



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS

EVALUACIÓN DE LAS PROPIEDADES ANTITUMORALES DEL PÉPTIDO GK-1

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
DOCTOR EN CIENCIAS

PRESENTA:

DIANA TORRES GARCÍA

DIRECTOR DE TESIS
DRA. EDDA LYDIA SCIUTTO CONDE
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS
COMITÉ TUTOR
DRA. LAILA GUTIÉRREZ KOBEH
FACULTAD DE MEDICINA
DR. ENRIQUE ORTEGA SOTO
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS

CDMX. JUNIO DE 2018.



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Ich widme diese Dissertation meinem Bruder Víctor Hugo.

*Nun ist er mir auch mit dem Abschied von dieser sonderbaren Welt ein wenig vorausgegangen. Dies bedeutet nichts.
Für uns gläubige Physiker hat die Scheidung zwischen Vergangenheit, Gegenwart und Zukunft nur die Bedeutung
einer, wenn auch hartnäckigen, Illusion.*

— Brief von Einstein vom 21. März 1955 an Vero und Bice (Beatrice) Besso.
Einstein Archiv Dokument 7-245

*Tus moléculas se han convertido en una improbabilidad cuántica.
Las mías existen en una relatividad espacial y temporal
destinada a terminarse en un tiempo también relativo.
Pero en mis sueños tu presencia es constatable.*

— Kyra Galván, Artificio del duelo, Sueño, 2013.

“We are star stuff which has taken its destiny into its own hands.”

— Carl Sagan, Cosmos

Este trabajo de tesis doctoral se realizó gracias al financiamiento otorgado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) a través de la beca 245638. Aunado a este financiamiento agradezco a la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), al Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas (PDCB) y al Instituto de Investigaciones Biomédicas por las facilidades otorgadas para realizar mis estudios de doctorado.

Agradezco a la Dra. Edda Lydia Sciutto Conde por haberme apoyado y asesorado a lo largo de la realización de este trabajo.

EVALUACIÓN DE LAS PROPIEDADES ANTITUMORALES DEL PÉPTIDO GK-1

ÍNDICE

1. Introducción	10
1.1 Historia del cáncer	11
1.1.1 Primeros registros: Paleopatología en homínidos y humanos	13
1.2 Aspectos generales del cáncer	17
1.2.1 El constructo del cáncer	20
1.2.2 Características del cáncer	21
i. Capacidad de prosperar en un microambiente inflamatorio crónico	25
ii. Capacidad de evadir el reconocimiento del sistema inmune	27
ii. Supresión de la respuesta inmune	29
1.3 Cáncer de mama	32
1.3.1 Origen y evolución	33
1.3.2 Aspectos clínicos	40
i. Epidemiología	40
ii. Cáncer de mama: Un término, ¿muchas entidades?	43
1.4 Respuesta Inmune asociada a neoplasias	50
1.4.1 Teoría de la inmunovigilancia	51
1.4.2 Inmunovigilancia vs Inmunooedición	52
1.4.3 Microambiente tumoral	54
1.5 Modelos murinos de cáncer de mama	58
1.5.1 Modelo 4T1	61
1.6 GK-1: Agente inmunopotenciador	63
2. Planteamiento del problema	67
3. Objetivos	70
3.1 Objetivo general	71
3.2 Objetivos específicos	71
4. Hipótesis	72
5. Metodología	74
5.1 Diseño experimental	75
i. Ratones experimentales	75
ii. GK-1	75
5.2 Cultivo celular	75
5.3 Modelo murino de carcinoma mamario	76
5.4 Evaluación del efecto antitumoral de GK-1	77
i. Curva de supervivencia	77
ii. Toma de muestra de sangre	77
5.5 Análisis histológico	77

5.6 Análisis de factores solubles en suero y extractos proteicos	80
i. Extractos proteicos	80
ii. Análisis de factores solubles en sangre y extractos proteicos	80
5.7 Análisis estadístico	80
6. Resultados	82
6.1 GK-1 incrementa la sobrevida de forma dosis dependiente	83
6.2 Disminución de la tasa de crecimiento tumoral se asocia al tratamiento con GK-1	84
6.3 Necrosis en tumores primarios asociada al tratamiento con GK-1	87
6.4 GK-1 reduce la macrometástasis pulmonar	89
6.5 Perfil de factores solubles asociado al tratamiento con GK-1	90
7. Discusión	100
8. Conclusión	108
9. Referencias	110
10. Anexos	134

ÍNDICE DE FIGURAS

1.1 Jeroglífico de la palabra tumor.	12
1.2 Evidencia más antigua de cáncer en homínidos: Espécimen SK 7923.	14
1.3. Modelo hipotético del origen celular distinto para los subtipos de cáncer de mama.	34
1.4 Modelo hipotético del origen celular común para los subtipos de cáncer de mama.	36
1.5 Modelo hipotético de la progresión del tumor de mama.	38
1.6 Estructura del seno.	46
1.7 Características del modelo murino 4T1.	62
5.1 Metástasis pulmonar macroscópica presente en ratones con tumores inducidos por células 4T1.	79
6.1. La administración semanal de GK-1 incrementa la supervivencia de ratones BALB/cAnN	83
6.2 GK-1 reduce la tasa de crecimiento tumoral de forma dosis dependiente.	84
6.3 Efecto dosis-dependiente del tratamiento con GK-1 en la esplenomegalia.	85
6.4. GK-1 aumenta la necrosis celular en el tumor primario.	87
6.5 Características morfológicas asociadas a necrosis.	88
6.6 El tratamiento con GK-1 se asocia a una menor proporción de tumores metastásicos pulmonares.	89
6.7 Expresión de las concentraciones de factores solubles en suero, tumores primarios, pulmones, hígado, bazo y cerebro de ratones tratados con GK-1 y sin tratamiento.	91
6.8 Los ratones administrados con GK-1 presentan en pulmón un perfil de producción de factores solubles distinto a los animales control.	92
6.9 El tratamiento con GK-1 se asocia a un perfil de producción de citocinas diferencial con respecto a los animales control en cerebro.	93
6.10 GK-1 induce cambios en el microambiente tumoral: perfil de citocinas, quimiocinas y factores de crecimiento.	95
6.11 Correlación de factores solubles en suero y tumor primario asociados al tratamiento con GK-1.	96
6.12 Correlación de factores solubles en pulmones y cerebro asociados al tratamiento	97

con GK-1.	
6.13 Correlación de factores solubles en bazo e hígado asociados al tratamiento con GK-1.	98
S1 Patrones de producción de factores solubles en suero de ratones tratados con GK-1 y sin tratamiento.	135
S.2 El tratamiento con GK-1 se asocia a un perfil de producción de citocinas diferencial con respecto a los animales control en tumor primario.	136
S.3 Patrones de producción de factores solubles en bazo de ratones tratados con GK-1 y sin tratamiento.	137
S.4 El tratamiento con GK-1 se asocia a un perfil de producción de citocinas diferencial con respecto a los animales control en hígado.	138
S5 Solicitud de patente frente al IMPI: Uso del péptido GK-1 como un agente antitumoral y/o antimetastásico.	140
S6 Solicitud de patente internacional PCT: Uso del péptido GK-1 como un agente anti-tumoral y/o antimetastásico.	141

ÍNDICE DE TABLAS

1.1 Método semicuantitativo para asignar una calificación histológica a tumores.	48
6.1. GK-1 reduce la tasa de crecimiento de tumores primarios, la esplenomegalia y el desarrollo de metástasis pulmonares.	86
6.2 El tratamiento con GK-1 se asocia a un perfil diferencial de factores solubles en bazo y cerebro.	94
6.3 Correlación de factores solubles presentes en ratones tratados con GK-1 y controles	99
S.1. Concentración de factores solubles en suero e hígado.	139

ABREVIATURAS

ADA Adenosine deaminase
ADCC Antibody-dependent cellular cytotoxicity, citotoxicidad mediada por anticuerpos
ADN Ácido desoxirribonucleico
AKT Serine/threonine-protein kinases
ARN Ácido ribonucleico
bFGF basic fibroblast growth factor
BPA Bisfenol A
BTLA B- and T-lymphocyte attenuator
CAF Cancer-associated fibroblasts, fibroblastos asociados a cáncer
CCL-2 Chemokine (C-C motif) ligand 2
CD Células dendríticas
CK Citoqueratinas
CPA Células presentadoras de antígeno
CpG C—phosphate—G
CSF-1 Colony stimulating factor 1
CSF1 Colony stimulating factor 1, factor estimulante de colonias 1
CTL Cytotoxic lymphocytes, células T citotóxicas
CTLA4 Cytotoxic T-Lymphocyte Associated Protein 4
CXCL12 C-X-C Motif Chemokine Ligand 12
DCIS Ductal Carcinoma in situ, Carcinoma ductal in situ
DDT Diclorodifeniltricloroetano
DE Desviaciones estándar
DMEM Dulbecco's Modified Eagle Medium
ECM Extracelular matrix
EGF Epidermal growth factor, factor de crecimiento epidérmico
EMT Epitelial-mesenchymal transition, transición epitelial-mesenquimal
ER Receptor de estrógeno,
FAP Fibroblast activation protein-a
GM-CSF Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor
H&E Hematoxilina y Eosina
hCAP109-135 Comprising the C-terminal domain of human CAP18, amino acid residue 109-135
HER2+ Epidermal growth factor receptor 2
HIF1 α Hypoxia-inducible factor 1-alpha
IDO Indoleamine 2,3-dioxygenase
IFN α/β Interferon alpha/beta
IL-10 Interleukin 10
IP-10 Interferon gamma-induced protein 10
KC Keratinocyte chemoattractant
LAG3 Lymphocyte-activation gene 3
LCIS Lobullar Carcinoma in situ, Carcinoma lobulillar in situ
LMP-2 Low molecular mass polypeptides 2
LMP-7 Low molecular mass polypeptides 7

LOH Loss of Heterozygosity
 MAM Macrófago asociado a metástasis
 MCP-1 Monocyte chemoattractant protein-1
 MDSC Myeloid-derived suppressor cells, células mieloides supresoras
 MHC Major histocompatibility complex, complejo principal de histocompatibilidad
 MIG Monokine induced by gamma interferon
 MIP-1a Macrophage Inflammatory Proteins alpha
 MMP Matrix metalloproteinases
 NF-kB Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells
 ns Diferencias estadísticamente no significativas (valor de $p > 0.05$).
 OMS Organización Mundial de la Salud
 PAMP Pathogen-associated molecular patterns, patrones moleculares asociados a patógenos
 PD-1 Programmed cell death protein 1
 PD-L1 Programmed death-ligand 1
 PFOSA Perfluorooctano-sulfonamida
 PI3 Phosphoinositide 3
 PKB Protein kinase B
 PR Receptor de la progesterona,
 pRb Proteína retinoblastoma
 PTEN Phosphatase and tensin homolog
 R2 Coeficiente de correlación.
 SDF-1 Stromal cell-derived factor 1
 SIDA Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida
 SSI Solución salina isotónica
 STAT3 Signal transducer and activator of transcription 3
 TAA Tumor-associated antigens, antígenos asociados a tumor
 TAM Tumor-associated macrophages, macrófagos asociados a tumor
 TAP-1 Transporter associated with antigen processing 1
 TAP-2 Transporter associated with antigen processing 2
 TCR T cell receptor
 TGFb Transforming Growth Factor beta
 Th1 Célula T cooperadora tipo 1
 TIM-3 T cell immunoglobulin and mucin domain 3
 TLR Toll like receptor, receptor tipo toll
 TNF- α Tumor necrosis factor alpha
 TNM Sistema de clasificación basado en T = tamaño del tumor, N= diseminación a nódulos linfáticos (N) y M=presencia o ausencia de metástasis.
 Treg Célula T reguladora
 TSA Tumor-specific antigens, antígenos específicos de tumor
 VEGF Vascular endothelial growth factor

To relieve an illness, one must begin, then, by unburdening its story.

— Siddhartha Mukherjee, *The Emperor of All Maladies*, 2010.

1. INTRODUCCIÓN

EVALUACIÓN DE LAS PROPIEDADES ANTITUMORALES DEL PÉPTIDO GK-1

Even an ancient monster needs a name.

— Siddhartha Mukherjee, *The Emperor of All Maladies*, 2010.

*In some ways disease does not exist until we have agreed that it does- by perceiving, naming,
and responding to it.*

— Charles E. Rosenberg, *Disease in history: frames and framers*, *Milbank Q*, 1989.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 HISTORIA DEL CÁNCER

Con este trabajo se pretende aportar al conocimiento del tratamiento del cáncer, a través de la exégesis de diversos aspectos epistemológicos y ontológicos de dicho padecimiento. En este sentido, es indispensable proporcionar el contexto hermenéutico del cáncer. Al respecto, el primer término empleado para referirse al cáncer fue karkinos, del griego cangrejo. Este término fue acuñado por Hipócrates de Cos ca. 400 a.C. Se cree que el empleo de este término deriva de las observaciones de casos clínicos, en los cuales se advirtió la semejanza entre los apéndices del cangrejo y la vascularización e inflamación, presentes en lo que se cree era un tumor de mama, en un paciente con un estado avanzado de la neoplasia [1]. Adicionalmente, se tiene registro de que Hipócrates identificó al cáncer como una condición potencialmente letal y cuyo origen se creía era el resultado en el incremento de bilis negra, producida por el bazo y el estómago. Ésta se convirtió en la teoría de la carcinogénesis que prevalecería durante los siguientes 1400 años [2,3]. Si bien Hipócrates acuñó el término karkinos, el primer caso documentado de cáncer data del segundo período intermedio del Antiguo Egipto (ca. 1800 a.C. a 1550 a.C.) y se encuentra reportado en el papiro de Edwin Smith [4]. Éste es uno de los papiros médicos más antiguos conocidos hasta el

momento; describe 48 casos de múltiples lesiones, entre ellas, ocho casos de tumores con su tratamiento. En el caso de los tumores superficiales realizaban la extirpación quirúrgica, de manera similar a como se lleva a cabo hoy, aunque también se tiene registro de la destrucción de tejido mediante cauterización. A través de estas inscripciones, se destacan dos aspectos importantes: el primero, los antiguos egipcios consideraban al cáncer como una enfermedad sin cura y cuyo tratamiento prácticamente consistía en cuidados paliativos; segundo, los antiguos egipcios fueron capaces de distinguir entre tumores benignos y malignos [3-5].



Figura 1.1 Jeroglífico de la palabra tumor.

Signo gráfico del Antiguo Egipto, empleado para referirse a un tumor. Descrita en el papiro de Edwin Smith, versión traducida por Breasted [4]

1.1.1 PRIMEROS REGISTROS: PALEOPATOLOGÍA EN HOMÍNIDOS Y HUMANOS

Hasta el momento no se cuenta con registros fehacientes de la prevalencia de neoplasias tanto en homínidos como en las primeras poblaciones humanas debido a las dificultades asociadas al análisis paleopatológico. Dentro de los principales problemas asociados a este tipo de análisis, se encuentran la disponibilidad de muestras, en cuyo caso se limitan a tejido proveniente de momias y restos óseos. Aunado a esto, los cambios *post mortem* derivados de procesos diagenéticos dificultan el diagnóstico diferencial entre lesiones neoplásicas primarias y secundarias, así como entre lesiones ocurridas durante la vida del espécimen y *post mortem*. Lo anterior se debe a alteraciones fisicoquímicas en el suelo y la presencia de microorganismos que pueden modificar los restos óseos generando cambios osteolíticos que emulan lesiones características de neoplasias primarias o metastásicas [5]. No obstante, existen reportes de tumores primarios y metastásicos presentes en restos pertenecientes a homínidos y humanos [6-12]. En este sentido, la evidencia más antigua de cáncer en homínidos fue reportada en el 2016 por Odes y colaboradores [13]. Los restos (espécimen SK 7923) pertenecen a un homínido, cuyo taxón no ha podido ser identificado con exactitud, aunque se cree que puede tratarse de un *Homo ergaster* o *Paranthropus robustus*. Dichos restos fueron encontrados en una cueva en Swartkrans aproximadamente a 40 km al noroeste de Johannesburgo, Sudáfrica; y datan de aproximadamente 1.5-1.8 millones de años [13]. El espécimen SK 7923 comprende el quinto metatarsiano del pie izquierdo, el cual presenta una lesión situada en la superficie próximo-ventral, exofítica y que invade la zona subperióstica del hueso cortical. Además, presenta una reacción subperióstica que levantó el periostio, el cual se osifica, y constituye el signo radiológico llamado triángulo de Codman (Figura 1.2B). Considerando la localización y las características de la lesión, se cree que ésta es consistente con osteosarcoma [13].

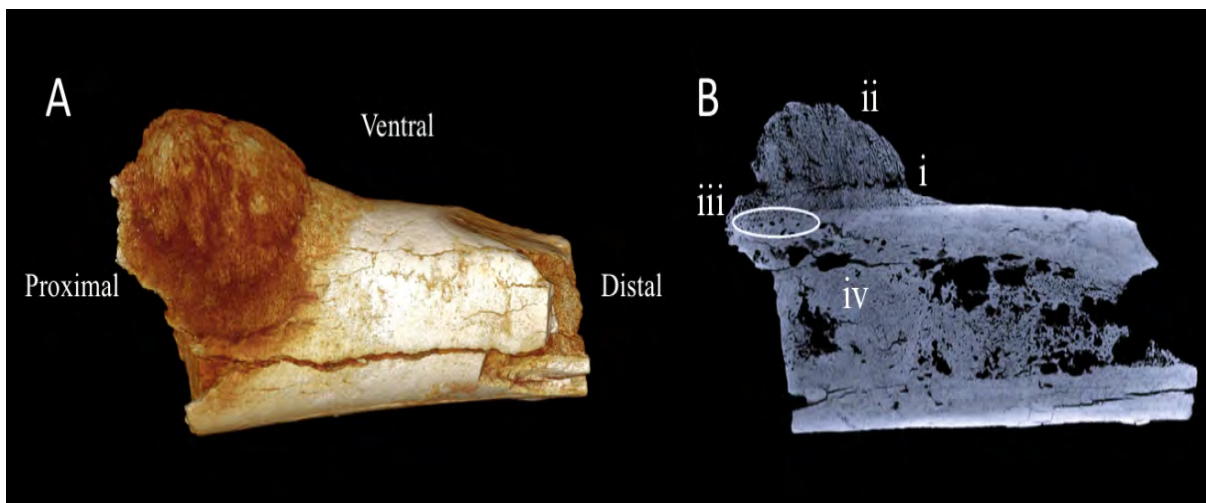


Figura 1.2 Evidencia más antigua de cáncer en homínidos: Especímen SK 7923.

(A) Quinto metatarso con diáfisis metatarsiana proximal y porción distal. (B) Micro-CT axial. i. Indica la formación de nuevo hueso subperiosteamente, formando un triángulo de Codman, ii. masa exofítica osificada y/o masa espiculada adyacente al hueso, iii. invasión subperiosteal localizada en corteza, iv. Hueso remodelado. Modificado de: Odes EJ. 2016 [13].

Por otro lado, con respecto a tumores benignos, la evidencia fósil más antigua en restos óseos de homínidos corresponde a un tumor osteogénico primario presente en la sexta vértebra torácica (especímen U.W. 88-37) de un *Australopithecus sediba* (MH1) diagnosticado con osteoma osteoide. Dicho diagnóstico se basa en la presencia de una lesión de 15 mm de diámetro con vestigios de procesos osteolíticos y osteoesclerótico [14]. Los restos de este homínido datan de hace 1.977 ± 0.002 millones de años, fueron descubiertos en la cueva de Malapa a 15 km al noreste de Sterkfontein, en el valle de Grootvleispruit, en Sudáfrica [15].

En el caso de los registros de cáncer en las primeras poblaciones humanas, las inscripciones en los papiros de Edwin Smith, Ebers [16,17] y Hearst [18] describen diversos casos de tumores. No obstante, es necesario el estudio antropológico de restos humanos, para poder establecer con mayor precisión y exactitud la prevalencia de neoplasias en humanos. En este sentido, en 1976 Strouhal, realizó una de las primeras revisiones de diversos restos humanos con evidencia de neoplasia. Este estudio comprendió el análisis de dos colecciones de restos humanos; una de ellas, comprendía

451 esqueletos que datan del periodo Romano tardío (siglos III a IV d.C.), dichos restos fueron encontrados en Sayala, Nubia Egipcia. La otra colección estaba constituida por 160 restos humanos, en su mayoría cráneos, provenientes del cementerio Naga-ed-Dêr, del Alto Egipto. Los resultados indican la presencia de tumores malignos y benignos, entre ellos destacan miomas uterinos calcificados, quistes dermoides, condromas, carcinoma nasofaríngeo, osteosarcomas, meningioma, tumores angioblásticos, mieloma múltiple, cistadenoma, carcinoma rectal; asimismo, se reportaron algunos casos de metástasis, entre ellas a cráneo, vertebras, pelvis y huesos largos [17, 19]. Posteriormente, en 1980, Torre C y colaboradores realizaron un análisis de 1118 restos óseos de la colección de Marro, del Departamento de Antropología de Torina, la cual incluía cráneos y columnas vertebrales de esqueletos que datan del 2800 a.C. al 1500 a.C., y pertenecen al Antiguo Egipto, encontrados en Ghebelen y Assiut. Al respecto, únicamente se encontraron dos casos probables de mieloma múltiple, dada la presencia de múltiples lesiones osteolíticas en cráneo, mandíbula y costillas [10]. Otra de las revisiones más extensas de restos humanos con evidencia de neoplasias, fue la realizada en 1986 por Pahl, quién reportó 44 casos de neoplasia entre cientos de momias del antiguo Egipto, las cuales comprendían el periodo de la era Arcaica a la Bizantina (3000 a.C. al 500 d.C) [20]. Todos los registros mencionados previamente, corresponden a los restos con mayor antigüedad con cáncer, sin embargo, también se conocen casos de neoplasias en poblaciones antiguas de Europa [21-31], Asia [31,32] y América [33-40]. Considerando los registros de cáncer en homínidos y humanos, la cantidad de tumores diagnosticados entre los miles de restos examinados es relativamente baja y debe considerarse como un reflejo de la prevalencia de neoplasias en la antigüedad. Sin embargo, el poder retrodictivo y explicativo de dichos datos es limitado debido a la baja precisión y exactitud de los métodos diagnósticos, al limitado número de muestras disponibles y a la presencia de artefactos

en las muestras, producto de la rehidratación de los tejidos, la descomposición y la desecación de éstos. Aunado a esto, la variación en la exposición a factores de riesgo, así como cambios en la expectativa de vida, podrían impedir la estimación precisa y exacta de la prevalencia de cáncer en la antigüedad. No obstante, el estudio de la historia del cáncer puede permitir la comprensión de la prevención, la etiología, la patogénesis y el tratamiento de dicha enfermedad.

1.2 ASPECTOS GENERALES DEL CÁNCER

*Diseases desperate grown
By desperate appliance are relieved,
Or not at all.*

— William Shakespeare, Hamlet, Act 4, Scene 3, 1603.

The environment is thus expressed in the structure of each part or the organism.

— J.B.S. Haldane, The Philosophical Basis of Biology, 1917.

Epistemológicamente una enfermedad surge a partir de constructos que derivan del conocimiento científico médico. En términos reduccionistas, una enfermedad es una alteración del estado fisiológico del cuerpo, que se manifiesta a través de síntomas y signos, y cuya progresión puede ser interpretada a través de la elaboración de un proceso patológico; sin embargo, el constructo de la enfermedad debe elaborarse considerando diversos aspectos además del patológico. En este sentido, Charles E. Rosenberg (1986) escribió: “*in some ways disease does not exist until we have agreed that it does- by perceiving, naming, and responding to it...*” [41]. Considerando lo anterior, una enfermedad no existe como un fenómeno social hasta que acordamos que lo hace [41, 42], es decir, los actos de acuerdo relevantes para el constructivismo social se convierten en acuerdos también importantes para el desarrollo del pensamiento médico; por ello debe considerarse que la demarcación de un fenómeno como la enfermedad surge de la interacción entre los elementos de la realidad observada y el observador, dando lugar a un constructo que depende tanto del sujeto como del objeto de estudio.

En 1858, “*omnis cellula e cellula*” de Rudolph Virchow cambiaría la concepción de las enfermedades [43]. A través de este aforismo se pudo consolidar la teoría celular, con lo cual se estableció el principio general, que ningún desarrollo celular de ningún tipo comienza de *novo* y,

en consecuencia, se rechazó la teoría de la generación equívoca (espontánea) [43]. También se determinó que las células no se originaban de un material amorfo (blastema) sino a partir de la división celular [44]. En este sentido, con el advenimiento de la teoría celular, Rudolph Virchow, el padre de la patología, propuso que todas las enfermedades involucran cambios en células normales, es decir, la célula no era únicamente una fuente de vida sino la sede de las enfermedades [45]. De esta forma, las enfermedades comenzaron a caracterizarse a través de cambios anatómicos, lesiones específicas o cambios funcionales y no solamente por un grupo de síntomas [41-46]. En este sentido, la patología consideraría que todas las enfermedades pueden ser explicadas y reducidas a cambios en la estructura y función celular. Con la concepción del origen celular de las enfermedades, Virchow fue el primero en establecer el origen celular del cáncer; creyendo que éste era causado por una irritación severa en los tejidos (la teoría de irritación crónica) [47], lo cual se creía estaba asociado a procesos de inflamación y división celular [45, 47]. Lo anterior, daría lugar a que la mayoría de los estudios del cáncer se enfocaran en descubrir los mecanismos asociados a la transformación de una célula normal en una célula cancerosa (célula transformada). No obstante, para el estudio del cáncer, deben considerarse las interacciones dinámicas que surgen entre la respuesta del organismo a la neoplasia y la respuesta de las propias células cancerosas. Así, podemos visualizar a las neoplasias como un modelo dinámico que realiza procesos no lineales y como un sistema constituido por diferentes componentes interconectados, que se autoorganizan y coevolucionan. Actualmente, uno de los enfoques principales del cáncer es estudiar la enfermedad como un sistema complejo que puede transitar de una forma latente (estado premaligno, lesión precancerosa) a una activa (estado maligno, cáncer invasivo) y por ende presentar múltiples estados inestables que despliegan emergencia [48-50]. La emergencia se refiere a la aparición de estructuras inesperadas y/o la ocurrencia de comportamientos que no se

observan ni se pueden inferir a partir de sus componentes aislados. Un ejemplo de emergencia, en el contexto del cáncer son los cambios genéticos irreversibles en una célula transformada que conducen a la carcinogénesis y a modificaciones citológicas o histológicas que no necesariamente son visibles en las células aisladas [51, 52]. El evaluar el cáncer como un sistema complejo permitirá determinar características de su comportamiento que no pueden ser estudiadas desde un enfoque reduccionista, ya que la visión reduccionista a menudo ignora o simplifica los factores ambientales y las interacciones dinámicas entre las partes del sistema. Una de las características de las explicaciones reductivas es su carácter de nivel inferior, por ejemplo, en el caso del origen del cáncer existen explicaciones exclusivamente asociadas a moléculas y/o genes, los cuales pueden ser casos importantes de explicaciones reductivas, sin que esto implique que sean las únicas explicaciones del origen del cáncer. Lo anterior, podría implicar que enfermedades complejas como el cáncer, al ser multifactoriales no están relacionadas o condicionadas al influjo de un solo gen o factor ambiental, sino que se originan de la acción combinada de muchos genes, factores ambientales y conductas de riesgo, cada uno de los cuales a menudo tiene solo un efecto relativamente débil [48-50]. No obstante, sería incorrecto suponer que aquellas enfermedades catalogadas como complejas carecen de resoluciones con enfoques simples o que sus causas no pueden ser simples [49]. Para el caso de las enfermedades complejas, independientemente del peso de los diversos factores etiológicos y patológicos, es factible establecer estrategias de análisis y tratamiento, mediante la búsqueda de un factor, cuyo control permita eliminar o controlar a la enfermedad [48-50].

1.2.1 EL CONSTRUCTO DEL CÁNCER

La construcción teórica del cáncer no ha sido consensuada, sin embargo, es indispensable considerar los aspectos patológicos, epidemiológicos, sociales y económicos que la circunscriben [51]. El constructo del cáncer se puede elaborar considerándolo un conjunto de enfermedades complejas, no transmisibles, que afectan diferentes órganos y tejidos; inducido por proliferación celular descontrolada y alteraciones en la arquitectura de tejidos y órganos que pueden culminar, en numerosos tipos de cáncer, con la ruptura de membrana basal y la concomitante extravasación celular (metástasis) [51-53].

La disrupción de la morfostásis celular es una característica del cáncer, la cual es causada principalmente por diversos factores que dañan o mutan genes, generando alteraciones homeostáticas que le confiere ventajas adaptativas a las células, permitiéndoles así, adquirir rasgos distintivos (“hallmarks”) y marcas únicas (“snowflakes”) [51-59]. Los rasgos distintivos del cáncer son características celulares presentes de forma consistente entre neoplasias, a pesar de que éstas tengan diferente origen celular y tisular. En contraste, las marcas únicas, surgen a partir del análisis molecular y genético de tumores, lo cual permite dividir a las neoplasias en subcategorías y establecer la alta heterogeneidad inter e intratumoral persistente en el cáncer, es decir, podemos determinar que al igual que los copos de nieve, no hay dos tumores exactamente iguales [57-59]. El establecimiento de estos rasgos distintivos y marcas únicas puede ser producto de la presión selectiva. En este sentido, se sabe que poblaciones que comparten un nicho ecológico y que son sometidas a la misma presión selectiva pueden atravesar por un proceso de adaptación evolutiva que les permitirá desarrollar los mismos rasgos a pesar de tener antecedentes genéticos diferentes [60-62].

1.2.2. CARACTERÍSTICAS DEL CÁNCER

La carcinogénesis es un proceso que comprende múltiples alteraciones genéticas, que pueden producir oncogenes con ganancia de funciones (estimulan la proliferación celular) o genes supresores (restringen la habilidad de las células para dividirse) con pérdida recesiva de funciones [63, 55, 56]. Estas alteraciones pueden ser tan sutiles como mutaciones puntuales o tan complejas como cambios en cromosomas completos [64, 54,56].

Como se mencionó con anterioridad, las células neoplásicas comparten atributos biológicos que operan y se controlan a diferentes escalas espaciales y temporales. En este sentido, se ha propuesto que las células que desarrollan las siguientes facultades se encuentran comúnmente en neoplasias agresivas [53, 56]:

1. Generar señales de crecimiento autónomo. Las células normales requieren señales mitogénicas para pasar de estado quiescente a proliferativo. Estas señales son transmitidas mediante factores de crecimiento difusibles, componentes extracelulares de matriz extracelular, o interacciones célula-célula. En el caso de las células cancerosas, éstas comúnmente generan sus propios mensajes pro-crecimiento, permitiéndoles la independencia de estímulos de crecimiento exógenos [53, 56].
2. Insensibilidad a señales antiproliferativas. Las señales de inhibición de crecimiento inducidas por factores solubles o por inhibidores embebidos en la matriz extracelular, mantienen la quiescencia celular y la homeostasia tisular. Dichas señales dependen de proteínas como retinoblastoma (pRb), p107 y p130. En este sentido, la hipofosforilación de pRb bloquea E2F, un factor de transcripción que controla la expresión de genes esenciales para la progresión de fase G1 a S. Uno de los posibles mecanismos a través del cual podrían las células cancerosas bloquear señales antiproliferativas es mediante TGF β (Transforming Growth Factor beta), factor

soluble que induce la síntesis de p15^{INK4B} y p21, proteínas que bloquean el complejo ciclina:CDK responsable de la fosforilación de pRb [53,65,66].

3. Evasión de mecanismos de muerte programada. En todas las estirpes celulares sanas, la presencia de daño genético crítico activa un programa de muerte celular. Una vez iniciado este proceso las membranas celulares se ven comprometidas, al igual que el citoplasma; los cromosomas son degradados y el núcleo es fragmentando; y al final dicha célula es fagocitada. En contraste, las células tumorales pueden evadir la muerte celular mediante diversos mecanismos, entre los cuales cabe resaltar, la mutación del gen supresor tumoral p53; hipoxia; hiperexpresión de oncogenes; activación de la vía PI3 cinasa-AKT/PKB, entre otros [53, 56]. Es importante señalar que esta habilidad, junto con la capacidad de expansión celular, incrementan la tasa de proliferación celular de las células tumorales.

4. Habilidad de estimular angiogénesis. Durante el proceso de proliferación celular son indispensables nutrientes y oxígeno provistos por la circulación sanguínea. La angiogénesis puede ser inducida de forma ininterrumpida a través de alteraciones en la transcripción genética que conducen al incremento en la expresión de VEGF (Vascular endothelial growth factor) y/o bFGF (basic fibroblast growth factor), o a la disminución en la expresión de inhibidores endógenos de la angiogénesis, como son interferón- β y trombospondina-1[53, 56].

5. Ilimitado potencial replicativo (Inmortalidad). Las células normales pueden dividirse hasta 70 veces. Por su parte, las células malignas necesitan realizar más divisiones para constituir exitosamente un tumor. Lo anterior implica que, a pesar de su capacidad de inhibir la apoptosis, presentar autonomía a señales de crecimiento y de

ser insensibles a señales de inhibición de la proliferación celular, esto no asegura que mantengan de forma indefinida la expansión celular, ya que la senescencia celular inhibirá la proliferación celular. Las células transformadas adquieren potencial replicativo ilimitado debido a que tienen la capacidad de conservar sus telómeros con cada ciclo celular, mediante la sobreexpresión de la telomerasa, la cual agrega repeticiones de hexanucleótidos al final telomérico del ADN [53, 56].

Si bien las cinco características mencionadas son probablemente no letales, la sexta propiedad, la habilidad de invadir tejido cercano y luego hacer metástasis a partes distantes del cuerpo, es la que hace que del cáncer una enfermedad letal.

6. Capacidad para invadir y diseminarse a otros órganos (Metástasis). Con base en las teorías de Virchow, Paget y Ewing, en los años 70's, Josh Fidler propuso que la metástasis es el resultado de eventos estocásticos que derivan en el establecimiento de tumores secundarios y que comprende los siguientes pasos secuenciales: (1) crecimiento de un tumor primario, (2) angiogénesis, (3) transición epitelial-mesenquimal (EMT, epitelial-mesenchymal transition), (4) invasión, (5) intravasación, (6) supervivencia en circulación, (7) extravasación, (8) dormancia y subsecuente crecimiento del tumor secundario [67-72]. Estos pasos permiten establecer los cambios que debe atravesar una célula cancerosa para tener la capacidad de disgregarse del tumor primario, atravesar el torrente sanguíneo o el sistema linfático y establecer un tumor secundario [73-75]. La adquisición de dichos cambios comprende alteraciones morfológicas de organización epitelial a una motilidad mesenquimal, proceso conocido como transición epitelial mesenquimal, EMT. La EMT comprende tanto cambios morfológicos como moleculares, los cuales incluyen la pérdida de polaridad y de E-

caderina, así como la ganancia de marcadores mesenquimales como N-caderina y vimentina, entre otros [68-72].

Además de las características previamente señaladas, en el 2011, dos trabajos independientes sugirieron incluir otras marcas características del cáncer que contemplaban la asociación entre el desarrollo tumoral, la respuesta inmune e inflamatoria [57,76]:

1. Capacidad de prosperar en un microambiente inflamatorio crónico.
2. Capacidad de evadir del reconocimiento del sistema inmune.
3. Supresión de la respuesta inmune.
4. Inestabilidad genómica y mutaciones.
5. Desregulación energética celular (reprogramación del metabolismo energético)

I. CAPACIDAD DE PROSPERAR EN UN MICROAMBIENTE INFLAMATORIO CRÓNICO.

Desde 1863, Rudolph Virchow trató de establecer la relación entre el desarrollo de neoplasias e inflamación [43]. No obstante, no fue sino hasta finales del siglo XIX, que por primera vez se contaba con evidencia que respaldaba dicha correlación [77]. En este sentido, se ha reportado en biopsias de tumores, la presencia de infiltrados de células y mediadores inflamatorios (como prostaglandinas, citocinas, quimiocinas, entre otros), así como remodelado tisular y angiogénesis, similar a los presentados en procesos inflamatorios crónicos [78]. Actualmente, la asociación entre el cáncer y procesos inflamatorios se ha respaldado mediante evidencia que indica que:

1. Existen enfermedades inflamatorias que pueden generar susceptibilidad al desarrollo de diversas neoplasias.
2. Medicamentos antiinflamatorios no esteroideos reducen el riesgo al desarrollo de algunos tipos de cáncer y disminución de la muerte asociada.
3. Las vías de señalización asociadas a la inflamación operan río arriba de mutaciones oncogénicas.
4. Se han reportado infiltrado de células y mediadores inflamatorios en el microambiente tumoral.
5. Se ha observado una disminución en la incidencia y en la diseminación de neoplasias después del tratamiento con moléculas que bloquean mediadores inflamatorios y factores de transcripción indispensables en procesos inflamatorios.
6. En algunas neoplasias, la transferencia adaptativa de células inflamatorias o la sobreexpresión de citocinas proinflamatorias promueve el desarrollo de tumores [79, 80].

En el 2008 Mantovani y colaboradores propusieron la existencia de dos vías que conectan la inflamación con el desarrollo de neoplasias [80]:

1. La vía extrínseca, desencadena mediante un proceso inflamatorio derivado de una infección o daño tisular, lo cual generará la activación de factores de transcripción (NF- κ B, STAT3, HIF1 α , entre otros) en células tumorales, estimulando así la producción de citocinas, quimiocinas, prostaglandinas y con ello el reclutamiento de leucocitos que producirán una respuesta inflamatoria exacerbada asociada a la inducción de proliferación celular, angiogénesis, migración de células tumorales, invasión, metástasis, inhibición de la respuesta adaptativa, entre otros [80].
2. Vía intrínseca, cuyo detonante de la activación de factores de transcripción en células tumorales son cambios génicos como el rearreglo o amplificación de cromosomas, la activación de oncogenes, la inactivación de genes supresores tumorales, entre otros [80].

II. CAPACIDAD DE EVADIR EL RECONOCIMIENTO DEL SISTEMA INMUNE.

La teoría de la inmunovigilancia fue propuesta por Burnet F.M en 1957 [81], la cual señala que:

1. La mayoría de las células transformadas expresan antígenos asociados a tumor (TAA, Tumor-associated antigens) y/o antígenos específicos de tumor (TSA, Tumor-specific antigens) distintos de los presentes en las células de las que derivan [82].
2. Las diferencias antigénicas pueden, bajo ciertas condiciones, ser reconocidas como extrañas e inducir una respuesta inmune antitumoral.

Lo anterior se pone de manifiesto a través de:

1. Incremento en la susceptibilidad e incidencia de neoplasias en sujetos con inmunosupresión asociada a enfermedades como SIDA (Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida), pacientes que recibieron un trasplante de órganos, alteraciones genéticas, grupos etarios (como es el caso de adultos mayores y las etapas del desarrollo humano prenatal y perinatal), entre otros.
2. Regresión espontánea de tumores [83].

Actualmente sabemos que los mecanismos de vigilancia inmune limitan el desarrollo de cáncer, pero no son completamente eficientes. Los tumores que eventualmente progresan son aquellos que son pobremente o no inmunogénicos.

Aunado a lo anterior, el aumento en la inestabilidad genómica en células pre-cancerosas favorece la aparición de clonas con diferente inmunogenicidad. Las clonas pobremente inmunogénicas son aquellas que pueden escapar la inmunovigilancia. Uno de los mecanismos responsables de la evasión a la inmunovigilancia es la pérdida de la expresión de las glicoproteínas del complejo principal de histocompatibilidad (MHC) clase I [84]. Algunos mecanismos asociados a la pérdida de MHC de clase I son:

1. Mutación en una copia del gen de β 2-microglobulina, conjunto con la pérdida de heterocigosidad asociada al segundo alelo (LOH, loss of Heterozygosity) [85].
2. Alteraciones en los genes MHC y en la vía de procesamiento y transporte antigénico, las cuales involucran la desregulación de las subunidades LMP-2 y LMP-7 del proteosoma, así como de los transportadores peptídicos TAP-1 y TAP-2 [86-90].

III. SUPRESIÓN DE LA RESPUESTA INMUNE.

Otra de las características del cáncer es la capacidad de inhibir la respuesta inmune anti-tumoral mediante la producción de factores solubles, así como a través de la inducción de la diferenciación y expansión de estirpes celulares supresoras. En este sentido, las células cancerosas pueden promover:

1. La diferenciación de células T naïve en células Treg a través de TGF- β , IL-10 e IDO (Indoleamine 2,3-dioxygenase) [91].
2. Expansión de células mieloides supresoras (MDSC, myeloid-derived suppressor cells) [92], macrófagos asociados a tumor (TAM, tumor-associated macrophages) [93] y células dendríticas (CD) [94].
3. La sobreexpresión de antígenos propios tolerados y proteínas codificadas por oncogenes [95].

Dichas condiciones inmunosupresoras en el microambiente tumoral pueden inducir:

1. Inhibición de la maduración de CD, de la expresión de MHC y moléculas coestimuladoras (CD80/CD86) mediante la presentación de moléculas de señalización negativa (CTLA4 y LAG3) [95].
2. Ciclos de señalización autocrina. En este sentido, la inmunosupresión puede ser mantenida a través de estirpes celulares como los linfocitos Treg. Lo anterior puede llevarse a cabo mediante la producción de IDO, quinurenina y citocinas como IL-10, TGF- β . En el caso de la quinurenina, ésta puede mediar la supresión de células T efectoras e inducir de la expresión de CTLA-4 y PTEN (phosphatase and tensin homolog) [96].
2. Inhibición de la activación y función de las células T efectoras debido a la producción de TGF- β , IL-10 e IL-35, así como la liberación de ADA (adenosine

deaminase) [97].

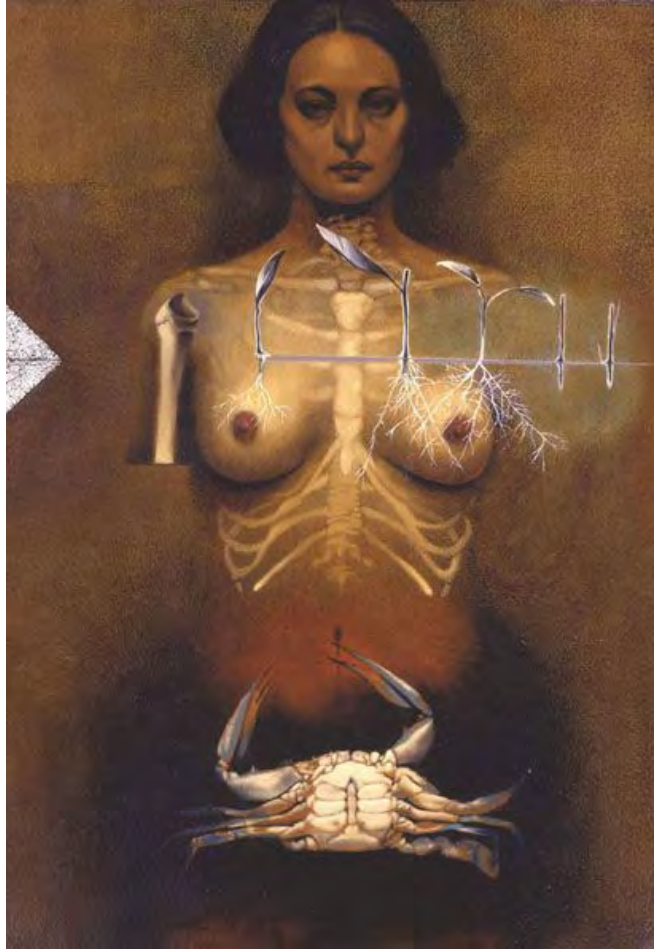
Como se mencionó con anterioridad, este tipo de señales se asocian a la activación y el mantenimiento de funciones tolerogénicas en diversas estirpes celulares, poniendo de manifiesto la capacidad del tumor de orquestar una red de múltiples actividades supresoras, distintas pero integradas [84, 95].

Hasta el momento han surgido múltiples estudios proponiendo incontables rasgos distintivos (hallmarks) del cáncer; dentro de éstos destaca la troncalidad (“stemness”), la cual se basa en la observación histológica de características morfológicas asociadas a estados de dediferenciación en diversos tumores, los cuales a su vez se asocian a perfiles transcripcionales con sobreexpresión de genes normalmente enriquecidos en células madre embrionarias [98,99]. La dediferenciación, también conocido como anaplasia es un fenómeno observado de forma persistente en neoplasias en estado avanzado. Esta anaplasia se caracteriza citológicamente por pleomorfismo nuclear, principalmente observados como núcleos hipercromáticos, contornos anormales del núcleo, nucléolos prominentes y pérdida de la polaridad celular [55, 100]; así como un incremento en el número de mitosis y por ende una capacidad de multiplicación celular superior con respecto a otros estados de la neoplasia [55, 100]. No obstante, es importante señalar que las células tumorales también tienen la capacidad de retener funciones asociadas a su origen tisular, una condición denominada "diferenciación", y la cual se refleja mediante la expresión de ciertas proteínas (como receptores, hormonas, filamentos intermedios del citoesqueleto, etc.) [98,99].

