



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas**

“IDENTIFICACIÓN DE MIMÓTOPOS DE EPÍTOPOS DE CÉLULAS T USANDO  
BIBLIOTECAS DE EPÍTOPOS VARIABLES Y UN MODELO MURINO DE  
ADENOCARCINOMA DE MAMA”

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:  
Maestra en Ciencias

PRESENTA:  
ERÉNDIRA GUADALUPE PÉREZ HERNÁNDEZ

TUTOR PRINCIPAL:  
DR. KAREN MANOUTCHARIAN AIRAPETIAN  
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS

COMITÉ TUTOR  
DR. LUIS PADILLA NORIEGA  
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS  
DR. ROGELIO ENRIQUE HERNÁNDEZ PANDO  
INSTITUTO NACIONAL DE CIENCIAS MÉDICAS Y NUTRICIÓN “SALVADOR ZUBIRÁN”

Ciudad de México, Abril, 2016



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

JURADO ASIGNADO:

**PRESIDENTE:** Dr. Luis Alfonso Vaca Domínguez

**VOCAL:** Dr. Enrique Ortega Soto

**VOCAL:** Dra. Paula Licona Limón

**VOCAL:** Dr. Abraham Landa Piedra

**SECRETARIO:** Dra. Yvonne Rosenstein Azoulay

**SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:** Este trabajo de Tesis se realizó en el Departamento de Inmunología del Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México.

**TUTOR PRINCIPAL:**

DR. KAREN MANOUTCHARIAN AIRAPETIAN

---

**SUSTENTANTE:**

ERÉNDIRA GUADALUPE PÉREZ HERNÁNDEZ.

---

## **Agradecimientos**

El sustentante Eréndira Guadalupe Pérez Hernández, desea agradecer:

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el otorgamiento de la beca de maestría para el desarrollo del presente trabajo.

Al Consejo Mexiquense de Ciencia y Tecnología (COMECyT) por el otorgamiento de la beca para tesis de posgrado.

Al Programa de Apoyo a los Estudios del Posgrado (PAEP) por el apoyo recibido para participar en el XV Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería y XII Simposio Internacional de la genética de microorganismos industriales.

A la Dirección General Asuntos del Personal Académico-UNAM (DGAPA-UNAM) por el apoyo de financiamiento para este proyecto (216110).

## **Agradecimientos personales**

A la Universidad Nacional Autónoma de México, mi segunda casa, en la que he podido adquirir conocimiento y nuevas experiencias al lado de compañeros y amigos.

Al Dr. Karen Manoutcharian, porque el crear pocas personas lo hacen resultado de un verdadero talento, le agradezco la oportunidad que me brindo al ser parte de su laboratorio, gracias por creer en mí, por su apoyo y enseñanzas.

Al Dr. Rogelio Hernández Pando y al Dr. Luis Padilla por su tiempo, sugerencias y observaciones durante el desarrollo de este trabajo.

A los miembros del jurado: Dr. Luis Alfonso Vaca Domínguez, Dr. Enrique Ortega Soto, Dra. Paula Licona Limón, Dr. Abraham Landa Piedra y Dra. Yvonne Rosenstein Azoulay por la revisión de este trabajo y por las observaciones realizadas.

## **Dedicatoria**

A Dios: quien me ha dado la fuerza, el amor y la guía necesarios para seguir adelante y continuar con este camino, que si bien no ha sido el más fácil si el mejor que pude haber tomado.

A mis padres y hermanos, les agradezco su apoyo, amor, comprensión y por estar ahí siempre.

A mi familia, en especial a mis ti@s Catalina, Sonia, Patricia, Lilia, Gloria, Paco, Beto, Félix, Jesús, a mis primos, Iván, Mario, Rosita, Manuel, Mari muchas gracias por su compañía, sus consejos y apoyo incondicional.

A mis amigos Jaque, Angy, Karla, Carmen, Elia y Francisco, a los que conocí en Laboratorios LAFON y LOBIOL, en especial a Francis, Laura, Alejandrina, Marisol, Yadira, Karen Nayeli, Mari y Miguel muchas gracias por su amistad y apoyo.

A mis amigos del INER, en especial a Vero, Norma y Ángeles por todo su apoyo, las palabras de ánimo que me han brindado y por los momentos que hemos compartido.

A mis amigos del laboratorio Ceci, Gore, Luci, Mariel, Gabriel, Allan, Fernando, Joselo, Paco, Gery, Mariana, Oscar, Nef, Rubén, muchas gracias por los momentos que hemos compartido dentro y fuera del laboratorio y por su gran apoyo.

A Rodolfo por tu invaluable amistad, porque te agradezco todo el apoyo que me has brindado tanto en el ámbito profesional y académico como en el personal, gracias también por tu paciencia que sin ella no sé qué habría pasado.

## ÍNDICE

|  |    |
|--|----|
| <b>RESUMEN</b> .....   | 2  |
| <b>ABSTRACT</b> .....  | 3  |
| <b>INTRODUCCIÓN</b> .....  | 4  |
| <b>CÁNCER</b> .....  | 4  |
| Respuesta inmune en cáncer.....  | 4  |
| Cáncer de mama.....  | 8  |
| Factores de riesgo.....  | 9  |
| <b>INMUNOTERAPIA EN CÁNCER DE MAMA</b> .....   | 10 |
| Inmunoterapia basada en anticuerpos.....   | 10 |
| Transferencia adoptiva de linfocitos T.....  | 10 |
| Vacunas.....   | 11 |
| <b>DESPLIEGUE EN BACTERIÓFAGOS</b> .....   | 13 |
| <b>ANTECEDENTES</b> .....  | 15 |
| <b>BIBLIOTECAS DE EPÍTOPOS VARIABLES</b> .....   | 15 |
| <b>MIMÓTOPOS</b> .....   | 16 |
| <b>HIPÓTESIS</b> .....   | 17 |
| <b>OBJETIVO</b> .....  | 17 |
| <b>MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....  | 18 |
| DESCRIPCIÓN DE LAS BEVs.....   | 18 |
| TRANSFORMACIÓN DE CÉLULAS <i>E. coli</i> TG1.....  | 18 |
| RESCATE DE BIBLIOTECAS CON FAGO AYUDADOR Y OBTENCIÓN DE<br>FAGOS RECOMBINANTES.....              | 19 |
| IMPLANTE DE CÉLULAS 4T1 A RATONES BALB/c Y EVALUACIÓN DEL<br>EFECTO ANTITUMORAL DE LAS BEVs..... | 20 |
| INMUNIZACIÓN DE RATONES BALB/c.....  | 20 |
| ENSAYO DE PROLIFERACIÓN CELULAR.....   | 21 |
| ANÁLISIS DE LOS ENSAYOS DE PROLIFERACIÓN CELULAR POR<br>CITOMETRÍA DE FLUJO.....                 | 22 |
| <b>RESULTADOS</b> .....  | 23 |
| GENERACIÓN DE LAS BEVs.....  | 23 |



|  |    |
|--|----|
| EFFECTO ANTITUMORAL DE LAS BEVs G5d Y G3d.....   | 23 |
| DETERMINACIÓN DE LA PROLIFERACIÓN CELULAR AL EMPLEAR BEVs.....   | 28 |
| SELECCIÓN DE MIMÓTOPOS DE EPÍTOPOS RECONOCIDOS POR<br>LINFOCITOS T A PARTIR DEL TAMIZAJE DE LA BEV G3d.....                  | 30 |
| PORCENTAJES DE PROLIFERACIÓN OBTENIDOS AL EMPLEAR<br>CLONAS INDIVIDUALES PROVENIENTES DE LA BEV G3d.....                     | 31 |
| EFFECTO ANTITUMORAL DE LA BEV G3d Y DE LOS MIMÓTOPOS DE<br>LINFOCITOS T IDENTIFICADOS A PARTIR DEL TAMIZAJE DE LA MISMA..... | 33 |
| <b>DISCUSIÓN</b> .....   | 36 |
| <b>CONCLUSIONES</b> .....  | 39 |
| <b>PERSPECTIVAS</b> .....  | 40 |
| <b>REFERENCIAS</b> .....   | 41 |

## ABREVIATURAS

**AAT:** Antígenos asociados al tumor

**APC:** Célula presentadora de antígeno

**ATCC:** American Type Culture Collection

**BEVs:** Bibliotecas de epítomos variables

**cb:** Carbenicilina

**CEA:** Antígeno carcinoembrionario

**Célula NK:** Célula asesina natural

**CFSE:** 5,6 ester succinimidil diacetato de carboxifluoresceína

**ConA:** Concanavalina A

**DAMPs:** Patrones moleculares asociados al daño

**FDA:** Food and Drug Administration

**GM-CSF:** Factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos

**HER:** Receptor del factor de crecimiento epidérmico

**IFN:** Interferón

**IL:** Interleucina

**Kn:** Kanamicina

**MHC I y II:** Moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad clase I y II

**MUC-1:** Mucina 1

**PBS:** Amortiguador de fosfatos salino

**RTK:** Receptores tirosin cinasa

**SEM:** Error estándar de la media

**SFB:** Suero Fetal Bovino

**TCR:** Receptor de células T

**TILs:** Linfocitos infiltrantes del tumor

**TNF:** Factor de necrosis tumoral

**VEGF:** Factor de Crecimiento del Endotelio Vascular

## RESUMEN

El cáncer de mama representa un gran problema de salud al ser la principal causa de muertes relacionadas a cáncer en mujeres alrededor del mundo. A pesar de los esfuerzos que se han llevado a cabo para mejorar la calidad de vida de los pacientes, las terapias convencionales no son lo suficientemente eficaces. Los avances recientes en los conocimientos de inmunología del cáncer, biología molecular y biotecnología han permitido proponer nuevas estrategias terapéuticas, tal como el uso de anticuerpos monoclonales, la transferencia adoptiva de linfocitos T y el diseño de vacunas.

El creciente interés en el diseño de vacunas que sean opciones para el tratamiento de pacientes con cáncer de mama se ha limitado ya que este tipo de cáncer está constituido por un grupo heterogéneo de enfermedades, cuyo microambiente tumoral e interacción con la respuesta inmune del hospedero es compleja. Así, se han propuesto distintos diseños experimentales con el objetivo de activar la respuesta inmune antitumoral, tal es el caso del uso de Bibliotecas de Epítomos Variables (BEVs).

En este trabajo se seleccionaron mimótopos (epítomos que imitan estructuras antigénicas sin ser idénticas a ellas) a partir del tamizaje de BEVs, y se evaluó la actividad antitumoral de la respuesta inmune inducida por las BEVs (G3d y G5d) y de dichos mimótopos empleando un modelo murino de adenocarcinoma de mama. Como control se empleó un epítomo inicial (NGd) cuya secuencia de aminoácidos no tiene relación alguna con antígenos presentes en este adenocarcinoma. Se observó que el crecimiento tumoral de los ratones implantados con células 4T1 e inmunizados con las BEVs fue significativamente menor que el de aquellos ratones implantados e inmunizados con el epítomo inicial.

La selección de mimótopos a partir de la BEV G3d se realizó empleando como criterio porcentajes de proliferación de esplenocitos; así, la inmunización con el grupo de mimótopos denominado: 20 clonas negativas de G3d disminuyó el crecimiento y el peso tumoral respecto al observado al inmunizar con la BEV G3d, sin encontrarse diferencias significativas. Estos resultados sugieren que el uso de BEVs es una estrategia de utilidad en la selección de componentes de vacunas, pero es indispensable emplear criterios de selección más específicos para incrementar la respuesta inmune antitumoral.

## ABSTRACT

The breast cancer is a great health problem and is the main cause of death related to cancer in women worldwide. Despite years of efforts to improve life quality of patients, the conventional therapies are not effective enough. However, several recent advances in cancer immunology, molecular biology and biotechnology have allowed to propose new therapeutic strategies, such as: monoclonal antibodies, adoptive T cell transfer and new vaccines approaches.

The vaccine design for breast cancer patients have been hampered because this cancer is composed of distinct subtypes associated with different clinical outcomes. This heterogeneity causes a complex interaction between the tumor microenvironment and the host immune system. Recently, we have developed a new vaccine concept based on application of combinatorial epitope library designated as variable epitope libraries (VELs).

In this work, we selected mimotopes, which mimic antigenic structures without amino acid sequence identity, by screening the VELs. We tested the antitumor effects of the VELs (G5d and G3d) and the selected mimotopes on already established tumors in a metastatic mouse 4T1 breast tumor model. Our results showed significant tumor growth inhibition in BALB/c mice immunized with the VELs. The screening of mimotopes of the G3d library was performed using splenocyte proliferation assay. The immunization with the mimotopes selected (20 negative clones of G3d) showed lower tumor area and weight, although without reaching statistical significance, as compared with mice immunized with G3d library. These results suggest that the use of VELs is a feasible strategy for the selection of vaccine components, but is essential to use more specific selection criteria to increase the antitumor immune responses.

# INTRODUCCIÓN

## CÁNCER

Las células que constituyen un organismo mantienen un equilibrio entre proliferación y muerte celular. (Klaunig JE., 2004) En los primeros años de vida, las células se dividen durante el crecimiento de la persona mientras que en la edad adulta la mayoría de las células sólo se dividen para reemplazar células muertas o para reparar lesiones. La pérdida de este balance da lugar al cáncer, el cual es un conjunto de enfermedades que resultan del crecimiento descontrolado de una población celular que presenta alteraciones genéticas y epigénéticas provocando un genotipo y fenotipo alterado. (Ponder B., 2001)

La carcinogénesis es el proceso que conduce a la transformación progresiva de una célula normal a una célula tumoral. Este proceso consiste de múltiples etapas, de las cuales se han definido tres para su estudio: iniciación, promoción y progresión. En la iniciación, una célula adquiere mutaciones no letales debidas a daño inducido por agentes carcinógenos (químicos, físicos o biológicos) o bien, debido a mutaciones en la línea germinal que pueden predisponer a un cáncer heredable. Estas mutaciones son transmitidas a las células hijas durante la etapa de promoción, en donde la acumulación de estas células transformadas (debido a la inducción de la proliferación celular y/o inhibición de la apoptosis) origina una lesión preneoplásica. Finalmente, en la etapa de progresión, las células acumulan daño genético adicional, que conlleva a la adquisición de la capacidad de invadir tejidos adyacentes y crecer a distancia (metástasis), (Kindt J., 2007) dando lugar al fenotipo maligno. (Pitot HC., 1991; Klaunig JE., 2004)

## Respuesta inmune en cáncer

### Teoría de la inmunomodulación del cáncer

El sistema inmune está encargado de proteger al organismo de distintos agentes patógenos así como de la formación de tumores. (Abbas AKI., 2008) De esta forma, las células tumorales son reconocidas y, en muchos casos, inducen una respuesta inmune coordinada que las elimina antes de que lleguen a ser clínicamente detectables, proceso conocido como inmunovigilancia del cáncer. (Zitvogel L., 2006) Sin embargo, se ha observado que a pesar de la inmunovigilancia, los tumores pueden desarrollarse, mostrando una amplia gama de perfiles

antigénicos que son seleccionados mediante una interacción compleja y dinámica entre el sistema inmune y el tumor, por lo que se consideró que el concepto de inmunoedición del cáncer proporciona una mejor explicación del papel que juega el sistema inmune en el desarrollo del tumor. Entonces, el concepto de inmunoedición se sustenta en la inmunovigilancia y enfatiza que la presión inmune ejercida sobre las células tumorales puede tener un efecto supresor o promotor en el crecimiento del tumor <sup>(Schreiber RD., 2011)</sup>, lo cual se describe en tres fases: eliminación (también conocida como protección), equilibrio (persistencia) y escape (progresión). <sup>(Dunn GP., 2006; Ryungsa K., 2007)</sup>

