



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA

DISEÑO Y EVALUACIÓN DE PARTÍCULAS TIPO PARVOVIRUS B19
QUIMÉRICAS MULTIEPITÓPICAS CONTRA CÁNCER DE MAMA TRIPLE
NEGATIVO EN UN MODELO MURINO

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

DOCTOR EN CIENCIAS

PRESENTA:

JIMÉNEZ CHÁVEZ ÁNGEL DE JESÚS

DIRECTORA DE TESIS

DRA. LETICIA MORENO FIERROS

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA

COMITÉ TUTOR

DR. KAREN MANOUTCHARIAN AIRAPETIAN

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS

DR. JUAN PABLO REYES GRAJEDA

INSTITUTO NACIONAL DE MEDICINA GENÓMICA

LOS REYES IZTACALA, ESTADO DE MÉXICO, SEPTIEMBRE DE 2020



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.

“Sólo aquellos que se arriesgan a ir muy lejos,
pueden llegar a saber lo lejos que pueden ir”

T.S. Elliot

Agradecimientos profesionales

Quiero agradecer profundamente a la Dra. Leticia Moreno Fierros por permitir desarrollarme profesionalmente en su laboratorio, por todo el apoyo y los consejos, espero seguir aprendiendo de usted ahora como un colega y colaborador.

Igualmente quiero agradecer a los miembros de mi comité tutor, los doctores Karen Manoutcharian Airapetian y Juan Pablo Reyes Grajeda por todos los consejos y enseñanzas que ayudaron a mejorar mi proyecto.

A los doctores Luis Enrique Arias Romero, María Gloria Soldevila Melgarejo, Rocío Ángeles García Becerra y Paula Licono Limón les agradezco el tiempo invertido para revisar y mejorar con sus comentarios esta tesis.

Agradezco al programa de doctorado en ciencias biomédicas, por brindarme apoyos para asistir a congresos nacionales e internacionales, lo que permitió enriquecer mi trabajo por medio de la discusión con expertos en el tema.

A CONACYT por la beca que permitió mantenerme durante el curso de mi doctorado, lo que facilitó enfocarme en el mismo, así como por los recursos brindados en el proyecto CB283319, que permitieron la adquisición de materiales necesarios para la realización de este proyecto.

Al Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT) 1N2233319 por los recursos brindados para realizar esta investigación.

Agradecimientos personales

A mi esposa Angelica, por todo tu apoyo y motivación, gracias por permanecer a mi lado durante todo este camino, gracias por darle felicidad y amor a mi vida.

A mis padres por toda su confianza y motivación, por enseñarme que nada es impedimento para alcanzar mis metas.

A mis hijos Antonio y Diego, por darle alegría a mi vida, sin la cual nada tiene sentido.

“Soy de los que piensan que la ciencia tiene una gran belleza. Un científico en su laboratorio no es solo un técnico, es también un niño ante un fenómeno natural, que lo impresiona como un cuento de hadas.”

Marie Curie

1. Resumen

El cáncer de mama triple negativo es un problema de salud importante que carece de blancos moleculares para la terapia. Los neoepítomos y antígenos asociados a tumor representan opciones viables para inducir respuestas inmunitarias antitumorales, pero tienen limitaciones, como la baja inmunogenicidad y la inducción de tolerancia, lo cual puede ser solucionado con sistemas de entrega adecuados. Las partículas tipo virus (VLPs) del parvovirus B19 pueden usarse para entregar antígenos para estimular la inmunidad celular y humoral. En este trabajo diseñamos y evaluamos el efecto profiláctico y terapéutico de VLPs formadas por la proteína VP2 B19, con múltiples neoepítomos o antígenos asociados a tumor, en un modelo de cáncer de mama murino inducido por la línea celular 4T1. Ratones Balb/c hembras recibieron tres inmunizaciones durante tres semanas antes de la inducción de los tumores (profiláctico) o cuatro inmunizaciones terapéuticas posteriores a la inducción de los tumores con VLPs cargadas con neoepítomos (VLPs-neo) o cargadas con antígenos asociados a tumor (VLPs-TAAs), VLPs tipo silvestre (VLPs-WT), PBS como vehículo o VLPs más adyuvante protoxina Cry1Ac, intraperitoneal y peri tumoralmente. Se evaluó el establecimiento de los tumores, el crecimiento tumoral, la macrometástasis pulmonar, las respuestas inmunes específicas, además de los efectos directos de las VLPs en las células tumorales. La administración profiláctica de VLPs-TAAs sin adyuvante protegió al 100% de los ratones ante el reto con la línea 4T1. Las dos construcciones administradas terapéuticamente retrasaron significativamente el crecimiento tumoral y disminuyeron el número de macro metástasis pulmonar, en comparación con el tratamiento con VLPs-WT, que sorprendentemente también provocaron efectos antitumorales que mejoraron con el adyuvante. Solo los tratamientos con VLPs quiméricas indujeron respuestas proliferativas específicas de linfocitos T CD8 y CD4 y la producción de Granzima-B en los ganglios linfáticos locales al tumor. El tratamiento con VLPs-neo indujo respuestas celulares citotóxicas específicas hacia la línea 4T1. Adicionalmente se observó que las VLPs-WT y quiméricas son capaces de entrar a los ganglios linfáticos locales al tumor y al propio tumor: dentro de los ganglios linfáticos las VLPs se unen a poblaciones de células presentadoras y son captadas por estas mismas poblaciones para presentar antígenos a linfocitos. Por su parte cuando las VLPs entran al tumor, las VLPs se acumulan al menos 24 horas, además, las VLPs-B19 *in vitro* son capaces de unirse a las células 4T1 y a las líneas MCF-7 y MDA-MB-231, son capaces de evitar la adhesión de las células tumorales 4T1, afectar su migración e inducir apoptosis. Los resultados de este trabajo apoyan el uso de las VLPs del parvovirus B19 como un sistema de entrega de antígeno tumorales hacia el tumor y hacia los ganglios inguinales para la inducción de respuestas inmunes antitumorales en la inmunoterapia del cáncer.

TABLA DE CONTENIDO

1. Resumen	1
2. Introducción	7
2.1. Problemática del cáncer en México y el Mundo	8
2.2. Cáncer de mama como un problema de salud pública actual	11
2.3. Transformación celular y establecimiento de tumores de mama	12
2.4. Teoría de la inmunoedición	15
2.5. Terapias actuales contra el cáncer	18
2.5.1. Cirugía	18
2.5.2. Quimioterapia	18
2.5.3. Radioterapia y terapia fotodinámica	20
2.5.4. Inmunoterapia como terapia alternativa a terapias convenciones	20
2.6. Sistemas de entrega y adyuvantes en inmunoterapia	21
2.6.1. Uso de partículas tipo virus como sistema de entrega en inmunoterapia	21
2.6.2. VLPs para la inducción de respuestas antitumorales	27
2.6.3. VLPs como un sistema de entrega a los ganglios linfáticos	28
2.6.4. Uso de múltiples epítomos para mejorar la eficacia de la vacuna	32
2.7. VLPs del parvovirus B19	33
2.8. Protoxina Cry1Ac como adyuvantes para vacunas contra el cáncer	34
3. Justificación	35
4. Objetivos e hipótesis	36
4.1. Hipótesis	36
4.2. Objetivo general	36
4.2.1. Objetivos particulares	36
5. Estrategia metodológica	37
5.1. Diseño de VLPs quiméricas	37
5.2. Purificación y ensamblaje de VLPs	38
5.2.1. Expresión	38
5.2.2. Ensamblaje <i>in vitro</i> de VLPs	37
5.3. Producción y purificación del adyuvante protoxina Cry1Ac	37
5.4. Animales y líneas celulares	38
5.5. Esquemas de Inmunización	38
5.5.1. Esquema terapéutico	38
5.5.2. Esquema Profiláctico	41
5.6. Análisis de la macro-metástasis a pulmón	42
5.7. Evaluación de la respuesta inmunológica	42
5.7.1. Proporción de células inmunes en Bazo y tumor	42
5.7.2. Proliferación y citotoxicidad de linfocitos T	43
5.7.3. Inducción de anticuerpos	43
5.8. In-cell western	43
5.9. Efectos de las VLPs-WT sobre células tumorales	44
5.9.1. Entrada de VLPs al tumor	44
5.9.2. Unión de VLPs a células tumorales	44
5.9.3. Ensayo de citotoxicidad	45
5.10. Análisis estadístico	45
6. Resultados	46
6.1. Diseño y caracterización de VLPs quiméricas multiepitépicas	46
6.1.1. Selección de epítomos	46
6.1.2. Antígenos y epítomos seleccionados	46
6.2. Diseño de VLPs quiméricas	48
6.3. Subclonación a vector de expresión	51
6.4. VLPs como sistema de entrega de neoepítomos	53
6.4.1. Ensamblaje de VLPs	54
6.4.2. Efecto antitumoral de las VLP-neo en ratones	55
6.4.3. Inhibición de macro-metástasis en el pulmón	57
6.4.4. Caracterización de poblaciones de linfocitos T y MDSC	59
6.4.5. Proliferación de linfocitos T inducido por VLPs-neo	61

6.4.6. Citotoxicidad de linfocitos T CD8 hacia células tumorales	65
6.5. VLPs como sistema de entrega de antígenos asociados a tumor	67
6.5.1. Purificación y ensamblaje de VLPs-TAAs	67
6.5.2. Crecimiento tumoral y metástasis (VLPs-TAAs)	69
6.5.3. Análisis de linfocitos T y MDSC en bazo y tumor de ratones inmunizados con VLPs-TAAs	71
6.5.4. Inducción de anticuerpos por VLPs-TAAs	73
6.5.5. Respuestas inmunes celulares inducidas por las VLPs-TAAs	73
6.6. Efectos de las VLPs-WT sobre las células tumorales <i>in vitro</i>	75
7. Discusión	79
8. Conclusiones	85
9. Mecanismo de acción	86
10. Bibliografía	88
11. Artículo publicado	95

ÍNDICE DE FIGURAS

• Figura 1. Incidencia de cáncer a nivel mundial.	9
• Figura 2. Incidencia de cáncer a nivel mundial por sexo.	10
• Figura 3. Sellos distintivos de las células de cáncer.	15
• Figura 4. Teoría de la inmunoedición del cáncer.	17
• Figura 5. Niveles de acción de los agentes quimioterapéuticos.	19
• Figura 6. Antígenos y sistemas de entrega para inducir respuestas antitumorales.	23
• Figura 7. Características de VLPs envueltas y no envueltas.	24
• Figura 8. Entrada de VLPs a ganglios linfáticos según su tamaño.	29
• Figura 9. Procesamiento de VLPs en ganglios linfáticos.	30
• Figura 10. Esquema de inmunización terapéutico.	41
• Figura 11. Esquema de inmunización profiláctico.	41
• Figura 12. Diseño y caracterización <i>in silico</i> de proteínas VP2 quiméricas.	50
• Figura 13. Sub clonación de los genes sintetizados al vector de expresión.	52
• Figura 14. Expresión de proteínas y ensamblaje de VLP-neo.	54
• Figura 15. El tratamiento con VLPs-neo redujo el crecimiento tumoral en ratones BALB/c con TNBC	56
• Figura 16. El tratamiento con VLPs-neo redujo la macro-metástasis pulmonar inducida por 1×10^4 y 3×10^3 células 4T1	58
• Figura 17. Los tratamientos con VLPs provocaron una reducción menor de linfocitos T y un menor porcentaje de MDSC en el bazo y tumor	60
• Figura 18. El tratamiento con VLPs-neo indujo respuestas proliferativas específicas de T CD4 y T CD8 en el ganglio inguinal	63
• Figura 19. El tratamiento con VLPs-WT no induce respuestas proliferativas de T CD4 ni T CD8 hacia los neoepítomos en el ganglio inguinal	65
• Figura 20. El tratamiento con VLPs-neo induce la producción de Granzima-B en células T CD8 de ganglio inguinal y éstas células pueden inducir apoptosis de células tumorales <i>in vitro</i>	67
• Figura 21. Expresión de proteínas y ensamblaje de VLPs-TAAs	68
• Figura 22. El tratamiento con VLPs-TAAs redujo el crecimiento tumoral en ratones BALB/c con TNBC y evita el establecimiento de tumores inducidos por la línea 4T1	70
• Figura 23. Los tratamientos con VLPs-TAAs provocaron una reducción menor de linfocitos T y un menor porcentaje de MDSC en el bazo y tumor tanto de forma profiláctica como terapéutica	73
• Figura 24. El tratamiento con VLPs-TAAs induce respuestas de anticuerpos y proliferativas de T CD4 y T CD8 hacia péptidos de P53 en el ganglio inguinal	74
• Figura 25. Las VLPs-WT pueden ingresar al tumor, unirse a las células 4T1 y afectar su migración, adhesión a fibronectina e inducir apoptosis	76
• Figura 26. Las VLPs pueden unirse a líneas de cáncer de mama humano y a poblaciones de células presentadoras de los ganglios linfáticos	78

- Figura 27. Mecanismo de acción de las VLPs-B19 como sistema de entrega de antígenos tumorales

LISTA DE ABREVIATURAS

A

a.a. : Aminoácidos.

Abs₆₀₀: Absorbancia a 600 nanómetros

ADCC: Citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo (por sus siglas en inglés)

ANOVA: Análisis de varianza (por sus siglas en inglés)

APC Células presentadoras de antígeno

ATP: Adenosín trifosfato

B

BALB/c: Cepa de ratón albino

BSA-PBS: Albumina de suero bovino - buffer de fosfatos salinos (por sus siglas en inglés)

C

CD: Grupo de diferenciación (por sus siglas en inglés)

CFSE: Carboxifluoresceína succimidil éster

CLDN18.2: Claudina-18.2

CTLA-4: Antígeno de linfocitos T citotóxicos 4 (por sus siglas en inglés)

D

Da: Daltones

DNA: Ácido desoxirribonucleico

DNasas: Desoxirribonucleasas

E

E. coli: *Escherichia coli*

EDTA: Ácido etilendiaminotetraacético (por sus siglas en inglés)

EEUU: Estados Unidos

F

FasL: Ligando de Fas

G

GFP: Proteína verde fluorescente (por sus siglas en inglés)

GLOBOCAN: Observatorio global del cáncer (por sus siglas en inglés)

GuHCl: Cloruro de guanidina

H

HBcAg: Antígeno recombinante del núcleo de la hepatitis B (por sus siglas en inglés)

HBx: Proteína del virus de la hepatitis B

HER-2: Receptor del factor de crecimiento epidérmico 2 (por sus siglas en inglés)

I

IFNY: Interferón gama

IL-10: Interleucina 10

IL-6: Interleucina 6

IMAC: Cromatografía de afinidad con metales inmovilizados (por sus siglas en inglés)

IPTG: Isopropil-β-D-1-tiogalactopiranosido (por sus siglas en inglés)

M

M: Molar

MAGE-A3: Antígeno de melanoma humano A3 (por sus siglas en inglés)

MAPK: Proteínas cinasas activadas por mitógeno (por sus siglas en inglés)

MCP1: Proteína quimiotáctica de monocitos 1 (por sus siglas en inglés)

MDSC: Células supresoras derivadas mieloides (por sus siglas en inglés)

MHC: Complejo principal de histocompatibilidad (por sus siglas en inglés)

mL: Mililitro

mM: Micro Molar

MTT: Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol

MUC1: Mucina 1

N

NaCl: Cloruro de sodio

NaH₂PO₄: Fosfato de sodio di hidratado

NK: Asesinas naturales (por sus siglas en inglés)

nm: Nanómetros

O

OMS: Organización mundial de la salud

P

PAMP: Patrones moleculares asociados a patógenos (por sus siglas en inglés)

pb: Pares de bases

PBS: Amortiguador de fosfato salino (por sus siglas en inglés)

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa (por sus siglas en inglés)

PDB: Banco de datos de proteínas (por sus siglas en inglés)

PDL-1: Ligando de proteína de muerte 1 (por sus siglas en inglés)

pH: Potencial de hidrógeno

R

RNA: Ácido ribonucleico (por sus siglas en inglés)

rpm: Revoluciones por minuto

S

s: Segundos

s.c.: subcutánea

SDS-PAGE: Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico (por sus siglas en inglés)

SEM: Error estándar de la media (por sus siglas en inglés)

T

TAAs: Antígenos asociados a tumor (por sus siglas en inglés)
TAP: Transportador asociado con el procesamiento de antígeno (por sus siglas en inglés)
TGFβ: Factor de crecimiento transformante beta (por sus siglas en inglés)
TLRs: Receptores tipo toll (por sus siglas en inglés)
TNBC: Cáncer de mama triple negativo (por sus siglas en inglés)
TNFα: Factor de necrosis tumoral alfa (por sus siglas en inglés)
T_{reg}: Células T reguladoras (por sus siglas en inglés)

V

VEGF: Factor de crecimiento endotelial vascular (por sus siglas en inglés)
VLPs: Partículas tipo virus (por sus siglas en inglés)
VLPs-B19: Partículas tipo virus del parvovirus B19 (por sus siglas en inglés)
VLPs-GFP: Partículas tipo virus con proteína verde fluorescente (por sus siglas en inglés)
VLPs-ne: Partículas tipo virus no envueltas
VLPs-neo: Partículas tipo virus con neoepítopos
VLPs-TAAs: Partículas tipo virus con antígenos asociados a tumor
VLPs-WT: Partículas tipo virus tipo nativo

M

μm: Micrómetros²⁵

2. Introducción

El término “cáncer” es utilizado para describir a un grupo de más de 100 enfermedades que se caracterizan por el crecimiento anormal de células en el cuerpo, el surgimiento de éstas células es debido a diversos factores físicos, químicos y biológicos, los cuales pueden afectar diversos tipos celulares, induciendo mutaciones en el ácido desoxirribonucleico (DNA por sus siglas en inglés) de éstas células [1], si estas mutaciones en el DNA afectan a genes supresores de tumores u oncogenes, es posible la “transformación” maligna de alguna de éstas células, esto lleva a las células a ser insensibles a los mecanismos de control del crecimiento celular [2], y permite que se dividan sin control hasta formar masas de células tumorales (tumores) las cuales pueden ser microscópicas o visibles a simple vista.

Existen tumores no cancerosos o benignos, lo cuales generalmente no son un riesgo de muerte para el paciente. Éstas neoplasias surgen por la proliferación de células no transformadas, las cuales mantienen la arquitectura normal del tejido donde se originan, crecen lentamente, están encapsuladas y no invaden tejidos adyacentes o distantes. Los tumores malignos contienen células transformadas las cuales presentan agrandamiento del núcleo con respecto al citoplasma, hipercromasia, pleomorfismo, nucléolos prominentes y mitosis frecuente [3], lo que las lleva a tener una morfología y arquitectura diferente al tejido normal donde se encuentran, presentan alta celularidad y necrosis, además, estos tumores contienen diversas células normales como células inmunes y estructurales, que son atraídas por factores liberados por las células tumorales, lo que lleva a la formación de un microambiente tumoral, el cual es un mecanismo de las células tumorales para obtener nutrientes y protección con el fin de seguir proliferando y diseminándose [4].

Tanto los tumores malignos como los benignos se clasifican de acuerdo con el tipo de célula de donde surgen, la mayoría de los tumores son carcinomas, sarcomas, leucemias o linfomas. Los carcinomas son malignidades de las células epiteliales y representan aproximadamente el 90% de los cánceres en humanos [5]. Los sarcomas son tumores sólidos del tejido conectivo como musculo, hueso, cartílago y tejido fibroso, relativamente raros en humanos. Las leucemias o linfomas se originan de las células que se encuentran en la sangre y el sistema linfático, respectivamente, las leucemias son “tumores líquidos” ya que existe un aumento en el número de células, pero no forman una masa en un solo sitio. Las leucemias y linfomas representan aproximadamente el 8% de las malignidades en humanos [5]. Los tumores son también clasificados por el tejido de origen, por ejemplo, carcinoma de pulmón o de mama, y también pueden clasificarse dependiendo del tipo celular que da origen al cáncer, por ejemplo, los fibrosarcomas surgen de los fibroblastos, mientras que la leucemia eritroide surge de precursores de eritrocitos.

