



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**  
**POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**  
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA  
BIOMEDICINA

**“Evaluación del efecto adyuvante antitumoral de  
la protoxina Cry1Ac en un modelo murino de  
cáncer de mama”**

**TESIS**

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:  
**MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

PRESENTA:

**Roberto Raúl Servin Garrido**

**Tutora principal: Dra. Leticia Moreno Fierros**  
Facultad de Estudios Superiores Iztacala, UNAM

**Comité tutor: Dr. Pedro Ulises Guadalupe Ostoa Saloma**  
Instituto de Investigaciones Biomedicas, UNAM

**Comité tutor: Dr. Luis Arturo Baiza Gutman**  
Facultad de Estudios Superiores Iztacala, UNAM

**Los Reyes, Iztacala, Estado de México, Junio. 2016**



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.





**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**  
**POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**  
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA  
BIOMEDICINA

**“Evaluación del efecto adyuvante antitumoral de  
la protoxina Cry1Ac en un modelo murino de  
cáncer de mama”**

**TESIS**

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:  
**MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

PRESENTA:

**Roberto Raúl Servin Garrido**

**Tutora principal: Dra. Leticia Moreno Fierros**  
Facultad de Estudios Superiores Iztacala, UNAM

**Comité tutor: Dr. Pedro Ulises Guadalupe Ostoa Saloma**  
Instituto de Investigaciones Biomedicas, UNAM

**Comité tutor: Dr. Luis Arturo Baiza Gutman**  
Facultad de Estudios Superiores Iztacala, UNAM



Dr. Isidro Ávila Martínez  
Director General de Administración Escolar, UNAM  
Presente

Me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día 15 de febrero de 2016, se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de **MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS** del alumno **SERVIN GARRIDO ROBERTO RAÚL**, con número de cuenta 305073886, con la tesis titulada **"EVALUACIÓN DEL EFECTO ADYUVANTE ANTITUMORAL DE LA PROTOXINA Cry1Ac EN UN MODELO MURINO DE CÁNCER DE MAMA."**, realizada bajo la dirección de la **DRA. LETICIA MORENO FIERROS**:

Presidente: DR. JOSÉ SULLIVAN LÓPEZ GONZÁLEZ  
Vocal: DR. EDELMIRO SANTIAGO OSORIO  
Secretario: DR. LUIS ARTURO BAIZA GUTMAN  
Suplente: DR. FELIPE VACA PANIAGUA  
Suplente: DR. PEDRO ULISES OSTOA SALOMA

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

ATENTAMENTE  
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"  
Cd. Universitaria, Cd. Mx., a 19 de mayo de 2016.

DRA. MARÍA DEL CORO ARIZMENDI ARRIAGA  
COORDINADORA DEL PROGRAMA



c.c.p. Expediente del (la) interesado (a)

## **AGRADECIMIENTOS**

Agradezco al Posgrado en Ciencias Biológicas de la UNAM por la oportunidad de cursar mis estudios de maestría en este posgrado, agradezco a todos los que me apoyaron y estuvieron dispuestos a orientarme de la mejor manera.

Durante la realización del presente trabajo de investigación se contó con el apoyo del programa de Becas para Estudios de Posgrado del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) con número (CVU/Becario): 545848/363147.

Este proyecto fue financiado gracias a los siguientes apoyos:

- UNAM-PAPIIT IN219416, IN219013
- CONACyT CB177612
- PAPCA-2014-11

A la Dra. Leticia Moreno Fierros por ser mi tutora de tesis, apoyarme y orientarme siempre.

Al Dr. Pedro Ulises Ostoa Saloma, al Dr. Luis Arturo Baiza Gutman por ser parte de mi comité tutor, por su apoyo y consejos para mejorar y llevar a cabo este proyecto. También quiero agradecer al Dr. Diego Julio Arenas Aranda quien fue parte de mi comité tutor y mi profesor durante mis estudios de licenciatura.

## **AGRADECIMIENTOS PERSONALES**

A la Dra. Leticia Moreno Fierros mi tutora de tesis, le agradezco por dejarme formar parte de su grupo de trabajo, por enseñarme y orientarme siempre. Me siento muy contento de estar en su laboratorio y llevar a cabo aquí mis estudios. Usted es mi ejemplo de superación, dedicación y gusto por la ciencia. Trabajar con usted me ha hecho aprender muchas cosas y crecer tanto como persona como profesional. Le agradezco por sus consejos y por la formación que me brinda a mí. Por enseñarme que cada obstáculo es una oportunidad para crecer. Gracias.

A Damaris quien me ayudo a realizar mis experimentos, por compartir sus conocimientos, por ayudarme y aconsejarme a mejorar en el trabajo de laboratorio, gracias güerita.

A mis compañeros de laboratorio con quien es muy agradable trabajar todos los días, aprendemos y nos ayudamos siempre. Agradezco su apoyo y el hacer del laboratorio un lugar agradable para trabajar.

A mis compañeros biólogos de la licenciatura, aunque ya no nos veamos seguido siguen siendo muy importantes para mí, agradecerles por las pláticas y consejos que me han regalado.

## **DEDICATORIAS**

Quiero dedicar esta tesis a mis padres quienes siempre me han apoyado en todos los aspectos, quienes me han formado como persona y son un ejemplo de responsabilidad, dedicación y amor. Les agradezco por sus consejos, por motivarme a seguir con mis estudios y por los buenos momentos que pasamos siempre. Te amo mamá, Te amo papá.

A mis hermanas a quienes amo y quiero mucho, espero esta tesis les sirva como motivación para saber que cualquier meta que ustedes se propongan se puede alcanzar.

A toda mi familia, tíos, tías y primos. Apoyarnos y querernos siempre para compartir buenos momentos como siempre los hemos vivido.



<b>ÍNDICE.....</b>	<b>1</b>
<b>Resumen.....</b>	<b>6</b>
<b>Abstract.....</b>	<b>8</b>
<b>Introducción.....</b>	<b>9</b>
Cáncer.....	9
Cáncer de mama.....	9
Sistema inmune frente a los tumores.....	9
Respuesta Inmune antitumoral.....	9
Inmunoedición del cáncer.....	10
Mecanismos de evasión al sistema inmune.....	10
Inmunoterapia.....	11
Inmunoterapia adyuvante.....	12
Protoxina y toxina Cry1Ac.....	13
<b>Justificación.....</b>	<b>15</b>
<b>Hipótesis.....</b>	<b>15</b>
<b>Objetivo general.....</b>	<b>15</b>
<b>Objetivos particulares.....</b>	<b>15</b>
<b>Metodología.....</b>	<b>16</b>
Ratones.....	16
Obtención y purificación de protoxina y toxina Cry1Ac.....	16
Cultivo línea celular 4T1.....	16
Lisado línea celular 4T1.....	17
Lisado tumoral.....	17
Esquemas de inmunización e inducción de tumores.....	17
Obtención de leucocitos de bazo.....	19
Ensayo de proliferación <i>in vitro</i> .....	20
Ensayo de producción de citocinas intracelulares.....	20
Detección de citocinas por ELISA.....	21
Análisis de citometría de flujo.....	22

Análisis estadístico.....	22
<b>Resultados.....</b>	<b>23</b>
Las proteínas Cry1Ac son adyuvantes en la inmunización con lisado celular 4T1 en un esquema corto de inmunización .....	23
Los linfocitos TCD4+ y TCD8+ en ratones protegidos no proliferan ante estímulo <i>in vitro</i> .....	24
La inmunización profiláctica con lisado celular 4T1 + protoxina Cry1Ac no cambia la proporción de leucocitos productores de TNF- $\alpha$ .....	25
La inmunización con lisado celular 4T1 + protoxina o toxina Cry1Ac mantiene la proporción de linfocitos TCD3+ y TCD8+ .....	26
Los ratones inmunizados con lisado celular 4T1 + las proteínas Cry1Ac no incrementaron células granulares en el bazo.....	28
Los ratones inmunizados con lisado celular 4T1 + protoxina Cry1Ac mantienen la misma proporción células Gr1+ y CD11b en proliferación que los ratones sanos.....	28
Efecto adyuvante antitumoral de la protoxina Cry1Ac en un esquema largo de inmunización profiláctica.....	31
La inmunización profiláctica de lisado celular 4T1 + protoxina Cry1Ac tiene proporción de linfocitos TCD3+ igual que los ratones sanos.....	32
Los ratones inmunizados con lisado celular 4T1 + protoxina Cry1Ac muestran una proporción de células granulares similar que los ratones sanos.....	33
La inmunización profiláctica de lisado celular 4T1 + protoxina Cry1Ac mantiene la proporción de células Gr1+ y CD11b+ similar a los ratones sanos .....	34
El estímulo <i>in vitro</i> con lisado celular 4T1 o lisado tumoral no induce proliferación en granulocitos y monocitos .....	35
La inmunización profiláctica de lisado celular 4T1 + protoxina Cry1Ac mantiene la proporción de MDSC .....	36

La inmunización profiláctica con los diferentes tratamientos no afecta la proporción de linfocitos TCD4, TCD8 y células granulares productoras de IFN- $\gamma$ y TNF- $\alpha$ .....	38
El estímulo <i>in vitro</i> con lisado tumoral induce la producción de IFN- $\gamma$ y TNF- $\alpha$ de ratones al emplear protoxina o toxina Cry1Ac como adyuvantes .....	39
<b>Discusión.....</b>	<b>40</b>
<b>Conclusiones.....</b>	<b>45</b>
Bibliografía.....	46
<b>Anexo I.....</b>	<b>51</b>
<b>Anexo II.....</b>	<b>54</b>

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Metodología experimental. Esquema de inmunización corto.....	23
<b>Figura 2.</b> Metodología experimental. Esquema de inmunización largo.....	24
<b>Figura 3.</b> Las proteínas Cry1Ac son adyuvantes en la inmunización con lisado celular 4T1 en un esquema corto de inmunización.....	28
<b>Figura 4.</b> Proporción de linfocitos TCD3+, TCD4+ y TCD8+ en bazo de ratones con tratamiento profiláctico.....	29
<b>Figura 5.</b> Proliferación in vitro de linfocitos TCD4+ y TCD8+.....	30
<b>Figura 6.</b> Proporción de linfocitos TCD4 y TCD8 productores de TNF- $\alpha$ .....	32
<b>Figura 7.</b> Proporción de células granulares en bazo de ratones con los diferentes tratamientos.....	33
<b>Figura 8.</b> Proliferación de granulocitos y monocitos de los diferentes tratamientos....	35
<b>Figura 9.</b> Efecto adyuvante antitumoral de la protoxina Cry1Ac en inmunización con lisado celular 4T1 con un esquema largo de inmunización.....	36
<b>Figura 10.</b> Proporción de linfocitos TCD3+ en bazo de ratones con tratamiento profiláctico.....	37
<b>Figura 11.</b> Proporción de células granulares de los diferentes tratamientos con estímulo y sin estímulo de lisado celular 4T1.....	38
<b>Figura 12.</b> Proporción de células granulares en bazo de ratones con los diferentes tratamientos.....	40
<b>Figura 13.</b> Proliferación de granulocitos y monocitos de los diferentes grupos de ratones tratados.....	41
<b>Figura 14.</b> Proporción y proliferación de MDSC de los diferentes grupos de ratones tratados.....	42
<b>Figura 15.</b> Proporción de células granulares y de linfocitos TCD4+ y TCD8+ productores de IFN- $\gamma$ y TNF- $\alpha$ .....	43
<b>Figura 16.</b> Producción de INF- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-10 e IL-6 en sobrenadante de leucocitos de bazo de los diferentes grupos de ratones inmunizados.....	44

## LISTA DE ABREVIATURAS

<b>ABTS</b>	2,2-bis-azino (ácido 3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico)
<b>APC</b>	Célula presentadora de antígeno
<b>BSA</b>	Albúmina sérica bovina
<b>CFSE</b>	Carboxifloresceína
<b>COX<sub>2</sub></b>	Ciclooxigenasa 2
<b>DC</b>	Célula dendrítica
<b>DTT</b>	Ditiotreitol
<b><i>E. coli</i></b>	<i>Escherichia coli</i>
<b>EDTA</b>	Acido etilendiaminotetra acético
<b>ELISA</b>	Ensayo por inmuno-adsorción ligado a enzimas
<b>HER2</b>	Receptor 2 de factor de crecimiento epidérmico humano
<b>IL-</b>	Interleucina
<b>i.p.</b>	Intra-peritoneal
<b>IFN-<math>\gamma</math></b>	Interferón gama
<b>LPS</b>	Lipopolisacárido
<b>MCP-1</b>	Proteína quimio atrayente de macrófagos-1
<b>MDSC</b>	Células supresoras derivadas mieloides
<b>MHC</b>	Complejo mayor de histocompatibilidad
<b>MUC-1</b>	Mucina 1
<b>NaCl</b>	Cloruro de sodio
<b>NF<math>\kappa</math><math>\beta</math></b>	Factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas
<b>NK</b>	Células naturales asesinas
<b>NO</b>	Óxido nítrico
<b>PBA</b>	Amortiguador de fosfatos con azida de sodio
<b>PBS</b>	Solución salina amortiguada con fosfatos
<b>PBS-tween</b>	PBS-Tween20
<b>pCry</b>	Protoxina Cry1Ac
<b>PHMB</b>	Inhibidor de proteasas p-hidroxibenzoato de mercurio
<b>PGE<sub>2</sub></b>	Prostaglandina E2
<b>ROS</b>	Especies reactivas de oxígeno
<b>Rpm</b>	Revoluciones por minuto
<b>SFB</b>	Suero fetal bovino
<b>TAA's</b>	Antígenos asociados a tumor
<b>TCR</b>	Receptor de células T
<b>tCry</b>	Toxina Cry1Ac
<b>TLR</b>	Receptor tipo toll
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	Factor necrótico tumoral

## Resumen

La protoxina y toxina Cry1Ac son 2 formas de una proteína producidas por *Bacillus thuringiensis*. La protoxina Cry1Ac es un potente inmunógeno y un potente adyuvante sistémico y de mucosas. Tiene efecto adyuvante protector contra tres modelos de infecciones parasitarias. El mecanismo por el que la protoxina tiene efectos adyuvantes es debido a la capacidad de inducir sobre-expresión de moléculas coestimuladoras (CD80 y CD86) y la inducción de citocinas pro-inflamatorias (IL-6, INF- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  y MCP-1). El efecto adyuvante protector de la protoxina y toxina Cry1Ac podría expandirse a otras patologías no infecciosas como el cáncer. Debido a que la protoxina y la toxina Cry1Ac tienen la capacidad de activar células de inmunidad innata induciendo la producción de citocinas, podrían favorecer una respuesta anti-tumoral. Para evaluar el efecto adyuvante anti-tumoral de la protoxina y toxina Cry1Ac, utilizamos un modelo murino de cáncer de mama con la línea tumoral 4T1. Inmunizamos ratones BALB/c con lisado de la línea celular 4T1 + protoxina o toxina Cry1Ac por vía i.p. Se utilizaron dos diferentes esquemas de inmunización, el primero, un esquema corto, con 3 inmunizaciones profilácticas cada 3<sup>er</sup> día; y el segundo, un esquema largo, con 3 inmunizaciones profilácticas cada 7<sup>mo</sup> día. Posteriormente inducimos los tumores en los ratones inmunizados mediante la inoculación de la línea tumoral 4T1. Observamos que la inmunización profiláctica de lisado celular 4T1 + protoxina Cry1Ac tuvo efecto adyuvante anti-tumoral; ya que los ratones que recibieron el esquema largo de inmunización, se protegieron completamente al desarrollo de tumores, mientras que los ratones que recibieron el esquema corto de inmunización, desarrollaron tumores de menor tamaño, mostraron mayor supervivencia (80%) y mayor porcentaje de ratones libres de tumor (70%), en comparación a los grupos control (PBS y lisado celular 4T1). Evaluamos la respuesta celular *in vitro* de leucocitos de bazo en los ratones con los diferentes tratamientos, ante el estímulo con lisado celular 4T1 y lisado tumoral. Los ratones inmunizados con lisado celular 4T1 + protoxina Cry1Ac, que no desarrollaron tumores mantuvieron la proporción normal de linfocitos TCD3+ (34.3%), TCD8+ (20.7%) y una baja proporción de células supresoras derivadas mieloides (MDSC), al igual que los ratones sanos (7.5% y 6.1% respectivamente), mientras que los ratones que desarrollaron tumores mostraban una disminución en la proporción de linfocitos TCD3+ (15.1% PBS y 13.8% lisado), TCD8+ (15% PBS y 15.3% lisado) y un incremento marcado de MDSC (53.4% PBS y 25.6% lisado). Por otro lado, el tratamiento profiláctico de la inmunización con lisado celular 4T1 + toxina Cry1Ac solo tuvo efecto antitumoral en el esquema corto de inmunización. El efecto antitumoral podría deberse al efecto adyuvante de las proteínas Cry1Ac que posiblemente contribuyó a que no se incrementaran las células MDSC que contribuyen de forma importante al desarrollo tumoral. Sin embargo faltan estudios para identificar

cual fue el mecanismo por el cual protoxina y toxina Cry1Ac tuvieron efecto adyuvante a la inmunización con lisado celular 4T1, generando protección o retraso en la aparición de tumores.

## ABSTRACT

Cry1Ac protoxin and toxin are two forms of a protein produced by *Bacillus thuringiensis*. The Cry1Ac protoxin is a potent immunogen and potent adjuvant systemic and mucosal. It has adjuvant protective effect against three models of parasitic infections. The mechanism by which we suggest that the protoxin Cry1Ac has adjuvant effect is the increased expression of coestimulatory molecules (CD80 and CD86) and induction of pro-inflammatory cytokines (IL-6, INF- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  y MCP-1) in macrophages. The protective effect and adjuvant action of protoxina and toxin Cry1Ac could be expanded to other non-infectious disease such as cancer; because their ability to activate cells of innate immunity by inducing production of cytokines, could promote anti-tumor response. To evaluate the anti-tumor effect of protoxina and toxin Cry1Ac, we used a mouse model of breast cancer with 4T1 tumor line. We immunized BALB/c mice with 4T1 cell lysate + Cry1Ac protoxin or toxin by i.p. We used two different immunization schedules, the first, a short schedule with 3 prophylactic immunizations every 3<sup>er</sup>d day; and second, a long schedule with 3 prophylactic immunizations every 7<sup>th</sup> day. Subsequently, we induce tumors in immunized mice by inoculation of 4T1 cells. The cells lysate 4T1 + Cry1Ac protoxin as a prophylactic treatment, had anti-tumor adjuvant effect, because mice receiving long immunization schedule, were completely protected to tumors, while the mice that received the short immunization schedule developed smaller tumors, with greater survival rate (80%) and higher percentage of tumor free mice (70%) compared to the control group (PBS and 4T1 cell lysate). We evaluate the cellular response in leukocytes from spleens of mice with different treatments, stimulating with cell lysate 4T1 and tumor lysate. Mice immunized with cell lysate 4T1 + protoxina Cry1Ac, who did not develop tumors, maintained the normal ratio of TCD3+ lymphocytes (34.3%), TCD8+ (20.7%) and a low proportion of myeloid derived suppressor cells (MDSC), while mice that developed tumor showed a decrease in the proportion of lymphocytes TCD3+ (15.1% PBS and 13.8% cell lysate 4T1), TCD8+ (15% PBS and 15.3% cell lysate 4T1) and a marked increase in MDSC (53.4% PBS and 25.6% cell lysate 4T1). Moreover, immunization with cell lysate 4T1 + toxin Cry1Ac only had antitumor adjuvant effect in the short immunization schedule. The cell lysate 4T1 + Cry1Ac protoxin or toxin had an adjuvant antitumor effect in this mouse model of breast cancer with 4T1 tumor cells. The antitumor effect could be due to a cellular immune response that may to prevent the increased of MDSC cells that contribute significantly to tumor development. However missing studies to identify the mechanism by which Cry1Ac protoxin and toxin adjuvant effect had to immunization with 4T1 cell lysate, generating protection or delayed onset of breast cancer tumors.



## **INTRODUCCIÓN**

### **CÁNCER**

El cáncer, hace referencia a un conjunto de enfermedades, que son originadas a partir del crecimiento descontrolado de células anormales, las cuales pueden ser definidas por sus capacidades para mantener señales proliferativas, resistencia a la muerte celular, capacidad de inducir angiogénesis, inmortalidad replicativa, invasión activa, habilidad para evitar la destrucción inmune, potencial para inducir inflamación crónica y metástasis(1).

### **CÁNCER DE MAMA**

El cáncer de mama es el segundo tipo de cáncer más común a nivel mundial, y el primero con mayor incidencia en mujeres; se presenta en países desarrollados y en vías de desarrollo y representa el 16% de todos los cánceres en mujeres (2). En México, desde el 2006 el cáncer de mama es la segunda causa de muerte en mujeres de entre 30 y 54 años (3). Los registros epidemiológicos muestran que el número de casos nuevos reportados de cáncer mamario van en aumento, así como la tasa de mortalidad, convirtiendo al cáncer de mama en un problema de salud pública en nuestro país (4).