## **Eliminación**

Esta fase consiste en el reconocimiento y eliminación de células transformadas por el sistema inmune innato y adaptativo. Las siguientes cuatro etapas se han propuesto para el proceso de eliminación: <sup>(Dunn GP., 2002; Ryungsa K., 2007)</sup>

### **i. Reconocimiento de las células tumorales**

Los mecanismos por los cuales el sistema inmune es alertado de la presencia de un tumor aún no se comprenden completamente. <sup>(Schreiber RD., 2011)</sup> Sin embargo, entre estos mecanismos se han descrito algunos como: (1) Expresión de ligandos relacionados a estrés, tal como MICA y MICB, moléculas no clásicas de la familia de las moléculas clase I del MHC, las cuales son reconocidas por el receptor activador NKG2D presente en la célula NK; <sup>(Raulet DH., 2009)</sup> (2) Liberación de citocinas proinflamatorias y patrones moleculares asociados al daño (DAMPs) <sup>(Kono H., 2008; Tesniere A., 2008)</sup> por células muertas o lesionadas cuando un tumor sólido ha crecido más de 2 a 3 mm y requiere un suplemento sanguíneo y una remodelación del estroma. <sup>(Ryungsa K., 2007)</sup>

### **ii. Migración y maduración de las células presentadoras de antígeno profesionales**

Los restos celulares provenientes de las células tumorales que han experimentado apoptosis o necrosis son captados por células presentadoras de antígeno profesionales locales, las cuales posteriormente migran a los ganglios linfáticos más cercanos. Durante este proceso las células dendríticas expresan moléculas de coestimulación como CD40, CD80/ CD86 y receptores para quimiocinas, como CCR7. <sup>(Dunn GP., 2002; Ryungsa K., 2007; Johnson LA., 2014; Lian J., 2015)</sup>

### iii. Activación de linfocitos T específicos a los antígenos tumorales

En los ganglios linfáticos las células dendríticas llevan a cabo la presentación de antígeno a los linfocitos T CD8+ y CD4+ naive, los cuales para su completa activación requieren de tres señales:

**(1) Reconocimiento por parte del receptor de los linfocitos T (TCR) de un complejo formado entre las moléculas del MHC y un péptido antigénico o epítipo en la APC:** cada producto alélico de las moléculas del MHC tiene distintas especificidades de unión a péptidos, referidas usualmente como motivos de unión a péptidos, los cuales se complementan con algunos residuos denominados de anclaje presentes en el péptido antigénico, fijando el péptido dentro del surco de la molécula del MHC. De esta forma, las moléculas clase I del MHC presentan péptidos de 8 a 10 aminoácidos de longitud al TCR de linfocitos T CD8+, mientras que las moléculas clase II del MHC presentan péptidos de 13 a 18 aminoácidos al TCR de linfocitos T CD4+. (Kindt., 2007; Sidney J., 2008; Lazoura E., 2009)

**(2) Coestimulación del linfocito T:** El linfocito T requiere señales que promuevan su activación y supervivencia proporcionadas por la interacción de las moléculas coestimuladoras con sus respectivos ligandos en las APCs. La molécula coestimuladora mejor caracterizada es CD28, la cual es constitutivamente expresada en linfocitos T naïve y activados. La interacción de CD28 con sus ligandos B7-1/CD80 o B7-2/CD86 desencadena distintos efectos en el linfocito T entre los que se encuentran: promover su ingreso y progresión a través del ciclo celular, incrementar la expresión de proteínas antiapoptóticas que promueven su supervivencia, aumentar la producción de IL-2 así como la expresión de su receptor (IL-2R). (Acuto O., 2003; Chen L., 2013)

**(3) Un microambiente que favorezca la activación del linfocito T:** Una vez que el linfocito ha recibido las señales de activación antes mencionadas, se lleva a cabo la síntesis de proteínas requeridas para su división y diferenciación en alguna de las subpoblaciones efectoras. Por ejemplo, si predomina la IL-2 e IFN- $\gamma$  en el microambiente, el linfocito T CD4+ se diferenciará a la subpoblación Th1 y liberará IL-2, IFN- $\gamma$  y TNF- $\beta$  con la finalidad de formar un microambiente propicio para la adecuada activación del linfocito T y para regular la respuesta inmunológica en curso. (Kindt., 2007; Murphy K., 2009)

#### **iv. Migración de linfocitos T activados al sitio del tumor y eliminación de las células tumorales**

Los linfocitos T CD4+ y T citotóxicos activados migran al sitio primario del tumor direccionados por quimiocinas, selectinas e integrinas. Los linfocitos activados experimentan un cambio dramático en la expresión de proteínas de superficie. Pierden la capacidad de ingresar a ganglios linfáticos a través de las vénulas de endotelio alto debido a la pérdida de la expresión de CD62L y CCR7. Además, los linfocitos activados expresan un conjunto de moléculas que les permiten migrar al sitio del tumor. Estas moléculas incluyen ligandos para selectinas E y P, y receptores para quimiocinas tal como CXCR3. (Slaney CY., 2014)

Los linfocitos T citotóxicos tienen la capacidad de reconocer y eliminar células propias alteradas por dos vías dependientes de contacto celular: la vía dependiente de gránulos y la vía dependiente de receptor (Fas-FasL). (Fan Z., 2005) Además, la liberación de citocinas tal como TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$ , ocasiona la apoptosis de la célula tumoral y un incremento en la presentación de antígenos en moléculas clase I del MHC así como en la muerte celular mediada por Fas, respectivamente. (Andersen MH., 2006)

Si algunas células tumorales sobreviven a la fase de eliminación entonces el proceso puede progresar a la segunda fase: la fase de equilibrio.

#### **Equilibrio**

En la fase de equilibrio el sistema inmune del hospedero ejerce una presión selectiva en las células tumorales que es suficiente para contenerlas, pero no para eliminarlas completamente lo que permite la selección inmune de células tumorales poco inmunogénicas. Durante este periodo de selección, son destruidas muchas de las células tumorales que escaparon inicialmente del proceso de eliminación pero surgen nuevas variantes celulares que poseen diferentes mutaciones que las hacen más aptas para resistir la respuesta inmune montada en contra de ellas. (Ryungsa K., 2007)

#### **Escape**

La inestabilidad genética presente en las células tumorales favorece el surgimiento de mecanismos que promuevan su sobrevivencia ante la presión inmune ejercida sobre ellas, originando variantes tumorales insensibles a la detección y/o a la eliminación inmune, las



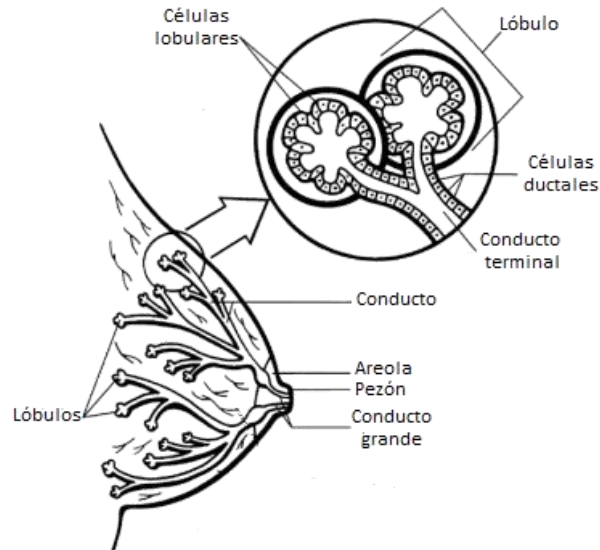
cuales son capaces de crecer descontroladamente, dando lugar a un tumor clínicamente detectable. Entre estos mecanismos de evasión se encuentran los siguientes: (Dunn GP., 2002)

- Evasión del reconocimiento inmune
- Reclutamiento de poblaciones celulares reguladoras
- Secreción de factores inmunosupresores
- Contra-ataque tumoral
- Predominancia de señales inhibitorias en el Linfocito T

## **Cáncer de mama**

El cáncer de mama presenta una alta heterogeneidad a nivel molecular dando lugar a un amplio espectro de tumores asociados con diferentes características histopatológicas y diversos resultados clínicos. (Polyak K., 2007; Vargo-Gogola T., 2007) Este tipo de cáncer es el diagnosticado con más frecuencia en mujeres alrededor del mundo y aunque este padecimiento es considerado como una enfermedad de los países desarrollados, la mayoría de las defunciones por esta causa se registran en los países en desarrollo. Consistente con esto, desde el 2006 el cáncer de mama ha sido la principal causa de muerte debida a cáncer en mujeres mexicanas, representando el 14% de muertes asociadas a cáncer. GLOBOCAN predice que en el año 2030, 24 386 mujeres mexicanas serán diagnosticadas con cáncer de mama y de estas 9 778 (40%) podrían morir. (de la Vara-Salazar E., 2011; Chávarri- Guerra Y., 2012)

Anatómicamente, la mama femenina comprende tres estructuras: la piel, el tejido subcutáneo y el tejido mamario, este último incluye el parénquima y el estroma. El parénquima se divide en 15 a 20 segmentos, unidades glandulares o lóbulos, que convergen en una serie de conductos en el pezón según una distribución radial y cada uno contiene de 20 a 40 lobulillos o células lobulares (Figura 1). Por otra parte, el estroma y el tejido subcutáneo contienen tejido adiposo, tejido conjuntivo, nervios, vasos sanguíneos y vasos linfáticos. (Richard L., 2005; Jay R., 2009) Los tipos histológicos de cáncer de mama más comunes son el carcinoma ductal, el cual tiene su origen en las células que forman los conductos, seguido del lobulillar. (Meisner A., 2008)



**Figura 1.** Anatomía de la mama normal. Adaptado de American Cancer Society.

## Factores de riesgo

Aunque se conocen varios factores de riesgo asociados al cáncer de mama, en la mayoría de las mujeres afectadas no es posible identificarlos específicamente. Entre estos factores de riesgo se encuentran el sexo (principal factor de riesgo siendo la relación de casos femenino-masculino de 144 a 1), la edad, antecedentes personales o familiares de cáncer de mama, tratamiento hormonal sustitutivo, efectos de la alimentación, factores reproductivos como nuligesta y primer embarazo a término después de los 30 años de edad. (Meisner A., 2008; Secretaría de Salud., 2011)

En las mujeres, la glándula mamaria es el único órgano que experimenta desarrollo y diferenciación postnatal regulado por estrógeno y progesterona durante la pubertad y ciclo menstrual y, además de estas hormonas, prolactina durante el embarazo y lactancia. (Polyak K., 2007) Existe una relación importante entre la presencia de estas hormonas y sus receptores en el desarrollo del cáncer de mama ya que la unión de alguna de estas hormonas con su receptor promueve el crecimiento, la diferenciación y la sobrevivencia del epitelio mamario. (Taneja P., 2010)

Del mismo modo, la transducción de señales por receptores con actividad de cinasa de tirosina (RTK) situados en la superficie de las células epiteliales de la mama contribuye al desarrollo del cáncer; concretamente, la sobreexpresión del Receptor del factor de crecimiento epidérmico (HER2) está implicado en la patogénesis y progresión de un subtipo de cáncer de mama. (Hynes NE., 2005; Vrbic S., 2013)

## **INMUNOTERAPIA EN CÁNCER DE MAMA**

A pesar de que los métodos terapéuticos empleados actualmente para tratar el cáncer de mama (cirugía, radioterapia, quimioterapia, hormonoterapia y tratamientos biológicos) proporcionan una mejor calidad de vida, ésta enfermedad sigue siendo incurable. (Emens LA., 2005; Secretaría de Salud., 2011) La manipulación del sistema inmune con la finalidad de obtener un efecto terapéutico en pacientes con cáncer se ha estudiado por más de 100 años. Sin embargo, hasta hace poco se han aprobado terapias basadas en incrementar la respuesta inmune antitumoral, entre las que se encuentran: (Zhou J., 2004)

### **Inmunoterapia basada en anticuerpos**

Esta estrategia terapéutica consiste en la administración de anticuerpos monoclonales dirigidos contra proteínas expresadas en la superficie de células de tumores sólidos y células tumorales circulantes, antígenos asociados con el estroma tumoral, antígenos presentes en la vasculatura asociada al tumor y/o contra ligandos que promueven el crecimiento tumoral (por ejemplo, factores del crecimiento vascular). (Adams GP., 2005)

Los anticuerpos monoclonales aprobados por la FDA (por sus siglas en inglés: Food and Drug Administration) para su uso en pacientes con cáncer de mama son: Trastuzumab, anticuerpo monoclonal contra HER2 -antígeno que se encuentra sobreexpresado en los tumores del 20 al 25% de los pacientes con cáncer de mama- (Slamon D., 2011), Bevacizumab, anticuerpo monoclonal contra el Factor de Crecimiento del Endotelio Vascular (VEGF) (von Minckwitz G., 2012) y Pertuzumab, anticuerpo monoclonal inhibidor de la dimerización de HER-2/3 (Lin SX., 2010)

Además de los anticuerpos antes citados, se encuentran en etapa de desarrollo clínico anticuerpos monoclonales dirigidos contra distintos blancos de importancia en el desarrollo y supervivencia del cáncer de mama, tales como anticuerpos contra moléculas de señalización y diferenciación celular (anti-IGF, Anti-EGFR/HER3, anti-HER3, anti-IGF-1R, anti-cMET), contra moléculas coinhibitorias (anti-PD1, anti-PD-L1, anti-CTLA-4), y anticuerpos anti-angiogénicos (anti- Integrinas  $\alpha_V$ ). (Scott AM., 2012; Zardavas D., 2013)

### **Transferencia adoptiva de linfocitos T**

La transferencia adoptiva de linfocitos T en pacientes con cáncer consiste en la generación *ex vivo* de linfocitos T tumor-específicos y su administración a un hospedero autólogo. (Dudley

ME., 2003) Esta terapia se ha llevado a cabo en modelos preclínicos, en los cuales ha sido posible identificar condiciones que incrementan su eficacia, como la presencia de linfocitos T CD8+ antígeno tumoral-específicos con alta afinidad, inmunosupresión del hospedero antes de la transferencia celular y la administración simultánea de IL-2 con los linfocitos T. (Dudley ME., 2003; Restifo NP., 2012)

La transferencia adoptiva de linfocitos T ha sido eficaz en pacientes con melanoma, en los cuales las poblaciones de linfocitos infiltrantes del tumor (TILs) pueden ser aisladas y expandidas simplemente al remover quirúrgicamente el tumor, disociar las células a células individuales o en fragmentos tumorales para posteriormente seleccionar las poblaciones de linfocitos T que tienen el TCR con la especificidad deseada, cultivarlos en presencia de IL-2 y anti-CD3 y transferirlos al paciente con cáncer. (Restifo NP., 2012)

Ésta terapia puede ser útil en otros tipos de cáncer como cáncer de colon y mama pero aún no son claras las especificidades y funciones de los TILs, aspecto que limita su uso en pacientes. (Restifo NP., 2012) En el caso de cáncer de mama, la significancia clínica de los TILs es controversial y los subtipos de linfocitos parecen determinar el resultado clínico del paciente. (Krell J., 2012) Por lo tanto, hasta el momento esta terapia se ha llevado a cabo en modelos murinos (Knutson KL., 2001; Alizadeh D., 2014) y en pacientes con cáncer de mama metastásico empleando linfocitos T de memoria provenientes de médula ósea. (Domschke C., 2013)

## **Vacunas**

La evidencia que soporta el concepto de la inmunovigilancia, que los linfocitos T son capaces de eliminar tumores sólidos, y la identificación de antígenos tumorales, han incrementado el interés en el desarrollo de vacunas contra el cáncer. (Scanlan MJ., 2001; Speiser DE., 2010) Estudios iniciales proponían que para promover una respuesta inmune antitumoral era suficiente emplear antígenos asociados al tumor (AAT) y citocinas o adyuvantes. Sin embargo, la falta de efecto clínico significativo en los pacientes con cáncer ha demostrado que en el diseño de una vacuna terapéutica deben considerarse más factores, como los mecanismos inmunosupresores, la tolerancia inmunológica y la variabilidad antigénica.

