD45 y los niveles de citocinas IL-1 α , IL- β , IL-2, IL-6, IL-10, IL-12 y TNF α , en los sobrenadantes de los cultivos de células dendríticas activados con los diferentes adyuvantes.

Por último, ya que en el último experimento se observó un aumento en las cantidades de linfocitos T en los grupos que recibieron los tratamientos con 5-FU y DC-Vax+5-FU y estos linfocitos tuvieron un aumento en la expresión de PD-1, se podría considerar conveniente la combinación de los tratamientos evaluados en este proyecto, con la inmunoterapia de bloqueo de puntos de control inmunológico, para el tratamiento del cáncer de mama.

Capítulo 5. Conclusiones

1.- Los coadyuvantes probados (vacunas profilácticas y partículas virales de virus de plantas) no son suficientes para incrementar la maduración de las células dendríticas, comparándolas con el coadyuvante LPS. Se propone probar nuevos coadyuvantes, como los oligonucleótidos con motivos CpG para la maduración de las células dendríticas.

2.- La vacunación autóloga con células dendríticas activadas con LPS o con la vacuna profiláctica Vanguard Plus y LPS redujo los tumores primarios de cáncer de mama. Sin embargo, esta reducción fue muy pequeña, por lo que no es suficiente suministrar esta inmunoterapia para eliminar las células cancerígenas.

3.- El 5-FU es un agente quimioterapéutico efectivo para la eliminación de células 4T1 de cáncer de mama y para la eliminación de células MDSCs en ratones. Sin embargo, se propone probar una dosis más alta a la utilizada en este estudio, para su combinación con la vacunación autóloga de células dendríticas.

4.- La combinación de la vacunación autóloga de células dendríticas y el 5-FU no fue efectiva para tratar los tumores primarios de cáncer de mama. Sin embargo, propiciaron el incremento en los niveles de linfocitos T CD4⁺ y T CD8⁺ en la sangre de los ratones que recibieron el tratamiento, estos linfocitos expresaban el marcador de agotamiento PD-1, lo que significa que anteriormente estuvieron activados y podrían reactivarse utilizando inhibidores de puntos de control inmunológico como anti PD-1 y anti PD-L1.

5.- Los niveles de anticuerpos anti-4T1 aumentan al administrar los tratamientos con 5-FU, DC-Vax y el tratamiento combinado de DC-Vax+5-FU, lo que implica que está sucediendo una respuesta inmune humoral ante los tratamientos y sería conveniente analizarla más a fondo.