La mayor parte de la mortalidad del cáncer o de los tumores malignos radica en la habilidad que tienen algunas células tumorales para escapar del tumor principal y

viajar a través del torrente sanguíneo y/o linfático para colonizar órganos distantes del tumor principal, en donde pueden formar nuevos tumores, este proceso de colonización de órganos distantes por parte de células tumorales es conocido como metástasis, y es la principal responsable de la muerte por tumores malignos en las personas [6], con excepción de los tumores en sistema nervioso, los cuales pueden ser mortales debido a la interrupción normal de las funciones cerebrales por el crecimiento tumoral. La metástasis a varios órganos puede inducir fallo múltiple de órganos lo que lleva a la muerte, por ejemplo, los pulmones con metástasis pueden poseer tantas células tumorales que éstas bloquean el intercambio gaseoso normal, lo que lleva a una falta de oxígeno mortal.

A diferencia de las enfermedades infecciosas, en donde son células invasoras como bacterias, hongos o protozoarios las que proliferan sin control en nuestro cuerpo y causan enfermedades, en el cáncer son células propias transformadas las que se dividen sin control, por lo que nuestro sistema inmune no es capaz de reconocerlas como extrañas y eliminarlas como pasa con los agentes infecciosos, además, debido a su naturaleza propia, los fármacos que son capaces de matar a las células tumorales también pueden matar células normales, ya que estos fármacos afectan a células de rápida proliferación como las células tumorales, pero también a células normales de rápida proliferación, como los enterocitos, lo que causa diversos efectos secundarios no deseados [7], además, las células tumorales eventualmente se hacen resistentes a los agentes quimioterapéuticos. El gran parecido entre las células tumorales y normales aunado a la adquisición de mecanismos de resistencia ha hecho que el tratamiento contra el cáncer continúe siendo un desafío a pesar del avance de la ciencia y tecnología.

2.1 Problemática del cáncer en México y el mundo

A pesar del avance significativo en los tratamientos contra el cáncer, esta enfermedad continua siendo una de las principales causas de muerte alrededor del mundo, el último análisis a nivel mundial sobre incidencia y mortalidad del observatorio global del cáncer (GLOBOCAN por sus siglas en inglés) muestra que en 2015, el cáncer fue la principal o la segunda causa de muerte en personas menores de 70 años en 91 países de 172 estudiados, mientras que en otros 22 países se posicionó como la tercera o cuarta causa de muerte. Los datos estimados en 2018 muestran 18.1 millones de nuevos casos y 9.6 millones de muertes por cáncer [8].

Los datos para ambos sexos combinados muestran que el cáncer de pulmón y el cáncer de mama fueron los tipos de tumores malignos con mayor número de nuevos casos, representando cada uno el 11.6% de todos los nuevos casos de cáncer en 2018, seguidos por el cáncer de colon (6.1%), próstata (7.1%), y estómago (5.7%),

los demás tipos de neoplasias malignas no representaron más del 5% de nuevos casos individualmente, pero en conjunto fueron responsables del 53.90% de la incidencia (Figura 1).

Número de nuevos casos en 2018, ambos sexos, todas las edades

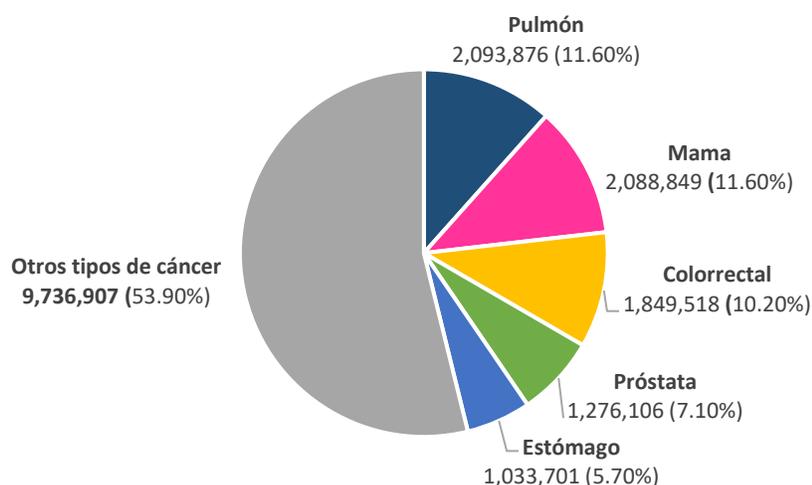


Figura 1. Incidencia de cáncer a nivel mundial. Número de casos nuevos y porcentaje de nuevos casos de diferentes tipos de cáncer registrados el año 2018 en todo el mundo considerando datos de ambos sexos.

A pesar de que el cáncer de mama mostró un número de nuevos casos muy similar al cáncer de pulmón, este último acumuló mayor número de decesos, siendo responsable del 18.4% de las muertes por neoplasias malignas, mientras que el cáncer de mama representó solamente el 6.6%, superado por otros tipos de cáncer como el de estómago o hígado que representaron el 8.2% cada uno. Los 10 tipos de cáncer con mayor incidencia (pulmón, mama, próstata, colon, no melanoma, estómago, hígado, recto, esófago y cérvix) representaron el 65% de los cánceres recién diagnosticados y los casos de muerte [8].

Al analizar la incidencia y mortalidad de los diferentes tipos de cáncer por sexo, se observa que el cáncer de pulmón es el que más comúnmente se diagnostica en hombres a nivel mundial y el que presenta mayor mortalidad, seguido por el cáncer de próstata y colorrectal en incidencia, y el de hígado y estómago en mortalidad. Mientras que, en las mujeres, el cáncer de mama es el más diagnosticado y la principal causa de muerte por tumores malignos, seguido por el cáncer colorrectal y el de pulmón en incidencia y viceversa para mortalidad (Figura 2).

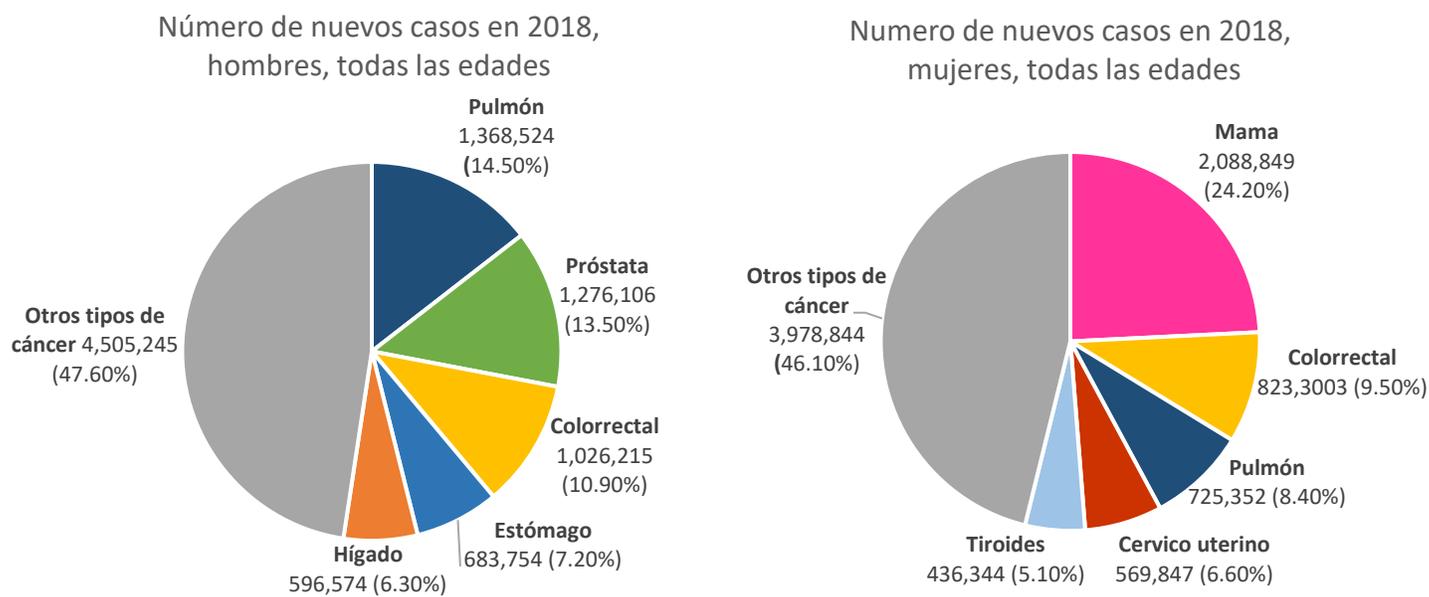


Figura 2. Incidencia de cáncer a nivel mundial por sexo. Número de casos nuevos y porcentaje de nuevos casos de diferentes tipos de cáncer registrados el año 2018 en todo el mundo, separado según el sexo.

En México, el cáncer continúa siendo un importante problema de salud pública, posicionándose como la tercera causa de muerte después de las enfermedades cardiovasculares y la diabetes [9]. Para ambos sexos en México, los tipos de cáncer con mayor recurrencia son el de mama, próstata, colorrectal y pulmón. Para hombres, el cáncer con mayor mortalidad es el de próstata, seguido por el de pulmón, colorrectal, de hígado y gástrico. Mientras que el de mama es el más comúnmente diagnosticado en mujeres y también el responsable de mayor número de muertes, seguido por el cervicouterino, estómago y pulmón [9].

A pesar de los avances científicos y tecnológicos, la organización mundial de la salud (OMS) estima que para el año 2030 los casos nuevos de cáncer sobrepasarán los 20 millones anuales a nivel mundial, en parte debido al crecimiento poblacional y al envejecimiento de la población. Sin embargo, se considera que es posible reducir la incidencia y mortalidad de varios tipos de cáncer mediante el establecimiento de hábitos saludables y vacunación, así como por el mejoramiento en las técnicas de diagnóstico temprano y el surgimiento de tratamientos más efectivos con menores efectos secundarios.

2.2 Cáncer de mama como un problema de salud pública actual

Como se mostró en el apartado anterior, uno de los tipos de cáncer con mayor incidencia y mortalidad a nivel mundial y en México es el cáncer de mama. Se estima que este año 2020 se diagnosticarán a 268,600 mujeres con cáncer de mama invasivo y 62,930 mujeres con cáncer de mama *in situ* solo en estados unidos, lo que llevará al menos a 42,260 muertes por cáncer de mama este año [8].

La tasa de supervivencia a 5 años indica el porcentaje de personas que viven al menos 5 años después de la detección del cáncer y en las mujeres con cáncer de mama invasivo es del 90%, mientras que a 10 años es del 83%.

Sin embargo, las tasas de supervivencia se modifican si se analizan por el estadio de la enfermedad y por rango de edad, si el cáncer se encuentra restringido solo a la mama con un diámetro menor a 1 cm, la tasa de supervivencia a 10 años es del 79%. Aproximadamente, 62% de las personas con cáncer de mama poseen tumores restringidos a la mama. En cambio, si el cáncer se ha diseminado a los ganglios linfáticos regionales, la tasa de supervivencia a 10 años es del 53%, mientras que si el cáncer se ha diseminados a partes distantes del cuerpo, es solo del 3.4% [10]. Estos datos muestran que algunos subtipos de cáncer de mama tienen una mayor mortalidad, lo cual se relaciona con sus características moleculares.

La clasificación molecular del cáncer de mama permite predecir el avance de la enfermedad y su respuesta al tratamiento. Actualmente, se acepta que existen 4 subtipos de cáncer de mama según sus perfiles de expresión: el luminal A, luminal B, HER-2 positivo y el tipo basal o triple negativo [11].

El luminal A incluye tumores que son positivos tanto para receptor de estrógeno como de progesterona, este subtipo de cáncer de mama representa del 40 al 50% de todos los casos de cáncer invasivo de mama, es el que posee mejor pronóstico y menor tasa de recaída, debido a que es susceptible a tratamientos hormonales y quimioterapia [11].

El luminal B se caracteriza por ser positivo para el receptor de estrógeno, pudiendo ser positivo o negativo para el receptor del factor de crecimiento epidérmico humano 2 (HER-2 por sus siglas en inglés). A menudo se diagnostica en mujeres jóvenes, tiene peor pronóstico que el luminal A, pero a pesar de eso la mayor parte de las portadoras se recupera sin altas tasas de recurrencia. Este subtipo representa 10-20% de los casos de cáncer de mama.

El HER-2+ se caracteriza por ser positivo para el receptor HER-2, representa cerca del 20% de los casos de cáncer de mama, este subtipo puede ser positivo o negativo para los receptores hormonales, las pacientes con este subtipo se benefician con el

tratamiento de anticuerpos anti-HER-2 (trastuzumab) lo que reduce drásticamente el riesgo de recaída de la enfermedad.

El subtipo triple negativo o tipo basal como su nombre lo indica es negativo para los receptores de estrógeno y progesterona, así como para HER-2, representa del 15 al 20% de todos los casos de cáncer de mama y es el subtipo con peor pronóstico y mayor recurrencia, debido a que tiene un crecimiento más acelerado y menores opciones de tratamiento, ya que no responde a terapias hormonales ni a terapias contra HER-2, por lo que es principalmente tratado con quimioterapia [12].

2.3 Transformación celular y establecimiento de tumores de mama

La mama se compone de glándulas de leche que se conectan con el pezón mediante ductos, éstas glándulas y ductos están inmersos en una matriz de tejido adiposo. Tanto las glándulas como los ductos están formados por células epiteliales. El mantenimiento de los tejidos de la mama, así como de muchos otros depende de un control sumamente preciso del crecimiento y la división de las células que conforman al tejido, lo que permite que el tejido cumpla su función biológica. Una característica importante de la mama es que su epitelio es sumamente responsivo a señales locales y sistémicas que llevan a cambios morfológicos de los ductos y glándulas durante la pubertad y la lactancia.

La homeostasis del tejido puede verse afectada por factores físicos (radiación ionizante), químicos (carcinógenos) o biológicos (infección con oncovirus, factores de crecimiento, mutaciones genéticas heredadas). Estos factores pueden afectar a las células de la mama induciendo daños o cambios en el DNA. A pesar de que estos factores afectan gran número de células, generalmente el cáncer surge de una sola célula que acumula las mutaciones necesarias para proliferar descontroladamente, esto lleva a que todas las células en un tumor compartan algunas características que las relaciona; esta llamada “-” del tumor fue demostrada por análisis de la inactivación del cromosoma X. Normalmente, las células de las mujeres contienen dos cromosomas X, sin embargo, uno de ellos es inactivado y convertido en heterocromatina. La inactivación de X ocurre de forma aleatoria en el desarrollo embrionario, por lo que un cromosoma X está inactivado en algunas células mientras que otro cromosoma X está inactivado en otras. Así, si una mujer es heterocigota para un gen del cromosoma X, lo que significa que tiene dos versiones diferentes del mismo gen (o alelos), uno en cada cromosoma X, cada célula de una mujer expresará un alelo diferente. Un tejido normal está compuesto de una mezcla de diferentes cromosomas X inactivados. En contraste, las células en los tumores expresan solo un alelo de un determinado gen del cromosoma X. esto implica que todas las células que conforman el tumor derivaron de una sola

célula con un patrón de inactivación de X definido antes de comenzar a proliferar [13].

A pesar de la clonalidad de los tumores, la célula que dio origen al tumor no posee todas las características de las células que conforman un tumor ya formado, debido a que la célula inicial va adquiriendo diferentes características durante un periodo de tiempo. Esto se ha evidenciado en el cáncer de colon, en donde la incidencia de este aumenta 10 veces a partir de los 30 a los 50 años, y aumenta nuevamente 10 veces después de los 50 años, lo que deja claro que el crecimiento de tumores es resultado de la acumulación sucesiva de anomalías en las células [14].

Los genes de importancia relacionados con el surgimiento de células tumorales son los oncogenes y los genes supresores de tumor; los oncogenes a menudo corresponden a genes que codifican proteínas que permiten el avance del ciclo celular para lograr la división celular, mientras que los genes supresores de tumores codifican proteínas inhibitoras del ciclo celular, lo que lleva a que las células no se dividan. La activación de diferentes oncogenes provee a la célula una ventaja selectiva por la adquisición de características como la inestabilidad genómica.

La inestabilidad genómica, se da cuando se afectan genes relacionados con el mantenimiento y reparación del DNA, lo que hace que las células sean proclives a acumular mutaciones con mayor facilidad que una célula sana, muchas de estas mutaciones se relacionan con la regulación de vías de señalización que inducen división y con el control del ciclo celular.

En las células tumorales existe un mantenimiento de las vías de señalización proliferativas lo que lleva a las células a entrar constantemente en el ciclo celular [15]: El ciclo celular consta de cuatro fases, las más importantes son la S en donde la célula replica el DNA y la M en la cual la célula se divide en dos células hijas, estas dos fases se separan por otras dos, la G1 se presenta después de la mitosis y antes de la S, en esta fase la célula es sensible a señales para avanzar o no en el ciclo, como vías de señalización inducidas por mitógenos, la fase G2 es posterior a la S y es donde la célula se prepara para entrar en mitosis [16]. La fase G0 representa un estado fuera del ciclo celular en donde las células no proliferan debido a una alta densidad celular o la falta de mitógenos.

A diferencia de las células normales diferenciadas de un tejido, las células tumorales avanzan constantemente en el ciclo celular, lo que les permite dividirse a pesar de los mecanismos de control. Esto es posible ya que las células tumorales también presentan mutaciones en genes relacionados con la resistencia a la muerte celular y la inducción de división celular [2]. Las células normales pueden dividirse un número fijo de veces antes de que entren en apoptosis, esto está regulado por los telómeros, los cuales son secuencias de DNA repetitivas que se encuentran en las porciones finales de los cromosomas, y protegen al resto del DNA de la degradación por desoxirribonucleasas (DNAsas, por sus siglas en inglés), sin embargo, durante cada ciclo de replicación del DNA, la DNA polimerasa no replica algunos de los

nucleótidos finales de los telómeros, lo que causa que con cada división celular los telómeros sean cada vez más cortos, hasta que la célula entra en apoptosis y muere [17]. En las células cancerosas existe la enzima telomerasa, que mantiene el largo de los telómeros y permite a las células proliferar indefinidamente.

Las células cancerosas también presentan cambios en su forma de obtención de energía, a diferencia de las células sanas en donde la cadena transportadora de electrones fabrica la mayor parte del adenosín trifosfato (ATP), algunas células tumorales pueden cambiar a un metabolismo basado en la glucólisis como principal vía de obtención de energía (efecto Warburg), sin embargo, debido a la menor eficiencia de la glucólisis para producir ATP las células tumorales requieren grandes cantidades de glucosa [18].

Cuando las células tumorales han crecido en una masa de aproximadamente 2mm, las células en el centro del tumor comienzan a sufrir de falta de oxígeno, incluso se puede generar un núcleo necrótico en los tumores, en el cual células tumorales muertas liberan su contenido al ambiente extracelular, como algunas proteínas nucleares no histonas [19]. Estas proteínas reclutan células inmunes hacia el tumor, las cuales junto con las células tumorales liberan factores, como el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF por sus siglas en inglés), que inducen la formación de nuevos vasos sanguíneos hacia el tumor, lo que le provee de la glucosa, el oxígeno y los nutrientes necesarios para mantener su tasa de crecimiento.