Hasta el momento, la única vacuna terapéutica aprobada por la FDA para su uso en pacientes con cáncer de próstata es sipuleucel-T (Provenge<sup>R</sup>), una vacuna basada en células dendríticas que han sido estimuladas empleando una proteína de fusión recombinante constituida por fosfatasa ácida prostática y el factor estimulante de colonias de granulocitos y

macrófagos (GM-CSF). El uso de esta vacuna se aprobó por la FDA debido al incremento de 2-4 meses en la supervivencia de pacientes con cáncer de próstata en estadios tardíos. (Mellman I., 2011; Emens LA., 2012)

En pacientes con cáncer de mama se ha observado una respuesta inmune contra AAT, lo que ha impulsado el desarrollo de vacunas terapéuticas que amplifiquen esta débil respuesta inmune. Estos AAT incluyen HER-2, Mucina 1 (MUC-1), antígeno carcinoembrionario (CEA), p53, MAGE, BAGE, GAGE, transcriptasa inversa de la telomerasa (hTERT), entre otros; de los cuales, HER-2, hTERT y MUC-1 han sido los más empleados como componentes de vacunas. (Scanlan MJ., 2001; Emens LA., 2005) Por ejemplo, la administración del péptido E75, derivado de HER-2, junto con GM-CSF en pacientes con cáncer de mama con alto riesgo de incidencia mostró prolongar la supervivencia libre de enfermedad en el subtipo de pacientes quienes expresaban bajos niveles de HER-2. Además, se están llevando a cabo ensayos clínicos para probar la eficacia de E75 en combinación con trastuzumab. (Melero I., 2014)

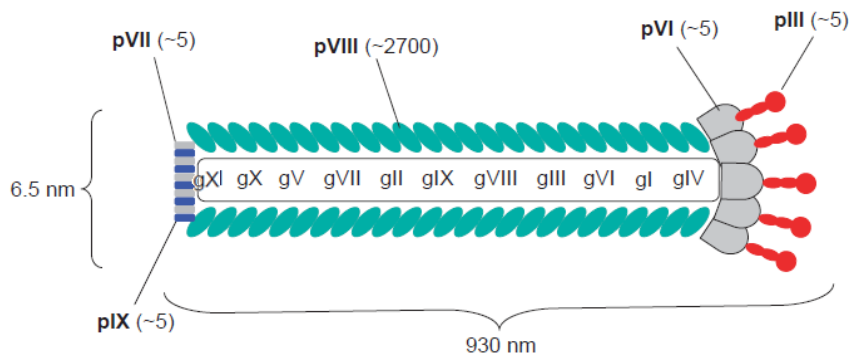
Estos ensayos han permitido evaluar la eficacia de la vacunación terapéutica en pacientes con cáncer de mama y han demostrado que ésta es limitada, entre otras razones, debido a los mecanismos de tolerancia inmune hacia los AAT empleados y a que muchos de estos estudios se realizaron en pacientes con cáncer de mama metastásico, por lo que la presencia prolongada del tumor y la toxicidad ocasionada por los tratamientos previos tienden a disminuir la respuesta inmune generada por la vacuna.

Otros factores que representan obstáculos en la vacunación terapéutica en pacientes con cáncer de mama son el número disminuido de linfocitos T helper y el incremento de células T reguladoras CD4+CD25+FOXP3+ en sangre periférica (Wang ZK., 2012; Decker T., 2012), APCs disfuncionales (disminución en los niveles de expresión de moléculas clase II del MHC y CD86 y en la secreción de IL-12) (Emens LA., 2005) e inestabilidad genética/fenotípica en las células tumorales. Esto último, origina una gran variabilidad antigénica que complica el uso de un antígeno específico como componente de una vacuna (Tobin GJ., 2008), por lo que se sugiere emplear un antígeno indispensable para el fenotipo transformado o múltiples antígenos tumorales. En este contexto, entre las diversas estrategias experimentales, el uso de Bibliotecas de epítopos variables (BEVs) proporciona una herramienta viable en el diseño de vacunas contra cáncer.

## DESPLIEGUE EN BACTERIÓFAGOS

El despliegue en bacteriófagos es una técnica en la que es posible obtener bibliotecas de epítomos desplegadas en las cápsides de los bacteriófagos. Un aspecto de importancia en esta técnica es que se puede llevar a cabo la selección y amplificación de clones de fagos específicas, así como la determinación de la secuencia de aminoácidos de algún epítomo en particular. (Sidhu SS., 2000; Azzazy HM., 2002; Manoutcharian K., 2005)

El despliegue en fago fue desarrollado empleando el fago M13 y a pesar del uso de otros sistemas de despliegue, tal como el fago  $\lambda$  o el T4, este sistema sigue siendo el más empleado. (Sidhu SS., 2000) El genoma del fago M13 consta de DNA de cadena sencilla de aproximadamente 6400 bases de longitud. Este fago infecta a células *E. coli* a través del pili F, inserta su genoma en la célula y este es convertido a una forma circular de doble cadena llamada la forma replicativa, la cual da lugar a DNA de cadena sencilla para la progenie. (Azzazy HM., 2002) Posteriormente, se producen las 11 proteínas codificadas por el genoma del fago, tres de las cuales (pII, pV y pX) intervienen en la replicación del genoma, tres proteínas (pI, pIV y pXI) participan en el transporte de las partículas virales resultantes hacia el exterior de la célula hospedera y cinco (pIII, pVI, pVII, pVIII y pIX) son las proteínas estructurales que conforman la cápside. De estas proteínas estructurales, la proteína VIII (pVIII) es la principal en la cápside al tener hasta 2700 copias, mientras que cada extremo de la partícula viral está cubierto por 4 a 5 copias de cada una de las proteínas estructurales menores: pIII y pVI en un extremo y pVII y pIX en el otro extremo, Figura 2. Finalmente, las partículas virales se ensamblan en la membrana citoplasmática y son secretadas de la bacteria infectada sin causar lisis celular. (Sambrook J., 2001; Mullen LM., 2006)

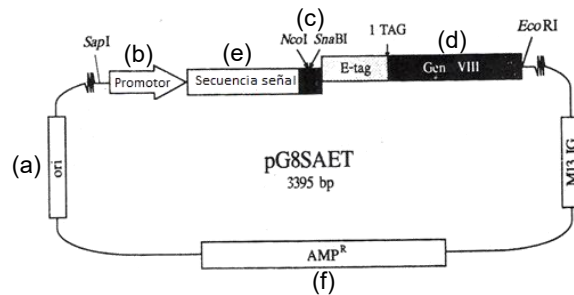


**Figura 2.** Representación esquemática del fago M13. El número de copias de cada proteína se muestra entre paréntesis. Adaptado de Mullen LM., 2006.

Las aproximaciones más comunes de despliegue en fago consisten en la clonación de los fragmentos de DNA que codifican el epítipo de interés en los genes que codifican a las proteínas pVIII o pIII. Sin embargo, este sistema es muy limitado ya que epítipos largos, más de 10 aminoácidos al emplear la proteína pVIII, comprometen la función de la cápside y no son desplegados eficientemente, por lo que se ha propuesto el uso de fagémidos para solucionar esta limitante. (Sidhu SS., 2000)

Los fagémidos, vectores híbridos de plásmidos y fagos, son diseñados para contener el origen de replicación plasmídico bacteriano y del fago filamentoso, un promotor, una secuencia de empaquetamiento, un gen de resistencia a antibióticos, un sitio de clonación múltiple y un gen de la proteína de la cápside del fago (en este caso el gen VIII, Figura 3). Pero los fagémidos no contienen los genes que codifican a las proteínas estructurales y no estructurales requeridas para producir un fago completo (Azzazy HM., 2002; Mullen LM., 2006), por lo que se requiere de un fago ayudador o “helper” que proporcione los componentes necesarios para el ensamble del fago.

Así, después de transformar bacterias con el fagémido este puede mantenerse como un plásmido o bien puede empaquetarse en un fago M13 recombinante con la ayuda del fago helper que contiene un origen de replicación defectuoso y proporciona, en *trans*, todas las proteínas requeridas para generar un fago completo. Este proceso se denomina rescate de fago y los fagos resultantes poseen en su cápside proteínas pVIII recombinantes (que contienen el epítipo de interés) y pVIII nativas. (Azzazy HM., 2002)



**Figura 3.** Características de los fagémidos. Se muestra el fagémido pG8SAET el cual es un vector de 3395 pares de bases, basado en el gen VIII, que contiene: a) dos orígenes de replicación: para el plásmido y para el fago (este es inactivo hasta que las células son infectadas con fago helper), b) un promotor, c) un sitio de clonación múltiple, d) un gen de la proteína de la cápside del fago (en este caso el gen VIII), e) una señal de empaquetamiento y f) un gen de resistencia a antibiótico. Adaptado de Jacobsson K., 2003.

## ANTECEDENTES

### BIBLIOTECAS DE EPÍTOPOS VARIABLES (BEVs)

Una de las estrategias llevadas a cabo por nuestro grupo de investigación para contrarrestar la variabilidad antigénica y mejorar la inmunogenicidad de los antígenos tumorales empleados en los protocolos de vacunas es el uso de BEVs. Estas consisten en un conjunto de epítomos (originados a partir de la modificación de la secuencia de aminoácidos de un epítomo silvestre) desplegados en bacteriófagos M13 como péptidos fusionados a la proteína pVIII.

Las BEVs permiten obtener un gran número de variantes de antígenos, por lo que se han empleado como vacunas contra patógenos en los cuales la variabilidad antigénica representa un obstáculo para su tratamiento, tal como el VIH <sup>(Pedroza-Roldan C., 2009; Charles-Niño C., 2011)</sup> y cáncer.

<sup>(Dominguez-Romero A., 2014)</sup> De esta forma, Pedroza-Roldan et al. reportaron que el uso de BEVs como inmunógenos en formato de fago filamentoso y de DNA en ratones BALB/c indujo una mayor respuesta celular respecto al epítomo silvestre y demostraron que la disminución en la complejidad de las BEVs (es decir, menor número de posiciones mutadas dentro de la secuencia de aminoácidos del epítomo silvestre) reducía la potencia de la biblioteca como inmunógeno. <sup>(Pedroza-Roldan C., 2009)</sup> Asimismo, Charles-Niño et al. demostraron que como

resultado de la inmunización de ratones BALB/c con BEVs en formato de fago filamentoso y de DNA se obtuvieron anticuerpos capaces de reconocer la proteína Env del VIH en su configuración nativa y que dicha inmunización con BEVs fue capaz de inducir suero neutralizante de cepas de un panel de virus VIH caracterizados de aislamientos primarios. <sup>(Charles-Niño C., 2011)</sup>

En el caso de vacunas contra cáncer, nuestro grupo de trabajo ha demostrado la utilidad de emplear BEVs de un epítomo derivado de survivina como un inmunógeno eficiente en un modelo murino de cáncer de mama; el empleo de dichas BEVs en formato de fago y péptido sintético, en ensayos profilácticos y terapéuticos ocasionaron una disminución en el crecimiento tumoral respecto al epítomo silvestre. <sup>(Dominguez-Romero A., 2014)</sup> Otra aproximación que se ha llevado a cabo por distintos grupos para potenciar la inmunidad antitumoral es la inmunización de péptidos antigénicos basados en AAT pero cuya secuencia de aminoácidos ha sido modificada. Estos péptidos son conocidos como ligandos peptídicos alterados, péptidos heteroclíticos o péptidos análogos. Las modificaciones en la secuencia de los AAT



se basan principalmente en la sustitución de aminoácidos en los residuos de anclaje de un epítipo para incrementar la afinidad de unión al MHC y así crear un complejo capaz de interactuar más eficientemente con el TCR. Alternativamente, los péptidos también pueden optimizarse al efectuar sustituciones de aminoácidos en los residuos de contacto con el TCR, incrementando así la interacción con el TCR respecto al antígeno tumoral silvestre; a estos péptidos se les conoce como superagonistas. (Iero M., 2009; Buhrman JD., 2013) Sin embargo, a pesar de que la evaluación de estas estrategias ha demostrado que las alteraciones sutiles en la secuencia del epítipo pueden alterar dramáticamente la presentación de antígeno y el reconocimiento por el linfocito T, los datos clínicos respecto a la capacidad de estas aproximaciones para inducir una respuesta inmune antitumoral son escasos y confusos. (Iero M., 2009)

## MIMÓTOPOS

Un mimótopo es un epítipo que mimetiza un antígeno y es capaz de activar una respuesta inmune específica de gran utilidad para el diseño de nuevas estrategias inmunoterapéuticas. (Sharav T., 2007; Shanmugam A., 2011) Los mimótopos tienen la ventaja de imitar estructuras antigénicas sin ser idénticas a ellas, por lo que son capaces de incrementar la respuesta de los linfocitos T ante células tumorales cuando los antígenos asociados al tumor inducen una respuesta ineficiente. (Brämswig KH., 2007)

Los mimótopos pueden obtenerse a partir de epítipos conocidos (mediante modificaciones en la secuencia) o *de novo* utilizando bibliotecas de epítipos, seleccionando aquellas variantes que sean capaces de inducir una respuesta inmune antitumoral. (Vasquez JJ., 2004; Brämswig KH., 2007; Nino- Siewert K., 2012) McMahan RH., et al. emplearon una clona de linfocitos T en un modelo murino de cáncer de colon para identificar mimótopos y reportaron que la secuencia de aminoácidos de los mimótopos seleccionados a partir de una biblioteca fue distinta respecto a la secuencia del péptido silvestre.

Además, a pesar de que la especificidad es una de las características de la inmunidad adaptativa, los TCRs específicos para epítipos particulares son capaces de reconocer una gran variedad de ligandos relacionados, incluso los TCRs son capaces de reconocer péptidos sin homología aparente al antígeno original. (Lustgarten J., 2006; Siewert K., 2012) Así que basados en la reactividad cruzada del TCR, se emplearon BEVs para identificar mimótopos reconocidos por linfocitos T como inmunógenos con posible actividad antitumoral.

## **HIPÓTESIS**

La identificación de mimótopos relacionados con la respuesta celular contra tumores permitirá generar inmunógenos capaces de romper la tolerancia inmunológica y construir vacunas eficaces contra cáncer de mama.

## **OBJETIVO**

Identificar mimótopos de epítomos tumorales reconocidos por linfocitos T a partir del tamizaje de BEVs y evaluar su efecto antitumoral en un modelo murino de adenocarcinoma de mama.

### **Objetivos particulares**

- 1) Llevar a cabo la construcción de las BEVs en forma de Fago M13 recombinante.
- 2) Obtener clonas individuales a partir de las BEVs y seleccionar mimótopos de epítomos reconocidos por linfocitos T a partir del tamizaje de las mismas.
- 3) Evaluar el efecto antitumoral de las BEVs y de los mimótopos identificados en un modelo murino de adenocarcinoma de mama.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Descripción de las BEVs

Las BEVs empleadas en este trabajo están constituidas por epítomos de 9 aminoácidos, dentro de los cuales se encuentran los aminoácidos de anclaje a la molécula clase I del MHC, haplotipo H-2D<sup>d</sup> y cuya diferencia es el número de posiciones mutadas: 3 (G3d) ó 5 (G5d), Tabla 1. Además, se utilizó como control negativo un epítomo inicial (NGd), cuya secuencia de aminoácidos incluye los aminoácidos de anclaje a la molécula clase I del MHC y el aminoácido alanina (empleado comúnmente para efectuar sistemas de tamizaje de aminoácidos mediante escaneo). (Malecek K., 2013)

| Tipo de epítomo                          | Nombre | Secuencia de aminoácidos | Haplotipo         |
|--|--------|--------------------------|-------------------|
| <b>Epítomo inicial</b>                   | NGd    | A G P A A A A A L/M      | H-2D <sup>d</sup> |
| <b>Epítomos con 5 posiciones mutadas</b> | G5d    | A G P X X X X X L/M      | H-2D <sup>d</sup> |
| <b>Epítomos con 3 posiciones mutadas</b> | G3d    | A G P X A X A X L/M      | H-2D <sup>d</sup> |

Tabla 1. Aminoácidos que constituyen los epítomos de las BEVs y del epítomo inicial, en donde X representa cualquiera de los 20 aminoácidos y A representa al aminoácido alanina.