Por otro lado, se han propuestos cambios fisiológicos como modificaciones claves que ocurren a nivel molecular. En este sentido, se han propuesto como modificaciones claves asociadas a neoplasias: “metilación aberrante del ADN” [101], “desregulación de la metilación del ADN y modificación de histonas” [102,103], “hipermetilación de las islas CpG e hipometilación genómica

global "[104-106], "hipermetilación del promotor de los genes distintivos del cáncer" [107], "regulación anormal de microARN" [108,109], "aneuploidía " y " aberraciones cromosómicas " [110-114], "señalización NF-kB alterada" [115], "disfunción mitocondrial" [116, 117], "alteración de la función bioenergética de las mitocondrias" [118], "cambio en el metabolismo celular" [119-121], "avidez de glucosa"[122], "cambio en el metabolismo de la glucosa desde la fosforilación oxidativa a la glucólisis"[117, 123], "alteración de la glucólisis"[124], "desregulación del ciclo celular y puntos de control defectuosos de la integridad del genoma"[125], "senescencia celular alterada"[126], "autofagia desactivada"[127], "interrupción de las uniones celulares"[128], "evasión de la respuesta inmune"[129], "hipoxia regional"[130], "acidosis en el microambiente"[130]. Con base en lo anterior, podemos establecer que estos marcadores comprenden cambios que ocurren a nivel molecular y que probablemente sean eventos secundarios relacionados a los seis signos originales propuestos por Douglas Hanahan y Robert A. Weinberg [53]. Por lo anterior, surge la necesidad de un formalismo matemático unificador que permita establecer la correlación entre alteraciones globales y modificaciones en perfiles moleculares y de transcripción de genes, con lo cual podrían determinarse los cambios en el transcriptoma celular responsables de la progresión de un fenotipo normal a uno maligno [131].

1.3 CÁNCER DE MAMA



Anatomía de una Dios (1993), de Arturo Rivera (1945). Pintura que pertenece a la serie: El Rastro del Dolor. Esta obra pretende a través del realismo ser una representación objetiva de la observación de los cambios y deformaciones de la anatomía humana asociados a procesos patológicos.

“La medicina y el arte no ofrecen antagonismos, tienen las mismas fuentes, todo ello asentado sobre la anatomía, que se lanza, en el amplio concepto que actualmente encierra, a dar a unos las particularidades de las formas, y a otros el origen de la vida”.

— Ángel Jorge Echeverri, Medicina y arte

1.3.1 ORIGEN Y EVOLUCIÓN

Disease can, of course, be construed in one of its primary aspects as the working out of a pathological process.

— Charles E. Rosenberg, *Disease in history: frames and framers*, 1989.

El cáncer de mama es una neoplasia heterogénea que se origina de tejido epitelial mamario; es considerado como un grupo de padecimientos que pueden ser clasificados con base en sus características moleculares, aspectos clínicos, respuesta a tratamientos y factores de riesgo asociados. Actualmente, esta neoplasia es clasificada por la Organización Mundial de la Salud (OMS) en 20 diferentes subtipos [132]. Dentro de la clasificación de tumores de mama, destacan los siguientes subtipos moleculares: el basal, luminal A, luminal B, y aquellos que sobreexpresan HER2+ (epidermal growth factor receptor 2), los cuales se definieron con base en análisis de perfiles de expresión génica en múltiples muestras de dichos tumores [133-135]. La relevancia de estos subtipos tumorales radica en su incidencia y el pronóstico asociado a cada uno [136], lo que sugiere que para cada subtipo tumoral pueden existir distintas vías de progresión tumoral. Esto se ha tratado de explicar a través de diversos modelos, entre ellos destaca la hipótesis de la célula diferente (Figura 1.3) [95]. De acuerdo con dicha hipótesis, cada subtipo tumoral se inicia a partir de una célula de diferente tipo (presumiblemente en una célula progenitora o madre), con base en los patrones de expresión de citoqueratinas (CK). Los subtipos de cáncer de mama luminal se asemejan a las células epiteliales lumbales normales que expresan CK8/18, mientras que el subtipo basal expresa CK5/6 como las células troncales basales. Por lo tanto, se ha propuesto que estos tumores surgen a partir de diferentes tipos de células, y que los tumores lumbales surgen de células progenitoras lumbales, mientras que los tumores basales se originan de células madre [137-140]. Sin embargo, comparaciones de perfiles transcripcionales de subtipos moleculares de

tumores de mama con perfiles de expresión génica de células aisladas de tejido epitelial mamario sugieren que diferentes subtipos moleculares de cáncer de mama pueden surgir de células con diversos estadios de diferenciación [141].

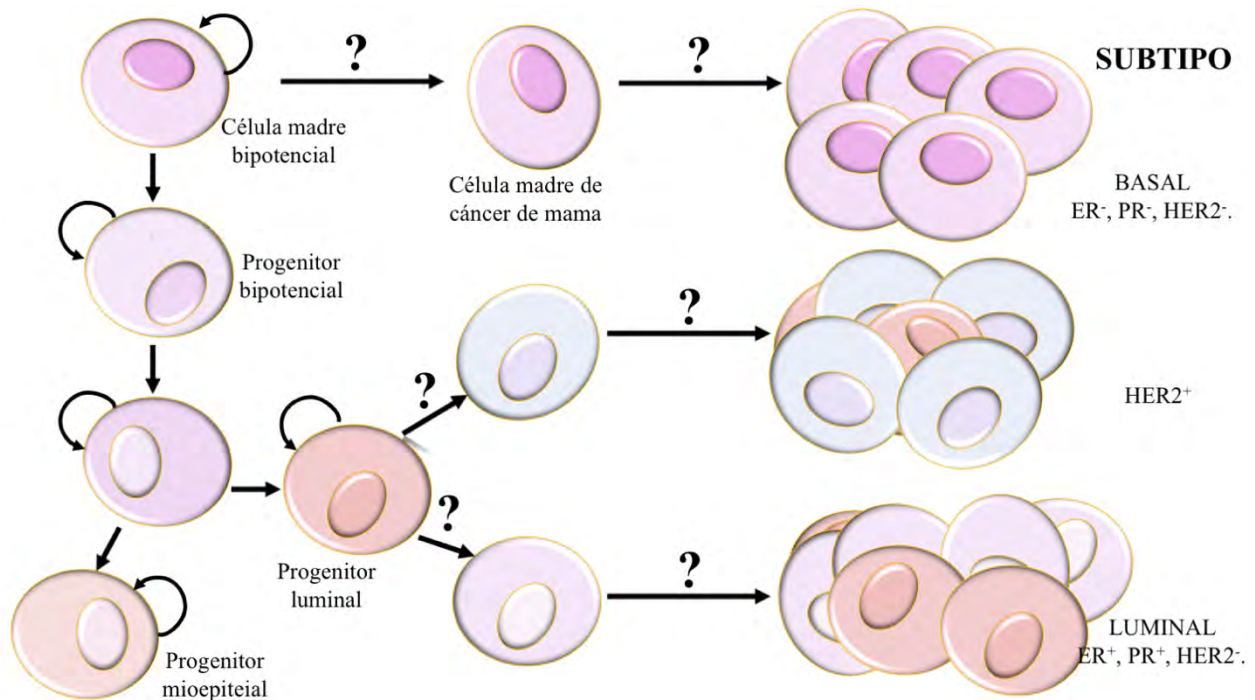


Figura 1.3 Modelo hipotético del origen celular distinto para los subtipos de cáncer de mama.

En esta figura se muestra un modelo hipotético de la generación de los subtipos de cáncer de mama. En la hipótesis el origen de los subtipos tumorales subyace en células de diferentes tipos. ER= receptor de estrógeno, PR= receptor de la progesterona, HER2 = epidermal growth factor receptor 2. Modificado de: Polyak K. Breast cancer: origins and evolution. J. Clin. Invest. 117:3155–3163 (2007). doi:10.1172/JCI33295 [98].

En contraste, existe otro modelo hipotético que propone que el origen de los subtipos tumorales subyace en el mismo tipo de célula, lo cual en conjunto con eventos genéticos y epigenéticos le confieren al tumor primario su fenotipo particular (Figura 1.4) [98]. No obstante, existe evidencia que denota que alteraciones en la proporción de claudina presente en tumores, correlaciona con perfiles de expresión génica similares a los característicos de células madre mamarias, adicionalmente, se ha reportado que los perfiles de expresión génica de tumores basales se parecen

a los progenitores luminales bipotentes o tempranos [142-144]. Con base en lo anterior, es poco factible que las células tumorales pudieran derivar del mismo tipo de célula, perder marcadores específicos de la célula de origen y adquirir otros (plasticidad epitelial). Un ejemplo de esto es la EMT, en la que las células epiteliales transformadas cambian a un fenotipo mesenquimal cuyo perfil de expresión génica se parece al de las células madre [145]. Aunado a esto, la EMT se asocia con una mayor movilidad y una mayor invasión de células. Sin embargo, una vez que llegan a un sitio distante, estas células pueden volver a un fenotipo epitelial después de las interacciones con el microambiente local [69, 146-148].

La historia natural del cáncer de mama implica la progresión a través de etapas clínicas y patológicas definidas, comenzando con hiperproliferación ductal, con evolución posterior en carcinomas *in situ* e invasivos, y finalmente en enfermedad metastásica [149,150]. En este sentido, el desarrollo del tumor puede afectar tanto al epitelio como a los tejidos conectivos mamarios. Sin embargo, las neoplasias que derivan de tejido conectivo o sarcomas son raros en la mama. La mayoría de los cánceres de mama y más del 85% de todos los cánceres humanos son de origen predominantemente epitelial (carcinomas). Por otro lado, el origen celular del cáncer de mama les confiere a los tumores diferentes características que se asocian a cambios en la tasa de crecimiento y en la diferenciación celular y tisular (anaplasia) [151].

Se cree que el inicio del cáncer de mama deriva de eventos de transformación genética y epigenética en una sola célula. Posteriormente, la progresión tumoral es impulsada por la acumulación de cambios genéticos adicionales, combinados con expansión y selección clonal [98]. Con base en lo anterior, se ha propuesto que la progresión de los tumores de mama consiste en la transición de carcinoma, *in situ*, invasivo y metastásico mediante cambios en las células presentes en el estroma (leucocitos, fibroblastos, miofibroblastos y células endoteliales). En este sentido, en

los carcinomas *in situ*, las células mioepiteliales se alteran epigenética y fenotípicamente, induciendo una disminución en su densidad celular y promoviendo la degradación de membrana basal. Al mismo tiempo, aumenta el número de fibroblastos estromales, miofibroblastos, linfocitos y células endoteliales. La pérdida de células mioepiteliales y de la membrana basal da como resultado carcinomas invasivos y metastásicos (Figura 1.5) [98].

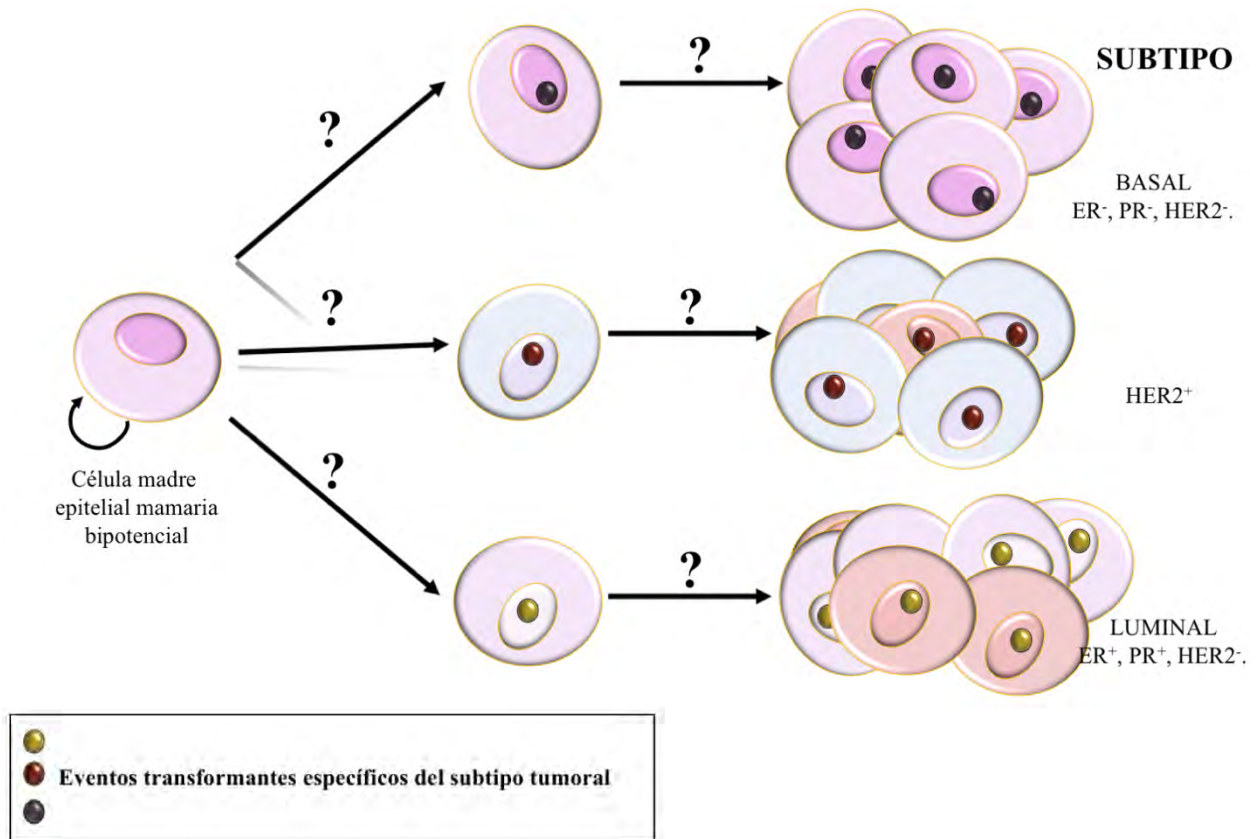


Figura 1.4 Modelo hipotético del origen celular común para los subtipos de cáncer de mama.

En este modelo se cree que el subtipo tumoral surge a partir de la misma célula madre, pero se diferencia con base a diversos eventos transformantes de origen genético y epigenético. ER= receptor de estrógeno, PR= receptor de la progesterona, HER2 = epidermal growth factor receptor 2. Modificado de: Polyak K. Breast cancer: origins and evolution. J. Clin. Invest. 117:3155–3163 (2007). doi:10.1172/JCI33295 [98].

Los eventos que conducen a la diseminación del cáncer de mama son de gran relevancia para establecer el manejo clínico del paciente y predecir la progresión y desenlace de la enfermedad.

En ese sentido, es indispensable estudiar los eventos que derivarán en la transición del DCIS (por sus siglas en inglés, Ductal Carcinoma *in situ*) al carcinoma invasivo y la concomitante diseminación metastásica de los tumores primarios a órganos distantes. Hasta ahora no se han identificado eventos genéticos que subyacen a estas transiciones. Sin embargo, el criterio diagnóstico que distingue a los carcinomas invasivos de los *in situ* es la desaparición de la capa de células mioepiteliales como una entidad organizada [152]. Estudios han revelado que las células mioepiteliales asociadas con DCIS no son fenotípicamente normales; han perdido algunos de sus marcadores de diferenciación y tienen genes regulados al alza que promueven la angiogénesis e invasión [153]. Adicionalmente, en comparación con sus contrapartes normales, las células mioepiteliales asociadas con DCIS presentan un incremento en la producción de enzimas que degradan matriz extracelular (ECM, extracellular matrix), como metaloproteasas de matriz (MMP, matrix metalloproteinases) [153].

En conjunto los hallazgos histopatológicos y los cambios en marcadores de diferenciación, indican que durante la tumorigénesis las células mioepiteliales se desdiferencian, dando como resultado la desaparición de la capa de células mioepiteliales y la subsecuente progresión a la forma invasiva [98]. Con base en lo anterior, se establece la relevancia de las células mioepiteliales y células estromales con capacidad de degradar la membrana basal en la progresión del carcinoma *in situ* a la forma invasiva [154-156]. No obstante, estudios recientes han demostrado que el curso de la enfermedad no está únicamente vinculado a las características del microambiente local o estroma, sino también a las características intrínsecas del tumor [157-163]; a la comunicación y modulación entre el tumor y el estroma; a variaciones genéticas e inmunológicas específicas del paciente, generando así varios niveles de complejidad que contribuyen a la heterogeneidad del cáncer de mama y al curso de la enfermedad.

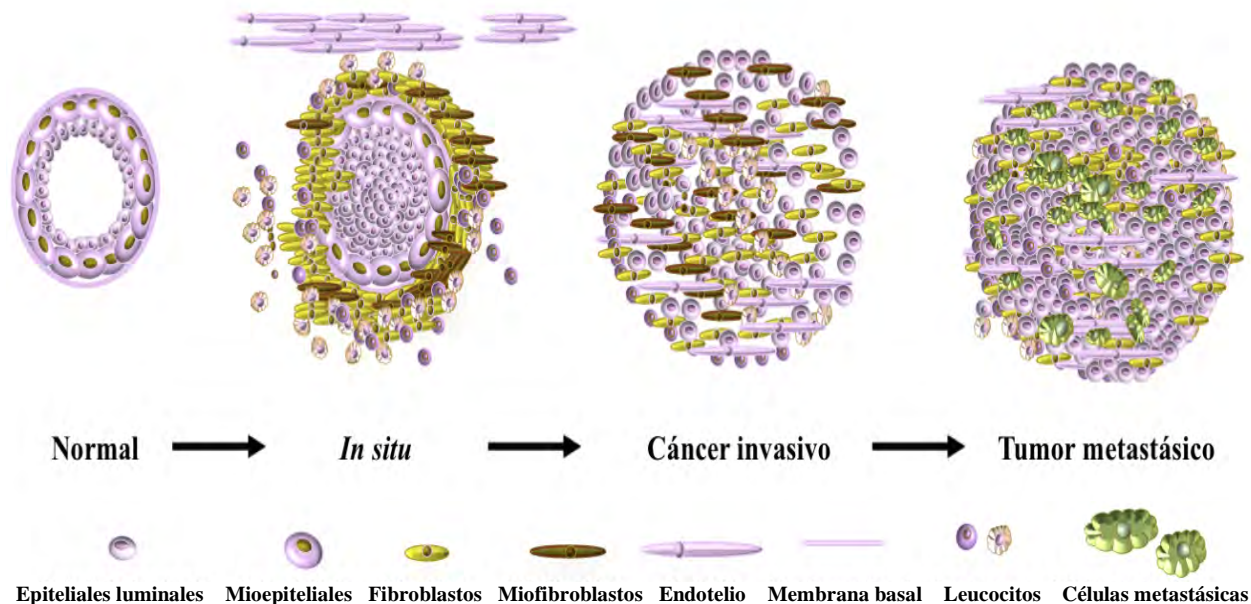


Figura 1.5 Modelo hipotético de la progresión del tumor de mama.

Se observa los cambios en la proporción y tipo de estirpes celulares asociados a la progresión de lesiones *in situ* a tumores metastásicos; progresión que también se acompaña de alteraciones genéticas y epigenéticas. Modificado de Polyak K. Breast cancer: origins and evolution. *J. Clin. Invest.* 117:3155–3163 (2007). doi:10.1172/JCI33295 [98].

En el caso del microambiente tumoral existen diversas estirpes celulares que son indispensables para el pronóstico de la enfermedad. Al respecto, se ha reportado que el aumento en el número de macrófagos asociados a tumores (TAM) correlaciona con un pronóstico malo [164], lo que refleja su capacidad para favorecer la invasión de células tumorales [165,166]. Esto está mediado en parte por un ciclo paracrino mutuo que involucra factores de crecimiento producidos por macrófagos que influyen en la migración de células tumorales, como el factor de crecimiento epidérmico (EGF, epidermal growth factor) y factores de crecimiento producidos por células tumorales que atraen macrófagos, como el factor estimulante de colonias 1 (CSF1, colony stimulating factor 1) [167]. Por otro lado, las células T asociadas a tumores pueden tener diferentes efectos, dependiendo del estado de activación. Las células T de tipo Th1 se asocian con un mejor pronóstico [162,168-171], mientras que las células Tregs inmunosupresoras se asocian con progresión tumoral y un mal

pronóstico [172-174].

Además de los factores microambientales previamente señalados, los fibroblastos asociados a cáncer (CAF, , cancer-associated fibroblasts) secretan factores protumorales como:

1. Quimiocinas como SDF-1/CXCL12, la cual promueve la migración de células tumorales al estroma [175] e induce angiogénesis mediante el reclutamiento de células progenitoras endoteliales [176].

2. Metaloproteinasas de la matriz, que generan la degradación de la ECM [177].

Con base en lo anterior podemos concluir que la heterogeneidad del cáncer de mama se circunscribe en función de las interacciones dinámicas previamente descritas [140].

1.3.2 ASPECTOS CLÍNICOS

I. EPIDEMIOLOGÍA

De acuerdo con la OMS en el 2012 el cáncer fue la primera causa de mortalidad y morbilidad (8 millones de muertes y 14 millones de nuevos casos) a nivel mundial [178]. Entre las mujeres, la neoplasia más frecuentemente diagnosticada y con mayor número de muertes asociadas fue el cáncer de mama, con un total del 15% de las muertes asociadas al cáncer en mujeres (0.5 millones). Ese mismo año, el cáncer de mama presentó la mayor incidencia con 43.3 casos por cada 100 000 habitantes (1.7 millones de casos nuevos), representando el 25.2% del total de los casos entre mujeres [179]. Hasta el momento, no se conoce con exactitud la etiología del cáncer de mama, sin embargo, se sabe que es multifactorial y que existen correlaciones claras entre cierto tipo de factores y el desarrollo de esta neoplasia. Al respecto, se sabe que la historia familiar es uno de los determinantes de riesgo más fuertes, aunque representan solamente una proporción de los casos de cáncer de mama. Dentro de los factores familiares de predisposición se consideran mutaciones en los genes BRCA1, BRCA2, y TP53, las cuales representan más de un 25% de incremento en la susceptibilidad al cáncer de mama [180]. Otros factores de riesgo considerados por la OMS son:

- El género. Si bien el cáncer de mama se presenta con mayor frecuencia en mujeres (representando el 99% de los casos), los hombres no están exentos. De acuerdo con la American Cancer Society desde 1975 la incidencia ha incrementado 0.8% anualmente desde 1975. Actualmente, la incidencia en hombres es aproximadamente del 1% del total de casos, lo cual dificulta la evaluación de los factores etiológicos en este grupo. Existen pocos estudios sobre la etiología del cáncer de mama en hombres, sin embargo, se sabe que los principales factores de riesgo son ginecomastia, el síndrome de Klinefelter, obesidad, exposición a radiación, falta de actividad física, fracturas óseas previas, mutaciones en los genes

BRCA1 y BRCA2 [179,181], desórdenes testiculares, tabaquismo, entre otros [179, 182, 183].

- El grupo etario. El 79% de los nuevos casos y el 88% de las muertes asociadas al cáncer de mama se presentan en mujeres mayores de 50 años y dicho riesgo aumenta con la edad [179].
- Grupo Étnico. De acuerdo con la OMS considerando todos los grupos etarios, las mujeres no hispanas de tez blanca presenta una mayor incidencia de cáncer de mama en general, no obstante, se sabe que las mujeres Afroamericanas, al igual que los hombres afroamericanos, presentan una mayor incidencia de casos de cáncer de mama antes de los 40 años y se sabe que son más propensas a morir sin importar la edad. Esto tal vez se debe a que en las mujeres afroamericanas existe una mayor prevalencia de tumores ER- con respecto a los ER+. Por último, las mujeres asiáticas tienen una menor incidencia y muertes asociadas al cáncer de mama con respecto a otros grupos étnicos [184].
- Otros factores:
 - I. La fisiología reproductiva como factor de riesgo: la nuliparidad y el primer parto después de los 30 años, en este sentido, para una mujer que tiene a su primer hijo a la edad de 30 años, el riesgo es casi el mismo que el de una mujer nulípara y aproximadamente el doble que el de una mujer que procrea a su primer hijo antes de los 20 años [179, 184].
 - II. Factores ambientales como consumo de bebidas alcohólicas, uso de ciertos anticonceptivos en el tratamiento de la menopausia (terapia de reemplazo hormonal), exposición a químicos como arsénico [185, 186], bisfenol A (BPA) [187], insecticidas (diclorodifeniltricloroetano (DDT), perfluorooctano-

sulfonamida (PFOSA), y contaminación del aire (dioxinas) [188], entre otros.

III. Exposición a radiación ionizante.

IV. Factores asociados al estilo de vida como son dietas con alto contenido calórico correlacionadas con la obesidad y con el consumo de grasa, proteína animal y azúcar refinado [183], así como la falta de ejercicio [179].

II. CÁNCER DE MAMA: UN TÉRMINO, ¿MUCHAS ENTIDADES?

Para comprender cómo surge la heterogeneidad tumoral, es indispensable conocer la arquitectura normal mamaria (Figura 1.6) [189]. Las glándulas mamarias o mamas son glándulas sudoríparas modificadas. La mama está compuesta por 15-20 lóbulos de glándulas tubuloalveolares, los cuales tienen su propio conducto galactóforo (2-4 mm de diámetro) que desembocan en el pezón a través de pequeños orificios (0.4-0.7 mm de diámetro). Por debajo de la areola cada conducto galactóforo muestra una dilatación llamada seno lactífero, que se estrecha hacia la desembocadura en el pezón. Los lóbulos se distribuyen radialmente alrededor del pezón y la areola, separados por bandas de tejido conjuntivo denso (ligamento suspensorio de la mama o de Cooper) y tejido adiposo abundante. Los lóbulos están formados por numerosos lobulillos de pequeño tamaño, constituidos por grupos de alveolos o adenómeros (unidad secretora) drenados por las ramas terminales (conductos alveolares) del conducto galactóforo correspondiente. Entre los lobulillos hay tejido conjuntivo mucho menos denso y poco tejido adiposo [140,189-191].

El epitelio que reviste los conductos presenta variaciones regionales. Cerca de la desembocadura en el pezón, el epitelio es plano estratificado, con transición a epitelio cúbico de dos capas en los senos lactíferos y luego a cilíndrico o cúbico simple o de una capa en el resto del sistema de conductos. Entre el epitelio y la lámina basal se encuentran las células mioepiteliales fusiformes, orientadas longitudinalmente en los conductos más pequeños. Con la formación de los alveolos rudimentarios después de la pubertad, las células mioepiteliales asociadas a estos son de forma estrellada, con una trama de prolongaciones citoplasmáticas que envuelven radialmente a cada alveolo. Los alveolos con capacidad secretora aparecen normalmente sólo durante el embarazo [140,189-191].

La estructura histológica de las unidades secretoras de las glándulas mamarias presenta variaciones dependiendo de la edad, el embarazo y la lactancia. En la glándula inactiva, las unidades

glandulares consisten principalmente de la parte distal de los elementos ductales (conductos alveolares). En la etapa inicial del ciclo menstrual los conductos parecen cordones celulares con poca o carentes de luz; en el clímax de la fase estrogénica, cerca de la ovulación, los conductos presentan luz con secreción escasa proveniente de las células de los alveolos rudimentarios cuyas células se hacen cilíndricas. En la fase progestacional se acentúa lo anterior y el tejido conjuntivo más laxo intralobulillar presentan más cantidad de líquido tisular [140,189-191].

Es importante recordar que todos los tejidos constitutivos de la mama son reactivos a estímulos hormonales, desde la pubertad hasta el final de la vida reproductiva. Las hormonas más importantes que tiene tropismo por la mama son los estrógenos, la progesterona, el lactógeno placentario, la prolactina (induce y mantienen la secreción merócrina y apocrina de leche), los corticoides suprarrenales y la oxitocina (contrae las células mioepiteliales para la eyección de la leche) [140,189-191].

La mayoría de los tumores de mama se desarrolla a partir de células epiteliales (carcinomas) de los conductos o de los lóbulos. Sin embargo, pueden presentarse tumores en otros tejidos asociados a la mama, como sarcomas asociados a músculo, tejido adiposo o conectivo [189, 190] pero su incidencia es mucho menor con respecto a los carcinomas. El tipo de carcinoma más común es el adenocarcinoma, el cual se origina en las unidades secretoras (cáncer lobulillar) [140,189-191].

La patología clásica ha segregado los tumores de mama en múltiples categorías, basadas en su morfología general y organización estructural [140]. En este sentido, los tumores pueden subdividirse en lesiones *in situ* e invasivas.

Las lesiones *in situ* se consideran pre-invasivas, dado que las células epiteliales malignas aún están confinadas al árbol ducto-lobular de la mama, y la membrana basal que los rodea se considera intacta en la medida que no sea penetrada por células cancerosas [189, 190].

Las lesiones pre-invasivas se dividen en:

1. Carcinoma ductal *in situ* (DCIS, por sus siglas en inglés, Ductal Carcinoma *in situ*). Es también conocido como carcinoma intraductal y se presenta en 1 de cada 5 casos nuevos de cáncer de mama. El DCIS es una lesión no invasiva. Sin embargo, los cambios morfológicos celulares presentes en este tipo de tumor son similares a los encontrados en células cancerosas [192,193] y tiene potencial invasivo si no se tratan a tiempo [194]. Se ha reportado que en algunos casos este tipo de tumores crecen tan despacio que incluso sin tratamiento pueden no afectar la salud del paciente.
2. Carcinoma lobulillar *in situ* (LCIS, Lobullar Carcinoma *in situ*). También conocido como neoplasia lobulillar es un factor de riesgo para desarrollar cáncer (en un periodo de 20 a 25 años). El LCIS es mucho menos común que el DCIS; del 2006 al 2012 se presentó en cerca del 12% de los casos totales diagnosticados [195,196].

Por otro lado, con respecto a las lesiones invasivas, éstas son muy comunes entre los tumores de mama (lesiones invasivo-infiltrantes). Esto significa que las células cancerosas han atravesado las paredes de los conductos galactóforos o de las unidades secretoras [197]. El pronóstico de este tipo de tumor depende de la estadificación de la neoplasia [198]. En este sentido, existe el sistema de clasificación TNM, el cual se basa en el tamaño del tumor y su extensión dentro de la mama (T); la diseminación a nódulos linfáticos (N) y la presencia o ausencia de metástasis (M). Una vez que se determina el estadio TNM se asigna un grado de 0, I, II, III o IV, dependiendo de la progresión de la enfermedad [198].

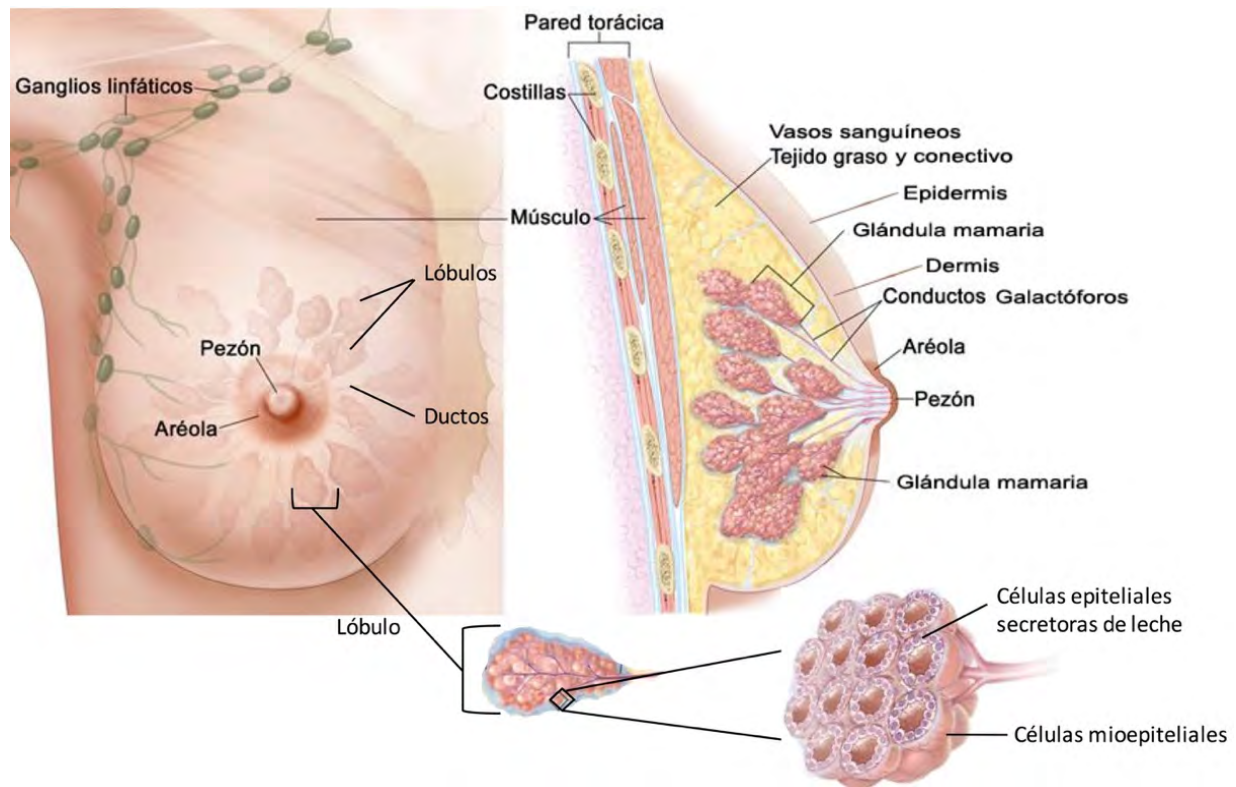


Figura 1.6 Estructura del seno.

La glándula mamaria (mama) está compuesta por 15 a 20 glándulas tubuloalveolares de origen epidérmico, organizadas en lóbulos y lobulillos drenados por un sistema propio de conductos ramificados: alveolares, galactóforos y senos lactíferos que desembocan en la punta del pezón. Las células mioepiteliales contráctiles dispuestas en distintos patrones rodean el epitelio ductual y alveolar, dentro de una membrana basal que encierra todo el sistema epitelial. Las unidades glandulares, junto con nervios, vasos sanguíneos y linfáticos están suspendidos en tejido adiposo, en tejido conjuntivo laxo y denso. Modificado de: <https://www.cancer.org/es/cancer/cancer-de-seno/acerca/que-es-el-cancer-de-seno.html> [193].

Además de la clasificación anterior, mediante la morfología histológica de los tumores se pueden establecer las diferencias tanto intra como inter tumoral y correlacionarlas con el grado de malignidad de la neoplasia, lo cual permite obtener una medida de qué tan desdiferenciadas están las células tumorales con respecto a la morfología asociada al tejido de origen. Dicha clasificación histológica es la modificación de Nottingham al sistema de Scarff-Bloom-Richardson [199]. El sistema de clasificación actual incluye 3 parámetros [200]:

1. El grado de diferenciación (formación glandular o de túbulos)

2. Pleomorfismo nuclear
3. Proliferación (índice mitótico)

En el caso del grado de diferenciación (formación de túbulos), solamente se consideran las estructuras con una evidente luz central y se asigna la calificación de la siguiente forma:

Grado 1 = formación de túbulos mayores al 75% del área tumoral.

Grado 2 = 10 -75% del tumor

Grado 3 = menos del 10% del área tumoral

Por otro lado, el pleomorfismo nuclear se evalúa con base en la variabilidad de la forma y tamaño de los núcleos neoplásicos en comparación con células normales. Por último, el índice mitótico debe evaluarse en la periferia de los tumores y se deben contar exclusivamente las mitosis claras. Con respecto a este parámetro, el sistema de Nottingham considera el área real del microscopio, mediante la determinación del área de campo con base en el diámetro de éste y el microscopio utilizado, a diferencia del sistema anterior que consideraba contar campos de gran aumento, sin considerar que el área de cada campo depende del microscopio utilizado. A cada parámetro previamente mencionado se le asigna una puntuación de 1 a 3, y se suman las puntuaciones de todos los parámetros juntos. Los tumores con una puntuación total de 3 a 5 son clasificados como 1 (de bajo grado), aquellos del 6-7 son grado 2 (grado intermedio), y los de 8 a 9 son grado 3 (alto grado) (Tabla 1.1) [201].

Esta escala histológica es también asociada a patrones de alteraciones moleculares, como son la expresión de los ER, PR y la sobreexpresión y amplificación génica de la proteína HER2. En este sentido, la clasificación molecular del cáncer de mama se basa en la presencia o ausencia de los marcadores biológicos previamente mencionados: ER+/ER-, PR+/PR- y HER2+/HER2- [98,202].

Tabla 1.1 Método semicuantitativo para asignar una calificación histológica a tumores.

Característica	Calificación
Formación glandular y tubular	
En su mayoría tumor (>75%)	1
Grado moderado (10-75%)	2
Poco o nada (<10%)	3
Pleomorfismo nuclear	
células pequeñas, regulares, uniformes	1
Incremento moderado en la variabilidad en el tamaño y forma	2
Variación marcada en la forma y el tamaño	3
Índice mitótico	
Dependiendo de el campo	1-3
Calificación final	
Suma todas las calificaciones para formación glandular, tubular, pleomorfismo nuclear e índice mitótico	
Grado 1	3-5
Grado 2	6-7
Grado 3	8-9

Empleando los marcadores moleculares previamente mencionados, los tumores pueden clasificarse en 4 tipos:

*Luminal A. Es el subtipo más común, representa alrededor del 40 % de los casos de cáncer de mama. Estos tumores son ER⁺ y/o PR⁺ y HER2⁻, son de crecimiento lento y menos agresivos que los otros subtipos. Los tumores luminales A se asocian con un pronóstico más favorable a corto plazo, ya que en la mayoría de los casos la terapia hormonal es efectiva [179,203].

* Luminal B. Representa aproximadamente del 10 % a 20 % de los casos. Este tipo de tumores son ER⁺ y / o PR⁺, pero se distinguen del luminal A porque expresan HER2 o por tener altas tasas de proliferación (un número elevado de células cancerosas en división activa) [179,203].

* Basal. Al igual que el tipo anterior representan alrededor del 10 % al 20 % de los casos. A diferencia de los previamente descritos, éstos se conocen como "triple negativo", ya que son ER⁻, PR⁻, y HER2⁻. Este tipo de tumores son más comunes en las mujeres afroamericanas, pre-menopáusicas, y aquellas que tienen una mutación en el gen BRCA1. Las mujeres diagnosticadas con cáncer de mama de tipo basal tienen un pronóstico pobre a corto plazo en comparación con aquellas diagnosticadas con otros tipos de cáncer, ya que en la actualidad no se cuenta con terapias específicas para estos tumores [179,204,205].

*HER2 enriquecido. En el 10% de los casos de cáncer de mama se produce en exceso HER2 (una proteína que promueve el crecimiento) y no se expresan receptores hormonales (ER⁻ y PR⁻). Al igual que en el subtipo basal, estas neoplasias tienden a crecer y propagarse más agresivamente que otros tipos de cáncer de mama y están asociados con un peor pronóstico a corto plazo en comparación con el cáncer ER⁺ [179].

1.4 RESPUESTA INMUNE ASOCIADA A NEOPLASIAS

El sistema inmune es uno de los sistemas biológicos más complejos, conformado por diferentes estirpes celulares, y mensajeros químicos, los cuales deben coordinarse para asegurar un desempeño conveniente, para discernir entre lo propio y lo extraño, a través de funciones especializadas (por ejemplo, reconocimiento de patrones moleculares, activación celular, eliminación [fagocitosis, muerte celular], generación de memoria a los antígenos reconocidos, etc.) [206].

Una de las principales funciones del sistema inmune es la vigilancia, confiriendo al hospedero la habilidad de reconocer y destruir componentes propios alterados, como células mutadas que están bajo transformación maligna. Actualmente, se sabe que alteraciones en este mecanismo pueden asociarse a susceptibilidad a desarrollar enfermedades neoplásicas. Con base en lo anterior, surge la teoría de la inmunovigilancia, la cual sostiene que el sistema inmune tiene la capacidad de reconocer selectivamente y subsecuentemente destruir células cancerosas [207].

1.4.1 TEORÍA DE LA INMUNOVIGILANCIA

Esta teoría fue propuesta por Burnet y sostiene que el sistema inmune continuamente censa el organismo en busca de células malignas, las cuales surgen como resultado de mutaciones. Debido a que las células cancerosas son reconocidas como extrañas, se postuló que, en algunos casos, las células cancerosas pueden ser eliminadas por mecanismos de respuesta inmunidad innata y adaptativa similares a los empleados en la eliminación de bacterias, virus, hongos y parásitos. Este supuesto se basa en la expresión de antígenos que pueden ser reconocidos por el sistema inmune, TAA o TSA. Una vez reconocidos estos TAAs o TSA, el sistema inmune puede eliminar a las células cancerosas que los expresan. El corolario de esta teoría es que el desarrollo del cáncer puede ser explicado en función de la habilidad del tumor de evadir el reconocimiento del sistema inmune, a través de la inducción de tolerancia inmune, disfunción y agotamiento celular u otros mecanismos inhibidores empleados por las células tumorales para evadir su detección y eliminación [81-83,207,208].

Es importante mencionar que la forma en la que se desarrollan los antígenos tumorales inducidos por carcinógenos difiere de los inducidos por infecciones virales. En el caso de los tumores inducidos por carcinógenos, independientemente de su morfología similar, cada nuevo tumor inducido por el mismo agente posee diferentes TAA. En contraste, los TAS en tumores inducidos por virus reaccionan de forma cruzada con aquellos de tumores inducidos por el mismo o similar virus incluso cuando su apariencia morfológica pueda ser diferente [82,209].

1.4.2 INMUNOVIGILANCIA VS INMUNOEDICIÓN

Robert Schreiber propuso el principio de inmunoedición, el cual consiste en tres fases: eliminación, equilibrio, y escape, las 3 Es de la inmunoedición del cáncer. La eliminación inicial es una fase que corresponde al concepto original de inmunovigilancia en un hospedero inmunocompetente, en el cual las células tumorales son exitosamente reconocidas y eliminadas por el sistema inmune, por lo tanto, el tejido regresa a su estado normal. En esta fase premaligna, no hay crecimiento tumoral discernible clínicamente ni síntomas clínicos [210,211].

Las células tumorales que evaden la fase de inmunovigilancia progresarán a una segunda fase de inmunoedición, llamada fase de equilibrio. Esta fase de equilibrio es un proceso escasamente comprendido donde el sistema inmune es capaz de controlar el crecimiento tumoral celular, pero no de eliminar completamente las células transformadas. Se ha hipotetizado que, en esta fase de equilibrio, pueden ocurrir dos respuestas. En la primera, el sistema inmune eventualmente puede eliminar todas las células tumorales. En el segundo escenario, la interacción constante del sistema inmune con los tumores en un periodo prolongado de tiempo podría “editar” o “esculpir” el fenotipo del tumor desarrollado, resultado en la inmunoselección de un tumor que ha sido modificado hasta alcanzar un estado menos inmunogénico, que le permite sobrevivir [211].

Los tumores que ya no son susceptibles del ataque inmune progresan en una tercera fase del proceso de inmunoedición, denominado “escape”. Se cree que la emergencia de síntomas clínicos de neoplasias correlaciona con este estado. Durante la fase de escape, los tumores transforman el sistema inmune y promueven inmunosupresión [82,210-212].

Además de la inmunovigilancia y la inmunoedición, la tolerancia es un mecanismo crucial para el desarrollo o control de las neoplasias. En este sentido, el establecimiento de mecanismos de selección durante el desarrollo tímico de las células T es indispensable para el control de la tolerancia. Al respecto, células T autoreactivas que reconocen auto-antígenos son eliminadas en el

timo por un proceso denominado selección negativa. Sin embargo, algunas células T pueden escapar de la selección tímica, aunque más tarde puedan ser eliminadas a través de mecanismos de control de la tolerancia periférica [82,213].

Por otro lado, se sabe que las células T pueden reconocer antígenos propios no mutados en células tumorales y por lo tanto generan respuestas anti-propio. Para ello, la activación de células T requiere dos distintas señales. La primera señal es proporcionada por la interacción entre el receptor TCR (T cell receptor) y péptidos antigénicos presentes en moléculas MHC. La segunda señal es proporcionada por una de varias moléculas coestimuladoras. No obstante, las células cancerosas frecuentemente estimulan solamente la primera señal, e ineficientemente estimulan la segunda señal. En consecuencia, las células cancerosas pueden preferencialmente inducir tolerancia. Por lo tanto, los antígenos tumorales deben ser presentados a través de células presentadoras de antígeno (CPA) para iniciar y sostener una respuesta inmune antitumoral [82,213]. Si bien la respuesta inmune adaptativa es importante para el establecimiento de una respuesta antitumoral, su correlación con la respuesta inmune innata permite generar cambios en la composición celular del microambiente tumoral y desplegar respuestas antígeno específicas. En este sentido, hay muchos ejemplos de dicha relación, como ejemplo, diversos estudios, tanto *in vitro* como *in vivo*, sugieren que las células T citotóxicas CD8 (CTL cytotoxic lymphocytes) y las células NK a través de citotoxicidad mediada por anticuerpos (ADCC, antibody-dependent cellular cytotoxicity), o los anticuerpos antitumorales pueden participar en la destrucción tumoral y en la regresión tumoral. Poniendo de manifiesto la importancia de la respuesta inmune innata en la resistencia contra el desarrollo y progresión del crecimiento de tumores [82,213].

1.4.3 MICROAMBIENTE TUMORAL

Una de las principales características de las neoplasias es la inestabilidad genómica, la cual contribuye a la heterogeneidad en el microambiente tumoral [214]. Actualmente se sabe que el microambiente tumoral puede determinar la efectividad de las terapias contra el cáncer [215, 216]. En este sentido, en el 2013 Galon y colaboradores reportaron que pacientes con células T citotóxicas infiltradas en tumores primarios tienen una mayor expectativa de supervivencia, independientemente del tipo de terapia administrada [217]. Asimismo, este grupo propuso que la respuesta inmune adaptativa pre-existente dentro del microambiente tumoral puede fungir como una medida de la estratificación tumoral [218]. Por otro lado, se ha reportado que la presencia de infiltrado de células T al tumor primario puede utilizarse como un predictor clínico positivo en respuesta a la inmunoterapia con anti-PD-1, lo cual implicaría que la presencia de células T CD8+ en el tumor correlaciona directamente con la efectividad de la inmunoterapia para bloquear PD-1 [219]. Es por ello, que si bien inmunoterapias como anti-PD-1/PD-L1 han probado su efectividad clínica contra más de 15 tipos de cáncer, entre ellos melanoma y linfoma de Hodgkin [220], aún no se ha comprobado que sean eficaces para los más de 100 tipos de neoplasias actualmente descritas.