Además de factores angiogénicos, las células tumorales también liberan moléculas promotoras de inflamación, como las citocinas interleucina 6 (IL-6) y el factor de necrosis tumoral α (TNF α); estas citocinas inducen un ambiente inflamatorio dentro del tumor, lo que lleva a la acumulación de células inmunes. En los primeros estadios del establecimiento del tumor, éstas células inmunes eliminan a las células tumorales más inmunogénicas, mientras que no son capaces de destruir a las células tumorales poco inmunogénicas ya que éstas poseen características que les permite ocultarse de la detección por el sistema inmune; presentan una disminución en las moléculas del complejo principal de histocompatibilidad (MHC), liberan citocinas antiinflamatorias como interleucina 10 (IL-10) y factor de crecimiento transformante beta (TGF β), expresan moléculas inhibitoras de la respuesta inmune como el ligando de muerte programada 1 (PD-L1), lo que lleva al cambio de algunas células inmunes a un fenotipo anérgico o a un fenotipo regulador como las células T reguladoras (Treg) o las células supresoras derivadas mieloides (MDSC, por sus siglas en inglés) las cuales son capaces de bloquear la citotoxicidad de los linfocitos [20]. Las principales características de las células tumorales se resumen en la Figura 3.

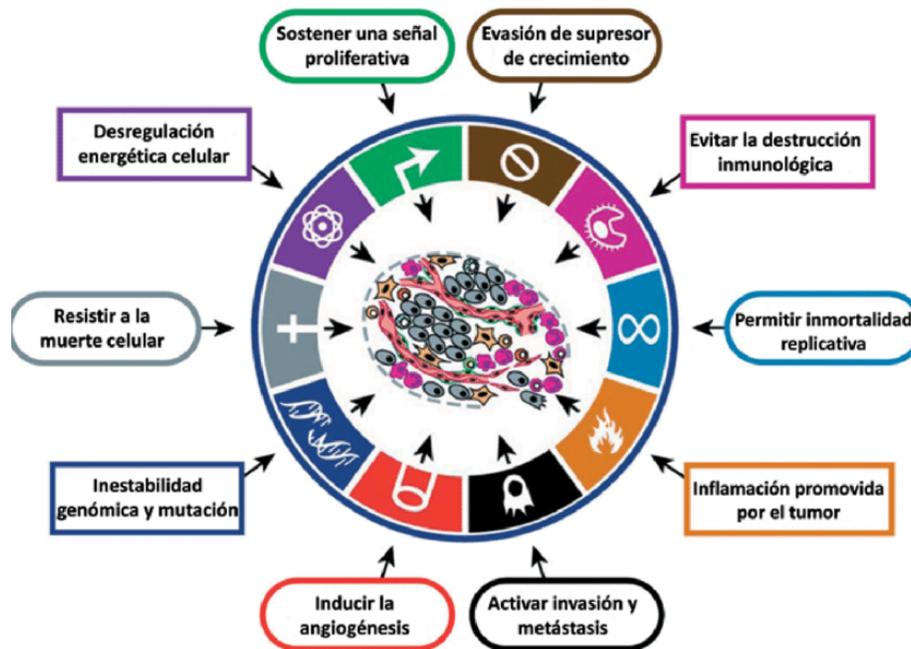


Figura 3. Sellos distintivos de las células de cáncer. Se muestran las principales características de las células cancerosas que les permite la formación de tumores malignos.

2.4 Teoría de la inmunoedición

El entendimiento de la relación entre el sistema inmune y el cáncer se ha establecido con diversos estudios, los cuales permitieron el planteamiento de la teoría de la inmunoedición (o immunoediting en inglés), la cual incluye tres fases: eliminación, equilibrio y escape [29].

En la fase de eliminación se observa la vigilancia inmunitaria, en la cual el sistema inmune elimina células transformadas potencialmente oncogénicas a través de la respuesta inmune innata y adaptativa mediante macrófagos M1, células asesinas naturales (NK) y linfocitos T citotóxicos y linfocitos B respectivamente, estos últimos reconocen secuencias (epítomos) de antígenos tumorales, estos antígenos pueden ser antígenos asociados a tumor, los cuales son proteínas normales de las células que debido a la inestabilidad genética sufren mutaciones que llevan a su sobre expresión o a que sus epítomos se unan de manera más eficaz a las moléculas de MHC, ejemplos de antígenos asociados a tumor son las moléculas MHC de clase I no clásicas MICA/B o moléculas asociadas a estrés células como RAE1 las cuales

se sobre expresan en las células tumorales por lo que pueden ser reconocidas por células NK [30]. Otro tipo de antígenos tumorales son los neo antígenos y neoepítomos, los primeros son proteínas nuevas que no se encuentran normalmente en el repertorio celular, los segundos son secuencias mutadas que adquieren la capacidad de unirse a las moléculas de MHC por lo que no se encuentran en células sanas, estos neoepítomos pueden ser reconocidos por linfocitos T CD4 y CD8 cuando están unidos a moléculas de MHC I o II respectivamente.

En la fase de equilibrio, las células cancerosas han escapado a la vigilancia inmunitaria, sin embargo, no existe un tumor detectable debido a que las células se encuentran en una fase de dormancia o son controladas por el sistema inmune por lo que todavía no hay signos ni síntomas de la enfermedad, dicha fase puede durar decenas de años o incluso toda la vida. Durante esta fase, debido a la presión selectiva ejercida por el sistema inmune además de otros factores genéticos, epigenéticos, ambientales, etc. se seleccionan células tumorales poco inmunogénicas con un genotipo y fenotipo que favorece la anergia inmunológica y/o tolerancia, lo que da comienzo a la fase de escape.

Durante la fase de escape las células tumorales expresan ligandos de muerte como el ligando de Fas (FasL) o PDL-1 para eliminar linfocitos T citotóxicos, disminuyen la expresión de moléculas del MHC de clase I (MHCI) para evitar su detección por linfocitos y secretan MICA/B soluble, factores inmunosupresores como TGF- β , IL-10 o indolamina dioxigenasa (IDO), además de que reclutan células supresoras como los linfocitos T reguladores (linfocitos T_{reg}) y MDSC. Estos tipos celulares junto con las células tumorales crean un microambiente tumoral inmunosupresor, el cual tiene una participación importante en la progresión tumoral y respuesta al tratamiento dependiendo de su composición [31] [32] (Figura 4).

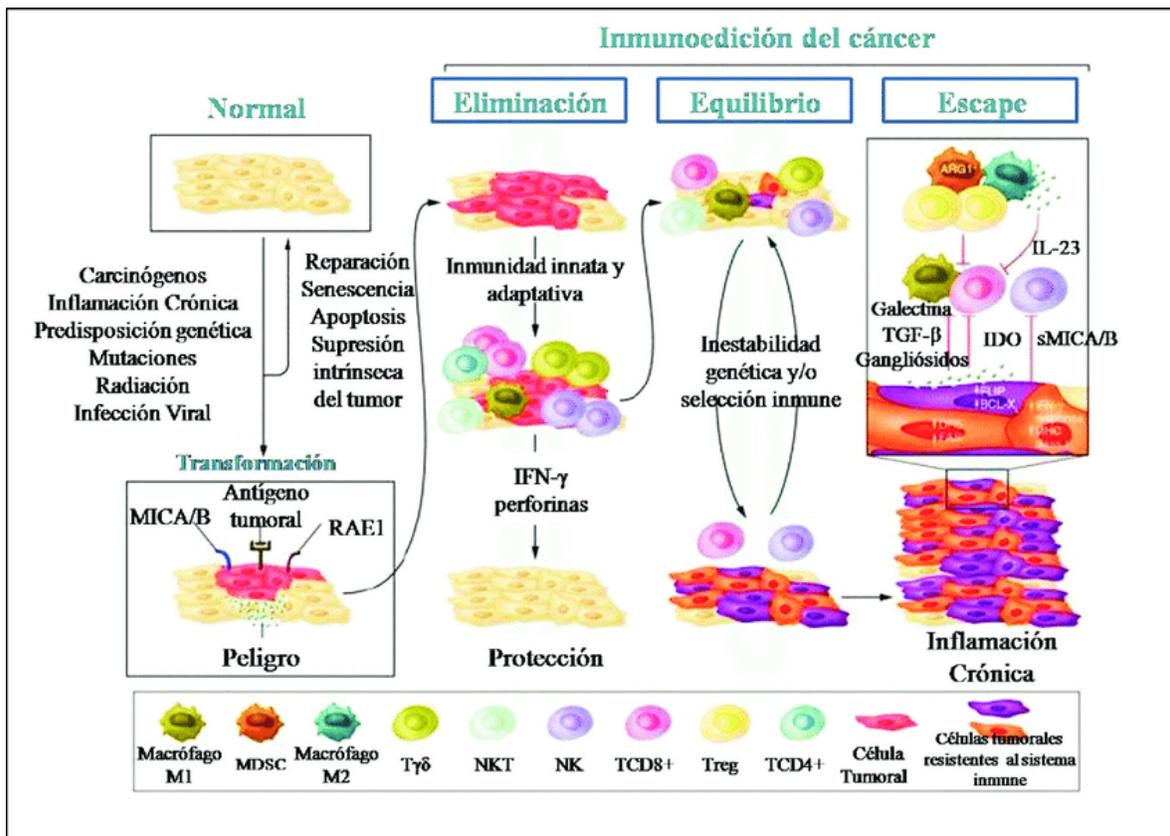


Figura 4. Teoría de la inmunoedición del cáncer. Esta teoría describe como las células normales de un tejido pueden llegar a formar tumores malignos, cuando aparecen células transformadas en tejidos normales éstas expresan antígenos tumorales como moléculas de MHC I no clásicas (MICA/B) o moléculas asociadas a estrés celular (RAE1) las cuales pueden ser reconocidas por células inmunes como macrófagos M1, células NK y linfocitos T CD8, CD4 y $\gamma\delta$, las cuales pueden eliminar a las células transformadas mediante perforinas y granzimas (Fase de eliminación). Sin embargo, si las células transformadas no son eliminadas éstas pueden existir en números bajos en el organismo sin inducir signos o síntomas de enfermedad ya que las células inmunes eliminan constantemente a las células transformadas que crecen el exceso (fase de equilibrio). En la fase de escape surgen clones resistentes al sistema inmune que liberan de moléculas que inhiben a las células inmunes como galectina, TGF- β , gangliósidos, indolamina dioxigenasa (IDO), moléculas de MHC I no clásicas solubles (sMICA/B) entre otras, además reclutan o transforman células inmunes para favorecer el crecimiento tumoral como las MDSC o Treg y macrófagos M2, los cuales también liberan factores que inhiben a las células del sistema inmune como IL-23, las células tumorales y las células inmunes supresoras crean un microambiente tumoral que permite a las células transformadas dividirse indefinidamente hasta formar tumores detectables.

2.5. Terapias actuales contra el cáncer

2.5.1 Cirugía

La primera terapia usada para tratar algunos tumores fue la extirpación quirúrgica del tumor o del tejido donde se encontraba, esta práctica comenzó siendo sumamente dolorosa y con un alto riesgo de infecciones. Sin embargo, desde el desarrollo de mejores anestésicos y antibióticos, se ha dado un avance significativo en el desarrollo de técnicas quirúrgicas que permite eliminar tumores sin afectar el tejido adyacente y garantizando la eliminación completa del tumor primario, esta aproximación ha mostrado tener potencial curativo cuando el cáncer se encuentra en un estadio temprano en donde no se ha diseminado a otros órganos [21]. A menudo también es necesaria la extirpación de los ganglios linfáticos locales al tumor, como es en el caso del cáncer de mama, en donde la mastectomía radical modificada, que implicaba la extirpación total de la mama y los nódulos linfáticos axilares, se mantuvo por un tiempo como la estrategia primaria para tratar tumores malignos. Nuevos estudios han demostrado que la cirugía conservadora de seno tiene la misma eficacia que la mastectomía radical, por lo que el estándar actual es la eliminación del tumor con un poco de tejido adyacente y si es necesario la extirpación de los ganglios positivos. A pesar del avance en las técnicas quirúrgicas actuales, continúa existiendo la reaparición del cáncer después de la operación, debido a que la cirugía no es capaz de eliminar las células que han invadido tejidos adyacentes al tumor o se han diseminado a otros órganos, incluso se ha propuesto que la cirugía puede inducir la metástasis, debido a que libera células tumorales hacia el torrente sanguíneo [22]. Por lo que a menudo la cirugía es complementada con el uso de agentes quimioterapéuticos.

2.5.2. Quimioterapia

Gracias al conocimiento de la biología celular y molecular de diversos tipos de células fue posible la generación de agentes quimioterapéuticos, los cuales son moléculas capaces de inhibir la proliferación celular, esto mediante diferentes mecanismos dependiendo el fármaco. Los taxanos y alcaloides de la vinca son moléculas descubiertas en plantas, capaces de bloquear el ensamblaje o desensamblaje de los microtúbulos [23], lo que causa que no se pueda formar el uso mitótico en las células en división, e impide la separación de los cromosomas hacia las células hijas, lo que lleva a que la célula entre en apoptosis. Otros fármacos como los agentes alquilantes actúan al intercalarse en las hebras del DNA, lo que impide que las hebras del DNA puedan separarse para llevar a cabo la replicación[24], lo cual induce la apoptosis de las células, Algunos agentes quimioterapéuticos bloquean la actividad de proteínas importantes en la célula para la división, tal es el caso de los inhibidores de la topoisomerasa, lo que igualmente lleva a que no se forme la horquilla de replicación e induce la muerte de las células (Figura 5)[25].

A pesar de que los fármacos utilizados en la quimioterapia son teóricamente capaces de afectar a todas las células, ya que poseen los componentes que son blancos de estos fármacos, la mayoría de las células no se ven afectadas por ellos debido a que se encuentran en la fase G0, por lo que no están remodelando su citoesqueleto ni replicando su DNA. Por el contrario, las células en constante división en un tejido, si son susceptibles a ser interrumpidas por los agentes quimioterapéuticos, lo que causa muchos de los efectos secundarios de la quimioterapia como anemia, leucopenia, disfunción cardíaca, pérdida de cabello, diarrea, etc. [26]. A pesar de estos efectos secundarios, la quimioterapia ha ofrecido la posibilidad de eliminar células tumorales que se encuentran diseminadas por el cuerpo, a menudo se emplean combinaciones de fármacos para mejorar la respuesta y generalmente se aplica la quimioterapia después de la cirugía del tumor principal.

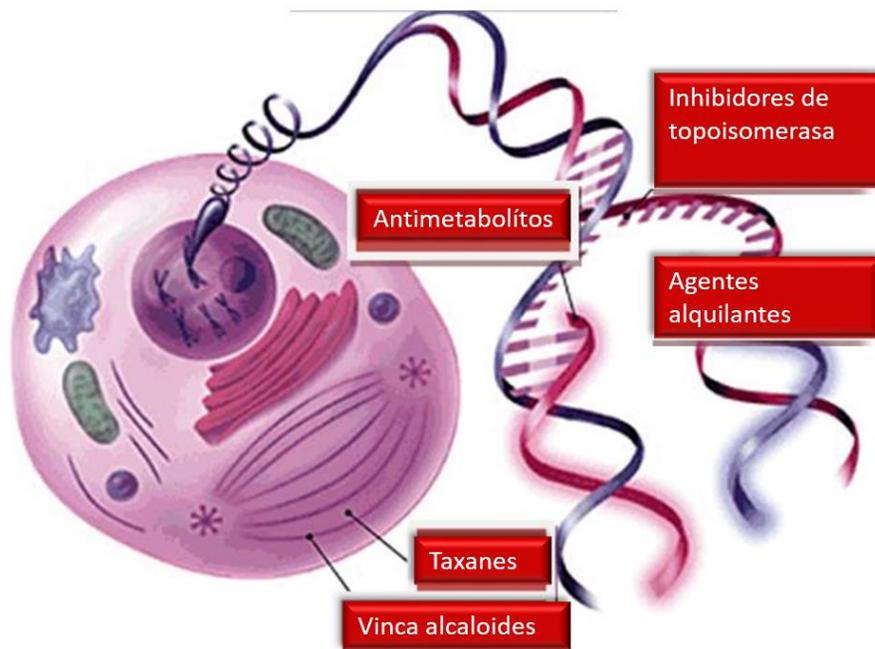


Figura 5. Niveles de acción de los agentes quimioterapéuticos. Los fármacos comúnmente usados para el tratamiento del cáncer actúan principalmente bloqueando el ensamblaje o desensamblaje de microtúbulos (taxanos y vinca alcaloides (alcaloides de la vinca)), la apertura de la doble hélice para su replicación y transcripción (inhibidores de la topoisomerasa y agentes alquilantes) o por la adición de antagonistas de bases nitrogenadas (antimetabolitos).

2.5.3. Radioterapia y terapia fotodinámica

A pesar del avance en las técnicas quirúrgicas, existen tumores que son difíciles de operar debido a su localización, en estos casos, el uso de radioterapia es recomendado, esta terapia se basa en el uso de radiación para inducir la muerte de células tumorales, para esto se utiliza un equipo especial capaz de generar un haz de radiación que se dirige hacia el sitio del tumor y sus alrededores, la radiación ionizante utilizada es capaz de inducir rupturas en el DNA, la acumulación de daños en el DNA en las células expuestas a la radiación lleva a la inducción de apoptosis de la célula [27], el objetivo de la radioterapia es aplicar altas dosis de radiación a las células anormales, mientras que trata de minimizar la radiación a tejidos sanos. Actualmente, aproximadamente el 50% de los pacientes con cáncer reciben dosis de radiación como parte de su tratamiento, sin embargo, esta terapia continúa teniendo fuertes efectos secundarios lo que limita la cantidad de radiación que puede aplicarse.

La terapia fotodinámica está basada en la reacción fotoquímica entre una molécula fotosensible, luz y una molécula de oxígeno, cuando estos componentes están juntos, se generan especies reactivas de oxígeno, las cuales pueden dañar directamente a la célula tumoral, a la vasculatura del tumor o inducir inflamación y respuestas inmunes [28]. Este procedimiento consta de dos pasos, se administra al paciente una molécula fotosensible, la cual puede estar acoplada a acarreadores o anticuerpos para unirse preferencialmente a las células tumorales, después, se utiliza un haz de luz infrarroja dirigido hacia el tumor, en donde el oxígeno presente se convertirá en una especie reactiva de oxígeno y matará las células cercanas. Esta técnica limita los efectos perjudiciales a los tejidos sanos, ya que estos pueden estar expuestos a la luz pero no contienen la molécula fotosensible, mientras que las moléculas fotosensibles que se encuentran en circulación no son capaces de formar los radicales de oxígeno sin la estimulación de la luz infrarroja, a pesar de ser una terapia con menores efectos secundarios que la radioterapia, mantiene el inconveniente de no poder eliminar a las células metastásicas [28].

2.5.4. Inmunoterapia como terapia alternativa a terapias convencionales

A pesar de los avances significativos en el desarrollo de técnicas quirúrgicas y nuevas combinaciones de agentes quimioterapéuticos, uno de los principales retos continúa siendo la eliminación de las células tumorales que se han diseminado fuera del tumor principal, para evitar la reaparición del tumor después de que ha terminado la terapia, además de disminuir la inducción de efectos secundarios sobre células sanas. Entre las nuevas terapias que han surgido gracias al conocimiento de la biología de los tumores esta la inmunoterapia, esta ha mostrado la capacidad de eliminar células tumorales tanto del tumor principal como células diseminadas, con un daño mínimo a las células sanas, además de la posibilidad de generar una memoria inmunitaria que permitiría la protección contra reapariciones del mismo tumor. La inmunoterapia se estableció gracias al conocimiento de cómo el sistema inmunitario está relacionado naturalmente con la protección contra el desarrollo de tumores, lo que se describe en la teoría de la inmunomodulación.