### Transformación de células *E. coli* TG1

Se realizaron electroporaciones de células *E. coli* TG1 con DNA de los fagémidos pG8SAET-inserto correspondientes a cada biblioteca empleada (G5d o G3d) o al epítomo inicial empleando el equipo Gene Pulser II (Biorad). Las células *E. coli* TG1 transformadas se plaquearon en agar Luria Broth (LB) en presencia de carbenicilina (cb) para determinar la complejidad (número de epítomos distintos) de las bibliotecas.

## Rescate de bibliotecas con Fago Ayudador y obtención de fagos recombinantes

Después de la transformación de *E. coli* TG1, las células se incubaron en medio YT 2X por 1h (hasta obtener una densidad óptica a 550 nm de 0.6) a 37°C y en agitación de 250 rpm. En seguida se agregó cb (50 µg/mL) y se incubó durante 1h, a 37°C en agitación.

Para obtener fagos M13 recombinantes se empleó el fago helper M13KO7 (Invitrogen), el cual se adicionó al cultivo de *E. coli* TG1 y se incubó 30 min sin agitación a 37°C seguidos de otros 30 min de incubación a 37°C con agitación a 250 rpm.

El cultivo se transfirió a un matraz con medio YT 2X –adicionado con cb y kanamicina (kn) [50 µg/mL]- y se incubó a 37°C durante 18 h con agitación de 250 rpm. Después del período de incubación, se eliminaron las bacterias centrifugando el cultivo a 8 000 rpm (centrífuga Beckman J2-21), 4°C por 20 min y se recolectó el sobrenadante en tubos de policarbonato. Para precipitar los fagos M13 recombinantes, se añadió una sexta parte de solución de PEG/NaCl (Polietilenglicol-8000 al 20% p/v, NaCl 2.5M) y se incubó por 18h a 4°C. Posteriormente se centrifugó a 15 000 rpm (centrífuga Beckman J2-21), 4°C por 15 min, el precipitado se resuspendió en amortiguador TBS (Tris-HCl 50 mM pH 7.5, 150Mm NaCl) y se efectuó una segunda precipitación añadiendo una quinta parte de solución de PEG/NaCl para su posterior incubación de 18 h a 4°C. Se centrifugó por 10 min a 10 000 rpm (centrífuga Beckman J2-21) a 4°C y el precipitado se resuspendió en amortiguador TBS. Los fagos obtenidos fueron titulados empleando *E. coli* TG1. Para esto se infectaron 200 µL de células *E. coli* TG1 (densidad óptica aproximada 0.6) con diluciones de los fagos recombinantes obtenidos. Se incubó por 40 min a 37 °C sin agitación y posteriormente el cultivo fue plaqueado en medio LB /cb. Las placas se incubaron durante 18h a 37°C y se determinó el título de cada biblioteca.

Además, mediante esta metodología pero en cultivos bacterianos con un volumen de 700µL y empleando placas de 96 pozos (Corning), se purificaron 90 clonas individuales de la biblioteca G3d y las siguientes dos clonas secuenciadas correspondientes al epítipo inicial:

1. A G P A A A A L (NGd5L)
2. A G P A A A A M (NGd5M)

## **Implante de células 4T1 a ratones BALB/c y evaluación del efecto antitumoral de las BEVs**

Para la generación del carcinoma mamario, se empleó la línea celular de adenocarcinoma mamario de ratón 4T1, obtenida de la American Type Culture Collection (*ATCC, Rockville, MD*). Para su mantenimiento, la línea celular se cultivó en medio RPMI-1640 (Gibco, USA) suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB) y 100 U/mL de penicilina, 100 µg/mL de estreptomycin y 0.25 µg/mL de anfotericina B. Los cultivos celulares fueron incubados en atmósfera húmeda con 5% de CO<sub>2</sub> a 37°C.

Durante su crecimiento, la línea celular presentó características de adhesión, por lo que al llegar a confluencia, se adicionó verseno a la monocapa celular y la caja de cultivo se agitó mecánicamente para favorecer el desprendimiento de las células. Las células se centrifugaron a 1500 rpm (centrífuga eppendorf 5702) y se resuspendieron en amortiguador de fosfatos salino (PBS). Se efectuó el conteo celular en cámara de Neubauer y la viabilidad se determinó por tinción con azul tripano (Sigma Chemical Co, St Louis, MO) siendo en todos los casos superior al 90%.

Se implantaron varios grupos de 5 a 7 ratones BALB/C hembras, de 4 a 6 semanas de vida, con 10 000 células 4T1/50µL de PBS, vía subcutánea en la glándula mamaria abdominal.

La determinación del efecto antitumoral de las BEVs se efectuó mediante la medición del área tumoral (medición del largo y ancho del tumor) empleando un Vernier digital. Las mediciones se iniciaron una vez que el tumor fue palpable, día 8 después del implante, y se efectuaron cada tercer día hasta el día 30 cuando los ratones fueron sacrificados. En éste día, se removió el tumor, y se registró su peso.

Para llevar a cabo la determinación de la macrometástasis pulmonar, se obtuvieron los pulmones y se fijaron en solución de Bouin (ácido acético glacial 5%, formaldehído 9%, ácido pícrico 0.9%). La evaluación cuantitativa de los nódulos tumorales pulmonares se efectuó contando las zonas visiblemente claras del pulmón.

## **Inmunización de ratones BALB/c**

En este trabajo se llevaron a cabo estudios de vacunación terapéutica, para lo cual se inmunizaron, 5 días después de haber sido implantados, grupos de ratones con una única dosis de  $5 \times 10^{12}$  partículas de fago/ 200µL de PBS por la vía intravenosa de cada

inmunógeno. Los inmunógenos empleados fueron: bibliotecas G3d o G5d, epítipo inicial NGd y las selecciones de clonas de la biblioteca G3d.

### **Ensayo de Proliferación celular**

Para llevar a cabo el análisis de la proliferación celular se empleó la tinción de esplenocitos con CFSE (5,6 ester succinimidil diacetato carboxifluoresceína) (Sigma Aldrich), este compuesto difunde pasivamente a través de la célula, siendo incoloro y no fluorescente hasta que se eliminan los grupos acetatos del compuesto por esterasas intracelulares dando lugar a 5,6 éster succinimidil carboxifluoresceína. Éste último compuesto reacciona con aminas intracelulares formando conjugados fluorescentes que son transferidos a las células hijas después de la división celular.

La tinción de las células del bazo se efectuó 15 ó 30 días después del implante de las células 4T1. En condiciones asépticas, se extrajo el bazo y se perfundió con 3-5 mL de RPMI 1640, se descartaron los restos celulares y se obtuvieron los sobrenadantes. Estos se centrifugaron y el botón celular se resuspendió en 1.5 mL de amortiguador de lisis de eritrocitos (155 mM  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , 10 mM  $\text{KHCO}_3$  y 96.7  $\mu\text{M}$   $\text{EDTA}\cdot 2\text{Na}$ ), se incubó por 5 min. Después de este tiempo, las células fueron centrifugadas y el botón celular se resuspendió en 3.0 mL de medio RPMI 1640 suplementado (SFB 10%, penicilina/estreptomicina 1X,  $\beta$ -mercaptoetanol 1X, piruvato de sodio 1X y aminoácidos no esenciales, Glicina, L-Alanina, L-Asparagina, L-Ácido aspártico, L-Ácido glutámico, L-Prolina, L-Serina 1X). Se tomó una alícuota para cuantificar las células empleando tinción con azul tripano y conteo en cámara de Neubauer.

Para cada grupo experimental, se tiñeron  $5 \times 10^7$  células con CFSE [5  $\mu\text{M}$ ] y se incubó por 10 min a temperatura ambiente en oscuridad. Después, las células se lavaron empleando una solución de PBS 1X /5% de SFB frío y finalmente se resuspendieron en 50 mL de medio RPMI 1640 suplementado para obtener una concentración celular final de  $1 \times 10^6$  células/mL.

Para llevar a cabo la estimulación de esplenocitos, se colocaron  $2 \times 10^5$  células marcadas con CFSE por pozo en placas de 96 pozos y se cultivaron con las BEVs, o bien, con clonas individuales ( $3 \times 10^9$  fagos/pozo). En cada placa se incluyó un control negativo y positivo, en este último caso se empleó concanavalina A (ConA), para la estimulación policlonal de células T (5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ). Cada placa se incubó por 72 horas, en atmósfera húmeda con 5% de  $\text{CO}_2$  a 37°C.

Después del período de incubación, se recolectaron las células de cada pozo y la fluorescencia de la población fue analizada por citometría de flujo, empleando el citómetro FACS Can (Becton Dickinson, USA) y adquiriendo 10 000 eventos por muestra.

### **Análisis de los ensayos de proliferación celular por citometría de flujo**

El procesamiento de los resultados obtenidos mediante citometría de flujo se realizó empleando el programa FlowJo 7.6. Para determinar los porcentajes de proliferación celular de los esplenocitos totales se realizó un gráfico de puntos de tamaño vs granularidad a partir del cual se delimitó una región de análisis (R1) en donde la población de esplenocitos era homogénea. A partir de esta región se efectuó para cada muestra un histograma de la fluorescencia de CFSE vs el número de eventos. A partir del histograma correspondiente al control negativo se estableció un marcador y este se empleó en cada muestra para obtener los porcentajes de proliferación celular.

### **Análisis estadístico**

Todos los resultados respecto al crecimiento, peso tumoral y macrometástasis fueron expresados como la media  $\pm$  error estándar promedio. El tamaño de la muestra de cada uno de los grupos de ratones fue por lo menos  $n=5$ . Los experimentos se repitieron al menos una vez con resultados comparables. La distribución normal de los datos se analizó empleando la prueba de Shapiro-Wilk. De acuerdo a la distribución de los datos, se analizaron empleando las pruebas Kruskal-Wallis y Dunn's para comparaciones múltiples o la prueba ANOVA de un factor y Tukey para comparaciones múltiples.

## RESULTADOS

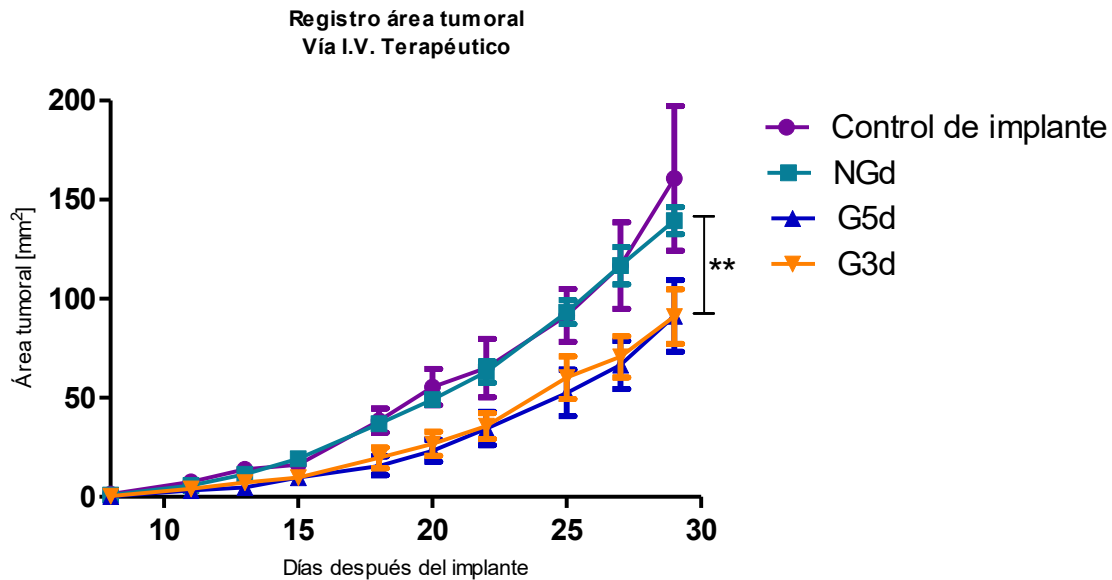
### Generación de las BEVs

Se realizaron electroporaciones de células *E. coli* TG1 con DNA de los fagémidos pG8SAET-inserto correspondientes a las BEVs o al epítipo inicial, obteniéndose en todos los casos una complejidad mínima de  $8 \times 10^3$  variantes. Posteriormente, se llevó a cabo el rescate de bibliotecas con fago ayudador, en donde el título típico de los fagos recombinantes obtenidos fue de  $10^{10}$  a  $10^{12}$  fagos/mL y  $10^{11}$  fagos/mL en el caso de los fagos obtenidos mediante purificación en placa de 96 pozos.

### Efecto antitumoral de las BEVs G5d y G3d

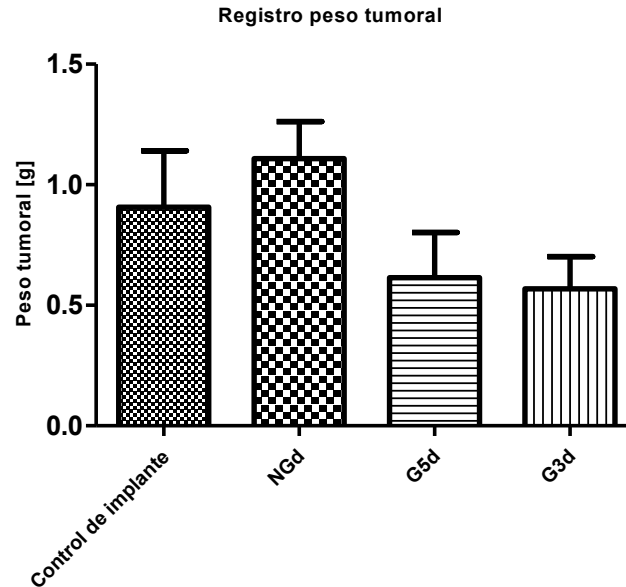
Se determinó el efecto antitumoral de las BEVs G5d, G3d y del epítipo inicial, inmunizando ratones BALB/c previamente implantados con la línea celular 4T1, como se mencionó en Materiales y Métodos. En la figura 4 se muestra la dinámica de crecimiento tumoral de los grupos de ratones inmunizados con las BEVs o con el epítipo inicial y del control de implante, en donde se observa que al día 29 los grupos con una menor área tumoral fueron los inmunizados con las Bibliotecas G5d ( $91.275 \text{ mm}^2$ ) y G3d ( $91.048 \text{ mm}^2$ ) siendo estas áreas estadísticamente diferentes respecto a las del grupo de ratones inmunizados con el epítipo inicial (NGd) ( $139.434 \text{ mm}^2$ ). El Control de implante fue el grupo que presentó mayor área tumoral ( $160.75 \text{ mm}^2$ ).