Literatura citada

- Ahrends, T., Spanjaard, A., Pilzecker, B., Bąbała, N., Bovens, A., Xiao, Y., Jacobs, H., Borst, J. 2017. CD4+ T Cell Help Confers a Cytotoxic T Cell Effector Program Including Coinhibitory Receptor Downregulation and Increased Tissue Invasiveness. *Immunity*, 47(5), 848-861.e5. doi:10.1016/j.immuni.2017.10.009
- Bjerregaard, A. M., Nielsen, M., Jurtz, V., Barra, C. M., Hadrup, S. R., Szallasi, Z., Eklund, A. C. 2017. An analysis of natural T cell responses to predicted tumor neoepitopes. *Frontiers in Immunology*, 8, 1–9. doi:10.3389/fimmu.2017.01566
- Bol, K. F., Aarntzen, E. H. J. G., Pots, J. M., Olde Nordkamp, M. A. M., van de Rakt, M. W. M. M., Scharenborg, N. M., de Boer, A. J., van Oorschot, T. G. M., Croockewit, S. A. J., Blokk, W. A. M., Oyen, W. J. G., Boerman, O. C., Mus, R. D. M., van Rossum, M. M., van der Graaf, C. A. A., Punt, C. J. A., Adema, G. J., Figdor, C. G., ... Schreiber, G. 2016. Prophylactic vaccines are potent activators of monocyte-derived dendritic cells and drive effective anti-tumor responses in melanoma patients at the cost of toxicity. *Cancer Immunology, Immunotherapy*, 65(3), 327–339. doi:10.1007/s00262-016-1796-7
- Bronte, V., Brandau, S., Chen, S. H., Colombo, M. P., Frey, A. B., Greten, T. F., Mandruzzato, S., Murray, P. J., Ochoa, A., Ostrand-Rosenberg, S., Rodriguez, P. C., Sica, A., Umansky, V., Vonderheide, R. H., Gabrilovich, D. I. 2016. Recommendations for myeloid-derived suppressor cell nomenclature and characterization standards. *Nature Communications*, 7, 1–10. doi:10.1038/ncomms12150
- Brook, N., Brook, E., Dharmarajan, A., Dass, C. R., Chan, A. 2018. Breast cancer bone metastases: pathogenesis and therapeutic targets. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, 96(December 2017), 63–78. doi:10.1016/j.biocel.2018.01.003
- Chen, D. S., Mellman, I. 2013. Oncology meets immunology: The cancer-immunity cycle. *Immunity*, 39(1), 1–10. doi:10.1016/j.immuni.2013.07.012
- Chen, Y., Liu, R., Li, C., Song, Y., Liu, G., Huang, Q., Yu, L., Zhu, D., Lu, C., Lu, A., Li, L., Liu, Y. 2021. Nab-paclitaxel promotes the cancer-immunity cycle as a potential immunomodulator. *American journal of cancer research*, 11(7), 3445–3460.
- Chiang, C. L.-L., Ledermann, J. A., Rad, A. N., Katz, D. R., Chain, B. M. 2006. Hypochlorous acid enhances immunogenicity and uptake of allogeneic ovarian tumor cells by dendritic cells to cross-prime tumor-specific T cells. *Cancer Immunology, Immunotherapy*, 55, 1384–1395. doi:10.1007/s00262-006-0127-9
- Corti, C., Giachetti, P. P. M. B., Eggermont, A. M. M., Delaloge, S., Curigliano, G. 2022. Therapeutic vaccines for breast cancer: Has the time finally come? *European Journal of Cancer*, 160, 150–174. doi:10.1016/j.ejca.2021.10.027
- Cranmer, L. D., Trevor, K. T., Hersh, E. M. 2004. Clinical applications of dendritic cell vaccination in the treatment of cancer. *Cancer Immunology, Immunotherapy*, 53(4), 275–306. doi:10.1007/s00262-003-0432-5

- Czerniecki, B. J., Koski, G. K., Koldovsky, U., Xu, S., Cohen, P. A., Mick, R., Nisenbaum, H., Pasha, T., Xu, M., Fox, K. R., Weinstein, S., Orel, S. G., Vonderheide, R., Coukos, G., DeMichele, A., Araujo, L., Spitz, F. R., Rosen, M., ... Zhang, P. J. 2007. Targeting HER-2/neu in early breast cancer development using dendritic cells with staged interleukin-12 burst secretion. *Cancer Research*, 67(4), 1842–1852. doi:10.1158/0008-5472.CAN-06-4038
- De Sanctis, F., Solito, S., Ugel, S., Molon, B., Bronte, V., Marigo, I. 2016. MDSCs in cancer: Conceiving new prognostic and therapeutic targets. *Biochimica et Biophysica Acta - Reviews on Cancer*, 1865(1), 35–48. doi:10.1016/j.bbcan.2015.08.001
- De Vries, I. J. M., Krooshoop, D. J. E. B., Scharenborg, N. M., Lesterhuis, W. J., Diepstra, J. H. S., Van Muijen, G. N. P., Strijk, S. P., Ruers, T. J., Boerman, O. C., Oyen, W. J. G., Adema, G. J., Punt, C. J. A., Figdor, C. G. 2003. Effective migration of antigen-pulsed dendritic cells to lymph nodes in melanoma patients is determined by their maturation state. *Cancer Research*, 63(1), 12–17.
- De Vries, I. J. M., Lesterhuis, W. J., Scharenborg, N. M., Engelen, L. P. H., Ruiter, D. J., Gerritsen, M. J. P., Croockewit, S., Britten, C. M., Torensma, R., Adema, G. J., Figdor, C. G., Punt, C. J. A. 2003. Maturation of Dendritic Cells Is a Prerequisite for Inducing Immune Responses in Advanced Melanoma Patients. *Clinical Cancer Research*, 9(14), 5091–5100.
- Dearman, R. J., Cumberbatch, M., Maxwell, G., Basketter, D. A., Kimber, I. 2009. Toll-like receptor ligand activation of murine bone marrow-derived dendritic cells. *Immunology*, 126(4), 475–484. doi:10.1111/j.1365-2567.2008.02922.x
- Di Pucchio, T., Pilla, L., Capone, I., Ferrantini, M., Montefiore, E., Urbani, F., Patuzzo, R., Pennacchioli, E., Santinami, M., Cova, A., Sovera, G., Arienti, F., Lombardo, C., Lombardi, A., Caporaso, P., D'Atri, S., Marchetti, P., Bonmassar, E., ... Rivoltini, L. 2006. Immunization of stage IV melanoma patients with Melan-A/MART-1 and gp100 peptides plus IFN- α results in the activation of specific CD8+ T cells and monocyte/dendritic cell precursors. *Cancer Research*, 66(9), 4943–4951. doi:10.1158/0008-5472.CAN-05-3396
- Durgeau, A., Virk, Y., Corgnac, S., Mami-Chouaib, F. 2018. Recent advances in targeting CD8 T-cell immunity for more effective cancer immunotherapy. *Frontiers in Immunology*, 9, 1–14. doi:10.3389/fimmu.2018.00014
- El Ansary, M., Mogawer, S., Elhamid, S. A., Alwakil, S., Aboelkasem, F., Sabaawy, H. El, Abdelhalim, O. 2013. Immunotherapy by autologous dendritic cell vaccine in patients with advanced HCC. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*, 139(1), 39–48. doi:10.1007/s00432-012-1298-8
- Fenga, C. 2016. Occupational exposure and risk of breast cancer (Review). *Biomedical Reports*, 4(3), 282–292. doi:10.3892/br.2016.575
- Galon, J., Bruni, D. 2019. Approaches to treat immune hot, altered and cold tumours with combination immunotherapies. *Nature Reviews Drug Discovery*, 18(3), 197–218. doi:10.1038/s41573-018-0007-y
- Godoy-Calderón, M. J., González-Marcano, E., Carballo, J., Convit, A. F. 2019. Evaluation of a ConvitVax/anti-PD-1 combined immunotherapy for breast cancer treatment. *Oncotarget*, 10(61),