2.6. Sistemas de entrega y adyuvantes en inmunoterapia

2.6.1. Uso de partículas tipo virus como sistema de entrega en inmunoterapia

La generación de respuestas inmunes profilácticas celulares y humorales mediante la vacunación con organismos atenuados ha demostrado ser altamente efectiva para muchas enfermedades infecciosas. Por el contrario, en enfermedades no infecciosas como el cáncer, el enfoque terapéutico equivalente del uso de lisados tumorales o células tumorales irradiadas ha provocado efectos secundarios graves relacionados con la auto reactividad, debido a la naturaleza del contenido de auto antígenos en estas vacunas. En la búsqueda de la mejora continua de la especificidad de las vacunas terapéuticas contra el cáncer, se ha propuesto el uso de proteínas o péptidos purificados, que corresponden a regiones alteradas de las células tumorales. Sin embargo, esta estrategia ha mostrado que el uso de antígenos solubles es menos inmunogénico que el uso de antígenos particulados[33].

En el caso de las vacunas contra organismos infecciosos, la mayoría de los antígenos son altamente inmunogénicos, en parte debido a sus características, como la naturaleza particulada, la presencia de antígenos con una disposición altamente repetitiva o la presencia de múltiples patrones moleculares asociados a

patógenos (PAMP). Estas características conducen a la activación adecuada del sistema inmune innato[34].

La baja inmunogenicidad de los antígenos tumorales representa un obstáculo importante en desarrollo de las vacunas contra el cáncer[35], por lo cual se han buscado estrategias para mejorar las respuestas inmunes inducidas hacia diferentes tipos de antígenos, entre estas estrategias el uso de sistemas de entrega ha sido ampliamente utilizado.

Diversos sistemas de entrega se han desarrollado [22]; (Figura 6), aunque todavía tienen limitaciones. 1) El uso de vectores virales y bacterianos para entregar ADN que codifica antígenos tumorales a las células presentadoras de antígeno [36]. Sin embargo, la integración de ADN extraño en células blanco y la activación transcripcional de oncogenes sigue siendo un riesgo potencial. 2) Se ha demostrado que las nanopartículas formadas por polímeros naturales o sintéticos son eficientes para la entrega de antígenos y adyuvantes (moléculas que mejoran la respuesta inmune inducida hacia antígenos con los que se administra) a células dendríticas donde pueden inducir presentación cruzada [37]. Sin embargo, aún persisten algunas preocupaciones relacionadas con la estabilidad y la potencial citotoxicidad [38]. 3) Se ha demostrado que los liposomas, que se han usado principalmente para la administración de fármacos, pueden inducir respuestas humorales y celulares hacia antígenos encapsulados o acoplados a su superficie [39]. Sin embargo, es necesario realizar una modificación de los liposomas para la liberación apropiada de antígenos al citosol para su procesamiento hacia MHC Clase I [40]. 4) Las partículas tipo virus (VLPs) son una estrategia prometedora para entregar epítopos que provocan respuestas inmunes antitumorales eficientes. Del mismo modo, las proteínas de andamiaje, que son proteínas de origen no viral que pueden ensamblarse en NeVLP, se consideran sistemas de entrega de epítopos atractivos para desarrollar vacunas contra el cáncer.

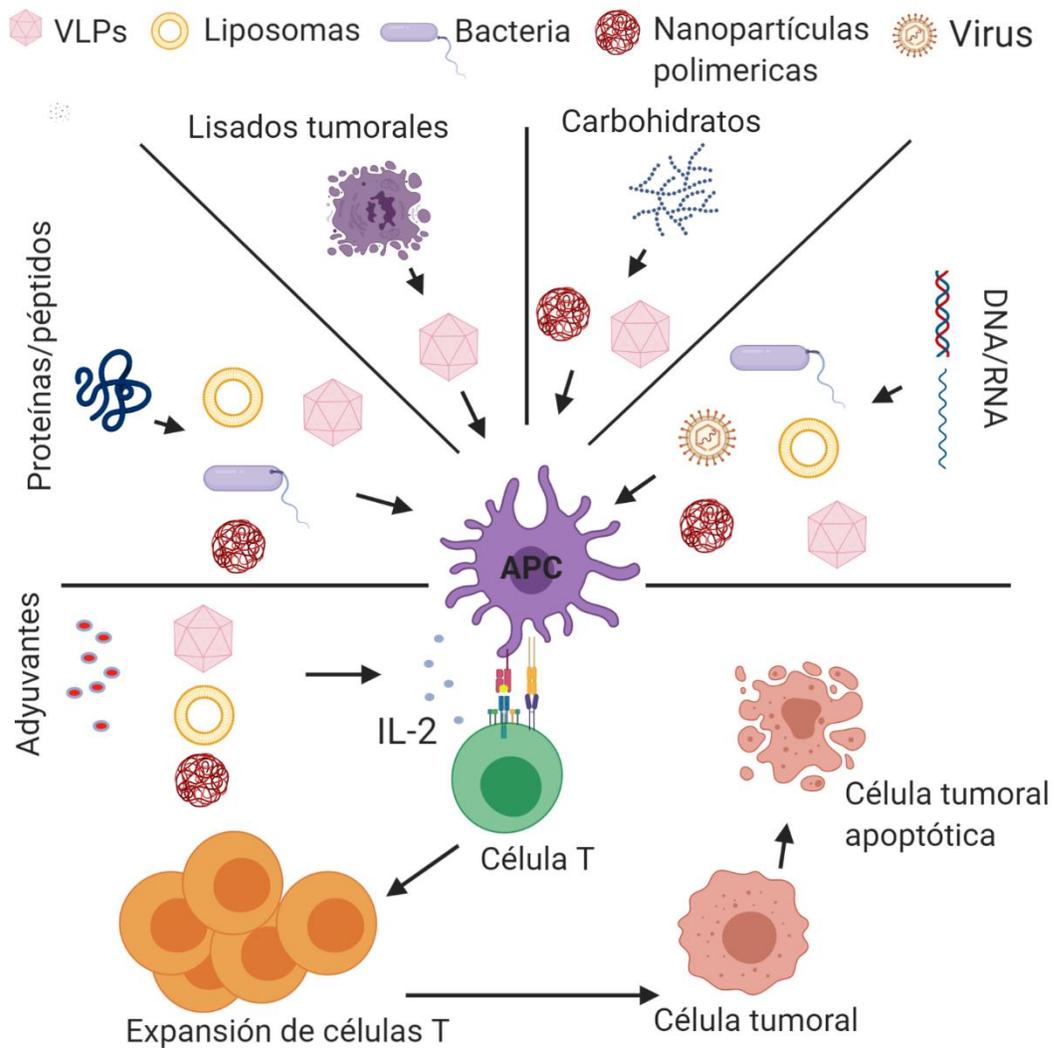


Figura 6. Antígenos y sistemas de entrega para inducir respuestas antitumorales. Se muestran algunos sistemas de entrega utilizados para entregar antígenos hacia las células presentadoras de antígeno (APC), los cuales a menudo van acompañados de adyuvantes para mejorar las respuestas inducidas de linfocitos T activados, los cuales después de un proceso de expansión pueden ser capaces de inducir apoptosis en las células tumorales.

Entre estas estrategias, el uso de sistemas de entrega basadas en partículas tipo virus (VLPs) ha generado un gran interés debido a sus ventajas para inducir inmunidad tumoral hacia diferentes tipos de antígenos [41].

Las VLPs están conformadas por subunidades estructurales capaces de auto ensamblarse para formar estructuras macromoleculares muy similares o idénticas a las cápsides virales, pero son seguras ya que no pueden replicarse porque no contienen material genético. Al igual que los virus, las VLPs pueden clasificarse en, con envoltura y sin envoltura (Figura 7). Las VLPs con envoltura tienen una capa de fosfolípidos, y las sin envoltura están formadas solo por proteínas. En el caso de las VLPs no envueltas (VLPs-ne), pueden estar formadas por varias proteínas diferentes o incluso por un solo tipo de proteína estructural [42].

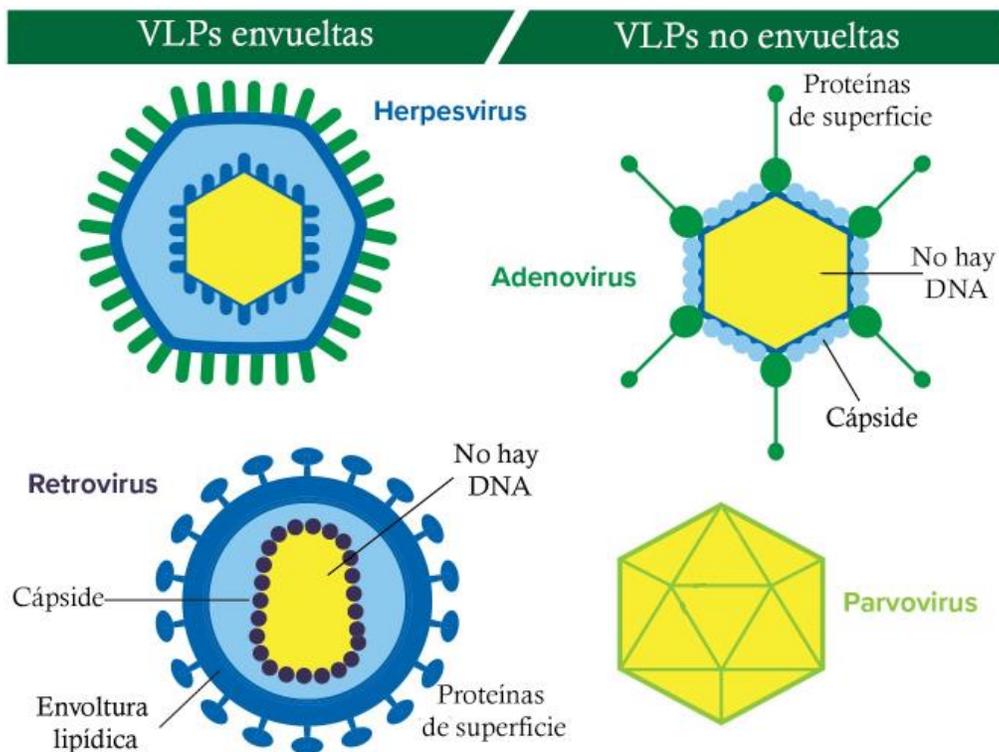


Figura 7. Características de VLPs envueltas y no envueltas. Las VLPs envueltas (izquierda) están compuestas de una bicapa lipídica que contiene diferentes proteínas incrustadas lo cual le provee la especificidad y permite la fusión de membranas entre las VLPs y sus células blanco. Las VLPs no envueltas (derecha) están formadas únicamente por proteínas, ningún tipo de VLPs contiene el material genético original del virus del que desciende.

Algunas VLPs pueden requerir modificaciones postraduccionales en sus proteínas estructurales para un adecuado ensamblaje de la cápside y, lo que es más importante (para fines de uso potencial como portador de vacunas), algunas proteínas estructurales a menudo pueden soportar cierto grado de modificación antes de perder la capacidad de auto ensamblarse en VLPs [43]. La característica atractiva de las VLPs es que puede aumentar la inmunogenicidad de los antígenos acoplados a ellas, debido a que se presentan en un estado particulado y los antígenos se muestran en una disposición altamente repetitiva. Además, la presencia de PAMPs en las VLPs permite la activación del sistema inmune innato y adaptativo.

La producción de VLPs se logra mediante la introducción de genes recombinantes que codifican las proteínas estructurales de los virus nativos. Este procedimiento se ha llevado a cabo en varios sistemas de expresión, como bacterias, levaduras, células de insectos, células vegetales o animales. Las proteínas estructurales pueden auto ensamblarse en cápsides en el citosol de las células y posteriormente purificarse, o pueden ensamblarse en entornos libres de células a partir de proteínas estructurales purificadas [1], esto evita la encapsulación de DNA o RNA (ácido ribonucleico) de las células de producción. Estas propiedades han llevado al estudio de una gran cantidad de VLPs como posibles sistemas de administración de antígenos en el cáncer (Tabla 1).

Tabla 1. VLPs no envueltas usadas en la inmunoterapia del cáncer.

VIRUS PARENTAL DE LAS VLPS	TIPO DE VLPS	SISTEMA DE PRODUCCIÓN	TAMAÑO (NM)	ANTÍGENOS ACOPLADOS	TIPO DE CÁNCER	RESPUESTA	REFERENCIA
RHDV	NE	Baculovirus	35-40	gp33, OVA,, gp100.2L, gp100.3L, topoisomerasa, Surviving peptides	Pulmón, Melanoma Colorrectal	↓ crecimiento tumoral, ↑ Mayor supervivencia Respuesta de linfocitos CD8	[44, 45] [46] [47]
NÚCLEO DE HEPATITIS B (HBC)	NE	<i>E. coli</i>	26-48	-Proteína idiотipo -Péptidos HBx -MAGE 1,3 -AFP1 -AFP2 -Claudina-18 isoforma 2	-Linfomas con proteína idiотipo -Hepatocarcinoma -Melanoma B16 -Adenocarcinoma	↓ crecimiento tumoral, ↑ Supervivencia -Respuestas humorales y celulares -ADCC	[48] [49] [50, 51] [52]
MS2	NE	<i>E. coli</i>	25	Proteína idiотipo	Linfomas con proteína idiотipo	-Respuestas humorales protectoras -↑ Supervivencia	[48]
BACTERIÓFAGO QB	NE	<i>E. coli</i>	30	-Péptidos de Melan-A	Melanoma	-Respuestas CD8 en pacientes	[53]
FAGO DE ACINETOBACTER AP205	NE	<i>E. coli</i>	36	Dominio extracelular de HER-2	Mama	Anticuerpos (anti-HER2) ↓ crecimiento tumoral	[54]
POLIOMAVIRUS	NE	<i>E. coli</i>	45	OVA, TRP2, Antígeno prostático específico (APE)	Melanoma Línea de cáncer de mama que expresa APE	↑ Supervivencia Respuestas CD8 y CD4	[55, 56]
PAPILOMAVIRUS	NE	Baculovirus	55	Proteína E7	Cervical	↓ crecimiento de tumor primario -Respuestas CD8 -Erradicación terapéutica de tumor	[57, 58]
VLPS DE LA ENFERMEDAD DE LA BURSA	NE	Levadura	25	Proteína E7	Cervical,	-Producción de IFNγ	[59]
VIRUS DEL MOSAICO DEL CAUPÍ	NE	Planta	28	ninguno	Mama Colon	↓ Metástasis ↓ Crecimiento de tumor	[60]
VIRUS DEL MOSAICO DE TABACO	NE	Planta	300x18	Péptido P15E	Carcinoma de timo	↑ Supervivencia	[61]

RHDV; virus de la enfermedad hemorrágica de conejo (por sus siglas en inglés).
NE; no envueltas. **ADCC**; citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo (por sus siglas en inglés) **NM**; nanómetros. **MAGE**

2.6.2. VLPs para la inducción de respuestas antitumorales

La inducción profiláctica de anticuerpos es esencial para prevenir el establecimiento de algunos tipos de tumores inducidos por virus, donde se puede evitar la infección y, por lo tanto, la formación de tumores [62, 63]. Terapéuticamente, las respuestas humorales también son relevantes en algunos tipos de cáncer que expresan receptores de importancia para la supervivencia de las células tumorales. En el modelo de linfoma de células B, las VLPs de bacteriófagos MS2 se han utilizado para inducir respuestas contra la proteína idiotipo, induciendo respuestas humorales protectoras a través de la activación de apoptosis en estas células [48].

En el cáncer de mama HER-2 positivo, las VLPs derivadas del fago AP205 (el cual infecta a bacterias *Acinetobacter*) que llevan el dominio extracelular de HER-2 han demostrado inducir actividad antitumoral al estimular fuertes respuestas de anticuerpos que pueden evitar la formación de tumores en esquemas profilácticos y reducir el crecimiento tumoral de forma terapéutica [54]. En modelos de cáncer de colon, las VLPs del antígeno recombinante del núcleo de la hepatitis B (HBcAg) con la isoforma de claudina-18.2 (CLDN18.2) como marcador selectivo de linaje celular asociado al tumor son capaces de inducir anticuerpos que matan células CLDN18.2 [52].

Estos anticuerpos hacia antígenos tumorales pueden inhibir las vías de señalización del receptor relacionadas con la proliferación en las células tumorales o pueden inducir ADCC o activación del complemento, lo que lleva a la muerte de las células tumorales. Sin embargo, solo la inducción de anticuerpos a menudo es insuficiente para inducir la reducción de la mayoría de los tumores sólidos, ya que las respuestas celulares son críticas en el establecimiento del tumor y en el éxito de la inmunoterapia [64, 65].

Las VLPs son capaces de inducir respuestas humorales y celulares simultáneamente a pesar de ser antígenos exógenos, ya que son potentes inductores de presentación cruzada en células presentadoras de antígeno (APC) [66, 67]. Este proceso puede ocurrir porque las VLPs pueden escapar de los endosomas al citosol, para ser degradados por el inmunoproteosoma y liberar péptidos que se cargarán en las moléculas de MHC de clase I para su presentación a los linfocitos T [68], igualmente las VLPs pueden degradarse y cargarse en moléculas de MHCI en los endosomas o el retículo endoplásmico independientemente del proteosoma [69].

Dependiendo de la ruta de administración, las VLPs pueden inducir respuestas inmunitarias sistémicas o más localizadas. Las VLPs de hepatitis B con proteínas MAGE (genes de antígenos de melanoma, por sus siglas en inglés) inducen células CD8 citotóxicas específicas de antígeno en el drenaje de los ganglios linfáticos, lo que causa un efecto antitumoral *in vivo* [50]. Las VLPs del virus del mosaico del

tabaco sin antígenos asociados, administrado por inhalación reducen el melanoma de pulmón B16F10 establecido e inducen inmunidad antitumoral sistémica mediante la activación del sistema inmune innato [60]

Las VLPs cargadas con varios antígenos tumorales han demostrado ser capaces de inducir respuestas inmunes celulares contra péptidos derivados de antígenos tumorales. Las VLPs de poliomavirus murino, que transportan el antígeno prostático específico humano cargadas en células dendríticas, protegen contra tumores e inducen células CD8 productoras de interferón (IFN γ) [56]. Las VLPs del virus del mosaico del tabaco cargadas con una baja cantidad de péptidos de melanoma (<1 μ g) pueden ser capturados y presentados en células presentadoras e inducir respuestas celulares que mejoran la protección contra el establecimiento de tumores [61].

Estos trabajos mostraron que las VLPs pueden unir varias secuencias de antígenos tumorales e inducir respuestas inmunes celulares y humorales capaces de afectar el crecimiento tumoral primario y la metástasis. Sin embargo, no existe una ruta de inmunización estándar para la inducción de respuestas inmunes que sean capaces de afectar las células tumorales en el tumor principal, así como a las células que han salido del tumor para colonizar órganos distantes.

2.6.3. VLPs como un sistema de entrega a los ganglios linfáticos

En la inmunoterapia, las VLPs utilizadas como sistema de entrega de medicamentos antitumorales pueden disminuir los efectos secundarios asociados con estas terapias [70, 71]. Son útiles como un sistema de entrega de genes y proteínas que inducen la apoptosis en las células tumorales susceptibles a su infección [72, 73]. Desafortunadamente, estos enfoques de administración no pueden proporcionar respuestas inmunológicas antitumorales de memoria ante futuros surgimientos de nuevas células tumorales; para esto, es necesario inducir respuestas inmunes celulares y humorales a los componentes tumorales.