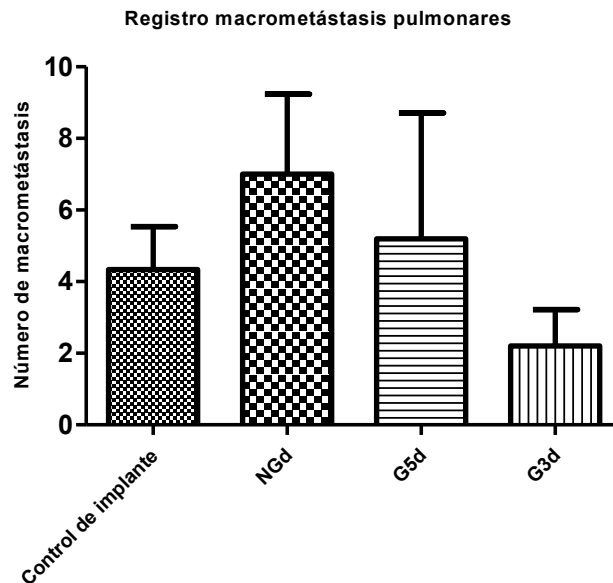


**Figura 4.** Áreas tumorales promedio obtenidas de ratones BALB/c (de 4 a 6 semanas) implantados con células 4T1 e inmunizados al quinto día con: a) Epítipo inicial NGd ■, b) BEV G5d ▲, c) BEV G3d ▼ (Dosis:  $5 \times 10^{12}$  fagos/200 $\mu$ L, vía I.V.), o d) sólo implantados (Control de implante)●. Los valores son la media  $\pm$  SEM, (n=5 ratones/grupo). \*\* Representa la inhibición del crecimiento tumoral estadísticamente significativa  $P < 0.05$  observada en la inmunización con las BEVs G5d y G3d comparadas con el grupo inmunizado con el epítipo inicial (NGd). Los datos fueron analizados empleando las pruebas Kruskal-Wallis y Dunn's para comparaciones múltiples.

Al día 29 después del implante, se obtuvieron los pesos tumorales de los grupos citados anteriormente y los valores promedio del peso tumoral en orden decreciente fueron: el grupo inmunizado con el epítipo inicial, NGd (1.108g), el control de implante (0.907g) y los grupos inmunizados con las bibliotecas G5d (0.614g) y G3d (0.568g); sin ser estas diferencias estadísticamente significativas (Figura 5).



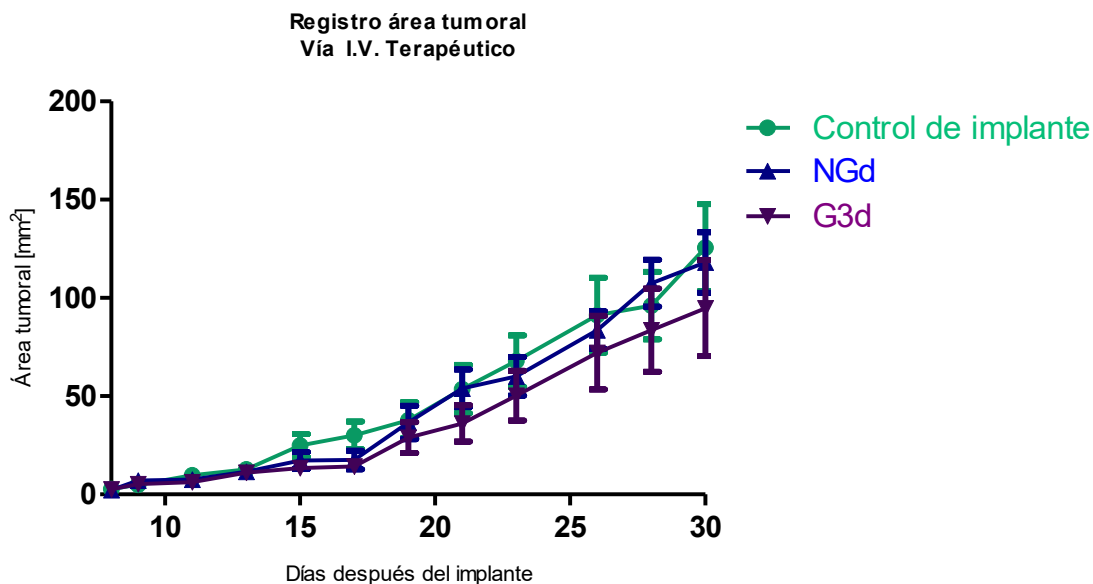
**Figura 5.** Pesos tumorales promedio obtenidos de ratones BALB/c (de 4 a 6 semanas) implantados con células 4T1 e inmunizados con a) Epítipo inicial NGd , b) BEV G5d , c) BEV G3d (Dosis:  $5 \times 10^{12}$  fagos/200 $\mu$ L, vía I.V.), o sólo implantados (Control de implante) . Los valores son la media  $\pm$  SEM, (n=5 ratones/grupo). Los datos fueron analizados empleando las pruebas ANOVA de 1 factor y Tukey para comparaciones múltiples.



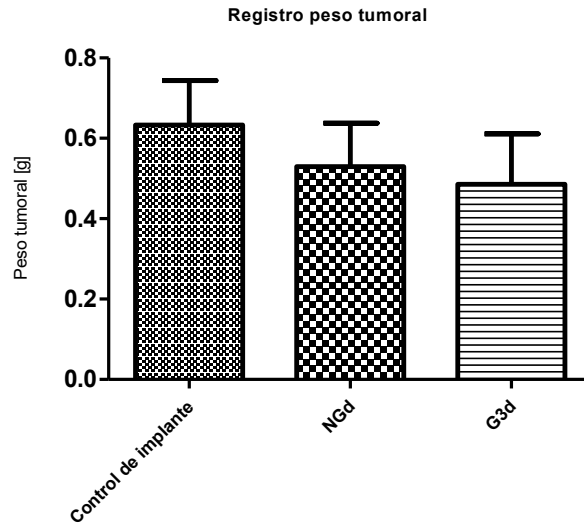
**Figura 6.** Macrometástasis pulmonares promedio obtenidas de ratones BALB/c (de 4 a 6 semanas) implantados con células 4T1 e inmunizados con a) Epítipo inicial NGd , b) BEV G5d , c) BEV G3d (Dosis:  $5 \times 10^{12}$  fagos/200 $\mu$ L, vía I.V.), o sólo implantados (Control de implante) . Los valores son la media  $\pm$  SEM, (n=5 ratones/grupo). Los datos fueron analizados empleando las pruebas Kruskal-Wallis y Dunn's para comparaciones múltiples.




El grupo que presentó menor número de macrometástasis pulmonares fue el inmunizado con la BEV G3d, seguido por el control de implante, el grupo inmunizado con la BEV G5d y el inmunizado con el epítipo inicial NGd, sin ser estas diferencias estadísticamente significativas (Figura 6).

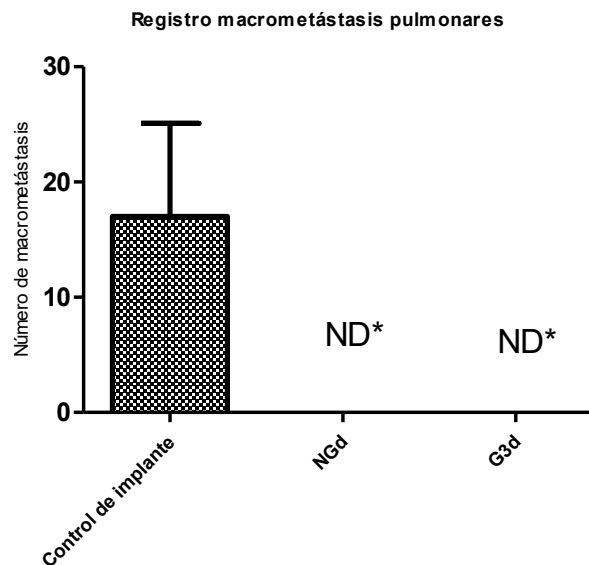
Puesto que el grupo inmunizado con la BEV G3d fue en el que se observó un área y peso tumoral menor, así como menor número de macrometástasis pulmonares respecto al resto de los grupos empleados (Figuras 4, 5 y 6), se prosiguió a evaluar una estrategia de inmunización distinta, en la cual se administró un refuerzo al día 16 después del implante, empleando una dosis de  $5 \times 10^{11}$  fagos/200 $\mu$ L, vía I.V. Sin embargo, no se observó diferencia significativa entre las áreas tumorales del grupo inmunizado con la BEV G3d y aquel en el que se administró un refuerzo (Figura 4 y 7). El grupo inmunizado con la BEV G3d fue el que presentó menor peso tumoral, sin observarse diferencias significativas con respecto al grupo inmunizado con el epítipo inicial o con el control de implante (Figura 8); mientras que el control de implante fue el único grupo en el cual se obtuvieron macrometástasis pulmonares (Figura 9).




**Figura 7.** Áreas tumorales promedio obtenidas de ratones BALB/c (de 4 a 6 semanas) implantados con células 4T1 e inmunizados al quinto día con: a) Epítipo inicial NGd ▲ b) BEV G3d ▼ (Dosis:  $5 \times 10^{12}$  fagos/200 $\mu$ L, vía I.V.), o sólo implantados (Control de implante)●. Se administró un refuerzo el día 16 después del implante (Dosis:  $5 \times 10^{11}$  fagos/200 $\mu$ L, vía I.V.). Los valores son la media  $\pm$  SEM, (n=5 ratones/grupo). Los datos fueron analizados empleando las pruebas Kruskal-Wallis y Dunn's para comparaciones múltiples.



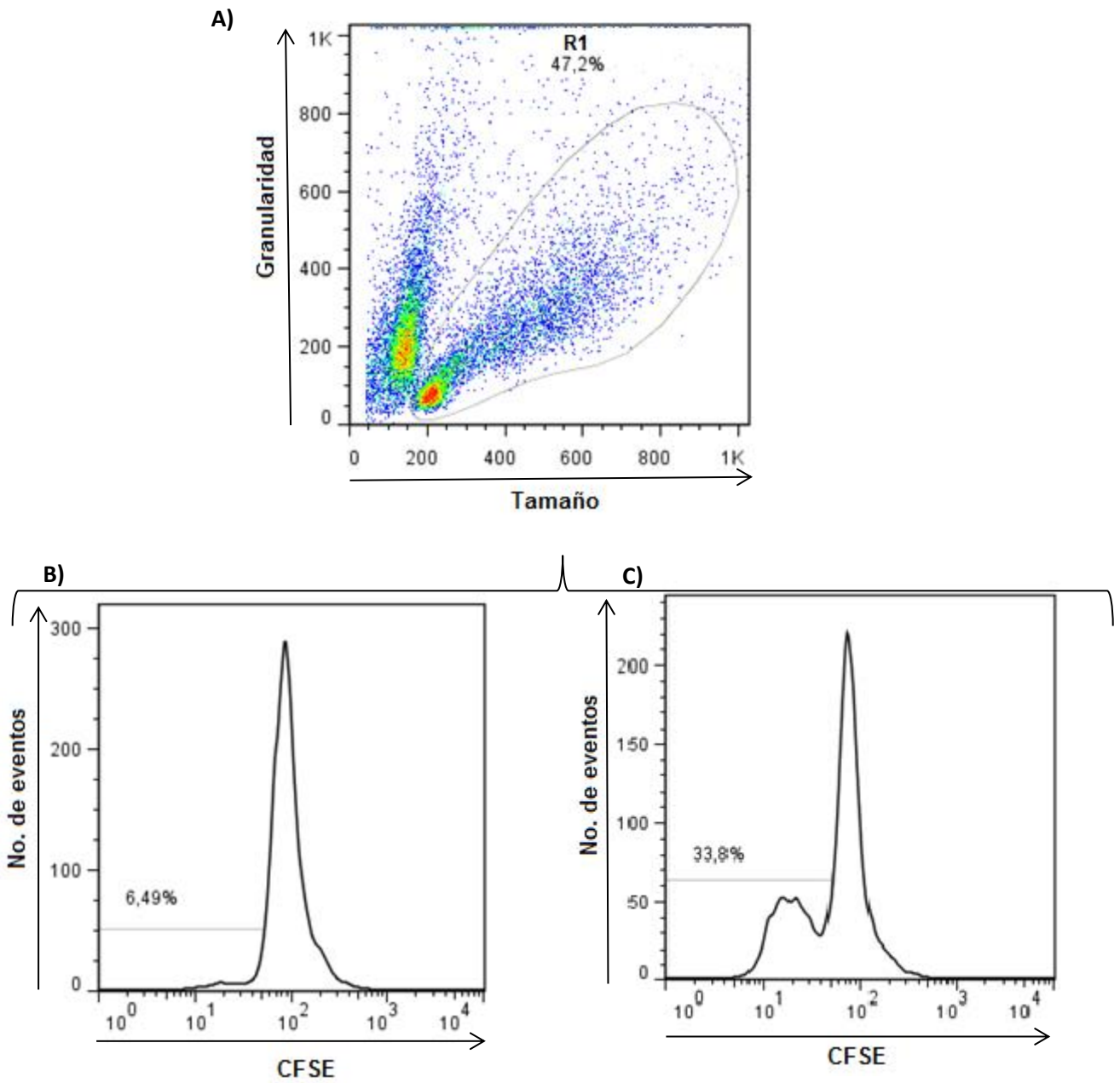
**Figura 8.** Pesos tumorales promedio obtenidos de ratones BALB/c (de 4 a 6 semanas) implantados con células 4T1 e inmunizados al quinto día con: a) Epítipo inicial NGd  b) BEV G3d  (Dosis:  $5 \times 10^{12}$  fagos/200 $\mu$ L, vía I.V.), o sólo implantados (Control de implante) . Se administró un refuerzo el día 16 después del implante (Dosis:  $5 \times 10^{11}$  fagos/200 $\mu$ L, vía I.V.). Los valores son la media  $\pm$  SEM, (n=5 ratones/grupo). Los datos fueron analizados empleando las pruebas ANOVA de 1 factor y Tukey para comparaciones múltiples.



**Figura 9.** Macrometástasis pulmonares promedio obtenidas de ratones BALB/c (de 4 a 6 semanas) implantados con células 4T1 e inmunizados con a) Epítipo inicial NGd, b) BEV G3d (Dosis:  $5 \times 10^{12}$  fagos/200 $\mu$ L, vía I.V.), o sólo implantados (Control de implante) . Se administró un refuerzo el día 16 después del implante (Dosis:  $5 \times 10^{11}$  fagos/200 $\mu$ L, vía I.V.). Los valores son la media  $\pm$  SEM, (n=5 ratones/grupo). \*ND: No detectadas.

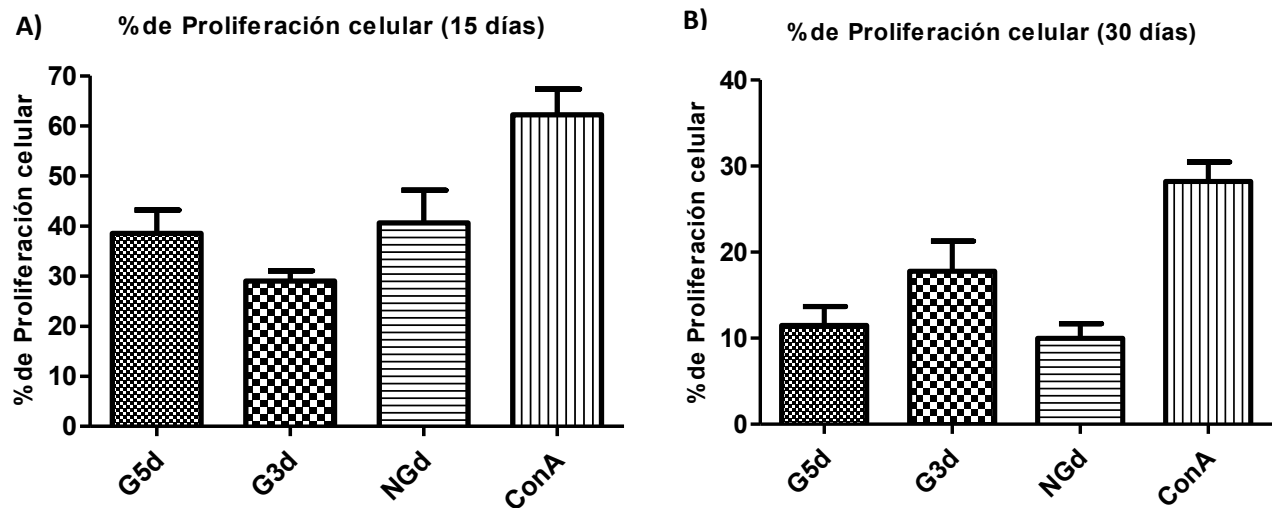
## **Determinación de la proliferación celular al emplear BEVs**

Se realizaron ensayos de proliferación celular con las BEVs y con clones individuales provenientes de estas para efectuar una selección de clones que pudiese mejorar el efecto antitumoral de las BEVs. En la figura 10 se muestra un ejemplo representativo del análisis de los resultados obtenidos por citometría de flujo para la biblioteca G5d.