6546–6560. doi:10.18632/oncotarget.27283

- Gros, A., Parkhurst, M. R., Tran, E., Pasetto, A., Robbins, P. F., Ilyas, S., Prickett, T. D., Gartner, J. J., Crystal, J. S., Roberts, I. M., Trebska-Mcgowan, K., Wunderlich, J. R., Yang, J. C., Rosenberg, S. A. 2016. Prospective identification of neoantigen-specific lymphocytes in the peripheral blood of melanoma patients. *Nature Medicine*, 22(4), 433–438. doi:10.1038/nm.4051
- Hanahan, D. 2022. Hallmarks of Cancer: New Dimensions. *Cancer Discovery*, 12(1), 31–46. doi:10.1158/2159-8290.CD-21-1059
- Hanahan, D., Weinberg, R. A. 2011. Hallmarks of cancer: The next generation. *Cell*, 144(5), 646–674. doi:10.1016/j.cell.2011.02.013
- Harbeck, N., Penault-Llorca, F., Cortes, J., Gnant, M., Houssami, N., Poortmans, P., Ruddy, K., Tsang, J., Cardoso, F. 2019. Breast cancer. *Nature Reviews Disease Primers*, 5(66), 1-31. doi:10.1038/s41572-019-0111-2
- Hashmi, A. A., Aijaz, S., Khan, S. M., Mahboob, R., Irfan, M., Zafar, N. I., Nisar, M., Siddiqui, M., Edhi, M. M., Faridi, N., Khan, A. 2018. Prognostic parameters of luminal A and luminal B intrinsic breast cancer subtypes of Pakistani patients. *World Journal of Surgical Oncology*, 16(1), 1–6. doi:10.1186/s12957-017-1299-9
- Hennessy, B. T., Krishnamurthy, S., Giordano, S., Buchholz, T. A., Kau, S. W., Duan, Z., Valero, V., Hortobagyi, G. N. 2005. Squamous cell carcinoma of the breast. *Journal of Clinical Oncology*, 23(31), 7827–7835. doi:10.1200/JCO.2004.00.9589
- Ho, A. Y., Tabrizi, S., Dunn, S. A., McArthur, H. L. 2022. Current advances in immune checkpoint inhibitor combinations with radiation therapy or cryotherapy for breast cancer. *Breast Cancer Research and Treatment*, 191(2), 229–241. doi:10.1007/s10549-021-06408-z
- Holen, I., Lefley, D. V, Francis, S. E., Rennicks, S., Bradbury, S., Coleman, R. E., Ottewell, P. 2016. IL-1 drives breast cancer growth and bone metastasis in vivo. *Oncotarget*, 7(46), 75571–75584. doi:10.18632/oncotarget.12289
- Huang, A. C., Postow, M. A., Orlovski, R. J., Mick, R., Bengsch, B., Manne, S., Xu, W., Harmon, S., Giles, J. R., Wenz, B., Adamow, M., Kuk, D., Panageas, K. S., Carrera, C., Wong, P., Quagliarello, F., Wubbenhorst, B., D’Andrea, K., ... Wherry, E. J. 2017. T-cell invigoration to tumour burden ratio associated with anti-PD-1 response. *Nature*, 545(7652), 60–65. doi:10.1038/nature22079
- Hubo, M., Trinschek, B., Kryczanowsky, F., Tuettenberg, A., Steinbrink, K., Jonuleit, H. 2013. Costimulatory molecules on immunogenic versus tolerogenic human dendritic cells. *Frontiers in Immunology*, 4, 1–14. doi:10.3389/fimmu.2013.00082
- IARC. 2020. Mexico Source: Globocan 2020. International Agency for Research on Cancer WHO, 929, 1–2. de <https://gco.iarc.fr/today/data/factsheets/populations/484-mexico-fact-sheets.pdf>