### **SISTEMA INMUNE FRENTE A TUMORES**

El papel del sistema inmune, reconociendo y controlando el crecimiento de los tumores, está ampliamente establecido. En pacientes con cáncer y en modelos de ratón, el sistema inmune reconoce y elimina células malignas transformadas; sin embargo, también el sistema inmune puede promover el crecimiento de los tumores mediante la inflamación crónica, disminución de la inmunogenicidad tumoral y disminuyendo la inmunidad antitumoral. La presión selectiva inmunológica y los mecanismos de evasión al sistema inmune por parte de las células tumorales, lleva como consecuencia selección de clones tumorales resistentes a su eliminación por el sistema inmune (5).

### **RESPUESTA INMUNE ANTITUMORAL**

Diversos estudios de la interacción del sistema inmune y el cáncer han revelado que la inmunidad innata y adaptativa participan en el reconocimiento y eliminación de las células tumorales. Las primeras células transformadas son detectadas por células naturales asesinas (NK) a través del encuentro con ligandos específicos de células tumorales. Esto lleva a la destrucción de algunas células, lo cual lleva a la captación y procesamiento de antígenos del tumor por macrófagos y células dendríticas (DC). Posteriormente esos macrófagos y DC secretan citocinas pro-inflamatorias, como TNF- $\alpha$ ,

el cual actúa directamente con células tumorales, evitando el crecimiento de los tumores, los macrófagos y DC activadas también presentan antígenos tumorales a linfocitos T y B. La activación de linfocitos T promueven la generación y expansión de linfocitos TCD4 y TCD8 específicos del tumor, y lleva a la producción de citocinas como IFN- $\gamma$ , el cual es un potente regulador de células efectoras que están involucradas en la respuesta inmune antitumoral (6-8).

### **INMUNOEDICIÓN DEL CÁNCER**

El sistema inmune tiene la capacidad de reconocer y eliminar células tumorales, sin embargo, también ejerce una presión selectiva en las células tumorales, generando células tumorales menos inmunogénicas, pasando desapercibidas al reconocimiento y eliminación por el sistema inmune. Este doble papel del sistema inmune suprimiendo o promoviendo el crecimiento tumoral es llamado inmunoedición del cáncer. El proceso de la inmunoedición es un proceso dinámico que consiste en tres fases: eliminación, equilibrio y escape. En la fase de eliminación las células transformadas en estadios tempranos son removidas directamente o indirectamente por el sistema inmune. La fase de equilibrio, se refiere a un periodo de incompleta destrucción del tumor por parte del sistema inmune, y la fase de escape, donde los tumores son clínicamente detectados, se refiere al crecimiento de las células tumorales, las cuales sobrevivieron a la eliminación por parte del sistema inmune, debido a la presión selectiva del mismo y/o al incremento de la inmunosupresión inducida por el tumor (9).

### **MECANISMOS DE EVASIÓN AL SISTEMA INMUNE**

Las células tumorales tienen múltiples mecanismos para evadir el reconocimiento del sistema inmune. Algunos de estos mecanismos incluyen la alteración en componentes de la maquinaria de la presentación de antígeno, defectos en la señalización de TCR (receptor de célula T), secreción de factores inmunosupresores o pro-apoptóticos, inducción de vías regulatorias negativas, y el reclutamiento específico de poblaciones celulares reguladoras (10-12). Uno de los mecanismos más estudiados por los cuales las células tumorales evitan el reconocimiento del sistema inmune, son deficiencias en la presentación de antígeno. Las DC son muy importantes para la generación y mantenimiento de la respuesta inmune antitumoral (13). Las células dendríticas activadas expresan moléculas que intervienen en la co-estimulación de linfocitos T, como CD80, CD86 y CD40; la interacción con sus respectivos ligandos es decisiva en la maduración de DC, la activación de linfocitos T y dirigir respuesta específica hacia Th1 (11). En cáncer de mama, las DC tienen disminución en la expresión de CD80 y CD86 (14), lo que dificulta la respuesta antitumoral y favorece el crecimiento del tumor.

## INMUNOTERAPIA

Las terapias más comunes contra el cáncer son la cirugía, quimioterapia y radioterapia, sin embargo, estas estrategias tienen dos grandes limitantes: su falta de especificidad y/o su ineficiencia para el control de la enfermedad mínima residual (15). Debido a la evidencia que apoya que el sistema inmune juega un papel fundamental en la vigilancia y destrucción de células malignas y que evita la formación de tumores, se ha propuesto como una alternativa a la quimioterapia, pero como se mencionó anteriormente las células cancerosas también cuentan con diversos mecanismos para evadir al sistema inmune. Los avances en el conocimiento de la biología de las células tumorales, así como algunos mecanismos de evasión a la respuesta inmune han permitido la implementación de algunos tratamientos basados en inmunoterapia en los pacientes o a nivel experimental (16). En gran medida las estrategias exploradas se han centrado en el desarrollo de inmunoterapias dirigidas a antígenos asociados a tumores (TAA's) como blancos terapéuticos para eliminar a las células cancerosas, ya sea por estrategias de inmunidad pasiva (administración de anticuerpos monoclonales contra TAAs) o inmunidad activa (activación de linfocitos T, B o células dendríticas *ex vivo*) mediante inmunógenos específicos seguido de la transferencia de células al paciente (16).

En los pacientes con cáncer de mama, la inmunoterapia pasiva es la más utilizada, en la cual se administran anticuerpos monoclonales dirigidos hacia antígenos tumorales identificados. La evidencia más clara de la efectividad de la inmunoterapia pasiva en cáncer de mama fue el desarrollo de un anticuerpo monoclonal dirigido hacia HER2, un receptor con actividad tirosina-cinasa (17). Sin embargo, esta terapia se aplica solo a un tercio de los pacientes con cáncer de mama que son HER2 positivos.

Para inducir inmunidad antitumoral activa, se han desarrollado vacunas dirigidas a antígenos sobreexpresados o alterados en los tumores, pero no en las células normales. La mayoría de estas vacunas son diseñadas para activar linfocitos TCD8+ mediante el uso de epítopos de antígenos tumorales que son péptidos pequeños que se unen a moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) de clase I (19). Una de las estrategias efectivas de inmunoterapia antitumoral que también se ha utilizado hacia otros tipos de tumores es la basada en el uso de DC autólogas. Ésta consiste en obtener células dendríticas del paciente, madurarlas, ponerlas en contacto con péptidos de antígenos tumorales, y posteriormente son regresadas al paciente (20). Para la activación *in vivo* e *in vitro* se han evaluado diversos activadores de DC, también se ha evaluado el bloqueo de vías de regulación de la respuesta inmune por ejemplo la administración de anticuerpos monoclonales contra CTLA-4 (antígeno 4 del linfocito citotóxico), PD1

(proteína de muerte celular programada 1). Sin embargo, algunas de estas vacunas ofrecen una respuesta de corta duración y deficiente respuesta de linfocitos T, y generalmente son combinadas con adyuvantes, para mejorar la presentación de antígeno, además estas estrategias necesitan de alta tecnología, logística y no son accesibles a todos los pacientes con cáncer.

Otra estrategia que se ha utilizado en la inmunoterapia contra el cáncer, es el uso de adyuvantes, los cuales se basan en activar la inmunidad innata y mejorar la presentación de antígeno en presencia de señales coestimuladoras. Se han administrado solos, directamente en los tumores o combinados con algunas vacunas como lisados o péptidos tumorales. Sin embargo los adyuvantes clásicos como el hidróxido de aluminio o emulsiones de agua con aceite, inducen respuestas Th2 pero no han sido efectivos para producir una fuerte respuesta de tipo Th1 requerido para la eliminación de tumores (21-22). En la siguiente sección se detalla el uso de adyuvantes en terapia antitumoral.

## **INMUNOTERAPIA ADYUVANTE**

Los adyuvantes son componentes esenciales en la inmunoterapia; ya que incrementan la eficacia, mediante el mejoramiento de la respuesta inmune específica hacia los antígenos. Sin embargo, el diseño de un adyuvante efectivo no es simple, debido a la complejidad y dificultad en las características de un buen adyuvante, el cual debe ser seguro, potente y de bajos costos de producción (23). Los adyuvantes en inmunoterapia contra el cáncer son agentes no específicos que se utilizan para mejorar la respuesta inmune, ayudando a eliminar células tumorales. Entre los adyuvantes estudiados que promueven una respuesta inmune hacia antígenos tumorales, se encuentra el lípido A, una porción biológicamente activa de lipopolisacárido (LPS), siendo el receptor de tipo toll (TLR-4) el que inicia la señalización de los efectos del lípido A. Al ser activados los receptores de TLR's, se llevan a cabo vías de señalización a través del factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas (NF-κB), llevando a la producción de citocinas pro-inflamatorias e interferones de tipo I, los cuales a su vez inducen la expresión de moléculas coestimuladoras en DC y macrófagos, necesarias para una eficiente presentación de antígeno. Otro agonista de TLR's que se ha estudiado en la inmunoterapia del cáncer, es el CpG, un agonista de TLR9, el cual estimula células de la inmunidad innata, entre ellas células NK, además de llevar a una inmunidad adaptativa específica de tumor (23). Baines y colaboradores en un modelo murino de cáncer de cérvix, encontró que la sola administración repetida de CpG a través de la vía s.c. indujo un efecto antitumoral, disminuyendo el tamaño de los tumores e incrementando la supervivencia de los ratones (24-25). También se han utilizado agonistas

de TLR-3 (poli I:C), agonista de TLR-5 (flagelina), agonista de TLR-7 (Imiquimod), etc. Sin embargo los agonistas de TLR's directa o indirectamente, a través de la activación de células de la inmunidad innata, pueden inducir diferenciación, proliferación o activación de linfocitos T reguladores (Treg) (26-28), quienes favorecen el crecimiento del tumor. Además el uso crónico de ligandos de TLR puede llevar a enfermedades inflamatorias crónicas, que se encuentran íntimamente relacionadas al cáncer (29)

Aunque el uso de agonistas de TLR's ha mostrado resultados prometedores en la inmunoterapia adyuvante contra el cáncer, su aplicación en la clínica es limitada, debido al potencial riesgo que podrían tener. Por lo tanto es importante encontrar nuevos adyuvantes, que sean seguros en su aplicación, y que ofrezcan buena respuesta adyuvante antitumoral.

### **PROTOXINA Y TOXINA CRY1AC**

La protoxina Cry1Ac es una proteína producida por *Bacillus thuringiensis* en su fase de esporulación, tiene un peso de 130 kDa, al ser procesada proteolíticamente se obtiene la toxina Cry1Ac, con un peso de 65 kDa. Estas proteínas son estables a pH alcalinos, la toxina tiene alta resistencia a la proteólisis, no son tóxicas para vertebrados y tiene bajos costos de producción. En nuestro grupo de investigación se ha demostrado que la protoxina Cry1Ac es un potente inmunógeno. También se ha demostrado que tiene efecto adyuvante protector empleando tres modelos de infecciones parasitarias (30-32) y que es un potente adyuvante sistémico y mucoso (32-33). Además la protoxina tiene un efecto adyuvante protector en el modelo de brucelosis murina, en el cual se observó proliferación de linfocitos citotóxicos TCD8+ (32). La toxina Cry1Ac, es también inmunogénica (36) y ha sido utilizada como bioinsecticida expresada en plantas transgénicas. El mecanismo por el que sugerimos que la protoxina y toxina Cry1Ac tienen efecto adyuvante, es por su capacidad de activar células presentadoras de antígeno, en macrófagos la protoxina y toxina Cry1Ac incrementan la expresión de moléculas coestimuladoras (CD80 y CD86) e induce la producción de citocinas pro-inflamatorias, especialmente IL-6, TNF- $\alpha$  y MCP-1. Estos efectos fueron evaluados en estudios *in vitro* e *in vivo* en ratones inmunizados por las vías intraperitoneal e intranasal en macrófagos de mucosas aislados de diferentes sitios (35). En virtud de que la administración de la protoxina y toxina Cry1Ac tienen la capacidad de activar células presentadoras de antígeno, que tiene efectos adyuvantes protectores en diferentes tipos de infección y que estos efectos pueden también incrementar las respuestas inmunes celulares de linfocitos CD8, consideramos que el efecto adyuvante de la protoxina y toxina Cry1Ac podría

expandirse a otras patologías no infecciosas como el cáncer, que representa un problema importante de salud para la población a nivel nacional y/o mundial.

En este contexto, si la adición de algunos agonistas de TLR's puede llevar a efectos adyuvantes que inducen inmunidad antitumoral, de forma análoga la protoxina y la toxina Cry1Ac tienen la capacidad de activar células presentadoras de antígeno incrementando la expresión de moléculas coestimuladoras e inducir la producción de citocinas, lo que podría favorecer la inducción de inmunidad antitumoral si es usado como adyuvante.

## **JUSTIFICACIÓN**

Es de vital importancia encontrar nuevos adyuvantes que tengan la capacidad de activar la respuesta inmune específica de tumor, que no sean tóxicos y sean seguros en su aplicación.

## **HIPÓTESIS**

La protoxina y toxina Cry1Ac tienen efecto adyuvante antitumoral en la inmunización con lisado celular 4T1 en un modelo murino de cáncer de mama.

## **OBJETIVO GENERAL**

- Evaluar el efecto adyuvante antitumoral de la protoxina y toxina Cry1Ac en un modelo de cáncer de mama en ratones BALB/c.

## **OBJETIVOS PARTICULARES**

Evaluar si el tratamiento profiláctico con la inmunización de lisado celular 4T1 + protoxina o toxina Cry1Ac inhibe el crecimiento de los tumores inducidos con la línea tumoral 4T1, evaluando los siguientes parámetros:

- ✓ Monitorear el crecimiento de los tumores (cada 3<sup>er</sup> día) hasta el día 40.
- ✓ Evaluar la proliferación *in vitro* de leucocitos totales de bazo ante el estímulo de lisado de línea celular 4T1 y lisados de tumor al día 40.
- ✓ Evaluar la producción intracelular de citocinas en células de bazo (IFN- $\gamma$  y TNF- $\alpha$ ).
- ✓ Evaluar las citocinas en sobrenadante de cultivo de células de bazo (IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-6 e IL-10).

## **METODOLOGÍA**

### **Ratones**

Se utilizaron ratones hembra BALB/c (6-8 semanas de edad), proporcionadas por el bioterio de la FES Iztacala, el protocolo tiene la aprobación del comité de bioseguridad de la FES Iztacala. Los ratones se mantuvieron con agua y alimento *ad libitum*.

### **Obtención y purificación de protoxina y toxina Cry1Ac**

Se utilizó la cepa recombinante de *E. coli* que contiene un plásmido con el gen que codifica la protoxina Cry1Ac. Las bacterias se cultivaron en medio "Luria Broth" (US Biological Swampscott, MA 01907) y se adicionó ampicilina (100 µg/mL). Posteriormente se incubó a 37 °C por 48 h a 300 rpm en agitación constante. Para la cosecha de las bacterias se centrifugó a 10,000 rpm a 4 °C por 15 min, las bacterias se lavaron dos veces con amortiguador TE (Tris-HCl 0.05 M, EDTA 1mM, pH 8.0). Posteriormente las bacterias fueron lisadas incubándolas a 37 °C durante 1 h con 20 mg/mL de lisozima + sacarosa al 15%. Posteriormente se sonicaron durante ciclos de 5 min cada uno, a una amplitud de 100 Htz. Los cuerpos de inclusión se recuperaron por centrifugación a 10,000 rpm a 4 °C por 10 min, al término, la pastilla se lavó 5 veces con 50 mL de NaCl 0.5 M más Tritón X-100 al 1%, sonicando entre cada lavado. Se realizó otra centrifugación bajo las mismas condiciones para re-suspender la pastilla en 30 mL de agua bidestilada a 4 °C. Una vez más se centrifugó a 10,000 rpm por 15 min a 4 °C y se solubilizó la pastilla en 10 mL de amortiguador de carbonatos (Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 0.1M, pH 9.6, más 10 mM de DTT) por 30 min a 37 °C en agitación a 300 rpm. La protoxina Cry1Ac solubilizada se obtuvo por centrifugación a 10,000 rpm 4 °C por 15 min, mediante la recuperación del sobrenadante. Los restos de endotoxinas se eliminaron purificando la proteína empleando una columna de polimixina (BioRad Lab, CA) y se verificó la ausencia de LPS. Finalmente la concentración de proteínas se determinó por el método de Bradford y la pureza mediante electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE). El manejo de las bacterias se realizó cumpliendo el reglamento de Bioseguridad de la UNAM-FES Iztacala.

### **Cultivo línea celular 4T1**

La línea celular 4T1, derivada de un carcinoma mamario de ratón BALB/c, fue donada por el Dr. Pedro Ostoa, del departamento de inmunología, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Ciudad Universitaria. La células fueron cultivadas en medio RPMI-1640 suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB) a 37 °C y 5% CO<sub>2</sub> en placas de cultivo de 75 cm<sup>2</sup>.



### **Lisado celular 4T1**

Las células 4T1 en cultivo a confluencia del 90%, fueron tratadas con 7 mL de verseno e incubadas durante 10 min a 37 °C para su desprendimiento, las células 4T1 se lavaron 2 veces con 6 mL de medio RPMI-1640 y 3 veces con 7 mL de PBS estéril. Posterior a los lavados se hizo una relación 5x del volumen de la pastilla celular y se agregó inhibidor de proteasas (PHMB) y PBS estéril, es importante el manejo de las células en frío y en condiciones de esterilidad. Después se sonicó la pastilla celular 4 veces durante 7 seg con intervalos de 20 seg. Ya que se obtuvo lisis completa de las células, se hicieron alícuotas que fueron almacenadas a -80 °C.

### **Lisado tumoral**

Se obtuvieron tumores de ratones inducidos por la línea tumoral 4T1 (tumores 16-18 mm<sup>2</sup>), el procedimiento se llevó a cabo en condiciones de esterilidad y frío. Se maceró el tumor, utilizando un filtro y émbolo para deshacer el tejido obteniendo las células en una caja petri, se hizo un lavado con 8 ml de RPMI y 4 lavados 8 ml PBS estéril. Posterior a los lavados se hace una relación del volumen de la pastilla celular y se agrega inhibidor de proteasas (PHMB) y PBS estéril, después se sónica la pastilla celular 4 veces durante 7 seg con intervalos de 20 seg. Ya que se obtuvo lisis completa de las células, se hicieron alícuotas que fueron almacenadas a -80 °C.

### **Esquemas de inmunización e inducción de tumores**

En este proyecto nos enfocamos en evaluar el efecto adyuvante antitumoral *in vivo* de la protoxina y toxina Cry1Ac coadministrada con lisados de células 4T1 utilizando un tratamiento profiláctico en un modelo murino de cáncer de mama inducido mediante la inoculación de la línea celular 4T1 (37). En el estudio utilizamos dos protocolos de inmunización, uno corto y uno largo. El protocolo corto de inmunización consistió de tres inmunizaciones profilácticas vía i. p. (intraperitoneal) con protoxina Cry1Ac + lisado de células 4T1 ó toxina Cry1Ac + lisado de células 4T1, se aplicó una inmunización cada 3<sup>er</sup> día, tres días posteriores a la última inmunización se inocularon  $1 \times 10^3$  células 4T1 vía s.c. (sub-cutánea) en una de las mamas de las ratonas BALB/c de 8 semanas de edad (Fig. 1). El segundo protocolo, un esquema de inmunización largo, con tres inmunizaciones cada 7<sup>mo</sup> día, se inocularon las células tumorales 4T1 7 días después de la última inmunización (Fig. 2). En las ratonas de ambos esquemas, los tumores fueron medidos cada 3er día con un vernier y los valores del tamaño tumoral fueron obtenidos mediante la fórmula  $L \times A$  (L=largo x A=ancho) (37). Todos los ratones fueron sacrificados 40 días después de la inoculación de células 4T1. Para ambos protocolos se conformaron

los siguientes grupos de ratonas inoculadas con línea tumoral 4T1 y se incluyó un grupo de ratonas sanas:

- 1) PBS (ratones no inmunizados, sólo inducción de tumor).
- 2) Inmunizadas con lisado de línea celular 4T1 (3 dosis de 50 µg vía i.p).
- 3) Inmunizadas con lisado de línea celular 4T1 (3 dosis de 50 µg + PCry1Ac 50 µg vía i.p.)
- 4) Inmunizadas con lisado de línea celular 4T1 (3 dosis de 50 µg + TCry1Ac 50 µg vía i.p.)
- 5) Control sano (ratones no inmunizados y sin inducción del tumor).