Considerando lo anterior, podemos determinar que la caracterización celular y molecular del microambiente tumoral puede permitir definir el tipo de respuesta antitumoral requerida para controlar y eliminar la neoplasia. Al respecto, se han propuesto 4 posibles escenarios que deben ser contrarrestados para eliminar una neoplasia [220]:

1. Microambiente tumoral con una respuesta inmune supresora. Este tipo de tumores requiere una inmunoterapia que elimine células supresoras y sus mediadores a través de la inhibición de los receptores que inducen dicha supresión.
2. Microambientes tumorales que tienen la capacidad de inhibir señales de apoptosis y

necrosis celular. Este tipo de microambiente requiere inducir procesos de muerte celular directos sobre las células transformadas.

3. Microambientes tumorales con CPA con modificaciones en sus funciones. Este tipo de tumor requiere el uso de adyuvantes para incrementar la función de las CPA.

4. Microambientes tumorales con células T anérgicas y macrófagos sin actividad efectora. Este tipo de microambiente puede tratarse utilizando agonistas como B7-H1, el receptor de la familia B7; BTLA; CCL-2; CSF-1; CTLA-4, entre otros [221].

En este sentido, el microambiente tumoral deriva de la interacción entre las células transformadas y las células normales del hospedero, generando la remodelación de matriz extracelular, angiogénesis, progresión tumoral y el establecimiento de nichos metastásicos [222]. Adicionalmente, el microambiente tumoral puede caracterizarse por estirpes celulares que tienen la capacidad inducir una respuesta pro-tumoral [223]. Dentro de las estirpes celulares principalmente asociadas a condiciones pro-tumorales se encuentran los macrófagos. Los macrófagos se clasifican principalmente en M1 y M2, pro y anti-inflamatorios, respectivamente. De éstos, dependiendo del microambiente tumoral, pueden ser considerados antitumorales como es el caso de los M1 ó como pro-tumorales a los M2 [224]. Por otro lado, se ha reportado que un incremento en la proporción de macrófagos M2 en el estroma tumoral correlaciona significativamente con neoplasias con mal pronóstico, y con un incremento en la degradación de la membrana basal en tumores invasivos [225-228]. Actualmente, es aceptado que los TAM pueden ser un componente indispensable de la respuesta asociada a tumores agresivos, ya que favorecen la invasión, angiogénesis, intravasación, extravasación y la metástasis a través de la secreción de factores solubles, actividad de proteasas [229-231], remodelación tisular, el reclutamiento de células supresoras y la alteración de la inmunidad adaptativa [232]. Se sabe que

los TAM exhiben típicamente una polarización tipo M2 [233], lo cual induce una disminución en la producción de citocinas inflamatorias [234].

Otras células asociadas a microambientes pro-tumorales son los linfocitos B inmunosupresores y las células T reguladoras, las cuales producen IL-10 y TGF- β , así como factores de polarización de M2 tales como IL-4 [91]. Asimismo, existen diversos estudios que sugieren la correlación de altas densidades de linfocitos T CD3+CD8+ (citotóxicos) y CD3+CD45RO+ (de memoria) infiltrados al tumor primario con un incremento en la supervivencia de pacientes con neoplasias de páncreas, mama, pulmón, ovario y melanoma [166,168,235,236]. Del mismo modo que los linfocitos, los CAF son células moduladoras del microambiente tumoral, puesto que contribuyen a la inducción de respuestas inmunosupresoras [237] que favorecen la evasión de la respuesta antitumoral del hospedero. Los CAF son fibroblastos activados que expresan el antígeno F19, también conocido como FAP (fibroblast activation protein- α) [238]. A diferencia de los fibroblastos encontrados en tejido normal, pueden producir factores de crecimiento y citocinas capaces de alterar la matriz extracelular, evadiendo así la respuesta inmune antitumoral [239], puesto que al secretar colagenasa I, pueden generar una barrera alrededor de las células tumorales, protegiéndolas de la respuesta de células T efectoras y de sustancias que pudieran dañarlas, como medicamentos antineoplásicos [146].

Considerando lo anterior podemos establecer que dependiendo del tipo de cáncer será el microambiente tumoral que se desarrolle, por ejemplo, en el caso del cáncer de mama, la neoplasia es de tipo carcinoma, es decir es un cáncer de origen epitelial, se subclasifica como adenocarcinoma, ya que se origina de tejido glandular. Esto implica que, en el tumor primario, las células cancerosas epiteliales están rodeadas por proteínas de matriz extracelular, fibroblastos, macrófagos, células endoteliales, linfocitos, granulocitos, entre otras estirpes celulares. Este

microambiente tumoral produce varios factores como TNF- α , TGF- β , Wnt y HIF-1 α , los cuales estimulan EMT y con ello la progresión del cáncer, invasión y metástasis. La EMT es un fenómeno en donde las células pierden propiedades epiteliales y ganan características mesenquimales, causando la pérdida del contacto célula-célula y la polaridad celular. Dicho microambiente induce la producción de citocinas proinflamatorias como TNF- α tanto por células tumorales como circundantes; mediante la activación de NF- κ B. Este ambiente proinflamatorio puede inducir el desarrollo de la neoplasia, mediante citocinas, factores de crecimiento, y quimiocinas que facilitan programas de carcinogénesis e inducen una tasa proliferativa celular sostenida, inhiben la apoptosis, estimulan la angiogénesis, y la síntesis de enzimas con capacidad remodeladora de la matriz extracelular como metaloproteasas, lo cual en conjunto puede promover la EMT [225,226, 69-72,240]. Con base en lo anterior podemos sugerir que el diseño de inmunoterapias antineoplásicas debería considerar el microambiente tumoral específico de acuerdo con la estadificación del tumor, de las interacciones ambientales y de las alteraciones genómicas de las células tumorales.

1.5 MODELO MURINO DE CÁNCER DE MAMA

“[to those who say] Just give me the data, well defined data, and I can make a model [come the reply] True scientific simplicity is never reductive; it is always a relevant simplicity that is a creative achievement... The true grandeur of science is not power but the demanding quest for relevance... How to learn? How to pay attention? How to acquire new habits of thinking? How to concentrate or explore other kinds of experiences? Those are questions that matter.”

— Michael R. Lissack

La construcción de modelos permite la manipulación y control de una parte del Universo. Lo anterior tiene como objetivo el estudio de fenómenos naturales y la obtención de conocimientos. La construcción de modelos deriva de la incapacidad de comprender y abarcar en su totalidad los fenómenos u objetos en estudio, así como de la complejidad que rige sobre los mismos. Por lo tanto, basados en el paradigma reduccionista abstraemos variables para su estudio, generando un modelo idealizado del objeto en estudio, es decir, sustituimos la parte del Universo en estudio, por un modelo similar, pero más sencillo [241].

Rosenblueth propone clasificar los modelos con base en su grado de abstracción, en este sentido propone la existencia de modelos teóricos o formales y modelos materiales o reales. Al respecto, define a un modelo material como aquella representación de un sistema real, el cual posee algunas propiedades semejantes a las existentes en el sistema en estudio. Este tipo de modelos se caracterizan por realizarse bajo condiciones más favorables y controladas, con respecto a las que rigen en el sistema original, por lo que su abstracción requiere la extrapolación de los resultados. Una de las principales áreas de aplicación de este tipo de modelos es la medicina. En este sentido, dada la limitación de la experimentación en humanos y la semejanza entre otros organismos, se

recurren a modelos materiales para experimentar en especies inferiores y adquirir conocimientos a través de la extrapolación [241].

Por otro lado, un modelo formal se define como la expresión simbólica, en términos lógicos, de una estructura idealizada que se supone análoga a la de un sistema real. Cualquier ley, o cualquier teoría, es un modelo formal de los fenómenos a los cuales es aplicable. Exhibe relaciones entre las distintas variables de estos fenómenos, y afirma que estas relaciones formales son semejantes a las que existen en los fenómenos reales [241].

En este trabajo pretendemos la abstracción de una enfermedad compleja como el cáncer a través de un modelo material que nos permitirá realizar analogías entre una especie inferior o menos compleja (el ratón) y el humano. Lo anterior, puede tener importantes ventajas didácticas y teóricas, sin embargo, debe considerarse que no todos los modelos materiales son buenos o deseables. Por ejemplo:

1. Si la concepción del modelo formal del que deriva un determinado modelo material es insustancial, el uso de dicho modelo real será improductivo.
2. Si los resultados del modelo material no se pueden hipotetizar mediante el modelo formal correspondiente, dicho modelo será superfluo.
3. Un modelo no es útil si este tiene más variables y atributos que el fenómeno que se desea estudiar.

Por último, debemos considerar que la elaboración de modelos conlleva ciertas limitaciones. En este sentido, los modelos materiales, siempre serán modelos parciales de la realidad, es decir, pueden ser semejantes al fenómeno en estudio, pero solo en algunos aspectos, por lo tanto, si deseamos perfeccionarlos se requerirá agregar atributos a los mismos, sin embargo, al agregar atributos en demasía se corre el peligro de llegar al absurdo, ya que cómo refiere Rosenblueth, el

mejor modelo de un gato es otro gato, o de preferencia, el mismo gato original. Lo mismo ocurre con los modelos teóricos, un modelo teórico ideal sería aquel que abarcará el Universo en su totalidad, sin embargo, la concepción y comprensión de dicho modelo no requeriría *per se* su creación dada la implicación de una comprensión absoluta del Universo [241].

1.5.1 MODELO 4T1

“La ciencia postula que la mente humana es finita y limitada, y que no es capaz de esta comprensión directa. Aspira a modelos o teorías de orden muy general, pero acepta, con modestia prudente, que esta generalidad tendrá, por necesidad, siempre algunas limitaciones”.

— Arturo Rosenblueth, El método científico.

La línea celular 4T1 fue aislada por Fred Miller de un tumor desarrollado espontáneamente en ratones BALB/c. Esta línea celular es una de 4 sublíneas que derivaron del tumor 410.4 [242]. 4T1 se aisló debido a su resistencia a 6-tioguanina. El tumor 4T1 es altamente tumorigénico e invasivo, y a diferencia de la mayoría de los modelos de tumores, puede desarrollar metástasis espontánea de un tumor primario en la glándula mamaria a múltiples sitios distantes, incluyendo ganglios linfáticos, hígado, pulmones, cerebro y hueso [242-244]. Adicionalmente este modelo se caracteriza por la presencia de esplenomegalia, la cual previamente se ha correlacionado con un mal pronóstico para el animal [245,246].

El tumor 4T1 tiene varias características que lo hacen adecuado para estudiar el cáncer de mama. Primero, las células tumorales son fácilmente trasplantadas en la glándula mamaria, por lo que el tumor primario crece en el mismo sitio anatómico que en el humano. Segundo, como en el humano, la neoplasia genera metástasis del tumor primario por vía hematogena a ganglios linfáticos, hígado, cerebro, pulmones y hueso [247,248] (Figura 1.7). Las células 4T1 crecen progresivamente y causan una enfermedad uniformemente letal, incluso después de la escisión del tumor primario [244,247,248].

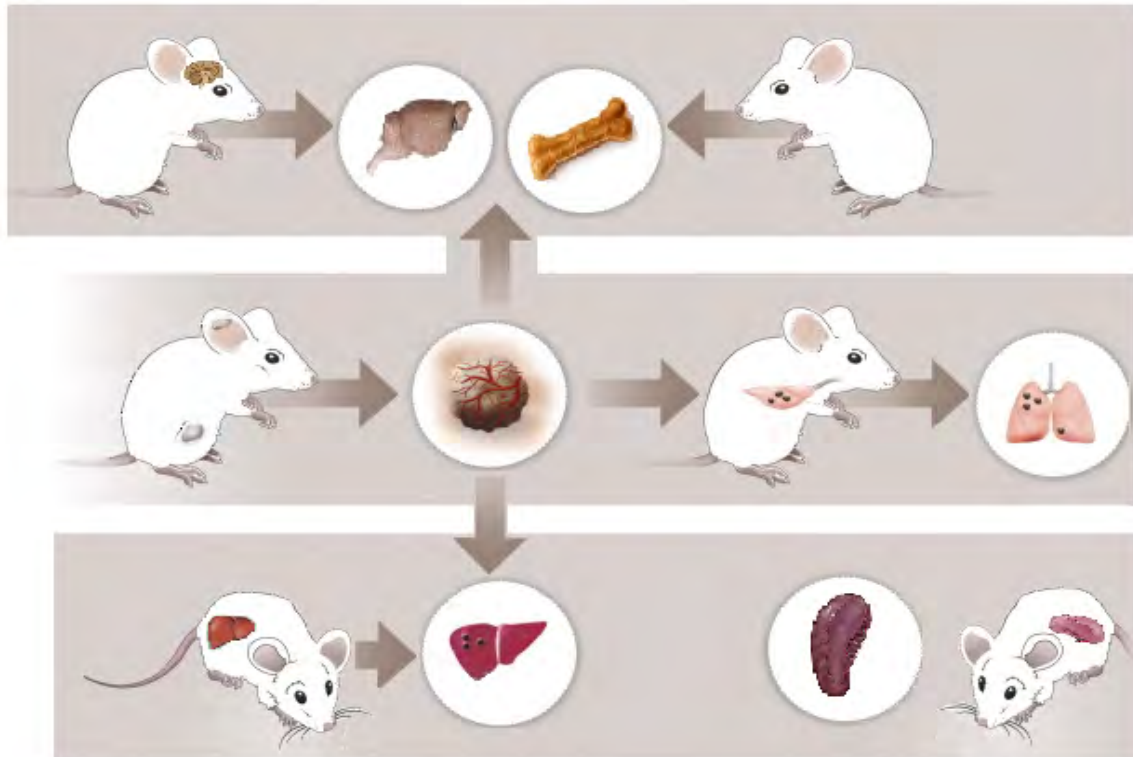


Figura 1.7 Características del modelo murino 4T1.

El tumor primario inducido por la línea celular 4T1 puede inducir de forma natural metástasis a pulmones, cerebro, hueso e hígado, convirtiéndose en modelo de cáncer murino que puede emular una neoplasia mamaria estado IV en humano. Adicionalmente, esta neoplasia se asocia a la inducción de esplenomegalia dada por una reacción leucemoide. Modificado de: Bagri A, et al. Trends Mol Med. 2010 [249].

1.6 GK-1: AGENTE INMUNOPOTENCIADOR

Actualmente han surgido diversos compuestos que pueden controlar la progresión de neoplasias a través de la modulación de la respuesta inmune. En este sentido, estrategias como la inmunomodulación permiten controlar el sistema inmune a través de la inducción de tolerancia, inmunopotenciación o inmunosupresión, mecanismos que pueden de forma específica o inespecífica modificar componentes solubles y celulares. Lo anterior surge como un área de oportunidad para el desarrollo de terapias que pueden potenciar o estimular el sistema inmune del paciente para controlar o eliminar enfermedades infecciosas, autoinmunes o neoplasias [82].

En el contexto del cáncer, la respuesta inmune puede ser modulada por compuestos capaces de modificar uno o varios elementos de la red de inmunoregulación asociada a la respuesta inmune antitumoral específica, lo cual se ha asociado en diversos estudios a (1) inducción de CTL específicos de tumor; (2) activación de macrófagos y células NK; y (3) inmunoregulación de la producción de mediadores inflamatorios [82, 250-253].

Con base en lo anterior, Bellanti propuso la clasificación de inmunomoduladores en tres grupos principales: (1) inmunopotenciadores, que mejoran la reactividad inmune; (2) inmunosupresores, que reducen la reactividad inmune; y (3) compuestos que inducen tolerancia inmune y, por lo tanto, disminuyen la respuesta inmune [82].

Con respecto a los inmunopotenciadores, éstos pueden dividirse en aquellos que actúan de forma específica y no específica. Dentro de este grupo se encuentran adyuvantes, vacunas e inmunoglobulinas. En el caso de los inmunopotenciadores inespecíficos, su función no depende de una respuesta antígeno específica, por lo que pueden potenciar la respuesta inmune mediante la activación de células T y CPA. Algunos ejemplos de este tipo de agentes son hormonas, escualeno, sales de aluminio, y otros compuestos que se utilizan como coadyuvantes en las vacunas [82].

Existen terapias antineoplásicas basadas en péptidos, las cuales tienen diversas ventajas sobre otras quimioterapias, como baja toxicidad, fuerte especificidad, facilidad para ingresar a tejidos, capacidad adyuvante, además de no ser genotóxicos [252-255]. Dentro de los péptidos con propiedades antitumorales se encuentran: (1) péptidos necróticos (por ejemplo, las cecropinas A y B, presentes en mamíferos y diversos insectos) [256]; (2) péptidos apoptóticos (como magainina 2, hCAP₁₀₉₋₁₃₅ (comprising the C-terminal domain of human CAP18, amino acid residue 109-135) y lactoferrina bovina) [257-259]; (3) péptidos que se unen a proteínas de adhesión celular; (4) inhibidores de proteincinasas; (5) péptidos con propiedades antiangiogénicas; (6) péptidos que interactúan con receptores; y (7) péptidos con actividad inmunoestimuladora [256].

En cuanto a los péptidos que interactúan con receptores se conocen varios compuestos con actividad antitumoral y adyuvante, como GM-CSF, IL-2, IFN α/β , α -GalCer (ligandos de glucolípidos), CpG, imiquimod, y poli I: C (agonistas del receptor tipo toll (TLR)) [260-262]. En general, muchos de estos compuestos pueden funcionar como patrones moleculares asociados a patógenos (PAMP) ya que pueden activar CPA a través de la señalización mediante TLRs. Por ejemplo, CpG induce una respuesta de tipo Th1 y activa CPA a través de TLR9 [263-266], sin embargo, en ensayos clínicos en humanos no estimula la respuesta inmune [267,268].

Desafortunadamente, varios inmunoestimuladores no han logrado revertir las condiciones inmunosupresoras en el microambiente tumoral. Con base en lo anterior, este trabajo tiene como objetivo evaluar el efecto antineoplásico del péptido GK-1, un inmunopotenciador inespecífico.

GK-1 es un péptido de 18 aminoácidos identificado y clonado a partir de la proteína KETc7, la cual se aisló de cisticercos de *Taenia crassiceps* [269]. *In vitro* se han comprobado sus propiedades inmunoestimuladoras al promover en CPA la expresión de moléculas como CD80/86, MHC de clase II y la secreción de factores solubles proinflamatorios como IFN- γ , TNF- α y CCL2

[270,271]. Adicionalmente *in vivo* se ha demostrado que GK-1 induce la proliferación de células TCD4⁺ y TCD8⁺. Aunado a lo anterior, se ha reportado que GK-1 incrementa el título de anticuerpos al ser usado como adyuvante de la vacuna de influenza en modelos murinos de la infección tanto de ratones seniles como jóvenes. Cabe destacar que en dicho estudio se observó que GK-1 promueve el infiltrado de células mononucleares (linfocitos y monocitos) al parénquima pulmonar, a los pocos días de su administración subcutánea, y tal vez esto está relacionado con la resolución de la infección pulmonar [272]. Basados en las capacidades inmunoestimuladoras previamente indicadas, se evaluaron las propiedades de GK-1 en el contexto del cáncer, dado que la inmunosupresión persistente en el microambiente tumoral es una de las características comúnmente encontradas en diversas neoplasias, por lo tanto, es factible que al estimular la respuesta inmune del hospedero se promueva un efecto antineoplásico. Al respecto en el 2013, se reportó en un modelo de melanoma murino inducido con la línea celular B16-F10, que animales administrados con GK-1 presentaron un incremento del 42.58% en la sobrevida y una tasa de crecimiento inferior en los tumores de estos ratones con respecto a los controles administrados con solución salina [273]. Aunado a lo anterior, en el tumor primario, reportaron un incremento en la necrosis celular intratumoral asociada al tratamiento con GK-1 [273]. Por otro lado, en el 2017, se evaluó el efecto antitumoral de GK-1 en conjunto con el anticuerpo anti-PD-L1 en un modelo murino de melanoma. En este estudio se reportó un incremento significativo del 47.82% en la sobrevida, siendo esta sobrevida superior a la observada al administrar GK-1 ó anti-PD-L1 solos [274]. Tomando en consideración lo anterior, este proyecto pretende determinar si el péptido GK-1 es capaz de potenciar la respuesta inmune contra tumores inducidos en un modelo murino de cáncer mama. Para este propósito se empleó la línea celular 4T1 para inducir en ratones BALB/c una neoplasia que emula un estado IV de cáncer de mama en humano, el cual, de acuerdo con la

historia natural de la enfermedad, generará metástasis a pulmones, cerebro, hígado y hueso [242-244]. En conjunto, este estudio pretende aportar evidencia sobre las propiedades antitumorales del péptido GK-1 en un modelo murino de cáncer, lo cual podría representar una nueva alternativa terapéutica capaz de incrementar la esperanza de vida de los pacientes con cáncer de mama.

2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

De acuerdo con la OMS en el 2012 a nivel mundial se presentaron 8.2 millones de defunciones asociadas a neoplasias y se diagnosticaron 14.1 millones de casos nuevos. Dentro de los distintos tipos de cáncer, el cáncer de mama representa la primera causa de muerte y es la neoplasia de mayor incidencia a nivel mundial en mujeres. Con base en lo anterior podemos establecer por qué el cáncer de mama es un problema de salud pública a nivel mundial.

A pesar de las diversas estrategias terapéuticas con blancos genéticos e inmunológicos, como son gefitinib, crizotinib, gemcitabina, paclitaxel, docetaxel, vinorelbina, cisplatino y carboplatino, actualmente el cáncer de mama es una de las neoplasias más agresivas con una sobrevida de 5 años en el 10-15% de los casos diagnosticados, lo cual permite suponer que ninguna de estas terapias ha sido lo suficientemente efectiva como para incrementar la sobrevida de los pacientes, independientemente del estado en el que se presenta la neoplasia. Por ello es necesario buscar nuevas alternativas terapéuticas que permitan incrementar la esperanza de vida de los pacientes. Con base en lo anterior este trabajo tiene como objetivo evaluar la capacidad antitumoral del péptido GK-1, para presentar una alternativa terapéutica que podría incrementar la sobrevida de los pacientes con cáncer. Lo anterior, deriva de trabajos que han demostrado las propiedades antitumorales e inmunoestimuladoras de GK-1 en el contexto de neoplasias, como melanoma. En este sentido, en el 2013 Pérez-Torres y colaboradores evaluaron por primera vez las propiedades antitumorales de GK-1 en un modelo murino de melanoma. Al respecto, reportaron que los ratones tratados con GK-1 sobrevivieron en promedio 42.58% más que aquellos ratones que no recibieron tratamiento. También observaron una disminución estadísticamente significativa de la tasa de crecimiento tumoral asociada al tratamiento con GK-1. Adicionalmente, en el tumor primario, reportaron un incremento en la necrosis celular intratumoral, lo cual se acompañó de una disminución significativa de la concentración de IFN- γ sérico; y en los pulmones se observó un

incremento en IL-12p70, IFN- γ , y una disminución de IL-17, IL-4, IL-23 e IL-12p40 (12). Aunado a lo anterior, se evaluó el posible efecto antineoplásico de GK-1 en combinación con anti-PD-L1, encontrando un incremento estadísticamente significativo de la supervivencia (47.82%) y una reducción en la concentración sérica de TNF, IL-6 e IL-10, todo ello en comparación con los tratamientos individuales con GK-1 y anti-PD-L1.

Si bien, ya se han reportado las propiedades antitumorales de GK-1 en modelos murinos de melanoma, es probable que el efecto de GK-1 pueda estar condicionado al microambiente tumoral, ya que se ha observado que inmunoterapias contra el cáncer, a pesar de tener la capacidad de inducir inmunovigilancia, estimulación específica contra células tumorales, inducción de memoria específica y eliminación de células transformadas, las células tumorales diluyen ese efecto a través de la inducción de inmunosupresión en el microambiente tumoral, mediante la activación e infiltración de células Treg, MDSC, CAF, entre otras estirpes. A pesar de que inmunoterapias de uso reciente como los anticuerpos anti-PD-1/PD-L1 han probado su efectividad clínica contra más de 15 tipos de cáncer, entre ellos melanoma y linfoma de Hodgkin, aún no se conoce su eficacia frente todas las neoplasias actualmente descritas (más de 100).

Considerando lo anterior, este estudio tiene como objetivo evaluar el potencial antitumoral de GK-1 en un modelo murino que emula un estado IV de cáncer de mama en humano.

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GENERAL

- Evaluar la capacidad antineoplásica del péptido GK-1 en un modelo murino de cáncer de mama.

3.2 OBJETIVOS PARTICULARES

- Determinar la tasa de crecimiento tumoral y la sobrevida asociados al tratamiento con GK-1
- Evaluar macrometástasis en ratones con tumores tratados con GK-1.
- Valorar la necrosis inducida en tumores primarios asociada al tratamiento con GK-1.
- Cuantificar la concentración de factores solubles (citocinas, quimiocinas y factores de crecimiento) en sangre periférica, tumores primarios y sitios metastásicos.
- Establecer si el efecto antineoplásico de GK-1 es dosis dependiente.

4. HIPÓTESIS

Dado que GK-1 tiene la capacidad de activar células presentadoras de antígeno y promover la proliferación y activación de células TCD4+ y TCD8+, esperamos que dicha capacidad inmunopotenciadora promueva los siguientes efectos de la respuesta inmune antitumoral en ratones con tumores inducidos por la línea celular 4T1:

1. Incremento en la sobrevida
2. Reducción en la tasa de crecimiento tumoral
3. Disminución en el número de focos metastásicos a pulmón, cerebro e hígado.

All our science, measured against reality, is primitive and childlike -and yet it is the most precious thing we have.

— Albert Einstein (1879-1955).

5. METODOLOGÍA

5.1 DISEÑO EXPERIMENTAL

I. RATONES EXPERIMENTALES

Se utilizaron ratones BALB/cAnN hembras y machos de 4-6 semanas de edad y de 27-17 g de peso. La cepa original proviene de HarlanTekland (Madison, WI). Los ratones fueron criados en las instalaciones del Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM. Dichos animales se obtuvieron mediante el apareamiento entre hermano y hermana, y fueron mantenidos en condiciones libres de patógenos con un fotoperiodo de 12 hrs y temperatura controlada. Adicionalmente, los ratones fueron mantenidos en cajas con ventilación, alimento y agua ad libitum. Todos los experimentos se llevaron a cabo de acuerdo con los lineamientos establecidos en la Guía para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio, Instituto de Recursos Animales de Laboratorio, Consejo Nacional de Investigación, Washington, Distrito de Columbia, así como los lineamientos de la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999 “Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de animales de laboratorio”.

II. GK-1

GK-1 es un péptido sintético de 18 aminoácidos (GYYYPSDPNTFYAPPYSA), elaborado por AnaSpec, Inc. El péptido tiene un 95% de pureza, determinada por cromatografía líquida de alta presión en fase reversa utilizando columnas de C18 [271]. Las dosis de administración de GK-1 fueron 0.1, 0.5 y 1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ por ratón cada 8 días.

5.2 CULTIVO CELULAR

La línea 4T1 (American Type Culture Collection, Manassas, VA) se cultivó en medio DMEM (Gibco, Grand Island, NY) suplementado con 10% de suero fetal bovino inactivado por calor (PAA, Pasching, Austria), 1% de penicilina y estreptomina (Gibco, Grand Island, NY) a 37 ° C

con una humedad relativa de 5% CO₂. Las células en cultivo se cosecharon por tripsinización (0.25%, Gibco, Grand Island, NY) y se lavaron tres veces con medio frío libre de suero antes de su implantación subcutánea.

5.3 MODELO MURINO DE CARCINOMA MAMARIO

Ratones BALB/cAnN fueron implantados con 1×10^3 células 4T1 (línea celular tumoral de mama desarrollado en ratones BALB/cAnN) vía subcutánea cerca de la cuarta glándula mamaria derecha. Aproximadamente 18-20 días post-implantación celular, se desarrollaron tumores sólidos medibles (1mm x 1mm). Una vez desarrollados los tumores sólidos, se dividieron los ratones de forma aleatoria en 4 grupos diferentes, a los cuales se les administró GK-1 (0.1, 0.5 ó 1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) ó solución salina isotónica (SSI) vía intravenosa (100 μl de volumen total se administraron en cada caso). Dicho esquema de administración se repitió cada semana (3 dosis en total). A los 39 días post-implantación se aplicó eutanasia. Durante la necropsia se obtuvieron el tumor primario, bazo, pulmones, hígado y cerebro. Posteriormente se pesaron tanto tumor primario como los demás órganos obtenidos. A lo largo de los 39 días de experimento, todos los animales fueron pesados y se registró el crecimiento de los tumores de forma continua. El volumen tumoral se calculó a través de la siguiente fórmula [275]:

$$\text{Volumen (mm}^3\text{)} = \pi LW^2/6$$

Donde

L es el lado más largo

W es lado más corto

En total se llevaron a cabo 6 experimentos independientes, los cuales incluían de 5 a 10 ratones por grupo. Cabe destacar que en caso de que los animales empleados en este estudio presentaran un estado letárgico o moribundo o cuando no pudieran responder a estímulos suaves, de acuerdo

con los lineamientos establecidos por the United Kingdom Coordinating Committee on Cancer Research (UKCCCR) se aplicó eutanasia, a pesar de que no hubieran transcurrido los 39 días post-implantación.

5.4 EVALUACIÓN DEL EFECTO ANTITUMORAL DE GK-1

I. CURVA DE SUPERVIVENCIA

Se implantaron 1×10^3 células 4T1 vía subcutánea cerca de la glándula mamaria derecha a ratones BALB/cAnN. A diferencia de los experimentos descritos en la sección 5.3, el punto final de este experimento correspondió a la eutanasia a ratones que presentaban un estado letárgico o moribundo o cuando no pudieran responder a estímulos suaves, de acuerdo con los lineamientos establecidos por the United Kingdom Coordinating Committee on Cancer Research (UKCCCR). Se realizaron 2 experimentos independientes con 5-10 ratones en cada grupo.

II. TOMA DE MUESTRA DE SANGRE

Se obtuvieron muestras de sangre al punto final del experimento (sección 5.3). Las muestras se tomaron de la vena facial submandibular usando escalpelo del número 11 como previamente se ha reportado [276]. En cada toma de muestra se colectaron un máximo de 0.5 ml de sangre, de éstas se aisló suero por centrifugación (1200 rpm por 10 min). El suero fue almacenado a -20°C hasta su análisis en el Magpix.

5.5 ANÁLISIS HISTOLÓGICO

Todas las muestras fueron fijadas con una solución de formaldehído al 10%, a excepción de los pulmones, los cuales se fijaron en solución Zamboni. Todas las muestras se examinaron

macroscópicamente para identificar focos metastásicos (Figura 5.1).

Se tomó una muestra aleatoria de 6 de tumores primarios (5 experimentos independientes) se procesaron para identificar muerte tisular y fibrosis en cortes de 4 μ m embebidos en parafina, los cuales se tiñeron con colorantes H&E (Hematoxilina y Eosina). Los cortes se analizaron con un microscopio Nikon Eclipse 80i equipado con una cámara digital y mediante el software InfinityAnalyze v6.3.0.

En el caso de la muerte celular se evaluaron cambios morfológicos característicos de necrosis. En este sentido, las células tumorales vivas se identificaron claramente por la presencia de núcleos basófilos con hasta dos nucléolos rodeados por un citoplasma eosinofílico bien definido (paneles superior e inferior izquierdo), mientras que las áreas de células necróticas/apoptóticas se caracterizaron por su eosinofilia citoplasmática, por la presencia de cuerpos apoptóticos, picnosis (núcleos pequeños e intensamente basófilos), cariorrexis (núcleos picnóticos y fragmentados) y cariólisis (una ruptura completa o degeneración de núcleos) [277].

Estos cambios nucleares se acompañaron por una pérdida de definición del citoplasma, que apareció como una masa compacta homogénea y eosinofílica, y con márgenes celulares indistintos. Una vez que estas alteraciones nucleares y citoplasmáticas se presentan, la célula muerta es una masa homogénea anucleada y eosinofílica (paneles superior e inferior derecho). Los cortes analizados provienen de una muestra aleatoria de cinco experimentos independientes (6 ratones tratados con GK-1 y 6 ratones no tratados). Los cortes se analizaron con un microscopio Nikon Eclipse 80i equipado con una cámara digital y mediante el software InfinityAnalyze v6.3.0.

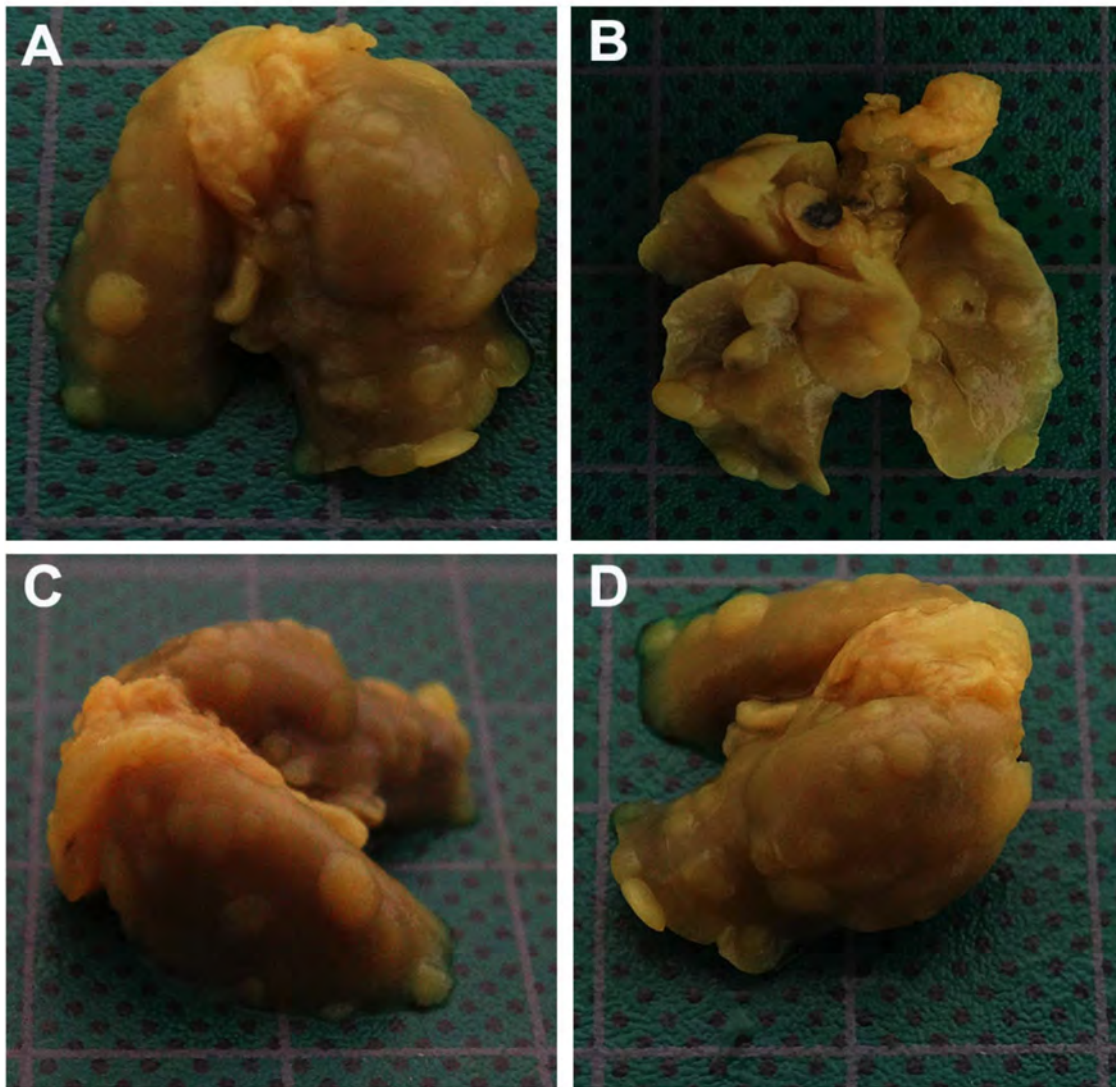


Figura 5.1 Metástasis pulmonar macroscópica presente en ratones con tumores inducidos por células 4T1.

Se presentan los pulmones de un ratón perteneciente al grupo control. Los pulmones que se diseccionaron durante las necropsias realizadas a los 39 días posteriores a la implantación de 1000 células 4T1. Las muestras se fijaron en solución Zamboni y posteriormente se evaluaron visualmente para cuantificar el número de tumores macroscópicos, como se indica en la sección 5.5.

5.6 ANÁLISIS DE FACTORES SOLUBLES EN SUERO Y EXTRACTOS PROTEICOS

I. EXTRACTOS PROTEICOS

Pulmones, hígado, bazo, cerebro y tumor primario se diseccionaron y fueron conservados en nitrógeno líquido a -80 °C para extraer proteínas. Se pesaron 5 mg de cada tejido y se agregaron 300 µl de buffer de extracción [278], posteriormente, se disgregaron con un homogenizador eléctrico. Los tejidos se lavaron 3 veces con 300 µl de buffer de extracción y se mantuvieron en agitación constante por 2 hrs a 4°C. Se centrifugaron por 20 minutos a 13000 rpm a 4°C. Finalmente, se tomó el sobrenadante (extracto proteico) y se almacenó a 80°C hasta su análisis en el Magpix Luminex.

II. ANÁLISIS DE FACTORES SOLUBLES EN SANGRE Y EXTRACTOS PROTEICOS.

Las concentraciones en pg/ml de citocinas, quimiocinas y factores de crecimiento se determinaron en el suero y extractos proteicos de tumores primarios, pulmones, bazo, hígado y cerebro. Estas moléculas se cuantificaron mediante el sistema Magpix Luminex (xPonent Software). Utilizando un panel comercial de 20 analitos (Mouse Cytokine Magnetic 20-Plex panel: FGF Basic, IL-1 β , IL-10, IL-13, IL-6, IL-12, IL-17, MIP-1 α , GM-CSF, MCP-1, IL-5, VEGF, IL-1 α , IFN- γ , TNF- α , IL-2, IP-10, MIG, KC, IL-4).

5.7 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Para cada variable estudiada se calcularon las medias y las desviaciones estándar (DE). Asimismo, fueron evaluadas las diferencias entre los grupos en estudio utilizando una prueba t no paramétrica (U de Mann-Whitney).

La curva de supervivencia se calculó utilizando el método de Kaplan-Meier y fue evaluada con la prueba de log-rank.

En el caso de la determinación de tejido muerto en tumores primario, los datos se normalizaron utilizando la proporción de áreas necrótico-apoptóticas e identificando diferencias estadísticamente significativas entre los grupos mediante una prueba t no paramétrica.

Las correlaciones entre variables se analizaron por correlación de Spearman y U de Mann-Whitney.

Los heatmaps y matrices de correlación se realizaron en R Studio (Version 0.98.1091 – © 2009-2014 RStudio, Inc.) mediante las paqueterías de symbols, plots, heatmap.2, graphics y corrplot, respectivamente.

En todos los casos los valores de $p < 0.05$ fueron considerados estadísticamente significativos.

Todos los análisis estadísticos a excepción de las correlaciones de Spearman se realizaron empleando el programa GraphPad Prism version 6.00 for MAC, GraphPad Software, La Jolla California USA, www.graphpad.com.

It is easy to obtain confirmations, or verifications, for nearly every theory—if we look for confirmations. Confirmations should count only if they are the result of risky predictions... A theory which is not refutable by any conceivable event is non-scientific. Irrefutability is not a virtue of a theory (as people often think) but a vice. Every genuine test of a theory is an attempt to falsify it, or refute it.

— Karl Raimund Popper
Conjectures and Refutations: The Growth of Scientific Knowledge (1963), 36.

6. RESULTADOS

6.1 GK-1 INCREMENTA LA SOBREVIDA DE FORMA DOSIS DEPENDIENTE

En la Figura 6.1 se observa la curva de sobrevida de ratones que desarrollaron tumores y que fueron tratados con 3 dosis de GK-1 (0.1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$, 0.5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$, y 1.0 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) ó que no recibieron tratamiento. Los ratones con GK-1, independientemente de la dosis sobrevivieron más días que los ratones control ($p < 0,0001$, log rank-test).

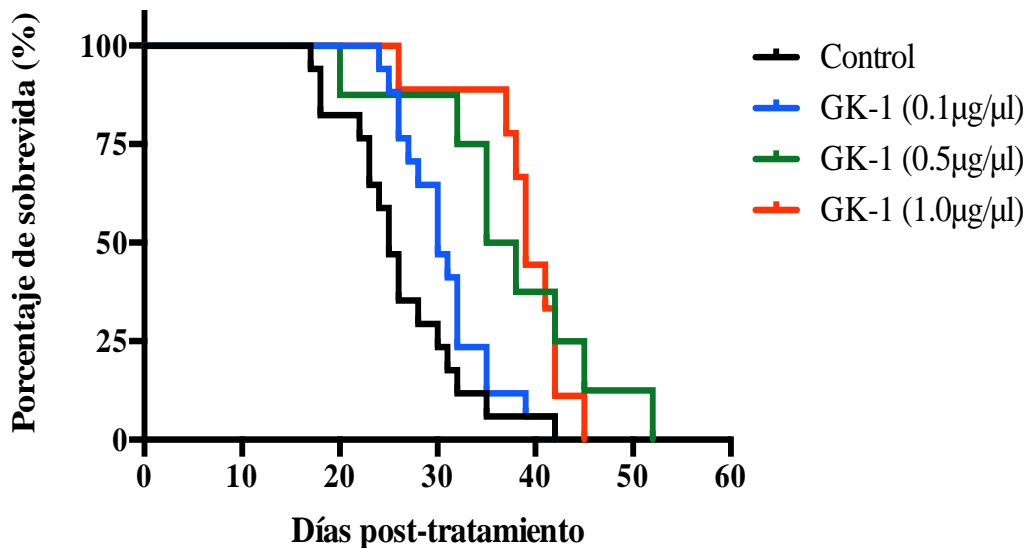


Figura 6.1 La administración semanal de GK-1 incrementa la sobrevida de ratones BALB/cAnN.

Curva Kaplan-Meier de sobrevida de ratones tratados con 0.1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ (rojo), 0.5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ (verde), y 1.0 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ (rojo) de GK-1, y controles (negro). En el eje de las abscisas se indican los días post-tratamiento (día en el que presentaron tumores palpables (18-20 días)). El día 0 corresponde a la administración de la primera dosis de todos los tratamientos. El esquema de administración fue semanal. Los ratones control fueron administrados de 2-6 veces con SSI. Los ratones tratados con las concentraciones 0.1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ y 0.5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ recibieron de 3-6 dosis de GK-1. Los ratones tratados con la concentración 1.0 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ recibieron de 4-7 dosis de GK-1. Todas las concentraciones administradas de GK-1 incrementan significativamente la sobrevida de ratones que desarrollaron tumores. ($P < 0.0001$, prueba de log-rank). Los datos corresponden a dos experimentos independientes.

Como podemos observar, los ratones tratados con 0.1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ de GK-1 murieron a los 24-42 días posteriores al inicio del tratamiento, entre los días 20-52 murieron los ratones tratados con 0.5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ de GK-1, y en los días 26-45 murieron los tratados con la dosis más concentrada de GK-1 (1.0 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$), en contraste, los ratones control murieron entre los días 17 y 42 post-tratamiento.

6.2 DISMINUCIÓN DE LA TASA DE CRECIMIENTO TUMORAL SE ASOCIA AL TRATAMIENTO CON GK-1

Como se mencionó con anterioridad, una vez que los ratones desarrollaron tumores palpables (1 mm x 1 mm) se determinó el volumen tumoral cada 3er día. Los resultados de la tasa de crecimiento tumoral se observan en la siguiente figura:

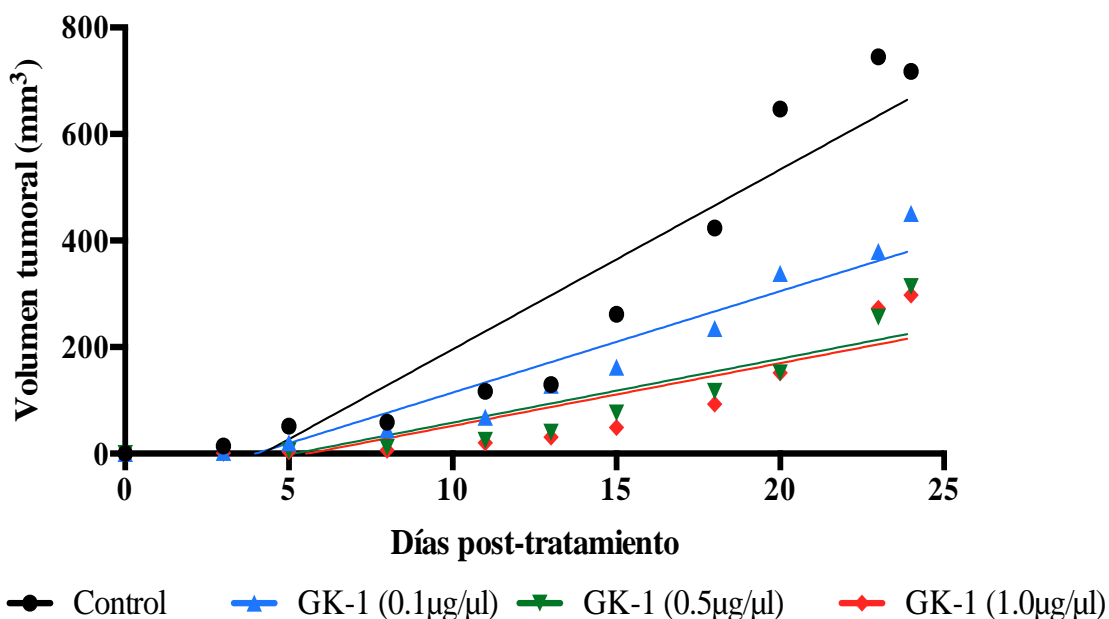


Figura 6.2 GK-1 reduce la tasa de crecimiento tumoral de forma dosis dependiente.