**Figura 10.** Ejemplo representativo del análisis de datos para la determinación del porcentaje de proliferación total de la biblioteca G5d. A) Gráfico de puntos, Tamaño vs Granularidad, en donde se delimitó la región de esplenocitos (R1); a partir de la cual se obtuvo el histograma donde se muestra la fluorescencia para CFSE. B) histograma del control negativo en donde se colocó el marcador y C) histograma correspondiente a los esplenocitos cultivados con la BEV G5d, en donde el porcentaje de proliferación celular obtenido fue de 33.8%. A cada porcentaje de proliferación celular se le resta el porcentaje obtenido para el control negativo.

Los porcentajes de proliferación celular obtenidos al cultivar esplenocitos y las BEVs a los 15 días después del implante se encuentran entre 29.02 y 38.52% (Figura 11A). Sin embargo, al comparar estos porcentajes de proliferación celular con los obtenidos al día 30 Figura 11B se observa una disminución considerable (porcentajes entre 11.49 y 17.79%), incluso las células son incapaces de responder eficazmente ante el estímulo con ConA. Por lo que, de acuerdo a estos resultados los ensayos de proliferación se llevaron a cabo posteriormente empleando esplenocitos de ratones sacrificados el día 15 después del implante.



**Figura 11.** Porcentajes de proliferación celular obtenidos al cultivar células provenientes del bazo de ratones BALB/c sacrificados A) 15 y B) 30 días después del implante, con las BEVs (G5d o G3d) y el epítipo inicial (NGd); también se muestra el porcentaje de proliferación correspondiente al control positivo, en el que se empleó concanavalina A (ConA). Los valores son la media  $\pm$  SEM, (n=2).

### **Selección de mimótopos de epítipos reconocidos por linfocitos T a partir del tamizaje de la BEV G3d**

Se purificaron 90 clones individuales a partir de la biblioteca G3d y dos clones correspondientes al epítipo inicial (NGd5L y NGd5M). Estas clones individuales se cultivaron con esplenocitos provenientes de alguna de las siguientes condiciones: ratones implantados con células 4T1 e inmunizados al quinto día con a) el epítipo inicial NGd o, b) la biblioteca G3d, y sacrificados quince días después del implante de células 4T1.

## **Porcentajes de proliferación obtenidos al emplear clonas individuales provenientes de la BEV G3d**

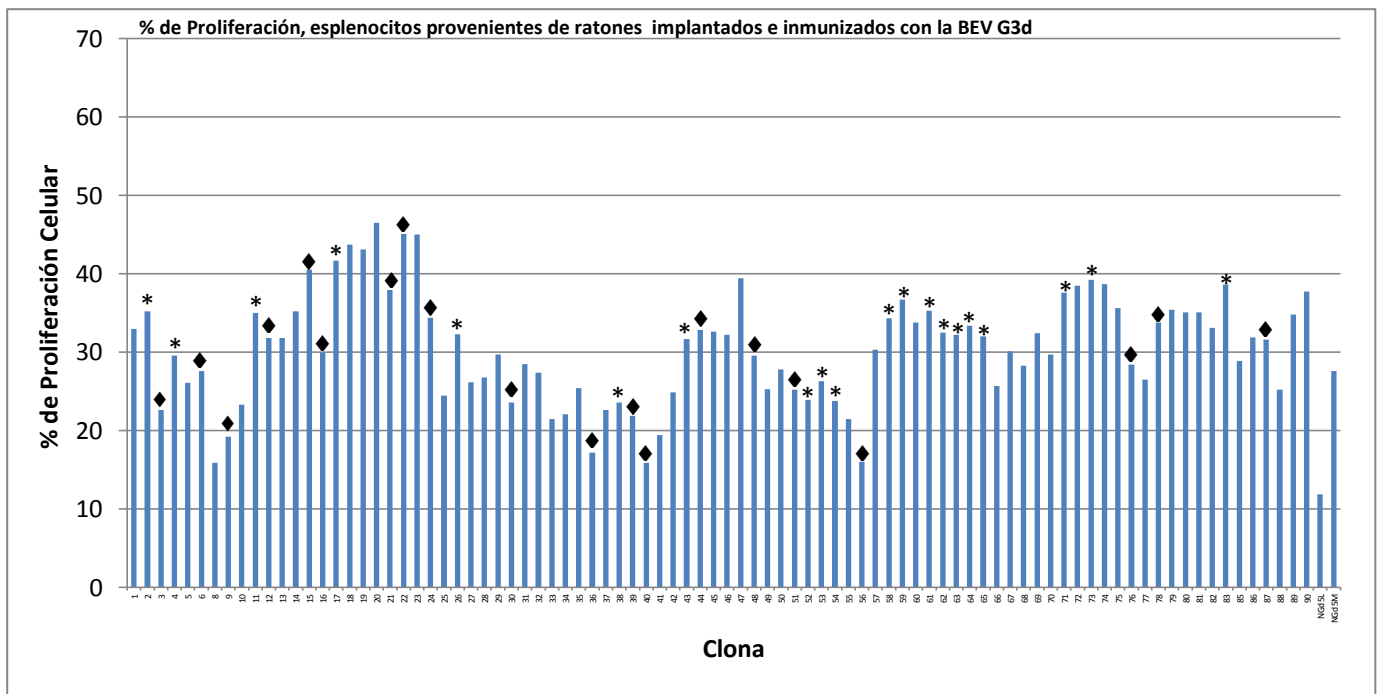
Se realizaron ensayos de proliferación celular empleando clonas individuales de la biblioteca G3d y esplenocitos provenientes de ratones implantados con células 4T1 e inmunizados con el epítipo inicial NGd o con la biblioteca G3d. Los porcentajes de proliferación obtenidos al emplear esplenocitos provenientes de ratones implantados e inmunizados con la Biblioteca G3d (media 30.5%) fueron significativamente mayores respecto a los observados al emplear esplenocitos provenientes de ratones implantados e inmunizados con el epítipo inicial NGd (media 18.1%) (Figura 14).

De acuerdo a los porcentajes de proliferación celular obtenidos (Figuras 12 y 13), se seleccionaron clonas con las siguientes características:

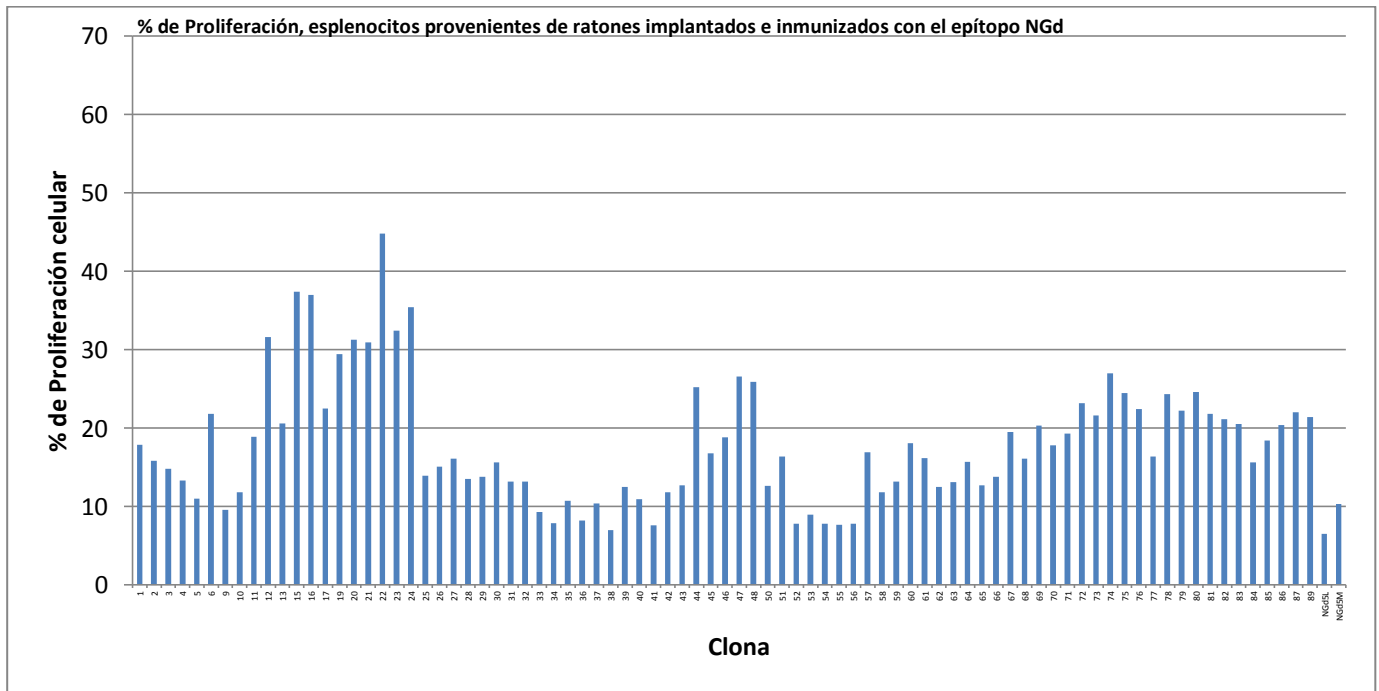
**Grupo 20 clonas negativas de G3d:** 20 clonas cuya diferencia en porcentajes de proliferación entre los obtenidos empleando esplenocitos provenientes de ratones implantados con células 4T1 e inmunizados con la biblioteca G3d y los obtenidos al emplear los esplenocitos de ratones implantados con células 4T1 e inmunizados con el epítipo NGd fueran menores al 9%.

**Grupo 20 clonas positivas de G3d:** 20 clonas cuya diferencia en porcentajes de proliferación entre los obtenidos empleando esplenocitos provenientes de ratones implantados con células 4T1 e inmunizados con la Biblioteca G3d y los obtenidos al emplear los esplenocitos de ratones implantados con células 4T1 e inmunizados con el epítipo NGd fueran mayores al 16%.

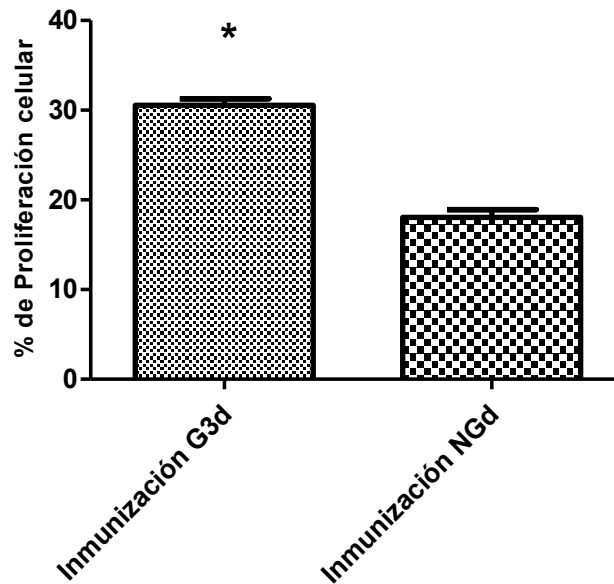




**Figura 12.** Porcentajes de proliferación celular obtenidos al cultivar células provenientes del bazo de ratones BALB/c (de 4 a 6 semanas) implantados e inmunizados con la BEV G3d y clonas individuales provenientes de la misma. \* Indican las 20 clonas seleccionadas como positivas de G3d y ◆ indica las 20 clonas seleccionadas como negativas de G3d.



**Figura 13.** Porcentajes de proliferación celular obtenidos al cultivar células provenientes del bazo de ratones BALB/c (de 4 a 6 semanas) implantados e inmunizados con el epítipo inicial NGd y clonas individuales provenientes de la BEV G3d.



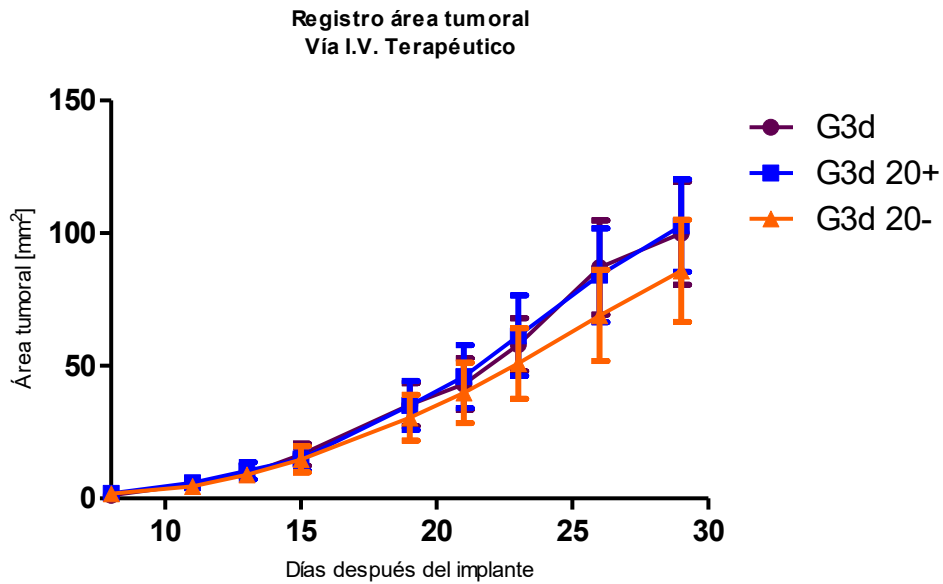
**Figura 14.** Porcentajes de proliferación celular promedio obtenidos al cultivar clonas individuales provenientes de la BEV G3d y células provenientes del bazo de ratones BALB/c (de 4 a 6 semanas) implantados e inmunizados con la BEV G3d o con el epítipo inicial NGd. \*Representa un mayor porcentaje de proliferación promedio estadísticamente significativo  $P < 0.05$ . Los datos fueron analizados utilizando la prueba t de Student.

### **Efecto antitumoral de la BEV G3d y de los mimótopos de linfocitos T identificados a partir del tamizaje de la misma**

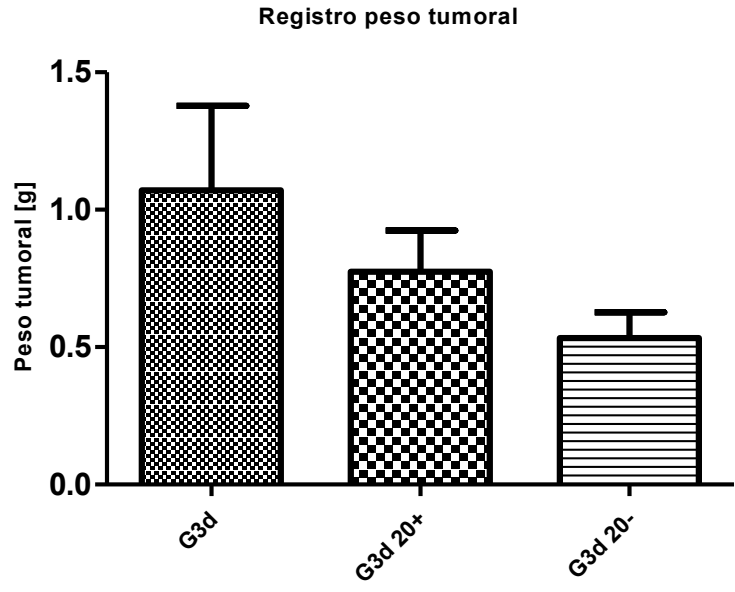
Se implantaron ratones BALB/c con células 4T1 y al quinto día se inmunizaron con: a) Biblioteca G3d, b) Grupo 20 clonas positivas de G3d o con c) Grupo 20 clonas negativas de G3d con la finalidad de evaluar el efecto antitumoral de los grupos seleccionados. El área tumoral fue medida a partir del día 8 después del implante y hasta el día 29, los resultados obtenidos para cada grupo empleado se muestran en la Figura 15. El grupo que presentó menor área tumoral al día 29 después del implante fue el inmunizado con las 20 clonas negativas de G3d ( $85.797\text{mm}^2$ ), seguido del grupo inmunizado con la Biblioteca G3d ( $99.99\text{mm}^2$ ) y del grupo inmunizado con las 20 clonas positivas de G3d ( $102.843\text{mm}^2$ ), sin ser estas diferencias estadísticamente significativas.