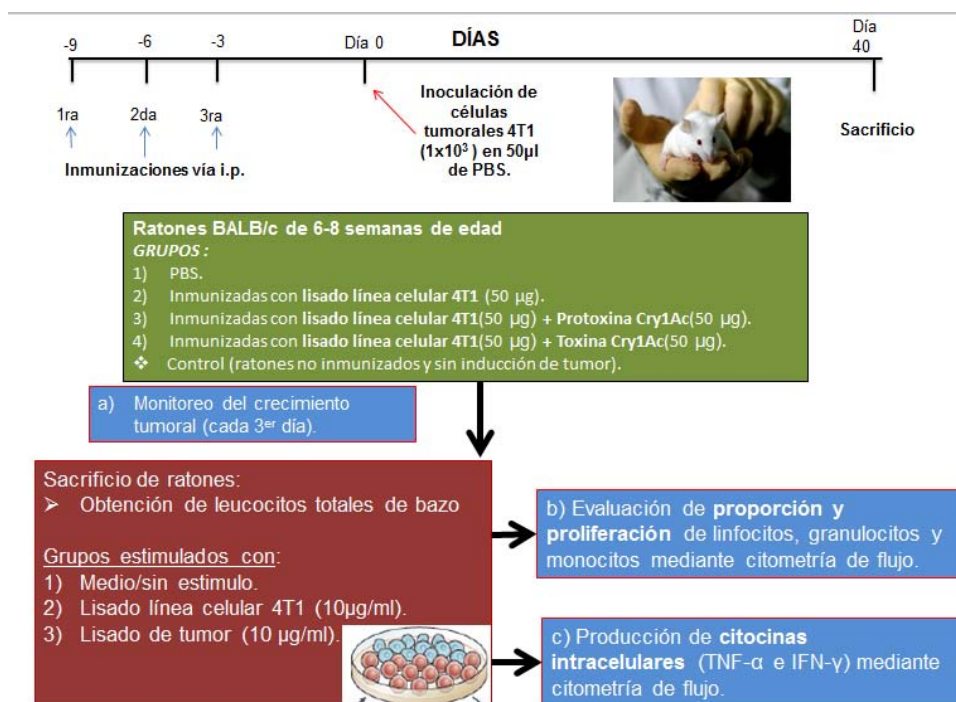


Figura 1. Metodología experimental. Esquema de inmunización corto. Los ratones fueron inmunizados vía i. p. (3 dosis) con protoxina Cry1Ac + lisado de células 4T1 o con toxina Cry1Ac + lisado de células 4T1. Se indujeron los tumores mediante inoculación de la línea celular 4T1 (1 x10<sup>3</sup> células vía s.c.) en ratonas BALB/c de 8 semanas de edad. Después de 40 días los ratones fueron sacrificados y se obtuvieron células de bazo. Se realizaron ensayos de Proliferación y producción de citocinas (INF-γ y TNF-α) empleando citometria de flujo.

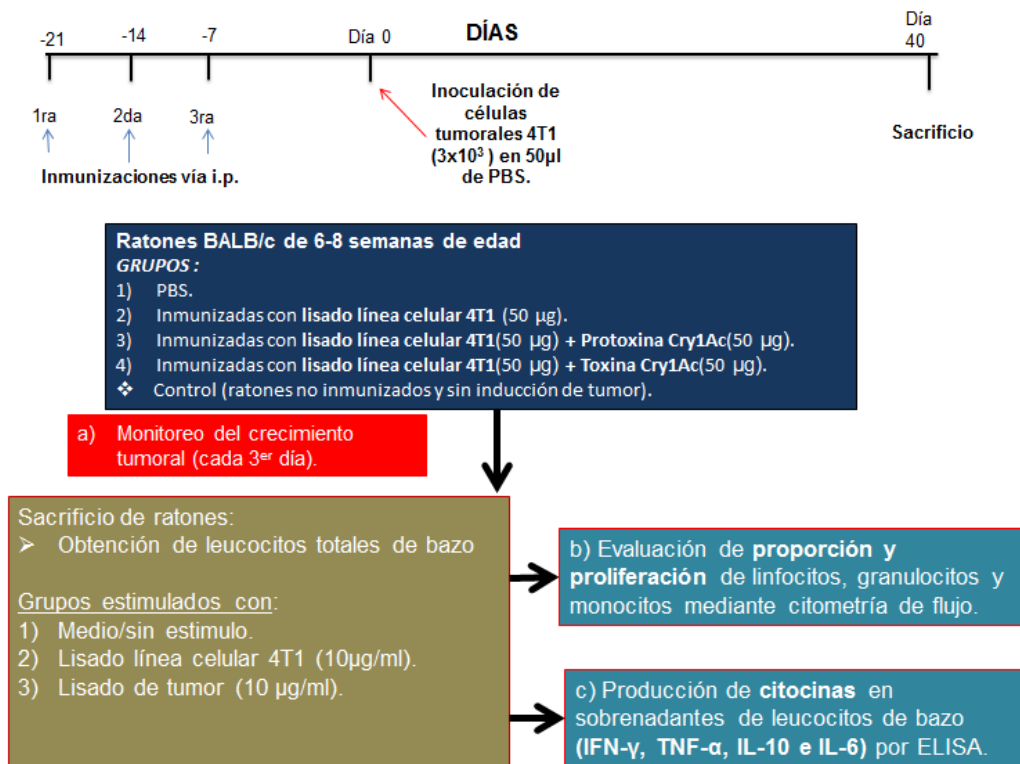


Figura 2. Metodología experimental. Esquema de inmunización largo. Los ratones fueron inmunizados vía i. p. (3 dosis) con protóxina Cry1Ac + lisado de células 4T1 o con toxina Cry1Ac + lisado de células 4T1 cada 7<sup>mo</sup> día. Se indujeron los tumores mediante la inoculación de la línea celular 4T1 ( $1 \times 10^3$  células vía s.c.) en ratonas BALB/c de 8 semanas de edad. Después de 40 días los ratones fueron sacrificados y se obtuvieron células de bazo. Se realizaron ensayos de proliferación y se evaluó la producción de citocinas (INF- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-10 e IL-16) en los sobrenadantes de leucocitos de bazo empleando el método de ELISA.

### Obtención de leucocitos de bazo

40 días posteriores a la inoculación de los tumores, los ratones fueron sacrificados, y se obtuvieron células de bazo, todo en condiciones de esterilidad. Los bazos fueron disgregados sobre un filtro de tela de organza y fueron filtrados, las células fueron recuperadas y llevadas a un volumen de 8 mL en tubos Corning de 15 mL, centrifugadas a 1500 rpm durante 10 min a 4 °C. Posteriormente se decantó el sobrenadante y se agregaron de 3 a 7 mL de búfer de lisis (dependiendo el tamaño de la pastilla celular) a las células, se re-suspendieron y se dejaron incubar 7 min en frío. Después se lavaron con 10 mL de PBS frío y centrifugadas a 1500 rpm, 10 min a 4 °C, después se agregó 5 mL de medio RPMI y las células fueron nuevamente filtradas con tela de organza y centrifugadas a 1500 rpm, 10 min a 4 °C, posteriormente se llevan los tubos con la pastilla celular a un volumen de 6 ml de medio RPMI para su conteo.

### **Ensayo de proliferación**

Después del conteo celular, se colocaron  $4 \times 10^7$  células provenientes de los bazos de los ratones con los tratamientos antes indicados, en 2 mL de medio RPMI en tubos Corning de 15 mL, y se centrifugaron a 1500 rpm, 10 min a 4 °C, después se decantó el sobrenadante y agregamos 1 mL de medio RPMI-1640 a la pastilla celular, las células se tiñeron con carboxifluoresceína (CFSE) 5 mM y los tubos fueron re-suspendidos rápidamente con vórtex e incubados durante 5 min. Después de la incubación las células fueron lavadas con 12 mL de PBS 1x y 5% SFB frío, centrifugadas a 1500 rpm, 10 min a 4 °C. La pastilla celular se lavó 3 veces más con 30 mL (c/lavado) de PBS 1x y 5% SFB en tubos Corning de 50 mL. Posterior a los lavados la pastilla se pasó a un tubo Corning de 15 mL en 3 mL de medio RPMI-1640 y se cultivaron  $4 \times 10^6$  de células en 1 mL en placas de cultivo de 12 pozos, se realizaron ensayos por triplicado, para evaluar la proliferación ante: 1) estímulo con 10 µg/mL de lisado celular 4T1, 2) 10 µg/mL de lisado tumoral y 3) un control sin estímulo. Los leucocitos de bazo se cultivaron durante 72 horas, 37 °C y 5% CO<sub>2</sub>. Se recuperaron las células de los pozos en tubos de Eppendorff y se centrifugaron a 1500 rpm, 5 min a 4°C, después fueron tratadas con anticuerpos de marcadores de superficie, fueron tratadas con anti-CD16/32 y se dejaron incubando por 15 min, posteriormente se lavaron con 1 mL de PBA (0.01% azida de sodio), después las células fueron tratadas con anticuerpos anti-CD3, anti-CD4, anti-CD8, anti-CD19 (tinción 1) o anti-Gr1, y anti-CD11b (tinción 2) 30 min a 4 °C. Después de la incubación las células fueron lavadas con 1 mL de PBA y fijadas con 300 µL de paraformaldehído al 1% para ser analizadas por citometría de flujo.

### **Ensayo de producción de citocinas intracelulares**

Las células de bazo fueron cultivadas en placas de cultivo de 12 pozos ( $4 \times 10^6$ /cada pozo) por triplicado cada bazo de ratón tratado. Después de 24 horas de cultivo fueron estimuladas con: 1) 10 µg/mL de lisado celular 4T1, 2) 10 µg/mL de lisado tumoral y 3) un control sin estímulo, para evaluar la proporción de células productoras de IFN-γ y TNF-α; se dejaron incubando a 37 °C 5% CO<sub>2</sub>. Después de la incubación se agregó a cada pozo 10 µg/mL de brefeldina la cual inhibe el transporte de proteínas del retículo endoplásmico al aparato de Golgi, evitando el transporte de vesículas, lo cual hace que los leucocitos de bazo no secreten citocinas, se dejaron incubar 4 h a 37 °C y 5% CO<sub>2</sub>. Después se recuperaron las células en tubos Eppendorff y se centrifugaron a 1500 rpm, 5 min a 4°C, después se agregó anticuerpo anti-CD<sup>16/32</sup> y se dejaron incubando por 15 min, posteriormente se lavaron con 1 mL de PBS y las células fueron tratadas con anticuerpos anti-CD3, anti-CD4, anti-CD8. Las células se lavaron con 1 mL de PBA, fijadas y

permeabilizadas con 50  $\mu$ L de Citofix/Citoperm (ver anexo 1) durante 15 min, lavadas con 1 mL de Perm Wash (ver anexo 1), las células se centrifugaron a 1500 rpm, 5 min a 4 °C, después se retiró el sobrenadante y fueron tratadas con anticuerpos anti-IFN- $\gamma$  y anti-TNF- $\alpha$ , se dejaron incubar durante 30 min, posteriormente fueron lavadas con 1 mL de Perm Wash, centrifugadas a 1500 rpm, 5 min a 4 °C, y finalmente se fijaron con 300  $\mu$ L de paraformaldehído al 1% para ser analizadas por citometria de flujo.

### **Detección de citocinas por ELISA**

La reconstitución de los anticuerpos se llevó a cabo siguiendo las instrucciones de manufactura de los “kits” anti-IFN- $\gamma$ , anti-TNF- $\alpha$ , anti-IL-6 y anti-IL-10 (ELISA PREPOTTECH Murino). Se recubrieron las placas de 96 pozos con 100  $\mu$ L de anticuerpo de captura diluido en PBS-tween a una concentración de 2  $\mu$ g/mL para IL-10 e IL-6 y 1  $\mu$ g/ml para IFN- $\gamma$  y TNF- $\alpha$ , y se incubaron durante 24 h. Después se lavaron 4 veces los pozos con 300  $\mu$ L de PBS-tween, y se bloqueó con 300  $\mu$ L de búfer de bloqueo (PBS 1x y 1% de BSA), se dejaron incubando las placas por 1 hora a 4 °C y después de la incubación se lavaron los pozos 4 veces con 300  $\mu$ L de PBS-tween. Posteriormente se agregan la curva estándar de concentración de citocinas o las muestras (sobrenadantes de leucocitos de bazo) a una dilución de 1:2 en diluyente (PBS 0.05% tween y 0.1% BSA), la placa se deja incubar durante 2 h a 4 °C, y posterior a la incubación se lavaron las placas 4 veces con 300  $\mu$ L de PBS-tween. Después se agregaron 100  $\mu$ L de anticuerpo de detección, después el anticuerpo biotinilado (anti-citocina) a una concentración de 5  $\mu$ g/mL para IL-6 e IL-10 y 2.5  $\mu$ g/mL para IFN- $\gamma$  y TNF- $\alpha$  diluidos en diluyente (PBS 0.05% tween + 0.01% BSA) se incubaron por 2 h a 4 °C, después se lavaron los pozos 4 veces con 300  $\mu$ L de PBS-tween. Posteriormente se agregó 100  $\mu$ L de estreptavidina peroxidada a una dilución 1:2000 en diluyente (PBS 0.05% tween + 0.01% BSA), se incubó 1 h a 4 °C. Después se lavaron las placas 4 veces con 300  $\mu$ L de PBS-tween, después para revelar las placas se agregaron 100  $\mu$ L de ABTS-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 3% (2,2-bis-azino (ácido 3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico), las lecturas se llevaron a cabo en espectrofotómetro a una longitud de onda de 405 nm, con corrección de 650 nm.

### **Análisis de citometria de flujo**

El análisis de citometria de flujo se realizó con el programa FlowJo. Al evaluar la proporción de TCD3+, TCD4+, TCD8+ y las células granulares, utilizamos la población completa (se registraron en el citometro capturas de 50,000 eventos), utilizando los respectivos marcadores de superficie para cada una de las poblaciones vs tamaño (SSC). Después al analizar la proliferación de TCD4+ y TCD8 utilizamos la región positiva

para TCD4+ y TCD8+ respectivamente, y analizamos la proliferación de la población, la cual correspondía a la pérdida de señal de CFSE (CFSE-). Al analizar la proliferación de las células granulares, utilizamos primero la región correspondiente a las células granulares por tamaño (SSC) y granularidad (FSC), y después utilizamos el marcador de Gr1, tomando la población positiva para Gr1+ para analizar la proliferación de granulocitos correspondientes a la región CFSE-.

### **Análisis estadístico**

El análisis estadístico se llevó a cabo mediante el uso del “software” Graph Pad Prim 6.0. En las gráficas se representa la media y error estándar, las diferencias significativas fueron determinadas mediante el análisis con ANOVA de 2 factores, seguido de prueba de comparación múltiple de Dunnett, las diferencias fueron significativas cuando el valor de  $p$  fue  $<0.05$

## RESULTADOS

### Las proteínas Cry1Ac son adyuvantes en la inmunización con lisado celular 4T1 en un esquema corto de inmunización

Los ratones inmunizados con lisado celular 4T1 + protoxina o toxina Cry1Ac desarrollaron tumores de menor tamaño en comparación al grupo inmunizado solo con lisado celular 4T1 y al grupo de ratones que desarrollan tumor (PBS) (Fig. 3a). Se observaron diferencias significativas en los tamaños de los tumor desde el día 18 después de haber inducido los tumores (Fig. 3a). Además, los ratones inmunizados con lisado celular 4T1 + protoxina o toxina Cry1Ac mostraron mayor sobrevida, 85% y 100% respectivamente, en comparación al grupo de ratones que desarrollan (PBS) y a los inmunizado con lisado celular 4T1, 75% y 65% respectivamente (Fig. 3b). Los ratones inmunizados con lisado celular 4T1 + protoxina o toxina Cry1Ac, tuvieron mayor porcentaje de ratones libres de tumor, 70% y 40% respectivamente, en comparación al grupo de ratones que desarrollan tumor (PBS) y al grupo inmunizado solo con lisado celular 4T1, 0% y 10% respectivamente (Fig. 3c). Estos resultados indican que el tratamiento profiláctico de la protoxina o toxina Cry1Ac con lisado celular 4T1 en un esquema corto de inmunización mostró efecto anti-tumoral.

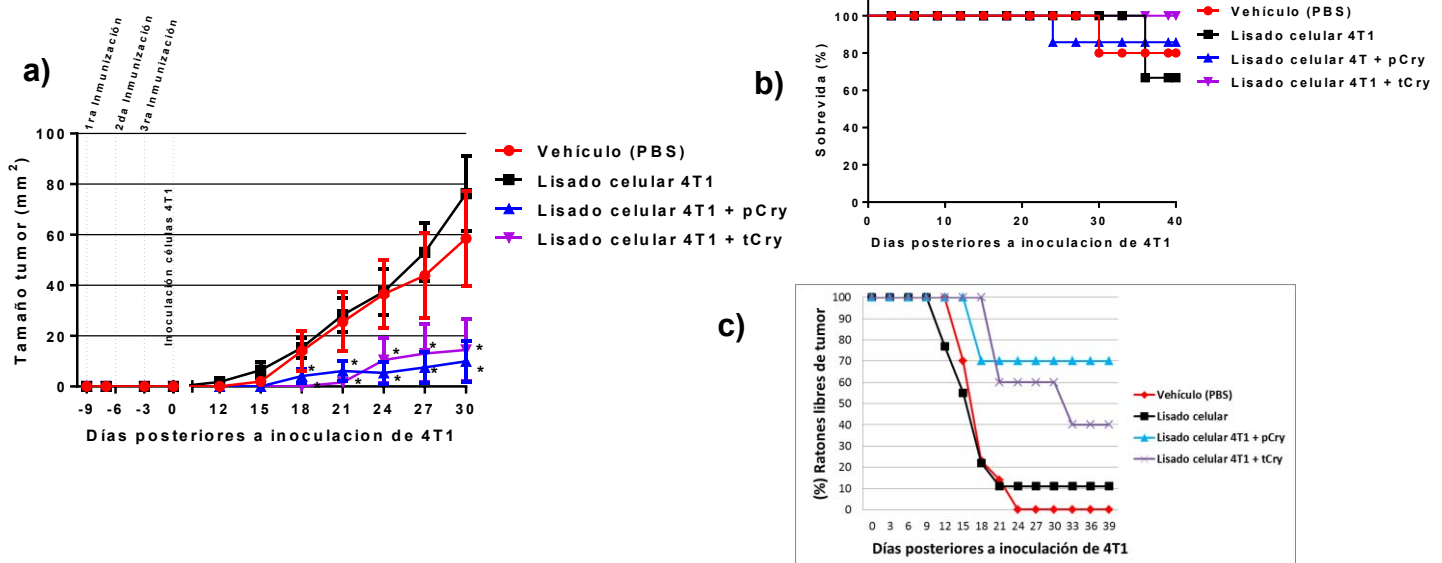


Figura 3 Las proteínas Cry1Ac son adyuvantes en la inmunización con lisado celular 4T1 en un esquema corto de inmunización. Ratones BALB/c recibieron 3 inmunizaciones (esquema corto: lisado celular 4T1, lisado celular 4T1 + protoxina Cry1Ac y lisado celular 4T1 + toxina Cry1Ac) y posteriormente se inocularon células de la línea 4T1 ( $1 \times 10^3$  células). El crecimiento de los tumores fue monitoreado cada 3<sup>er</sup> día. a) Crecimiento tumoral, cada punto representa la media del crecimiento tumoral por grupo experimental. b) Sobrevida de los ratones con los diferentes tratamientos profilácticos c) Porcentaje de ratones libres de tumor 40 días después haber inducido tumores. ANOVA de 2 factores y prueba de comparación múltiple de Dunnett. Valor *P* representa diferencias significativas entre los grupos tratados. ( $P < 0.001$ ). Ratones que desarrollan tumor (PBS), tratados con lisado celular 4T1 y lisado celular 4T1 + pCry  $n = 10$ . Ratones tratados con lisado celular 4T1 + tCry  $n = 5$ . \* Indica diferencias significativas con respecto a los ratones que desarrollan tumor (PBS).

## La inmunización con lisado celular 4T1 + protoxina o toxina Cry1Ac mantiene la proporción de linfocitos TCD3+ y TCD8+

Evaluamos las poblaciones de linfocitos TCD3+, TCD4+ y TCD8+ en bazo de los ratones con los diferentes tratamientos, estos últimos tienen función citotóxica frente a las células tumorales. Encontramos que los ratones inmunizados con lisado celular 4T1 + protoxina o toxina Cry1Ac, mantenían la misma proporción de linfocitos TCD3+ que los ratones sanos (control), 34.3% y 31.3% respectivamente contra 32.9% de los ratones sanos (Fig. 5a). Posteriormente, analizamos la proporción de linfocitos TCD4+ y TCD8, encontramos en los ratones inmunizados con lisado celular 4T1 + protoxina o toxina Cry1Ac, una proporción similar de TCD8+ similar que los ratones sanos, 20.7% y 20.6% respectivamente, mientras que los ratones que desarrollan tumor (PBS) y los inmunizados solo con lisado celular 4T1, mostraron una disminución significativa de TCD8+, 15% y 15.3% respectivamente contra 22.4% de los ratones sanos (Fig. 5b y 5c).