El cambio del volumen tumoral con respecto al tiempo en ratones tratados con GK-1 (0.1 µg/µl, 0.5 µg/µl, y 1.0 µg/µl) y controles. Los resultados corresponden a 2 experimentos independientes. El tamaño de la muestra total fue de 12 ratones para todos los grupos en estudio.

Como podemos observar en la figura 6.2, los ratones tratados con GK-1 (0.1 µg/µl (297.73 ± 59.56 mm³), 0.5 µg/µl (313.46 ± 71.11 mm³), y 1.0 µg/µl (451.01 ± 62.74 mm³)) presentan un menor volumen tumoral con respecto a los ratones sin tratamiento (717.44 ± 90.15 mm³, $p < 0.0001$, a los 24 días posteriores al inicio del tratamiento). Con respecto a las pendientes de cada curva, se observó una diferencia estadísticamente significativa entre los ratones control y los tratados con

GK-1 ($p < 0.0005$). Es importante señalar que las pendientes de las tasas de crecimiento tumoral entre dosis de GK-1 no son estadísticamente significativas.

Como se indica en la sección 5.3 se realizó la disección de tumor primario, bazo y órganos metastásicos. Los datos que corresponden a los pesos de tumores primarios, bazos y macrometástasis pulmonar se reportan en la Tabla 6.1. En el caso del peso de los tumores primarios, se observa que los ratones tratados con GK-1 ($0.1 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ ($0.93 \pm 0.12 \text{ g}$), $0.5 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ ($0.93 \pm 0.31 \text{ g}$), y $1.0 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ ($0.83 \pm 0.16\text{g}$)) desarrollaron tumores de menor peso con respecto a los observados en ratones control ($1.79 \pm 0.38\text{g}$, $p = 0.014$).

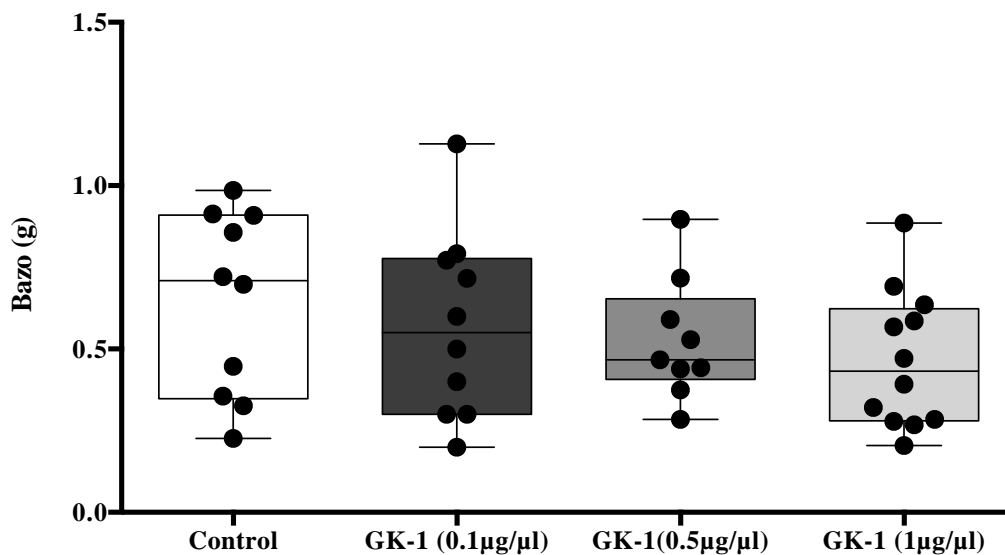


Figura 6.3 Efecto dosis-dependiente del tratamiento con GK-1 en la esplenomegalia.

Boxplot que indica la distribución de los datos de los pesos de los bazos obtenidos durante las necropsias de ratones tratados con $0.1 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ (gris oscuro), $0.5 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ (gris medio), $1 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ (gris claro) GK-1 y animales control (blanco) (ver sección 5.3). Los bigotes representan los máximos y mínimos. El centro de la caja señala la mediana de los datos. La parte inferior de la caja corresponde al primer cuartil y la parte superior indica el tercer cuartil de los datos. Los valores se obtuvieron a partir de una muestra aleatoria de cinco experimentos independientes.

Como se mencionó con anterioridad, el modelo 4T1 se caracteriza por la inducción de esplenomegalia. Con la finalidad de establecer si el efecto antineoplásico de GK-1 se asocia a una

reducción en la esplenomegalia se determinó el peso de los bazos como se indica en la sección 5.3. Al respecto, en la figura 6.3 y en la Tabla 6.1 se reportan los promedios del peso de los bazos de los ratones con tumores inducidos por la línea celular 4T1. Aquellos animales que recibieron el tratamiento con GK-1 presentan en promedio una esplenomegalia menor con respecto a los controles. Dicho efecto parece ser dosis dependiente dado que el promedio del peso de los bazos de los ratones tratados con 1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ de GK-1 ($0.47 \pm 0.21\text{g}$) es menor con respecto a las otras dosis (GK-1 0.1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$, $0.57 \pm 0.29 \text{ g}$; GK-1 0.5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$, $0.53 \pm 0.19\text{g}$) y al grupo control ($0.64 \pm 0.28\text{g}$); sin embargo, dicho efecto no fue estadísticamente significativo ($p = 0.09$ GK-1 (1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) vs. control).

Tabla 6.1. GK-1 reduce la tasa de crecimiento de tumores primarios, la esplenomegalia y el desarrollo de metástasis pulmonares.

Grupo de estudio	Volumen tumoral (mm^3)	Peso tumoral (g)	Tumores metastásico pulmonares	Bazo (g)
Control	717.44 ± 90.15	1.79 ± 0.38	90.50 ± 45.16	0.64 ± 0.28
GK-1 (0.1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$)	451.01 ± 62.74	0.93 ± 0.12	5.33 ± 2.78	0.57 ± 0.29
GK-1 (0.5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$)	313.46 ± 71.11	0.93 ± 0.31	1.00 ± 0.77	0.53 ± 0.19
GK-1 (1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$)	297.73 ± 59.56	0.83 ± 0.16	5.67 ± 5.67	0.47 ± 0.21
Valor de p	$< 0.0001^*$	$< 0.01^{**}$ 0.014^*	0.006^*	ns

El volumen tumoral fue determinado en cada ratón como se describe previamente en la sección 5.3. Los ratones se sacrificaron a los 39 días posteriores a la implantación de células 4T1, sus tumores y pulmones fueron disecados; los tumores y bazos fueron pesados y los pulmones se analizaron macroscópicamente en busca de tumores. Se indica la media \pm DE de todas las medidas en ratones tratados con GK-1 (0.1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$, 0.5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$, y 1.0 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) y no tratados. * Control vs GK-1 (0.1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) vs GK-1 (0.5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) vs GK-1 (1.0 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$); ** GK-1 (0.1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) vs GK-1 (0.5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$); ** GK-1 (0.1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) vs GK-1 (1.0 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$). ns indica diferencias estadísticamente no significativas (valor de $p = 0.09$). Los valores de las macrometástasis pulmonares se obtuvieron a partir de una muestra aleatoria de cinco experimentos independientes (7 ratones tratados con GK-1 (0.1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$, 0.5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$, y 1.0 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) y 7 ratones no tratados).

6.3 NECROSIS EN TUMORES PRIMARIOS ASOCIADA AL TRATAMIENTO CON GK-1

Se realizó un análisis histopatológico de muestras de tumor primario de ratones tratados con GK-1 (únicamente 0.1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) y controles (Figura 6.4A). Los resultados revelaron un aumento de las áreas de células necróticas en la capa superficial de los tumores primarios en ratones tratados con GK-1 (Figura 6.4B, $p = 0.001$). Destacan claras diferencias citológicas entre las células cancerosas vivas, las cuales se caracterizan por ser más grandes (con un núcleo basófilo bien definido con hasta dos nucléolos rodeados por un citoplasma eosinófilo), con respecto a células necróticas (células más pequeñas que perdieron el núcleo y el citoplasma es eosinofílico) (Figura 6.5).

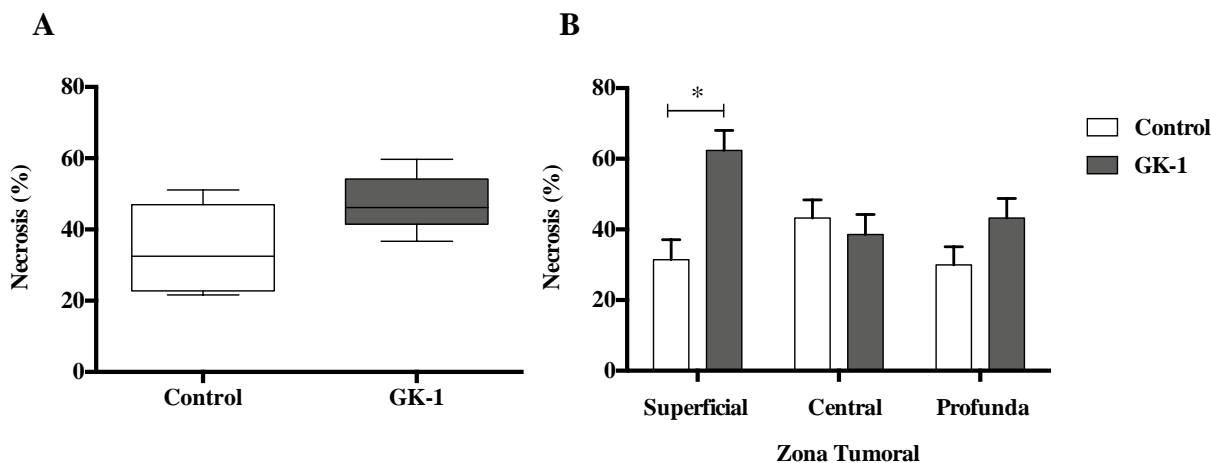
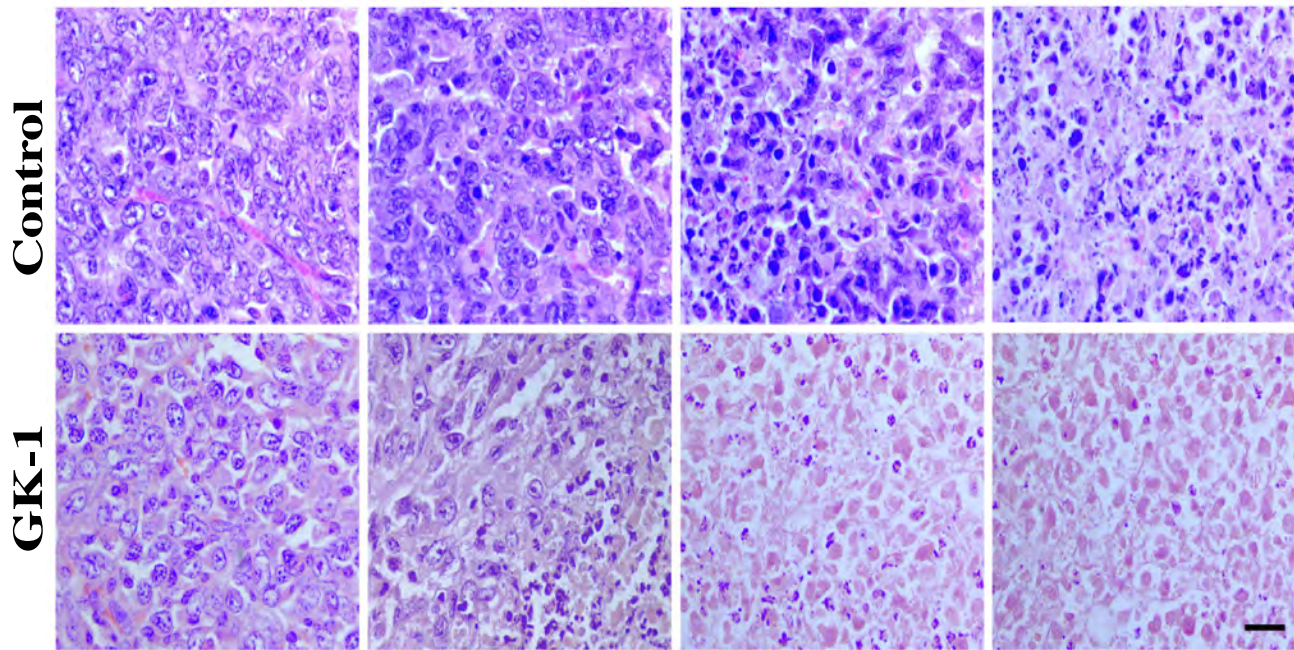


Figura 6.4 GK-1 aumenta la necrosis celular en el tumor primario.

El gráfico de barras representa el porcentaje total de áreas de necrosis en el tumor primario tanto en ratones tratados con GK-1 (0.1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) como ratones no tratados (A). Se muestran los hallazgos histopatológicos representativos en las áreas superficiales, centrales y profundas de tumores primarios en ratones no tratados y ratones tratados con GK-1. El porcentaje de necrosis aumentó significativamente en la zona superficial de los tumores primarios de ratones tratados con GK-1 ($p = 0.001$) (B). Los valores se obtuvieron a partir de una muestra aleatoria de cinco experimentos independientes (6 ratones tratados con GK-1 y 6 ratones no tratados).



% Áreas Necróticas

Figura 6.5 Características morfológicas asociadas a necrosis.

Se muestran zonas de transición de los tumores primarios de ratones tratados con GK-1 (0.1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) y controles. Las células tumorales vivas se identificaron claramente por la presencia de núcleos basófilos con hasta dos nucléolos rodeados por un citoplasma eosinofílico bien definido (paneles superior e inferior izquierdo), mientras que las áreas de células necróticas se caracterizaron por la presencia de cuerpos apoptóticos, picnosis (núcleos pequeños e intensamente basófilos), cariorrresis (núcleos picnóticos y fragmentados) y cariólisis (una ruptura completa o degeneración de núcleos). Estos cambios nucleares se acompañaron por una pérdida de definición del citoplasma, que apareció como una masa compacta homogénea y eosinofílica, y con márgenes celulares indistintos. Una vez que estas alteraciones nucleares y citoplasmáticas se presentan, la célula muerta es una masa homogénea anucleada y eosinofílica (paneles superior e inferior derecho). En segundo lugar, el tercer panel superior e inferior representan áreas de transición entre células tumorales vivas y células necróticas (paneles centrales superior e inferior). Los ratones no tratados presentan más células tumorales vivas y menos áreas necróticas que los ratones tratados con GK-1, los cuales mostraron una transición más abrupta a las áreas de necrosis. Tinción H&E, bar = 20 μm . Los valores se obtuvieron a partir de una muestra aleatoria de cinco experimentos independientes (6 ratones tratados con GK-1 y 6 ratones no tratados).

6.4 GK-1 REDUCE LA MACROMETÁSTASIS PULMONAR

Las macrometástasis presentes en la superficie pulmonar por ratón se contaron tanto en los animales tratados con GK-1 (0.1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$, 0.5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$, y 1.0 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) como en los ratones no tratados. Los órganos disecados se fijaron en solución de Zamboni al 10% durante una noche a 4°C. Se observan imágenes representativas tomadas de las regiones posterior y anterior de los pulmones de ratones no tratados, y de ratones tratados con 0.1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$, 0.5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$, y 1.0 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ de GK-1. Como se puede observar en la Figura 6.6 y en la Tabla 6.1, el número de tumores metastásicos pulmonares se redujo significativamente en ratones tratados con todas las concentraciones de GK-1 (0.1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$, 0.5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$, y 1.0 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$), en comparación con el grupo control ($p = 0,006$).

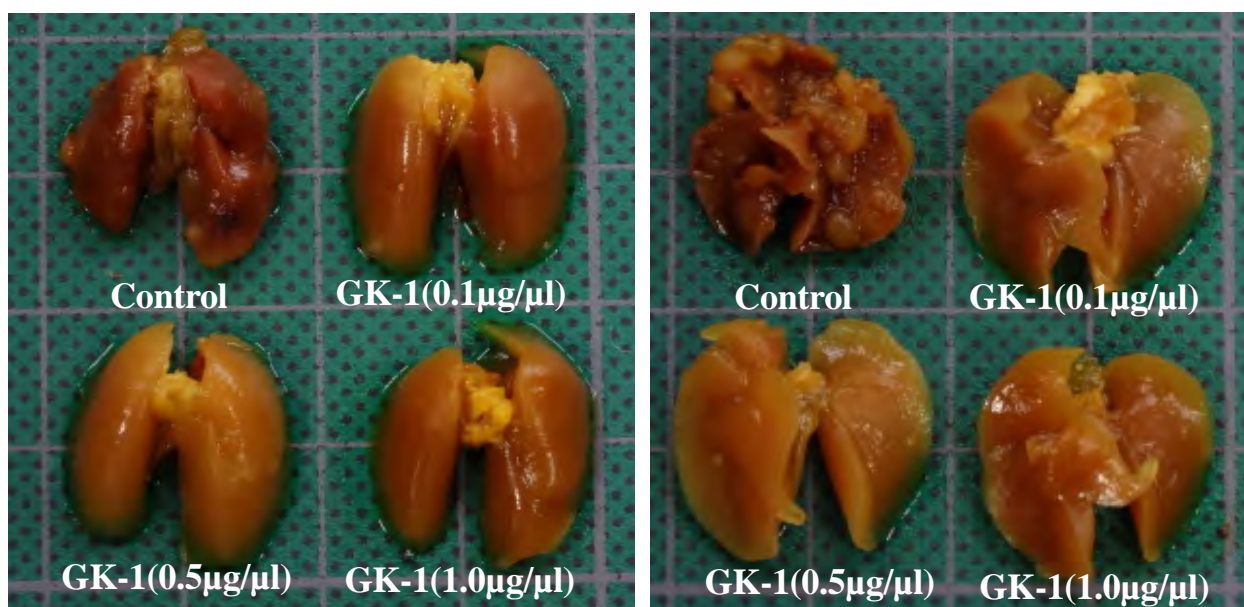


Figura. 6.6 El tratamiento con GK-1 se asocia a una menor proporción de tumores metastásicos pulmonares.

Se diseccionaron los pulmones de ratones con tumores inducidos por la línea celular 4T1 como se indica en las secciones 5.3 y 5.5. Los ratones que recibieron el tratamiento con GK-1 presentaron una menor cantidad de tumores secundarios de forma dosis dependiente. El número de macrometástasis pulmonares se determinó a partir de una muestra aleatoria de cinco experimentos independientes (7 ratones tratados con GK-1 (0.1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$, 0.5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$, y 1.0 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) y 7 ratones no tratados).

6.5 PERFIL DE FACTORES SOLUBLES ASOCIADO AL TRATAMIENTO CON GK-1

Como se señaló previamente los sitios de metástasis del modelo murino de cáncer de mama 4T1 son pulmones, cerebro, hígado y hueso. Con base en lo anterior se diseccionaron dichos órganos y se determinó la concentración de factores solubles en extractos proteicos de suero, tumores primarios, pulmones, hígado, bazo y cerebro, para determinar el tipo de respuesta inmune establecida en cada uno de los sitios previamente indicados. Se realizó un análisis exploratorio jerárquico no supervisado para establecer si las diferencias en las concentraciones de factores solubles permiten agrupar de forma separada los grupos en estudio (Figura 6.7, todos los órganos y grupos de estudio). Al respecto encontramos que las diferencias en la concentración de factores solubles presentes en pulmones y cerebro permiten agrupar a los ratones con y sin tratamiento de forma independiente y más clara que con respecto a otros tejidos (Figura 6.8 y 6.9, respectivamente). Una vez establecido en qué órganos existen claras diferencias entre las concentraciones de factores solubles se realizó el análisis estadístico descrito en la sección 5.7. Los resultados de dicho análisis se reportan en la Tabla 6.2 y en la Figura 6.10. En este sentido, en los únicos sitios donde no se encontró ninguna diferencia estadísticamente significativa fue en suero y en hígado (En Anexos: Tabla S.1). Por otro lado, como se observa en la Tabla 6.2, en el bazo existe un incremento en la concentración de IL-12, MIP-1 α , IL-1 α y MIG en los ratones tratados con GK-1 con respecto a los ratones control. Adicionalmente en cerebro, los ratones sin tratamiento presentaron una mayor concentración de FGF básico, MCP-1, IL-5 e IL-4, en contraste con los ratones con GK-1, los cuales presentaron una mayor concentración de IL-17 e IL-2.

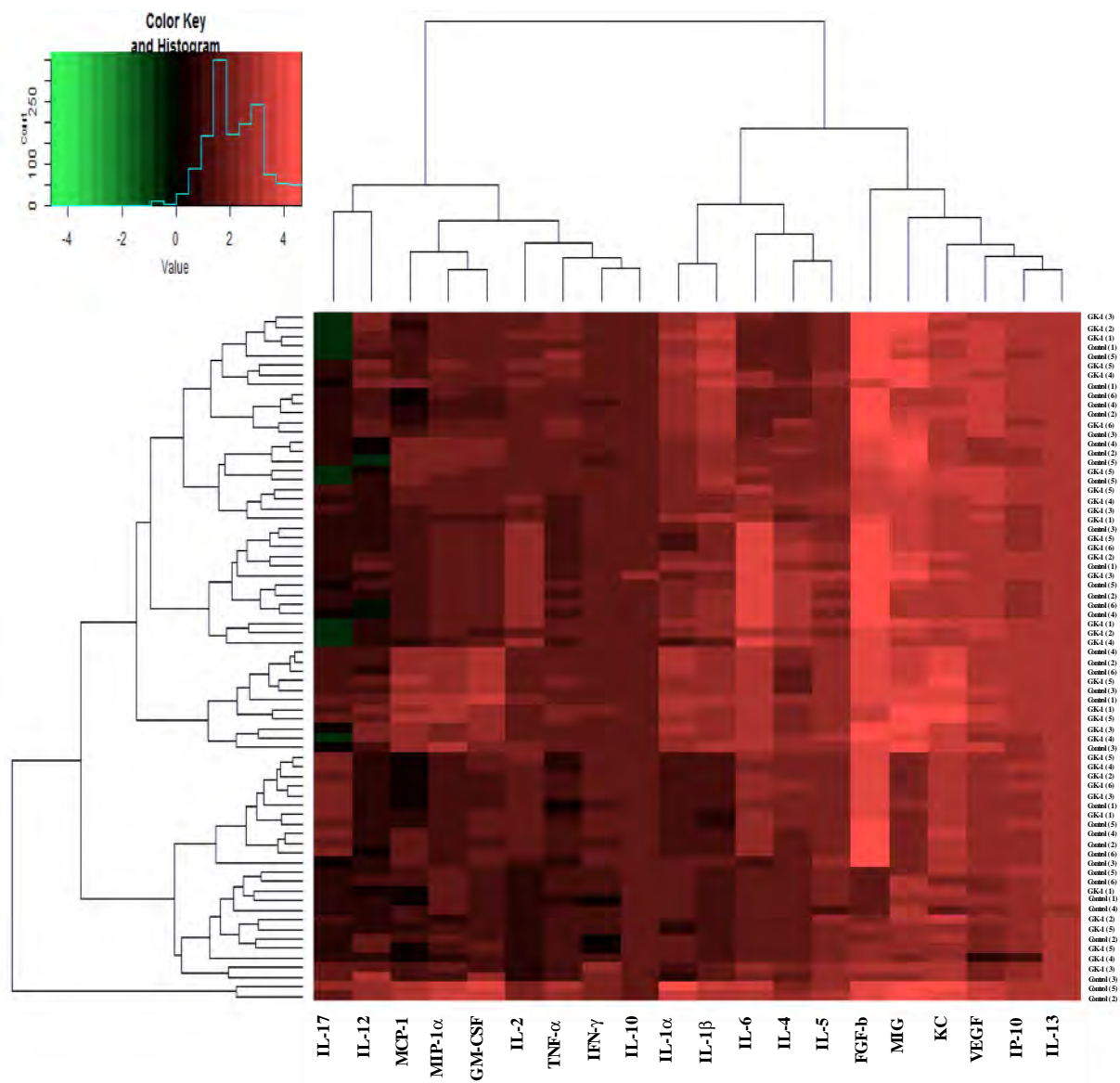


Figura 6.7 Expresión de las concentraciones de factores solubles en suero, tumores primarios, pulmones, hígado, bazo y cerebro de ratones tratados con GK-1 y sin tratamiento.

Análisis jerárquico no supervisado de la correlación entre la concentración de los factores solubles cuantificados en tumor, pulmones, cerebro, hígado, bazo y suero. Los niveles de producción de las citocinas individuales están representados por tonos de rojo a verde en el mapa de calor, con los valores más altos en rojo claro y los más bajos en verde claro. En este análisis jerárquico no supervisado, los ratones control y los animales tratados con GK-1 (0.1 µg/µl) no se agruparon como se esperaba en 2 grupos discretos, lo que claramente indica que los cambios en la concentración de citocinas no fueron distintos de forma global entre los grupos en estudio. Los datos corresponden a una muestra aleatoria de 6 animales por grupo obtenidos de 5 experimentos independientes.

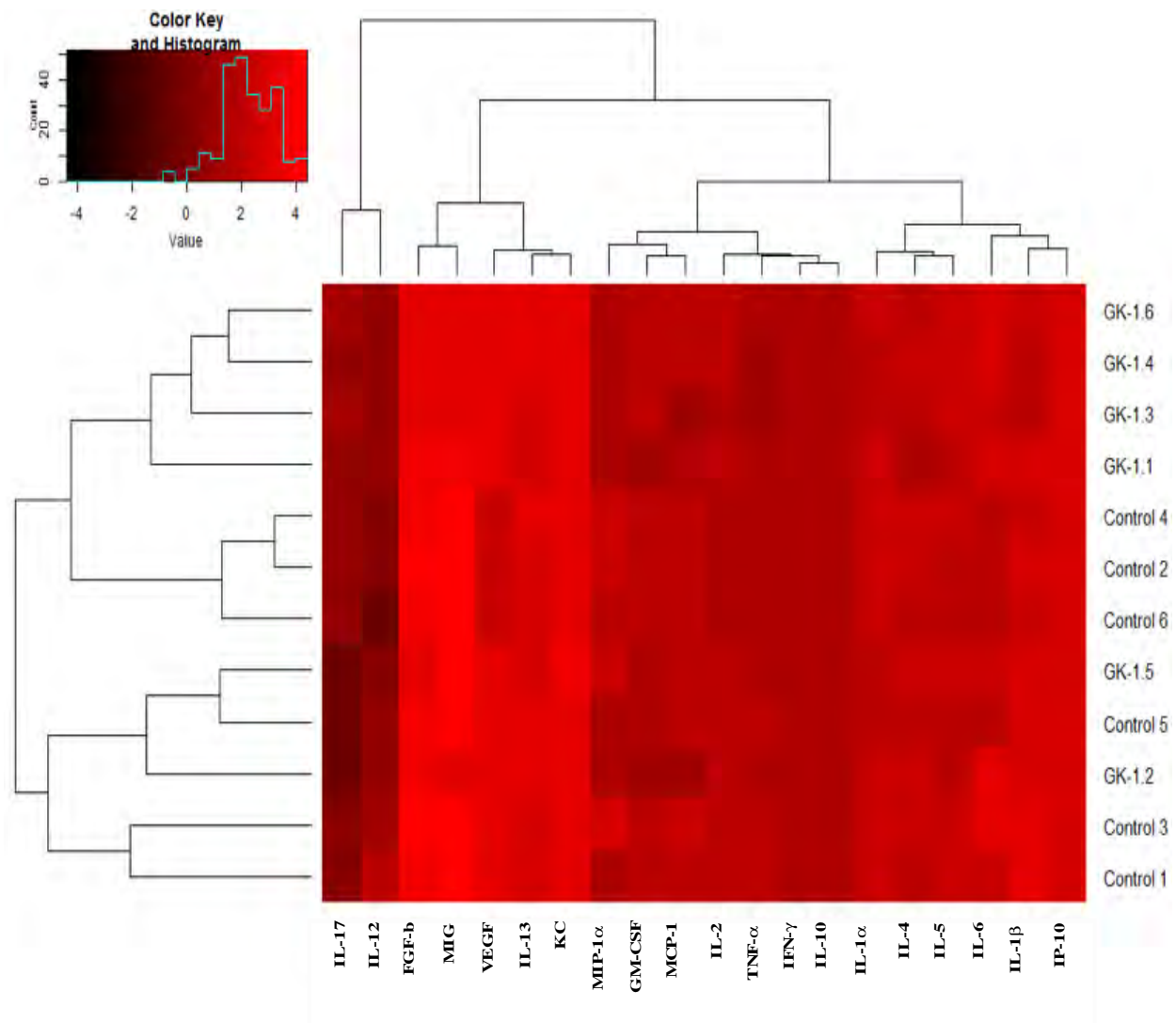


Figura 6.8 Los ratones administrados con GK-1 presentan en pulmón un perfil de producción de factores solubles distinto a los animales control.

Análisis jerárquico no supervisado de la correlación entre la concentración de los factores solubles cuantificados en pulmones. Los valores de la concentración de citocinas individuales están representados por tonos de negro a rojo en el mapa de calor, con los valores más altos en rojo claro y los más bajos en negro. En este análisis jerárquico no supervisado, los ratones control y los animales tratados con GK-1 se agruparon como se esperaba en grupos discretos, lo que indica que existen cambios en la concentración de citocinas en los pulmones de los ratones en estudio. Los datos corresponden a una muestra aleatoria de 6 animales por grupo obtenidos de 5 experimentos independientes.

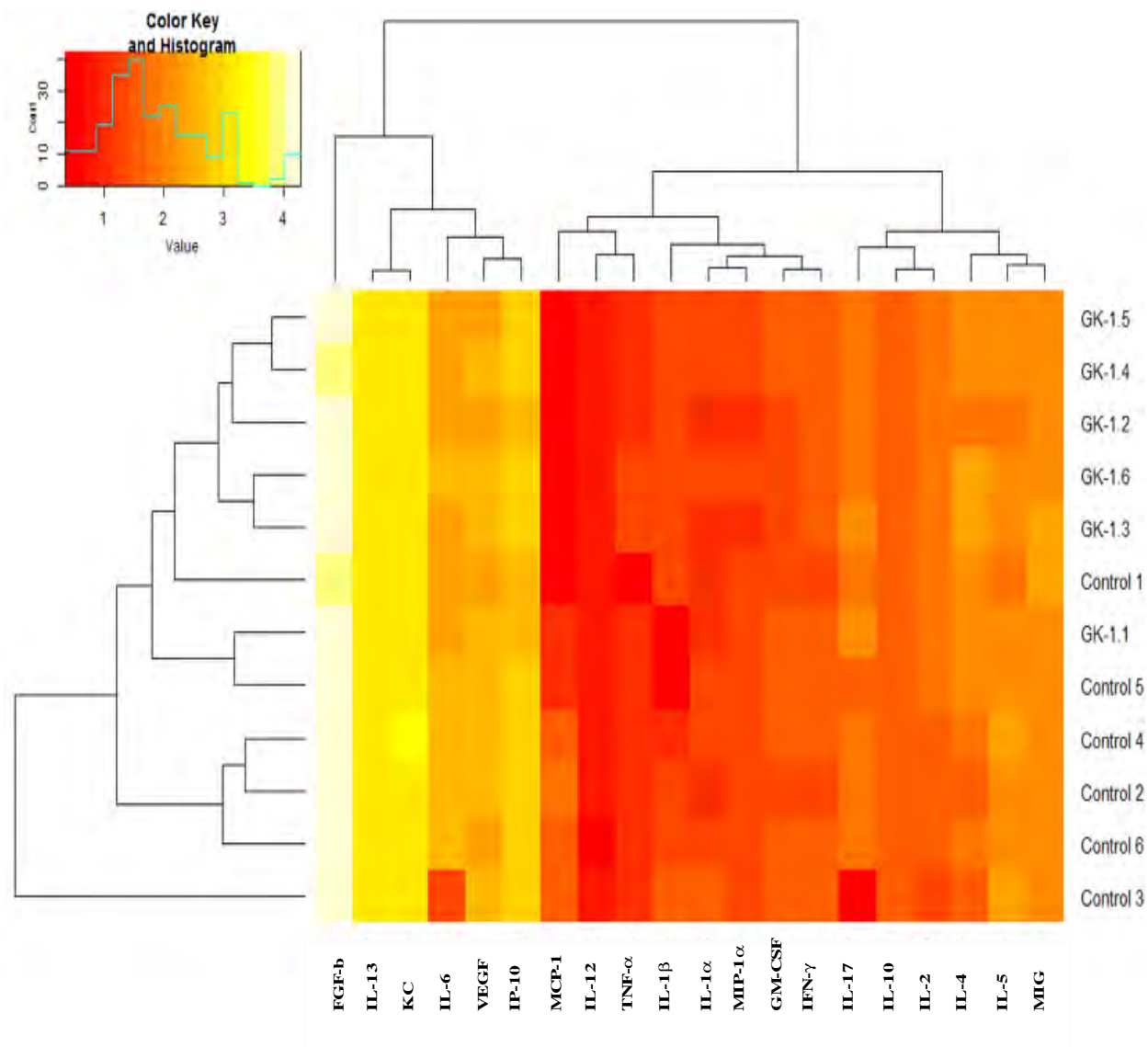


Figura 6.9 El tratamiento con GK-1 se asocia a un perfil de producción de citocinas diferencial con respecto a los animales control en cerebro.

Análisis jerárquico no supervisado de la correlación entre la concentración de los factores solubles cuantificados en cerebro. Los valores de la concentración de citocinas individuales están representados por tonos de blanco a rojo en el mapa de calor, con los valores más altos en blanco y los más bajos en rojo. En este análisis jerárquico no supervisado, los ratones control y los animales tratados con GK-1 se agruparon en grupos discretos, lo que indica que existen cambios en la concentración de factores solubles producidos en cerebro de los ratones en estudio. Los datos corresponden a una muestra aleatoria de 6 animales por grupo obtenidos de 5 experimentos independientes.

Tabla 6.2 El tratamiento con GK-1 se asocia a un perfil diferencial de factores solubles en bazo y cerebro.

	Bazo		Cerebro	
	GK-1 (0.1µg/µl)	Control	GK-1 (0.1µg/µl)	Control
FGF Basic	2.30E+04 ± 3.54E+03	2.39E+04 ± 7.05E+03	1.16E+04 ± 1.54E+03	* 1.54E+04 ± 2.95E+03
IL-12	8.06E+01 ± 3.61E+01	* 2.40E+01 ± 1.30E+01	5.29E+00 ± 0.00E+00	4.79E+00 ± 1.23E+00
IL-17	2.98E+00 ± 3.01E+00	3.41E+00 ± 2.43E+00	8.06E+01 ± 1.83E+01	* 5.35E+01 ± 2.92E+01
MIP-1α (CCL3)	4.99E+01 ± 1.51E+01	* 2.93E+01 ± 5.88E+00	1.40E+01 ± 3.47E+00	1.97E+01 ± 4.08E+00
GM-CSF	3.79E+01 ± 1.60E+01	2.97E+01 ± 1.40E+01	2.53E+01 ± 8.27E+00	3.00E+01 ± 1.08E+01
MCP-1 (CCL2)	1.19E+01 ± 4.41E+00	7.74E+00 ± 4.21E+00	3.44E+00 ± 2.06E+00	* 3.01E+01 ± 2.05E+01
IL-5	1.65E+02 ± 1.00E+02	1.18E+02 ± 3.92E+01	1.18E+02 ± 2.19E+01	* 1.43E+02 ± 5.17E+01
IL-1α	6.28E+02 ± 2.42E+02	* 3.31E+02 ± 3.97E+01	1.44E+01 ± 3.44E+00	1.83E+01 ± 6.87E+00
TNF-α	1.00E+02 ± 2.46E+01	1.20E+02 ± 1.17E+02	1.26E+01 ± 5.88E+00	9.71E+00 ± 3.92E+00
IL-2	6.65E+01 ± 1.05E+01	5.95E+01 ± 3.06E+00	6.02E+01 ± 7.11E+00	* 4.18E+01 ± 1.19E+01
MIG (CXCL9)	2.31E+04 ± 1.36E+04	* 4.01E+03 ± 3.36E+03	1.44E+02 ± 2.83E+01	1.50E+02 ± 3.42E+01
IL-4	7.03E+01 ± 9.56E+01	4.14E+01 ± 2.81E+01	1.36E+02 ± 5.13E+01	* 6.22E+01 ± 2.60E+01

Se reporta la concentración en pg/ml y se expresan los datos en media ±DE. Los datos corresponden a las diferencias estadísticamente significativas analizadas en bazo y cerebro. Se tomó una muestra aleatoria de 5 experimentos independientes. *valor de p < 0.05

Además de la identificación de diferencias estadísticamente significativas en tumor primario, bazo, pulmones y cerebro realizamos otro análisis exploratorio a través de matrices de correlación para determinar la relación entre el perfil de producción de factores solubles; encontrándose 8 correlaciones positivas estadísticamente significativas en los ratones tratados con GK-1 y 6 correlaciones en los ratones controles (Tabla 6.3) (Figuras 6.11-6.13). Dichas correlaciones se presentaron en tumor primario (VEGF vs IL-13, MIP-1α vs TNF-α e IL-2 vs IL-1β), bazo (VEGF vs IL-1β), cerebro (IL-13 vs VEGF e IP-10 vs KC) e hígado (IL-1β vs VEGF e IL-13 vs IP-10). Con respecto a los controles se encontraron 3 correlaciones positivas en suero (IP-10 vs IL-13) y cerebro (GM-CSF vs IL-1α e IL-5 vs IL-1α), asimismo, se encontraron 3 correlaciones negativas en hígado (IL-4 vs VEGF), pulmones (KC vs IL-17) y bazo (IL-17 vs IL-1α).

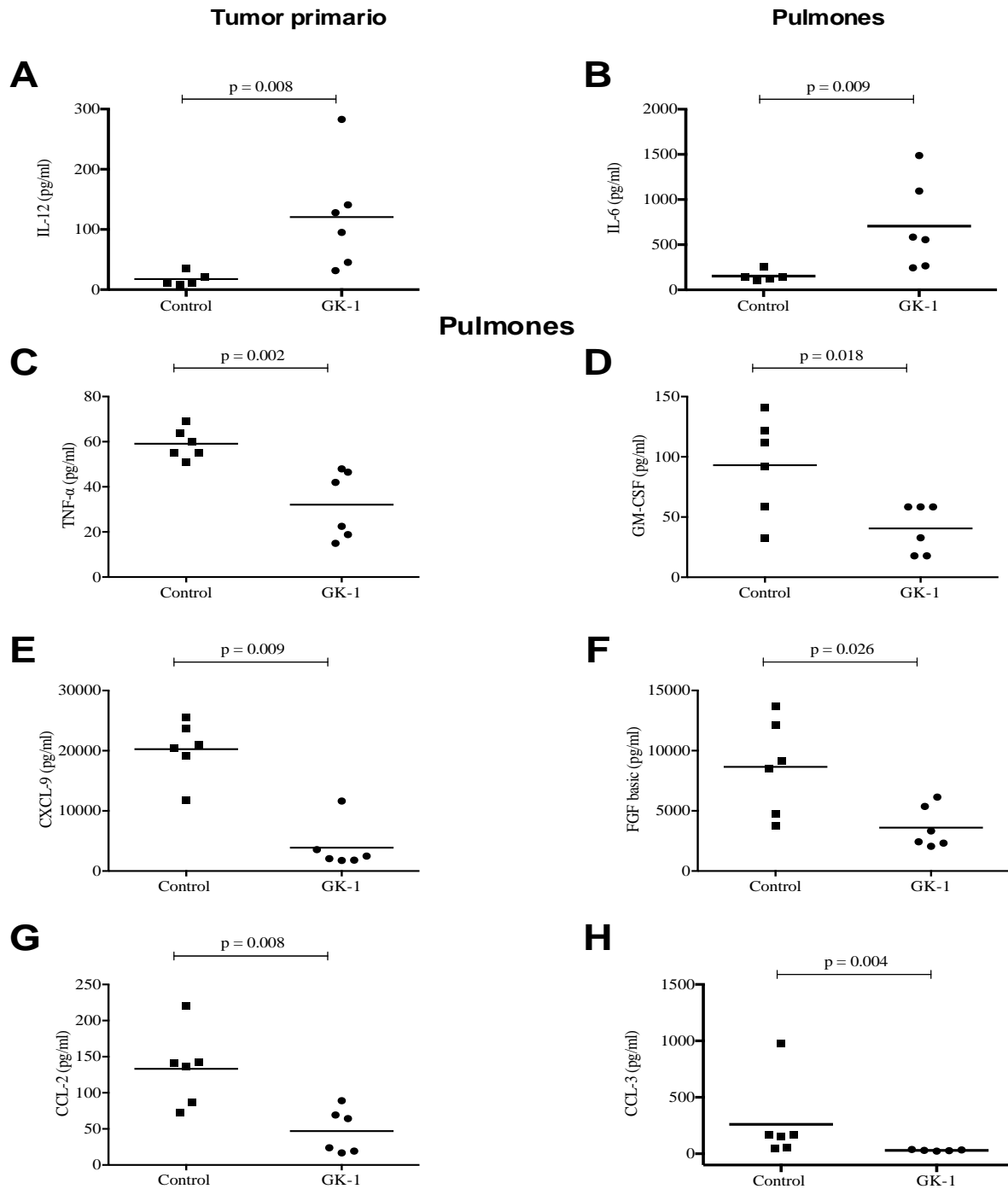


Figura 6.10 GK-1 induce cambios en el microambiente tumoral: perfil de citocinas, quimiocinas y factores de crecimiento.

Los diagramas de puntos representan los valores individuales de los ratones tratados con GK-1 (0.1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) y no tratados; la línea representa la media de cada grupo (pg/ml). Los datos corresponden a diferencias estadísticamente significativas encontradas en los tumores primarios (A) y muestras de pulmones (B-H) entre ratones tratados con GK-1 y ratones no tratados. Los valores se obtuvieron a partir de una muestra aleatoria de cinco experimentos independientes (6 ratones tratados con GK-1 y 6 ratones no tratados).

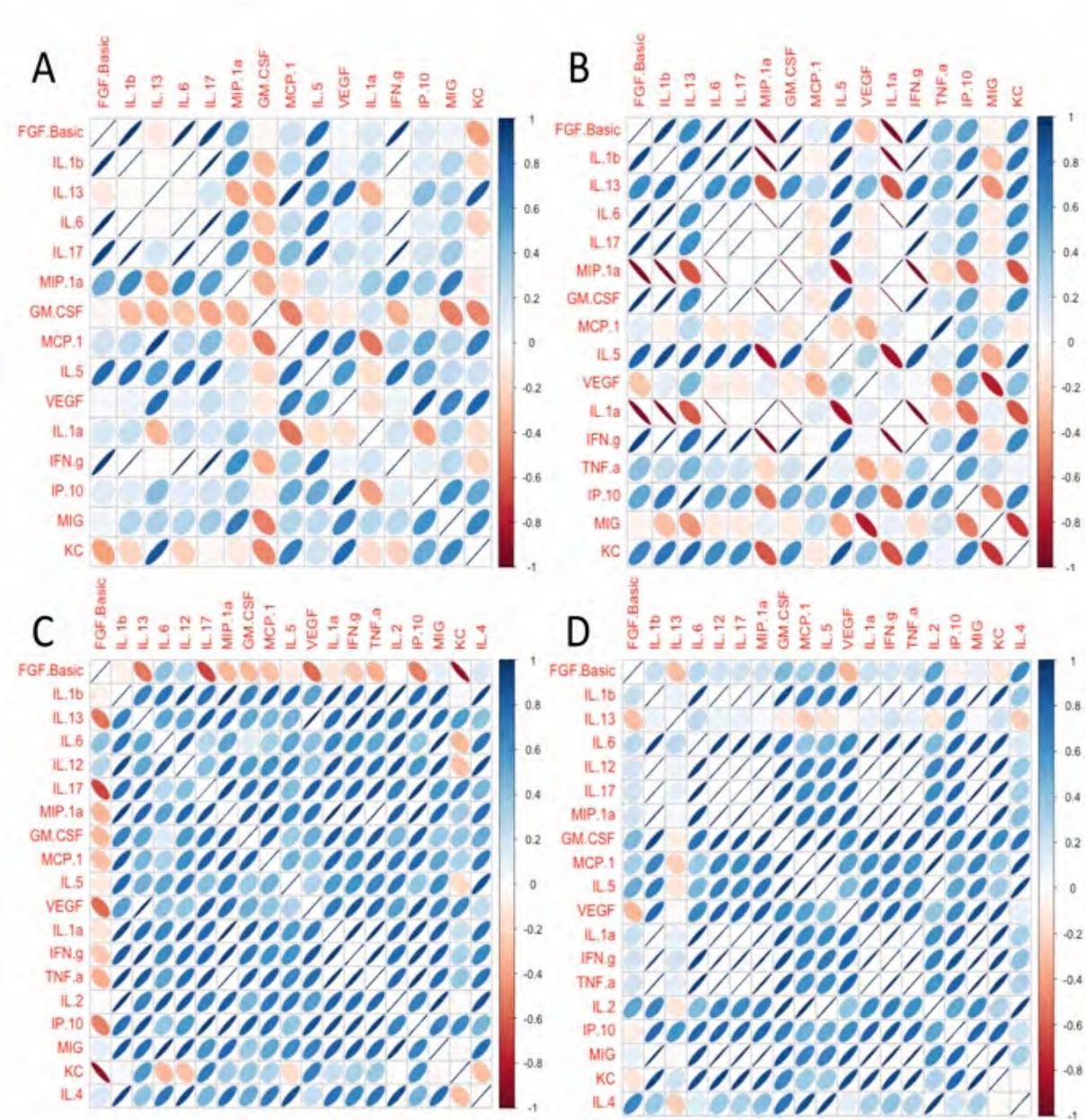


Figura 6.11 Correlación de factores solubles en suero y tumor primario asociados al tratamiento con GK-1.