- Kantoff, P. W., Higano, C. S., Shore, N. D., Berger, E. R., Small, E. J., Penson, D. F., Redfern, C. H., Ferrari, A. C., Dreicer, R., Sims, R. B., Xu, Y., Frohlich, M. W., Schellhammer, P. F. 2010. Sipuleucel-T immunotherapy for castration-resistant prostate cancer. *New England Journal of Medicine*, 363(5), 411–422. doi:10.1056/NEJMoa1001294
- Koury, J., Lucero, M., Cato, C., Chang, L., Geiger, J., Henry, D., Hernandez, J., Hung, F., Kaur, P., Teskey, G., Tran, A. 2018. Immunotherapies: Exploiting the immune system for cancer treatment. *Journal of Immunology Research*, 2018, 1–16. doi:10.1155/2018/9585614
- Leelatian, N., Doxie, D. B., Greenplate, A. R., Sinnaeve, J., Ihrie, R. A., Irish, J. M. 2018. Preparing viable single cells from human tissue and tumors for cytomic analysis. *Current Protocols in Molecular Biology*, 25C.1.1-25C.1.23. doi:10.1002/cpmb.37
- Lesterhuis, W. J., Aarntzen, E. H. J. G., De Vries, I. J. M., Schuurhuis, D. H., Figdor, C. G., Adema, G. J., Punt, C. J. A. 2008. Dendritic cell vaccines in melanoma: From promise to proof? *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, 66(2), 118–134. doi:10.1016/j.critrevonc.2007.12.007
- Mastelic-Gavillet, B., Balint, K., Boudousquie, C., Gannon, P. O., Kandalaft, L. E. 2019. Personalized dendritic cell vaccines-recent breakthroughs and encouraging clinical results. *Frontiers in Immunology*, 10, 1–10. doi:10.3389/fimmu.2019.00766
- Mcperson, K., Steel, C. M., Dixon, J. M. 2000. ABC of Breast Diseases Breast cancer-epidemiology, risk factors, and genetics. 321, 624–628. doi:10.1136/bmj.321.7261.624
- Miggelbrink, A. M., Jackson, J. D., Lorrey, S. J., Srinivasan, E. S., Waibl-Polania, J., Wilkinson, D. S., Fecci, P. E. 2021. CD4 T-Cell exhaustion: Does it exist and what are its roles in cancer? *Clinical Cancer Research*, 27(21), 5742–5752. doi:10.1158/1078-0432.CCR-21-0206
- Mittrücker, H. W., Visekruna, A., Huber, M. 2014. Heterogeneity in the Differentiation and Function of CD8+ T Cells. *Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis*, 62(6), 449–458. doi:10.1007/s00005-014-0293-y
- Mohammad, K. S., Javelaud, D., Fournier, P. G. J., Niewolna, M., McKenna, C. R., Peng, X. H., Duong, V., Dunn, L. K., Mauviel, A., Guise, T. A. 2011. TGF- β -RI kinase inhibitor SD-208 reduces the development and progression of melanoma bone metastases. *Cancer Research*, 71(1), 175–184. doi:10.1158/0008-5472.CAN-10-2651
- Morse, M. A., Niedzwiecki, D., Marshall, J. L., Garrett, C., Chang, D. Z., Aklilu, M., Crocenzi, T. S., Cole, D. J., Dessureault, S., Hobeika, A. C., Osada, T., Onaitis, M., Clary, B. M., Hsu, D., Devi, G. R., Bulusu, A., Annechiarico, R. P., Chadaram, V., ... Lyerly, H. K. 2013. A randomized phase II study of immunization with dendritic cells modified with poxvectors encoding CEA and MUC1 compared with the same poxvectors plus GM-CSF for resected metastatic colorectal cancer. *Annals of Surgery*, 258(6), 879–886. doi:10.1097/SLA.0b013e318292919e
- Nestle, F. O., Farkas, A., Conrad, C. 2005. Dendritic-cell-based therapeutic vaccination against cancer. *Current Opinion in Immunology*, 17(2), 163–169. doi:10.1016/j.coi.2005.02.003