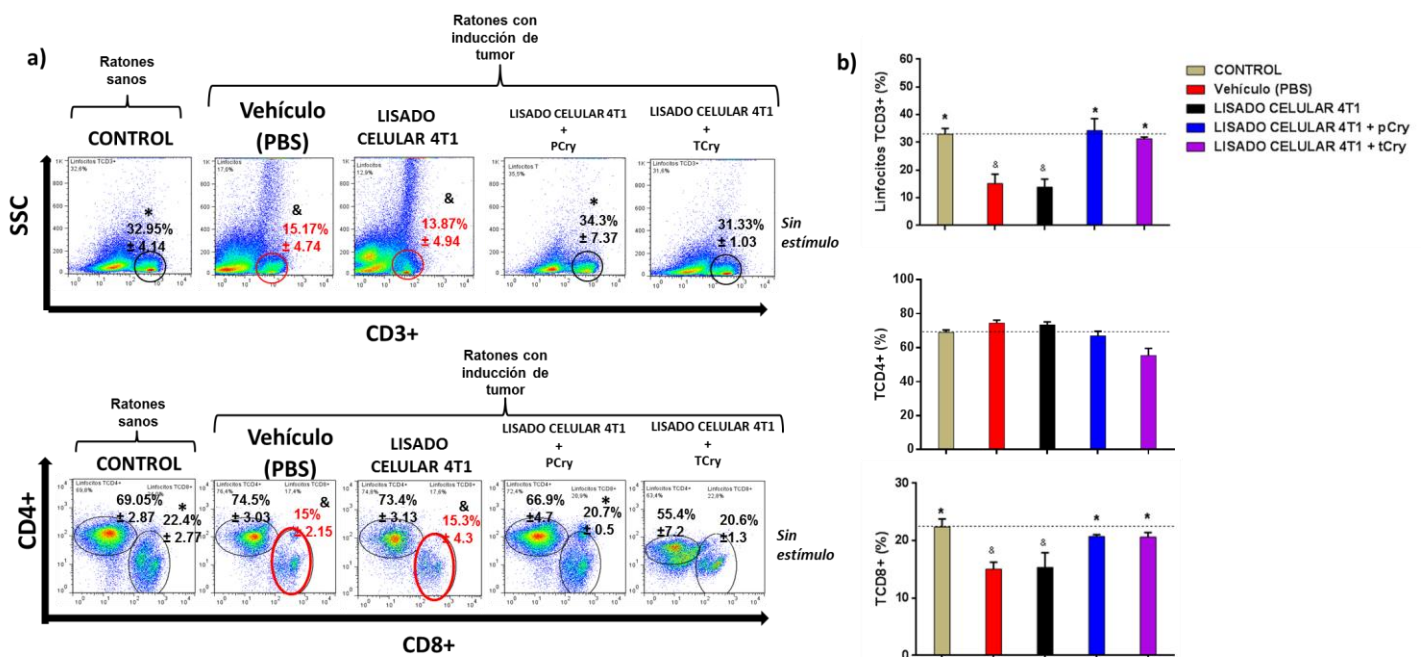


Figura 4 Proporción de linfocitos TCD3+, TCD4+ y TCD8+ en bazo de ratones con tratamiento profiláctico. Leucocitos de bazo de los ratones tratados fueron marcados con anticuerpos de superficie anti-CD3, anti-CD4 y anti-CD8. a) "Dotplots" de la proporción de linfocitos TCD3+, TCD4+ y TCD8+ de los diferentes tratamientos. b) Grafica de proporción de TCD4+, TCD8+ de los diferentes tratamientos. ANOVA de 2 factores seguido de prueba de comparación múltiple de Dunnett. \* Indica diferencias significativas con respecto a los ratones que desarrollan tumor (PBS), & Indica diferencias significativas con respecto a los ratones sanos (Control). n=6 por grupo



## Los linfocitos TCD4+ y TCD8+ en ratones protegidos no proliferan ante estímulo *in vitro*

Para evaluar el mecanismo celular por el cual los ratones tratados con lisado celular 4T1 + protoxina o toxina Cry1Ac desarrollaron tumores de menor tamaño en comparación a los demás grupos, analizamos en leucocitos de bazo la proliferación basal de linfocitos TCD4+ y TCD8+, y la proliferación ante el estímulo *in vitro* con lisado celular 4T1 o lisado de tumor. Observamos que la proliferación basal de linfocitos TCD4+ fue mayor en los ratones que desarrollan tumor (PBS) y en los tratados con lisado celular 4T1 en comparación con los ratones tratados con lisado celular 4T1 + protoxina Cry1Ac y los ratones sanos (Control), mismo efecto que fue observado al estimular con lisado celular 4T1, sin embargo, no encontramos diferencias estadísticamente significativas (Fig. 4). El grupo tratado con lisado celular 4T1 + toxina Cry1Ac presentó una proliferación basal similar a los ratones que desarrollan tumor (PBS) (Fig. 4). A pesar de que los ratones tratados con lisado celular 4T1 + protoxina o toxina Cry1Ac mostraron un menor tamaño en el crecimiento de los tumores, no observamos mayor proliferación de linfocitos TCD4+ y TCD8+, esto quizá se deba a la limitante de la metodología utilizada.

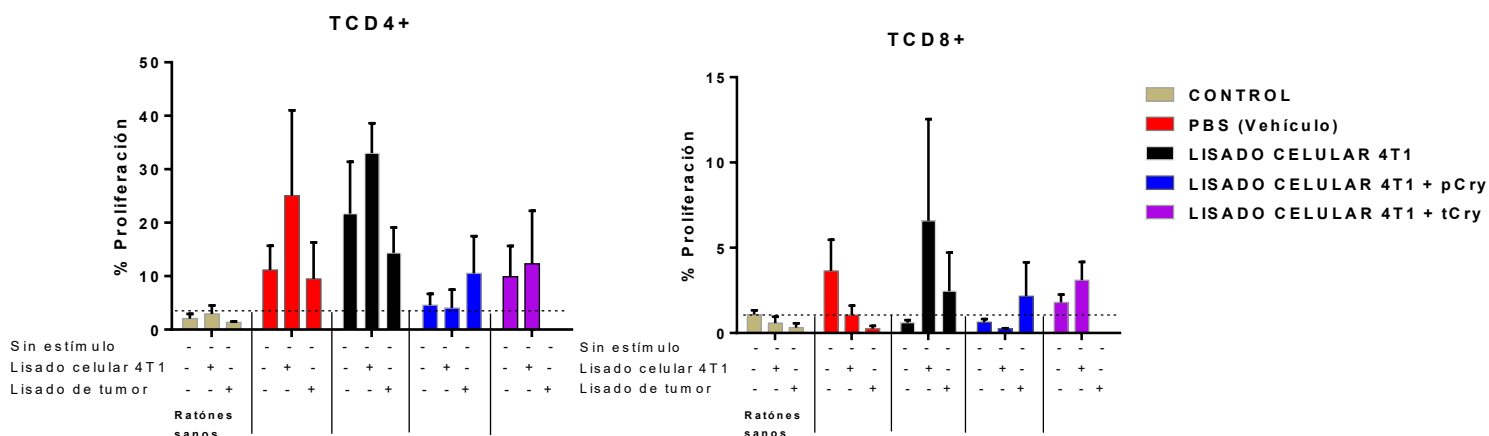


Figura 5 Proliferación *in vitro* de linfocitos TCD4+ y TCD8+. Leucocitos de bazo de los ratones inmunizados fueron teñidos con carboxifluoresceína (CFSE), cultivados en placas de 96 pozos ( $2 \times 10^6$  células) y estimuladas con  $10 \mu\text{g/mL}$  de lisado celular 4T1 o con  $10 \mu\text{g/mL}$  de lisado de tumor. 72 horas después del estímulo las células fueron recuperadas y teñidas con anticuerpos anti-CD4 y anti-CD8. ANOVA de 2 factores y prueba de comparación múltiple de Dunnett.  $n = 6$  por grupo.

## **La inmunización profiláctica con lisado celular 4T1 + protoxina Cry1Ac no cambia la proporción de leucocitos productores de TNF- $\alpha$**

La producción de citocinas tipo Th1, como el TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$ , favorecen la respuesta antitumoral. Evaluamos mediante citometría de flujo la proporción de linfocitos TCD4+, TCD8+ y macrófagos/granulocitos (región tamaño-granularidad) productores de IFN- $\gamma$  y TNF- $\alpha$  en células de bazo de los ratones con los diferentes tratamientos. Encontramos de manera basal (sin estímulo) que los ratones inmunizados con lisado celular 4T1 + toxina Cry1Ac y los inmunizados solamente con lisado celular 4T1 mostraron mayor proporción de TCD4+/TNF- $\alpha$ + y TCD8+/TNF- $\alpha$ +, mientras que los ratones inmunizados con lisado celular 4T1 + protoxina Cry1Ac tuvieron proporción de TCD4 y TCD8 productores de TNF- $\alpha$  similar al de los ratones sanos y los ratones que desarrollan tumor (PBS), sin embargo, no encontramos diferencias estadísticamente significativas entre los diferentes grupos. Cuando estimulamos con lisado celular 4T1 o con lisado de tumor, no observamos diferencias entre los diferentes grupos. También evaluamos la proporción de células productoras de TNF- $\alpha$ , que correspondían a la región de granulocitos y macrófagos de acuerdo al tamaño y granularidad (FSC-SSC), observamos que los ratones inmunizados con lisado celular 4T1 + protoxina Cry1Ac tenían una proporción de células productoras de TNF- $\alpha$  similar a los ratones sanos, mientras que los ratones inmunizados con lisado celular 4T1 + toxina Cry1Ac y los inmunizados solamente con lisado celular 4T1 mostraron una mayor proporción de células correspondientes a la región de macrófagos y granulocitos productoras de TNF- $\alpha$  (Fig. 7). No encontramos diferencias en la proporción de linfocitos TCD4+ y TCD8+ productores de IFN- $\gamma$  entre los diferentes grupos (datos no mostrados). De manera interesante, observamos en estos resultados que el incremento en la proporción de TCD4+/TNF- $\alpha$ +, TCD8+/TNF- $\alpha$ + y células granulares/TNF- $\alpha$ + estuvo relacionado a los ratones que desarrollaron tumor.

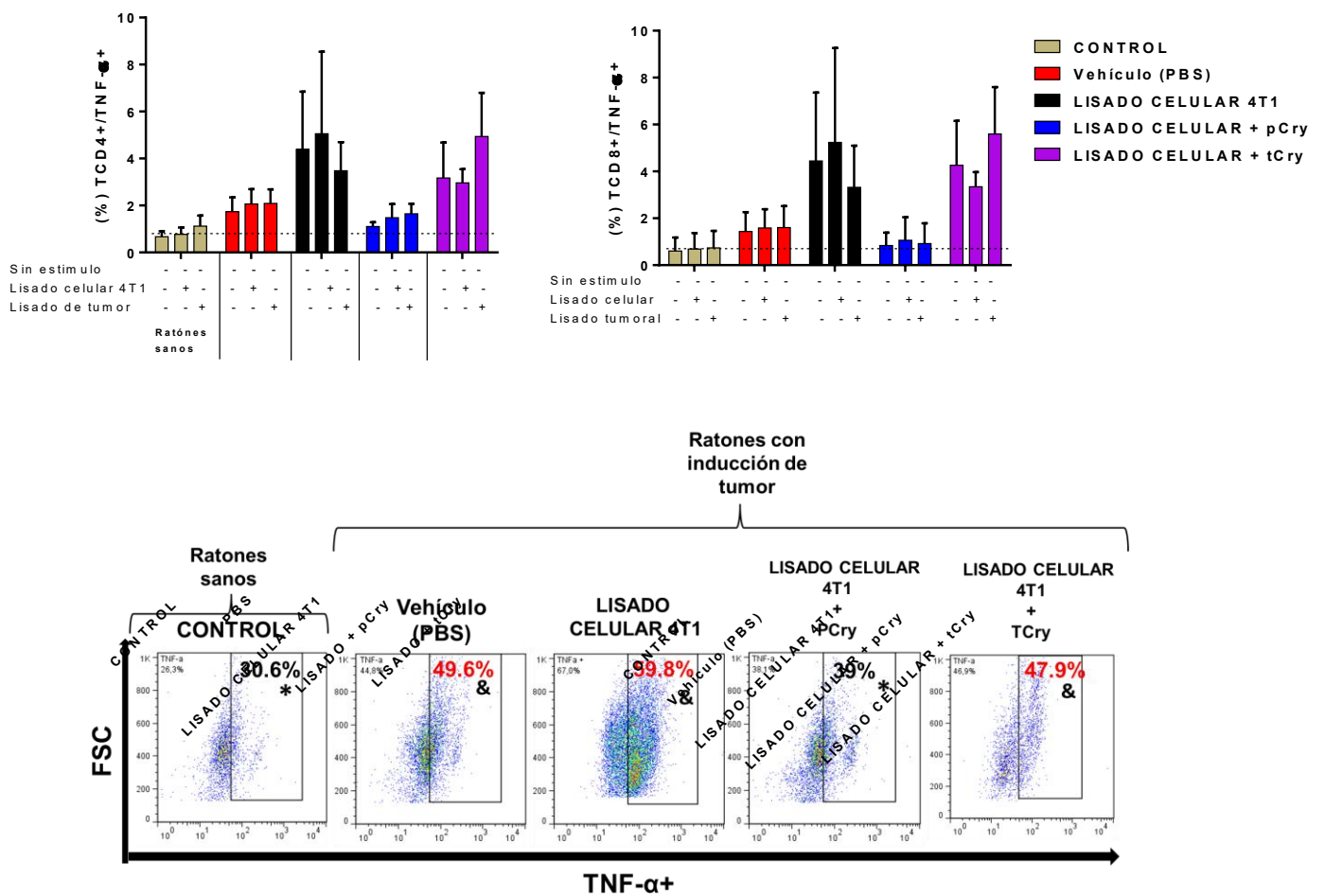


Figura 6 Proporción de linfocitos TCD4 y TCD8 productores de TNF- $\alpha$ . Leucocitos de bazos de los diferentes grupos de ratones fueron cultivados en placas de 96 pozos ( $2 \times 10^6$  células), 24 horas después, se estimularon con  $10 \mu\text{g/mL}$  de lisado celular 4T1 o con  $10 \mu\text{g/mL}$  de lisado de tumor, 1 hora después del estímulo agregamos brefeldina para inhibir el transporte vesicular del aparato de Golgi. Las células fueron recuperadas y teñidas con marcadores de superficie anti-CD4, anti-CD8 y después con tinción intracelular con marcadores anti-IFN- $\gamma$  y anti-TNF- $\alpha$ . ANOVA de 2 factores y prueba de comparación múltiple de Dunnett.  $n = 6$  por grupo. \* Indica las diferencias significativas con respecto al grupo de ratones que desarrollan tumor (PBS). & Indica las diferencias con respecto a los ratones sanos (control).

## Los ratones inmunizados con lisado celular 4T1 + las proteínas Cry1Ac no incrementaron células granulares en el bazo

Al analizar las poblaciones en la respuesta celular *in vitro*, observamos que los ratones que desarrollaron tumores con mayor tamaño (PBS y lisado celular 4T1), tenían un incremento de células grandes y granulares, mientras que los ratones inmunizados con lisado celular 4T1 + protoxina o toxina Cry1Ac mostraron proporciones similares que los ratones sanos. Este incremento en células granulares estaba relacionado al tamaño de los tumores, mientras más volumen tenía el tumor mayor proporción de células granulares encontrábamos en los bazos de dichos ratones (Fig. 6).

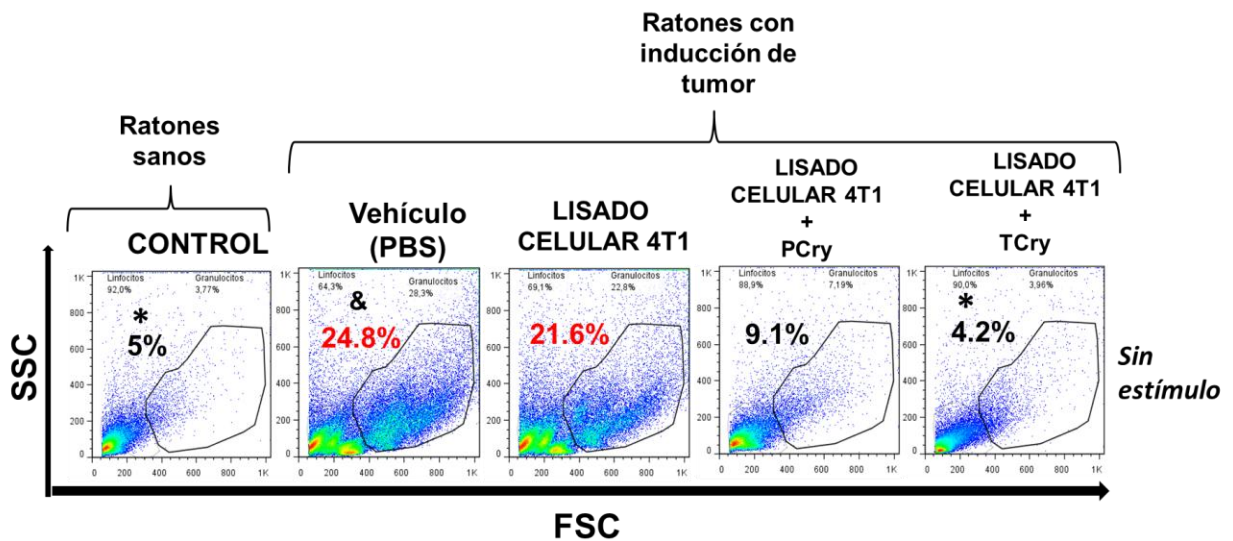
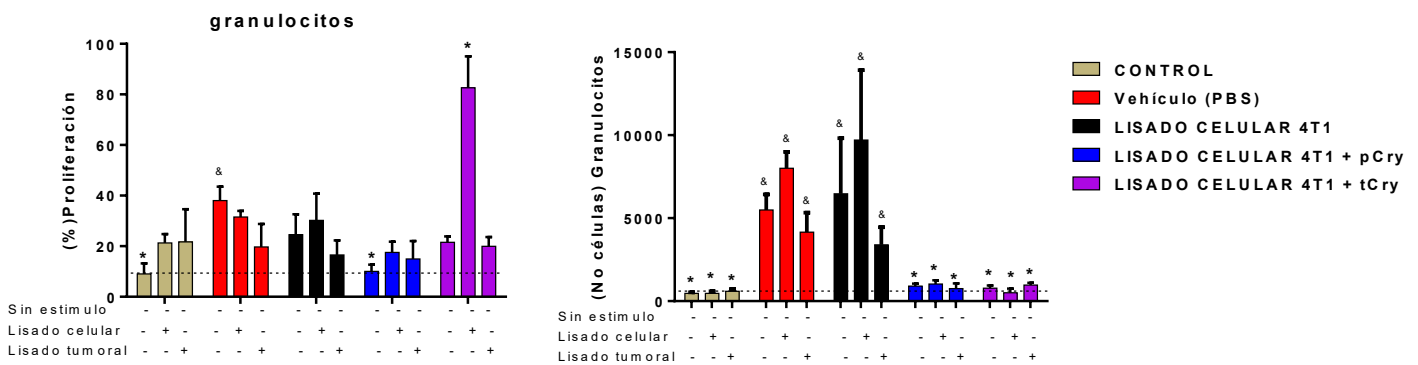
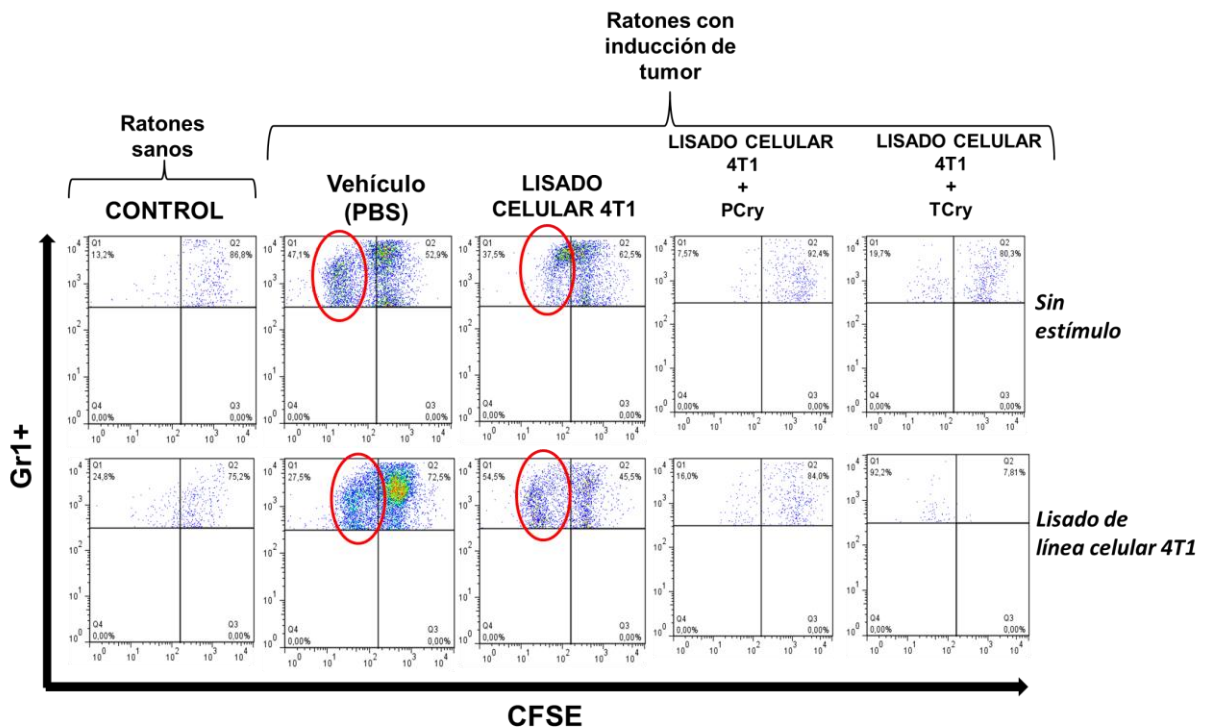


Figura 7 Proporción de células granulares en bazo de ratones con los diferentes tratamientos. Leucocitos totales de bazo de los ratones inmunizados fueron cultivados en placas de 96 pozos ( $2 \times 10^6$  células). Las células fueron recuperadas. ANOVA de 2 factores y prueba de comparación múltiple de Dunnett.  $n = 6$  por grupo. \* Indica las diferencias significativas con respecto a los ratones que desarrollan tumor (PBS). & Indica las diferencias con respecto a los ratones sanos (Control).