Las VLPs han sido consideradas como un sistema de entrega dirigido preferentemente a los ganglios linfáticos. Por inyección cerca del tumor, las VLPs pueden alcanzar los ganglios linfáticos centinelas y entrar al tumor. Su tamaño nanométrico está relacionado con su capacidad de ingresar a los ganglios linfáticos y al tumor por diferentes rutas. Las células dendríticas residentes de tejido capturan partículas mayores de 200 nanómetros (nm) y luego son transportadas por estas células a los ganglios linfáticos. Por otro lado, las partículas de tamaños más pequeños de 20-200 nm pueden ingresar libremente a los ganglios linfáticos a través de los vasos linfáticos [80], el rango de partículas de \sim 30 nm es el que se informa como más eficiente para la entrada libre hacia los ganglios linfáticos (Figura 8).

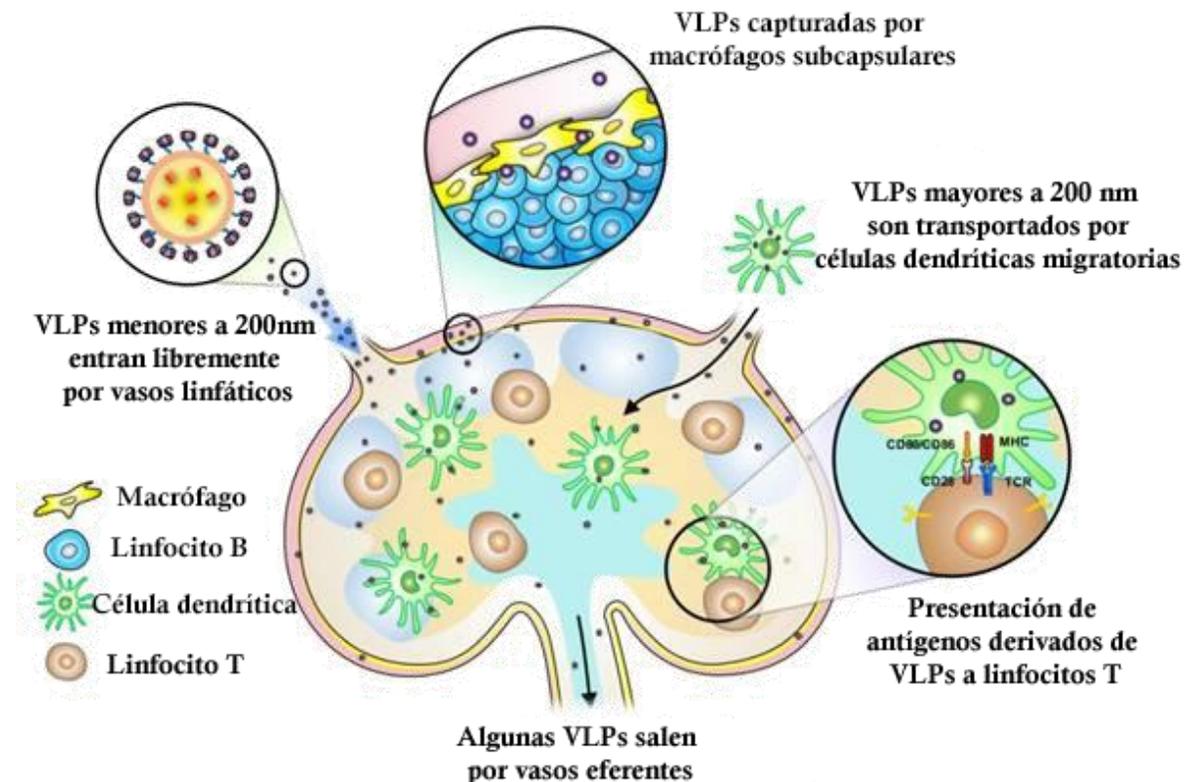


Figura 8. Entrada de VLPs a ganglios linfáticos según su tamaño. VLPs de tamaños menores a 200nm llegan a los ganglios linfáticos a través de los vasos linfáticos, dentro del ganglios las VLPs pueden ser captadas por diferentes poblaciones como macrófagos subcapsulares, células dendríticas residentes y linfocitos B. las VLPs mayores a 200nm se mantienen en el sitio de inyección y son transportados a los ganglios por células presentadoras migratorias como células dendríticas y macrófagos. Una vez que la VLPs han sido procesadas por las células presentadoras dentro de los ganglios, éstas presentan antígenos a linfocitos T para su activación.

Las VLPs Q β y otras nanopartículas pequeñas (20-200 nm) pueden ingresar libremente en los ganglios linfáticos donde pueden ser tomadas por las células dendríticas residentes CD8-CD11b+, CD8+CD11c+, las células dendríticas derivadas de los monocitos CD11b + CD11c + y CD11b + F4 / 80 + macrófagos [74]. Las células dendríticas CD8+ son una subpoblación especializada en antígenos de presentación cruzada de linfocitos T [75]. Es posible mejorar la captación de VLPs por una determinada población de células presentadoras; por ejemplo, la manosilación de VLPs del virus de la enfermedad hemorrágica del conejo mejoró la absorción de VLPs por las células dendríticas, los macrófagos y las células B por el receptor de manosa [76]. La inmunización con VLPs en un rango de tamaño de 20-200 nm les permite el ingreso a los ganglios linfáticos locales cerca del sitio de inmunización. En este sitio, las APC capturan VLPs y las células dendríticas pueden presentar antígenos por presentación cruzada para inducir respuestas de linfocitos citotóxicos capaces de retrasar el crecimiento tumoral *in vivo* en diferentes modelos de cáncer [44,45,77]. Las poblaciones involucradas en el procesamiento de VLPs para la inducción de respuestas inmunes antitumorales se resumen de forma general en la Figura 9.

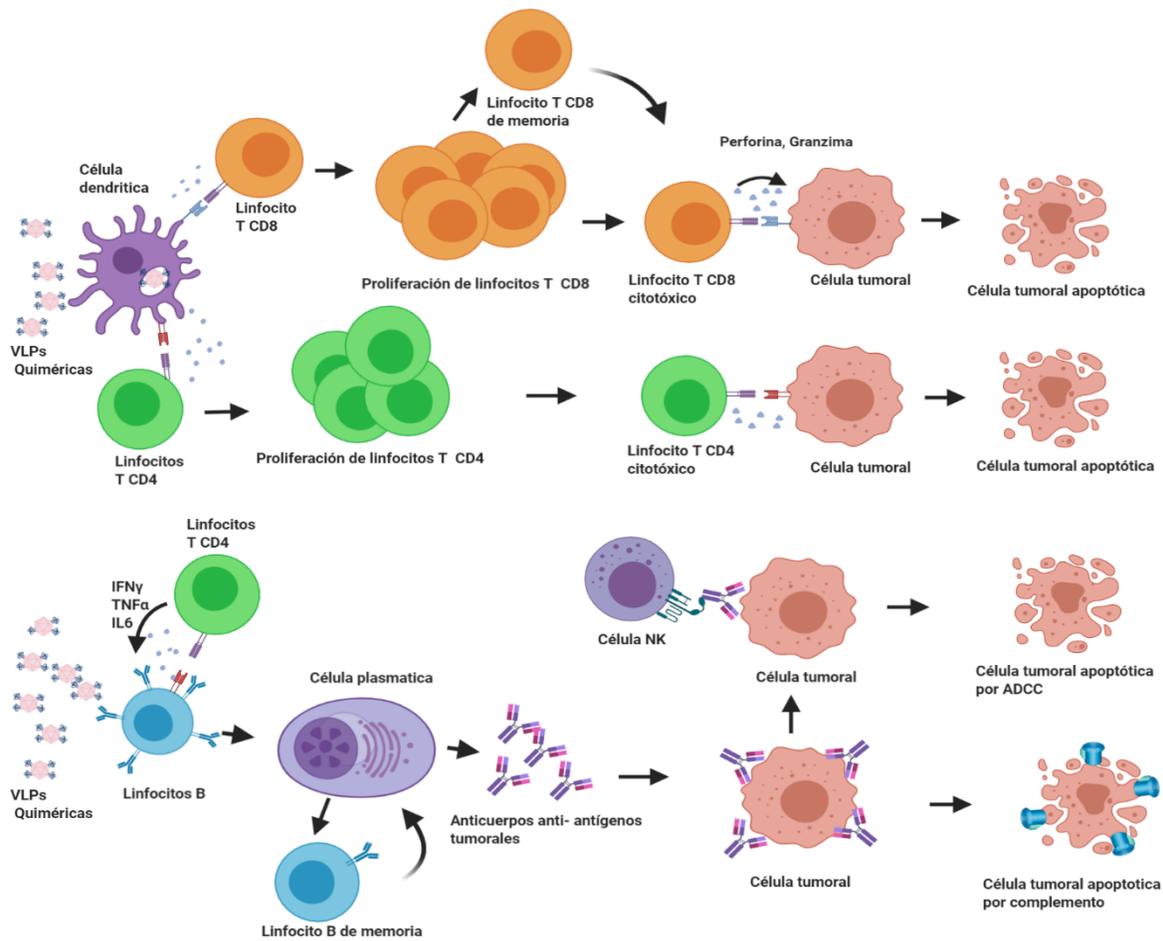


Figura 9. Procesamiento de VLPs en ganglios linfáticos. Las VLPs que contienen algún antígeno tumoral (VLPs quiméricas) entran a los nódulos linfáticos y son capturadas por células presentadoras de antígeno como las células dendríticas, las cuales por presentación cruzada presentan antígenos tumorales a linfocitos T CD4 y CD8 e inducen su activación; posteriormente estos linfocitos pueden proliferar y son capaces de matar a las células tumorales que presenten el antígeno tumoral específico, manteniendo células de memoria que pueden proteger contra posteriores apariciones de células tumorales con el mismo antígeno. Las VLPs quiméricas también pueden ser reconocidas por linfocitos B, los cuales se transforman en células plasmáticas liberadoras de anticuerpos anti-antígeno, los cuales pueden ayudar a la eliminación de células tumorales mediante la activación del complemento y ADCC mediada por células NK.

La ruta de inmunización de las VLPs afecta su entrada a los diferentes ganglios linfáticos, VLPs de 90 nm han mostrado una entrada rápida a los ganglios inguinales y poplíteos después de cinco minutos de una inmunización subcutánea (s.c.) en la almohadilla del pie de los ratones, permaneciendo en los ganglios hasta seis días. [78] La preexistencia de títulos altos de anticuerpos anti-VLPs no interfiere significativamente con la inducción de respuestas hacia nuevos antígenos específicos mostrados en las VLPs [79], lo que permite protocolos de múltiples inmunizaciones. Se ha demostrado que la inducción de anticuerpos contra antígenos tumorales en VLPs afecta las respuestas celulares. Sin embargo, con el aumento de la densidad del antígeno en las VLPs, el uso de inmunizaciones repetidas y el uso de altas dosis de VLPs se ha logrado evitar este efecto [80].

Después de la entrada de las VLPs al ganglio linfático, las VLPs están presentes en las regiones subcapsular, medular y cortical en tiempos cortos (menos de 1 hora) (Figura 8). En tiempos mayores (24 horas), también se pueden detectar en los folículos de células B unidas a las células dendríticas foliculares [81]. El estudio de la cinética de transporte de VLPs en el ganglio linfático mostró que las VLPs pueden llegar a diferentes poblaciones de APC como los macrófagos CD11b+ F4/80+, diferentes células dendríticas como CD8+ CD11c+, CD8- CD11b+ y CD8+ CD11c+, así como linfocitos CD45R/ B220+ [81].

Debido a la presencia de PAMP en las VLPs, estas pueden inducir la activación de las APC mediante la inducción de sobreexpresión de MHC de clase II (MHC II) y moléculas coestimuladoras como CD86 y CD40, además de la liberación de citocinas proinflamatorias, esta capacidad es la que proporciona las características de adyuvante a las VLPs y conduce a una mejor inducción de respuestas hacia antígenos tumorales acoplados [74, 82]. A pesar de este efecto adyuvante intrínseco, los adyuvantes como CpG se han acoplado o encapsulado en VLPs para garantizar que sean administrado de manera simultánea con los antígenos tumorales a la misma población de células presentadoras [81, 89, 92], lo que ha demostrado la capacidad de aumentar la respuesta de las células T CD8 citotóxicas y de memoria en pacientes [83].

Una vez que las VLPs llegan a las APC en los ganglios linfáticos, pueden ingresar a las células por diferentes rutas dependiendo de su tamaño. Las partículas mayores de 0,5 μm entran por fagocitosis o macro pinocitosis e inducen respuestas humorales. Pequeñas partículas de 20-200 nm ingresan a la célula por endocitosis mediada por receptor y pueden inducir respuestas de células T CD4 y CD8 por presentación cruzada de antígeno [83].

La presentación cruzada de los antígenos en las VLPs en las APC puede estar mediada por la ruta dependiente del transportador asociado con el procesamiento de antígeno (TAP), que requiere el escape de los antígenos-VLPs de los endosomas al citosol y la degradación por el inmunoproteosoma. La modificación de los conectores utilizados para unir los antígenos a los VLPs puede permitir la liberación

preferencial de los péptidos de interés por el proteosoma[46]. Los antígenos pueden alcanzar la ruta independiente del TAPs mediante la fusión de endosomas que contienen VLPs con endosomas que poseen MHCI [44, 84]; ambas rutas conducen a la degradación de VLPs y la liberación de péptidos para su carga en moléculas de MHCI. Las VLPs son capaces de inducir la presentación de péptidos tanto en moléculas MHCI y II simultáneamente, por lo que la adición de epítomos de células CD4+ y CD8+ dentro de las mismas VLPs puede permitir la inducción de ambos tipos de respuesta de células T, lo que permite la inducción de respuestas antitumoral más eficaz [85, 86]

2.6.4. Uso de múltiples epítomos para mejorar la eficacia de la vacuna.

Aunque el uso de péptidos individuales ha demostrado la capacidad de inducir respuestas celulares citotóxicas en modelos preclínicos, el éxito de esta estrategia sigue siendo limitado en humanos [87, 88]. Los avances en la secuenciación del exoma tumoral muestra heterogeneidad antigénica en los tumores, lo que demuestra que un enfoque con múltiples epítomos puede ser necesario para la inducción de respuestas más efectivas [45, 89]. Diversos enfoques han demostrado la capacidad de inducir respuestas inmunes a múltiples epítomos tumorales de manera efectiva [90-93]. La elección de un sistema de entrega para estos antígenos es importante para la inducción de respuestas inmunes [94]. Estudios recientes han demostrado la efectividad del uso de nano discos con múltiples neoepítomos (epítomos exclusivos de una célula que surgen por mutaciones somáticas) de la línea tumoral B16F10 para retrasar el crecimiento de los tumores B16F10, logrando la erradicación del 90% del tumor cuando se administra junto con inhibidores anti-punto de control CTLA-4 (antígeno de linfocitos T citotóxicos 4) y anti-PDL-1 [95]. Mientras que las construcciones de múltiples epítomos solubles no lograron erradicar los tumores, el suministro de antígenos y adyuvantes, en forma de partículas a los ganglios linfáticos para llegar a las células presentadoras especializadas y su activación, ha demostrado ser extremadamente importante para inducir estas respuestas antitumorales [96].

Diferentes VLPs se han probado como sistema de entrega para múltiples epítomos en enfermedades infecciosas, mostrando la capacidad de inducir respuestas de anticuerpos y linfocitos citotóxicos significativamente más altas que el uso de péptidos individuales[97]. En el cáncer, las VLPs con múltiples epítomos de linfocitos B y T del MAGE-A3 han demostrado la capacidad de inducir respuestas de anticuerpos y linfocitos citotóxicos *in vivo* en modelos de melanoma en ratones [98]. Las VLPs de hepatitis B con múltiples epítomos de HBx pudieron inducir respuestas celulares citotóxicas, que permitieron la lisis de células tumorales hepáticas, y mostraron que los epítomos subdominantes pueden ser responsables de las respuestas antitumorales [49]. Las VLPs del virus de la enfermedad hemorrágica del conejo también mostraron que la adición de diferentes antígenos podría mejorar la

supervivencia y las respuestas inmunitarias antitumorales con respecto a las monoterapias en un modelo de cáncer de colon [47]. Estudios como los mostrados en la Tabla 1 han demostrado la capacidad de las VLPs como un sistema de entrega de antígenos para la inducción de respuestas inmunes antitumorales en nódulos linfáticos cercanos al tumor, lo que puede repercutir en el crecimiento del tumor y la metástasis a otros órganos.

2.7. VLPs del parvovirus B19

Las VLPs del parvovirus humano B19 (o *erythroparvovirus primate 1*) pueden ser formadas por 60 copias de la proteína estructural VP2, la cual puede obtenerse por recombinación en *E. coli*, de forma desnaturalizada, lo que aumenta sus rendimientos de producción. En un ambiente *in vitro* libre de células una vez re-naturalizadas las proteínas VP2 son capaces de formar espontáneamente cápsides de ~20 nm de diámetro [99]; además se ha demostrado que estas VLPs son capaces de portar péptidos de hasta 250 aminoácidos (a.a.), correspondientes a la proteína verde fluorescente (GFP), en su región amino terminal y expresarlos en su superficie sin perder su capacidad de formar cápsides y sin afectar sus rendimientos de producción [100], lo que las hace viables como sistema de entrega para vacunas multiepitópicas.

Se ha reportado que las VLPs de parvovirus son capaces de inducir fuertes respuestas celulares al inducir presentación cruzada en células dendríticas CD8⁺ [101, 102], estas características junto con su facilidad de ensamblaje, alta estabilidad y bajos costos de producción las hace atractivas como sistema de entrega de antígeno para inmunoterapia. Debido a esto, en el presente trabajo se utilizaron VLPs-B19 como sistema de entrega de múltiples neoepítomos y epítomos de TAAs.

A pesar de que el uso de VLPs con múltiples epítomos puede ser una buena estrategia para inducir respuestas inmunes. Es bien sabido que en los pacientes con cáncer existe un estado de tolerancia inmunitaria, entre cuyos mecanismos se encuentra la inactivación de las APC, al inducir la disminución de moléculas coestimuladoras importantes como CD80/CD86 y citosinas. La disminución de moléculas coestimuladoras y citocinas evita que los linfocitos específicos hacia los epítomos tumorales sean completamente activados. Debido a esto, el uso de sustancias que aumenten las moléculas coestimuladoras y citocinas proinflamatorias en las APC son ampliamente utilizadas para permitir la inducción de respuestas tanto a antígenos exógenos como endógenos [103]. Los adyuvantes son sustancias que al ser coadministradas con un antígeno aumentan la respuesta inmune hacia éste, principalmente por su capacidad de activar APC, permitiendo el procesamiento y presentación de péptidos hacia linfocitos con las 3 señales

necesarias para la activación de linfocitos, lo que facilita la inducción de respuestas citotóxicas hacia las células tumorales [104, 105].

2.8. Protoxina Cry1Ac como adyuvantes para vacunas contra el cáncer

Se ha reportado que el uso de adyuvantes junto a las VLPs B19 aumenta las respuestas hacia el virus nativo B19 [106]. Por ello hipotetizamos que el uso VLPs-multiepitópicas junto a un adyuvante podría potenciar la respuesta inducida por las VLPs, al activar las APC que puedan procesar dichas VLPs y presentarlas a linfocitos mediante presentación cruzada.

A pesar de que los adyuvantes utilizados en la actualidad son capaces de inducir fuertes respuestas inmunes, éstos han sido asociados a riesgos de toxicidad y/o inflamación crónica, formación de granulomas, entre otros efectos secundarios no deseados, por lo que se requieren nuevos adyuvantes que carezcan de dichos efectos adversos y mantengan una fuerte inducción de respuestas inmunes.