Los ratones con GK-1 corresponden a las matrices A y C. Los ratones sin tratamiento corresponden a las matrices B y D. Se utilizó un modelo de regresión lineal para analizar la correlación entre las concentraciones de citocinas, quimiocinas y factores de crecimiento en animales no tratados, y ratones tratados con GK-1. La escala azul corresponde a las correlaciones positivas y la escala roja a las negativas. El grosor del punto indica la dispersión de los datos, por lo tanto, entre más delgado sea el punto hay menos dispersión. Los valores se recolectaron a partir de una muestra aleatoria de 5 experimentos independientes (6 ratones tratados con GK-1 y 6 ratones no tratados).

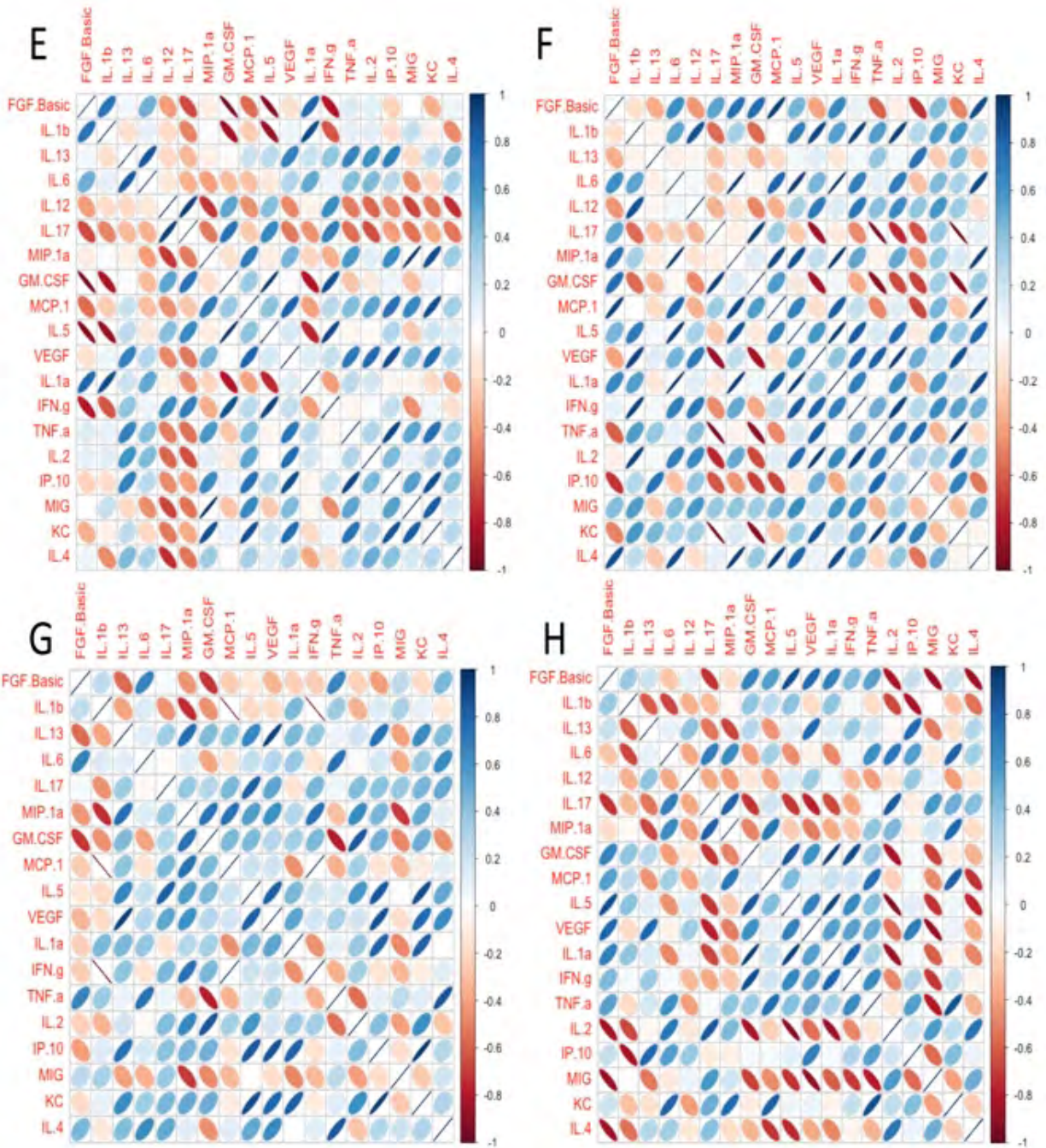


Figura 6.12 Correlación de factores solubles en pulmones y cerebro asociados al tratamiento con GK-1.

Los ratones con GK-1 corresponden a las matrices E y G. Los ratones sin tratamiento corresponden a las matrices F y H. Se utilizó un modelo de regresión lineal para analizar la correlación entre las concentraciones de citocinas, quimiocinas y factores de crecimiento en animales no tratados, y ratones tratados con GK-1. La escala azul corresponde a las correlaciones positivas y la escala roja a las negativas. El grosor del punto indica la dispersión de los datos, por lo tanto, entre más delgado sea el punto hay menos dispersión. Los valores se recolectaron a partir de una muestra aleatoria de 5 experimentos independientes (6 ratones tratados con GK-1 y 6 ratones no tratados).

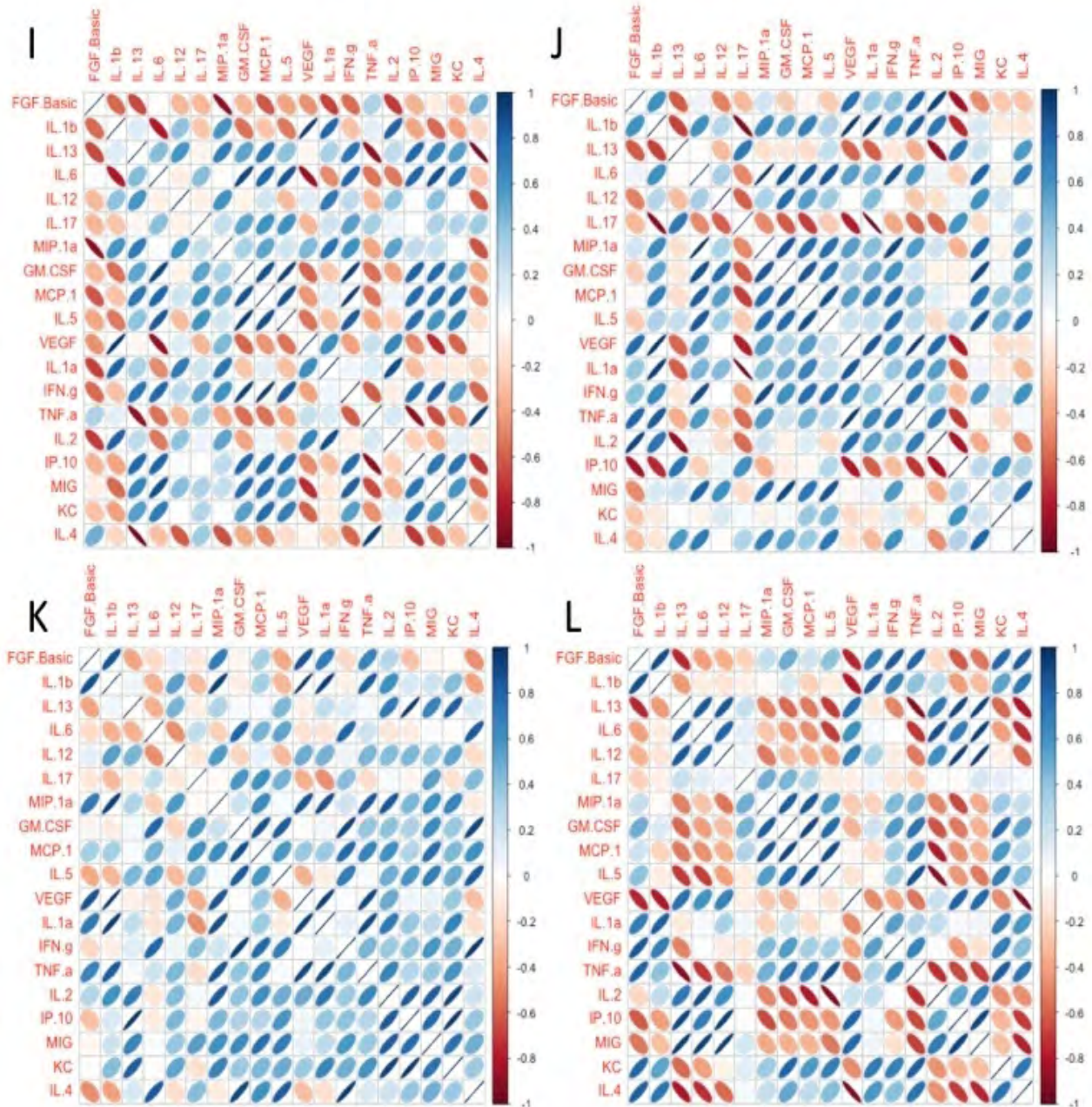


Figura 6.13 Correlación de factores solubles en bazo e hígado asociados al tratamiento con GK-1

Los ratones con GK-1 corresponden a las matrices I y K; los ratones sin tratamiento corresponden a las matrices J y L. Se utilizó un modelo de regresión lineal para analizar la correlación entre las concentraciones de citocinas, quimiocinas y factores de crecimiento en animales no tratados, y ratones tratados con GK-1. La escala azul corresponde a las correlaciones positivas y la escala roja a las negativas. El grosor del punto indica la dispersión de los datos, por lo tanto, entre más delgado sea el punto hay menos dispersión. Los valores se recolectaron a partir de una muestra aleatoria de 5 experimentos independientes (6 ratones tratados con GK-1 y 6 ratones no tratados).

Tabla 6.3 Correlación de factores solubles presentes en ratones tratados con GK-1 y controles.

Muestra	GK-1 (0.1µg/µl)		Control			
	+	R²	+	R²	-	R²
Suero			IP-10 vs IL-13	0.91		
Tumor primario	VEGF vs IL-13 MIP-1α vs TNF-α IL-2 vs IL-1β	0.96 0.90 0.91				
Pulmones					IL-17 vs KC	0.95
Cerebro	VEGF vs IL-13 IP-10 vs KC	0.86 0.89	GM-CSF vs IL-1α IL-5 vs IL-1α	0.89 0.86		
Hígado	VEGF vs IL-1β IP-10 vs IL-13	0.94 0.90			VEGF vs IL-4	0.84
Bazo	VEGF vs IL-1β	0.90			IP-10 vs. IL-13	0.91

R²= coeficiente de correlación. Todas las correlaciones presentadas son estadísticamente significativas (p<0.05).

+ correlación positiva

- correlación negativa

7. DISCUSIÓN

En este trabajo se obtuvo evidencia que respalda, por primera vez, que GK-1 tiene la capacidad de alterar la progresión de cáncer de mama en un modelo murino. En este sentido, el tratamiento con GK-1 aumentó significativamente la tasa de supervivencia de los ratones portadores de tumores 4T1 de forma dosis-dependiente (Figura 6.1, $p < 0.0001$). El efecto más fuerte se obtuvo al administrar $0.5 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ de GK-1, observándose un incremento de la supervivencia del 23.8% con respecto a los controles. Lo anterior, concuerda con lo previamente reportado por Pérez-Torres y colaboradores en un modelo murino de melanoma [273]. En dicho estudio se observó que la administración semanal peritumoral de GK-1 aumentó la supervivencia 42,58% de los ratones con tumores de melanoma (línea celular B16F10) [273]. Este efecto denota la capacidad de GK-1 de estimular el sistema inmune del hospedador, por lo que es importante establecer las condiciones que gobiernan el microambiente tumoral en cada neoplasia, ya que, en el caso del cáncer de mama, GK-1 podría compensar la inmunosupresión que acompaña a los tumores murinos de mama 4T1 y controlar así su crecimiento [279]. Dicha especulación se basa en experimentos *in vitro* en los cuales se comprobó que GK-1 activa CPA e induce la proliferación de células T [269-272], por lo cual es factible que GK-1 sea un inmunopotenciador inespecífico con capacidad de revertir el microambiente supresor.

Por otro lado, se han descrito varios péptidos antitumorales [280], muchos de los cuales comparten algunas propiedades fisicoquímicas de GK-1, como una carga neta positiva e hidrofobia. La carga neta positiva se ha atribuido a la presencia de residuos de lisina, mientras que la hidrofobicidad se debe, en parte, a la presencia de aminoácidos hidrófobos como cisteína, prolina, glicina, metionina y tirosina. Algunos péptidos ricos en prolina como el cicloheptapéptido phakellistatin, derivado de esponjas marinas, tienen propiedades citotóxicas antitumorales e inhiben el ciclo celular [281]. Una característica que distingue a GK-1 es que es rico en prolina y aminoácidos aromáticos. Por

lo tanto, es probable que GK-1 pueda ejercer sus propiedades antitumorales debido a su particular conformación. Aunado a lo anterior, se ha propuesto que los péptidos ricos en prolina pueden ejercer efectos antitumorales al alterar la membrana celular [282].

Junto con el aumento significativo en la tasa de supervivencia, los ratones inyectados por vía intravenosa con GK-1 presentaron una tasa de crecimiento del tumor primario menor que los controles (Figura 6.2, Tabla 6.1). Pérez-Torres y colaboradores reportaron un efecto similar; ellos encontraron un retraso en el crecimiento melanoma subcutáneo de 3 a 12 días en ratones tratados con GK-1 en contraste con controles (administrados con solución salina) ($p < 0.05$) [273]. Además de presentar un volumen tumoral menor, los ratones tratados con GK-1 tuvieron tumores de menor peso al contrastar con los tumores de ratones control. Al respecto, el peso tumoral promedio de los ratones tratados con GK-1 fue 0.93 ± 0.12 g (dosis de $0.1 \mu\text{g}/\mu\text{l}$), 0.93 ± 0.31 g (dosis de $0.5 \mu\text{g}/\mu\text{l}$), 0.83 ± 0.16 g (dosis de $1.0 \mu\text{g}/\mu\text{l}$), en contraste con los ratones control, 1.79 ± 0.38 g ($p = 0.014$).

Para evaluar el efecto antitumoral de GK-1, se realizó un análisis histológico de las áreas de muerte celular presentes en el tumor primario. Se encontró un porcentaje significativamente mayor de células muertas en la zona del tumor cercana a la piel en ratones tratados con GK-1 (dosis de $0.1 \mu\text{g}/\mu\text{l}$) con respect a los animales no tratados ($62.36\% \pm 43.82$ vs. $31.44\% \pm 43.72$, respectivamente) ($p = 0.001$) (Figura 6.4 y 6.5). Este incremento en la necrosis tumoral también fue reportado por Pérez-Torres y colaboradores en un modelo de melanoma [273].

Al igual que en el cáncer de mama humano, el modelo murino 4T1 se caracteriza por presentar metástasis natural a pulmones, el hígado, los huesos y el cerebro [242-244]. En este estudio, evaluamos la aparición de macrometástasis en hígado, cerebro y pulmón, encontrando focos metastásicos en pulmones tanto en ratones tratados como en no tratados con GK-1. Identificamos una disminución significativa de metástasis pulmonar asociada al tratamiento con GK-1 ($p = 0,006$,

Tabla 6.1 y Figura 6.6). Se sabe, que el desarrollo de metástasis en los carcinomas depende de cambios en el microambiente tumoral, que favorecen la salida de las células cancerosas a través de su desprendimiento del tumor primario, lo que les permite invadir el estroma y romper la membrana basal [283]. En este sentido, se ha reportado que aproximadamente 1×10^6 células cancerosas pueden salir del tumor a la circulación por gramo de tumor por día [284]. Teniendo en cuenta esto, el efecto antimetastásico de GK-1 puede estar relacionado con el aumento de la muerte tisular observado en tumores primarios de ratones tratados, particularmente en las zonas superficiales de los tumores, lo que podría limitar la cantidad de células cancerosas que salen del tumor. Además, se observó un incremento en la concentración de IL-12 en el tumor primario, lo cual podría relacionarse con la necrosis encontrada en los mismos. En este sentido, se sabe que IL-12 tiene propiedades antitumorales, mediadas a través del eje de activación IFN- γ /IP-10, que induce actividad anti-angiogénica [285-287]. Sin embargo, es importante señalar que no se encontraron cambios en la concentración de dichos factores solubles, por lo que es posible que la función de IL-12 se asocie a la presencia de células TCD8+ y células NK. Sin embargo, se requieren más experimentos para determinar si el daño tumoral depende de estas estirpes celulares. La evaluación de la concentración de 20 factores solubles para determinar el perfil de citocinas, quimiocinas y factores de crecimiento en suero, tumores primarios, hígado, bazo, pulmones y cerebro, sugiere que GK-1 promovió un ambiente proinflamatorio en el bazo, asociado a un incremento en la concentración de IL-12, CCL3 (MIP-1 α), IL-1 α y CXCL9 (MIG) (Tabla 6.2). Aunado a esto, el peso de los bazos de ratones tratados con 1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ de GK-1 ($0.47 \pm 0.21\text{g}$) fue menor con respecto a los animales control ($0.64 \pm 0.28\text{g}$, $p = 0.09$) y a las otras dosis de GK-1 (GK-1 0.1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$, $0.57 \pm 0.29\text{g}$; GK-1 0.5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$, $0.53 \pm 0.19\text{g}$) (Figura 6.3). Existen estudios que indican que la esplenomegalia característica de este modelo se asocia a un infiltrado de

granulocitos inmaduros (GR-1^{dim}/CD11b^{bright}) a la pulpa roja debido a la inducción de una reacción leucemoide (leukocytosis > 50,000 células/ μ l) [245] y se sabe que correlaciona con el incremento del tamaño del tumor primario y por ende a un peor pronóstico [288]. En este sentido, para poder establecer la relevancia de estos cambios es indispensable evaluar el infiltrado de estirpes celulares a la pulpa roja y blanca, ya que es factible que la reacción leucemoide asociada a la esplenomegalia sea responsable del establecimiento de inmunosupresión a través de la inducción de estirpes celulares como MDSC.

Por otro lado, la reducción en el número de macrometástasis en el pulmón se acompañó de una disminución en la concentración de bFGF, CCL3 (MIP-1 α), GM-CSF, CCL2 (MCP-1), y CXCL9 (MIG) (Figura 6.10), lo cual indica que en los controles persevera un ambiente que favorecerá angiogénesis e infiltración de MAM (macrófago asociado a metástasis) en los pulmones. Con relación a la angiogénesis, la disminución en los niveles de bFGF en ratones tratados con GK-1 con respecto a ratones no tratados podría inducir una respuesta atenuada al desarrollo de nuevos vasos sanguíneos. En este sentido, bFGF es un factor tumorigénico, cuya activación durante el crecimiento tumoral puede conducir a la angiogénesis, la proliferación celular y la supervivencia de las células tumorales [289]. Respecto a la modulación de los infiltrados de MAM, la disminución en las concentraciones de CCL2 (MCP-1) y CCL3 (MIP-1 α) podría disminuir la respuesta exacerbada asociada a la migración e infiltración de monocitos, células T y células NK [290,291]. De hecho, la disminución en las concentraciones de CCL3 (MIP-1) y CCL2 (MCP-1) podrían asociarse con un menor número de focos metastásicos en pulmón y con un número reducido de infiltrados de MAM, como Kitamura y colaboradores informaron [291]. En dicho estudio se reportó la asociación entre la delección genética de CCL3 o su receptor CCR1 con una reducción en la presencia de MAM y tumores metastásicos [291].

En pulmones, además de los factores solubles con concentraciones menores en los ratones tratados con respecto a los controles, se encontró un incremento en la concentración de IL-6 (Figura 6.10). Este sentido IL-6 es un factor proangiogénico que promueve la expresión de b-FGF y VEGF en células tumorales, induciendo crecimiento tumoral y metástasis debido al incremento en la vascularización [292]. Sin embargo, como se mencionó previamente, se encontró una disminución en la concentración de b-FGF en ratones tratados con GK-1 y no hay diferencias estadísticamente significativas en la concentración de VEGF entre los grupos de estudio. Nuestros resultados sugieren que el establecimiento de condiciones inflamatorias en sitios distantes al tumor primario, pueden comprometer la llegada y establecimiento de células tumorales metastásicas y con ello el desarrollo de nichos metastásicos, que a su vez podrían reducir la supervivencia y promover la proliferación de células tumorales. Por otro lado, quizás la cantidad de células tumorales que llegan al pulmón podría dictar la función de IL-6. Con respecto a esto, la respuesta antiinflamatoria IL-6 ha sido asociado con una disminución de IL-1 β , citocina cuya concentración disminuyó en los pulmones de ratones tratados con GK-1 (428.40 ± 135.80 pg / ml) en comparación con los ratones no tratados ($850,10 \pm 241,40$ pg / ml, $p = 0,190$). Además, en modelos preclínicos de cáncer, anticuerpos neutralizantes al receptor de IL-1 e IL-1 β han demostrado ser eficaces en tratar la metástasis [293]. Considerando las funciones previamente descritas, el significado del incremento en la concentración de IL-6 en ratones tratados con GK-1 debe tomarse con precaución.

Aunque en el cerebro no se encontraron macrometástasis se detectaron cambios en la concentración de factores solubles. Los ratones tratados con GK-1 presentaron un incremento en la concentración de IL-17, IL-2 e IL-4, así como una disminución en la concentración de bFGF, CCL2 (MCP-1) e IL-5 (Tabla 6.2). Se ha reportado que bFGF induce angiogénesis en tumores primarios y gliomas. Al respecto, se sabe que el transcritto de bFGF se expresa con frecuencia en

gliomas humanos y meningiomas [294]. Además, en tumores cerebrales primarios y metastásicos, bFGF altera el reclutamiento de células NK y su adhesión a los vasos sanguíneos a través de la regulación negativa de las moléculas de adhesión en el endotelio [295]. Sin embargo, es necesario realizar otros estudios, como determinación de micrometástasis para establecer la relevancia de los cambios en las concentraciones de factores solubles en cerebro.

Por último, analizamos la correlación de las citocinas entre los grupos en estudio y las muestras de órganos con metástasis potenciales (Figura 6.11-Figura 6.13, Tabla 6.3) e identificamos una correlación positiva entre VEGF e IL-13 y entre VEGF frente a IL-1 β en ratones tratados con GK-1. Se sabe que esta combinación de citocinas modula la angiogénesis, la linfangiogénesis y la infiltración de leucocitos [296].

En el caso de los ratones no tratados, se encontró una correlación negativa entre VEGF e IL-4. Es importante mencionar que IL-4 tiene un efecto anti-angiogénico al inhibir la producción de VEGF en fibroblastos [297]; sin embargo, estas propiedades antiangiogénicas dependen de la cantidad de IL-4; se ha informado que pequeñas cantidades (0.01 ng / ml) de IL-4 estimulan la quimiotaxis de células endoteliales vasculares, pero esto podría ser inhibido por dosis más altas de IL-4 [298]. Además, los tumores que expresan IL-4 tienen densidad vascular reducida [299]. Estos hallazgos deben ser acompañados de análisis de factores asociados a la inducción de angiogénesis para determinar la importancia de las correlaciones previamente señaladas.

Por último, todo modelo material tiene sus limitaciones ya sea por el diseño experimental o por la naturaleza *per se* del mismo. En este sentido, algunas de las limitaciones de este estudio son la falta de evidencia del infiltrado celular al microambiente tumoral y sitios metastásicos. Adicionalmente se debe incluir en el diseño experimental un péptido con secuencia desordenada para establecer si el efecto tumoral es específico a la secuencia de aminoácidos de GK-1. También

deberá evaluarse el efecto de GK-1 en comparación con otras terapias de uso en este modelo como anti-VEGF, anti-CTLA4, cisplatino, sunitinib, u otros, para establecer la relevancia del efecto antineoplásico inducido por GK-1 en este modelo.

Es importante considerar que el mecanismo de acción de GK-1 deberá dilucidarse a través del establecimiento del microambiente tumoral antes y después del tratamiento. En este sentido, es posible que GK-1 promueva la reactivación de estirpes celulares como linfocitos T y células dendríticas que pudieran estar en condiciones de agotamiento. Lo anterior, podría realizarse al evaluar cambios en la expresión de moléculas coestimuladoras de inhibición como PD-1, LAG-3, TIM-3, CTLA-4, u otras, junto con la evaluación de la actividad citotóxica (producción de granzimas y perforinas, para el caso de CTL) y la producción de citocinas como IL-12, IFN- γ , entre otros.

8. CONCLUSIÓN

Los resultados obtenidos en este trabajo sustentan la efectividad del inmunopotenciador GK-1 en el tratamiento de este modelo murino de cáncer de mama ya que:

1. GK-1 incrementa la sobrevida de manera dosis dependiente.
2. El tratamiento con GK-1 induce una reducción en la tasa de crecimiento tumoral acompañada de un incremento en la necrosis del tumor primario asociada al aumento en la concentración de IL-12.
3. El tratamiento con GK-1 se asocia con un menor número de tumores secundarios pulmonares (macrometástasis) concomitantes a la reducción en la concentración de FGF básico, CCL3 (MIP-1 α), GM-CSF, CCL2 (MCP-1) y CXCL9 (MIG), así como al incremento en la concentración de IL-6.

9. REFERENCIAS

1. National Institutes of Health, National Cancer. U. S. Institute. SEER training module. Cancer: a historic perspective. Disponible en: <https://training.seer.cancer.gov/disease/history/>. Acceso: 23/09/2017.
2. Fitzgerald PJ. From demons and evil spirits to cancer genes: The Development of Concepts Concerning the Causes of Cancer and Carcinogenesis. 1st Edition. American Registry of Pathology, Washington, DC, 2000. ISBN-13: 978-1881041719. ISBN-10: 1881041719.
3. Tu SM. Origin of cancers. Clinical perspectives and implications of a stem-cell theory of cancer. *Cancer Treat Res.* 2010;154:v-239. doi: 10.1007/978-1-4419-5968-3_1.
4. Breasted JH. The Edwin Smith surgical papyrus, published in facsimile and hieroglyphic transliteration with translation and commentary in two volumes. Univ. Chicago Press, Chicago, IL, 1930. ISBN 0-918986-73-7.
5. Capasso LL. Antiquity of Cancer. *Int J Cancer.* 2005; Jan 1;113(1):2-13. doi: 10.1002/ijc.20610.
6. Stathopoulos G. Letter: Kanam mandible's tumour. *Lancet.* 1975; Jan 18;1(7899):165. doi:10.1038/185946a0
7. Tobias PV. The Kanam Jaw. *Nature.* 1960; March 26; 185:946–947. doi:10.1038/185946a0.
8. Czarnetzki A. Pathological changes in the morphology of the young paleolithic skeletal remains from Stetten (south-west Germany). *J Hum Evol.* 1980; 9:15-17. doi: 10.1016/0047-2484(80)90037-8
9. Moller P, Moller-Christensen V. A mediaeval female skull showing evidence of metastases from a malignant growth. *Acta Pathol Microbiol Scand.* 1952;30(3-4):336-42.
10. Torre C, Giacobini G, Sicuro A. The skull and vertebral column pathology of Ancient Egyptians. A study of the Marro Collection. *J Hum Evol.* 1980; 9(1): 41-44. doi: 10.1016/0047-2484(80)90040-8
11. Ortner DJ, Putschar WGJ. Identification of Pathological Conditions in Human Skeletal Remains (Second Edition). Chapter 7 – Theoretical Issues in Paleopathology. Academic Press. 2003, Pages 109–118.
12. Ortner DJ. Identification of Pathological Conditions in Human Skeletal Remains (Second Edition). Chapter 20 – T Tumors and Tumor-like Lesions of Bone. Academic Press. 2003, Pages 503–544.
13. Odes EJ, Randolph-Quinney PS, Steyn M, Throckmorton Z, Smilg JS, Zipfel B, Augustine TN, de Beer F, Hoffman JW, Franklin RD, Berger LR. Earliest hominin cancer: 1.7-million-year-old osteosarcoma from Swartkrans Cave, South Africa. *S Afr J Sci.* 2016; Jul112(7/8):1-5.

14. Randolph-Quinney PS, Williams SA, Steyn M, Meyer MR, Jacqueline SS, Churchill SE, Odes EJ, Augustine T, Tafforeau P, Berger LR. Osteogenic tumour in Australopithecus sediba: Earliest hominin evidence for neoplastic disease. *S Afr J Sci.* 2016; Jul;112(7/8):1-7. DOI: <https://doi.org/10.17159/sajs.2016/20150470>
15. Dirks PH, Kibii JM, Kuhn BF, Steininger C, Churchill SE, Kramers JD, Pickering R, Farber DL, Mériaux AS, Herries AI, King GC, Berger LR. Geological setting and age of Australopithecus sediba from southern Africa. *Science.* 2010; Apr 9;328(5975):205-8.
16. Dawson WR. *Magician and Leech: A Study in the Beginnings of Medicine with Special Reference to Ancient Egypt*, Methuen and Co., London. 1929. Disponible en: <http://thehealingproject.net.au/wp-content/uploads/2009/11/Warren-R-DAWSON.-Magician-and-Leech.-A-Study-in-the-Beginnings-of-Medicine-with-Special-Reference-to-Egypt.pdf>. Acceso: 25/09/2017.
17. Strouhal E. Tumors in the Remains of Ancient Egyptians. *Am J Phys Anthropol.* 1976; Nov;45(3 pt. 2):613-20.
18. Ghalioungui, P. *Magic and Medical Science in Ancient Egypt*. Hodder and Stoughton, London. 1963.
19. Strouhal E. Ancient Egyptian case of carcinoma. *Bull N Y Acad Med.* 1978; Mar;54(3):290-302.
20. Pahl WM. Tumors of bone and soft tissue in ancient Egypt and Nubia: a synopsis of the detected cases. *Int. J. Anthropol.* 1986; 1:(3);267-275.
21. Strouhal E. Malignant tumours in past populations in Middle Europe. In: La Verghetta M, Capasso L, eds. *Proceedings of the XIIIth European Meeting of the Paleopathology Association*. Teramo: Edigrafical Publisher, 2001. 265–72.
22. Dastugue J. Tumeur maxillaire sur un crâne du Moyen-Age. *Bull Assoc Fr Etud Cancer* 1965; 52:69 –72.
23. Strouhal E, Vyhnanek L, Horácková L, Benesová L, Nemecková A. Malignant tumors affecting the people from the ossuary at Krtiny (Czech Republic). *Journal of Paleopathology.* 1996;8:5–24.
24. Capasso L, Di Muzio M, Di Tota G, Spoleitini L. A case of probable cranial Hemangioma (Iron Age, Central Italy). *Journal of Paleopathology.* 1992;4:55– 62.
25. Brothwell D. *Digging up bones*. London: Oxford University Press, 1981. 139–43.
26. Brothwell D. The evidence of neoplasms. In: Brothwell D, Sandison T, eds. *Diseases in antiquity*. Springfield: CC Thomas, 1967. 320–45.
27. Campillo D. *Lesiones patológicas en cráneos prehistóricos de la región valenciana*. Valencia: S.I.P. So. 1976; 93.

28. Hacking P. A pituitary tumour in a medieval skull. *Int J Osteoarchaeology*. 1995; 5:390–3.
29. Kramar C, Baud CA, Lagier R. Presumed calcified leiomyoma of the uterus. *Arch Pathol Lab Med*. 1983;107:91–3.
30. Jimenez-Brobeil SA, Botella Lopez MC, Ruiz Rodriguez L. A contribution to medieval pathological gynecology. *Journal of Paleopathology*. 1992; 4:155–61.
31. Soulie R. Un cas de metastases crâniennes de carcinome datant du Bronze Ancien: typologie des lesions, observations paléopathologiques analogues en Europe c'entrale et occidentale. *Proceedings of the III European Meeting of the Paleopathology Association, Caen*. 1980; 1:239–53.
32. Krogman WM. Skeletal and dental pathology of an early Iranian site. *Bull Hist Med*. 1940; 8:28–48.
33. Sawyer D, Wood N, Allison M. An ancient “tumour” from pre-Columbian Chile. *J Craniomaxillofac Surg*. 1988; 18:136–8.
34. MacCurdy G. Human skeletal remains from highlands of Peru. *Am J Physical Anthropol*. 1923; 6:217–330.
35. Aufderheide AC, Ragsdale B, Buikstra J, Ekberg F, Vinh TN. Structure of the radiological “sunburst” pattern as revealed in a ancient osteosarcoma. *Journal of Paleopathology*. 1997; 9:101–6.
36. Steinbock TR. *Paleopathological diagnosis and interpretation*. Springfield: CC Thomas, 1976; 316–402.
37. Hooton EA. *The Indians of Pecos Pueblo. A study of their skeletal remains*. New Haven: Yale University Press. 1930; 111.
38. Grona F, Rocca ED, Grona L. *Las trepanaciones craneanas en el Peru en la época pre-historica*. Lima: Maria. 1954; 132.
39. Hollimon SE. Malignancy in three crania from coastal Southern California. Paper on paleopathology presented at the VI Annual Meeting of the Paleopathology Association, San Diego. 1981; 8 p.
40. Ortner DJ. Bone tumors in archaeological human skeletons (paleopathology of human bone tumors). In: Kaiser ME, ed. *Neoplasms: comparative pathology of growth in animals, plants, and man*. Baltimore: Williams and Wilkins. 1981; 733–8.
41. Rosenberg, CE. Disease and Social Order in America: Perceptions and Expectations. *Milbank Quarterly* 64 (Suppl. 1). 1986; 34–55.
42. Rosenberg CE. Disease in History: Frames and Framers. *The Milbank Quarterly*. 1989; Vol. 67, Suppl. 1.

43. Virchow RLK, Chance F. Cellular Pathology: As Based Upon Physiological and Pathological Histology. Twenty Lectures Delivered in the Pathological Institute of Berlin During the Months of February, March and April, 1858. London: John Churchill, New Burlington Street. 1890.
44. Ackerknecht EH. Rudolph Virchow: Doctor, Statesman, Anthropologist. Madison, Wise, University Press. 1953.
45. Lin JJ. Rudolf Virchow: Creator of Cellular Pathology. *Laboratory Medicine*. Vol. 14, no. 12, December. 1983; 791-794.
46. Virchow RLK. An Address on the Value of Pathological Experiments. By Rudolf Virchow, M.D., Professor in the University of Berlin. *The British Medical Journal*. 1881; August 6, 198-203.
47. Walter E and Scott M. The life and work of Rudolf Virchow 1821–1902: “Cell theory, thrombosis and the sausage duel”. *Journal of the Intensive Care Society*. 2017; Vol. 18(3) 234–235.
48. Prigogine I. Exploring complexity. *European Journal of Operational Research* 30.1987; 97-103 97.
49. Rothman KJ, Greenland S. *Modern Epidemiology*. Williams & Wilkins, Philadelphia, ed. 2. 1998.
50. Patiño JF. Oncología, Caos y Sistemas Adaptativos Complejos. *Rev Col Cancerol*. 2002; 6(1): 16-19.
51. Valadez Blanco EO. *El Cáncer Como Enfermedad Compleja: Redes y Niveles de Organización* (Tesis de licenciatura), UNAM, México, CDMX. 2007.
52. Soto A, Sonnenschein C. Emergentism as a default: cancer as a problem of tissue organization. *J Biosci*. 2005; 30(1):103–18.10.1007/BF02705155.
53. Douglas H and Weinberg RA. The Hallmarks of Cancer. *Cell*. 2000; January 7;Vol.100, 57-70.
54. Marte, B. Cell division and cancer. *Nature*. 2004; 18 Nov, Vol. 432.
55. Michor F, Iwasa Y, Nowak MA. Dynamics of cancer progression. *Nat Rev Cancer*. Vol.4. March 2004.
56. Gibbs W. Untangling the roots of Cancer. *Sci Am*. 2003; Jul;289(1):56-65.
57. Douglas H and Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*. 2011; Mar 4;144(5):646-74. doi: 10.1016/j.cell.2011.02.013.
58. Fortunato A, Boddy A, Mallo D, Aktipis A, Maley CC, Pepper JW. Natural Selection in Cancer Biology: From Molecular Snowflakes to Trait Hallmarks. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2017; Feb 1;7(2). pii: a029652. doi: 10.1101/cshperspect.a029652.

59. Kurzrock R, Giles FJ. Precision oncology for patients with advanced cancer: the challenges of malignant snowflakes. *Cell Cycle*. 2015;14(14):2219-21. doi: 10.1080/15384101.2015.1041695.
60. Merlo LM, Pepper JW, Reid BJ, Maley CC. Cancer as an evolutionary and ecological process. *Nat Rev Cancer*. 2006; Dec;6(12):924-35. Epub 2006 Nov 16.
61. Pepper JW, Scott Findlay C, Kassen R, Spencer SL, Maley CC. Cancer research meets evolutionary biology. *Evol Appl*. 2009; Feb;2(1):62-70. doi: 10.1111/j.1752-4571.2008.00063.x.
62. Sprouffske K, Merlo LM, Gerrish PJ, Maley CC, Sniegowski PD. Cancer in light of experimental evolution. *Curr Biol*. 2012; Sep 11;22(17):R762-71. doi: 10.1016/j.cub.2012.06.065.
63. Sigston EAW, Williams BRG. An Emergence Framework of Carcinogenesis. *Front Oncol*. 2017; Sep 14;7:198. doi: 10.3389/fonc.2017.00198. eCollection 2017.
64. Kandoth C, McLellan MD, Vandin F, Ye K, Niu B, Lu C, Xie M, Zhang Q, McMichael JF, Wyczalkowski MA, Leiserson MDM, Miller CA, Welch JS, Walter MJ, Wendl MC, Ley TJ, Wilson RK, Raphael BJ, Ding L. Mutational landscape and significance across 12 major cancer types. *Nature*. 2013; Oct 17;502(7471):333-339. doi: 10.1038/nature12634.
65. Hannon GJ, and Beach D. P15INK4B is a potential effector of TGF-beta-induced cell cycle arrest. *Nature*. 1994; 371, 257–261.
66. Datto MB, Hu PP, Kowalik TF, Yingling J, and Wang XF. The viral oncoprotein E1A blocks transforming growth factor β -mediated induction of p21/WAF1/Cip1 and p15/INK4B *Mol. Cell Biol*. 1997;17, 2030–2037.
67. Seyfried TN, Huysentruyt LC. On the origin of cancer metastasis. *Crit Rev Oncog*. 2013;18(1-2):43-73.
68. Cheung JK, Ewald AJ. Illuminating breast cancer invasion: diverse roles for cell-cell interactions; *Curr Opin Cell Biol*. 2014; October; 30: 99-111. doi: 10.1016/j.ceb.2014.07.003.
69. Polyak K, Weinberg RA. Transitions between epithelial and mesenchymal states: acquisition of malignant and stem cell traits. *Nat Rev Cancer*. 2009; 9:265–273.
70. Thiery JP, Acloque H, Huang RY, Nieto MA. Epithelial–mesenchymal transitions in development and disease. *Cell*. 2009; 139:871–890.
71. Tsai JH, Yang J. Epithelial–mesenchymal plasticity in carcinoma metastasis. *Genes Dev*. 2013; 27:2192–2206.
72. Thiery JP. Epithelial–mesenchymal transitions in tumour progression. *Nat Rev Cancer*. 2002; 2:442–454.
73. Fidler IJ, Kripke ML. Metastasis results from preexisting variant cells within a malignant tumor. *Science*. 1977;197:893–5

74. Cifone MA, Kripke ML, Fidler IJ. Growth rate and chromosome number of tumor cell lines with different metastatic potential. *J Supramol Struct.* 1979;11(4):467-76.
75. Fidler IJ, Gersten DM, Kripke ML. Influence of immune status on the metastasis of three murine fibrosarcomas of different immunogenicities. *Cancer Res.* 1979; Oct;39(10):3816-21.
76. Cavallo F, De Giovanni C, Nanni P, Forni G, Lollini PL. 2011: the immune hallmarks of cancer. *Cancer Immunol Immunother.* 2011; Mar;60(3):319-26. doi: 10.1007/s00262-010-0968-0. Epub 2011 Jan 26.
77. Balkwill F, Mantovani A. Inflammation and cancer: back to Virchow? *Lancet.* 2001; Feb 17;357(9255):539-45.
78. Balkwill F, Charles KA, Mantovani A. Smoldering and polarized inflammation in the initiation and promotion of malignant disease. *Cancer Cell.* 2005; Mar;7(3):211-7.
79. Vignozzi L, Maggi M. Prostate cancer: intriguing data on inflammation and prostate cancer. *Nat Rev Urol.* 2014; Jul;11(7):369-70. doi: 10.1038/nrurol.2014.143. Epub 2014 Jul 1.
80. Mantovani A, Allavena P, Sica A, Balkwill F. Cancer-related inflammation. *Nature.* 2008; Jul 24;454(7203):436-44. doi: 10.1038/nature07205.
81. Burnet F.M. Cancer; a biological approach. I. The processes of control. *Br Med J.* 1957; Apr 6;1(5022):779-86.
82. Bellanti. Immunology IV. Clinical Applications in Health and Disease. *World Allergy Organ J.* 2012; Aug; 5(8): 94. Published online 2012 Aug 15. doi: 10.1097/WOX.0b013e3182641db0.
83. Burnet FM. immunological factors in the process of carcinogenesis. *Br Med Bull.* 1964; May;20:154-8.
84. Dunn GP, Old LJ, Schreiber RD. The three Es of cancer immunoediting. *Annu Rev Immunol.* 2004;22:329-60.
85. Hicklin DJ, Wang Z, Arienti F, Rivoltini L, Parmiani G, Ferrone S. β 2-microglobulin mutations, HLA class I antigen loss, and tumor progression in melanoma. *J Clin Invest.* 1998;101:2720-2729.
86. Restifo NP, Esquivel F, Kawakami Y, Yewdell JW, Mulé JJ, Rosenberg SA, Bennink JR. Identification of human cancers deficient in antigen processing. *J Exp Med.* 1993;177:265-272.
87. Korkolopoulou P, Kaklamanis L, Pezzella F, Harris AL, Gatter KC. Loss of antigen-presenting molecules (MHC class I and TAP-1) in lung cancer. *Br J Cancer.* 1996;73:148-153.
88. Sanda MG, Restifo NP, Walsh JC, Kawakami Y, Nelson WG, Pardoll DM, Simons JW. Molecular characterization of defective antigen processing in human prostate cancer. *J Natl Cancer Inst.* 1995; Feb 15;87(4):280-5.

89. Seliger B, Höhne A, Jung D, Kallfelz M, Knuth A, Jaeger E, Bernhard H, Momburg F, Tampé R, Huber C. Expression and function of the peptide transporters in escape variants of human renal cell carcinomas. *Exp Hematol*. 1997; Jul;25(7):608-14.
90. Khong HT and Restifo NP. Natural selection of tumor variants in the generation of “tumor escape” phenotypes. *Nat Immunol*. 2002; Nov;3(11):999-1005.
91. Jarnicki AG, Lysaght J, Todryk S, Mills KH. Suppression of antitumor immunity by IL-10 and TGFbeta-producing T cells infiltrating the growing tumor: influence of tumor environment on the induction of CD4+ and CD8+ regulatory T cells. *J Immunol*. 2006; 177:896–904.
92. Pyzer AR, Cole L, Rosenblatt J, Avigan DE. Myeloid-derived suppressor cells as effectors of immune suppression in cancer. *Int J Cancer*. 2016; Nov 1;139(9):1915-26. doi: 10.1002/ijc.30232. Epub 2016 Jul 12.
93. Movahedi K, Laoui D, Gysemans C, Baeten M, Stangé G, Van den Bossche J, Mack M, Pipeleers D, In't Veld P, De Baetselier P, Van Ginderachter JA. Different tumor microenvironments contain functionally distinct subsets of macrophages derived from Ly6C(high) monocytes. *Cancer Res*. 2010; Jul 15;70(14):5728-39. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-09-4672. Epub 2010 Jun 22.
94. Tran Janco JM, Lamichhane P, Karyampudi L, Knutson KL. Tumor-infiltrating dendritic cells in cancer pathogenesis. *J Immunol*. 2015; Apr 1;194(7):2985-91. doi: 10.4049/jimmunol.1403134.
95. Schreiber RD, Old LJ, Smyth MJ. Cancer immunoediting: integrating immunity's roles in cancer suppression and promotion. *Science*. 2011; Mar 25;331(6024):1565-70. doi: 10.1126/science.1203486.
96. Jean-Pierre Routy, Bertrand Routy, Gina M. Graziani, Vikram Mehraj. The Kynurenine Pathway Is a Double-Edged Sword in Immune-Privileged Sites and in Cancer: Implications for Immunotherapy. *Int J Tryptophan Res*. 2016; 9: 67–77. doi: 10.4137/IJTR.S38355.
97. Mandapathil M, Hilldorfer B, Szczepanski MJ, Czystowska M, Szajnik M, Ren J, Lang S, Jackson EK, Gorelik E, Whiteside TL. Generation and accumulation of immunosuppressive adenosine by human CD4+CD25highFOXP3+ regulatory T cells. *J Biol Chem*. 2010; Mar 5;285(10):7176-86. doi: 10.1074/jbc.M109.047423.
98. Polyak K. Breast cancer: origins and evolution. *J Clin Invest*. 2007; Nov;117(11):3155-63. doi:10.1172/JCI33295.
99. Ben-Porath I, Thomson MW, Carey VJ, Ge R, Bell GW, Regev A, Weinberg RA. An embryonic stem cell-like gene expression signature in poorly differentiated aggressive human tumors. *Nat Genet*. 2008; May;40(5):499-507. doi: 10.1038/ng.127.
100. Mendoza PR, Specht CS, Hubbard GB, Wells JR, Lynn MJ, Zhang Q, Kong J, Grossniklaus HE. Histopathologic grading of anaplasia in retinoblastoma. *Am J Ophthalmol*. 2015; Apr;159(4):764-76. doi: 10.1016/j.ajo.2014.12.014.