## Los ratones inmunizados lisado celular 4T1 + protoxina Cry1Ac mantienen la misma proporción células Gr1+ y CD11b+ en proliferación que los ratones sanos

Después de haber encontrado un incremento en la proporción de células granulares en ratones con mayor volumen tumoral, analizamos la proliferación y cantidad de granulocitos mediante el marcador Gr1+ y el marcador CD11b+. En condiciones normales los granulocitos en bazo no presentan proliferación. Sin embargo, al evaluar la proliferación de estas poblaciones, observamos que de manera basal, los granulocitos de los ratones que desarrollan tumor (PBS) y los inmunizados solamente con lisado celular 4T1 (que también desarrollaron tumores), tenían mayor proporción de granulocitos en proliferación, 38% y 24% respectivamente, mientras que los ratones

inmunizados con lisado celular 4T1 + protoxina o toxina Cry1Ac tenían la misma proporción de granulocitos en proliferación que los ratones sanos, 10% y 9%. Al estimular con lisado celular 4T1 observamos un ligero incremento en la proporción de granulocitos en proliferación en todos los grupos tratados, sin presentar diferencias significativas entre los diferentes tratamientos (Fig. 7). Al analizar la proliferación de monocitos en células de bazo de los ratones con los diferentes tratamientos, observamos de manera similar que los ratones que desarrollan tumor (PBS) y los inmunizados solo con lisado celular 4T1, tienen una mayor proporción en la proliferación de monocitos CD11b+, mientras que los inmunizados con lisado celular 4T1 + protoxina o toxina Cry1Ac mantiene la misma proporción de proliferación de monocitos CD11b+ al igual que los ratones sanos (Fig. 7)



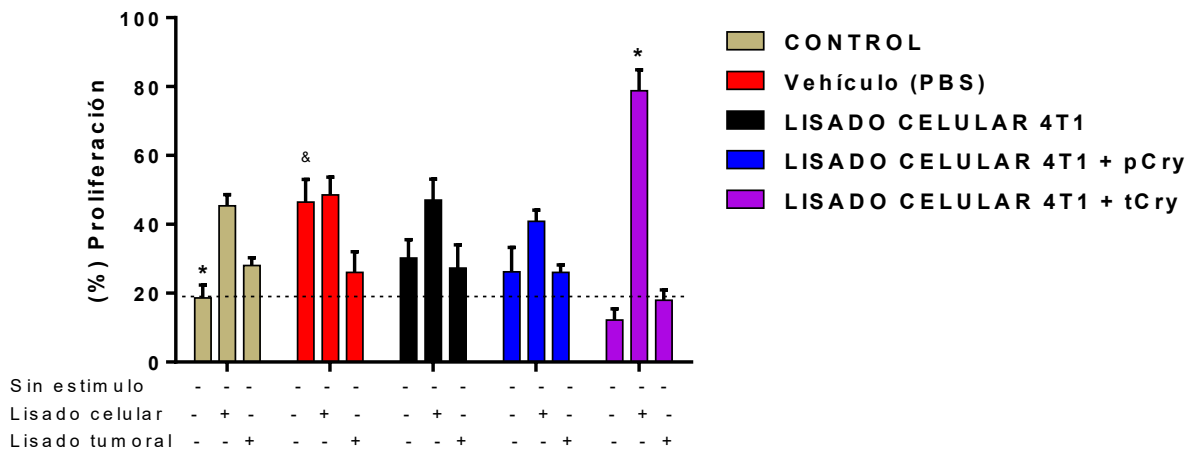
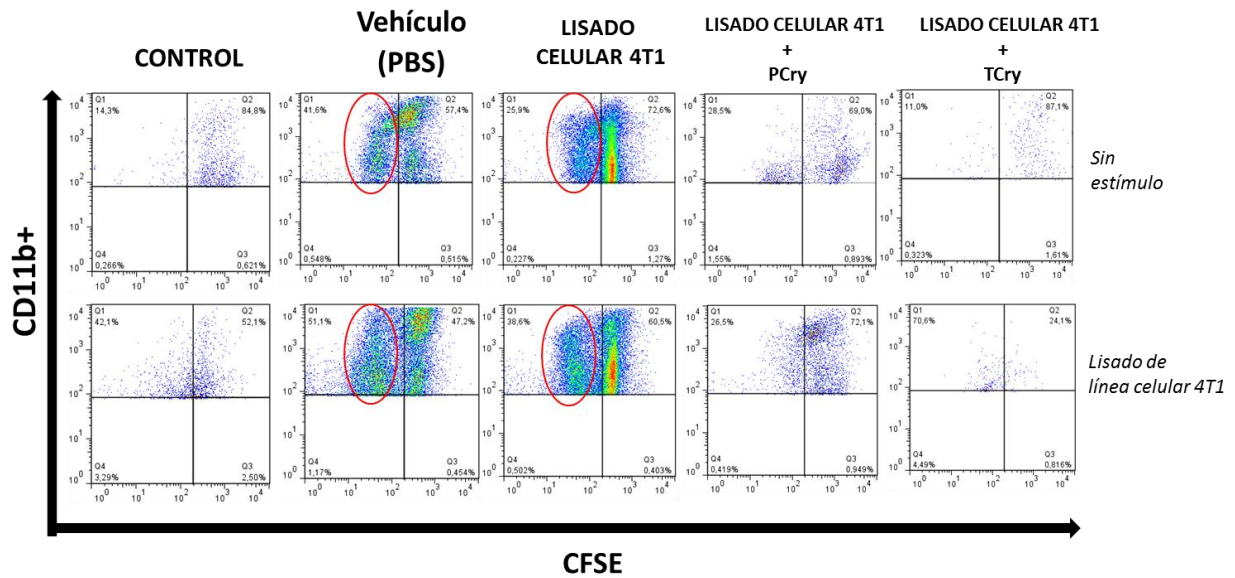


Figura 8 Proliferación de granulocitos y monocitos de los diferentes tratamientos. Leucocitos totales de bazo de los ratones inmunizados fueron teñidos con CFSE y fueron cultivados en placas de 96 pozos ( $2 \times 10^6$  células) y estimuladas con  $10 \mu\text{g/mL}$  de lisado celular 4T1 o con  $10 \mu\text{g/mL}$  de lisado de tumor. 72 horas después del estímulo, las células fueron recuperadas y teñidas con anticuerpos de marcadores de superficie anti-Gr1 y anti-CD11b. ANOVA de 2 factores y prueba de comparación múltiple de Dunnett.  $n = 6$  por grupo. \* Indica las diferencias significativas con respecto al grupo PBS. & Indica las diferencias con respecto al grupo Control.

CONTROL  
 Vehículo (PBS)  
 LISADO CELULAR 4T1  
 LISADO CELULAR 4T1 + pCry  
 LISADO CELULAR 4T1 + tCry

## Efecto adyuvante antitumoral de la protoxina Cry1Ac en un esquema largo de inmunización profiláctica

Al emplear el esquema corto de inmunización, pudimos observar que la administración de protoxina o toxina Cry1Ac tiene efecto adyuvante al lisado celular 4T1 de manera profiláctica. Decidimos emplear un esquema de inmunización profiláctica más largo para favorecer una mejor respuesta inmune adaptativa, incrementar la respuesta celular y la respuesta de memoria. Interesantemente, el esquema largo de inmunización con lisado celular 4T1 + protoxina Cry1Ac mostró un mejor efecto adyuvante antitumoral en comparación al esquema corto; ya que los ratones que recibieron el tratamiento no desarrollaron tumores, mostrando un 100% de ratones libres de tumor y 100% de sobrevida (Fig. 8b-d). Mientras que la inmunización profiláctica de toxina Cry1Ac coadministrada con lisado celular 4T1 no mostró efecto adyuvante antitumoral; ya que los ratones mostraron crecimiento tumoral similar a los ratones que desarrollan tumores (PBS), mostraron un 50% de sobrevida y solo un 25% de ratones libres de tumor.

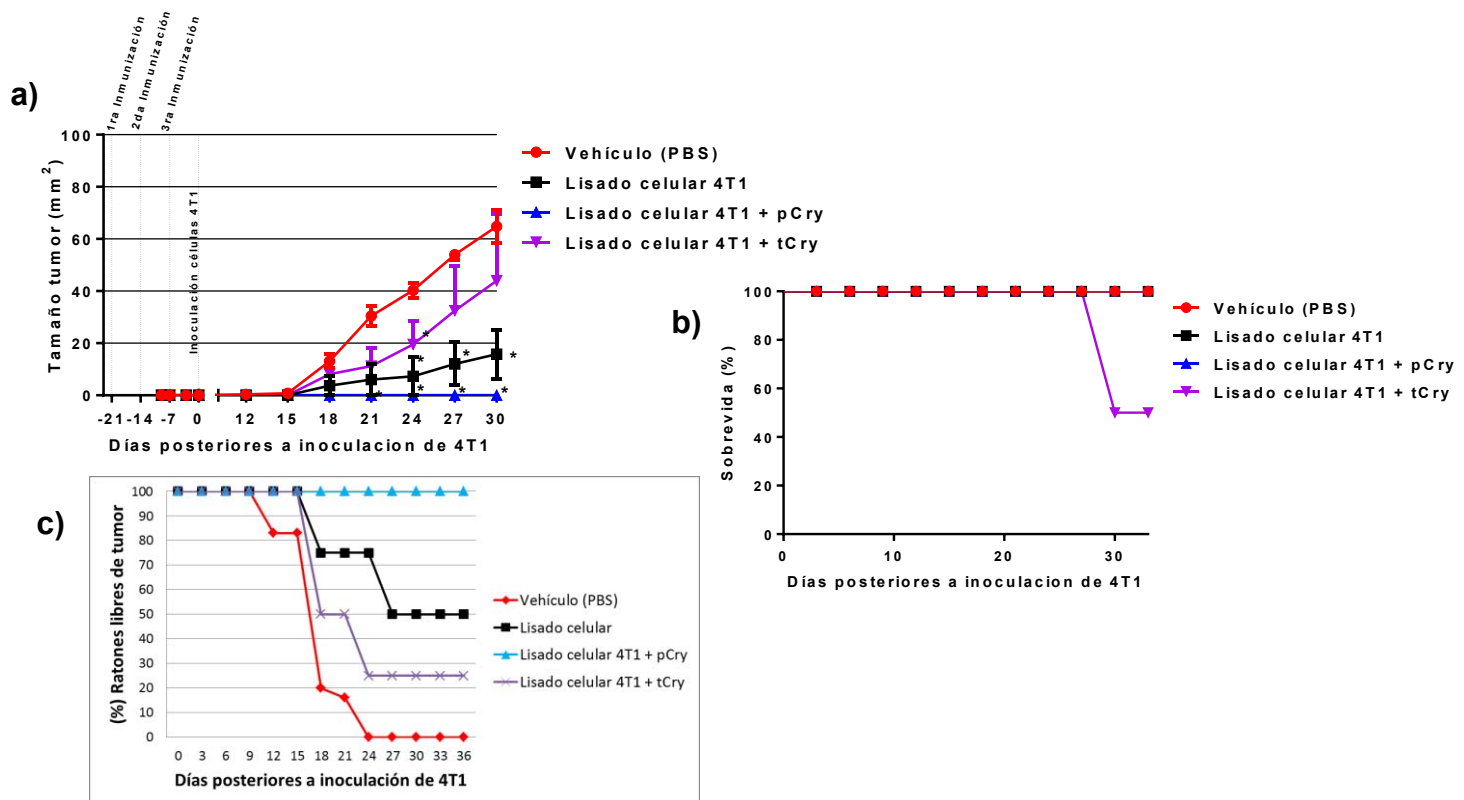


Figura 9 Efecto adyuvante antitumoral de la protoxina Cry1Ac en inmunización con lisado celular 4T1 con un esquema largo de inmunización. Ratones BALB/c recibieron 3 inmunizaciones, 1 cada 7 días, (lisado celular 4T1, lisado celular 4T1 + protoxina Cry1Ac y lisado celular 4T1 + toxina Cry1Ac) y posteriormente se inocularon células de la línea 4T1 ( $1 \times 10^3$  células). El crecimiento de los tumores fue monitoreado cada 3<sup>er</sup> día. a) Crecimiento tumoral, cada punto representa la media del crecimiento tumoral por grupo experimental. b) Porcentaje de sobrevida en los diferentes tratamientos profilácticos c) Ratones libres de tumor 40 días después haber inducido tumores ANOVA de 2 factores y prueba de comparación múltiple de Dunnett. Valor *P* representa diferencias significativas entre los grupos tratados. ( $P < 0.001$ ).  $n=5$  por grupo. \* Indica diferencias significativas con respecto a los ratones que desarrollan tumor (PBS).

## La inmunización profiláctica de lisado celular 4T1 + protoxina Cry1Ac tiene proporción de linfocitos TCD3+ igual que los ratones sanos

Evaluamos la proporción de linfocitos TCD3+ en los bazo de los ratones de los diferentes tratamientos; ya que estas poblaciones juegan un papel importante como células efectoras frente a la formación de tumores. Los ratones inmunizados con protoxina Cry1Ac coadministrada con lisado celular 4T1 mostraron la misma proporción de linfocitos TCD3+ que los ratones sanos, 43.7% y 38.3% respectivamente, mientras que los demás grupos (PBS, lisado celular 4T1 y toxina Cry1Ac coadministrada con lisado celular 4T1) presentaron una disminución de linfocitos TCD3+, 15.6%, 27.6% y 21.9% respectivamente (Fig. 9)

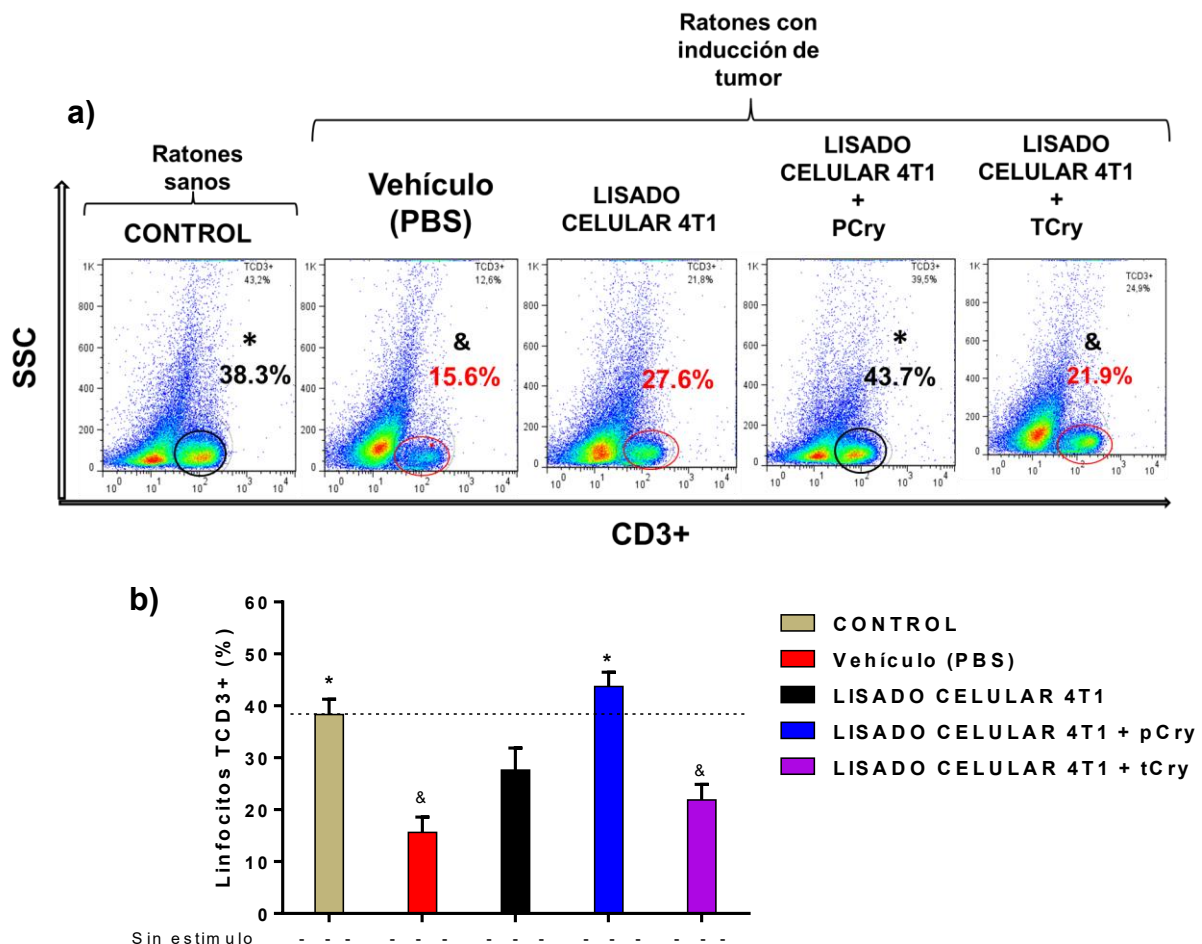


Figura 10. Proporción de linfocitos TCD3+ en bazo de ratones con tratamiento profiláctico. Leucocitos de bazo de los ratones inmunizados fueron cultivados en placas de 96 pozos ( $2 \times 10^6$  células). 72 horas después, las células fueron recuperadas y teñidas con anticuerpos de marcadores de superficie anti-CD3. a) "Dotplots" de la proporción de linfocitos TCD3+ de los diferentes tratamientos. b) Grafica de proporción de TCD3+ de los diferentes tratamientos. ANOVA de 2 factores seguido de prueba de comparación múltiple de Dunnett. \* Indica diferencias significativas con respecto a los ratones que desarrollan tumor (PBS), & Indica diferencias significativas con respecto a los ratones sanos (Control). n= 3 por grupo



**Los ratones inmunizados con lisado celular 4T1 + protoxina Cry1Ac muestran una proporción de células granulares similar que los ratones sanos**

Al analizar las poblaciones en la respuesta celular *in vitro* ante el estímulo con lisado celular 4T1 y lisado de tumor, de forma similar a lo observado con el esquema corto, en este esquema largo observamos que la inmunización profiláctica de lisado celular 4T1 + protoxina Cry1Ac mantiene una proporción similar de células granulares que los ratones sanos, 11.4% y 12.3% respectivamente, mientras que los ratones que desarrollaron tumores (PBS, lisado celular 4T1 y toxina Cry1Ac coadministrada con lisado celular 4T1), muestran un incremento en la proporción de células granulares, 22.8%, 17.3% y 22.2% respectivamente (Fig. 10). Después del estímulo con lisado celular 4T1, observamos incremento en la proporción de células granulares, este incremento fue independiente de la inmunización que recibieron los diferentes grupos de ratones, ratones sanos (Control 27.4%), ratones que desarrollan tumor (PBS 40.3%), Lisado celular 4T1 (32.6%), lisado celular 4T1 + protoxina Cry1Ac (27.6%) y lisado celular 4T1 + toxina Cry1Ac (27.9%) (Fig.10). Sin embargo no encontramos diferencias significativas entre los diferentes grupos y ante el estímulo con lisado celular 4T1.