- Neuzillet, C., Tijeras-Raballand, A., Cohen, R., Cros, J., Faivre, S., Raymond, E., De Gramont, A. 2015. Targeting the TGF β pathway for cancer therapy. *Pharmacology and Therapeutics*, 147, 22–31. doi:10.1016/j.pharmthera.2014.11.001
- Newman, J. H., Chesson, C. B., Herzog, N. L., Bommareddy, P. K., Aspromonte, S. M., Pepe, R., Estupinian, R., Aboelatta, M. M., Buddhadev, S., Tarabichi, S., Lee, M., Li, S., Medina, D. J., Giurini, E. F., Gupta, K. H., Guevara-Aleman, G., Rossi, M., Nowicki, C., ... Zloza, A. 2020. Intratumoral injection of the seasonal flu shot converts immunologically cold tumors to hot and serves as an immunotherapy for cancer. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 117(2), 1119–1128. doi:10.1073/pnas.1904022116
- Nuñez-Rivera, A., Fournier, P. G. J., Arellano, D. L., Rodriguez-Hernandez, A. G., Vazquez-Duhalt, R., Cadena-Nava, R. D. 2020. Brome mosaic virus-like particles as siRNA nanocarriers for biomedical purposes. *Beilstein Journal of Nanotechnology*, 11, 372–382. doi:10.3762/bjnano.11.28
- Paharkova-Vatchkova, V., Maldonado, R., Kovats, S. 2004. Estrogen Preferentially Promotes the Differentiation of CD11c + CD11b intermediate Dendritic Cells from Bone Marrow Precursors. *The Journal of Immunology*, 172(3), 1426–1436. doi:10.4049/jimmunol.172.3.1426
- Pecorino, L. 2012. Introduction. *Molecular Biology of Cancer: mechanisms, targets, and therapeutics*. En University of Greenwich. Oxford University Press. pp. 1-20.
- Prokopowicz, Z. M., Arce, F., Biedron, R., Chiang, C. L.-L., Cizek, M., Katz, D. R., Nowakowska, M., Zapotoczny, S., Marcinkiewicz, J., Chain, B. M. 2010. Hypochlorous Acid: A Natural Adjuvant That Facilitates Antigen Processing, Cross-Priming, and the Induction of Adaptive Immunity. *The Journal of Immunology*, 184(2), 824–835. doi:10.4049/jimmunol.0902606
- Roche, P. A., Furuta, K. 2015. The ins and outs of MHC class II-mediated antigen processing and presentation. *Nature Reviews Immunology*, 15(4), 203–216. doi:10.1038/nri3818
- Rock, K. L., Reits, E., Neefjes, J. 2016. Present Yourself! By MHC Class I and MHC Class II Molecules. *Trends in Immunology*, 37(11), 724–737. doi:10.1016/j.it.2016.08.010
- Safarzadeh, E., Hashemzadeh, S., Duijf, P. H. G., Mansoori, B., Khaze, V., Mohammadi, A., Kazemi, T., Yousefi, M., Asadi, M., Mohammadi, H., Babaie, F., Baradaran, B. 2019. Circulating myeloid-derived suppressor cells: An independent prognostic factor in patients with breast cancer. *Journal of Cellular Physiology*, 234(4), 3515–3525. doi:10.1002/jcp.26896
- Sahin, U., Türeci, Ö. 2018. Personalized vaccines for cancer immunotherapy. *Science*, 359(6382), 1355–1360. doi:10.1126/science.aar7112
- Sarivalasis, A., Boudousquié, C., Balint, K., Stevenson, B. J., Gannon, P. O., Iancu, E. M., Rossier, L., Martin Lluesma, S., Mathevet, P., Sempoux, C., Coukos, G., Dafni, U., Harari, A., Bassani-Sternberg, M., Kandalaft, L. E. 2019. A Phase I/II trial comparing autologous dendritic cell vaccine pulsed either with personalized peptides (PEP-DC) or with tumor lysate (OC-DC) in patients with advanced high-grade ovarian serous carcinoma. *Journal of Translational Medicine*, 17(1), 1–10. doi:10.1186/s12967-019-02133-w