101. Esteller M. Aberrant DNA methylation as a cancer-inducing mechanism. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 2005; 45: 629–656.
102. Fabbri M. MicroRNAs and cancer epigenetics. *Curr Opin Investig Drugs.* 2008; Jun;9(6):583-90.
103. Fraga MF, Ballestar E, Villar-Garea A, Boix-Chornet M, Espada J, Schotta G, Bonaldi T, Haydon C, Ropero S, Petrie K, Iyer NG, Pérez-Rosado A, Calvo E, Lopez JA, Cano A, Calasanz MJ, Colomer D, Piris MA, Ahn N, Imhof A, Caldas C, Jenuwein T, Esteller M. Loss of acetylation at Lys16 and trimethylation at Lys20 of histone H4 is a common hallmark of human cancer. *Nat Genet.* 2005; Apr;37(4):391-400. doi: 10.1038/ng1531.
104. Feinberg AP, and Vogelstein B. Hypomethylation distinguishes genes of some human cancers from their normal counterparts. *Nature.* 1983; 301, 89–92.
105. Goelz SE, Vogelstein B, Hamilton SR, Feinberg AP. Hypomethylation of DNA from benign and malignant human colon neoplasms. *Science.* 1985; Apr 12;228(4696):187-90
106. Esteller M, Corn PG, Baylin SB, Herman JG. A gene hypermethylation profile of human cancer. *Cancer Res.* 2001; Apr 15;61(8):3225-9.
107. Licchesi JD, Westra WH, Hooker CM, Herman JG. Promoter hypermethylation of hallmark cancer genes in atypical adenomatous hyperplasia of the lung. *Clin Cancer Res.* 2008; May 1;14(9):2570-8. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-07-2033.
108. Dalmay T, Edwards DR. MicroRNAs and the hallmarks of cancer. *Oncogene.* 2006; Oct 9;25(46):6170-5.
109. Ruan K, Fang X, Ouyang G. MicroRNAs: Novel regulators in the hallmarks of human cancer. *Cancer Lett.* 2009 Nov 28;285(2):116-26. doi: 10.1016/j.canlet.2009.04.031.
110. Tycko B. Genetic and epigenetic mosaicism in cancer precursor tissues. *Ann N Y Acad Sci.* 2003; Mar; 983:43-54.
111. Panigrahi AK, Pati D. Road to the crossroads of life and death: Linking sister chromatid cohesion and separation to aneuploidy, apoptosis and cancer. *Crit Rev Oncol Hematol.* 2009; Dec;72(3):181-93. doi: 10.1016/j.critrevonc.2008.12.002.
112. Albertson DG, Collins C, McCormick F, Gray JW. Chromosome aberrations in solid tumors. *Nat Genet.* 2003; Aug;34(4):369-76.
113. Fabarius A, Hehlmann R, Duesberg PH. Instability of chromosome structure in cancer cells increases exponentially with degrees of aneuploidy. *Cancer Genet Cytogenet.* 2003; May;143(1):59-72.
114. Duesberg P, Rausch C, Rasnick D, Hehlmann R. Genetic instability of cancer cells is proportional to their degree of aneuploidy. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998; Nov 10;95(23):13692-7.

115. Naugler WE, Karin M. NF-kappaB and cancer-identifying targets and mechanisms. *Curr Opin Genet Dev.* 2008; Feb;18(1):19-26. doi: 10.1016/j.gde.2008.01.020.
116. Maniccia AW, Lewis C, Begum N, Xu J, Cui J, Chipitsyna G, Aysola K, Reddy V, Bhat G, Fujimura Y, Henderson B, Reddy ES, Rao VN. Mitochondrial localization, ELK-1 transcriptional regulation and growth inhibitory functions of BRCA1, BRCA1a, and BRCA1b proteins. *J Cell Physiol.* 2009; Jun;219(3):634-41. doi: 10.1002/jcp.21708.
117. Rustin P, Kroemer G. Mitochondria and cancer. *Ernst Schering Found Symp Proc.* 2007;(4):1-21.
118. Isidoro A, Martínez M, Fernández PL, Ortega AD, Santamaría G, Chamorro M, Reed JC, Cuezva JM. Alteration of the bioenergetic phenotype of mitochondria is a hallmark of breast, gastric, lung and oesophageal cancer. *Biochem J.* 2004; Feb 15;378(Pt 1):17-20.
119. Tennant DA, Duran RV, Boulahbel H, Gottlieb E. Metabolic transformation in cancer. *Carcinogenesis.* 2009; Aug;30(8):1269-80. doi: 10.1093/carcin/bgp070.
120. Sheng H, Niu B, Sun H. Metabolic targeting of cancers: from molecular mechanisms to therapeutic strategies. *Curr Med Chem.* 2009;16(13):1561-87.
121. Kroemer G, Pouyssegur J. Tumor cell metabolism: cancer's Achilles' heel. *Cancer Cell.* 2008; Jun;13(6):472-82. doi: 10.1016/j.ccr.2008.05.005.
122. Ortega AD, Sánchez-Aragó M, Giner-Sánchez D, Sánchez-Cenizo L, Willers I, Cuezva JM. Glucose avidity of carcinomas. *Cancer Lett.* 2009; Apr 18;276(2):125-35. doi: 10.1016/j.canlet.2008.08.007.
123. Lee HC, Wei YH. Mitochondrial DNA instability and metabolic shift in human cancers. *Int J Mol Sci.* 2009 Feb;10(2):674-701. doi: 10.3390/ijms10020674.
124. Yeung SJ, Pan J, Lee MH. Roles of p53, MYC and HIF-1 in regulating glycolysis - the seventh hallmark of cancer. *Cell Mol Life Sci.* 2008; Dec;65(24):3981-99. doi: 10.1007/s00018-008-8224-x.
125. Bartkova J, Rajpert-De Meyts E, Skakkebaek NE, Lukas J, Bartek J. Deregulation of the G1/S-phase control in human testicular germ cell tumours. *APMIS.* 2003; Jan;111(1):252-65; discussion 265-6.
126. Caino MC, Meshki J, Kazanietz MG. Hallmarks for senescence in carcinogenesis: novel signaling players. *Apoptosis.* 2009 Apr;14(4):392-408. doi: 10.1007/s10495-009-0316-z.
127. Galluzzi L, Morselli E, Kepp O, Vitale I, Rigoni A, Vacchelli E, Michaud M, Zischka H, Castedo M, Kroemer G. Mitochondrial gateways to cancer. *Mol Aspects Med.* 2010; Feb;31(1):1-20. doi: 10.1016/j.mam.2009.08.002.
128. Weinstein RS, Pauli BU. Cell junctions and the biological behaviour of cancer. *Ciba Found Symp.* 1987;125:240-60.

129. Ruan K, Song G, Ouyang G. Role of hypoxia in the hallmarks of human cancer. *J Cell Biochem.* 2009; Aug 15;107(6):1053-62. doi: 10.1002/jcb.22214.
130. Fang JS, Gillies RD, Gatenby RA. Adaptation to hypoxia and acidosis in carcinogenesis and tumor progression. *Semin Cancer Biol.* 2008; Oct;18(5):330-7. doi: 10.1016/j.semcancer.2008.03.011.
131. Berretta R, Moscato P. Cancer Biomarker Discovery: The Entropic Hallmark. *PLoS One.* 2010; Aug 18;5(8):e12262. doi: 10.1371/journal.pone.0012262.
132. Lakhani SR, Ellis IO, Schnitt SJ, Tan PH, van de Vijver MJ. IARC.WHO Classification of Tumors of the Breast 4th edition. IARC WHO Classification of Tumours, No 4. ISBN-13 9789283224334.
133. Perou CM, Sørli T, Eisen MB, van de Rijn M, Jeffrey SS, Rees CA, Pollack JR, Ross DT, Johnsen H, Akslen LA, Fluge O, Pergamenschikov A, Williams C, Zhu SX, Lønning PE, Børresen-Dale AL, Brown PO, Botstein D. Molecular portraits of human breast tumours. *Nature.* 2000; Aug 17;406(6797):747-52.
134. Hu Z, Fan C, Oh DS, Marron JS, He X, Qaqish BF, Livasy C, Carey LA, Reynolds E, Dressler L, Nobel A, Parker J, Ewend MG, Sawyer LR, Wu J, Liu Y, Nanda R, Tretiakova M, Ruiz Orrico A, Dreher D, Palazzo JP, Perreard L, Nelson E, Mone M, Hansen H, Mullins M, Quackenbush JF, Ellis MJ, Olopade OI, Bernard PS, Perou CM. The molecular portraits of breast tumors are conserved across microarray platforms. *BMC Genomics.* 2006; Apr 27;7:96. doi: 10.1186/1471-2164-7-96.
135. Sørli T, Wang Y, Xiao C, Johnsen H, Naume B, Samaha RR, Børresen-Dale AL. Distinct molecular mechanisms underlying clinically relevant subtypes of breast cancer: gene expression analyses across three different platforms. *BMC Genomics.* 2006; May 26;7:127. doi: 10.1186/1471-2164-7-127.
136. Sørli T, Perou CM, Tibshirani R, Aas T, Geisler S, Johnsen H, Hastie T, Eisen MB, van de Rijn M, Jeffrey SS, Thorsen T, Quist H, Matese JC, Brown PO, Botstein D, Lønning PE, Børresen-Dale AL. Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2001; Sep 11;98(19):10869-74.
137. Sørli T, Tibshirani R, Parker J, Hastie T, Marron JS, Nobel A, Deng S, Johnsen H, Pesich R, Geisler S, Demeter J, Perou CM, Lønning PE, Brown PO, Børresen-Dale AL, Botstein D. Repeated observation of breast tumor subtypes in independent gene expression data sets. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003 Jul 8;100(14):8418-23. doi: 10.1073/pnas.0932692100.
138. Smalley MJ, Reis-Filho JS, Ashworth A. BRCA1 and stem cells: tumour typecasting. *Nat Cell Biol.* 2008; Apr;10(4):377-9. doi: 10.1038/ncb0408-377.
139. Liu S, Ginestier C, Charafe-Jauffret E, Foco H, Kleer CG, Merajver SD, Dontu G, Wicha MS. BRCA1 regulates human mammary stem/ progenitor cell fate. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2008; Feb 5;105(5):1680-5. doi: 10.1073/pnas.0711613105.

140. Bertos RN, Park M. Breast cancer-one term, many entities? *J Clin Invest*. 2011; Oct;121(10):3789-96. doi: 10.1172/JCI57100.
141. Prat A, Perou CM. Mammary development meets cancer genomics. *Nat Med*. 2009 Aug;15(8):842-4. doi: 10.1038/nm0809-842.
142. Lim E, Vaillant F, Wu D, Forrest NC, Pal B, Hart AH, Asselin-Labat ML, Gyorki DE, Ward T, Partanen A, Feleppa F, Huschtscha LI, Thorne HJ, kConFab, Fox SB, Yan M, French JD, Brown MA, Smyth GK, Visvader JE, Lindeman GJ. Aberrant luminal progenitors as the candidate target population for basal tumor development in BRCA1 mutation carriers. *Nat Med*. 2009; Aug;15(8):907-13. doi: 10.1038/nm.2000.
143. Molyneux G, Geyer FC, Magnay FA, McCarthy A, Kendrick H, Natrajan R, Mackay A, Grigoriadis A, Tutt A, Ashworth A, Reis-Filho JS, Smalley MJ. BRCA1 basal-like breast cancers originate from luminal epithelial progenitors and not from basal stem cells. *Cell Stem Cell*. 2010; Sep 3;7(3):403-17. doi: 10.1016/j.stem.2010.07.010.
144. Visvader JE. Cells of origin in cancer. *Nature*. 2011; Jan 20;469(7330):314-22. doi: 10.1038/nature09781.
145. Mani SA, Guo W, Liao MJ, Eaton EN, Ayyanan A, Zhou AY, Brooks M, Reinhard F, Zhang CC, Shipitsin M, Campbell LL, Polyak K, Brisken C, Yang J, Weinberg RA. The epithelial-mesenchymal transition generates cells with properties of stem cells. *Cell*. 2008; May 16;133(4):704-15. doi: 10.1016/j.cell.2008.03.027.
146. Kalluri R, Weinberg RA. The basics of epithelial-mesenchymal transition. *J Clin Invest*. 2009; 119(6):1420–1428.
147. Blick T, Widodo E, Hugo H, Waltham M, Lenburg ME, Neve RM, Thompson EW. Epithelial mesenchymal transition traits in human breast cancer cell lines. *Clin Exp Metastasis*. 2008;25(6):629-42. doi: 10.1007/s10585-008-9170-6. Epub 2008 May 7.
148. Van der Pluijm G. Epithelial plasticity, cancer stem cells and bone metastasis formation. *Bone*. 2011; 48(1):37–43.
149. Allred DC, Mohsin SK, Fuqua SA. Histological and biological evolution of human premalignant breast disease. *Endocr Relat Cancer*. 2001; Mar;8(1):47-61.
150. Burstein HJ, Polyak K, Wong JS, Lester SC, Kaelin CM. Ductal carcinoma in situ of the breast. *N Engl J Med*. 2004; Apr 1;350(14):1430-41
151. Shevchenko IT, Ganina KP, Ishchenko VE, Chepiakov VD. Survival rate of breast cancer patients with varying degrees of tumor anaplasia. *Klin Khir*. 1980 May;(5):42-4.
152. Lerwill MF. Current practical applications of diagnostic immunohistochemistry in breast pathology. *Am J Surg Pathol*. 2004; Aug;28(8):1076-91.

153. Allinen M, Beroukhi R, Cai L, Brennan C, Lahti-Domenici J, Huang H, Porter D, Hu M, Chin L, Richardson A, Schnitt S, Sellers WR, Polyak K. Molecular characterization of the tumor microenvironment in breast cancer. *Cancer Cell*. 2004; Jul;6(1):17-32.
154. Barsky SH, and Karlin NJ. Myoepithelial cells: autocrine and paracrine suppressors of breast cancer progression. *J Mammary Gland Biol Neoplasia*. 2005; Jul;10(3):249-60.
155. Barsky SH. Myoepithelial mRNA expression profiling reveals a common tumor-suppressor phenotype. *Exp Mol Pathol*. 2003; Apr;74(2):113-22.
156. Polyak K, Hu M. Do myoepithelial cells hold the key for breast tumor progression? *J Mammary Gland Biol Neoplasia*. 2005; Jul;10(3):231-47
157. Tlsty TD, Coussens LM. Tumor stroma and regulation of cancer development. *Annu Rev Pathol*. 2006; 1:119–150.
158. Bacac M, Provero P, Mayran N, Stehle JC, Fusco C, Stamenkovic I. A mouse stromal response to tumor invasion predicts prostate and breast cancer patient survival. *PLoS One*. 2006 Dec 20;1:e32.
159. Boersma BJ, Reimers M, Yi M, Ludwig JA, Luke BT, Stephens RM, Yfantis HG, Lee DH, Weinstein JN, Ambs S. A stromal gene signature associated with inflammatory breast cancer. *Int J Cancer*. 2008; Mar 15;122(6):1324-32. doi: 10.1002/ijc.23237
160. Casey T, Bond J, Tighe S, Hunter T, Lintault L, Patel O, Eneman J, Crocker A, White J, Tessitore J, Stanley M, Harlow S, Weaver D, Muss H, Plaut K. Molecular signatures suggest a major role for stromal cells in development of invasive breast cancer. *Breast Cancer Res Treat*. 2009 Mar;114(1):47-62. doi: 10.1007/s10549-008-9982-8.
161. Farmer P, Bonnefoi H, Anderle P, Cameron D, Wirapati P, Becette V, André S, Piccart M, Campone M, Brain E, Macgrogan G, Petit T, Jassem J, Bibeau F, Blot E, Bogaerts J, Aguet M, Bergh J, Iggo R, Delorenzi M. A stroma-related gene signature predicts resistance to neoadjuvant chemotherapy in breast cancer. *Nat Med*. 2009; Jan;15(1):68-74. doi: 10.1038/nm.1908.
162. Finak G, Bertos N, Pepin F, Sadekova S, Souleimanova M, Zhao H, Chen H, Omeroglu G, Meterissian S, Omeroglu A, Hallett M, Park M. Stromal gene expression predicts clinical outcome in breast cancer. *Nat Med*. 2008; May;14(5):518-27. doi: 10.1038/nm1764.
163. Ma X-J, Dahiya S, Richardson E, Erlander M, Sgroi D. Gene expression profiling of the tumor microenvironment during breast cancer progression. *Breast Cancer Res*. 2009;11(1):R7. doi: 10.1186/bcr2222.
164. Leek RD, Harris AL. Tumor-associated macrophages in breast cancer. *J Mammary Gland Biol Neoplasia*. 2002;7(2):177–189.
165. Lin EY, Gouon-Evans V, Nguyen AV, Pollard JW. The macrophage growth factor CSF-1 in mammary gland development and tumor progression. *J Mammary Gland Biol Neoplasia*. 2002;7(2):147–162.

166. Joyce JA, Pollard JW. Microenvironmental regulation of metastasis. *Nat Rev Cancer*. 2009;9(4):239–252.
167. Wyckoff J, Wang W, Lin EY, Wang Y, Pixley F, Stanley ER, Graf T, Pollard JW, Segall J, Condeelis J. A paracrine loop between tumor cells and macrophages is required for tumor cell migration in mammary tumors. *Cancer Res*. 2004; Oct 1;64(19):7022-9. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-04-1449
168. Teschendorff AE, Gomez S, Arenas A, El-Ashry D, Schmidt M, Gehrman M, Caldas C. Improved prognostic classification of breast cancer defined by antagonistic activation patterns of immune response pathway modules. *BMC Cancer*. 2010; Nov 4;10:604. doi: 10.1186/1471-2407-10-604.
169. Oldford SA, Robb JD, Codner D, Gadag V, Watson PH, Drover S. Tumor cell expression of HLA-DM associates with a Th1 profile and predicts improved survival in breast carcinoma patients. *Int Immunol*. 2006;18(11):1591–1602.
170. Marrogi AJ, Munshi A, Merogi AJ, Ohadike Y, El-Habashi A, Marrogi OL, Freeman SM. Study of tumor infiltrating lymphocytes and transforming growth factor-beta as prognostic factors in breast carcinoma. *Int J Cancer*. 1997; Oct 21;74(5):492-501.
171. Mahmoud SM, Paish EC, Powe DG, Macmillan RD, Grainge MJ, Lee AH, Ellis IO, Green AR. Tumor-infiltrating CD8+ lymphocytes predict clinical outcome in breast cancer. *J Clin Oncol*. 2011; May 20;29(15):1949-55. doi: 10.1200/JCO.2010.30.5037.
172. Gobert M, Treilleux I, Bendriss-Vermare N, Bachelot T, Goddard-Leon S, Arfi V, Biota C, Doffin AC, Durand I, Olive D, Perez S, Pasqual N, Faure C, Ray-Coquard I, Puisieux A, Caux C, Blay JY, Ménétrier-Caux C. Regulatory T cells recruited through CCL22/CCR4 are selectively activated in lymphoid infiltrates surrounding primary breast tumors and lead to an adverse clinical outcome. *Cancer Res*. 2009 Mar 1;69(5):2000-9. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-08-2360.
173. Gupta S, Joshi K, Wig JD, Arora SK. Intratumoral FOXP3 expression in infiltrating breast carcinoma: Its association with clinicopathologic parameters and angiogenesis. *Acta Oncol*. 2007;46(6):792–797.
174. Bates GJ, Fox SB, Han C, Leek RD, Garcia JF, Harris AL, Banham AH. Quantification of regulatory T cells enables the identification of high-risk breast cancer patients and those at risk of late relapse. *J Clin Oncol*. 2006; Dec 1;24(34):5373-80. doi: 10.1200/JCO.2006.05.9584.
175. Müller A, Homey B, Soto H, Ge N, Catron D, Buchanan ME, McClanahan T, Murphy E, Yuan W, Wagner SN, Barrera JL, Mohar A, Verástegui E, Zlotnik A. Involvement of chemokine receptors in breast cancer metastasis. *Nature*. 2001; Mar 1;410(6824):50-6. doi: 10.1038/35065016.
176. Orimo A, Weinberg RA. Stromal fibroblasts in cancer: a novel tumor-promoting cell type. *Cell Cycle*. 2006; 5(15):1597–1601.

177. Stuelten CH, DaCosta Byfield S, Arany PR, Karpova TS, Stetler-Stevenson WG, Roberts AB. Breast cancer cells induce stromal fibroblasts to express MMP-9 via secretion of TNF-alpha and TGF-beta. *J Cell Sci.* 2005;118(pt 10):2143–2153.
178. David AR, Zimmerman MR (2010) Cancer: an old disease, a new disease or something in between? *Nat Rev Cancer.* 2010 Oct;10(10):728-33. doi: 10.1038/nrc2914.
179. Stewart, B.W., Wild, C.P. IARC. World Cancer Report 2014. IARC Nonserial Publication ISBN/13 9789283204299.
180. Martinez JD, Parker MT. Molecular Biology of Cancer. Burger's Medicinal Chemistry and Drug Discovery Sixth Edition, Volume 5: Chemotherapeutic Agents Edited by Donald J. Abraham. ISBN 0-471-37031-2 ©2003 John Wiley&Sons, Inc.
181. American Cancer Society. Key Statistics for Breast Cancer in Men. American Cancer Society. Accessed on august 2017: <https://www.cancer.org/cancer/breast-cancer-in-men/about/key-statistics.html>
182. Soto AM, Sonnenschein C. Regulation of cell proliferation: the negative control perspective. *Ann N Y Acad Sci.* 1991;628:412-8.
183. Jones PA, Baylin SB. The epigenomics of cancer. *Cell.* 2007; Feb 23;128(4):683-92. doi: 10.1016/j.cell.2007.01.029
184. American Cancer Society Breast Cancer Facts & Figures 2017-2018. American Cancer Society. Accessed on December 2017: <https://www.cancer.org/content/dam/cancer-org/research/cancer-facts-and-statistics/breast-cancer-facts-and-figures/breast-cancer-facts-and-figures-2017-2018.pdf>
185. Roy P, Saha A. Metabolism and toxicity of arsenic: A human carcinogen. *Curr Sci.* 2002; 82:38–44.
186. Paul I Dantzig. Breast Cancer, Dermatofibromas and Arsenic. *Indian J Dermatol.* 2009; Jan-Mar; 54(1): 23–25. doi: 10.4103/0019-5154.48981.
187. Wang Z, Liu H, Liu S. Low-Dose Bisphenol A Exposure: A Seemingly Instigating Carcinogenic Effect on Breast Cancer. *Adv Sci (Weinh).* 2016 Nov 21;4(2):1600248. doi: 10.1002/advs.201600248.
188. Snedeker SM. Pesticides and breast cancer risk: a review of DDT, DDE, and dieldrin. *Environ Health Perspect.* 2001; Mar; 109(Suppl 1): 35–47.
189. American Cancer Society. ¿Qué es el cáncer de seno? Accessed on December 2017: <https://www.cancer.org/es/cancer/cancer-de-seno/acerca/que-es-el-cancer-de-seno.html>
190. National Cancer Institute. What is Cancer? Accessed on September 2016: <https://www.cancer.gov/about-cancer/understanding/what-is-cancer>

191. Weiss. L. *Histology: Cell and Tissue Biology*. Fifth Edition Hardcover – February 28, 1983. 1219 pages. Publisher: Elsevier Science Ltd; 5th edition (February 28, 1983). ISBN-10: 0444007164. ISBN-13: 978-0444007162.
192. Pinder SE, Ellis IO. The diagnosis and management of pre-invasive breast disease: ductal carcinoma in situ (DCIS) and atypical ductal hyperplasia (ADH)-current definitions and classification. *Breast Cancer Res.* 2003;5(5):254–257.
193. National Cancer Institute. Carcinoma ductal in situ. Accessed on February 2018: <https://www.cancer.org/es/cancer/cancer-de-seno/compreension-de-un-diagnostico-de-cancer-de-seno/tipos-de-cancer-de-seno/carcinoma-ductal-in-situ.html>
194. National Cancer Institute. Breast Cancer—Health Professional Version. Accessed on January 2018: <https://www.cancer.gov/types/breast/hp>
195. National Cancer Institute. Carcinoma lobulillar in situ (LCIS). Accessed on February 2018: <https://www.cancer.org/es/cancer/cancer-de-seno/afecciones-no-cancerosas-de-los-senos/carcinoma-lobulillar-in-situ.html>
196. National Cancer Institute. Cancer Stat Facts: Female Breast Cancer. Accessed on February 2018: <https://seer.cancer.gov/statfacts/html/breast.html>
197. BreastCancer.ORG. Types of Breast Cancer. Accessed on November 2017: <http://www.breastcancer.org/symptoms/types>
198. National Cancer Institute. Understanding a Breast Cancer Diagnosis. Accessed on February 2018: <https://www.cancer.org/cancer/breast-cancer/understanding-a-breast-cancer-diagnosis.html>
199. National Cancer Institute. SEER. Surveillance, Epidemiology, and End Results Program. Special Grade Systems Rules Breast (site: breast excluding lymphomas; CS schema: breast). Accessed on June 2018: <https://seer.cancer.gov/tools/grade/>
200. Rakha EA, Reis-Filho JS, Baehner F, Dabbs DJ, Decker T, Eusebi V, Fox SB, Ichihara S, Jacquemier J, Lakhani SR, Palacios J, Richardson AL, Schnitt SJ, Schmitt FC, Tan PH, Tse GM, Badve S, Ellis IO. Breast cancer prognostic classification in the molecular era: the role of histological grade. *Breast Cancer Res.* 2010;12(4):207. doi: 10.1186/bcr2607.
201. Elston CW, Ellis IO. Pathological prognostic factors in breast cancer. I. The value of histological grade in breast cancer: experience from a large study with long-term follow-up. *Histopathology.* 1991 Nov;19(5):403-10.
202. Onitilo AA, Engel JM, Greenlee RT, Mukesh BN. Breast cancer subtypes based on ER/PR and Her2 expression: comparison of clinicopathologic features and survival. *Clin Med Res.* 2009 Jun;7(1-2):4-13. doi: 10.3121/cm.2009.825.

203. Xu L, Li JH, Ye JM, Duan XN, Cheng YJ, Xin L, Liu Q, Zhou B, Liu YH. A Retrospective Survival Analysis of Anatomic and Prognostic Stage Group Based on the American Joint Committee on Cancer 8th Edition Cancer Staging Manual in Luminal B Human Epidermal Growth Factor Receptor 2-negative Breast Cancer. *Chin Med J (Engl)*. 2017 Aug 20;130(16):1945-1952. doi: 10.4103/0366-6999.211896.
204. Palma G, Frasci G, Chirico A, Esposito E, Siani C, Saturnino C, Arra C, Ciliberto G, Giordano A, D'Aiuto M. Triple negative breast cancer: looking for the missing link between biology and treatments. *Oncotarget*. 2015; Sep 29;6(29):26560-74. doi: 10.18632/oncotarget.5306.
205. Abramson VG, Lehmann BD, Ballinger TJ, Pietenpol JA. Subtyping of triple-negative breast cancer: implications for therapy. *Cancer*. 2015; Jan 1;121(1):8-16. doi: 10.1002/cncr.28914.
206. Agliari E, Barra A, Guerra F, Moauro F. A thermodynamical perspective of immune capabilities. *J Theor Biol*. 2011; Oct 21;287:48-63. doi: 10.1016/j.jtbi.2011.07.027.
207. Swann JB, Smyth MJ. Immune surveillance of tumors. *J Clin Invest*. 2007; May;117(5):1137-46.
208. Khodadoust MS, Alizadeh AA. Tumor antigen discovery through translation of the cancer genome. *Immunol Res*. 2014; May;58(2-3):292-9. doi: 10.1007/s12026-014-8505-4. Review.
209. Houben R, Dreher C, Angermeyer S, Borst A, Utikal J, Haferkamp S, Peitsch WK, Schrama D, Hesbacher S. Mechanisms of p53 restriction in Merkel cell carcinoma cells are independent of the Merkel cell polyoma virus T antigens. *J Invest Dermatol*. 2013; Oct;133(10):2453-2460. doi: 10.1038/jid.2013.169.
210. Dunn GP, Old LJ, Schreiber RD. The immunobiology of cancer immunosurveillance and immunoediting. *Immunity*. 2004; Aug;21(2):137-48.
211. Vesely MD, Schreiber RD. Cancer immunoediting: antigens, mechanisms, and implications to cancer immunotherapy. *Ann N Y Acad Sci*. 2013; May;1284:1-5. doi: 10.1111/nyas.12105.
212. Kim R, Emi M, Tanabe K. Cancer immunoediting from immune surveillance to immune escape. *Immunology*. 2007 May;121(1):1-14.
213. Lenin PR, Jiménez Martínez MC, Garcés Álvarez ME. *Inmunología molecular, celular y traslacional*. Editorial Wolters Kluwer, Barcelona: 2016.
214. Burrell R.A, McGranahan N, Bartek J, Swanton C. The causes and consequences of genetic heterogeneity in cancer evolution. *Nature*. 2013 Sep 19;501(7467):338-45. doi: 10.1038/nature12625.
215. Galon J, Angell HK, Bedognetti D, Marincola FM. The continuum of cancer immunosurveillance: prognostic, predictive, and mechanistic signatures. *Immunity*. 2013 Jul 25;39(1):11-26. doi: 10.1016/j.immuni.2013.07.008.

216. Galon J, Galon J, et al. *Science*. 2006;313::1960–1964. *Science*. 2006 Sep 29;313(5795):1960-4. doi: 10.1126/science.1129139
217. Angell HK, Galon J. From the immune contexture to the Immunoscore: the role of prognostic and predictive immune markers in cancer. *Curr Opin Immunol*. 2013 Apr;25(2):261-7. doi: 10.1016/j.coi.2013.03.004.
218. Koster, B.D, de Gruijl TD, van den Eertwegh AJ. Recent developments and future challenges in immune checkpoint inhibitory cancer treatment. *Curr Opin Oncol*. 2015; Nov;27(6):482-8. doi: 10.1097/CCO.0000000000000221.
219. Van Allen, E.M, Miao D, Schilling B, Shukla SA, Blank C, Zimmer L, Sucker A, Hillen U, Foppen MHG, Goldinger SM, Utikal J, Hassel JC, Weide B, Kaehler KC, Loquai C, Mohr P, Gutzmer R, Dummer R, Gabriel S, Wu CJ, Schadendorf D, Garraway LA. Genomic correlates of response to CTLA-4 blockade in metastatic melanoma. *Science*. 2015; Oct 9;350(6257):207-211. doi: 10.1126/science.aad0095.
220. Teng MW, Ngiow SF, Ribas A, Smyth MJ. Classifying Cancers Based on T-cell Infiltration and PD-L1. *Cancer Res*. 2015; Jun 1;75(11):2139-45. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-15-0255.
221. Smyth MJ, Ngiow SF, Ribas A, Teng MW. Combination cancer immunotherapies tailored to the tumour microenvironment. *Nat Rev Clin Oncol*. 2016; Mar;13(3):143-58. doi: 10.1038/nrclinonc.2015.209.
222. Weigelt B, Geyer FC, Reis-Filho JS. Histological types of breast cancer: how special are they? *Mol Oncol*. 2010 Jun;4(3):192-208. doi: 10.1016/j.molonc.2010.04.004.
223. Pardoll DM. The blockade of immune checkpoints in cancer immunotherapy. *Nat Rev Cancer*. 2012; Mar 22;12(4):252-64. doi: 10.1038/nrc3239.
224. Tumeh PC, Harview CL, Yearley JH, Shintaku IP, Taylor EJ, Robert L, Chmielowski B, Spasic M, Henry G, Ciobanu V, West AN, Carmona M, Kivork C, Seja E, Cherry G, Gutierrez AJ, Grogan TR, Mateus C, Tomasic G, Glaspy JA, Emerson RO, Robins H, Pierce RH, Elashoff DA, Robert C, Ribas A. PD-1 blockade induces responses by inhibiting adaptive immune resistance. *Nature*. 2014; Nov 27;515(7528):568-71. doi: 10.1038/nature13954.
225. Balkwill FR, Capasso M, Hagemann T. The tumor microenvironment at a glance. *J Cell Sci*. 2012; Dec 1;125(Pt 23):5591-6. doi: 10.1242/jcs.116392.
226. Gajewski TF, Meng Y, Harlin H. Immune suppression in the tumor microenvironment. *J Immunother*. 2006; May-Jun;29(3):233-40. doi: 10.1097/01.cji.0000199193.29048.56
227. Subimerb C, Pinlaor S, Khuntikeo N, Leelayuwat C, Morris A, McGrath MS, Wongkham S. Tissue invasive macrophage density is correlated with prognosis in cholangiocarcinoma. *Mol Med Rep*. 2010; Jul-Aug;3(4):597-605. doi: 10.3892/mmr_00000303.

228. Qing W, Fang WY, Ye L, Shen LY, Zhang XF, Fei XC, Chen X, Wang WQ, Li XY, Xiao JC, Ning G. Density of tumor-associated macrophages correlates with lymph node metastasis in papillary thyroid carcinoma. *Thyroid*. 2012; Sep;22(9):905-10. doi: 10.1089/thy.2011.0452.
229. Karnevi E, Andersson R, Rosendahl AH. Tumour-educated macrophages display a mixed polarisation and enhance pancreatic cancer cell invasion. *Immunol Cell Biol*. 2014; Jul;92(6):543-52. doi: 10.1038/icb.2014.22.
230. Meng F, Li C, Li W, Gao Z, Guo K, Song S. Interaction between pancreatic cancer cells and tumor-associated macrophages promotes the invasion of pancreatic cancer cells and the differentiation and migration of macrophages. *IUBMB Life*. 2014; Dec;66(12):835-46. doi: 10.1002/iub.1336.
231. Yang J, Li X, Liu X, Liu Y. The role of tumor-associated macrophages in breast carcinoma invasion and metastasis. *Int J Clin Exp Pathol*. 2015; Jun 1;8(6):6656-64. eCollection 2015.
232. Lin E. Y, Pollard JW. Tumor-associated macrophages press the angiogenic switch in breast cancer. *Cancer Res*. 2007; Jun 1;67(11):5064-6. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-07-0912.
233. Porta C, Subhra Kumar B, Larghi P, Rubino L, Mancino A, Sica A. Tumor promotion by tumor-associated macrophages. *Adv Exp Med Biol*. 2007;604:67-86.
234. Laoui D, Movahedi K, Van Overmeire E, Van den Bossche J, Schouppe E, Mommer C, Nikolaou A, Morias Y, De Baetselier P, Van Ginderachter JA. Tumor-associated macrophages in breast cancer: distinct subsets, distinct functions. *Int J Dev Biol*. 2011;55(7-9):861-7. doi: 10.1387/ijdb.113371dl.
235. Clemente CG, Mihm MC Jr, Bufalino R, Zurrida S, Collini P, Cascinelli N. Prognostic value of tumor infiltrating lymphocytes in the vertical growth phase of primary cutaneous melanoma. *Cancer*. 1996 Apr 1;77(7):1303-10. doi: 10.1002/(SICI)1097-0142(19960401)77:7<1303::AID-CNCR12>3.0.CO;2-5
236. Fukunaga A, Miyamoto M, Cho Y, Murakami S, Kawarada Y, Oshikiri T, Kato K, Kurokawa T, Suzuoki M, Nakakubo Y, Hiraoka K, Itoh T, Morikawa T, Okushiba S, Kondo S, Katoh H. CD8+ tumor-infiltrating lymphocytes together with CD4+ tumor-infiltrating lymphocytes and dendritic cells improve the prognosis of patients with pancreatic adenocarcinoma. *Pancreas*. 2004; Jan;28(1):e26-31.
237. Fearon DT. The carcinoma-associated fibroblast expressing fibroblast activation protein and escape from immune surveillance. *Cancer Immunol Res*. 2014; Mar;2(3):187-93. doi: 10.1158/2326-6066.CIR-14-0002.
238. Garin-Chesa P, Old LJ, Rettig WJ. Cell surface glycoprotein of reactive stromal fibroblasts as a potential antibody target in human epithelial cancers. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1990 Sep;87(18):7235-9.
239. Kalluri R, Zeisberg M. Fibroblasts in cancer. *Nat Rev Cancer*. 2006 May;6(5):392-401. doi: 10.1038/nrc1877.

240. Joyce JA, Fearon DT. T cell exclusion, immune privilege, and the tumor microenvironment. *Science*. 2015 Apr 3;348(6230):74-80. doi: 10.1126/science.aaa6204.
241. Rosenblueth A. *El método científico*. Editor: La prensa medica mexicana (2003). ISBN-10: 9684351585. ISBN-13: 978-9684351585.
242. Pulaski BA, Ostrand-Rosenberg S. Reduction of established spontaneous mammary carcinoma metastases following immunotherapy with major histocompatibility complex class II and B7.1 cell-based tumor vaccines. *Cancer Res*. 1998 Apr 1;58(7):1486-93.
243. Lelekakis M, Moseley JM, Martin TJ, Hards D, Williams E, Ho P, Lowen D, Javni J, Miller FR, Slavin J, Anderson RL. A novel orthotopic model of breast cancer metastasis to bone. *Clin Exp Metastasis*. 1999 Mar;17(2):163-70.
244. Pulaski BA, Ostrand-Rosenberg S. Mouse 4T1 breast tumor model. *Curr Protoc Immunol*. May 2001;Chapter 20:Unit 20.22.
245. DuPre' SA, Hunter KW Jr. Murine mammary carcinoma 4T1 induces a leukemoid reaction with splenomegaly: association with tumor-derived growth factors. *Exp Mol Pathol*. 2007; Feb;82(1):12-24.
246. Liu M, Jin X, He X, Pan L, Zhang X, Zhao Y. Macrophages support splenic erythropoiesis in 4T1 tumor-bearing mice. *PLoS One*. 2015 Mar 30;10(3):e0121921. doi: 10.1371/journal.pone.0121921. eCollection 2015.
247. Heppner GH, Miller FR, Shekhar PM. Nontransgenic models of breast cancer. *Breast Cancer Res*. 2000;2(5):331-4.
248. Morecki S, Yacovlev L, Slavin S. Effect of indomethacin on tumorigenicity and immunity induction in a murine model of mammary carcinoma. *Int J Cancer*. 1998 Mar 16;75(6):894-9.
249. Bagri A, Kouros-Mehr H, Leong KG, Plowman GD. Use of anti-VEGF adjuvant therapy in cancer: challenges and rationale. *Trends Mol Med*. 2010; Mar;16(3):122-32. doi: 10.1016/j.molmed.2010.01.004.
250. Dudley ME, Wunderlich JR, Robbins PF, Yang JC, Hwu P, et al. Cancer regression and autoimmunity in patients after clonal repopulation with antitumor lymphocytes. *Science*. 2002; 298:850–854.
251. Rosenberg SA, Yang JC, Restifo NP. Cancer immunotherapy: moving beyond current vaccines. *Nat. Med*. 2004; 10:909–915.
252. Ishizuka M, Kawatsu M, Yamashita T, Ueno M, Takeuchi T. Low molecular weight immunomodulators produced by microorganisms. *Int J Immunopharmacol*. 1995 Feb;17(2):133-39.

253. Fauci AS, Rosenberg SA, Sherwin SA, Dinarello CA, Longo DL, Lane HC. Immunomodulators in clinical medicine. NIH conference. *Ann Intern Med.* 1987; Mar;106(3):421-33.
252. Kaplan, N. Morpurgo N, Linial M. Novel families of toxin-like peptides in insects and mammals: a computational approach. *J Mol Biol.* 2007; Jun 1;369(2):553-66.
253. Rüegg C, Hasmim M, Lejeune FJ, Alghisi GC. Antiangiogenic peptides and proteins: from experimental tools to clinical drugs. *Biochim Biophys Acta.* 2006; Apr;1765(2):155-77.
254. Janin YL. Peptides with anticancer use or potential. *Amino Acids.* 2003; Jul;25(1):1-40.
255. Mader, J.S. and Hoskin, D.W. (2006) Cationic antimicrobial peptides as novel cytotoxic agents for cancer treatment. *Expert Opin. Investig. Drugs* 15, 933–946
256. Bhutia SK, Maiti TK. Targeting tumors with peptides from natural sources. *Trends Biotechnol.* 2008 Apr;26(4):210-7. doi: 10.1016/j.tibtech.2008.01.002. Epub 2008 Mar 4. Review. PMID: 18295917.
257. Okumura, K. Itoh A, Isogai E, Hirose K, Hosokawa Y, Abiko Y, Shibata T, Hirata M, Isogai H. C-terminal domain of human CAP18 antimicrobial peptide induces apoptosis in oral squamous cell carcinoma SAS-H1 cells. *Cancer Lett.* 2004; Aug 30;212(2):185-94.
258. Mader JS. Richardson A, Salsman J, Top D, de Antueno R, Duncan R, Hoskin DW. Bovine lactoferricin causes apoptosis in Jurkat T-leukemia cells by sequential permeabilization of the cell membrane and targeting of mitochondria. *Exp. Cell Res.* 313, 2634–2650
259. Lehmann, J. Retz M, Sidhu SS, Suttman H, Sell M, Paulsen F, Harder J, Unteregger G, Stöckle M. Antitumor activity of the antimicrobial peptide magainin II against bladder cancer cell lines. *Eur Urol.* 2006; Jul;50(1):141-7.
260. Krieg AM. CpG motifs in bacterial DNA and their immune effects. *Annu Rev Immunol* 2002; 20:709–60.
261. Alexopoulou L, Holt AC, Medzhitov R, Flavell RA. Recognition of double stranded RNA and activation of NF-kappaB by Toll- like receptor 3. *Nature* 2001;413(6857):732–8.
262. Netea MG, van der Graaf C, Van der Meer JW, Kullberg BJ. Toll-like receptors and the host defense against microbial pathogens: bringing specificity to the innate-immune system. *J Leukoc Biol* 2004;75(5):749–55.
263. Weiner GJ, Liu HM, Wooldridge JE, Dahle CE, Krieg AM. Immunostimulatory oligodeoxynucleotides containing the CpG motif are effective as immune adjuvants in tumor antigen immunization. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997;94(20):10833–7.
264. Chu RS, Targoni OS, Krieg AM, Lehmann PV, Harding CV. CpG oligodeoxynucleotides act as adjuvants that switch on T helper 1 (Th1) immunity. *J Exp Med* 1997;186(10):1623–31.

265. Krug A, Towarowski A, Britsch S, Rothenfusser S, Hornung V, Bals R, Giese T, Engelmann H, Endres S, Krieg AM, Hartmann G. Toll-like receptor expression reveals CpG DNA as a unique microbial stimulus for plasmacytoid dendritic cells which synergizes with CD40 ligand to induce high amounts of IL-12. *Eur J Immunol*. 2001 Oct;31(10):3026-37.
266. Krieg AM. Therapeutic potential of Toll-like receptor 9 activation. *Nat Rev Drug Discov*. 2006 Jun;5(6):471-84.
267. Schmidt C. Clinical setbacks for toll-like receptor 9 agonists in cancer. *Nat Biotechnol* 2007;25(8):825–6.
268. Mocellin S, Pilati P, Nitti D. Peptide-based anticancer vaccines: recent advances and future perspectives. *Curr Med Chem*. 2009;16(36):4779-96.
269. Gevorkian G, Manoutcharian K, Larralde C, Hernandez M, Almagro JC, Viveros M, Sotelo J, Garcia E, Sciutto E. Immunodominant synthetic peptides of *Taenia crassiceps* in murine and human cysticercosis. *Immunol Lett*. 1996 Mar;49(3):185-9.
270. Segura-Velazquez R, Fragoso G, Sciutto E, Sarukhan A. Towards identification of the mechanisms of action of parasite-derived peptide GK1 on the immunogenicity of an influenza vaccine. *Clin Vaccine Immunol*. 2009;Sep; 16(9):1338-1343.
271. Toledo A, Larralde C, Fragoso G, Gevorkian G, Manoutcharian K, Hernández M, Acero G, Rosas G, López-Casillas F, Garfias CK, Vázquez R, Terrazas I, Sciutto E. Towards a *Taenia solium* cysticercosis vaccine: an epitope shared by *Taenia crassiceps* and *Taenia solium* protects mice against experimental cysticercosis. *Infect Immun*. 1999; May;67(5):2522-30.
272. Segura-Velazquez R, Pérez-Torres A, Rosas G, Toledo A, Restelli M, Acosta E, Corral R, Rosetti F, Fragoso G, Grinstein S, Sciutto E. A novel synthetic adjuvant effectively enhances the immunogenicity of the influenza vaccine. *Vaccine*. 2006; Feb 20;24(8):1073-80.
273. Perez-Torres A, Vera-Aguilera J, Hernaiz-Leonardo JC, Moreno-Aguilera E, Monteverde-Suarez D, Vera-Aguilera C, Estrada-Bárceñas D. The synthetic parasite-derived peptide GK1 increases survival in a preclinical mouse melanoma model. *Cancer Biother Radiopharm*. 2013; Nov;28(9):682-90. doi: 10.1089/cbr.2012.1438.
274. Vera-Aguilera J, Perez-Torres A, Beltran D, Villanueva-Ramos C, Wachtel M, Moreno-Aguilera E, Vera-Aguilera C, Ventolini G, Martínez-Zaguilán R, Sennoune SR. Novel Treatment of Melanoma: Combined Parasite-Derived Peptide GK-1 and Anti-Programmed Death Ligand 1 Therapy. *Cancer Biother Radiopharm*. 2017; Mar;32(2):49-56. doi: 10.1089/cbr.2016.2123.
275. Carlsson G, Gullberg B, Hafstrom L. Estimation of liver tumor volume using different formulas- an experimental study in rats. *J Cancer Res Clin Oncol*. 1983;105(1):20-23.
276. Golde WT, Gollobin P, Rodriguez LL. A rapid, simple, and humane method for submandibular bleeding of mice using a lancet. *Lab Anim (NY)*. Oct 2005;34(9):39-43.