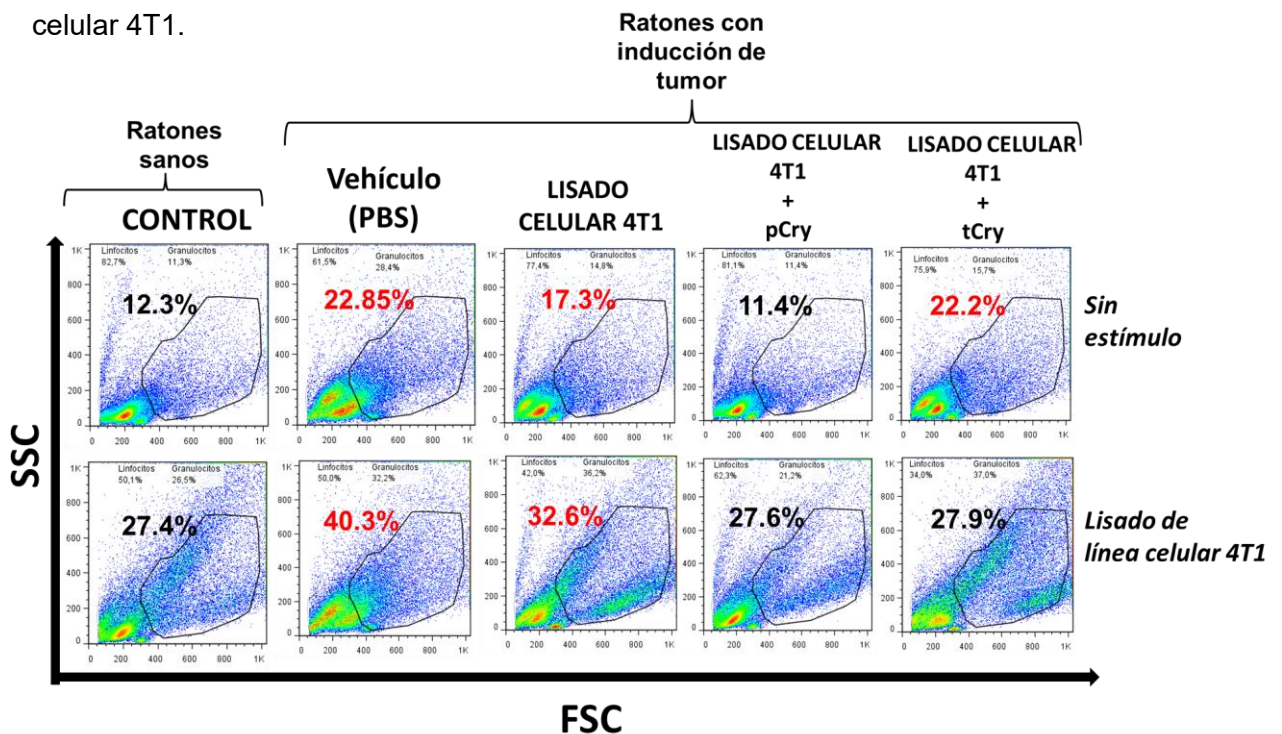
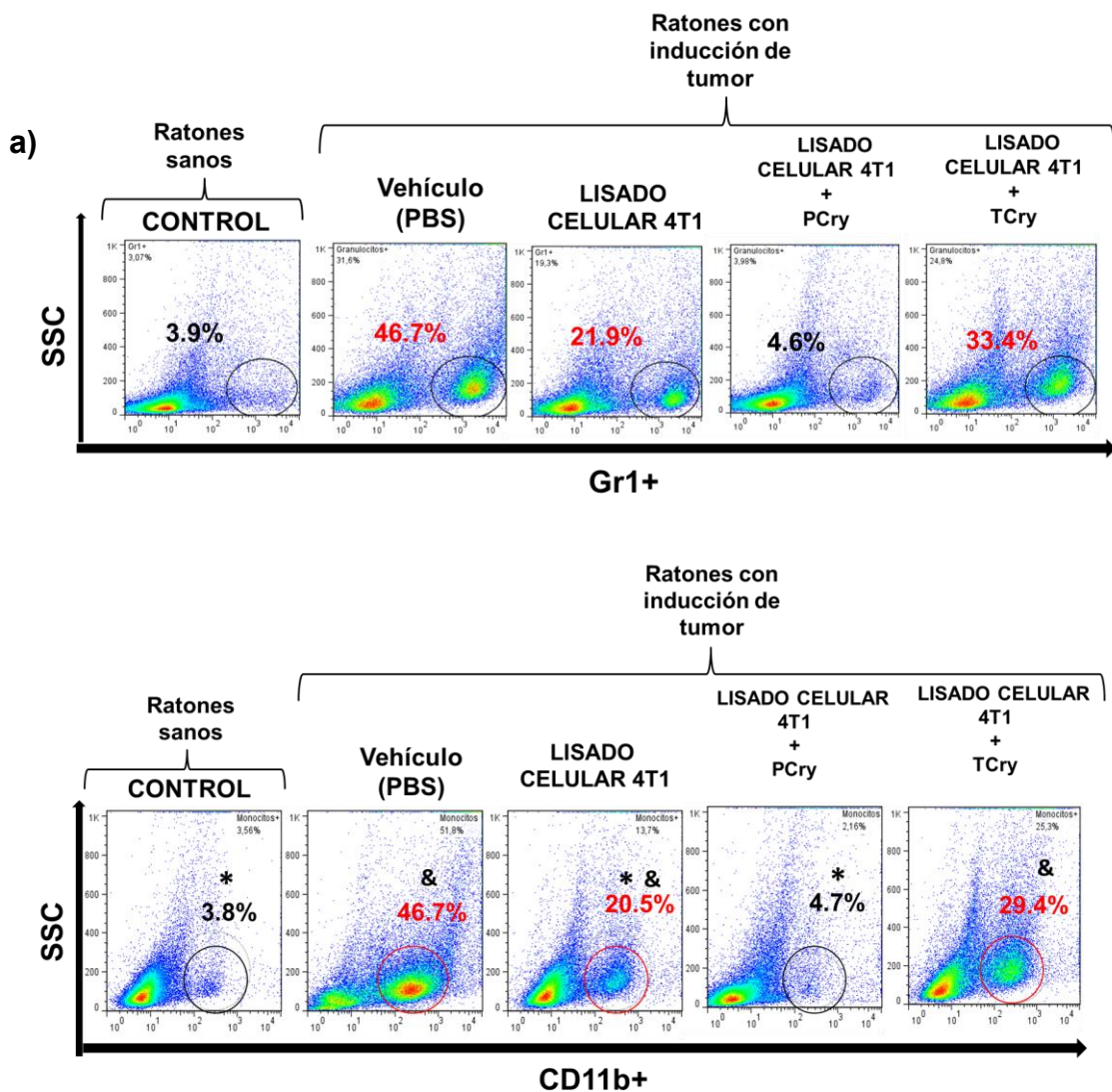


Figura 11 Proporción de células granulares de los diferentes tratamientos, sin estímulo y con estímulo de lisado celular 4T1. Leucocitos totales de bazo de los ratones inmunizados fueron cultivados en placas de 96 pozos ( $2 \times 10^6$  células). Las células fueron estimuladas con lisado celular 4T1, y 72 horas después las células fueron recuperadas marcadas con anticuerpos de superficie. ANOVA de 2 factores y prueba de comparación múltiple de Dunnett.  $n = 3$  por grupo.

**Los ratones inmunizados con lisado celular 4T1 + protoxina Cry1Ac muestran una proporción de células Gr1+ y CD11b+ similar a los ratones sanos**

Al igual que en el esquema corto, encontramos nuevamente que los ratones inmunizados con lisado celular 4T1 + protoxina Cry1Ac muestran proporción de granulocitos (Gr1+) (4.6%) y monocitos (CD11b+) (4.7%) similar a los ratones sanos, 3.9% y 3.8% respectivamente. Mientras que los ratones que desarrollaron tumor (PBS, lisado celular 4T1 y toxina Cry1Ac coadministrada con lisado celular 4T1) tenían incremento en la proporción de granulocitos y monocitos (Fig. 11a-b).



b)

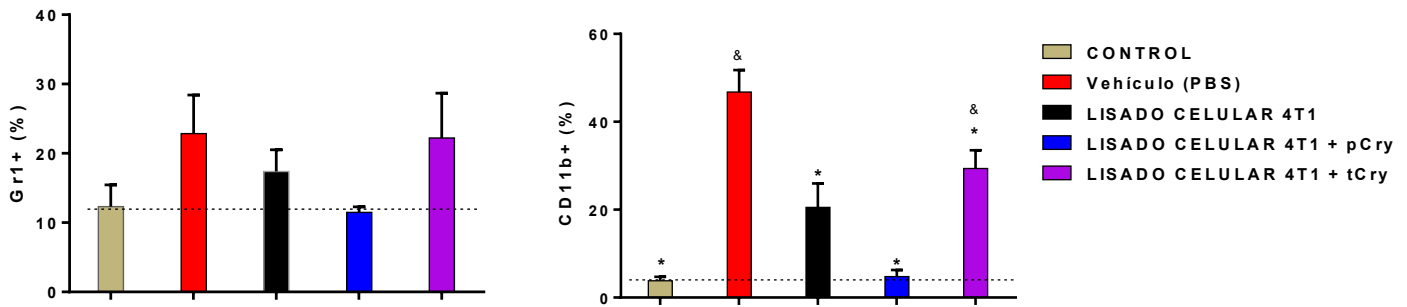


Figura 12 Proporción de células granulares en bazo de ratones con los diferentes tratamientos. Leucocitos de bazo de los ratones inmunizados fueron cultivados en placas de 96 pozos ( $2 \times 10^6$  células). Las células fueron recuperadas y marcadas con anticuerpos de superficie anti-Gr1+ y anti-CD11b+. a) "Dot-plots" de la proporción de Gr1+ y CD11b+ en bazo de ratones con los diferentes tratamientos. b) Grafica de la proporción (%) de Gr1+ y CD11b+ en bazo de ratones con los diferentes tratamientos. ANOVA de 2 factores y prueba de comparación múltiple de Dunnett. n= 3 por grupo. \* Indica las diferencias significativas con respecto a los ratones que desarrollan tumor (PBS). & Indica las diferencias con respecto a los ratones sanos (Control).

**El estímulo *in vitro* con lisado celular 4T1 o lisado tumoral no induce proliferación en granulocitos y monocitos**

Evaluamos la proporción y proliferación *in vitro* de granulocitos y monocitos como parte del sistema inmune innato en este modelo de cáncer de mama, y evaluamos si ante un estímulo mitogénico, con lisado celular 4T1 o lisado tumoral observábamos diferencias en los diferentes tratamientos. De manera inicial no esperábamos encontrar una respuesta antígeno específica, sin embargo, pensando en las células supresoras derivadas mieloides (MDSC, por sus siglas en ingles), una población importante en la patología de los tumores favoreciendo su crecimiento, son células inmaduras que expresan los marcadores Gr1+ CD11b+ y que aún podrían presentar respuestas proliferativas, analizamos las poblaciones de bazo con estos marcadores. Al analizar la proliferación de granulocitos y monocitos ante los diferentes estímulos, no encontramos diferencias significativas entre los grupos experimentales (Fig. 12).

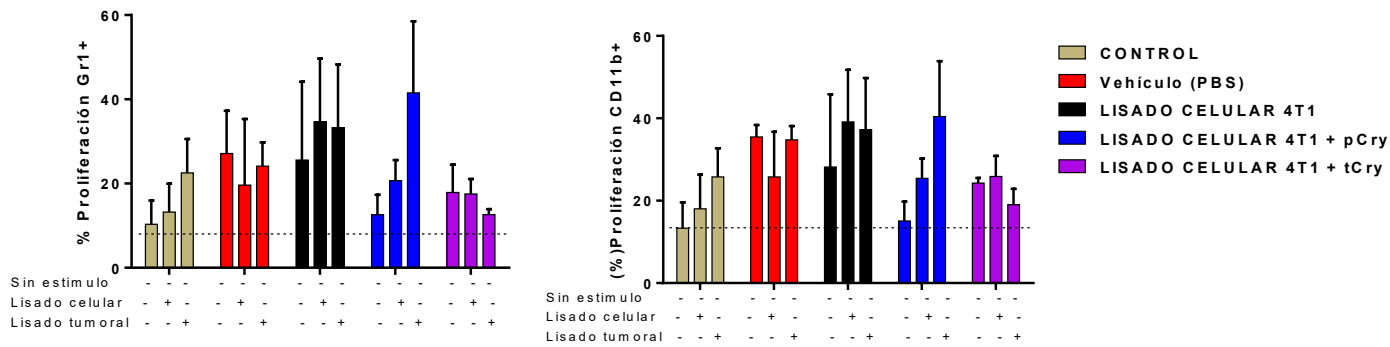


Figura 13 Proliferación de granulocitos y monocitos en bazo de ratones con los diferentes grupos de ratones tratados. Leucocitos totales de bazo de los ratones inmunizados fueron teñidos con CFSE y fueron cultivados en placas de 96 pozos ( $2 \times 10^6$  células) y estimuladas con  $10 \mu\text{g/mL}$  de lisado celular 4T1 o con  $10 \mu\text{g/mL}$  de lisado de tumor. 72 horas después del estímulo, las células fueron recuperadas y teñidas con anticuerpos de superficie anti-Gr1 y anti-CD11b. ANOVA de 2 factores y prueba de comparación múltiple de Dunnett.  $n = 3$  por grupo. \* Indica las diferencias significativas con respecto a los ratones que desarrollan tumor (PBS). # Indica las diferencias con respecto a los ratones sanos (Control).

CONTROL  
PBS  
LISADO CELULAR 4T1  
LISADO + pCry  
LISADO + tCry

CONTROL  
Vehículo (PBS)  
LISADO CELULAR 4T1  
LISADO CELULAR 4T1 + pCry  
LISADO CELULAR 4T1 + tCry

### La inmunización profiláctica de lisado celular 4T1 + protoxina Cry1Ac mantiene la proporción de MDSC

La proporción y proliferación de granulocitos y monocitos encontrados en los ratones que desarrollaron tumor, tenían porcentajes similares, lo cual nos sugirió que podrían ser las mismas poblaciones, por lo tanto, nos enfocamos en evaluar la población de MDSC, que están caracterizadas por la expresión de los marcadores Gr1+ CD11b+. Esta población de MDSC es muy importante ya que tienen efecto inmunosupresor en el microambiente tumoral, disminuyendo la respuesta antitumoral y favoreciendo el crecimiento de los tumores (37). Evaluamos la proporción y proliferación de las MDSC en células de bazo de los ratones inmunizados. Observamos que los ratones inmunizados con lisado celular 4T1 + protoxina Cry1Ac no incrementan la proporción de MDSC en bazo, mientras que los ratones con mayor crecimiento tumoral (PBS, lisado celular 4T1 y toxina Cry1Ac coadministrada con lisado celular 4T1), muestran un incremento en esta población, 53.4%, 25.6% y 39.3% respectivamente. La proliferación de manera basal de MDSC fue mayor en los ratones que desarrollaron tumores (PBS, lisado celular 4T1 y toxina Cry1Ac coadministrada con lisado celular 4T1), al estimular *in vitro* no observamos diferencias (Fig. 13).

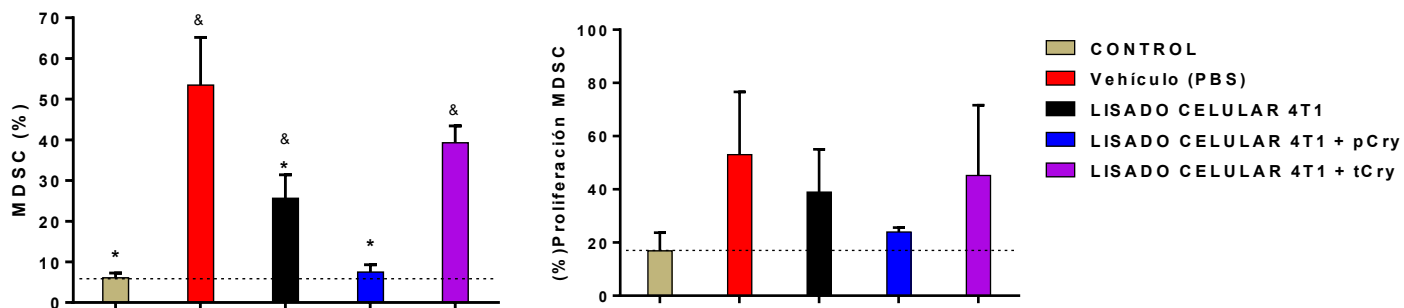
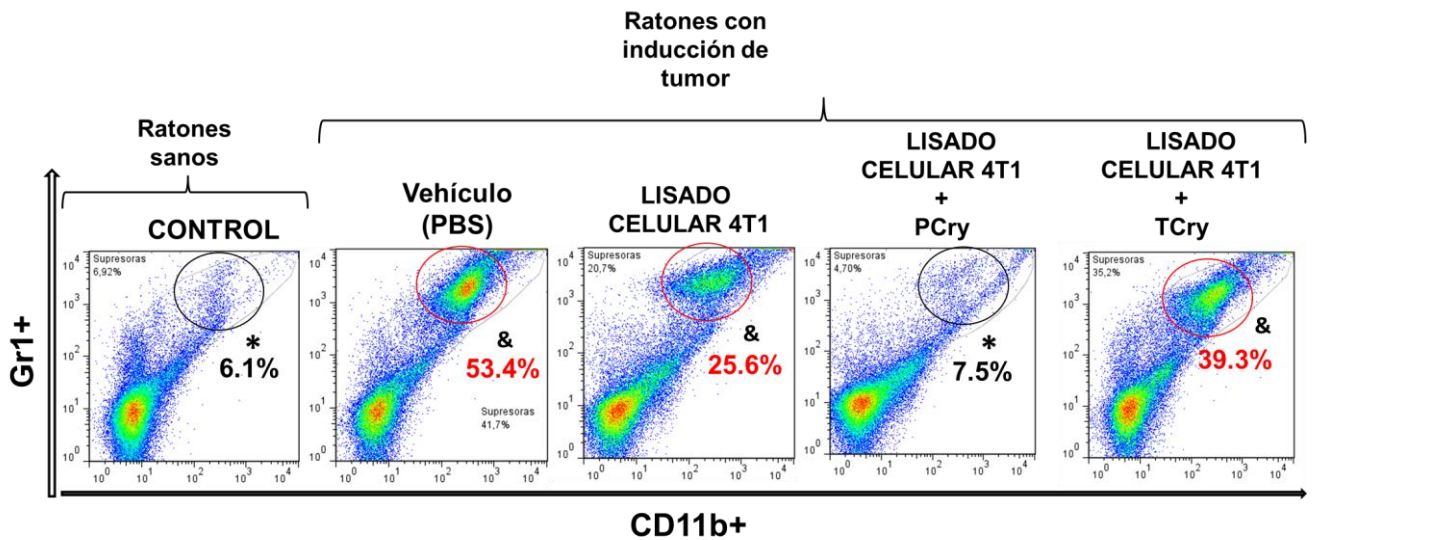


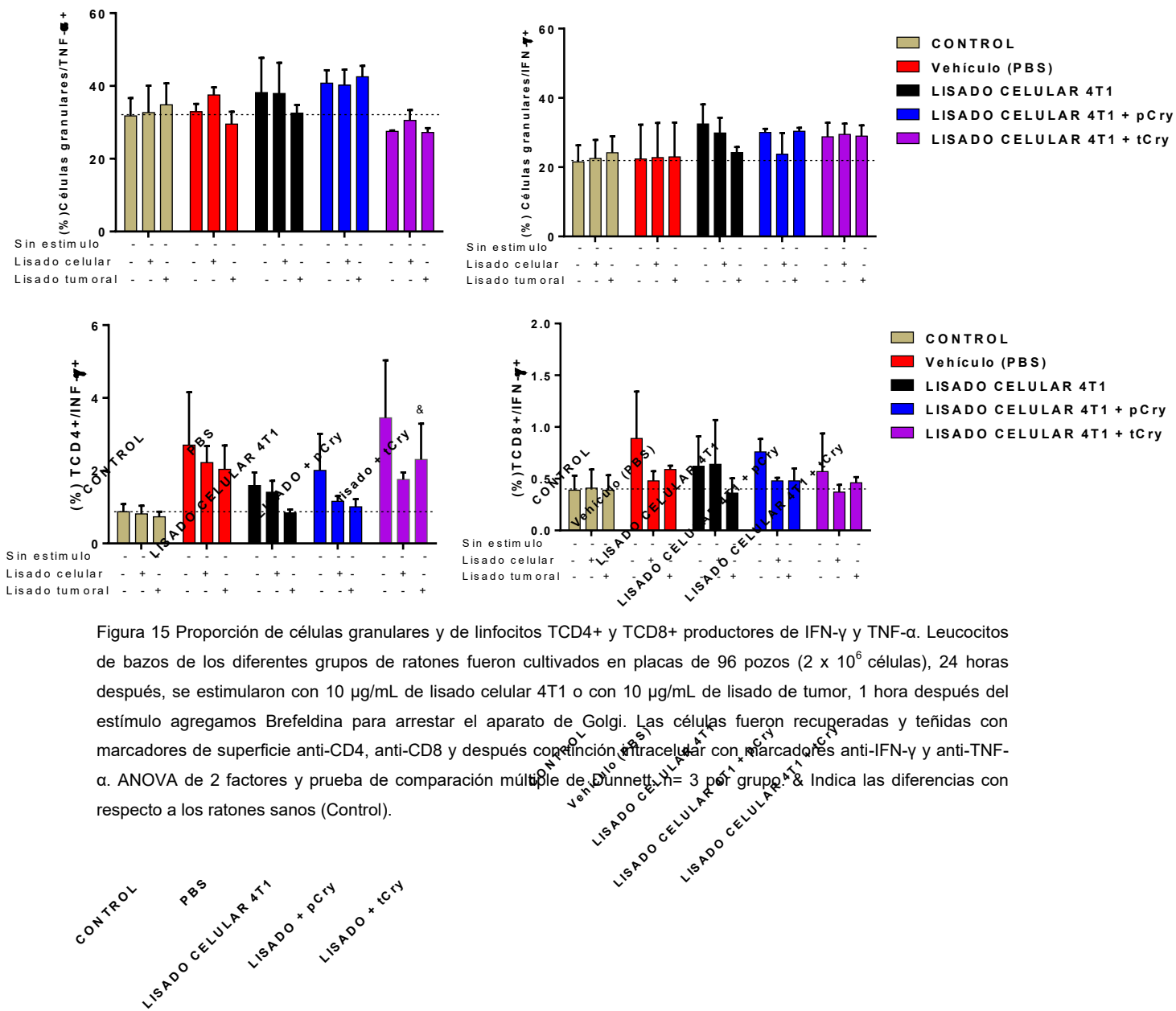
Figura 14 Proporción y proliferación de MDSC de los diferentes grupos de ratones tratados. Leucocitos de bazo de los ratones inmunizados fueron teñidos con CFSE y fueron cultivados en placas de 96 pozos ( $2 \times 10^6$  células) y estimuladas con  $10 \mu\text{g}/\text{mL}$  de lisado celular 4T1 o con  $10 \mu\text{g}/\text{mL}$  de lisado de tumor. 72 horas después del estímulo, las células fueron recuperadas y teñidas con anticuerpos de superficie anti-Gr1 y anti-CD11b. ANOVA de 2 factores y prueba de comparación múltiple de Dunnett.  $n = 3$  por grupo. \* Indica las diferencias significativas con respecto a los ratones que desarrollan tumor (PBS). & Indica las diferencias con respecto a los ratones sanos (Control).