En este trabajo utilizamos como adyuvante a la protoxina Cry1Ac, la cual es una delta endotoxina producida por la bacteria grampositiva *bacillus thuringiensis* durante su fase de esporulación. La protoxina Cry1Ac es una proteína de 130 kDa formada por siete dominios, los dominios 1 al 3 corresponden al núcleo tóxico, también llamado toxina Cry1Ac[107], la cual tiene efectos insecticidas en larvas de lepidópteros (mariposas y polillas) por lo cual se ha usado ampliamente como bioinsecticida y en plantas transgénicas[108]. La protoxina ha demostrado tener efecto adyuvante igual o mayor a la toxina del cólera (el adyuvante de mucosas más utilizado a nivel experimental) sin efectos tóxicos en vertebrados. La protoxina Cry1Ac tiene efecto adyuvante tanto a nivel sistémico como a nivel mucoso, ha demostrado efecto adyuvante al coadministrarse con diversos antígenos como ovoalbúmina, péptidos de HIV, antígenos de superficie de hepatitis B y polisacáridos de neumococos, y ha demostrado proveer protección en modelos de infección de meningoencefalitis, cisticercosis, malaria murina y brucelosis, en esta última a través de la inducción de respuestas citotóxicas mediadas por linfocitos CD8. Parte de su mecanismo de acción es el aumento en la expresión de las moléculas coestimuladoras CD80 y CD86 en APC, y la inducción de producción de citocinas proinflamatorias como TNF- α , IL-6 y CCL-2 por parte de éstas células [109-111]. Además, en un estudio actual del laboratorio se ha demostrado que la coadministración de lisados celulares de la línea de cáncer de mama murino 4T1 junto a la protoxina Cry1Ac es capaz de inducir respuestas inmunes capaces de evitar el establecimiento de tumores inducidos con la línea 4T1 (en proceso de publicación), estos resultados parecen sugerir que este adyuvante es capaz de romper la tolerancia hacia antígenos tumorales permitiendo la inducción de respuestas antitumorales, el mecanismo involucrado en este efecto se está estudiando actualmente. La capacidad de este adyuvante de inducir respuestas

humorales y celulares además de su falta de toxicidad en vertebrados y su bajo costo de producción son características deseables para los nuevos adyuvantes en cáncer, además de que concuerda con nuestro enfoque de bajos costos para fácil aplicación.

3. Justificación

Debido a que ahora es posible identificar los TAAs y neoepítomos presentes en un tumor de una manera rápida, es posible elegir y priorizar epítomos para utilizarse en la inmunoterapia; sin embargo, un aspecto importante para la inducción de respuestas inmunes efectivas contra estos epítomos es la elección del sistema de entrega. Las VLPs como sistema de entrega de antígenos han mostrado ventajas como la inducción de presentación cruzada y potenciamiento del sistema inmune. Las VLPs-VP2-B19 además, poseen características deseables para los sistemas de entrega en cáncer; son capaces de auto ensamblarse de forma *in vitro*, sin verse afectadas por la adición de péptidos de hasta 250 a.a. en su región amino terminal, son capaces de producirse en *E. coli* facilitando su purificación, además, una vez ensambladas son altamente termoestables en temperaturas hasta de 40°C [99] lo cual es deseable ya que evita lo riguroso de la cadena de frío de las vacunas. Las características de estas VLPs parecen indicar que pueden ser buenos candidatos como sistemas de entrega de antígeno en la inmunoterapia por lo que es importante evaluar si dichas VLPs cargadas con múltiples epítomos de TAAs y neoepítomos son capaces de inducir respuestas inmunes antitumorales y si la adición de un adyuvante facilita o mejora la inducción de estas respuestas con el fin averiguar su potencial uso en la inmunoterapia.

4. Objetivos e hipótesis

4.1 Hipótesis

Las VLPs-B19 cargadas con TAAs o neoepítomos administradas junto con la protoxina Cry1Ac como adyuvante serán capaces de inducir respuestas celulares y humorales antitumorales que retrasarán o evitarán el crecimiento tumoral y la metástasis en pulmón.

4.2. Objetivo general

Diseñar y evaluar el efecto antitumoral de dos construcciones quiméricas multiepitópicas utilizando como sistema de entrega las VLPs-VP2-B19 cargadas con neoepítomos y/o epítomos de TAAs junto con el adyuvante protoxina Cry1Ac, en un modelo murino de cáncer de mama triple negativo inducido por la línea celular 4T1.

4.2.1. Objetivos particulares

1. Elegir epítomos de TAAs y neoepítomos de la línea celular 4T1.
2. Diseñar y caracterizar *in silico* una proteína VP2 multiepitópica.
3. Expresar y purificar las proteínas VP2-WT y VP2 multiepitópicas en *E. coli*.
4. Evaluar en un modelo profiláctico si las VLPs-multiepitópicas son capaces de afectar el establecimiento del tumor o el crecimiento tumoral.
5. Evaluar en un modelo terapéutico si las VLPs-multiepitópicas son capaces de afectar el crecimiento tumoral.
6. Evaluar si existen cambios en las poblaciones inmunes de importancia en cáncer (T_{reg}, MDSC, CD8⁺, CD4⁺, NK) inducidos por la inmunización con VLPs-WT o VLPs-multiepitópicas en ratones con cáncer de mama.
7. Evaluar si se inducen respuestas celulares y humorales hacia las VLPs-multiepitópicas y hacia los epítomos en ellas en los ratones inmunizados con las VLPs-multiepitópicas.
8. Evaluar el efecto de las VLPs-WT o VLPs-multiepitópicas en la macrometástasis en pulmón inducida por la implantación de la línea 4T1.
9. Evaluar si las VLPs-WT pueden afectar la adhesión a matriz extracelular, migración o inducir apoptosis de las células tumorales *in vitro*.
10. Evaluar si las VLPs pueden dirigirse a ganglios linfáticos o al tumor principal y si pueden ser endocitadas por APC o células tumorales.
11. Evaluar si la adición del adyuvante protoxina Cry1Ac mejora el efecto antitumoral y anti metastásico de las VLPs multiepitópicas.

5. Estrategia metodológica

5.1 Diseño de VLPs quiméricas

Para el diseño de la vacuna multiepitópica se realizó una búsqueda bibliográfica de epítomos de TAAs y neoepítomos de la línea 4T1, utilizando criterios de inclusión (mencionados más adelante). Las construcciones quiméricas fueron analizadas *in silico* con diversos softwares informáticos para conocer su estructura secundaria (Gor4, Jpred4), disposición espacial (I-TRASSER, phyre-2), procesamiento por inmunoproteosoma (IDEA Analysis Resource) y unión a MHC I de ratón (H2D^d) (PredBalb/c)

El vector de expresión de la proteína VP2-WT fue construido previamente [19]. Se diseñaron dos construcciones multiepitópicas, una constituida por los neoepítomos Tmtc2 (QGVTVLAVSAVYDIFVFHRLKMKQILP), GPRC5a (FAICFSCLLAHALNLIKLVRGRKPLSW), Qars (FPPDAINNF) y el epítomo de survivina GWEPDDNPI, dichos epítomos fueron añadidos a la región amino terminal de la proteína VP2, separándolos con conectores rígidos formadores de hélices alfa formados por la secuencia A(EAAAK)₃, esta construcción fue llamada VP2-Neo. La segunda construcción estaba constituida por 3 epítomos de la proteína P53 (AIYKKSQHM, LAKTCPVQLWVS, KYMCNSSCM) y un epítomo de la proteína MUC1 (GVTSAPDTRPAPGSTAPPAH), estos epítomos se añadieron a la VP2 como se mencionó anteriormente, la segunda construcción fue nombrada VP2-TAAs. Las construcciones quiméricas fueron analizadas *in silico* con diversos softwares informáticos para conocer su estructura secundaria (Gor4, Jpred4), disposición espacial (I-TRASSER, phyre-2), procesamiento por inmunoproteosoma (IEDB Analysis Resource) y unión a MHC I de ratón (H2D^d) (PredBalb/c) para elegir el mejor orden de los epítomos en la construcción. Una vez decidida la disposición, la secuencia de DNA se optimizó para su expresión en *E. coli*, los genes recombinantes que codificaba la proteína VP2-Neo y VP2-TAAs se sintetizaron químicamente por la compañía Epoch Life Science Inc (Missouri, Texas, EE. UU.), los genes fueron recibidos en el vector pBSK y fueron subclonados en el vector de expresión pet22b (Novagen, Madison, Wisconsin, EE. UU.), para esto; Los genes correspondientes a nuestras construcciones de peso esperado de ~2000pb fueron amplificados mediante PCR con una polimerasa de alta fidelidad (pfu) y purificados a partir del gel de agarosa 1% utilizando el GeneJet Gel extraction kit (Thermo fisher). Los genes fueron introducidos al vector pUC18 mediante corte y empalme simultaneo utilizando la enzima de restricción Sma I y la ligasa T7 durante 1 h a temperatura ambiente, bacterias TOP 10 competentes fueron transformadas por choque térmico con 3 µL de la reacción y se corroboró la presencia del inserto en el vector mediante cortes con enzimas de restricción (Nde I y EcoR I) en minipreps de las colonias obtenidas. Posteriormente, el fragmento de interés fue extraído del

vector pUC18 mediante corte con las enzimas Nde I y EcoR I y recuperado como se menciona anteriormente, los fragmentos de interés fueron introducidos al vector pET22b el cual fue previamente linealizado con las enzimas Nde I y EcoR I, la ligación se realizó mediante la ligasa T7 durante toda la noche a 4°C. Los plásmidos finales se llamaron Pet-VP2-WT, pet-VP2-Neo y Pet-VP2-TAAs, que codifican proteínas VP2 silvestre (VP2-WT), VP2 con neoepítomos (VP2-Neo) y VP2 con antígenos asociados a tumor (VP2-TAAs) respectivamente. Todos los plásmidos fueron mantenidos en Células TOP 10, la identidad de los genes de las construcciones fue confirmada por secuenciación de Sanger por la compañía Epoch Life Science Inc. Las construcciones en el vector de expresión fueron introducidos a bacterias *E. coli* BL21 (DE3) para su expresión.

5.2. Purificación y ensamblaje de VLPs

5.2.1. Expresión

Para extraer las proteínas de interés, células *E. coli* BL21 transformadas se cultivaron en medio LB + ampicilina (100 µg/mL) a 37 °C hasta la fase media exponencial ($Abs_{600}=0.6$), en este punto se añadió isopropil β-D-1-tiogalactopiranosido (IPTG) para una concentración final de 0.1mM y se cultivaron 12 h adicionales. Las células se recuperaron por centrifugación a 10000 rpm a 4 °C durante 10 min, el pellet fue resuspendido en buffer de lisis (NaH₂PO₄ 50mM; NaCl 0.3M; pH 6.3), las células se rompieron mediante sonicación usando pulsos de 5s y descansos de 5s durante 15 min en hielo. Las proteínas recombinantes VP2 forman cuerpos de inclusión, como se ha reportado para otras proteínas virales en sistemas procariontes, por lo tanto, los cuerpos de inclusión se recuperaron por centrifugación a 8000 rpm a 4 °C por 20 min, los cuerpos de inclusión que contienen la proteína de interés se lavaron tres veces con buffer A (NaH₂PO₄ 50mM; NaCl 0.3M; Urea 3M; Tritón X-100 2%; pH6.3), una vez con buffer A + DTT 5 mM y finalmente con buffer de lisis. El pellet obtenido de los lavados se solubilizó en 60 mL de buffer de columna (NaH₂PO₄ 50mM; NaCl 0.3M; DTT 2mM; GuHCl 6M; pH 6.3) y se incubó a 37 °C, 200 rpm durante 72 h. La proteína no solubilizada se eliminó por centrifugación a 13000 rpm por 20 min. La purificación de las proteínas VP2-WT, VP2neo, VP2-TAAs y VLPs-GFP con etiqueta de histidina se realizó vía cromatografía de afinidad en condiciones desnaturizantes. Una columna con 10 mL de His pure cobalt resin (Thermo Scientific) se equilibró con buffer de columna y se cargó con 3-5 mL de la proteína solubilizada a un flujo de 2 mL/min. La columna se lavó con dos volúmenes de buffer de columna y dos volúmenes de buffer de columna + 20mM imidazol. La proteína se eluyó con buffer de elución (NaH₂PO₄ 50mM; NaCl 0.3mM; GuHCl 3M; Imidazol 300mM; pH 7.5) y se colectaron fracciones de 5 mL. Las alícuotas se dializaron en agua para eliminar el agente desnaturizante antes de su separación por electroforesis en gel de poliácridamida con SDS (SDS-PAGE) para verificar la presencia y pureza de la proteína en las

distintas fracciones. Las fracciones que contienen proteína pura se concentraron mediante unidades de filtración por centrifugación de 50000 Da (Millipore).

5.2.2. Ensamblaje *in vitro* de VLPs

El ensamblaje de las cápsides se realizó dializando 1.3 mL de proteína (0.5 mg/mL) tres veces contra 50 mL de PBS + L-arginina (NaCl 137 mM; KCl 2.7 mM; Na₂HPO₄ 10 mM; KH₂PO₄ 1.76 mM; L-arginina 0.2M, pH 7.4) a 4 °C en agitación constante durante 12 h. El correcto ensamblaje de las cápsides se verificó mediante dispersión dinámica de luz (con el equipo Zetasizer®). Las alícuotas con presencia de cápsides (más del 90% de cápsides ensambladas) se filtraron por membrana de 0.22 µm y se mantuvieron a 4 °C hasta su uso.

5.3. Producción y purificación del adyuvante protoxina Cry1Ac

La protoxina Cry1Ac se obtuvo de la cepa recombinante de *E. coli* JM103, la cual contiene un plásmido de autoinducción que incluye el gen que codifica para la protoxina Cry1Ac, la cual fue amablemente donada por el Dr. Donal Dean (Universidad estatal de Ohio, Columbus, EE. UU.).

Para la producción de la proteína, células *E. coli* transformadas se crecieron en 500 mL de medio LB + ampicilina (100 µg/mL) a 37 °C, 250 rpm durante 48 h, las células se recuperaron a 10000 rpm durante 15 min a 4 °C, el pellet se resuspendió en buffer de lisis (Tris 50 mM pH 8.0; EDTA 1mM; sacarosa 15%; lisozima 2 mg/mL) durante 1 h a 37 °C. Las células se lisaron por sonicación, 5 ciclos de 5 min a 100 de amplitud en hielo para liberar los cristales que contienen la protoxina. Los cristales se solubilizaron en buffer de carbonatos 0.1M pH 9.6 + DTT 10 mM, se centrifugaron a 10,000 rpm durante 10 min a 4 °C para eliminar los restos celulares y se recuperó el sobrenadante (protoxina Cry1Ac). Para la concentración y purificación de la protoxina Cry1Ac se centrifugó repetidamente con filtros de exclusión molecular de 100 kDa (Millipore), se esterilizó por filtración por 0.22 µm y se mantuvo a 4 °C hasta su uso.

5.4 Animales y líneas celulares

Se usaron ratones BALB/c hembra, de 6 a 8 semanas de edad para este estudio. Los ratones se mantuvieron en micro aisladores, con cubiertas de filtro estériles, tuvieron acceso *ad libitum* a agua y alimentos, y se alojaron bajo un período de luz/oscuridad de 12:12 h en la FES Iztacala, UNAM. Los animales fueron atendidos de acuerdo con las regulaciones federales (NOM-062-ZOO-1999, Ministerio de Agricultura, México). El protocolo de vacunación fue aprobado por el comité institucional de cuidado y uso de animales (IACUC).

Las células de carcinoma mamario de ratón 4T1, y de humano MDA-MB-231 y MCF-7(ATCC, Manassas, Virginia, EE. UU.), se mantuvieron durante por tiempo limitado *in vitro* mediante pases en medio RPMI-1640 o DMEM (Gibco®, Grand Island, Nueva York, EE. UU.). Las células epiteliales normales de colon CLR-1790 se mantuvieron en medio EMEM (Gibco®, Grand Island, Nueva York, EE. UU.). Todos los medios contenían penicilina (100 U / ml), estreptomycin (100 µg / ml) y fungicida (0,75 µg / ml) (Sigma Aldrich, St. Luis, Misuri, EE. UU.) Y fueron complementados con FBS al 10% (Gibco®)

5.5. Esquemas de Inmunización

5.5.1. Esquema terapéutico

Los tumores fueron inducidos por inyección s.c., en la sexta mama de ratones BALB/c, de 3×10^3 células 4T1 que se obtuvieron recientemente del cultivo celular, con una viabilidad superior al 90% (evaluada por exclusión con azul tripano). Los ratones BALB/c con tumores palpables se separaron aleatoriamente en grupos con 5-8 ratones y cada ratón se inmunizó simultáneamente por vía intraperitoneal y s.c. peri tumoral en los días 7, 14, 21 y 28 después de la inducción tumoral con 50 µL del vehículo (PBS), 50 µg de VLPs-WT o 50 µg de VLPs-neo o VLPs-TAAs multiepitópicas recombinantes solo o más 50 µg de adyuvante (protoxina Cry1Ac). El crecimiento del tumor se registró con un vernier digital cada 3 días y el volumen del tumor se calculó de acuerdo con la fórmula $V = L \times S^2 / 2$, donde L es el lado más largo y S el más corto. Se realizaron sacrificios de los ratones los días 15 y 36 después de la inducción tumoral, los animales se sacrificaron mediante dislocación cervical. Se obtuvieron los bazo, los ganglios inguinales, los pulmones y los tumores para su posterior análisis en los días indicados.

Es importante mencionar que, en este trabajo, utilizamos un número menor de células 4T1 (3×10^3) para inducir tumores en ratones BALB/c. Esta concentración celular se eligió para evitar la inducción de procesos necróticos en los tumores observados cuando se usó mayor concentración de células. Queríamos evitar la inducción de necrosis porque provoca lesiones dolorosas en los tejidos de los animales, lo que hace necesario sacrificar a los ratones prematuramente y, por lo tanto, complica la evaluación de los tratamientos antitumorales.

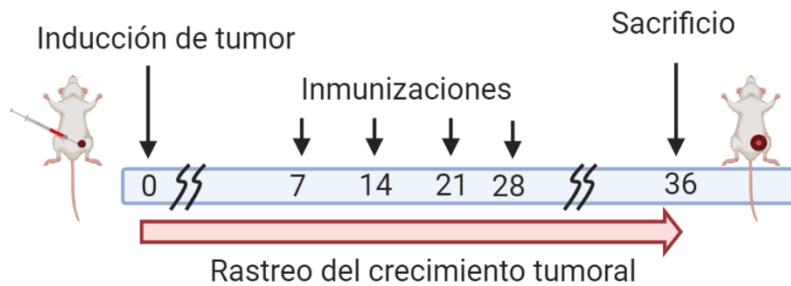


Figura 10. Esquema de inmunización terapéutica. Se muestra de manera general los días de inducción de tumor, inmunización y sacrificio del esquema terapéutico, los detalles de los grupos e inmunizaciones se describen en el texto.

5.5.2. Esquema Profiláctico

Para la evaluación del efecto profiláctico, se formaron grupos de 4-8 ratones y cada ratón se inmunizó simultáneamente por vía intraperitoneal y s.c. peri tumoral en los días -21, -14 y -7 antes de la inducción tumoral con 50 μ L del vehículo (PBS), 50 μ g de VLPs-WT o 50 μ g de VLPs-TAAs solo o más 50 μ g de adyuvante (protoxina Cry1Ac). Siete días después de la última inmunización (día 0) los tumores fueron inducidos por inyección s.c., en la sexta mama de ratones BALB/c, con 3×10^3 células 4T1 que se obtuvieron recientemente del cultivo celular, con una viabilidad superior al 90% (evaluada por exclusión con azul de tripano).