277. Kumar V, Abbas AK, Fausto N, Robbins SL and Cotran RS. Robbins and Cotran pathologic basis of disease. 8th ed. Philadelphia: Elsevier Saunders; 2005. 12–18 p.
278. Shen K, Sun J, Cao X, Zhou D and Li J. Comparison of different buffers for protein extraction from formalin-fixed and paraffin-embedded tissue specimens. *PLoSOne*. 2015; Nov 18;10(11):e0142650.
279. Le HK, Graham L, Cha E, Morales JK, Manjili MH, Bear HD. Gemcitabine directly inhibits myeloid derived suppressor cells in BALB/c mice bearing 4T1 mammary carcinoma and augments expansion of T cells from tumor-bearing mice. *Int Immunopharmacol*. 2009;Jul 9(7-8):900-909.
280. Thundimadathil J. Cancer treatment using peptides: current therapies and future prospects. *J Amino Acids*. 2012; 2012:967347.
281. Pettit GR, Cichacz Z, Barkoczy J, Dorsaz AC, Herald DL, Williams MD, Doubek DL, Schmidt JM, Tackett LP, Brune DC, et al. Isolation and structure of the marine sponge cell growth inhibitory cyclic peptide phakellistatin 1. *J Nat Prod*. 1993; Feb;56(2):260-7.
282. Phoenix D, Dennison SR, Harris F. Antimicrobial Peptides: Their History, Evolution, and Functional Promiscuity. *Antimicrobial Peptides*. Weinheim, Germany: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA; 2013:1-37.
283. Fidler IJ. Critical factors in the biology of human cancer metastasis: twenty-eighth G.H.A. Clowes memorial award lecture. *Cancer Res*. 1990; Oct 1 50(19):6130-6138.
284. Butler TP, Gullino PM. Quantitation of cell shedding into efferent blood of mammary adenocarcinoma. *Cancer Res*. 1975; Mar 35(3):512-516.
285. Yang SX, Wei WS, Ouyan QW, Jiang QH, Zou YF, Qu W, Tu JH, Zhou ZB, Ding HL, Xie CW, Lei QM, Zhong CR. Interleukin-12 activated CD8⁺ T cells induces apoptosis in breast cancer cells and reduces tumor growth. *Biomed Pharmacother*. 2016; Dec;84:1466-1471. doi: 10.1016/j.biopha.2016.10.046.
286. Shi X, Cao S, Mitsuhashi M, Xiang Z, Ma X. Genome-wide analysis of molecular changes in IL-12-induced control of mammary carcinoma via IFN-gamma-independent mechanisms. *J Immunol*. 2004; Apr 1;172(7):4111-22.
287. Siddiqui F, Ehrhart EJ, Charles B, Chubb L, Li CY, Zhang X, Larue SM, Avery PR, Dewhirst MW, Ullrich RL. Anti-angiogenic effects of interleukin-12 delivered by a novel hyperthermia induced gene construct. *Int J Hyperthermia*. 2006; Nov;22(7):587-606.
288. Kasuga I, Makino S, Kiyokawa H, Katoh H, Ebihara Y, Ohyashiki K. Tumor-related leukocytosis is linked with poor prognosis in patients with lung carcinoma. *Cancer*. 2001; 92:2399-405.
289. Turner N and Grose R. Fibroblast growth factor signalling: from development to cancer. *Nat Rev Cancer*. 2010; Feb;10(2):116-29.

290. Qian BZ, Li J, Zhang H, Kitamura T, Zhang J, Campion LR, Kaiser EA, Snyder LA, Pollard JW. CCL-2 recruits inflammatory monocytes to facilitate breast-tumour metastasis. *Nature*. 2011 Jun 8;475(7355):222-5. doi: 10.1038/nature10138.
291. Kitamura T, Qian BZ, Soong D, Cassetta L, Noy R, Sugano G, Kato Y, Li J, Pollard JW. CCL-2-induced chemokine cascade promotes breast cancer metastasis by enhancing retention of metastasis-associated macrophages. *J Exp Med*. 2015 Jun 29;212(7):1043-59. doi: 10.1084/jem.20141836.
292. Wei LH, Kuo ML, Chen CA, Chou CH, Lai KB, Lee CN, Hsieh CY. Interleukin-6 promotes cervical tumor growth by VEGF-dependent angiogenesis via a STAT3 pathway. *Oncogene*. 2003; Mar 13;22(10):1517-27.
293. Dinarello CA. Why not treat human cancer with interleukin-1 blockade? *Cancer Metastasis Rev*. 2010 Jun;29(2):317-29. doi: 10.1007/s10555-010-9229-0.
294. Takahashi JA, Mori H, Fukumoto M, Igarashi K, Jaye M, Oda Y, Kikuchi H, Hatanaka M. Gene expression of fibroblast growth factors in human gliomas and meningiomas: demonstration of cellular source of basic fibroblast growth factor mRNA and peptide in tumor tissues. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1990 Aug;87(15):5710-4..
295. Melder RJ, Koenig GC, Witwer BP, Safabakhsh N, Munn LL, Jain RK. During angiogenesis, vascular endothelial growth factor and basic fibroblast growth factor regulate natural killer cell adhesion to tumor endothelium. *Nat Med*. 1996; Sep 2(9):992-997.
296. Nakao S, Noda K, Zandi S, et al. VAP-1-mediated M2 macrophage infiltration underlies IL-1beta- but not VEGF-A-induced lymph- and angiogenesis. *Am J Pathol*. 2011; Apr 178(4):1913-1921.
297. Hong KH, Cho ML, Min SY, Shin YJ, Yoo SA, Choi JJ, Kim WU, Song SW, Cho CS. Effect of interleukin-4 on vascular endothelial growth factor production in rheumatoid synovial fibroblasts. *Clin Exp Immunol*. 2007; Mar;147(3):573-9.
298. Volpert OV, Fong T, Koch AE, Peterson JD, Waltenbaugh C, Tepper RI, Bouck NP. Inhibition of angiogenesis by interleukin 4. *J Exp Med*. 1998; Sep 21;188(6):1039-46.
299. Saleh M, Davis ID, Wilks AF. The paracrine role of tumour-derived mIL-4 on tumour-associated endothelium. *Int J Cancer*. 1997; Aug 7; 72(4):664-672.

10. ANEXOS

ANEXO 1:

Como se señaló en la sección 6.5 se realizó un análisis exploratorio jerárquico no supervisado con la finalidad de establecer patrones que denoten diferencias entre las concentraciones de factores solubles presentes en todos los órganos de estudio y entre ratones que recibieron tratamiento y ratones controles. En este sentido, se anexan los mapas de calor correspondientes a los análisis en suero, tumor primario, bazo e hígado (Figura S.1, S.2, S.3 y S.4, respectivamente).

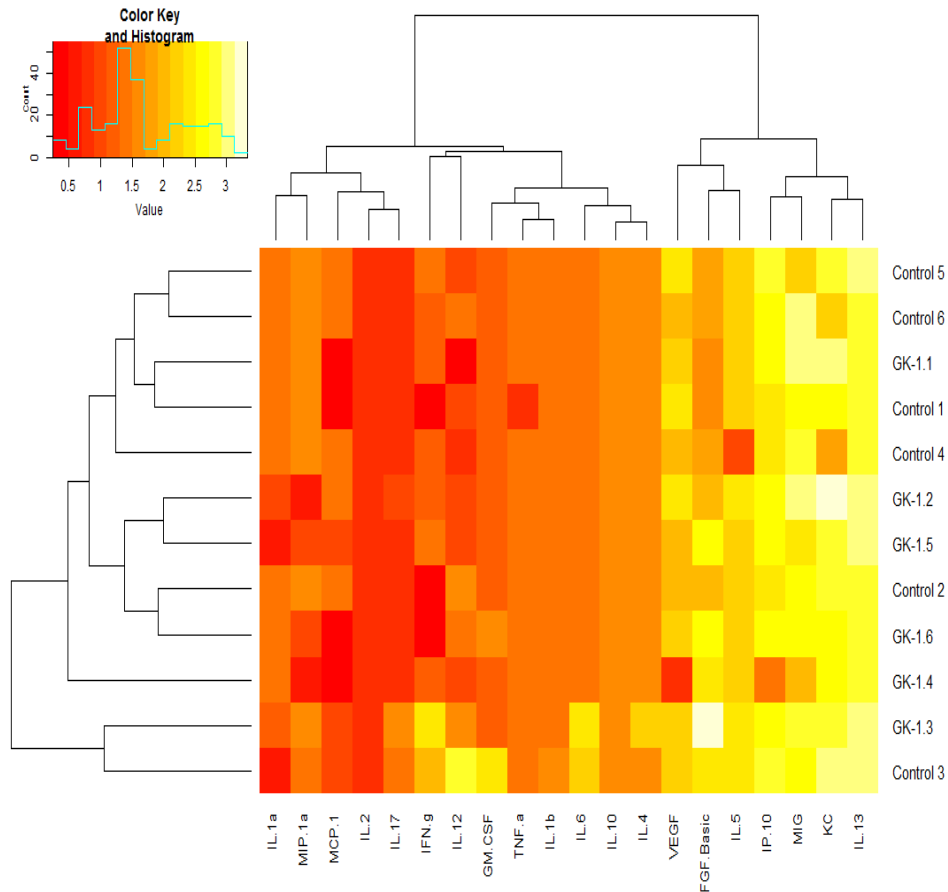


Figura S1 Patrones de producción de factores solubles en suero de ratones tratados con GK-1 y sin tratamiento.

Mapa de calor generado a partir del análisis jerárquico no supervisado de la correlación entre la concentración de los factores solubles cuantificados en suero. Los valores de la concentración de citocinas individuales están representados por tonos de blanco a rojo en el mapa de calor, con los valores más altos en blanco y los más bajos en rojo. En este análisis jerárquico no supervisado, los ratones control y los animales tratados con GK-1 no se agruparon de forma independiente, indicando que no existen cambios en la concentración de factores solubles entre los animales en estudio. Los datos corresponden a una muestra aleatoria de 5 experimentos independientes.

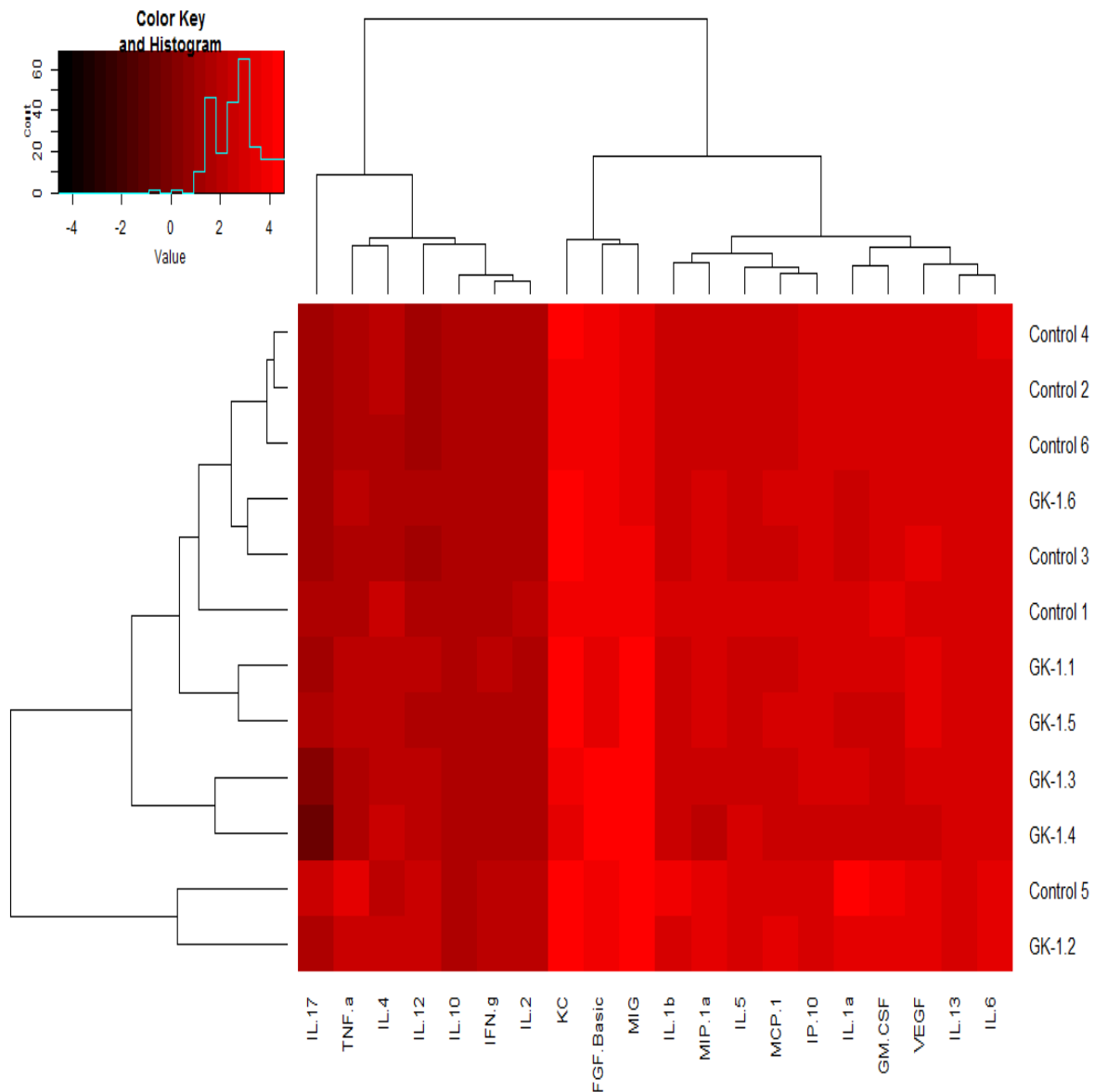


Figura S.2 El tratamiento con GK-1 se asocia a un perfil de producción de citocinas diferencial con respecto a los animales control en tumor primario.

Mapa de calor generado a partir del análisis jerárquico no supervisado de la correlación entre la concentración de los factores solubles cuantificados en tumor primario. Los valores de la concentración de citocinas individuales están representados por tonos de rojo a negro en el mapa de calor, con los valores más altos en rojo y los más bajos en negro. En este análisis jerárquico no supervisado, los ratones control y los animales tratados con GK-1 no se agruparon de forma independiente, indicando que no existen cambios en la concentración de factores solubles entre los animales en estudio en el tumor primario. Los datos corresponden a una muestra aleatoria de 6 ratones seleccionados a partir de 5 experimentos independientes.

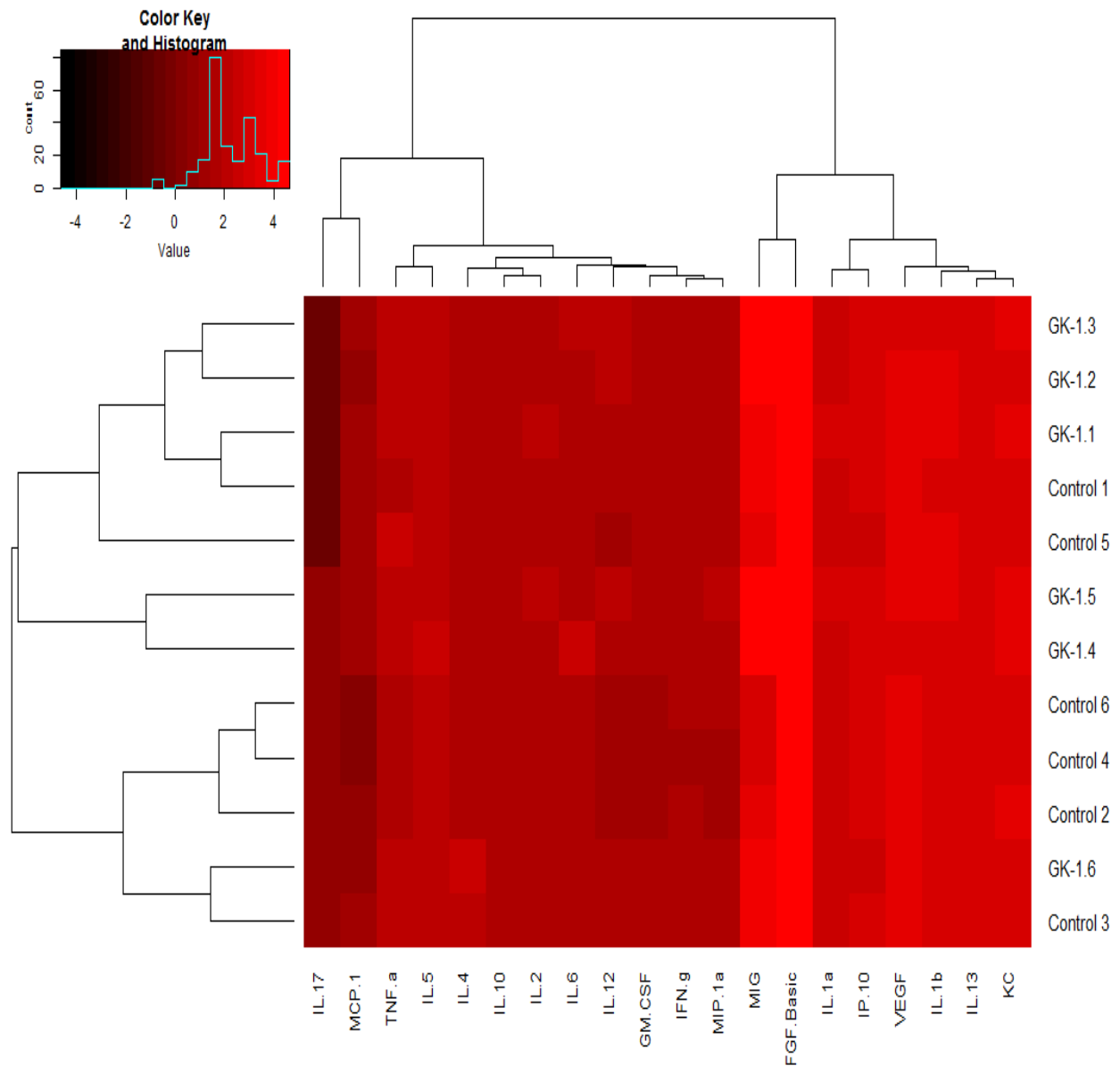


Figura S.3 Patrones de producción de factores solubles en bazo de ratones tratados con GK-1 y sin tratamiento.

Mapa de calor generado a partir del análisis jerárquico no supervisado de la correlación entre la concentración de los factores solubles cuantificados en bazo. Los valores de la concentración de citocinas individuales están representados por tonos de rojo a negro en el mapa de calor, con los valores más altos en rojo y los más bajos en negro. En este análisis jerárquico no supervisado, los ratones control y los animales tratados con GK-1 no se agruparon de forma independiente, indicando que no existen cambios en la concentración de factores solubles entre los animales en estudio. Los datos corresponden a una muestra aleatoria de 6 ratones seleccionados a partir de 5 experimentos independientes.

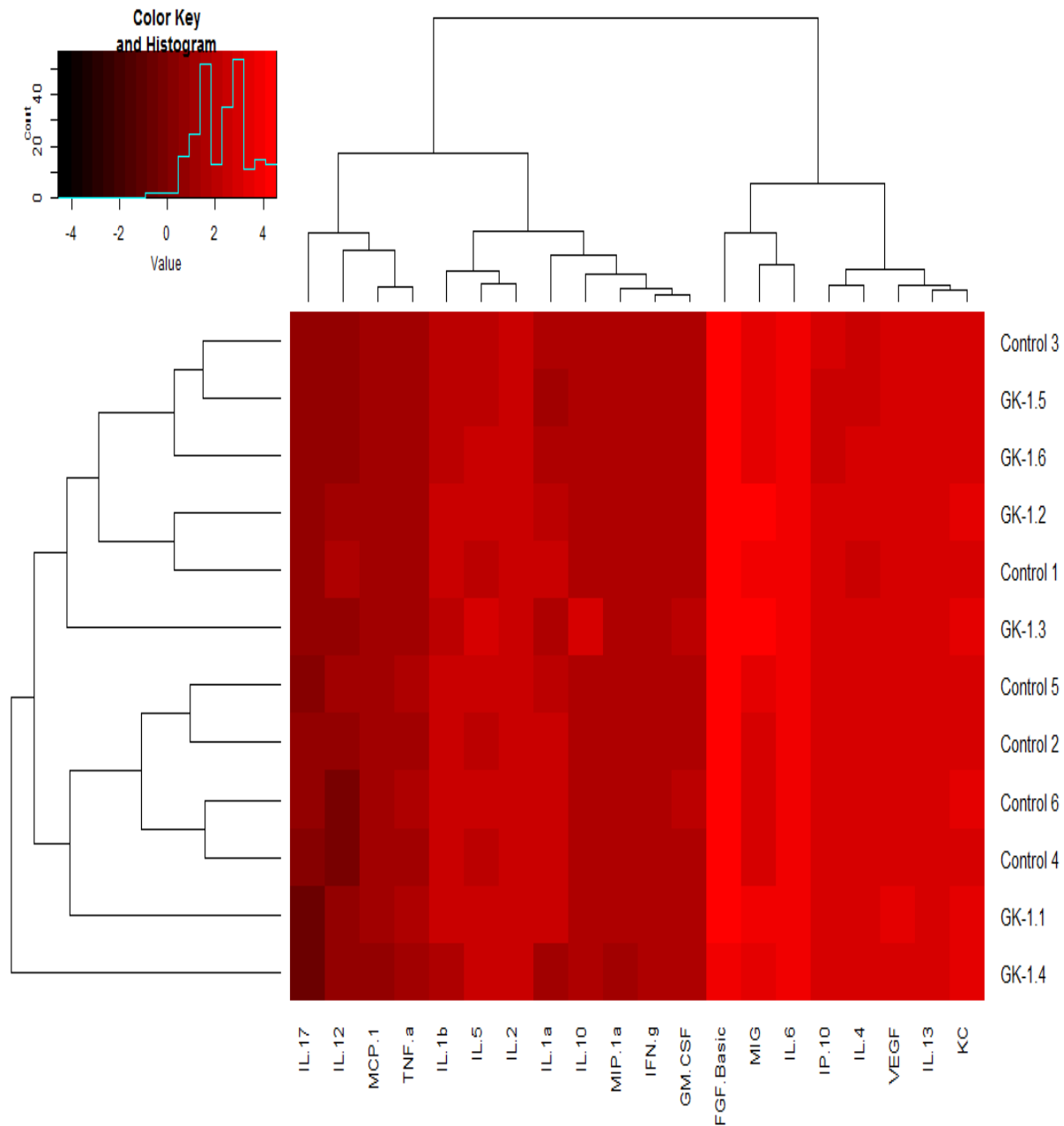


Figura S.4 El tratamiento con GK-1 se asocia a un perfil de producción de citocinas diferencial con respecto a los animales control en hígado.

Mapa de calor generado a partir del análisis jerárquico no supervisado de la correlación entre la concentración de los factores solubles cuantificados en hígado. Los valores de la concentración de citocinas individuales están representados por tonos de rojo a negro en el mapa de calor, con los valores más altos en rojo y los más bajos en negro. En este análisis jerárquico no supervisado, los ratones control y los animales tratados con GK-1 no se agruparon de forma independiente, indicando que no existen cambios en la concentración de factores solubles entre los animales en estudio. Los datos corresponden a una muestra aleatoria de 6 ratones seleccionados a partir de 5 experimentos independientes.

Como podemos observar en las Figuras S1-S4 los mapas de calor generados a partir del análisis jerárquico no supervisado demuestran que los grupos en estudio no se agrupan discretamente, indicando que no existen cambios globales en el perfil de producción de factores solubles en suero, tumor, bazo e hígado. Lo anterior se confirmó en hígado y suero a través del análisis estadístico previamente descrito en la sección 6.7 (Tabla S.1). Sin embargo, en el caso de tumor primario y bazo si encontramos diferencias estadísticamente significativas entre algunos factores solubles (Tabla 6.2 y Figura 6.10).

Tabla S.1. Concentración de factores solubles en suero e hígado.

	Suero		Hígado	
	GK-1	Control	GK-1	Control
FGF basic	4.15E+13 ± 1.02E+14	4.15E+13 ± 1.02E+14	2.31E+04 ± 8.20E+03	2.52E+04 ± 4.75E+03
IL-1	1.35E+14 ± 6.61E+13	1.08E+14 ± 8.36E+13	1.47E+02 ± 1.08E+02	2.34E+02 ± 4.86E+01
IL-13	9.02E+02 ± 2.01E+02	8.12E+02 ± 2.20E+02	1.19E+03 ± 1.53E+02	1.21E+03 ± 9.34E+01
IL-6	1.37E+14 ± 1.06E+14	1.71E+14 ± 8.39E+13	6.72E+03 ± 6.21E+02	6.71E+03 ± 4.19E+02
IL-12	2.64E+14 ± 2.90E+14	1.76E+14 ± 2.73E+14	2.64E+14 ± 2.90E+14	1.76E+14 ± 2.73E+14
IL-17	3.39E+14 ± 2.63E+14	4.24E+14 ± 2.08E+14	8.49E+13 ± 2.08E+14	2.55E+14 ± 2.79E+14
MIP-1α	9.25E+13 ± 1.43E+14	2.31E+14 ± 1.13E+14	3.85E+01 ± 1.49E+01	3.17E+01 ± 5.23E+00
GM-CSF	6.60E+13 ± 7.23E+13	8.79E+13 ± 6.81E+13	4.78E+01 ± 1.46E+01	4.13E+01 ± 1.51E+01
MCP-1	2.55E+13 ± 6.26E+13	1.02E+14 ± 7.91E+13	1.30E+01 ± 3.19E+00	1.40E+01 ± 3.47E+00
IL-5	1.84E+02 ± 5.60E+01	1.47E+02 ± 9.88E+01	2.95E+02 ± 1.62E+02	2.22E+02 ± 9.20E+01
VEGF	7.11E+13 ± 1.74E+14	1.62E+02 ± 6.91E+01	1.35E+03 ± 4.96E+02	1.08E+03 ± 4.00E+02
IL-1α	9.26E+13 ± 1.01E+14	1.54E+14 ± 7.56E+13	1.02E+02 ± 1.34E+02	1.64E+02 ± 6.30E+01
IFN-γ	3.88E+13 ± 6.01E+13	3.88E+13 ± 6.01E+13	4.65E+01 ± 1.06E+01	3.80E+01 ± 6.16E+00
TNF-α	1.65E+14 ± 0.00E+00	1.37E+14 ± 6.73E+13	1.95E+01 ± 7.25E+00	2.06E+01 ± 5.05E+00
IL-2	4.90E+14 ± 0.00E+00	4.90E+14 ± 0.00E+00	2.88E+02 ± 4.17E+01	3.22E+02 ± 3.34E+01
IP-10	2.34E+13 ± 5.74E+13	4.08E+02 ± 1.80E+02	6.08E+02 ± 1.16E+02	5.84E+02 ± 1.59E+01
MIG	5.89E+02 ± 4.11E+02	5.12E+02 ± 2.43E+02	7.37E+03 ± 5.96E+03	3.29E+03 ± 3.61E+03
KC	9.29E+02 ± 6.66E+02	8.16E+13 ± 2.00E+14	1.74E+03 ± 3.34E+02	1.49E+03 ± 5.61E+01
IL-4	2.60E+14 ± 1.28E+14	3.12E+14 ± 0.00E+00	8.95E+02 ± 4.05E+02	7.50E+02 ± 2.85E+02

Se reportan la media y desviación estándar de la concentración de los factores solubles (pg/ml) determinados en suero e hígado. Los datos corresponden a una muestra aleatoria de 6 ratones por grupo, obtenida a partir de 5 experimentos independientes.

ANEXO 2:

Con base en los resultados obtenidos a partir de este trabajo se realizó la solicitud de dos patentes: una nacional frente al IMPI y otra internacional tipo PCT. El objetivo de estas solicitudes es proteger los resultados obtenidos, para poder continuar explorando las propiedades de GK-1 y generar evidencia preclínica suficiente para solicitar la realización de estudios de fase clínica en pacientes con cáncer.

Instituto Mexicano de la Propiedad Industrial

INSTITUTO MEXICANO DE LA PROPIEDAD INDUSTRIAL
Dirección Divisiva de Patentes

Uso exclusivo Delegaciones y Subdelegaciones de la Secretaría de Economía y Oficinas Regionales del IMPI

Solicitud de Patente Solicitud de Registro de Modelo de Utilidad

Solicitud de Registro de Diseño Industrial, especifique cual: Modelo Industrial Dibujo Industrial

Antes de llenar la forma lea las consideraciones generales al reverso

DATOS DEL (DE LOS) SOLICITANTE(S)

El solicitante es el inventor El solicitante es el causahabiente

1) Nombre (s) UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
2) Nacionalidad (es) MEXICANA
3) Domicilio, calle, número, colonia y código postal: 9º PISO DE LA TORRE DE RECTORÍA SIN, CIUDAD UNIVERSITARIA, C.P. 04510
Población, Estado y País: COYOACÁN, CIUDAD DE MÉXICO, MÉXICO
4) Teléfono (clave): (55) 56 22 63 29 Al. 31 5) Fax (clave): (55) 56 65 46 44

DATOS DEL (DE LOS) INVENTOR(ES)

6) Nombre (s) ÉDIDA I YDIA SCRUTTO CORDE, GLADIS DEL CARMEN FRAGOSO GONZÁLEZ, DIANA TORRES GARCÍA, JACQUELINE BRENDA CERVANTES TORRES, RENÉ ALVARO SEGURA VEJÁZQUEZ, ARMANDO PÉREZ TORRES Y KAREN MANUCHARYAN
7) Nacionalidad (es) MEXICANAS
8) Domicilio, calle, número, colonia y código postal: PRIVADA DE LA SELVA NO. 108, LOMAS DE LA SELVA, C.P. 82270
Población, Estado y País: CUERNAVACA, MORELOS, MÉXICO
9) Teléfono (clave) 10) Fax (clave)

DATOS DEL (DE LOS) APODERADO(S)

11) Nombre (s) LIC. MARTHA FIGUEROA PÉREZ 12) RGP-DDAJ-14762
13) Domicilio, calle, número, colonia y código postal: 3er PISO DEL EDIFICIO "B" DE LAS OFICINAS ADMINISTRATIVAS EXTERIORES DE LA ZONA CULTURAL DE CIUDAD UNIVERSITARIA, C.P. 04510
Población, Estado y País: COYOACÁN, CIUDAD DE MÉXICO, MÉXICO 14) Teléfono (clave) (55) 56 22 63 29 Al. 31 15) Fax (clave) (55) 56 65 46 44
16) Personas Autorizadas para oír y recibir notificaciones:
DANIEL OJESTO MARTÍNEZ PORCAYO, ROCÍO JUÁREZ VÁZQUEZ Y RUBÉN GONZÁLEZ GALINDO

17) Denominación o Título de la invención:
"USO DEL PÉPTIDO GK-1 COMO UN AGENTE ANTI-TUMORAL Y/O ANTI-METASTÁSICO"

18) Fecha de divulgación previa
Día Mes Año
20) Divisiva de la solicitud

19) Clasificación Internacional uso exclusivo del IMPI
21) Fecha de presentación
Día Mes Año

22) Prioridad Reclamada:
Número Figura jurídica Fecha de presentación No. de serie
País Día Mes Año

Lista de verificación (uso interno)

No. Hojas		No. Hojas	
<input checked="" type="checkbox"/> 1	Comprobante de pago de la tarifa	<input checked="" type="checkbox"/> 7	Documento de cesión de derechos
<input checked="" type="checkbox"/> 21	Descripción y reivindicación (es) de la invención		Constancia de depósito de material biológico
<input checked="" type="checkbox"/> 5	Dibujo (s) en su caso		Documento (s) comprobatorio(s) de divulgación previa
<input checked="" type="checkbox"/> 1	Resumen de la descripción de la invención		Documento (s) de prioridad
<input checked="" type="checkbox"/> 1	Documento que acredite la personalidad del apoderado		Traducción
		36	TOTAL DE HOJAS

Observaciones:
Se anexa hoja de descuento.
Bajo protesta de decir verdad, manifiesto que los datos asentados en esta solicitud son ciertos.

LIC. MARTHA FIGUEROA PÉREZ CIUDAD UNIVERSITARIA, CD. MX. A 17 DE MAYO DE 2016.
Nombre y firma del solicitante o su apoderado Lugar y fecha

Página 1 de 2 IMPI 00 009

Figura S5 Solicitud de patente frente al IMPI: Uso del péptido GK-1 como un agente anti-tumoral y/o antimetastásico.

Solicitud de patente de uso presentada el 18 de mayo del 2016. Esta solicitud presenta todos los resultados reportados en este trabajo.

Un año posterior a la solicitud de la patente de uso frente al IMPI se realizó la solicitud internacional tipo PCT con la finalidad de cubrir otros países además de México.

PCT
PETITORIO

El abajo firmante pide que la presente solicitud internacional sea tramitada con arreglo al Tratado de Cooperación en materia de Patentes.

Para uso de la Oficina receptora internacional	
PCT/MX2017 / 800055	
Fecha de presentación internacional (18.05.2017)	18 MAY 2017
SOLICITUD INTERNACIONAL PCT R.O.MX	
Referencia al expediente del solicitante o del mandatarario o representante común (como máximo: 12 caracteres)	

Resumen N° I TÍTULO DE LA INVENCIÓN	
USO DEL PÉPTIDO GK-1 COMO UN AGENTE ANTI-TUMORAL Y/O ANTI-METASTÁSICO	
Resumen N° II SOLICITANTE <input type="checkbox"/> <i>Esta persona también es inventor</i>	
Nombre y dirección completa según el modelo, o si se trata de una persona jurídica, la designación oficial completa. De la dirección deben figurar el código postal y el nombre del país. El país de la dirección indicativa no debe considerarse el Estado de destino del solicitante si se trata de un agente de Estado de destino. UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO 9º Piso de la Torre de Rectoría Ciudad Universitaria S/N, C.P. 04510 Ciudad de México MX	
Autorización a utilizar el signo-4. Al menos una de las causas que legitiman dicho uso autoriza a la Oficina receptora, la Administración de Breventes Internacionales, la Oficina Internacional y la Administración de Breventes de Patentes Internacionales a utilizar la designación de signo-4 que se indica en este resumen para evitar confusiones relativas a la prioridad internacional, si dicha oficina no se lo permite. <input type="checkbox"/> como signo propio por vía electrónica seguida de las notificaciones en papel o <input type="checkbox"/> por correo electrónico exclusivamente (no se permite ningún otro medio en papel). Dirección de correo-e:	
País de nacionalidad o nombre del Estado: MX	Estado de domicilio o nombre del Estado: MX
Este signo es solo propio para: <input checked="" type="checkbox"/> todos los Estados designados <input type="checkbox"/> los Estados indicados en el resumen reglamentario	
Resumen N° III OTRAS SOLICITUANTES Y/O OFERTANTES EN VENTAJA	
<input checked="" type="checkbox"/> Los datos solicitados (no llenar) promueven la solicitud en una hoja de continuación.	
Resumen N° IV MANDATARIO O REPRESENTANTE COMÚN; O DIRECCIÓN PARA LA CORRESPONDENCIA	
La persona abajo identificada se nombra y es nombrada para actuar en nombre del/los solicitante/s ante las administraciones internacionales competentes como: <input checked="" type="checkbox"/> mandatario <input type="checkbox"/> representante común	
Nombre y dirección completa según el modelo, o si se trata de una persona jurídica, la designación oficial completa. De la dirección deben figurar el código postal y el nombre del país. FIGUEROA PÉREZ, Martha Edificio B, 3er Piso de las Oficinas Administrativas Exteriores Zona Cultural de Ciudad Universitaria, C.P. 04510 Ciudad de México MX	
Autorización a utilizar el signo-4. Al menos una de las causas que legitiman dicho uso autoriza a la Oficina receptora, la Administración de Breventes Internacionales, la Oficina Internacional y la Administración de Breventes de Patentes Internacionales a utilizar la designación de signo-4 que se indica en este resumen para evitar confusiones relativas a la prioridad internacional, si dicha oficina no se lo permite. <input checked="" type="checkbox"/> como signo propio por vía electrónica seguida de las notificaciones en papel o <input type="checkbox"/> por correo electrónico exclusivamente (no se permite ningún otro medio en papel). Dirección de correo-e: marthalp@unam.mx	
<input type="checkbox"/> Resumen para la correspondencia: indique esta causa cuando se lo nombra en la(s) hoja(s) numerada(s) según mandato o representante común y el signo-4 se utiliza en su lugar para evitar una designación especial a la que debe expresarse la correspondencia.	

Formulario PCT/IB2101 (Inventor) Versión 2015.1 Por los datos al llenado del formulario

Figura S6 Solicitud de patente internacional PCT: Uso del péptido GK-1 como un agente anti-tumoral y/o antimetastásico.

Solicitud de patente de uso presentada el 18 de mayo del 2017 Esta solicitud presenta todos los resultados reportados en este trabajo y tiene como objetivo proteger estos resultados en otros países además de México.

ANEXO 3:

Derivado de los resultados presentados en este trabajo se publicó el siguiente artículo que muestra principalmente que GK-1:

1. Incrementa la supervivencia de manera dosis dependiente.
2. Induce una reducción en la tasa de crecimiento tumoral acompañada de un incremento en la necrosis del tumor primario junto con el aumento en la concentración de IL-12.
3. Controla el establecimiento de tumores secundarios pulmonares, ya que el tratamiento con este péptido se asocia a un menor número de macrometástasis, lo cual se acompañó de la reducción en la concentración de FGF básico, CCL3 (MIP-1 α), GM-CSF, CCL2 (MCP-1) y CXCL9 (MIG), así como al incremento en la concentración de IL-6.



Contents lists available at ScienceDirect

Vaccine

journal homepage: www.elsevier.com/locate/vaccine

GK-1 peptide reduces tumor growth, decreases metastatic burden, and increases survival in a murine breast cancer model

D. Torres-García^a, A. Pérez-Torres^b, K. Manoutcharian^a, U. Orbe^b, R. Servín-Blanco^a, G. Fragoso^a, E. Sciotto^{a,*}

^aDepartamento de Inmunología, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, Av. Universidad 3000, 04510 Mexico City, Mexico

^bDepartamento de Biología Celular y Tisular, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México, Av. Universidad 3000, 04510 Mexico City, Mexico

ARTICLE INFO

Article history:

Received 7 June 2017

Received in revised form 10 August 2017

Accepted 19 August 2017

Available online xxxxx

Keywords:

Breast cancer

Metastasis

Immunotherapy

Primary tumor

GK-1

ABSTRACT

GK-1 is a parasite-derived peptide adjuvant of 18 amino acid-length that enhances T-cell function and increases survival in B16-F10 melanoma tumor-bearing mice. This study was designed to evaluate *in vivo* the antitumor efficacy of GK-1 on 4T1 mouse mammary carcinoma.

BALB/c mice with palpable primary tumors were weekly intravenously injected three times with saline solution or three different concentrations (10, 50, or 100 µg per mouse) of GK-1. GK-1 significantly increased lifespan ($p < 0.0001$) and reduced the primary tumor weight ($p = 0.014$) and volume ($p < 0.0001$) with respect to control mice, with no statistically significant differences among GK-1 doses. At the primary tumor, we found increased necrotic areas associated with a reduction in tumor mass, as well as an increase in the antitumor cytokine IL-12. Especially encouraging is the ability of GK-1 to reduce the number of lung metastasis ($p = 0.006$) disregarding the dose used. The participation of IL-6 in metastasis development and the decreased levels of CCL-2, CCL-3, TNF- α , CXCL-9, GM-CSF, and b-FGF found in lungs of GK-1-treated mice is discussed.

Our study supports the effectiveness of GK-1 as an antineoplastic agent that merits further exploration in combination with other therapeutic approaches in future translational studies.

© 2017 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Breast cancer (BC) is the most common form of cancer that affects women worldwide [1]. In the last decades, the mortality rate of BC patients has been declining due to improvements in early diagnosis and more effective treatments [2]. Unfortunately, some BC forms are resistant to conventional therapies, a fact that points to the need for more effective therapies.

Many efforts have been thriving in recent years to enhance tumor immunity and control cancer progression. However, the development of effective cancer immunotherapies has been hampered by a high epitope mutation rate derived from the antigenic variability of cancer cells, which promotes escape from immune surveillance, immune tolerance and immune escape, an immuno-

suppressive tumor microenvironment, and the generation of new tumor cells from cancer stem cells [3].

However, several preclinical and clinical studies have demonstrated the potential of immunotherapy to improve the clinical outcome for cancer patients through vaccination, adoptive T cell transfer, cytokine therapy, and other approaches. Some examples of these therapies are trastuzumab [4], lapatinib [5,6], and everolimus [7], whose targets are cancer stem cells. Nowadays, perhaps the most encouraging results have come from immunomodulatory therapies like IFN- α , IL-2, IL-15, IL-21, anti-CD25, anti-PD-1, and anti-CTLA-4, among others [8–11]. Unfortunately, these drugs may have side effects such as diarrhea, pruritus, constipation, fatigue, skin eruption dermatitis, and follicular eruption, [11–14] as well as an increased risk of autoimmune diseases like enterocolitis, lupus, nephritis, arthritis, uveitis, and hepatitis [15–20].

In spite of these considerations, the pivotal role of the host immune response in the natural history of breast cancer offers a target for new treatment approaches. In particular, the disrupted immunity promoted by BC itself offers a therapeutic opportunity to deal with the tumor by reversing those immunity conditions. Thus, the goal of this study was to improve the immunity against

Abbreviations: BC, breast cancer; aa, amino acid; SS, saline solution; H&E, hematoxylin and eosin; SD, standard deviation; MAM, metastasis-associated macrophages; MDSC, myeloid-derived suppressor cells.

* Corresponding author.

E-mail address: edda@unam.mx (E. Sciotto).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.vaccine.2017.08.060>

0264-410X/© 2017 Elsevier Ltd. All rights reserved.

the primary tumor and the metastatic disease in the hope of controlling its progression with less non-desirable effects. For this purpose, the immunomodulatory 18-amino acid (aa) peptide GK-1—derived from an antigen isolated from a cDNA library of *Taenia crassiceps* cysticerci [21]—was evaluated. The immunomodulatory properties of GK-1 have been consistently established *in vitro* and *in vivo* [22–24]. GK-1 promotes *in vitro* activation of antigen presenting cells (dendritic cells and macrophages) through the expression of CD80/86, MHC class II, and the secretion of IFN- γ , TNF- α , and CCL-2 (MCP-1) [24]. It also promotes CD8+ and CD4+ specific T cell proliferation [22]. Moreover, GK-1 has been observed to promote infiltration of mononuclear cells (lymphocytes and macrophages) to the lung parenchyma, which could be related to the resolution of pulmonary viral infections [23].

In this study, the *in vivo* effects of GK-1 on the primary tumor growth and its ability to metastasize to the lungs in the 4T1-murine model of BC was studied. The 4T1 cell line is highly tumorigenic and develops an invasive breast adenocarcinoma in the murine model [25]; it is a poorly immunogenic and a triple-negative BC [26]. When orthotopically transplanted into BALB/c mice, 4T1 cells develop tumors that share many of the characteristics of human BC, particularly its ability to spontaneously metastasize to the lungs, liver, brain, and bone, emulating a stage-IV human BC [25,27].

2. Material and methods

2.1. Mice

Four to six-weeks-old BALB/cAnN mice were purchased from Harlan Tekland (Madison, Wisconsin, USA). The animals were acclimated to the animal facility of the Instituto de Investigaciones Biomédicas at the Universidad Nacional Autónoma de México for a minimum of 1 week. Mice were separately housed in ventilated cages under a controlled light cycle (12 light/12 dark hours) at standard room temperature (22–24 °C) and were allowed access to a conventional diet and tap water *ad libitum*.

2.2. Ethics statement

Mice were sacrificed by cervical dislocation either on the day 39 post-implantation of 4T1 cells or when they presented any unusual behavior, such as restricted body mobility or eating and drinking difficulties. Mice were monitored at least three times a week for welfare and potential discomfort; therefore, no analgesics or anesthetics were applied. All applicable international, national, and institutional guidelines for the care and use of animals were followed. The protocol was approved by the Ethical Committee for Animal Research at the Instituto de Investigaciones Biomédicas (protocol ID 152).

2.3. GK-1

GK-1 was purchased as a synthetic 18-aa peptide (GYYYPSDPNTFYAPPYSA) from USV, LTD, Mumbai, Maharashtra, India (batch RD0001). The peptide was 95% pure as determined by high-pressure liquid chromatography using a reverse-phase C₁₈ column [22].

2.4. 4T1 cell line

4T1 cells, originally obtained from the American Type Culture Collection, Manassas, VA, were grown in RPMI-1640 medium (Gibco, Grand Island, NY, USA) supplemented with 10% heat-inactivated fetal bovine serum (PAA, Pasching, Upper Austria,

Austria), 1% penicillin, and streptomycin (Gibco, Grand Island, NY, USA) at 37 °C under a 95% relative humidity and 5% CO₂ atmosphere. Cultured cells were harvested by trypsinization (0.25% trypsin – 0.53 mM EDTA, Gibco, Grand Island, NY, USA) and washed three times with cold phosphate-buffered saline (PBS) before subcutaneous implantation.

2.5. Implantation of 4T1 cells

Animal studies were carried out as reported previously [28]. Briefly, viable 4T1 cells were counted by trypan blue dye exclusion; 1×10^3 cells were suspended in 100 μ l of sterile saline solution (SS) and injected subcutaneously in the right mammary fat pad. All animals were monitored at least every other day to evaluate tumor growth, which was calculated according to the following formula [29]:

$$\text{Volume (mm}^3\text{)} = \frac{\pi LW^2}{6}$$

where

L is the longest side

W is the shortest side

Once mice developed palpable tumors (1 mm \times 1 mm), approximately after 15–18 days post 4T1 cells implantation (day 0 of treatment), they were randomly assigned into four groups. A total of five independent experiments were conducted with 5–10 mice per group.

2.6. GK-1-treated and control mice

Mice in the GK-1 groups were treated weekly with 10, 50, or 100 μ g of GK-1 in SS (100 μ l) per mouse for 24 days (3 doses in total). Mice in the control group were intravenously administered in the same manner with 100 μ l SS. It is worthy to mention that a superior antitumor response (i.e. a lower tumor growth rate) of GK-1 was established in a previous pilot study when administered intravenously to mice with respect to the peritumoral and intranasal routes of administration (data not shown).