CONTROL    PBS    LISADO CELULAR 4T1    LISADO + pCry    LISADO + tCry

CONTROL    Vehículo (PBS)    LISADO CELULAR 4T1    LISADO CELULAR 4T1 + pCry    LISADO CELULAR 4T1 + tCry

## La inmunización profiláctica con los diferentes tratamientos no afecta la proporción de linfocitos TCD4, TCD8 y células granulares productoras de IFN-γ y TNF-α

Evaluamos mediante citometría de flujo la proporción de linfocitos TCD4, TCD8 y granulocitos productores de IFN-γ y TNF-α, de manera similar al que evaluamos en el primer esquema. Encontramos que la inmunización profiláctica de los diferentes tratamientos no mostraron cambios en la proporción de células granulares y linfocitos TCD4 y TCD8 productores de TNF-α e IFN-γ (Fig. 14).



## El estímulo *in vitro* con lisado tumoral induce la producción de IFN- $\gamma$ y TNF- $\alpha$ de ratones al emplear protoxina o toxina Cry1Ac como adyuvantes

Analizamos la producción de citocinas en sobrenadantes de cultivo de leucocitos totales de bazo mediante el método de ELISA. Leucocitos totales de bazos de los diferentes grupos de ratones fueron cultivados en placas de 96 pozos ( $2 \times 10^6$  células), se estimularon con 10  $\mu\text{g/mL}$  de lisado celular 4T1 o con 10  $\mu\text{g/mL}$  de lisado de tumor. 24 horas del estímulo, se recuperaron 300  $\mu\text{l}$  de sobrenadante y se analizaron mediante ELISA. Observamos que los sobrenadantes de leucocitos totales de bazo de los ratones inmunizados con protoxina o toxina Cry1Ac coadministrada con lisado celular 4T1 mostraron mayor producción de IFN- $\gamma$  y TNF- $\alpha$  al ser estimulados con lisado tumoral en comparación al grupo control, encontrando diferencias significativas, mientras que en la producción de IL-10 e IL-6 de sobrenadantes de leucocitos totales de bazo no encontramos diferencias entre los grupos experimentales (Fig. 15).

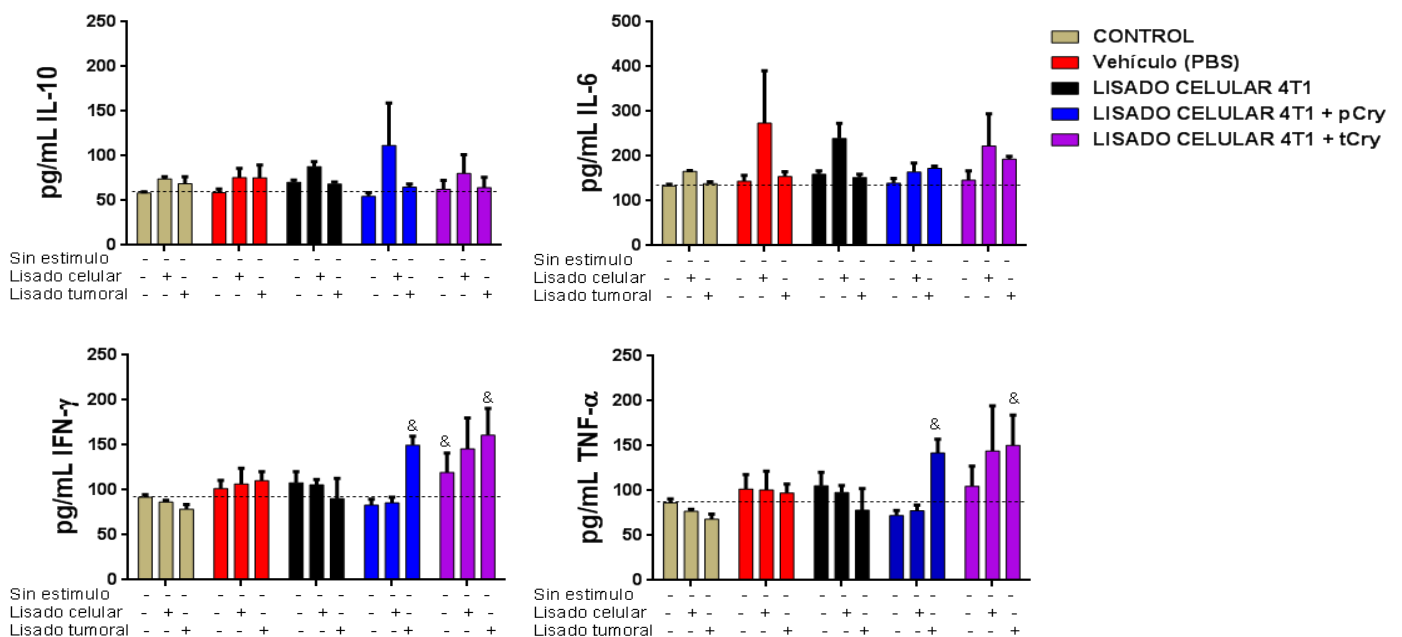


Figura 16 Producción de IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-10 e IL-6 en sobrenadante de leucocitos de bazo de los diferentes grupos de ratones inmunizados. Leucocitos de bazos de los diferentes grupos de ratones fueron cultivados en placas de 96 pozos ( $2 \times 10^6$  células), se estimularon con 10  $\mu\text{g/mL}$  de lisado celular 4T1 o con 10  $\mu\text{g/mL}$  de lisado de tumor. 24 horas del estímulo, se recuperaron 300  $\mu\text{l}$  de sobrenadante y se analizaron mediante ELISA. ANOVA de 2 factores y prueba de comparación múltiple de Dunnett.  $n = 3$  por grupo. & Indica las diferencias con respecto a los ratones sanos (Control).

## DISCUSION

Antecedentes en el laboratorio han mostrado que la protoxina Cry1Ac es un potente adyuvante sistémico y de mucosas (32-33), el mecanismo por el cual tiene efecto adyuvante es mediante la activación de macrófagos, que producen citocinas pro-inflamatorias y también induce la expresión de moléculas coestimuladoras como CD80 y CD86 (34). También la protoxina Cry1Ac confiere protección en diferentes modelos de infección y parasitosis (29-31). La aplicación de la protoxina Cry1Ac podría extenderse a otros modelos. En la actualidad se han buscado y estudiado diversos adyuvantes que puedan ser empleados en la inmunoterapia contra el cáncer. Diversos trabajos se han enfocado en estudiar los agonistas de TLR's como adyuvantes que mejoren la respuesta antitumoral, mediante la activación del sistema inmune. Si la adición de algunos agonistas de TLR's puede llevar a efectos adyuvantes que coinciden con la inducción de inmunidad antitumoral, de forma análoga la protoxina y la toxina Cry1Ac tienen la capacidad de activar células de inmunidad innata, induciendo la producción de citocinas, lo que podría también favorecer la inducción de inmunidad antitumoral por lo que podría emplearse como un adyuvante antitumoral. Por lo tanto, en el presente trabajo evaluamos el efecto adyuvante antitumoral de la protoxina y toxina Cry1Ac en un modelo murino de cáncer de mama, evaluando dos diferentes esquemas de inmunización profiláctica con la protoxina y toxina Cry1Ac ante la inmunización con lisado de la línea celular 4T1.

En el esquema corto observamos que los ratones inmunizados con lisado celular 4T1 + protoxina o toxina Cry1Ac presentaron un menor crecimiento de los tumores, mayor supervivencia y mayor porcentaje de ratones libres de tumor en comparación con los ratones que desarrollan tumor (PBS), lo que sugirió que tanto protoxina como toxina Cry1Ac tenían efecto adyuvante antitumoral en la inmunización con lisado celular 4T1. En el esquema largo de inmunización, con un espaciamiento mayor entre las inmunizaciones, lo cual favorecería la respuesta celular, humoral y la respuesta de memoria a los antígenos administrados en el lisado celular 4T1; notablemente, solo los ratones que recibieron la inmunización profiláctica de lisado celular 4T1 + protoxina Cry1Ac se protegieron completamente, y no desarrollaron tumores. Sin embargo, los ratones inmunizados con lisado celular 4T1 + toxina Cry1Ac, desarrollaron tumores, de manera contraria al esquema corto, en el que desarrollaron tumores pequeños. En el esquema corto los ratones inmunizados con lisado celular 4T1 + protoxina Cry1Ac presentaron un 80% de ratones libres de tumor, mientras que en el esquema largo tuvieron 100% de ratones libres de tumor. Es importante mencionar que en el esquema largo de inmunización, los ratones inmunizados solo con lisado celular 4T1, desarrollaron tumores más pequeños que en el esquema corto. También tuvieron un mayor porcentaje de



ratones libres de tumor (50% y 10% respectivamente). La respuesta antitumoral de los ratones inmunizados con lisado celular 4T1 + protoxina Cry1Ac y los inmunizados solamente con lisado celular 4T1 fue mejor en el esquema largo de inmunización.

Para evaluar el mecanismo por el cual los ratones inmunizados con lisado celular 4T1 + protoxina y toxina Cry1Ac se habían protegido al desarrollo de tumores, evaluamos la respuesta celular *in vitro* en leucocitos de bazo, ante el estímulo con lisado celular 4T1 y lisado tumoral. La respuesta antitumoral mediada por linfocitos citotóxico (TCD8+) y linfocitos cooperadores (TCD4+) son importantes en la inmunidad antitumoral; ya que los CTL eliminan células tumorales mediante perforina o granzima además de producir IFN- $\gamma$  que mejora la respuesta tipo Th1 y mejora los efectos citotóxicos (38), mientras que los linfocitos cooperadores (TCD4+), producen citocinas pro-inflamatorias que polarizan respuestas de tipo Th1 que mejoran la respuesta antitumoral (39). El bazo es un órgano linfoide que tiene un papel importante para generar inmunidad celular y humoral, tanto a nivel sistémico como local (40). Al evaluar la respuesta celular de la proliferación y la proporción *in vitro* de linfocitos TCD4+ y TCD8+ ante el estímulo con lisado celular 4T1 y lisado tumoral, no observamos un respuestas distinta en los ratones inmunizados con lisado celular 4T1 + protoxina o toxina Cry1Ac que nos indican cómo se habían protegido al desarrollo de tumores.

Se ha reportado en modelos animales y en pacientes con cáncer la disminución en la proporción de linfocitos TCD8+, a nivel sistémico y en el tumor, esto debido a diferentes factores como la hipoxia, la presencia de COX2, PGE2, los cuales favorecen la presencia de células Treg, MDSC y éstas a su vez pueden disminuir la cantidad y la función de las células efectoras con actividad anti-tumoral (41-43). Al analizar la proporción de linfocitos en bazo de los ratones inmunizados en el esquema corto de inmunización, observamos que los ratones inmunizados con lisado celular 4T1 + protoxina o toxina Cry1Ac mantenían la misma proporción de linfocitos TCD3+ (34.3% y 31.3% respectivamente) y TCD8+ (20.7% y 20.6% respectivamente) al igual que los ratones sanos (32.9% linfocitos TCD3+ y 22.4% linfocitos TCD8+), mientras que los ratones que desarrollaron tumores mostraban una disminución en la proporción de TCD8+. De manera similar, en el esquema largo de inmunización, los ratones que desarrollaron tumor, entre ellos los inmunizados con lisado celular + toxina Cry1Ac, mostraron una disminución de TCD3+ (21.9%), mientras que los inmunizados con lisado celular 4T1 + protoxina Cry1Ac mantuvieron la misma proporción de TCD3+ (43.7%) que los ratones sanos (38.3%). Estos resultados podrían sugerir que los ratones que no desarrollaron tumor, entre ellos los inmunizados con lisado celular 4T1 + protoxina, y toxina solamente en el primer esquema, tuvieron una mejor respuesta celular citotóxica frente a los tumores, debido a

que la cantidad de linfocitos TCD8 citotóxicos no se modificó y permaneció igual con respecto a los ratones sanos, caso contrario a los ratones que desarrollaron tumor (PBS, lisado celular 4T1 y toxina Cry1Ac en el segundo esquema) en los cuales disminuyó la cantidad de TCD8+ siendo menos eficiente la eliminación de células tumorales.

La presencia de células granulares en bazo tienen un papel importante favoreciendo los tumores, esto mediante la secreción de citocinas, quimiocinas y células granulares que se dirigen desde el bazo hasta los tumores (40,44-46). Nosotros observamos que los ratones inmunizados profilácticamente con lisado celular 4T1 + protoxina Cry1Ac mostraron la misma proporción de células granulares en bazo que los ratones sanos, mientras que los ratones que desarrollaron tumor, tanto en el esquema corto como en el largo (PBS, lisado celular 4T1 y toxina Cry1Ac coadministrada con lisado celular 4T1), mostraron un incremento en la proporción de estas células. Lo que puede sugerir inmunosupresión, favoreciendo la invasión, proliferación y sobrevida de las células tumorales en los ratones que desarrollan tumor (PBS) y los inmunizados con lisado celular 4T1.

Las MDSC son una población de células inmaduras no diferenciadas del linaje mieloide. En recientes años han sido relacionadas directamente con el crecimiento de tumores, ya que suprimen la respuesta antitumoral de linfocitos T, promueven la angiogénesis y favorecen la metástasis (47). Se ha reportado un sustancial incremento de MDSC en sangre, nódulos linfoides, medula ósea y bazo en diferentes modelos de cáncer en ratones, así como en pacientes con diferentes tipos de cáncer, incluyendo cáncer de mama (48-50). En el esquema largo de inmunización profiláctica, observamos la presencia de MDSC en el bazo de los ratones que desarrollaron tumores (PBS) con 53.4%, lisado celular 4T1 con 25.6% y lisado celular 4T1 + toxina Cry1Ac con 39.3%, mientras que los ratones que fueron inmunizados con lisado celular + protoxina Cry1Ac mantuvieron la misma proporción de MDSC que los ratones sanos (7.5% y 6.1% respectivamente). Una característica de la progresión tumoral es el incremento en hematopoyesis extra medular (EMH) y la neutrofilia, las cuales resultan en la evasión de la respuesta inmune y la vascularización de los tumores (51). Varios estudios han establecido el potente mecanismo inmunosupresor de las MDSC (52). La generación e interacción de ROS y óxido nítrico (NO), pueden causar nitración del complejo del receptor de linfocitos TCD8, lo cual reduce la unión del receptor de células T al complejo de péptido con moléculas de MHC I, lo que lleva a una deficiente activación de células T efectoras ante el estímulo con antígenos específicos (53). También está ampliamente reportado que la depleción de L-arginina y cisteína en el microambiente tumoral causado por las MDSC resulta en la disminución de la expresión de la cadena  $\zeta$  de CD3,

inhibiendo la proliferación de linfocitos y disminuyendo la producción de IL-2 e IFN- $\gamma$  (54-56). Este conjunto de estudios, en los que se han establecido algunos de los mecanismos por los cuales las MDSC llevan a cabo su efecto supresor en la respuesta celular antitumoral en los tumores y a nivel sistémico concuerda con los resultados que observamos; ya que los ratones que desarrollaron tumor mostraron incremento en la población de MDSC en bazo, lo que podría explicar la disminución de linfocitos TCD3+ y TCD8+. Sin embargo hace falta evaluar la presencia de MDSC en los tumores, así como el infiltrado de linfocitos TCD4+ y TCD8+ para analizar la respuesta inmunológica en el tumor a nivel *in situ* y a nivel sistémico.

Un factor importante en el desarrollo de la respuesta inmune antitumoral, es la presencia de citocinas, o células productoras de citocinas, como INF- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , favoreciendo las respuestas anti-tumorales, o IL-6 e IL-10, promoviendo el desarrollo de las células tumorales. El IFN- $\gamma$  es sintetizado mayoritariamente por células Th1, NK y por TCD8+. El IFN- $\gamma$  incrementa la expresión de moléculas coestimuladoras en células presentadoras de antígeno, promueve la diferenciación de TCD4+ en Th1, activa a los neutrófilos e incrementa la capacidad lítica de NK (57-58). El TNF- $\alpha$  es producido principalmente por macrófagos activados, aunque también los linfocitos T y NK pueden producirlo. La función de TNF- $\alpha$  consiste en estimular el reclutamiento de macrófagos y linfocitos en la zona de tumor, mediante la activación de los endotelios (59-62). La activación de receptores de TNF- $\alpha$  puede mejorar la generación de células T reactivas a los tumores (63-65).

Nosotros evaluamos la proporción de TCD4+, TCD8+ y células granulares productoras de TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$ , y evaluamos la producción de citocinas (IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-6 e IL-10) en los sobrenadantes de leucocitos totales de los ratones inmunizados. Encontramos que los ratones inmunizados en el esquema corto con lisado celular 4T1 + protoxina Cry1Ac mostraban la misma proporción de TCD4+, TCD8+ (1.10% y 0.84% respectivamente) productores de TNF- $\alpha$ , que los ratones sanos (0.67% y 0.60% respectivamente), mientras que en los ratones inmunizados con lisado celular 4T1 y ratones inmunizados con toxina Cry1Ac coadministrada con lisado celular 4T1 mostraban un ligero incremento en la proporción de linfocitos productores de TNF- $\alpha$ . Mientras que en el esquema largo de inmunización observamos incremento en la producción de IFN- $\gamma$  y TNF- $\alpha$  en los sobrenadantes de leucocitos totales de bazo en los ratones inmunizados con protoxina y toxina al ser estimulados con el lisado tumoral. El incremento en la proporción de linfocitos productores de estas citocinas fue más notorio en los ratones que desarrollaron tumores, lo que podría indicar una respuesta activa antitumoral, que podría haber sido no tan efectiva para eliminar las células tumorales, sin embargo, algunas evidencias

sugieren que la presencia de TNF- $\alpha$  en modelos de ratones y pacientes con cáncer de mama, significa un pobre pronóstico o avance de la enfermedad. Madera y colaboradores, encontraron que macrófagos de peritoneo de ratones con tumores inducidos por la línea celular 4T1, mejoraban la producción de citocinas pro-inflamatorias en respuesta a LPS, lo que les sugería una producción secundaria de TNF- $\alpha$  en sitios distantes al tumor primario, que podría sugerir que las células tumorales 4T1 inducen la reprogramación de estos macrófagos teniendo un rol importante en sitios de pre-metástasis (66). Otros reportes en modelos de ratón, observaron que la ablación de TNF- $\alpha$  reduce la metástasis (67-68). También se ha reportado en pacientes que un incremento de TNF- $\alpha$  circulante, que se relaciona con el estado de inflamación, la progresión de metástasis y la muerte de los pacientes (69-70).