Se obtuvieron muestras de sangre en los días -14, -7 y 0 para el análisis de anticuerpos y el crecimiento del tumor se registró con un vernier digital cada 3 días como se mencionó anteriormente.

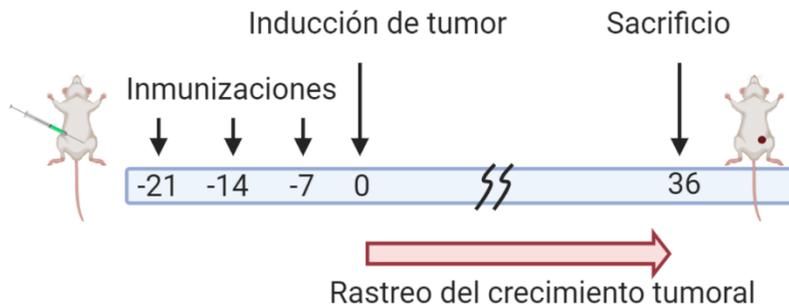


Figura 11. Esquema de inmunización profiláctica. Se muestra de manera general los días de inmunización, inducción del tumor y sacrificio del esquema profiláctico, los detalles de los grupos e inmunizaciones se describen en el texto.

5.6. Análisis de la macrometástasis a pulmón

Para el análisis de las macrometástasis en los pulmones, se utilizó los mismos esquemas descritos anteriormente. Durante el sacrificio, los pulmones se llenaron con 1 ml de una solución de tinta india al 10% (Winsor & Newton, Londres, Reino Unido), en PBS, a través de la tráquea con la ayuda de una cánula. La tráquea se bloqueó con hilo quirúrgico y los pulmones se extrajeron y lavaron 3 veces con 10 ml de solución de Fekete's (85 ml de etanol al 70%, 10 ml de paraformaldehído al 10% y 5 ml de ácido acético) y los pulmones se fijaron en la misma solución durante la noche. Los focos macroscópicos se contaron y fotografiaron con un microscopio estereoscópico, OLYMPUS SZ CTV (Olympus, Tokio, Japón). El índice metastásico se calculó con el número de nódulos de metástasis pulmonares/peso del tumor primario.

5.7. Evaluación de la respuesta inmunológica

5.7.1. Proporción de células inmunes en Bazo y tumor

El bazo, los ganglios linfáticos inguinales y el tumor de los diferentes grupos de tratamiento se desintegraron mecánicamente a través de una malla de plástico, la suspensión celular se filtró y se lisaron los glóbulos rojos. Las células se lavaron y contaron mediante un contador celular automático Bio-Rad TC10TM (Hércules, California, EE. UU.). Para caracterizar las poblaciones, se centrifugaron 1×10^6 células a 400 g durante 5 minutos a 4°C , y el sedimento se trató con $1 \mu\text{g} / \text{ml}$ de anticuerpo anti-CD16 / 32 (Biolegend, San Diego, California, EE. UU., cat # 101302), en 0,5% de BSA-PBS para evitar la unión no específica de los anticuerpos. Para las tinciones extracelulares las células se lavaron con BSA-PBS y se incubaron con la combinación indicada de anticuerpos [CD3-APC, Granzima-B-PE, CD11b-FITC (Biolegend, San Diego, California, EE. UU., Cat #: 100236, 372207, 1012059)] o CD4-PeCy5, CD3-PeCy5, CD8-PE, Gr1-APC (ebioscience, San Diego, California, EE. UU., Cat #: 150041, 150031, 120081, 108412) a una dilución apropiada durante 30 minutos a 4°C en oscuridad. Para las tinciones intracelulares, después del bloqueo con CD16/32 las células fueron incubadas con una solución de fijación/permeabilización (BD citofix/citoperm) antes de la tinción con los anticuerpos marcados. Posteriormente, las células se lavaron para eliminar el exceso de anticuerpo y se fijaron en 300 μl de paraformaldehído al 1%.

5.7.2. Proliferación y citotoxicidad de linfocitos T

La proliferación de células T se analizó el día 15 de tratamiento marcando 3×10^6 células de ganglios inguinales con carboxifluoresceína succinimidil éster (CFSE) (5 μM) (Molecular probes, Eugene, Oregón, EE. UU., Cat #: 11524217), las células se colocaron en placas de 96 pocillos y se estimularon con 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de péptidos sintéticos o 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de VLPs quiméricas durante 96 horas. Posteriormente, las células se recuperaron y se tiñeron para el análisis como se mencionó anteriormente.

El análisis de la citotoxicidad celular mediada por células T se llevó a cabo el día 15 después de la inmunización, células no adherentes del ganglio inguinal se utilizaron para aislar linfocitos T mediante selección negativa con micro perlas MACS CD19 (Miltenyi Biotec, Bergisch, Alemania, gato no 130 -121-301), las células T se contaron y se cultivaron conjunto con 3×10^4 células 4T1 teñidas con CFSE durante 4 horas en diferentes radios de célula tumoral/linfocitos. Las células fueron recuperadas, teñidas con Anexina V-APC y analizadas por citometría de flujo. Todos los datos se obtuvieron en un sistema de citometría de flujo BD FACSCalibur (RRID: SCR_000401) con el software BD CellQuest Pro (Franklin Lakes, Nueva Jersey, EE. UU., RRID: SCR_014489). Los datos de citometría de flujo se analizaron utilizando el software Flowjo 7.6® (FlowJo, Ashland, Oregón, EE. UU., RRID: SCR_008520).

5.7.3. Inducción de anticuerpos

Las placas de ensayo se recubrieron con VLPs-WT, VLPs-Neo (20 $\mu\text{g}/\text{mL}$) o con los péptidos sintéticos indicados (2 $\mu\text{g}/\text{mL}$) (GenScript Co. (NJ, EE. UU.), durante 24 horas a 4 ° C y posteriormente las placas se bloquearon con leche deslactosada al 5% durante 2 horas a 25°C. Las placas se incubaron adicionalmente durante la noche a 4°C con diluciones en serie de sueros de ratón (dilución 1:100 a 1:12,800). Se añadió el anticuerpo secundario, anti-IgG anti-ratón conjugado con peroxidasa de rábano picante de cabra (dilución 1: 2000), y las placas se incubaron durante 1 hora 25°C. Después del lavado, el sustrato 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico) (ABTS) con 1 mM de H₂O₂ se añadió. La D.O. a 405 nm se midió durante 60 min con lector ELISA, los títulos de anticuerpos se calcularon como la máxima dilución en la que una muestra obtuvo una D.O. mayor a su basal sin suero.

5.8. In-cell western

El ensayo de in-cell western fue realizado usando el sistema de imagen Odyssey (LICOR Biosciences, Lincoln, NE, USA) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Células 4T1 fueron crecidas en placas de 96 pozos hasta que alcanzaron 90% de confluencia, se añadieron diferentes concentraciones de VLPs-WT (3.75, 7.5, 15, 30, 60 y 120 $\mu\text{g}/\text{mL}$) durante 1 o 3 horas y después se fijaron con paraformaldehído al 4%, las células fueron bloqueadas con albumina por 30 min.,

lavadas e incubadas con sueros de conejo anti-VLPs durante 24 horas a 4°C, las placas se revelaron con anticuerpo anti IgG de conejo IgG IRDye800 (LI-COR Biosciences) (dilución 1:5000) a temperatura ambiente por 2 horas y lavadas para eliminar el exceso de anticuerpo. Las microplacas fueron escaneadas con el sistema de imagen infrarroja Odyssey CLx, las intensidades de fluorescencia que representa la unión de las VLPs a las células 4T1 fueron adquiridas usando el software Odyssey software versión 3.0.

5.9. Efectos de las VLPs-WT sobre células tumorales

5.9.1. Entrada de VLPs al tumor

Para evaluar si las VLPs podían entrar al tumor después de la inyección s.c. peri tumoral, se inyectó 50 µg de VLPs-GFP de forma s.c. peri tumoral. Después de 1 o 24 horas, se extrajo el tumor y se congeló con tissue tek, se realizaron cortes de 5 micras y se fotografiaron utilizando un microscopio de fluorescencia.

5.9.2. Unión de VLPs a células tumorales

Para analizar si las VLPs podían unirse a las células tumorales, se sembraron 20×10^3 células 4T1 en placas de 96 pozos, se añadió VLPs-GFP (50 µg/mL) durante 3 horas, las células fueron recuperadas y analizadas por citometría de flujo, para evaluar solo la señal intracelular de las VLPs-GFP, antes de la lectura de las muestras en el citómetro las muestras se pre incubaron con azul tripano 0.4% durante 1 minuto para apagar la fluorescencia de la GFP. Este mismo procedimiento se utilizó con células de ganglio inguinal, en las cuales, además, se marcaron con anticuerpos para distinguir las diferentes poblaciones inmunes.

5.9.3. Ensayo de citotoxicidad

Para el análisis del efecto citotóxico de las VLPs en las células tumorales 4T1, se sembraron 3×10^4 células 4T1 en placas de 96 pocillos y se estimularon con 25, 50, 100 o 200 $\mu\text{g/ml}$ de VLPs-WT durante 4 o 24 horas. Para analizar la viabilidad celular a cada pocillo celular (100 μL), se agregaron 10 μL de MTT (5 mg / ml) (Sigma Aldrich, St. Luis, Missouri, EE. UU.) y se incubaron 4 horas adicionales, los cristales de formazán se solubilizaron en isopropanol acidificado y la absorbancia se registró a 570 nm. Para el análisis de la apoptosis temprana, tardía y necrosis después de la incubación de las VLPs con las células tumorales como se describió anteriormente, las células se recuperaron y se tiñeron con Anexina V-APC (Biolegend, San Diego, California, EE. UU., Cat # 640920) y yoduro de propidio (Sigma Aldrich, St. Luis, Missouri, EE. UU.) Las muestras se analizaron por citometría de flujo con un citómetro FACSCalibur, en el que se registraron 10000 eventos por muestra.

5.10. Análisis estadístico

Todos los datos obtenidos se analizaron con el software Graphpad Prism (RRID: SCR_002798), se utilizaron análisis de varianza (ANOVA) y prueba t para determinar diferencias significativas entre los grupos, que se indicaron cuando el valor p fue ≤ 0.1 , ≤ 0.05 , ≤ 0.01 o ≤ 0.001 y se marcaron como *, **, *** o ****, respectivamente. Los resultados se muestran como media \pm error estándar de la media (SEM).

6. Resultados

6.1 Diseño y caracterización de VLPs quiméricas multiepitópicas

6.1.1. Selección de epítomos

Para la selección de epítomos se realizó una búsqueda bibliográfica de los antígenos mutados en células de cáncer de mama. Se utilizaron los siguientes criterios de inclusión: 1) antígenos cuya expresión aberrante se encuentre presentes tanto en humano como en ratón, 2) epítomos que fueran capaces de unirse al MHCI de ratón Balb/c 3) epítomos que hubieran demostrado ser capaces de inducir respuestas inmunes. No se consideró el grado de caracterización de los antígenos, se consideraron epítomos determinados experimentalmente excluyendo aquellos obtenidos por predicciones computacionales.

6.1.2 Antígenos y epítomos seleccionados

P53: fue seleccionada por la alta distribución de su forma mutada en cáncer de mama y otros tipos de cáncer, reportándose mutada en más del 70% de tumores. Se eligieron tres epítomos reportados de las regiones mutadas de esta proteína y los cuales se han encontrado son capaces de inducir respuestas celulares, esto debido a que es una proteína intracelular.

MUC1: es una mucina que se encuentra mutada principalmente en cánceres que surgen de superficies mucosas, entre los cuales se incluye los lobulillos y conductos de la mama, esta mucina contiene una secuencia altamente conservada tanto en ratones y humanos (Tabla 2) dicho epítomo carece de glicosilación en las células de cáncer, y por su localización extracelular lo hace un blanco ideal para inducir respuesta de anticuerpos, la cual se ha reportado hacía varias líneas celulares tumorales.

Survivina: es una proteína anti apoptótica la cual se encuentra sobre expresada en cáncer confiriéndole a la célula una resistencia a la muerte celular, de ella se han reportado múltiples epítomos capaces de inducir respuestas celulares.

Tmtc2, Gprc5 y Qars (neoepítomos) son proteínas de las cuales a partir de secuenciación de última generación del exoma de la línea 4T1 se han identificado mutaciones de variación en un solo nucleótido que inducen el cambio de un a.a., dichos neoepítomos fueron capaces de inducir la producción de IFN γ por parte de linfocitos T CD8 indicando la producción de respuestas celulares.

Tabla 2. Selección de epítomos. Se muestran los epítomos y neoepítomos (*) seleccionados de seis proteínas diferentes, así como el tipo de respuesta inmune inducida por los mismos

Epítomos seleccionados			
NOMBRE	EPÍTOPOS	Tipo de respuesta	REFERENCIA
P53	-AIYKKSQHM -LAKTCPVQLWVS -KYMCNSSCM	Linfocitos T CD8	[112]
MUC1	GVTSAPDTRPAPGSTAPPAH	Anticuerpos	[113]
Survivina	GWEPDDNPI	Linfocito T CD8	[114]
Tmtc2	QGVTVLAVSAVYDIFVFHRLKMKQILP*	Linfocitos T CD8	[115]
Gprc5a	FAICFSCLLAHALNLIKLVGRKPLSW*	Linfocitos T CD8	
Qars	FPPDAINNF*	Linfocitos T CD8	[116]

6.2. Diseño de VLPs quiméricas

Se crearon construcciones constituidas por la secuencia de la proteína VP2 más los neoepítomos o epítomos de TAAs utilizando el software snapgene, se utilizaron espaciadores rígidos formadores de hélices alfa (EAAAK(x3)) para separar los epítomos. Se sabe que estos espaciadores impiden interacciones entre los epítomos además de que se ha observado que aumentan la inmunogenicidad y solubilidad de la proteína, lo cual es deseable para el ensamblaje de VLPs. Los epítomos seleccionados se repartieron en dos construcciones, una compuesta principalmente de neoepítomos pensada para su evaluación en un esquema terapéutico (VLPs-neo), equivalente a la terapia personalizada que se ha evaluado en pacientes. La segunda construcción (VLPs-TAAs) estaba constituida por epítomos de antígenos asociados a tumor, pensado para su evaluación tanto en esquemas profiláctico como terapéutico. La composición final de ambas construcciones se muestra en la Figura 12A. Se probaron diversas combinaciones de posición de los epítomos, se eligió la disposición que fue predicha con linkers formadores de hélices alfa y epítomos lineales (Figura 12C).

Las construcciones diseñadas fueron analizadas *in silico* con el objetivo de conocer su, estructura secundaria, acomodo espacial, procesamiento por el inmunoproteosoma, y unión al H2D^d.

Utilizando softwares informáticos de predicción de estructura secundaria a partir de la secuencia de a.a., se realizaron predicciones para ambas construcciones, así como para la proteína VP2 nativa, la cual tuvo una homología de 100% con la proteína VP2 cristalizada (PDB 1S58), en cuanto a las proteínas quiméricas, se observó que los espaciadores (linkers) utilizados son formadores de hélices alfa, mientras que la mayoría de los epítomos poseen una extensión extendida (Figura 12B, C). Esto se observó en ambas construcciones, observando que la región correspondiente a la proteína VP2 no tuvo modificaciones en cuanto a su estructura secundaria (Figura 12B, C). El conocimiento de esta estructura es sumamente importante en cuanto a los epítomos para inducir respuestas de anticuerpos, los cuales deben ser accesibles para su reconocimiento.

Con el fin de determinar la disposición espacial de la proteína (estructura terciaria), para conocer el posible acomodo de los epítomos en el espacio con respecto a la proteína nativa VP2, se realizaron predicciones de conformación tridimensional utilizando el software phyre2, el análisis corroboró la predicción de estructura secundaria realizada con otros software y mostró que la región multiepitópica posee una conformación ligeramente extendida hacia el exterior de la proteína, lo cual es deseable para la inducción de respuestas humorales. No se encontraron cambios significativos en la estructura o acomodo espacial de la fracción de la proteína VP2 (Figura 12C), este tipo de modelaje junto con los de accesibilidad al medio permiten

predecir si epítomos para respuestas humorales serán accesibles, permitiendo cambiar el acomodo con el fin de obtener la mayor accesibilidad posible hacia las regiones de interés, y así asegurar la mayor probabilidad de inducción de respuestas, en el caso de los epítomos para respuestas celulares, este modelaje no es tan beneficioso, ya que para la presentación de estos es necesaria la degradación de la proteína.

Una vez caracterizado los aspectos estructurales de las proteínas quiméricas se realizaron análisis para conocer si estas construcciones tenían probabilidad de ser procesados por el inmunoproteosoma de ratón, si este procesamiento era capaz de liberar a nuestros epítomos y si estos epítomos tenían la capacidad de unirse a moléculas de MHCI de ratón (H2D^d) lo que nos permitiría estimar si los epítomos y/o las construcciones serían teóricamente capaces de inducir respuestas celulares específicas.

Para analizar si el procesamiento de nuestras proteínas quiméricas era teóricamente capaz de liberar nuestros epítomos utilizamos el servidor Immune Epitope Database Analysis Resource (IEDB) el cual utiliza una base de datos de epítomos inmunes caracterizados experimentalmente. Para el procesamiento por el inmunoproteosoma el software asigna puntuaciones a cada aminoácido dentro de una ventana de 10 aminoácidos alrededor del enlace escindible, la suma de estas puntuaciones representa la probabilidad de liberación de ese péptido, la puntuación (score) va desde poca probabilidad (0), probabilidad media (0.5) o probabilidad alta (cerca de 1 o mayor)[117]. El análisis de nuestras secuencias se basó en la búsqueda de péptidos de diferente largo, para secuencias de 9 a.a. de largo, observamos la liberación de epítomos de las proteínas survivina, Qars, Tmtc2, Gprc5 y p53 con valores de procesamiento altos (proteasome score), la herramienta IEDB también calcula la afinidad de los péptidos a la proteína TAP, lo cual se ha mostrado ser proporcional a la eficiencia de su transporte dentro del retículo endoplásmico[117]. El intervalo de valores de procesamiento es igual al mencionado para la liberación por el inmunoproteosoma, el análisis arrojó valores intermedios de transporte al retículo para péptidos de las proteínas P53 y Gprc5a, altos para las proteínas Qars y Tmtc2 y baja para péptidos de survivina. (TAP Score) (Figura 12D).

Los epítomos que fueron predichos ser liberados por el inmunoproteosoma de ratón fueron posteriormente analizados con el servidor PredBALB/c, el cual analiza su probabilidad de unión de los péptidos a moléculas de MHCI de ratón, asignando a cada péptido una puntuación (score) del 0 al 10, mientras mayor es la puntuación mayor es la probabilidad de unión[118], con este análisis observamos que todos los epítomos en nuestras construcciones tuvieron puntuaciones altas de probabilidad de unión a H2D^d (Figura 12E) por lo que teóricamente podrían ser presentados a linfocitos T para activarlos.