En cuanto a los pesos tumorales, la Figura 16 muestra que semejante a lo observado en las áreas tumorales, el grupo que presentó un menor peso tumoral fue el inmunizado con las 20 clonas negativas de G3d (0.532g), seguido por el grupo inmunizado con las 20 clonas positivas de G3d (0.775g) y del grupo inmunizado con la Biblioteca G3d (1.07g). Mientras

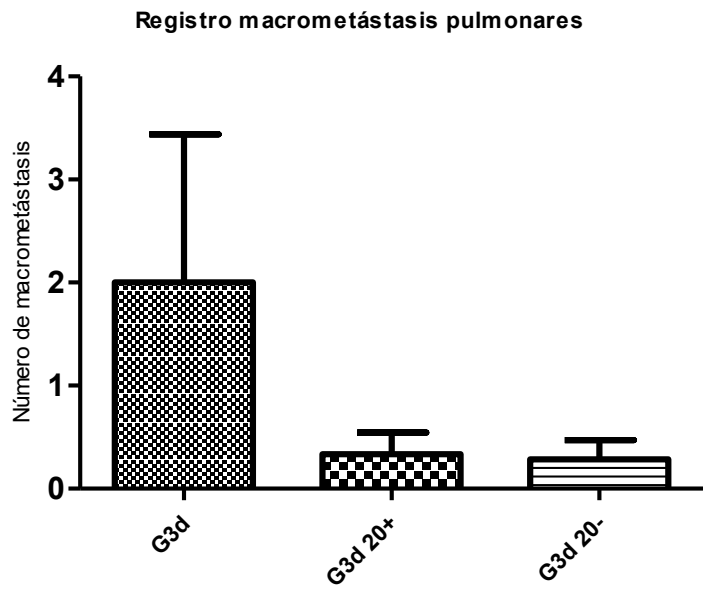
que el grupo que presentó mayor número de macrometástasis pulmonares fue el inmunizado con la BEV G3d (Figura 17).






**Figura 15.** Áreas tumorales promedio obtenidas de ratones BALB/c (de 4 a 6 semanas) implantados con células 4T1 e inmunizados al quinto día con: a) BEV G3d ●, b) 20 clonas positivas de G3d ■ o c) 20 clonas negativas de G3d ▲ (Dosis:  $5 \times 10^{12}$  fagos/200 $\mu$ L, vía I.V.). Los valores son la media  $\pm$  SEM, (n=6). Los datos fueron analizados empleando las pruebas ANOVA de 1 factor y Tukey para comparaciones múltiples.



**Figura 16.** Pesos tumorales promedio obtenidos de ratones BALB/c (de 4 a 6 semanas) implantados con células 4T1 e inmunizados al quinto día con a) BEV G3d , b) 20 clonas positivas de G3d  o c) 20 clonas negativas de G3d  (Dosis:  $5 \times 10^{12}$  fagos/200 $\mu$ L, vía I.V.). Los valores son la media  $\pm$  SEM, (n=6). Los datos fueron analizados empleando las pruebas ANOVA de 1 factor y Tukey para comparaciones múltiples.



**Figura 17.** Macrometástasis pulmonares promedio obtenidas de ratones BALB/c (de 4 a 6 semanas) implantados con células 4T1 e inmunizados al quinto día con a) BEV G3d , b) 20 clonas positivas de G3d  o c) 20 clonas negativas de G3d  (Dosis:  $5 \times 10^{12}$  fagos/200 $\mu$ L, vía I.V.). Los valores son la media  $\pm$  SEM, (n=6). Los datos fueron analizados empleando las pruebas Kruskal-Wallis y Dunn's para comparaciones múltiples.

## DISCUSIÓN

En el diseño de una vacuna terapéutica efectiva para pacientes con cáncer de mama deben considerarse los siguientes factores: a) la vacuna debe ser capaz de romper la tolerancia periférica con el objetivo de activar linfocitos T anti-tumorales de baja afinidad que no fueron eliminados durante la selección en el timo (Milani A., 2014), b) empleo de antígenos blanco apropiados, c) estrategias de inmunización efectivas y d) los mecanismos de escape inmune. (Scanlan MJ., 2001)

Considerando estos puntos y dentro de las aproximaciones llevadas a cabo en el diseño de una vacuna profiláctica en cáncer de mama se encuentra la empleada por Jaini et al., quienes, en un modelo murino de cáncer de mama, reportan la posibilidad de usar el antígeno alfa-lactoalbúmina. Los autores proponen que una respuesta autoinmune capaz de inducir daño a algún órgano puede brindar protección y terapia contra los tumores originados en dicho órgano. El nivel máximo de expresión de alfa-lactoalbúmina está presente solo en ratones en lactancia, por lo que sería identificada como extraña en animales que no se encuentren en lactancia pero que presenten algún tumor. (Jaini R., 2010)

Además, se han desarrollado nuevas estrategias como el uso de vacunas basadas en péptidos y aunque aún no están definidos los criterios empleados en su diseño, diversos acercamientos han sido empleados. Entre estos se encuentran la optimización de la unión de los péptidos al MHC o bien en la interacción del complejo péptido-MHC con el TCR. A pesar de ser estrategias prometedoras, se ha demostrado que un bajo porcentaje de linfocitos T producidos reconocen al péptido silvestre y su efecto antitumoral es casi nulo. (Iero M., 2009; Buhrman JD., 2013) Por otra parte, nuestro grupo de trabajo reportó que el uso de BEVs conteniendo variantes del epítipo de survivina como componentes de una vacuna contra cáncer de mama en un modelo murino ocasionó una disminución del crecimiento tumoral en estudios profilácticos y terapéuticos. (Dominguez-Romero A., 2014)

Considerando los factores mencionados anteriormente para obtener una respuesta inmune antitumoral, la necesidad de nuevas estrategias en el diseño de una vacuna y la gran variabilidad antigénica presente en las células tumorales, en este trabajo se llevó a cabo la inmunización con BEVs. Los ratones inmunizados con las bibliotecas G5d y G3d tuvieron una disminución significativa en el área tumoral respecto a los ratones inmunizados con el epítipo inicial (Figura 4), lo que se correlacionó con los pesos tumorales, siendo menores en los grupos de ratones inmunizados con dichas bibliotecas (Figura 5). Dichos resultados

sugieren que los epítomos presentes en las bibliotecas G5d y G3d son reconocidos por el sistema inmune y son capaces de ejercer un efecto antitumoral. Esto debido probablemente a la presentación simultánea de múltiples epítomos a los linfocitos T, lo que conllevaría a la activación de un amplio conjunto de linfocitos, algunos de los cuales serían capaces de ejercer un efecto antitumoral al reconocer cruzadamente antígenos tumorales. (Dominguez-Romero A.,

2014) Además, se ha reportado que ciertas cadenas laterales en los aminoácidos en la superficie del complejo péptido-MHC pueden alterar la interacción con el TCR, aun cuando estas cadenas laterales no están directamente implicadas en la unión con el TCR. Así, aminoácidos como la alanina (presente en la secuencia de aminoácidos de los epítomos que constituyen la BEV G3d) pueden permitir a otros aminoácidos en la superficie del complejo péptido-MHC rotar libremente o adoptar una conformación diferente, con cambios en la energía de unión (Iero M., 2009) y por lo tanto modificar la respuesta del linfocito T.

Dados los efectos antitumorales observados en la BEV G3d (menor área y peso tumoral, así como menor número de metástasis respecto al grupo inmunizado con el epítomo inicial), se prosiguió a administrar un refuerzo el día 16 después del implante. Contrario a lo esperado, no se observó un incremento en la actividad antitumoral de la BEV G3d (Figura 7 y 8), excepto en el número de macrometástasis (Figura 9), siendo ausentes en este grupo y en el inmunizado con el epítomo inicial NGd. Considerando que más del 90% de la mortalidad en pacientes con cáncer es debida a la presencia de metástasis, y a que la presencia de metástasis distantes (principalmente a pulmones y hueso) limita el pronóstico de los pacientes con cáncer de mama (Fang Y., et al. 2013), los resultados obtenidos al emplear la BEV G3d son prometedores.

La selección de mimótopos se llevó a cabo mediante el escrutinio de clonas individuales de la biblioteca G3d evaluando su efecto sobre la capacidad proliferativa de esplenocitos provenientes de ratones con distintos tratamientos. Como era de esperar, al emplear clonas individuales de la biblioteca G3d en ensayos de proliferación celular, se observó que los porcentajes fueron mayores al emplear esplenocitos provenientes de ratones implantados e inmunizados con la biblioteca G3d que al emplear esplenocitos de ratones implantados e inmunizados con el epítomo inicial NGd (Figura 14). De manera que se seleccionaron como mimótopos un conjunto de clonas a partir de los niveles de proliferación celular ya que se ha sugerido que las propiedades funcionales de los linfocitos T, tal como la proliferación celular, parecen correlacionarse con su eficacia, (Appay V., 2008) aunado a que aún no se comprende

como las alteraciones en la secuencia de un péptido puede afectar la función o el repertorio de las poblaciones de linfocitos T. (Buhrman JD., 2013)

Los resultados obtenidos muestran que los ratones inmunizados con las 20 clonas negativas de G3d presentaron menor área tumoral respecto a los inmunizados con la biblioteca G3d o con las 20 clonas positivas de G3d, lo cual se correlaciona con los pesos tumorales registrados; sin embargo, las diferencias obtenidas no fueron significativas (Figuras 15 y 16). Además, se observó un menor número de macrometástasis pulmonares al inmunizar con la selección de clonas (Figura 17). Esto demuestra que la selección y disminución en la complejidad del número de variantes en la biblioteca G3d, produce un efecto antitumoral distinto respecto a la biblioteca completa. Hay evidencia que indica que las células T son tolerantes a los epítomos dominantes presentes en proteínas propias pero pueden responder a los epítomos subdominantes. (Disis ML., 2004) Por lo que el hecho de que los ratones inmunizados con las 20 clonas negativas de G3d presentaran un área tumoral menor se podría deber a que en este caso las clonas seleccionadas fueron reconocidas y generaron porcentajes de proliferación similares al emplear esplenocitos tanto de ratones implantados e inmunizados con la biblioteca G3d o con el epítomo inicial NGd. Esto podría ocasionar un mayor número de linfocitos capaces de reconocer estas clonas y probablemente capaces de reaccionar cruzadamente con las células tumorales. (Iero M., 2009)

El éxito al emplear el sistema inmune para tratar el cáncer podría requerir de la combinación de distintas estrategias que actúen en múltiples niveles. Así, la destrucción de la célula tumoral *in situ*, ocasionada por ejemplo por tratamientos convencionales, brindaría la oportunidad de emplear una vacuna tumoral polivalente, constituida por una mezcla de epítomos mutados sin un requerimiento por el conocimiento del antígeno blanco. (Segal NH., 2008)

Aspecto que ha sido reportado por James TC, et al. en cuyo trabajo se demuestra que la homología en la secuencia y/o las propiedades químicas de los mimótopos a algún epítomo (en ese caso MUC1) no son factores determinantes para activar el sistema inmune.

El uso de mimótopos seleccionados a través del tamizaje de BEVs podría ser de gran utilidad al emplearse como inmunógenos capaces de romper la tolerancia hacia antígenos tumorales y de superar la gran variabilidad antigénica presente en cáncer de mama; (Segal NH., 2008) sin embargo, un tamizaje más específico que incluya un análisis de las subpoblaciones y funcionalidad de los linfocitos T probablemente contribuiría al desarrollo de vacunas más eficaces.

## CONCLUSIONES

En este trabajo se empleó una nueva estrategia para seleccionar mimótopos a partir de BEVs con la finalidad de implementar nuevas aproximaciones en el desarrollo de vacunas contra cáncer. Se emplearon las BEVs G3d y G5d como vacunas terapéuticas en un modelo murino de cáncer de mama y se observó una disminución significativa en el área tumoral respecto al grupo inmunizado con el epítipo inicial NGd. Además, se seleccionaron de acuerdo a criterios de porcentajes de proliferación de esplenocitos dos grupos de mimótopos a partir de la BEV G3d y se denominaron: 20 clonas negativas o 20 clonas positivas de G3d.

Al emplear como mimótopos la selección de 20 clonas negativas a partir de la BEV G3d se mejoró la actividad antitumoral respecto a la BEV G3d, sin ser esta diferencia estadísticamente significativa. Asimismo, a pesar de no haberse observado diferencias estadísticamente significativas, la inmunización con la biblioteca G3d y con los dos grupos de mimótopos redujo el número de macrometástasis pulmonares. Siendo esto de especial interés, puesto que una vez que en un paciente con cáncer de mama se detectan metástasis las terapias disponibles tienen poco impacto en su supervivencia. Esto demuestra la importancia en la selección de componentes de vacunas que junto con tratamientos complementarios proporcionen estrategias eficaces a emplear en contra del cáncer de mama.



## **PERSPECTIVAS**

Los resultados del presente trabajo muestran que el mimetismo molecular y el reconocimiento de múltiples epítomos por el TCR son aspectos de relevancia que pueden manipularse para obtener la respuesta inmune deseada, por lo que además del seguimiento del crecimiento y peso tumoral sería importante evaluar la presencia de células T reguladoras, linfocitos T CD4+ y CD8+ en cortes histológicos del tumor.

Debido a la importancia de emplear antígenos blanco apropiados, se podrían seleccionar mimótopos con criterios más específicos, identificar y evaluar la actividad antitumoral de mimótopos a partir de la BEV G5d, emplear péptidos sintéticos, o bien, otra aproximación de interés sería que posterior a inmunizar con una selección de mimótopos se lleve a cabo un refuerzo con un AAT, tal como HER-2 o MUC-1.