Thirty-nine days after cell implantation, primary tumor, lungs, brain, and liver were dissected, and any macrometastases that could be generated by haematogenous dissemination [25,27] were identified as shown in the [Supplementary Fig. 1](#). Primary tumors were weighed.

2.7. Histological analysis of primary tumors

Primary tumors from six mice per group were manually sectioned in the superficial (near to skin), central, and deep parts (near to the muscle). Samples were randomly selected from five independent experiments. Specimens were fixed in 10% neutral-buffered Zamboni solution overnight at 4 °C, paraffin-embedded, and processed to obtain two 4- μ m slices per section, which were stained with hematoxylin and eosin (H&E). Necrotic areas were evaluated based on the commonest nuclear changes indicative of cell death such as pyknosis, karyolysis, and karyorrhexis, attributable to the nonspecific breakdown of DNA increase [30]. Furthermore, the increase in cytoplasmic eosinophilia due to the loss of RNA, and protein denaturation were also evaluated as a histological manifestations of necrosis [30].

Necrotic sections were measured using a BX50 Olympus microscope equipped with a digital camera and using the Infinity Analyze software, v6.3.0. Briefly, total tissue areas were measured with a 10X objective, discarding all areas without tissue. Thereafter, necrotic areas were measured and subtracted from the total

tissue area to determinate the necrotic area percentage per slice. Ten fields per tissue section from each of the three zones in which primary tumors were divided, were analyzed. All measurements were performed after calibrating with a micrometer. The value obtained in micrometers was assigned to a measuring function of the microscopic field observed with a 10X objective. With this measure, the software automatically estimates perimeters and areas.

2.8. Tissue protein extracts

Primary tumors and lungs dissected from mice were immersed in liquid nitrogen and stored at -80°C until processed for protein extraction. For each 5 mg of tissue, 300 μl of lysis buffer containing protease inhibitors were added [31]; then, tissues were homogenized with an electric homogenizer (IKA, MODEL T 10 Basic S1, with dispersion tools S10N-5G, Cincinnati, Ohio, USA). Tissues were washed three times with 300 μl of lysis buffer; then they were incubated under constant agitation for 2 h at 4°C . Then, homogenates were spun for 20 min at 11,000g at 4°C . Finally, the supernatant (protein extract) was isolated and protein concentration was adjusted with the Lowry assay. Protein extracts were stored at -80°C until were used.

2.9. Measurement of cytokines, chemokines and growth factors

The concentration in pg/ml of b-FGF, IL-1 β , IL-10, IL-13, IL-6, IL-12, IL-17, CCL-3 (MIP-1 α), GM-CSF, CCL-2 (MCP-1), IL-5, VEGF, IL-1 α , IFN- γ , TNF- α , IL-2, CXCL-10 (IP-10), CXCL-9 (MIG), CXCL-1 (KC), and IL-4 were determined in tissue protein extract samples ($n = 6$ per group), which were randomly selected from 5 independent experiments. A commercial panel of 20 analytes (Magnetic Mouse Cytokine 20-Plex Panel: Basic) was used and molecules were quantified in the Luminex Magpix (Xponent Software) system.

2.10. Statistical analysis

Mean and standard deviation (SD) were calculated for each variable studied. Differences between groups were assessed using a non-parametric test (Mann-Whitney U). The survival graph was plotted using the Kaplan-Meier method, and it was evaluated with the log-rank test. For dead tissue evaluation in primary tumors, data were normalized using the ratio of necrotic/tumor cells live areas and identifying statistically significant differences between groups using a nonparametric test.

In all cases, $p < 0.05$ was considered statistically significant. All statistical analyses and graphics were performed using the GraphPad Prism software, version 6.00 for MAC (GraphPad Software, La Jolla, California, USA, www.graphpad.com), except for Heatmaps, which were performed in R Studio (Version 0.98.1091 - © 2009–2014 RStudio, Inc.) using the packages RColorBrewer and heatmap.plus.

3. Results

3.1. GK-1 increases the survival of 4T1 tumor-bearing mice

The survival of 4T1 tumor-bearing mice treated with GK-1 was compared to saline-treated animals. GK-1 significantly improved survival with respect to non-treated mice ($p < 0.0001$, log rank-test). Mice treated with 10 μg (lowest dose) of GK-1 died at days 24–42 after treatment, at days 20–52 when treated with 50 μg (intermediate dose), and at days 26–45 when treated with 100 μg (highest dose) per mice. Non-treated control mice died at

days 17–42 post-treatment (Fig. 1). The effect of GK-1 (10 μg) on mouse survival was studied in two independent experiments, with similar results to those herein reported (data not shown).

3.2. GK-1 reduces tumor growth rate

Fig. 2 shows the effect of GK-1 treatment on tumor size. GK-1-treated mice exhibited significantly lower tumor weight ($p = 0.014$) and volume ($p < 0.0001$) 24 days after treatment (A). The growth of primary tumors in non-treated and treated mice over a 24-day period is shown in Fig. 2C. As shown, a significantly higher slope was observed in non-treated animals with respect to GK-1-treated mice ($p < 0.0005$), with no significant differences among doses (C).

3.3. GK-1 decreases lung macrometastases

A significant difference in the number of lung macrometastases was observed (Fig. 2A-B and Supplementary Fig. 1) between GK-1-treated and non-treated mice ($p = 0.006$). Fig. 2B illustrates representative lungs from mice that received GK-1 and a representative lung from a control mouse. GK-1 treatment induced a remarkable reduction from 16 to 90% in the number of macrometastases in the lungs, with no significant differences among doses. No macrometastases were detected in brain or liver, neither in treated nor control mice (data not shown).

Considering that the reduction in the tumor progression was observed independently from the GK-1 doses employed, the microscopic analysis of the tumors and the evaluation of soluble factors in the primary tumors and the lungs were performed only in mice treated with 10 μg of GK-1.

3.4. Increased necrotic areas in GK-1-treated mice

Histopathological studies revealed increased necrotic cell areas at the superficial layer of the primary tumors in GK-1-treated mice (Fig. 3A, $p = 0.001$). In addition, clear cytological differences between living larger cancer cells (with a well-defined basophilic nucleus with up to two nucleoli surrounded by an eosinophilic cytoplasm) with respect to necrotic cells (smaller cells that lost the nucleus and cytoplasm staining differences due to an increased diffuse eosinophilia) were observed after H&E staining (Fig. 3B).

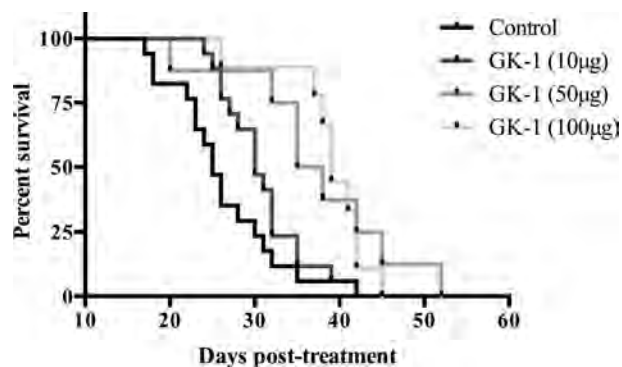


Fig. 1. Weekly administration of GK-1 increases the lifespan of BALB/cAnN mice. Kaplan-Meier survival curves were obtained for mice treated with 10 μg (dark gray, $n = 17$), 50 μg (gray, $n = 8$), and 100 μg (light gray, $n = 9$) of GK-1, or non-treated mice (black, $n = 17$). All concentrations of GK-1 significantly increased the lifespan of 4T1 tumor-bearing mice ($p < 0.0001$, log-rank test).

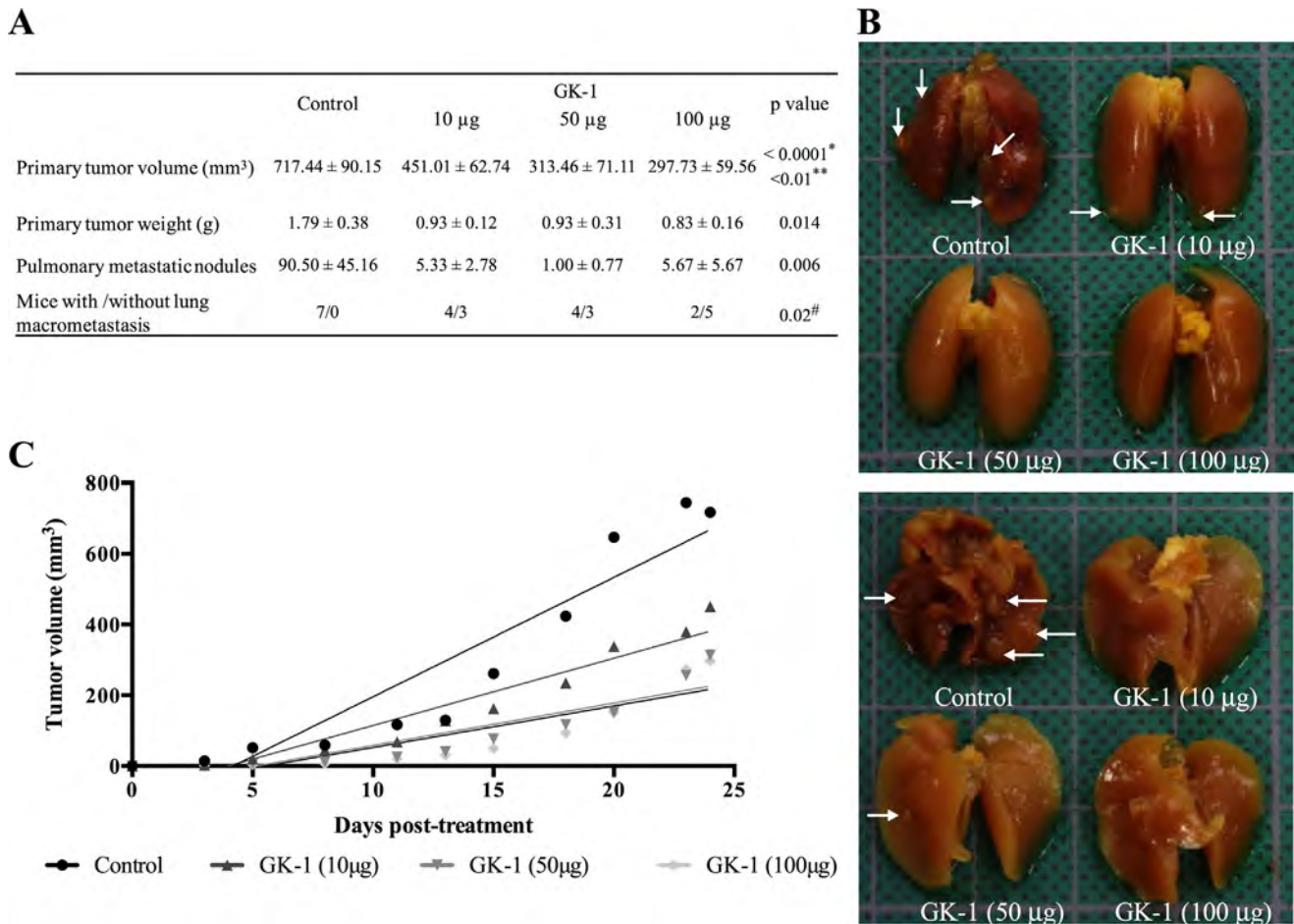


Fig. 2. GK-1 slows primary tumor growth and lung metastasis development. Tumor volume, and weight, as well as metastatic nodules were determined for each mouse as described in the Material and methods section. Mean \pm SD of all measures in mice treated with GK-1 (10, 50, and 100 μg) and non-treated are reported (A). * indicates statistically significant differences among non-treated mice, GK-1 (10 μg), GK-1 (50 μg), and GK-1 (100 μg)-treated mice. ** indicates the p -value of the differences between GK-1 (10 μg) and GK-1 (50 μg)-treated mice, as well as between GK-1 (10 μg) and GK-1 (100 μg)-treated mice. # indicates statistically significant differences between non-treated mice and GK-1 (100 μg)-treated mice. Macrometastases on the liver, brain, and lung surface per mouse were counted both in the animals treated with GK-1 (10, 50, and 100 μg) and in non-treated mice. No metastatic foci were observed in brain and liver. Representative images taken from the posterior and anterior aspects of lungs of non-treated mice and mice treated with 10 μg , 50 μg , and 100 μg of GK-1 (B). The metastasis foci are observed on the lung surface (white arrows). The number of lung metastatic nodules was significantly reduced in 4T1 tumor-bearing mice treated with all the concentrations of GK-1 compared with the control group ($p = 0.006$). Tumor volume developed throughout the experiment in mice treated with 10 μg of GK-1 (dark gray), 50 μg of GK-1 (gray), 100 μg of GK-1 (light gray), and non-treated (black) (C). Data correspond to five independent experiments. For tumor weight and tumor volume, the data were pooled. Values from lung macrometastases were collected from a random sample of five independent experiments (7 mice treated with GK-1 (10, 50, and 100 μg) and 7 non-treated mice).

3.5. GK-1 increases the level of the anti-tumor IL-12 cytokine in the primary tumor and changed the cytokine, chemokine, and growth factor microenvironment in lungs

The concentration of cytokines, chemokines, and growth factors was estimated in tissue extracts from the primary tumor and lungs. A non-supervising hierarchical clustering analysis is illustrated in the heatmap shown in Fig. 4. GK-1-treated and non-treated mice were clustered into separate groups, supporting differences among the soluble factors measured.

A significantly increased concentration of IL-12 in GK-1-treated with respect to non-treated mice was found at the primary tumor. An increased concentration of IL-6, accompanied by a diminished concentration of the angiogenic growth factor b-FGF and GM-CSF were observed in the lungs of GK-1-treated mice. GK-1 also reduced the concentration of the CCL-3 (MIP-1 α), CCL-2 (MCP-1), and CXCL-9 (MIG) chemokines, and TNF- α in the lungs of treated mice (Fig. 5).

4. Discussion

Clear evidence of the effectiveness of GK-1 to interrupt the BC progression was obtained in this study. GK-1 treatment significantly increased the lifespan of 4T1 tumor-bearing mice in a dose-dependent manner. The highest effect was obtained when 50 μg of GK-1 was employed (from 42 to 52 days, Fig. 1), which represents an increase of 23.8% in survival. It is worth to mention that all mice would eventually die due to metastases, as demonstrated in previous studies [28].

Along with the significant increase in the survival rate, mice injected intravenously with GK-1 exhibited a decrease both in tumor growth rate (volume) (Fig. 2C) and in tumor weight (Fig. 2A) compared to controls. A similar effect was reported in melanoma, in which a significant delay in tumor growth from day 3 to 12 was observed in GK-1-treated mice ($p < 0.05$) [32]. The larger size of cell death areas found in the primary tumor by histological examination could be related to the decrease in tumor

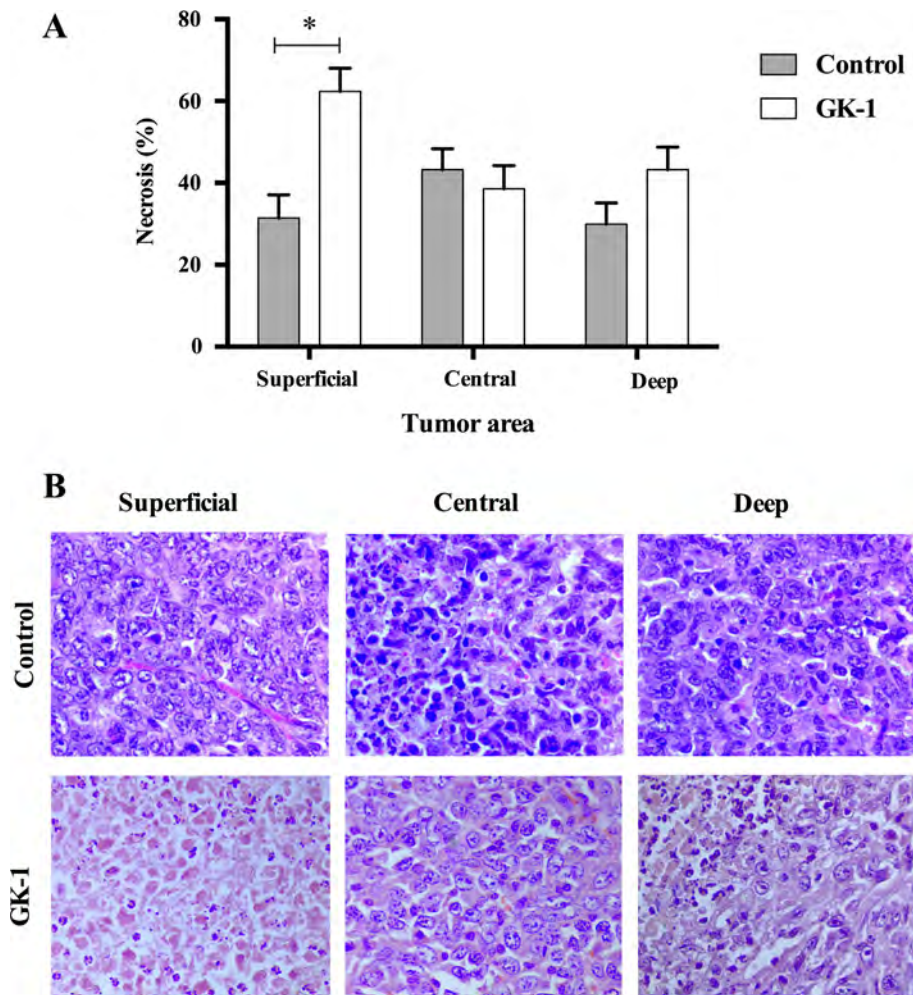


Fig. 3. GK-1 treatment increases necrotic areas in the primary tumor. The total percentage of necrosis areas in the complete primary tumor was increased in GK-1-treated mice (lowest doses; 10 μ g of GK-1) with respect to non-treated mice; necrosis percentage was significantly increased at the superficial layer of primary tumors in GK-1-treated mice (* indicates the statistically significant difference among non-treated mice and GK-1-treated mice; $p = 0.001$) (A). Representative histopathological findings at the superficial, central, and deep layers of primary tumors in non-treated mice (upper panels) and GK-1-treated mice (bottom panels) (B). Living tumor cells were clearly identified by the presence of basophilic nuclei with up to two nucleoli surrounded by a well-defined eosinophilic cytoplasm (upper and bottom central panels), whereas necrotic cells areas were characterized by the presence of apoptotic bodies, pyknosis (smaller and intensely basophilic nuclei), karyorrhexis (pyknotic nuclei are fragmented into several particles), and karyolysis (a complete breakdown or degeneration of nuclei). These nuclear changes were accompanied by a loss of definition of cytoplasm, which appeared as a compact homogeneous and eosinophilic mass, and cell margins are indistinct. Once these nuclear and cytoplasmic alterations are complete, the dead cell is an anucleate and eosinophilic homogeneous mass (upper central and bottom panels). Note that non-treated mice contain more living tumor cells and fewer necrotic areas than GK-1-treated mice, which showed a more abrupt transition to the increased necrosis areas. H&E stain, bar = 20 μ m. Values were collected from a random sample of five independent experiments (6 mice treated with GK-1 and 6 non-treated mice).

size observed in GK-1-treated mice. Indeed, a significantly higher percentage of dead cells was found in the superficial layer, close to the skin, of the primary tumor in GK-1-treated mice with respect to non-treated animals (Fig. 3), as previously reported in B16F10 tumor-bearing mice treated with GK-1 ($p < 0.05$) [32].

Like in human BC, the most common sites for the occurrence of metastasis in the 4T1 mammary carcinoma model are lungs, liver, bone, and brain [25,27]. Thus, the occurrence of macrometastases in the lung was evaluated. An encouraging significant decrease in the number of metastatic foci was found in GK-1-treated mice with respect to controls ($p = 0.006$, Fig. 2A). It is known that the development of metastasis depends on changes in the tumor microenvironment, which induces the egress of cancer cells by detachment from the primary tumor, allowing them to invade the stroma and break the basement membrane [33]. In this regard, it has been reported that approximately 1×10^6 cancer cells can egress from the tumor to the circulation per gram of tumor per day [34]. Considering this, the anti-metastatic effect of GK-1 may be related

to the increased tissue death observed in primary tumors from treated mice (Fig. 3). Moreover, the increased concentration of the antitumor IL-12 cytokine found in primary tumors may increase tumor cell damage, limiting the number of cancer cells coming out from the tumor. IL-12 by itself has some antitumor activity, mediated by its ability to elicit anti-angiogenic activity [35]. It has been suggested that the IL-12 anti-angiogenic activity requires the activation of IFN- γ /IP-10 (CXCL-10) axis [36,37]. Nevertheless, since no significant changes were found in these parameters, it is feasible that other cells such as CD8+T cells and NK cells may underlie the increased damage observed in the primary tumor. Additional experiments are required to further explore the mechanism underlying this effect.

It is worthy to consider that the tumors are composed of numerous cell lineages, whose tumorigenic performance depends on the microenvironment. The cell-interaction is driven mainly by cytokines, chemokines, and growth factors, which can promote or delay the tumor growth and metastasis. The reduced

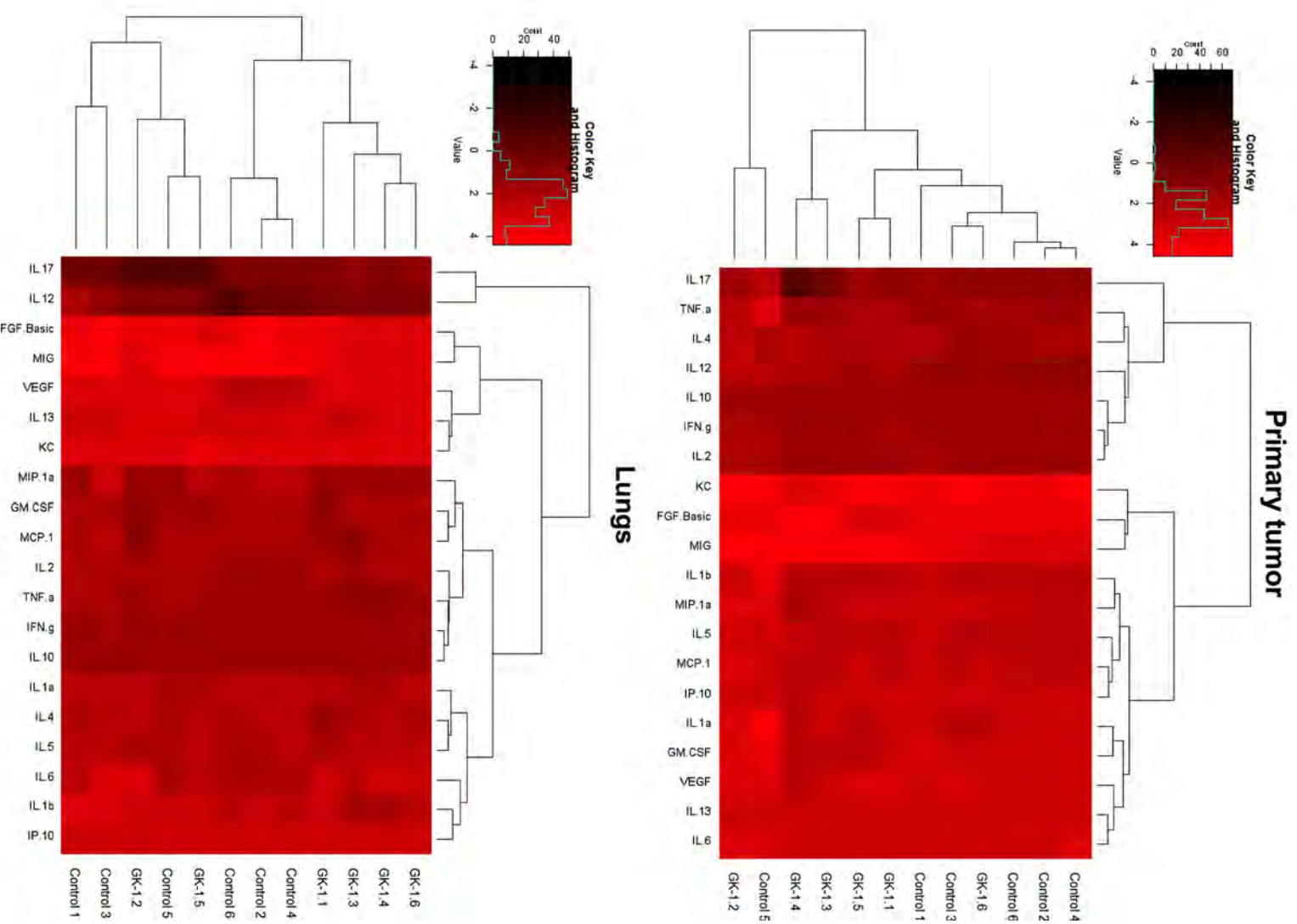


Fig. 4. Cytokine profile in murine mammary carcinoma 4T1: 4T1 tumor-bearing mice have distinct and overlapping cytokine profiles. The heatmaps represent the observed concentrations of 20 soluble factors, quantified in lungs and primary tumors, through the Luminex Magpix (Xponent Software) system using the Magnetic Mouse Cytokine 20-Plex Panel: Basic. Concentrations of individual soluble factors are represented by shades of red to black in the heatmaps, with highest values in black to the lowest in light red. Each heatmap and dendrogram depict some separation of 4T1 tumor-bearing mice cytokine response. The dendrograms are made based on unsupervised hierarchical clustering analyses; those clusterings suggested separation of cytokine response patterns based on the cluster dendrograms and visual inspection of the heatmaps. GK-1.1 to GK-1.6 represents 6 mice treated with 10 µg GK-1. Control 1 to Control 6 represents the non-treated mice. Values were collected from a random sample of five independent experiments (6 mice treated with GK-1 and 6 non-treated mice). (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

concentration of b-FGF, CCL-3 (MIP-1 α), GM-CSF, CCL-2 (MCP-1), TNF- α , and CXCL-9 (MIG), and the increase of IL-6 (Fig. 5) accompanied the reduction in the number of macrometastases in the lungs. With regard to IL-6, it has been described as a pro-angiogenic factor that promotes the expression of b-FGF and VEGF by tumor cells, inducing tumor growth and metastasis due to rapid

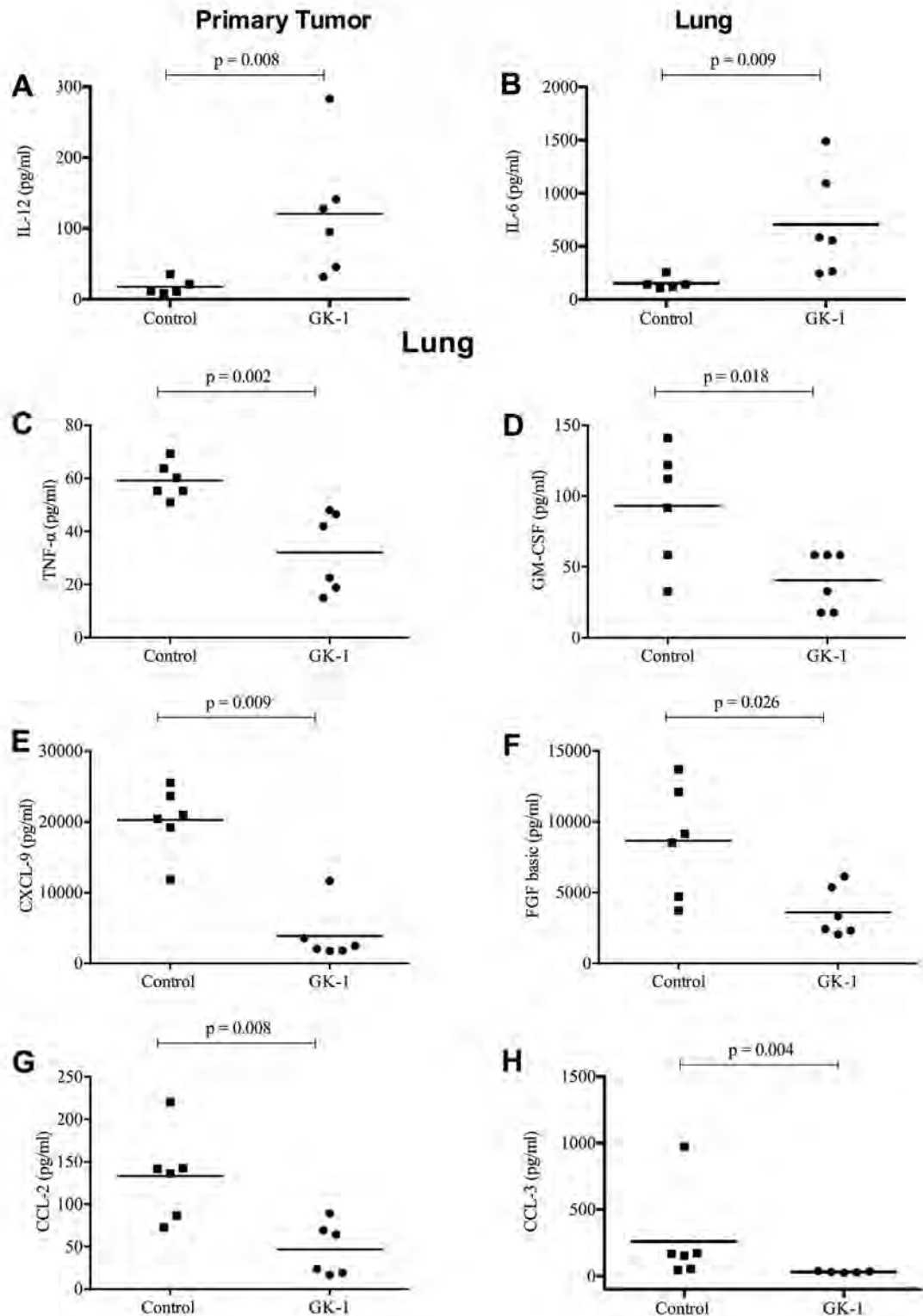


Fig. 5. GK-1 induces changes in the tumor microenvironment: Cytokine profile. Individual values of mice GK-1-treated ($n = 6$; $10 \mu\text{g}$ of GK-1) and non-treated ($n = 6$) are presented in the dot plots; the line represents the mean of each group (pg/ml). The data correspond to statistically significant differences found in primary tumors (A) and lungs samples (B-H) between GK-1-treated mice (lowest doses; $10 \mu\text{g}$ of GK-1) and non-treated mice. Values were collected from a random sample of five independent experiments (6 mice treated with GK-1 and 6 non-treated mice).

vascularization [38]. Nevertheless, we found a decrease of b-FGF concentration in GK-1-treated mice and no statically significant differences in VEGF concentration among the study groups. While the increased concentration of IL-6 in lung could be a driver of malignancy, this metastatic environment was insufficient to pro-

note the establishment of lung macrometastases and to induce the increase of VEGF, b-FGF, or chemokines that could recruit metastasis-associated macrophages (MAM), and myeloid-derived suppressor cells (MDSC) such as CCL-2, CCL-3, and GM-CSF, respectively [39–41]. Moreover, a decreased concentration of those

chemokines was observed in the lungs of GK-1-treated mice. Our results suggest that the establishment of inflammatory conditions at distant organ sites previous to the arrival of metastatic tumor cell compromises the development of metastatic niches, which in turns might reduce tumor cell survival and proliferation. On the other hand, perhaps the number of tumor cells arriving at the lung could dictate the IL-6 response either as a proinflammatory or anti-inflammatory cytokine. Concerning this, the IL-6 anti-inflammatory response has been associated with a decrease of IL-1 β , whose concentration was decreased in the lungs of GK-1-treated mice (428.40 ± 135.80 pg/ml) compared to non-treated mice (850.10 ± 241.40 pg/ml, $p = 0.190$). Moreover, in preclinical animal cancer models neutralizing antibodies to the IL-1 receptor and IL-1 β have been shown efficacious in treating metastasis [42].

As mentioned before, the reduction in the number of macrometastases in the lungs is accompanied by reduced levels of b-FGF, CCL-3 (MIP-1 α), GM-CSF, CCL-2 (MCP-1), TNF- α , and CXCL-9 (MIG) (Fig. 5). It is feasible that this particular profile results in an attenuation of angiogenesis and downregulating signals to induce MAM infiltrates into the lungs. With regard to angiogenesis, a decrease in b-FGF concentration in GK-1-treated mice with respect to non-treated mice suggests an attenuated activity on the development of new blood vessels, cellular proliferation, and tumor cell survival, as well as a disruption in the recruitment of NK cells and their adhesion to blood vessels [43,44].

Another point that merits comment is the absence of undesirable side effects in GK-1-treated mice. These results add to the experiences in previous experiments using GK-1 as an anti-cysticercosis vaccine and as an adjuvant [22–24]. Besides, preliminary data of ongoing preclinical studies suggest that GK-1 is a safe immunogen in a large range of doses (unpublished data).

With respect to the possible action mechanisms of GK-1, based on available data we propose that this peptide can affect tumor growth and metastasis by changing tumor microenvironment. GK-1 appears to release breaks on the immune system from the tumor-associated suppressive microenvironment and thereby allowing immune cells to become activated. Although more studies focusing on the anticancer effect of GK-1 are required, this research provides new evidence of the possible clinical use of GK-1 beyond its adjuvant effect.

5. Conclusion

Considering the discussion above, our results support the effectiveness of GK-1 against an invasive breast cancer in the murine model induced by 4T1 cell line, reducing metastasis to lungs, probably through the involvement of tumor microenvironment associated mechanisms leading to an increase in IL-12 and IL-6 concentrations along with a decrease in b-FGF, CCL-3 (MIP-1 α), GM-CSF, CCL-2 (MCP-1), TNF- α , and CXCL-9 (MIG) concentration in lungs. Altogether, these results suggest that GK-1 could be an immunomodulator agent, useful in the treatment of BC.

Acknowledgments

The authors acknowledge the financial assistance of CONACYT to the doctoral student Diana Torres-García from Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), who received the fellowship 245638. This manuscript is part of the doctoral thesis of the student from the Instituto de Investigaciones Biomédicas at the Universidad Nacional Autónoma de México.

We are grateful to M.Sc. Jacquelynne Cervantes for providing the GK-1 peptide. Likewise, we want to express our gratitude to

MSc. Evelyn Pulido, BSc. Martha Carrasco, BSc. Fernando Martínez, and BSc. Verónica Rodríguez for their contribution to this work.

Funding

This research was funded by DGAPA (Dirección General Asuntos del Personal Académico) (PAPIIT (Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica) IG200414) and FINNOVA (Fondo Sectorial de Innovación Secretaría de Economía-CONACYT (Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología)) (224525).

Appendix A. Supplementary material

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at <http://dx.doi.org/10.1016/j.vaccine.2017.08.060>.

References

- [1] Stewart BW, Wild CP. World Health Organization. World Cancer Report 2014. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer; 2014. 632 p.
- [2] American Cancer Society [Internet]. Georgia: Breast Cancer Facts & Figures 2015–2016; 2015 [cited 2017 Feb 3]. Available from: <<https://www.cancer.org/treatment/treatments-and-side-effects/treatment-types/immunotherapy/what-is-immunotherapy.html>>.
- [3] Natrajan R, Sailem H, Mardakheh FK, Arias Garcia M, Tape CJ, Dowsett M, et al. Microenvironmental heterogeneity parallels breast cancer progression: a histology-genomic integration analysis. *PLoS Med* 2016;13(2):e1001961.
- [4] Diessner J, Bruttel V, Stein RG, Horn E, Hausler SF, Dietl J, et al. Targeting of preexisting and induced breast cancer stem cells with trastuzumab and trastuzumab emtansine (T-DM1). *Cell Death Dis* 2014;27(5):e1149.
- [5] Blackwell KL, Burstein HJ, Stormiolo AM, Rugo H, Sledge G, Koehler M, et al. Randomized study of Lapatinib alone or in combination with trastuzumab in women with ErbB2-positive, trastuzumab-refractory metastatic breast cancer. *J Clin Oncol* 2010;28(7):1124–30.
- [6] Farnie G, Johnson RL, Williams KE, Clarke RB, Bundred NJ. Lapatinib inhibits stem/progenitor proliferation in preclinical in vitro models of ductal carcinoma in situ (DCIS). *Cell Cycle* 2014;13(3):418–25.
- [7] Zhu Y, Zhang X, Liu Y, Zhang S, Liu J, Ma Y, et al. Antitumor effect of the mTOR inhibitor everolimus in combination with trastuzumab on human breast cancer stem cells in vitro and in vivo. *Tumour Biol* 2012;33(5):1349–62.
- [8] American Cancer Society [Internet]. Georgia: Cancer Immunotherapy; 2017 [cited 2017 Jan 10]. Available from: <<https://www.cancer.org/treatment/treatments-and-side-effects/treatment-types/immunotherapy/what-is-immunotherapy.html>>.
- [9] Roberti MP, Rocca YS, Amat M, Pampena MB, Loza J, Colo F, et al. IL-2- or IL-15-activated NK cells enhance Cetuximab-mediated activity against triple-negative breast cancer in xenografts and in breast cancer patients. *Breast Cancer Res Treat* 2012;136(3):659–71.
- [10] Rech AJ, Vonderheide RH. Clinical use of anti-CD25 antibody daclizumab to enhance immune responses to tumor antigen vaccination by targeting regulatory T cells. *Ann N Y Acad Sci* 2009;1174:99–106.
- [11] Vonderheide RH, LoRusso PM, Khalil M, Gartner EM, Khaira D, Soulieres D, et al. Tremelimumab in combination with exemestane in patients with advanced breast cancer and treatment-associated modulation of inducible costimulator expression on patient T cells. *Clin Cancer Res* 2010;16(13):3485–94.
- [12] Lin R, Yellin MJ, Lowy I, Safferman A, Chin K, Ibrahim R. An analysis of the effectiveness of specific guidelines for the management of ipilimumab-mediated diarrhea/colitis: prevention of gastrointestinal perforation and/or colectomy. *J Clin Oncol* 2008;26:9063.
- [13] Jaber SH, Cowen EW, Haworth LR, Booher SL, Berman DM, Rosenberg SA, et al. Skin reactions in a subset of patients with stage IV melanoma treated with anti-cytotoxic T-lymphocyte antigen 4 monoclonal antibody as a single agent. *Arch Dermatol* 2006;142:166–72.
- [14] Lim JL, Dahiya M, Burgin S. Intertriginous and follicular eruption to anticytotoxic T-lymphocyte antigen 4 monoclonal antibody. *J Am Acad Dermatol* 2008;59(2 Suppl. 1):S60–1.
- [15] Maker AV, Phan GQ, Attia P, Yang JC, Sherry RM, Topalian SL, et al. Tumor regression and autoimmunity in patients treated with cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 blockade and interleukin 2: a phase I/II study. *Ann Surg Oncol* 2005;12(12):1005–16.
- [16] Gogas H, Ioannovich J, Dafni U, Stavropoulou-Giokas C, Frangia K, Tsoutsos D, et al. Prognostic significance of autoimmunity during treatment of melanoma with interferon. *N Engl J Med* 2006;354(7):709–18.
- [17] Beck KE, Blansfield JA, Tran KQ, Feldman AL, Hughes MS, Royal RE, et al. Enterocolitis in patients with cancer after antibody blockade of cytotoxic T-lymphocyte-associated antigen 4. *J Clin Oncol* 2006;24(15):2283–9.
- [18] Fadel F, El Karoui K, Knebelmann B. Anti-CTLA4 antibody-induced lupus nephritis. *N Engl J Med* 2009;361(2):211–2.

- [19] Yang JC, Hughes M, Kammula U, Royal R, Sherry RM, Topalian SL, et al. Ipilimumab (anti-CTLA4 antibody) causes regression of metastatic renal cell cancer associated with enteritis and hypophysitis. *J Immunother* 2007;30(8):825–30.
- [20] Attia P, Phan GQ, Maker AV, Robinson MR, Quezado MM, Yang JC, et al. Autoimmunity correlates with tumor regression in patients with metastatic melanoma treated with anti-cytotoxic T-lymphocyte antigen-4. *J Clin Oncol* 2005;23(25):6043–53.
- [21] Gevorkian G, Manoutcharian K, Larralde C, Hernandez M, Almagro JC, Viveros M, et al. Immunodominant synthetic peptides of *Taenia crassiceps* in murine and human cysticercosis. *Immunol Lett* 1996;49(3):185–9.
- [22] Toledo A, Larralde C, Fragoso G, Gevorkian G, Manoutcharian K, Hernandez M, et al. Towards a *Taenia solium* cysticercosis vaccine: an epitope shared by *Taenia crassiceps* and *Taenia solium* protects mice against experimental cysticercosis. *Infect Immun* 1999;67(5):2522–30.
- [23] Segura-Velazquez R, Perez-Torres A, Rosas G, Toledo A, Restelli M, Acosta E, et al. A novel synthetic adjuvant effectively enhances the immunogenicity of the influenza vaccine. *Vaccine* 2006;24(8):1073–80.
- [24] Segura-Velazquez R, Fragoso G, Sciutto E, Sarukhan A. Towards identification of the mechanisms of action of parasite-derived peptide GK1 on the immunogenicity of an influenza vaccine. *Clin Vaccine Immunol* 2009;16(9):1338–43.
- [25] Aslakson CJ, Miller FR. Selective events in the metastatic process defined by analysis of the sequential dissemination of subpopulations of a mouse mammary tumor. *Cancer Res* 1992;52(6):1399–405.
- [26] Pulaski BA, Terman DS, Khan S, Muller E, Ostrand-Rosenberg S. Cooperativity of *Staphylococcus aureus* enterotoxin B superantigen, major histocompatibility complex class II, and CD80 for immunotherapy of advanced spontaneous metastases in a clinically relevant postoperative mouse breast cancer model. *Cancer Res* 2000;60(10):2710–5.
- [27] Mi Z, Guo H, Wai PY, Gao C, Wei J, Kuo PC. Differential osteopontin expression in phenotypically distinct subclones of murine breast cancer cells mediates metastatic behavior. *J Biol Chem* 2004;279(45):46659–67.
- [28] Pulaski BA, Ostrand-Rosenberg S. Mouse 4T1 breast tumor model. *Curr Protoc Immunol* 2001; Unit 20.2 [Chapter 20].
- [29] Carlsson G, Gullberg B, Hafstrom L. Estimation of liver tumor volume using different formulas – an experimental study in rats. *J Cancer Res Clin Oncol* 1983;105(1):20–3.
- [30] Kumar V, Abbas AK, Fausto N, Robbins SL, Cotran RS. Robbins and Cotran pathologic basis of disease. 8th ed. Philadelphia: Elsevier Saunders; 2005. p. 12–8.
- [31] Shen K, Sun J, Cao X, Zhou D, Li J. Comparison of different buffers for protein extraction from formalin-fixed and paraffin-embedded tissue specimens. *PLoS One* 2015;10(11):e0142650.
- [32] Perez-Torres A, Vera-Aguilera J, Hernaiz-Leonardo JC, Moreno-Aguilera E, Monteverde-Suarez D, Vera-Aguilera C, et al. The synthetic parasite-derived peptide GK1 increases survival in a preclinical mouse melanoma model. *Cancer Biother Radiopharm* 2013;28(9):682–90.
- [33] Fidler IJ. Critical factors in the biology of human cancer metastasis: twenty-eighth G.H.A. Clowes memorial award lecture. *Cancer Res* 1990;50(19):6130–8.
- [34] Butler TP, Gullino PM. Quantitation of cell shedding into efferent blood of mammary adenocarcinoma. *Cancer Res* 1975;35(3):512–6.
- [35] Yang SX, Wei WS, Ouyan QW, Jiang QH, Zou YF, Qu W, et al. Interleukin-12 activated CD8+ T cells induces apoptosis in breast cancer cells and reduces tumor growth. *Biomed Pharmacother* 2016;84:1466–71.
- [36] Shi X, Cao S, Mitsuhashi M, Xiang Z, Ma X. Genome-wide analysis of molecular changes in IL-12-induced control of mammary carcinoma via IFN-gamma-independent mechanisms. *J Immunol* 2004;172(7):4111–22.
- [37] Siddiqui F, Ehrhart EJ, Charles B, Chubb L, Li CY, Zhang X, et al. Anti-angiogenic effects of interleukin-12 delivered by a novel hyperthermia induced gene construct. *Int J Hyperthermia* 2006;22(7):587–606.
- [38] Wei LH, Kuo ML, Chen CA, Chou CH, Lai KB, Lee CN, et al. Interleukin-6 promotes cervical tumor growth by VEGF-dependent angiogenesis via a STAT3 pathway. *Oncogene* 2003;22(10):1517–27.
- [39] Qian BZ, Li J, Zhang H, Kitamura T, Zhang J, Campion LR, et al. CCL-2 recruits inflammatory monocytes to facilitate breast-tumour metastasis. *Nature* 2011;475(7355):222–5.
- [40] Kitamura T, Qian BZ, Soong D, Cassetta L, Noy R, Sugano G, et al. CCL-2-induced chemokine cascade promotes breast cancer metastasis by enhancing retention of metastasis-associated macrophages. *J Exp Med* 2015;212(7):1043–59.
- [41] Gargett T, Christo SN, Hercus TR, Abbas N, Singhal N, Lopez AF, et al. GM-CSF signalling blockade and chemotherapeutic agents act in concert to inhibit the function of myeloid-derived suppressor cells in vitro. *Clin Transl Immunol* 2016;5(12):e119.
- [42] Dinarello CA. Why not treat human cancer with interleukin-1 blockade? *Cancer Metastasis Rev* 2010;29(2):317–29.
- [43] Turner N, Grose R. Fibroblast growth factor signalling: from development to cancer. *Nat Rev Cancer* 2010;10(2):116–29.
- [44] Melder RJ, Koenig GC, Witwer BP, Safabakhsh N, Munn LL, Jain RK. During angiogenesis, vascular endothelial growth factor and basic fibroblast growth factor regulate natural killer cell adhesion to tumor endothelium. *Nat Med* 1996;2(9):992–7.