Nosotros utilizamos un modelo de cáncer de mama inducido por la línea tumoral 4T1, las cuales simulan el estadio IV de cáncer de mama en humanos, el estadio más tardío del cáncer de mama, la línea tumoral 4T1 es poco inmunogénica, agresiva y con alta tasas de metástasis. En el presente trabajo demostramos que la inmunización profiláctica con lisado celular 4T1 + protoxina Cey1Ac tuvo un efecto adyuvante antitumoral en ambos esquemas de inmunización, mientras que la toxina Cry1Ac presentó este efecto solo en el primer esquema, sin embargo, encontramos el mecanismo por el cual la protoxina y toxina ejercieron este efecto. Por lo tanto es importante continuar con el estudio del efecto antitumoral de la protoxina y toxina Cry1Ac, que nos ayude a explicar el mecanismo por el cual mejora la respuesta antitumoral. Además se abre la posibilidad de evaluar sus efectos terapéuticos en cáncer.

## **CONCLUSIONES**

Evaluamos el efecto adyuvante antitumoral de la protoxina y toxina Cry1Ac en la inmunización con lisado celular 4T1 en un modelo murino de cáncer de mama empleando dos esquemas diferentes de inmunización. Demostramos que la protoxina Cry1Ac tuvo efecto adyuvante antitumoral a la inmunización con lisado celular 4T1 en ambos esquemas (esquema corto y esquema largo de inmunización), ya que los ratones desarrollaron tumores pequeños en el esquema corto, mientras que en el esquema largo se protegieron completamente al desarrollo de tumores, también observamos que mantenían la misma proporción de TCD8+ y de MDSC que los ratones sanos, mientras que los que desarrollaron tumores mostraban una disminución de linfocitos TCD8+ y un incremento marcado de MDSC. El efecto adyuvante antitumoral de la toxina Cry1Ac a la inmunización con el lisado celular 4T1 solamente lo observamos en el esquema corto de inmunización, en el cual los ratones desarrollaron tumores de menor tamaño al ser comparados con los ratones que desarrollan tumores (PBS) y los inmunizados solamente con el lisado celular 4T1. Sin embargo, hace falta estudiar cual fue el mecanismo por el cual las proteínas Cry1Ac tuvieron efecto adyuvante a la inmunización con el lisado celular 4T1.

## BIBLIOGRAFIA

1. Hanahan D., Weinberg R. A., Hallmarks of cancer: the next generation, *Cell* 2011; 144: 646-674.
2. GLOBOCAN. International Agency for Research on Cancer, World Health Organization, Cancer incidence and mortality worldwide in 2012, consultado en: <http://globocan.iarc.fr/> 21-SEP-2012.
3. Knaul FM, Lopez CL, Lazcano PE, *et al*, México: numeralia de cáncer de mama, Fundación mexicana para la salud 2010, [www.funsalud.org.mx](http://www.funsalud.org.mx)
4. Secretaria de Salud, México, Programa de acción: cáncer de mama 2007-2012, México 2007, p. 11.
5. Schreiber RD, Old LJ, Smyth MJ, Cancer Immunoediting: integrating immunity's roles in cancer suppression and promotion, *Science* 2011; 331 (6024): 1565-1570.
6. Finn OJ, Immuno-oncology: understanding the function and dysfunction of the immune system in cancer, *Annals of oncology* 2012; 23 (supplement 8): vii6-vii9.
7. Dzivenu K, Phill D, O'Donell TJ, Cancer and the immune system: The vital connection, Cancer Research Institute 2013.
8. Bidwell BN, Slaney CY, Withana NP, *et al.*, Silencing of Irf7 pathways in breast cancer cells promotes bone metastasis through immune escape, *Nature Medicine* 2012; 18: 1224-31.
9. Dunn GP, Old LJ, Schreiber RD, The immunobiology of cancer immunosurveillance and immunoediting, *Immunity* 2004; 21 (2): 137-148.
10. Draker CG, Jaffe E, Pardoll DM, Mechanism of immune evasion by tumors, *Advances in Immunology* 2006; 90: 51-81.
11. Khong HT, Restifo NP., Natural selection of tumor variants in generation on "tumor escape" phenotypes, *Nature Immunology* 2002, 3; 999-1005.
12. Blank C, Gajewski TF, Mackensen A, Interaction of PD-L1 on tumor cells with PD-1 on tumor specific T cell as a mechanism of immune evasion: implications for tumor immunotherapy, *Cancer Immunology Immunotherapy* 2005; 54: 307-14.
13. Guermonprez P, Amigorena S, Pathways for antigen cross presentation, *Seminars in Immunopathology* 2005; 26 (3): 257-71.
14. Kichler L, Budinsky AC, Wolfram R, *et al*, Deficiencies in phenotype expression and function of dendritic cells from patients with early breast cancer, *European Journal of Medical Research* 2006; 11 (1): 7-12.
15. Sledge G, Momounas EP, Hortobagyi GN, *et al*, Past, present and future challenges in breast cancer treatment, *Journal of Clinical Oncology* 2014; 32 (19): 1979-86.

16. Ernest B, Anderson KS, Immunotherapy for the treatment of breast cancer, *Current Oncology Report* 2015; 17 (2): 5
17. Arnould L, Gelly M, Penault-Llorca F, *et al.*, Trastuzumab-based treatment of HER2 positive breast cancer: an antibody-dependent cellular cytotoxicity mechanism? *British Journal of Cancer* 2006; 94 (2): 259-67.
18. Emens LA, Breast cancer immunobiology driving immunotherapy: vaccine and immune checkpoint blockade, *Expert Review of Anticancer Therapy* 2012; 12 (12):1597-611.
19. Ramos RN, Chin LS, Dos Santos AP, *et al.*, Monocyte-derived dendritic cells from breast cancer patients are biased to induce CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> FoxP3<sup>+</sup> regulatory T cell, *Journal of leukocyte Biology* 2012; 92 (3): 673-82.
20. Hodi FS, O'Day SJ, McDermott DF, *et al.*, Improved survival with ipilimumab in patients with metastatic melanoma, *New England Journal Medicine* 2010; 363(8): 711-23.
21. Melero I, Gaudermack G, Gerritsen W, *et al.*, Therapeutic vaccines for cancer: an overview of clinical trials, *Nature Review Clinical Oncology* 2014; 11(9): 509-24.
22. Abid H, Salika J, Hruby V, Cancer vaccine adjuvants-recent clinical progress and future perspectives, *Immunopharmacology and Immunotoxicology* 2015; 37: 1-11.
23. Baines J., Celes E., Immune-mediated tumor regression induced by CpG-containing oligodeoxynucleotides, *Clinical Cancer Research* 2003, Vol. 9; 2697-2700.
24. Krieg AM, Therapeutic potential of Toll-like receptor 9 activation, *Nature Review Drug Discovery* 2016; 5: 471-84.
25. Mellor AL, Baban B, Chandler PR, *et al.*, Cutting edge: CpG oligonucleotides induce splenic CD19<sup>+</sup> dendritic cell to acquire potent indoleamine 2,3-dioxygenase-dependent T cell regulatory function via IFN type I signaling, *Journal Immunology* 2005;175: 5601-5605.
26. Conroy H, Marshall NA, Mills KH, TLR ligand suppression or enhancement of Treg cells A double-edged sword in immunity to tumours. *Oncogene* 2008; 27(2):168-80.
27. Caramalho I, Lopes-Carvalho T, Ostler D, *et al.*, Regulatory T cell selectively express toll-like receptor and are activated by lipopolysaccharide, *The Journal of Experimental Medicine* 2003; 197: 403-411.
28. Coussens M., Werb Z., Inflammation and cancer, *Nature* 2002, 420 (6917); 860-867.
29. Khan AA, Khan Z, Warnakulasuriya S, Cancer-associated toll-like receptor modulation and insinuation in infection susceptibility: association or coincidence?, *Annals of Oncology* 2016, 00; 1-14.

30. Rojas HS, Marco RM, Moreno FL, *et al.* Nitric oxide production and nitric oxide synthases immunoreactivity in *Naegleria fowleri*. *Parasitology Research* 2007; 101(2):269-74.
31. Legorreta HM, Meza RO, Moreno FL, Pretreatment with Cry1Ac protoxina modulates the immune response, and increase the survival of Plasmodium-infected CBA/Ca mice, *Journal of Biomedicine and Biotechnology* 2010; 198921.
32. González GE, García HA, Flores MR, *et al.*, The protoxin Cry1Ac of *Bacillus thuringiensis* improves the protection conferred by intranasal immunization with *Brucella abortus* RB51 in a model mouse, *Veterinary Microbiology* 2015; 175 (2-4): 382-8.
33. Moreno FL., Ruiz MJ, Esquivel, R., *et al.*, Cry1Ac protoxin as carrier and adjuvant for the induction of mucosal and systemic antibody immune responses to polysaccharides of *S. pneumoniae* by intranasal immunization in mice. *Scandinavian Journal of Immunology* 2003. 57: 45.
34. Vázquez PR, Moreno FL, Neri BL, *et al.*, *Bacillus thuringiensis* Cry1Ac protoxin is a potent systemic and mucosal adjuvant. *Scandinavian Journal of Immunology* 1999 46:578-584.
35. Moreno FL, Garcia H, Ilhuitzati A, *et al.*, Cry1Ac from *Bacillus thuringiensis* promotes macrophage activation by upregulating CD80 and CD86 and by inducing IL-6, MCP-1 and TNF- $\alpha$  cytokines. *International Immunopharmacology* 2013; 4: 1051-66
36. Guerrero GG, Dean HD, Moreno FL, Structural implication of the induced immune response by *Bacillus thuringiensis* Cry proteins: role of the N-terminal region, *Molecular Immunology* 2004; 41 (12); 1177-83.
37. Jaini R, Kesaraju P, Johnson JM, *et al*, An autoimmune-mediated strategy for prophylactic breast cancer vaccination, *Nature Medicine* 2010, 16 (7): 799-803.
38. Markowitz J, Wesolowski R, Papenfuss T, *et al.*, Myeloid-derived suppressor cells in breast cancer, *Breast Cancer Research and Treatment*. 2013; 140 (1): 13-21.
39. Shankaran V, Ikeda D, Bruce AT, *et al*, 2001, IFN $\gamma$  and lymphocytes prevent primary tumour development and shape tumour immunogenicity, *Nature* 2001; 410: 1107-1111.
40. Bronte V, Pittet MJ, The spleen in local and systemic regulation of immunity, *Immunity* 2013; 39(5):806-818
41. Romagnani S, The Th1/Th2 paradigm, *Immunology Today* 1997; 18: 263-66.
42. Pockaj BA, Basu GD, Pathangey LB, *et al.*, Reduced T-cell and dendritic cells function is related to cyclooxygenase-2 overexpression and prostaglandin E2 secretion in patients with breast cancer. *Annals of Surgical Oncology* 2004; 11 (3): 328-39.



43. Muller AJ, DuHadaway JB, Donover PS, *et al.*, Inhibition of indoleamine 2,3-dioxygenase, an immunoregulatory target of the cancer suppression gen Bin 1, potentiates cancer chemotherapy, *Nature Medicine* 2005; 11 (3): 312-319.
44. Caras I, Grigorescu A, Stavaru C, *et al*, Evidence for immune defects in breast and lung cancer patients, *Cancer Immunology Immunotherapy* 2004; 53 (12): 1146-52.
45. Noy R, Pollard JW, Tumor-associated macrophages: from mechanism to therapy, *Immunity* 2014; 41: 49-61.
46. Cortez RB, Etzrodt M, Newton A, *et al*, Origins of tumor-associated macrophages and neutrophils, *PNAS* 2012; 109(7): 2491-2496.
47. Pollard JW, Tumour-educated macrophages promotes tumor progression and metastasis, *Nature Review Cancer* 2004; 4: 71-78.
48. Youn JI, Nagaraj S, Collazo M, *et al.*, Subsets of myeloid-derived suppressor cells in tumor-bearing mice, *Journal Immunology* 2008; 181: 5791-802
49. Younos I, Donkor M, Hoke T, *et al.*, Tumor-and-organ-dependent infiltration by myeloid-suppressor cells, *International Immunopharmacology* 2011; 11: 816-26.
50. Almand B, Clark JI, Nikitina E, *et al.*, Increased production of immature myeloid cells in cancer patients: a mechanism of immunosuppression in cancer, *Journal Immunology* 2001; 166: 678-89.
51. Pollard JW, Macrophages define the invasive microenvironment in breast cancer, *Journal of Leukocyte Biology* 2008; 84: 623-30.
52. Condamine T, Ramachandran I, Youn JI, *et al.*, Regulation of tumor metastasis by myeloid-derived suppressor cells, *Annual Review Medicine* 2015; 66: 97-110.
53. Talmadge JE, Gabrilovich DI, History of myeloid-derived suppressor cells, *Nature Review Cancer* 2013; 10: 739-52.
54. Gabrilovich DI, Nagaraj S, Myeloid-derived suppressor cells as regulators of the immune system, *Nature Review Immunology* 2009; 9: 163-74.
55. Nagaraj S, Gabrilovich DI, Myeloid-derived suppressor cells, *Advances in Experimental Medicine and Biology* 2007; 601: 213-23.
56. Rodríguez PC, Zea H, Culotta KS, *et al*, Regulation of T cell receptor CD3zeta chain expression by L-arginine, *The Journal of Biological Chemistry* 2002; 277: 21123-29.
57. Zea H, Rodriguez PC, Atkins MB, *et al*, Arginase-producing myeloid suppressor cells in renal cell carcinoma patient: a mechanism of tumor evasion, *Cancer Research* 2005; 65: 3044-48.
58. Srivastava MK, Sinha P, Clemments VK, *et al*, Myeloid-derived suppressor cells inhibit T-cell activation by depleting cystine and cysteine, *Cancer Reseach*. 70: 68-77.

59. Boehm U, Klamp T, Groot M, *et al.*, Cellular responses to interferon-gamma, *Annual Review Immunology* 1997; 15: 749-95.
60. Lee SH, Aggarwal BB, Rinderknecht E, *et al.*, The synergistic anti-proliferative effect of gamma-interferon and human lymphotoxin, *Journal of Immunology* 1984; 133: 1083-86.
61. Lejeune FJ, Ruegg C, Lienard D, *et al.*, Clinical applications of TNF-alpha in cancer, *Current Opinion in Immunology* 1998; 10 (5): 573-580.
62. Van Horsen R, Ten Hagen TL, Eggermont AM, *et al.*, TNF-alpha in cancer treatment: molecular insights, antitumor effects and clinical utility, *Oncologist* 2006; 11: 397-408.
63. Tamada K, Chen L, Renewed interest in cancer immunotherapy with the tumor necrosis factor superfamily molecules, *Cancer Immunology Immunotherapy* 2006; 55: 355-362.
64. Mocelin S, Rossi CR, Pilati P, *et al.*, Tumor necrosis factor, cancer and anticancer therapy, *Cytokine Growth Factor Reviews* 2005; 16: 35-53.
65. Cros M, Duan W, Choi H, *et al.*, TNF superfamily in inflammatory disease: translating basic insights, *Trends in Immunology* 2012; 33: 144-52.
66. Madera L, Greenshields A, Coombs MR, *et al.*, 4T1 murine mammary carcinoma cells enhance macrophage-mediated innate inflammatory responses, *Plos one* 2015; 20 (7).
67. Yu M, Zhou X, Niu L, *et al.*, Targeting transmembrane TNF- $\alpha$  suppresses breast cancer growth, *Cancer Research* 2013; 73: 4061-74.
68. Bonapace L, Coissieux M-M, *et al.*, Cessation of CCL2 inhibition accelerates breast cancer metastasis by promoting angiogenesis, *Nature* 2014; 515: 130-133.
69. Alokail MS, Al-Daghri NM, Mohammed AK, *et al.*, Increased TNF- $\alpha$ , IL-6 and ErbB2 mRNA expression in peripheral blood leucocytes from breast cancer patients, *Medical Oncology* 2014; 31: 38 doi
70. Tripsianis G, Papadopoulou E, Anagnostopoulos K, *et al.*, Coexpression of IL-6 and TNF- $\alpha$ : prognostic significance on breast cancer outcome, *Neoplasma* 2014; 61: 205-212.

## ANEXO I

### Soluciones

<b>Amortiguador de fosfatos-salina (PBS)</b>			
<b>PBS</b>	10X	1X	5X
<b>NaCl</b>	80 g	8 g	40 g
<b>KCl</b>	2 g	0.2 g	1 g
<b>KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub></b>	2 g	0.2 g	1 g
<b>Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub></b>	11.5 g	1.15 g	5.75 g
<b>H<sub>2</sub>O aforar a 1000 ml</b>			

<b>PBS-Tween</b>	
<b>1 litro de PBS1x filtrado</b>	
<b>Ajustar pH a 7.4</b>	
<b>Agregar 500 µl de Tween 20</b>	
<b>Almacenar a 4 °C</b>	

<b>Amortiguador de lisis para eritrocitos</b>	
<b>Tris-HCl (0.01M)</b>	0.157 g
<b>Cloruro de amonio</b>	0.830 g
<b>Agua destilada</b>	100 ml

<b>Medio RPMI (cultivo celular)</b>				
<b>Volumen</b>	100 ml	200 ml	300 ml	500 ml
<b>RPMI</b>	1.039 g	2.078 g	3.117 g	5.119 g
<b>NaHCO<sub>3</sub></b>	0.2 g	0.4 g	0.6 g	1 g
<b>Antibac 100x</b>	1 ml	2 ml	3 ml	5 ml

Ajustar pH a 7.3, disolver y aforar al volumen indicado con agua destilada.

<b>Inhibidor de proteasas (PHMB)</b>		
<b>Trizma base 150 Mm</b>	10 ml	100 ml
<b>Acido p-hidroximercúribenzoico</b>	0.3607 g	3.607 g
<b>Trizma base</b>	0.9 g	0.18 g
<b>H<sub>2</sub>O</b>	50 ml	10 ml

Guardar en alícuotas de 1.5 ml a -20 °C

<b>Paraformaldehido 1%</b>	
<b>Paraformaldehido (Sigma)</b>	1 g
<b>PBS</b>	80 ml

Calentar a 60 °C con agitación, al alcanzar la temperatura adicionar unas gotas de NaOH al 1 M acuoso hasta que se disuelva el paraformaldehido y dejar enfriar. Ajustar pH con HCl 1 N a 7.4 y aforar a 100 ml. Guardar a 4 °C no usarse después de 15 días de haber sido elaborado.

<b>PBA (solución de albumina-azida de sodio)</b>	
<b>Albúmina de suero bovino</b>	0.5 g
<b>Azida de sodio</b>	0.01% (0.01 gr en 100 ml de PBS)
<b>Aforar a 100 ml de PBS esteril</b>	

Almacenar a 4 °C

<b>RPMI (para sacrificio) 50 ml</b>	
<b>RPMI</b>	0.815 g
<b>NaHCO<sub>3</sub></b>	0.1 g
<b>Antibac 100x</b>	500 µl
<b>Piruvato</b>	500 µl
<b>Aminoácidos no esenciales 50x</b>	500 µl
<b>Mercaptoetanol</b>	50 µl
<b>L-glutamina</b>	500 µl

Ajustar pH a 7.3 y filtrar, almacenar a 4 °C

<b>PBS 5% SFB 500 ml</b>	
<b>PBS1x</b>	475 ml
<b>SFB</b>	25 ml

Almacenar a 4 °C

<b>Buffer de carbonatos</b>		
<b>Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub></b>	0.105 g	10 ml
<b>NaHCO<sub>3</sub></b>	0.168 g	20 ml

Agregar la solución más básica (Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>) a las acida (NaHCO<sub>3</sub>) y subir el pH hasta 9.6

<b>Citofix-Citoperm</b>	
<b>PBS1x</b>	90 ml
<b>Saponina</b>	0.1 g
<b>BSA</b>	2 g
<b>Paraformaldehido 1%</b>	1 ml
<b>Azida de sodio</b>	0.1 g

Aforar a 100 ml con PBS1x, envolver el frasco con papel aluminio y almacenar a 4 °C

<b>Perm-Wash 100 ml</b>	
<b>PBS1x</b>	90 ml
<b>Suero fetal bovino</b>	2 ml
<b>Saponina</b>	0.01 g
<b>Azida de sodio</b>	0.01 g

Aforar a 100 ml con PBS1x, filtrar y almacenar a 4 °C

<b>Verseno 500 ml</b>	
<b>Tris-base</b>	1.52 g
<b>NaCl</b>	4 g
<b>KCl</b>	0.2 g
<b>EDTA</b>	0.1 g

Diluir en agua destilada, llevar a pH de 7.7, esterilizar en autoclave y guardar en alícuotas de 35 ml a 4 °C.

## **ANEXO II**

Preparación de anticuerpos

Los anticuerpos se utilizaron a una dilución de (1:100)

### ➤ TINCIÓN PARA EVALUAR PROLIFERACIÓN:

#### **Tinción 1**

- CFSE-FITC
- CD3-APC doble
- CD4-PeCy5
- CD8-Pe

#### **Tinción 2**

- CFSE-FITC
- CD19-Pe
- CD11b-PeCy5
- Gr1-APC

### ➤ TINCIÓN PARA EVALUAR CITOCINAS INTRA-CELULARES:

#### **Tinción 1**

- TNF- $\alpha$ -PE
- CD4-FITC
- CD8-PeCy5
- CD3-APC doble

#### **Tinción 2**

- IFN- $\gamma$ -FITC
- CD4-PeCy5
- CD8-Pe
- CD3-APC doble