## REFERENCIAS

1. Abbas AK., Lichtman AH., Pillai S. *Inmunología celular y molecular*. Ed. Elsevier. 6ta edición. España, 2008 pp.3-17, 189-209.
2. Acuto O., Michel F. CD28-Mediated co-stimulation: a quantitative support for TCR signaling. *Nat Rev Immunol* **3**: 939-951 (2003).
3. Adams GP., Weiner LM. Monoclonal antibody therapy of cancer. *Nat Biotechnol* **23**: 1147-1157 (2005).
4. Alizadeh D, Trad M, Hanke NT, Larmonier CB, et al. Doxorubicin eliminates myeloid-derived suppressor cells and enhances the efficacy of adoptive T-cell transfer in breast cancer. *Cancer Res* **74**:104-118 (2014).
5. Andersen MH., Schrama D., Thor Straten P., et al. Cytotoxic T cells. *J Invest Dermatol* **126**: 32-41 (2006).
6. Appay V, Douek DC, Price DA. CD8+ T cell efficacy in vaccination and disease. *Nat Med* **14**: 623-628 (2008).
7. Azzazy HM., Highsmith WE Jr. Phage display technology: clinical applications and recent innovations. *Clin Biochem* **35**: 425-445 (2002).
8. Barrett JC. Mechanisms of multistep carcinogenesis and carcinogen risk assessment. *Environ Health Perspect* **100**:9-20 (1993).
9. Brämswig KH., Knittelfelder R., Gruber S., et al. Immunization with mimotopes prevents growth of carcinoembryonic antigen positive tumors in BALB/c mice. *Clin Cancer Res* **13**:6501-6508 (2007).
10. Buhman JD., Jordan KR., U'ren L., et al. Augmenting antitumor T-cell responses to mimotope vaccination by boosting with native tumor antigens. *Cancer Res* **73**: 74-85 (2013).
11. Buhman JD., Slansky JE. Improving T cell responses to modified peptides in tumor vaccines. *Immunol Res* **55**:34-47 (2013).
12. Castano AP., Mroz P., Hamblin MR. Photodynamic therapy and anti-tumour immunity. *Nat Rev Cancer* **6**: 535-545 (2006).
13. Charles-Niño C., Pedroza-Roldan C., Viveros M, Gevorkian G., et al. Variable epitope libraries: new vaccine immunogens capable of inducing broad human immunodeficiency virus type 1-neutralizing antibody response. *Vaccine*. **29**:5313-5321 (2011).
14. Chávarri-Guerra Y., Villarreal-Garza C., Liedke PE., et al. Breast cancer in Mexico: a growing challenge to health and the health system. *Lancet Oncol* **13**:e335-e343 (2012).
15. Chen L, Flies DB. Molecular mechanisms of T cell co-stimulation and co-inhibition. *Nat Rev Immunol* **13**: 227-242 (2013).
16. Croce CM. Oncogenes and cancer. *N Engl J Med* **358**: 502-511 (2008).

17. de la Vara-Salazar E., Suárez-López L., Angeles-Llerenas A., et al. Breast cancer mortality trends in Mexico, 1980-2009. *Salud Publica Mex* **53**:385-393 (2011).
18. Decker T., Fischer G., Bücke W., et al. Increased number of regulatory T cells (T-regs) in the peripheral blood of patients with Her-2/neu-positive early breast cancer. *J Cancer Res Clin Oncol* **138**: 1945-1950 (2012).
19. Disis ML., Salazar LG., Knutson KL. Peptide-based vaccines in breast cancer. *Breast Dis* **20**:3-11 (2004).
20. Dominguez-Romero A., Zamora-Alvarado R., Servín-Blanco R., et al. Variable epitope library carrying heavily mutated survivin-derived CTL epitope variants as a new class of efficient vaccine immunogen tested in a mouse model of breast cancer. *Hum Vaccin Immunother* **10**: 3201-3213 (2014).
21. Domschke C., Ge Y., Bernhardt I., et al. Long-term survival after adoptive bone marrow T cell therapy of advanced metastasized breast cancer: follow-up analysis of a clinical pilot trial. *Cancer Immunol Immunother* **62**: 1053-1060 (2013).
22. Dranoff G. Cytokines in cancer pathogenesis and cancer therapy. *Nat Rev Cancer* **4**: 11-22 (2004).
23. Dudley ME., Rosenberg SA. Adoptive-cell-transfer therapy for the treatment of patients with cancer. *Nat Rev Cancer* **3**: 666-675 (2003).
24. Dunn GP., Bruce AT., Ikeda H., et al. Cancer immunoediting: from immune-surveillance to tumor escape. *Nat Immunol* **3**: 991-998 (2002).
25. Dunn GP., Koebel CM., Schreiber RD. Interferons, immunity and cancer immunoediting. *Nat Rev Immunol* **6**: 836-847 (2006).
26. Emens LA. Re-purposing cancer therapeutics for breast cancer immunotherapy. *Cancer Immunol Immunother* **61**:1299-1305 (2012).
27. Emens LA., Reilly RT., Jaffee EM. Breast cancer vaccines: maximizing cancer treatment by tapping into host immunity. *Endocr Relat Cancer*. **12**: 1-17 (2005).
28. Fan Z., Zhang Q. Molecular mechanisms of lymphocyte-mediated cytotoxicity. *Cell Mol Immunol* **2**: 259-264 (2005).
29. Fang Y., Chen Y., Yu L., et al. Inhibition of breast cancer metastases by a novel inhibitor of TGF $\beta$  receptor 1. *J Natl Cancer Inst* **105**: 47-58 (2013).
30. Hynes NE., Lane HA. ERBB receptors and cancer: the complexity of targeted inhibitors. *Nat Rev Cancer* **5**:341-354 (2005).
31. Iero M., Filipazzi P., Castelli C., et al. Modified peptides in anti-cancer vaccines: are we eventually improving anti-tumour immunity? *Cancer Immunol Immunother* **58**: 1159-1167 (2009).

32. Ikeda H., Old LJ., Schreiber RD. The roles of IFN $\gamma$  in protection against tumor development and cancer immunoediting. *Cytokine Growth Factor Rev* **13**: 95-109 (2002).
33. Jacobsson K., Rosander A., Bjerketorp J., et al. Shotgun Phage Display -Selection for Bacterial Receptins or other Exported Proteins. *Biol Proced Online* **5**:123-135 (2003).
34. Jaini R., Kesaraju P., Johnson JM., et al. An autoimmune-mediated strategy for prophylactic breast cancer vaccination. *Nat Med* **16**: 799-803 (2010).
35. James TC, Bond U. Molecular mimics of the tumour antigen MUC1. *PLoS One* **7**: e49728 (2012).
36. Jay R. Harris., Marc E. Lippman., Monica Morrow. Enfermedades de la mama. Ed. Marbán Libros, SL. España, 2009 pp. 1-4.
37. Johnson LA., Jackson DG. Control of dendritic cell trafficking in lymphatics by chemokines. *Angiogenesis* **17**: 335-345 (2014).
38. Kindt. J. Thomas. Inmunología de Kuby. Ed. Mc. Graw Hill. 6ta edición. México, 2007 pp.525-542.
39. Klaunig JE., Kamendulis LM. The role of oxidative stress in carcinogenesis. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **44**:239-267 (2004).
40. Knutson KL., Disis ML. Expansion of HER2/neu-specific T cells ex vivo following immunization with a HER2/neu peptide-based vaccine. *Clin Breast Cancer* **2**:73-79 (2001).
41. Kono H., Rock K. How dying cells alert the immune system to danger. *Nat Rev Immunol* **8**: 279-289 (2008).
42. Krell J., Frampton AE., Stebbing J. The clinical significance of tumor infiltrating lymphocytes in breast cancer: does subtype matter? *BMC Cancer* **12**: 1-3 (2012).
43. Lazoura E., Lodding J., Farrugia W., et al. Non-canonical anchor motif peptides bound to MHC class I induce cellular responses. *Mol Immunol* **46**: 1171-1178 (2009).
44. Lian J., Luster AD. Chemokine-guided cell positioning in the lymph node orchestrates the generation of adaptive immune responses. *Curr Opin Cell Biol* **36**: 1-6 (2015).
45. Lin SX., Chen J., Mazumdar M., et al. Molecular therapy of breast cancer: progress and future directions. *Nat Rev Endocrinol* **6**: 485-493 (2010).
46. Lustgarten J., Dominguez AL., Pinilla C. Identification of cross-reactive peptides using combinatorial libraries circumvents tolerance against Her-2/neu-immunodominant epitope. *J Immunol* Feb **176**:1796-1805 (2006).
47. Malecek K., Zhong S., McGary K., et al. Engineering improved T cell receptors using an alanine-scan guided T cell display selection system. *J Immunol Methods* **392**:1-11 (2013).
48. Manoutcharian K. Bacteriophages as tools for vaccine and drug development. *Expert Rev Vaccines* **4**: 5-7 (2005).

49. Marquez JP., Rivera R., Kang KH., et al. Human papillomavirus immunogen that provides protective tumor immunity and induces tumor regression. *Viral Immunol* **25**:141-152 (2012).
50. McMahan RH., McWilliams JA., Jordan KR., et al. Relating TCR-peptide-MHC affinity to immunogenicity for the design of tumor vaccines. *J Clin Invest* **116**: 2543-2551 (2006).
51. Meisner A., Fekrazad MH., Royce ME. Enfermedades mamarias: benignas y malignas. *Med Clin N Am* **92**: 1115-1141 (2008).
52. Melero I., Gaudernack G., Gerritsen W., et al. Therapeutic vaccines for cancer: an overview of clinical trials. *Nat Rev Clin Oncol* **11**: 509-515 (2014).
53. Mellman I., Coukos G., Dranoff G. Cancer immunotherapy comes of age. *Nature* **480**: 480-489 (2011).
54. Milani A., Sangiolo D., Aglietta M., et al. Recent advances in the development of breast cancer vaccines. *Breast Cancer (Dove Med Press)* **6**:159-168 (2014).
55. Mullen LM., Nair SP., Ward JM., et al. Phage display in the study of infectious diseases. *Trends Microbiol* **14**: 141-147 (2006).
56. Murphy K., Travers P., Walport M. Inmunobiología de Janeway. Ed. Mc. Graw Hill. 7ma edición. México, 2009 pp.525-542.
57. National Cancer Institute - PDQ Cancer Information Summaries. March 22, 2012. U.S. National Library of Medicine - The World's Largest Medical Library
58. Nino-Vasquez JJ., Allicotti G., Borrás E., et al. A powerful combination: the use of positional scanning libraries and biometrical analysis to identify cross-reactive T cell epitopes. *Mol Immunol* **40**: 1063-1074 (2004).
59. Pedroza-Roldan C., Charles-Niño C., Saavedra R., et al. Variable epitope library-based vaccines: shooting moving targets. *Mol Immunol* **47**:270-282 (2009).
60. Pitot HC., Dragan YP. Facts and theories concerning the mechanisms of carcinogenesis. *FASEB J* **5**: 2280-2286 (1991).
61. Polyak K. Breast cancer: origins and evolution. *J Clin Invest* **117**: 3155-3163 (2007).
62. Ponder B. Cancer genetics. *Nat* **411**: 336-341 (2001).
63. Porter P. "Westernizing" women's risks? Breast cancer in lower-income countries. *N Engl J Med* **358**:213-216 (2008).
64. Raulet DH., Guerra N. Oncogenic stress sensed by the immune system: role of natural killer cell receptors. *Nat Rev Immunol* **9**: 568-580 (2009).
65. Restifo NP., Dudley ME., Rosenberg SA. Adoptive immunotherapy for cancer: harnessing the T cell response. *Nat Rev Immunol* **12**: 269-281 (2012).
66. Richard L. Drake., A. Wayne Vogl., Adam W.M. Mitchell. Gray Anatomía para estudiantes. Ed. Elsevier. España, 2005 pp.115-116.

67. Rosenberg SO. Immune surveillance: a balance between protumor and antitumor immunity. *Curr Opin Genet Dev* **18**: 11-18 (2008).
68. Ryungsa K., Manabu E., Kazuaki T. Cancer immunoediting from immune surveillance to immune escape. *Immunology* **121**: 1-14 (2007).
69. Sambrook J., Russell DW. Molecular cloning: a laboratory manual. Ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press. Third edition, Volume 1. New York, 2001 pp 3.1- 3.9.
70. Scanlan MJ., Jäger D. Challenges to the development of antigen-specific breast cancer vaccines. *Breast Cancer Res* **3**:95-98 (2001).
71. Schreiber RD., Old LJ., Smyth MJ. Cancer immunoediting: integrating immunity's roles in cancer suppression and promotion. *Science* **331**: 1565-1570 (2011).
72. Scott AM., Wolchok JD., Old LJ. Antibody therapy of cancer. *Nat Rev Cancer* **12**: 278-287 (2012).
73. Secretaría de Salud, Norma Oficial Mexicana NOM-041-SSA2-2011, Para la prevención, diagnóstico, tratamiento, control y vigilancia epidemiológica del cáncer de mama (2011).
74. Segal NH., Parsons DW., Peggs KS., et al. Epitope landscape in breast and colorectal cancer. *Cancer Res* **68**: 889-892 (2008).
75. Shanmugam A., Suriano R., Goswami N., et al. Identification of peptide mimotopes of gp96 using single-chain antibody library. *Cell Stress Chaperones* **16**:225-234 (2011).
76. Sharav T., Wiesmüller KH., Walden P. Mimotope vaccines for cancer immunotherapy. *Vaccine*. 25:3032-3037 (2007).
77. Sidhu SS. Phage display in pharmaceutical biotechnology. *Curr Opin Biotechnol* **11**: 610-616 (2000).
78. Sidney J., Assarsson E., Moore C., et al. Quantitative peptide binding motifs for 19 human and mouse MHC class I molecules derived using positional scanning combinatorial peptide libraries. *Immune Res* **4**:2 (2008).
79. Siewert K., Malotka J., Kawakami N., et al. Unbiased identification of target antigens of CD8+ T cells with combinatorial libraries coding for short peptides. *Nat Med* **18**: 824-828 (2012).
80. Slamon D., Eiermann W., Robert N., et al. Adjuvant trastuzumab in HER2-positive breast cancer. *N Engl J Med* **365**: 1273-1283 (2011).
81. Slamon DJ., Godolphin W., Jones LA., et al. Studies of the HER-2/neu proto-oncogene in human breast and ovarian cancer. *Science* **244**:707-712 (1989).
82. Slaney CY., Kershaw MH., Darcy PK. Trafficking of T cells into tumors. *Cancer Res* **74**: 7168-7174 (2014).
83. Smyth MJ., Hayakawa Y., Takeda K., et al. New aspects of natural-killer-cell surveillance and therapy of cancer. *Nat Rev Cancer* **2**: 850-861 (2002).

84. Speiser DE., Romero P. Molecularly defined vaccines for cancer immunotherapy, and protective T cell immunity. *Semin Immunol* **22**: 144-154 (2010).
85. Taneja P., Maglic D., Kai F., et al. Classical and novel prognostic markers for breast cancer and their clinical significance. *Clin Med Insights Oncol* **4**:15-34 (2010).
86. Tesniere A., Panaretakis T., Keep O., et al. Molecular characteristics of immunogenic cancer cell. *Cell Death Differ* **15**: 3-12 (2008).
87. Tobin GJ., Trujillo JD., Bushnell RV., et al. Deceptive imprinting and immune refocusing in vaccine design. *Vaccine* **26**:6189-199 (2008).
88. Vargo-Gogola T., Rosen JM. Modelling breast cancer: one size does not fit all. *Nat Rev Cancer* **7**:659-672 (2007).
89. von Minckwitz G., Eidtmann H., Rezai M., et al. Neoadjuvant chemotherapy and bevacizumab for HER2-negative breast cancer. *N Engl J Med* **366**: 299-309 (2012).
90. Vrbic S., Pejicic I., Filipovic S., et al. Current and future anti-HER2 therapy in breast cancer. *J Buon* **18**:4-16 (2013).
91. Wang ZK., Yang B., Liu H., et al. Regulatory T cells increase in breast cancer and in stage IV breast cancer. *Cancer Immunol Immunother* **61**:911-916 (2012).
92. Weinberg RA. How cancer arises. *Sci Am* **275**: 62-70 (1996).
93. Yaddanapudi K., Mitchell RA., Eaton JW. Cancer vaccines: Looking to the future. *Oncoimmunology* **2**: e23403-1-7 (2013).
94. Zardavas D., Baselga J., Piccart M. Emerging targeted agents in metastatic breast cancer. *Nat Rev Clin Oncol* **10**: 191-210 (2013).
95. Zhou J., Zhong Y. Breast cancer immunotherapy. *Cell Mol Immunol* **1**: 247-255 (2004).
96. Zitvogel L., Tesniere A., Kroemer G. Cancer despite immunosurveillance: immunoselection and immunosubversion. *Nat Rev Immunol* **6**: 715-727 (2006).