- Schmid, P., Rugo, H. S., Adams, S., Schneeweiss, A., Barrios, C. H., Iwata, H., Diéras, V., Henschel, V., Molinero, L., Chui, S. Y., Maiya, V., Husain, A., Winer, E. P., Loi, S., Emens, L. A. 2020. Atezolizumab plus nab-paclitaxel as first-line treatment for unresectable, locally advanced or metastatic triple-negative breast cancer (IMpassion130): updated efficacy results from a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 3 trial. *The Lancet Oncology*, 21(1), 44–59. doi:10.1016/S1470-2045(19)30689-8
- Schreibelt, G., Benitez-Ribas, D., Schuurhuis, D., Lambeck, A. J. A., Van Hout-Kuijper, M., Schaft, N., Punt, C. J. A., Figdor, C. G., Adema, G. J., De Vries, I. J. M. 2010. Commonly used prophylactic vaccines as an alternative for synthetically produced TLR ligands to mature monocyte-derived dendritic cells. *Blood*, 116(4), 564–574. doi:10.1182/blood-2009-11-251884
- Scimeca, M., Antonacci, C., Toschi, N., Giannini, E., Bonfiglio, R., Buonomo, C. O., Pistolese, C. A., Tarantino, U., Bonanno, E. 2018. Breast Osteoblast-like Cells: A Reliable Early Marker for Bone Metastases From Breast Cancer. *Clinical breast cancer*, 18(4), e659—e669. doi:10.1016/j.clbc.2017.11.020
- Scott, A. M., Wolchok, J. D., Old, L. J. 2012. Antibody therapy of cancer. *Nature Reviews Cancer*, 12(4), 278–287. doi:10.1038/nrc3236
- Song, N., Guo, H., Ren, J., Hao, S., Wang, X. 2018. Synergistic anti-tumor effects of dasatinib and dendritic cell vaccine on metastatic breast cancer in a mouse model. *Oncology Letters*, 15, 6831–6838. doi:10.3892/ol.2018.8188
- Spörri, R., Reis e Sousa, C. 2005. Inflammatory mediators are insufficient for full dendritic cell activation and promote expansion of CD4+ T cell populations lacking helper function. *Nature Immunology*, 6(2), 163–170. doi:10.1038/ni1162
- Sung, H., Ferlay, J., Siegel, R. L., Laversanne, M., Soerjomataram, I., Jemal, A., Bray, F. 2021. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 71(3), 209–249. doi:10.3322/caac.21660
- Tanyi, J. L., Bobisse, S., Ophir, E., Tuyaeerts, S., Roberti, A., Genolet, R., Baumgartner, P., Stevenson, B. J., Iseli, C., Dangaj, D., Czerniecki, B., Semilietof, A., Racle, J., Michel, A., Xenarios, I., Chiang, C., Monos, D. S., Torigian, D. A., ... Kandalafi, L. E. 2018. Personalized cancer vaccine effectively mobilizes antitumor T cell immunity in ovarian cancer. *Science Translational Medicine*, 10(436), 1–15. doi:10.1126/scitranslmed.aao5931
- Tomasichio, M., Semple, L., Esmail, A., Meldau, R., Randall, P., Pooran, A., Davids, M., Cairncross, L., Anderson, D., Downs, J., Malherbe, F., Novitzky, N., Panieri, E., Oelofse, S., Londt, R., Naiker, T., Dheda, K. 2019. An autologous dendritic cell vaccine polarizes a Th-1 response which is tumoricidal to patient-derived breast cancer cells. *Cancer Immunology, Immunotherapy*, 68(1), 71–83. doi:10.1007/s00262-018-2238-5
- Tower, H., Ruppert, M., Britt, K. 2019. The immune microenvironment of breast cancer progression. *Cancers*, 11(9), 1–15. doi:10.3390/cancers11091375
- Tumeh, P. C., Harview, C. L., Yearley, J. H., Shintaku, I. P., Taylor, E. J. M., Robert, L., Chmielowski, B., Spasic,

- M., Henry, G., Ciobanu, V., West, A. N., Carmona, M., Kivork, C., Seja, E., Cherry, G., Gutierrez, A. J., Grogan, T. R., Mateus, C., ... Ribas, A. 2014. PD-1 blockade induces responses by inhibiting adaptive immune resistance. *Nature*, 515(7528), 568–571. doi:10.1038/nature13954
- Vidal, M., Paré, L., Prat, A. 2016. Molecular classification of breast cancer. *Management of Breast Diseases: Second Edition*, 27(1), 203–219. doi:10.1007/978-3-319-46356-8_12
- Vincent, J., Mignot, G., Chalmin, F., Ladoire, S., Bruchard, M., Chevriaux, A., Martin, F., Apetoh, L., Rébé, C., Ghiringhelli, F. 2010. 5-Fluorouracil selectively kills tumor-associated myeloid-derived suppressor cells resulting in enhanced T cell-dependent antitumor immunity. *Cancer Research*, 70(8), 3052–3061. doi:10.1158/0008-5472.CAN-09-3690
- Waks, A. G., Winer, E. P. 2019. Breast Cancer Treatment: A Review. *JAMA - Journal of the American Medical Association*, 321(3), 288–300. doi:10.1001/jama.2018.19323
- Wang, C., Beiss, V., Steinmetz, N. F. 2019a. Cowpea Mosaic Virus Nanoparticles and Empty Virus-Like Particles Show Distinct but Overlapping Immunostimulatory Properties. *Journal of Virology*, 93(21). doi:10.1128/jvi.00129-19
- Wang, S. si, Liu, W., Ly, D., Xu, H., Qu, L., Zhang, L. 2019b. Tumor-infiltrating B cells: their role and application in anti-tumor immunity in lung cancer. *Cellular and Molecular Immunology*, 16(1), 6–18. doi:10.1038/s41423-018-0027-x
- Xing, K., Gu, B., Zhang, P., Wu, X. 2015. Dexamethasone enhances programmed cell death 1 (PD-1) expression during T cell activation: An insight into the optimum application of glucocorticoids in anti-cancer therapy. *BMC Immunology*, 16(1), 1–9. doi:10.1186/s12865-015-0103-2
- Xu, X., Zhang, C., Trotter, T. N., Gowda, P. S., Lu, Y., Ponnazhagan, S., Javed, A., Li, J., Yang, Y. 2020. Runx2 deficiency in osteoblasts promotes myeloma progression by altering the bone microenvironment at new bone sites. *Cancer Research*, 80(5), 1036–1048. doi:10.1158/0008-5472.CAN-19-0284
- Yerukala Sathipati, S., Ho, S. Y. 2018. Identifying a miRNA signature for predicting the stage of breast cancer. *Scientific Reports*, 8(1), 1–11. doi:10.1038/s41598-018-34604-3
- Zhu, S., Lv, X., Zhang, X., Li, T., Zang, G., Yang, N., Wang, X., Wu, J., Chen, W., Liu, Y. J., Chen, J. 2019. An effective dendritic cell-based vaccine containing glioma stem-like cell lysate and CpG adjuvant for an orthotopic mouse model of glioma. *International Journal of Cancer*, 144(11), 2867–2879. doi:10.1002/ijc.32008
- Zou, Y., Zou, X., Zheng, S., Tang, H., Zhang, L., Liu, P., Xie, X. 2020. Efficacy and predictive factors of immune checkpoint inhibitors in metastatic breast cancer: a systematic review and meta-analysis. *Therapeutic Advances in Medical Oncology*, 12, 1–17. doi:10.1177/1758835920940928

Anexos

Tabla 3. Anticuerpos utilizados para citometría de flujo

Nombre del anticuerpo	Fuente y número de catálogo	Especie	Concentración	Detalles específicos de aplicación
Anti-mouse CD3 ϵ conjugado a FITC	eBioscience, clona 145-2C11, cat #11-0031-82	Hamster	250 ng / 10 ⁶ Células	Bloqueo en 1X, 1% BSA, 0.5 mM EDTA, 10% SFB, anti-CD16/32 (10min, RT). Teñido en buffer de bloqueo (30min, 4°C)
Anti-mouse CD3 ϵ conjugado a PE	eBioscience, clona 145-2C11, cat # 12-0031-82	Hamster	500 ng / 10 ⁶ Células	
Anti-mouse CD4 conjugado a PERCP-Cy5.5	eBioscience, clona RM4-5, cat # 45-0042-82	Rata	62.5 ng / 10 ⁶ Células	
Anti-mouse CD8 α conjugado a AF488	eBioscience, clona 53-6.7, cat # 53-0081-82	Rata	250 ng / 10 ⁶ Células	
Anti-mouse CD8 α conjugado a APC	eBioscience, clona 53-6.7, cat # 17-0081-82	Rata	250 ng / 10 ⁶ Células	
Anti-mouse CD11b conjugado a FITC	BioLegend, clona M1/70, cat # 101205	Rata	31.3 ng / 10 ⁶ Células	
Anti-mouse CD11b conjugado a PE	BioLegend, clona M1/70, cat # 101207	Rata	31.3 ng / 10 ⁶ Células	
Anti-mouse CD11 conjugado a FITC	BioLegend clona N418, cat # MA5-16877	Hamster	125 ng / 10 ⁶ Células	
Anti-mouse CD80 conjugado a PE	Invitrogen clona 16-10A1, cat # 14-0801-82	Hamster	30 ng / 10 ⁶ Células	
Anti-mouse CD86 conjugado a APC	Invitrogen clona GL-1, cat # 17-0862-82	Rata	30 ng / 10 ⁶ Células	
Anti-mouse CD86 conjugado a PE Cy7	Invitrogen clona GL-1, cat # 25-0862-82	Rata	30 ng / 10 ⁶ Células	

Anti-mouse CD90.2 conjugado a PE-Cy7	BioLegend, clona 53-2.1, cat # 140309	Rata	15 ng / 10 ⁶ Células	
Anti-mouse Ly6C conjugado a PerCP-Cy5.5	eBioscience, clona HK1.4, cat # 45-5932	Rata	125 ng / 10 ⁶ Células	
Anti-mouse Ly6G conjugado a APC-Cy7	BioLegend, clona 1A8, cat # 127623	Rata	31.3 ng / 10 ⁶ Células	
Anti-mouse MHC II conjugado a PE-Cy7	BioLegend, clona M5/144.15.2, cat # 25-53-21-82	Rata	60 ng / 10 ⁶ Células	
Anti-mouse PD-1 conjugado a APC-Cy7	BioLegend, clona 29F.1A12, cat # 135224	Rata	125 ng / 10 ⁶ Células	
Anti-mouse CD62L conjugado a PE	eBioscience, clona MEL-14, cat #12-06-21-82	Rata	125 ng / 10 ⁶ Células	
Anti-mouse CD16/32 Ultra-LEAF	BioLegend, clona 93, cat # 101330	Rata	1 µg / 10 ⁶ Células	Diluido en in blocking buffer (PBS (1X), 1% BSA, 0.5 mM EDTA, 10% FBS)

Tabla 4 . Nombre y formulación de las vacunas profilácticas utilizadas como coadyuvantes.

Nombre de la vacuna	Marca	Formulación (dosis 1ml)
Defensor 1	Zoetis	-Virus Rábico cepa PV-Paris (Pasteur) replicado en una línea celular estable, inactivado químicamente y adicionado con un adyuvante. -Conservador: Gentamicina.
Vanguard Plus 5/CV-L	Zoetis	Fracción liofilizada virus viable modificado de: -Virus Distemper N-CDV ≥ 103.5 TCID ₅₀ -Adenovirus Canino Tipo 2, Cepa Manhattan ≥ 103.4 TCID ₅₀ -Parainfluenza Canina, Cepa NL-CPI-5 ≥ 105.5 TCID ₅₀ -Parvovirus Canino, Cepa NL-35-D ≥ 107.2 TCID ₅₀ - <i>Leptospira canicola</i> , Cepa C-51 600 UN - <i>L. icterohaemorrhagiae</i> , Cepa NADL 11403 600 UN -Fracción Líquida (Diluyente): ≥ 1.49 RP -Coronavirus Canino, Cepa NL-18 -Conservador: Gentamicina