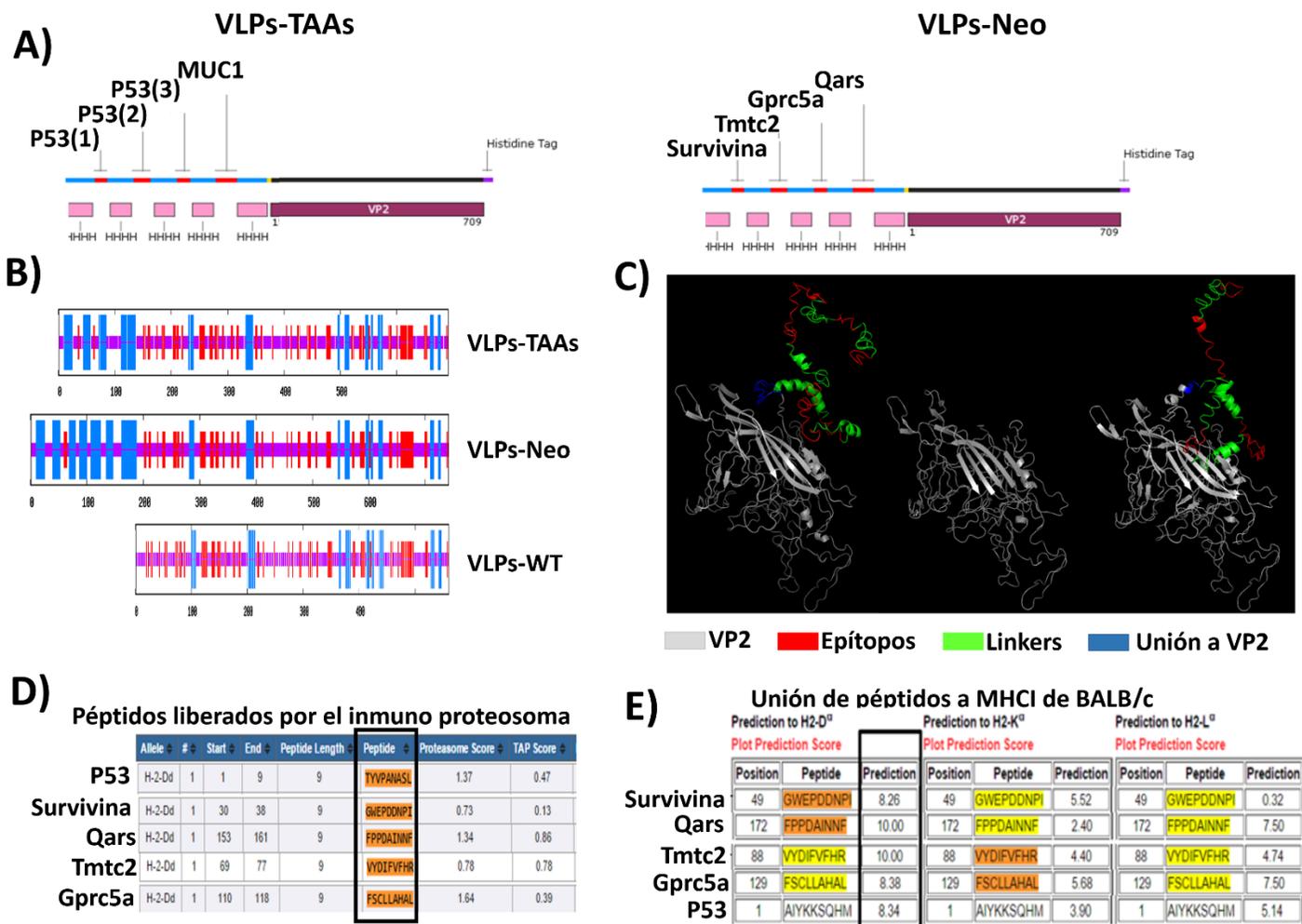


Figura 12. Diseño y caracterización *in silico* de proteínas VP2 quiméricas. A) Composición de las proteínas quiméricas VP2. Se muestra el acomodo final de los epítomos seleccionados en el extremo amino terminal de la proteína VP2. Se utilizaron linkers rígidos formadores de hélices alfa (EAAAK (x3)) (representados como HHHH) para separar los epítomos (nombres superiores). Se muestra el Tag de histidinas en el extremo carboxilo de las construcciones. Y la región correspondiente a la proteína VP2 nativa (gris). **B) Predicción de estructura secundaria de VP2-Neo.** Comparación de la estructura secundaria de las construcciones VP2-TAAs y VP2-Neo y la proteína VP2-WT mostrando las regiones de hélices alfa en azul, lamina beta en rojo y extendido en morado. Obtenido con el software Jpred4. **C) Predicción de estructura terciaria de las proteínas quiméricas y VP2.** Se muestra la predicción hecha a partir del programa phyre2, de modelado por homología de las construcciones VP2-TAAs (derecha), VP2-Neo (izquierda) y VP2-WT (central). **D) Predicción de procesamiento por inmunoproteosoma.** Se muestra la predicción hecha a partir del servidor IEDB de procesamiento por proteosoma (proteasome score), transporte por las proteínas TAP al retículo endoplásmico (TAP score). Valores positivos indican alta

probabilidad de procesamiento. **E) Unión a MHC I de ratón.** Predicción de unión de péptidos a MHC I de ratón utilizando el servidor PredBALB/c, se resalta los valores para el MHC I de ratón (H2D^d). Valores cercanos a 10 indican una mayor probabilidad de unión.

6.3. Subclonación a vector de expresión

Una vez que se eligió el orden de los epítomos dentro de la construcción basados en los análisis de la Figura 12, los genes de ambas construcciones fueron sintetizados químicamente por la compañía epoch life science, y se introdujeron en un plásmido pBSK de clonación para su posterior subclonación a un plásmido de expresión PET.

Los vectores pBSK contenían la secuencia de la proteína VP2 unido a los diferentes epítomos en su región amino terminal, por lo que no se realizó ninguna modificación adicional más que el paso de los genes al vector de expresión pET22b.

En breve, el vector pBSK fue introducido en la cepa de *E. coli* TOP10 para su mantenimiento y replicación.

Posteriormente, los genes de interés se extrajeron mediante PCR utilizando Primers específicos para cada construcción. Dichos Primers poseían además los sitios de restricción NdeI (extremo 5') y EcoRI (extremo 3'). Los productos obtenidos de la PCR fueron introducidos en el vector pUC18 mediante corte y ligación simultánea utilizando la enzima SmaI y la ligasa T7. La correcta ligación se corroboró por corte con enzimas de restricción. Una vez confirmado se procedió a realizar una subclonación con las enzimas de restricción EcoRI y NdeI (Figura 13A), ambos vectores fueron cortados con ambas enzimas, corridos en un gel de agarosa 1% y las bandas de interés fueron recuperadas y purificadas con el GeneJet Gel Extraction kit (Thermo), los productos purificados fueron ligados utilizando la ligasa T7 (según especificaciones del proveedor) y transformados en bacterias TOP10 para su mantenimiento y replicación, la identidad se corroboró por secuenciación de Sanger (epoch life science) y con enzimas de restricción, las construcciones finales fueron introducidas en bacterias BL21 (DE3) para su expresión (Figura 13B).

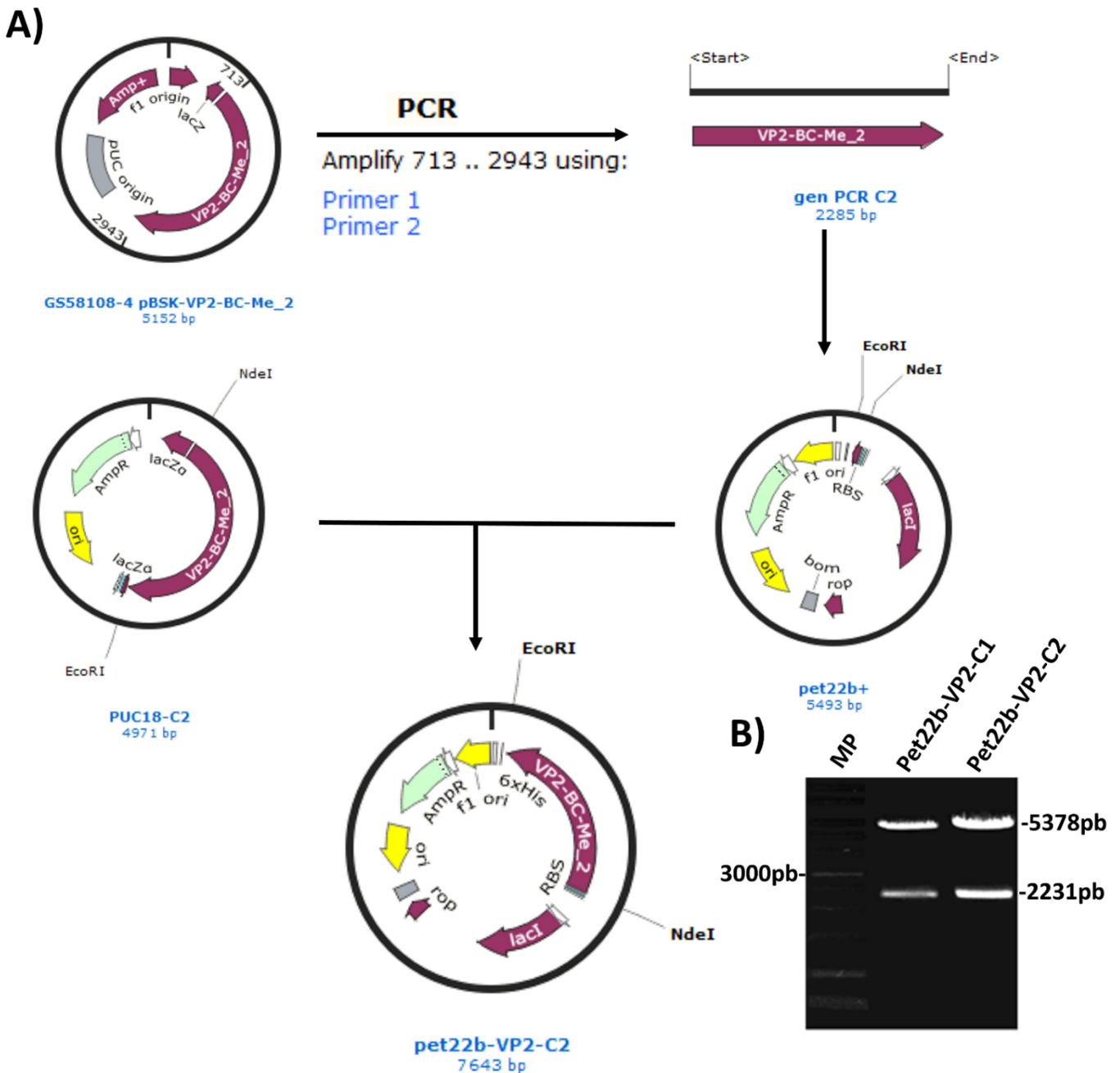


Figura 13. Sub clonación de los genes sintetizados en el vector de expresión.

A) Se muestran gráficamente los pasos seguidos para clonar los genes de interés en el vector de expresión pet22b. el gen de interés fue obtenido mediante PCR e introducido al vector puc18, este vector y el vector Pet22b fueron tratados con las enzimas de restricción EcoRI y NdeI, se realizó una electroforesis en gel de agarosa y las bandas de peso esperado (pet22b: 5378 pb, construcciones: ~2231 pb) fueron recuperadas mediante el GeneJet Gel extraction kit (Thermo), los productos purificados fueron cuantificados y ligados en un ratio 1:5 inserto vector con la ligasa T7, la reacción de ligación se utilizó para transformar bacterias TOP10. **B)** Miniprep a las bacterias transformadas con la reacción de ligación, se realizó un análisis de restricción utilizando las enzimas EcoRI y NdeI.

6.4. VLPs como sistema de entrega de neoepítopos

La construcción VP2-neo (Figura 14A) estaba conformada por la proteína VP2-WT más los neoepítopos, Tmtc2, Gprc5a y Qars, que fueron identificados, por la secuenciación de última generación de la línea celular 4T1, como epítopos reconocidos por las células CD8 [22, 23], y un epítopo del TAA survivina 66-74, que se ha informado que induce inmunidad tumoral en el modelo de cáncer de mama 4T1 con metástasis espontánea [31]. Esta construcción fue diseñada para su evaluación en un esquema terapéutico para evaluar la utilidad de las VLPs-B19 como sistema de entrega en terapias personalizadas con neoepítopos los cuales son identificados de biopsias de tumor de los propios pacientes, por lo que no pueden ser utilizados en esquemas profilácticos.

Para su evaluación las proteínas VP2-WT, VP2-WT-GFP y VP2-neo se sobre expresaron en células *E. coli* BL21 (DE3) como cuerpos de inclusión, y posteriormente, las proteínas se purificaron en condiciones desnaturizantes, según protocolos previos [19].

Las proteínas VP2-WT y VP2-WT-GFP se purificaron con el protocolo previamente reportado [19, 20], con modificaciones menores, y se almacenó en buffer de elusión hasta su ensamblaje (Figura 14B). La proteína VP2-neo mostró ligeros cambios en la solubilidad, ya que un porcentaje significativo de la proteína se solubilizó en el buffer de lavado de los cuerpos de inclusión, a diferencia de la proteína VP2-WT que no se solubilizó en este buffer. Como resultado, lavamos la pastilla de bacterias con un buffer de lavado que no contenía urea, y luego agregamos 5M GuHCl a la proteína VP2-neo para solubilizarla, y luego ser purificada por cromatografía de afinidad por metales inmovilizados (IMAC) (Figura 14B), este aumento en la concentración de GuHCl se realizó porque una concentración de 3M GuHCl no permitió la purificación de la proteína con IMAC. Este fenómeno ya se ha informado para otras proteínas quimeras VP2 [20] y posiblemente se deba a una desnaturalización incompleta de la proteína, lo que permite la formación de estructuras terciarias que bloquean la exposición de la etiqueta de histidina. El aumento de la concentración de este agente caotrópico resolvió el problema y permitió que las proteínas VP2-neo fueran purificadas por IMAC.

La protoxina Cry1Ac recombinante adyuvante se produjo y purificó de acuerdo con trabajos previos sin modificaciones y se mantuvo a 4 ° C hasta su uso [32].

6.4.1 Ensamblaje de VLPs

El ensamblaje de VLPs con la proteína WT-VP2 produjo cápsides de 22-24 nm de diámetro que coincidieron con los informes de esta proteína [19]. La proteína VP2-neo se ensambló sola o mediante la adición de diferentes ratios de la proteína VP2-WT (datos no mostrados). En todos los casos, se observaron VLPs que coincidieron

con el tamaño informado de las VLPs-WT. En consecuencia, decidimos trabajar solo con cápsides formadas por el 100% de la proteína VP2-neo, para asegurar la presencia de la fracción de múltiples epítomos en las cápsides ensambladas. El ensamblaje con VP2 100% quimérica se informó recientemente [20]. El ensamblaje de las VLPs-neo produjo especies mono dispersas de 20 ± 3.0 nm de diámetro (Figura 14C).

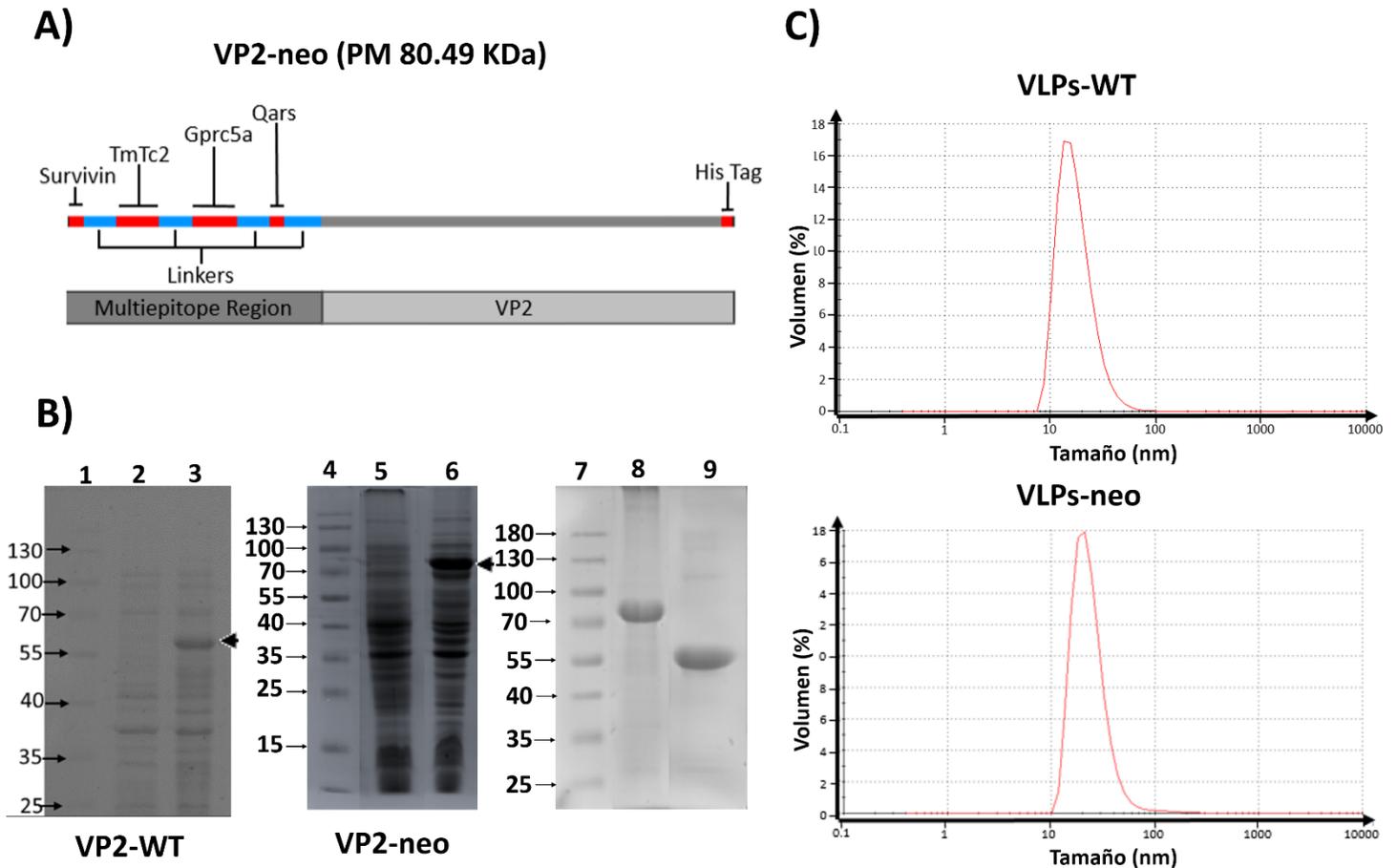


Figura 14. Expresión de proteínas y ensamblaje de VLPs-neo. A) Composición de la construcción quimérica de múltiples epítomos VP2-neo. B) Sobreexpresión de proteínas VP2-WT y VP2-neo, después de la inducción de IPTG durante 18 horas a 30°C en células BL21DE3 *E. coli*. Proteínas de células no inducidas (2,5) e inducidas (3,6). Marcadores de peso molecular (1, 4,7). Las bandas de ~ 60 y ~ 80 kDa, correspondientes al peso esperado para VP2-WT y VP2-neo, respectivamente, están marcadas con puntas de flecha negra en 3 y 6. VP2-WT (9) y VP2-neo (8) purificadas por IMAC. C) Resultados del tamaño de las VLPs, adquiridos mediante dispersión dinámica de luz. Las VLPs se ensamblaron como se indica en materiales y métodos por diálisis de proteínas puras frente a PBS + 0.2M de arginina. Se

completaron 50 mediciones para cada muestra y se observaron picos de ~ 20 nm indicando cápsides ensambladas tanto de VLPs-WT como de VLPs-neo.

6.4.2 Efecto antitumoral de las VLPs-neo en ratones

Para probar el posible efecto antitumoral de las VLPs-neo en tumores establecidos, se implantaron células 4T1 en ratonas BALB/c y luego se inmunizaron con VLPs-neo con o sin adyuvante o con VLPs-WT como control. Se administraron 50 µg de cada proteína en forma de VLPs por vía intraperitoneal y peri tumoral simultáneamente cada 7 días durante el curso de los experimentos. Inesperadamente, observamos un retraso en el crecimiento tumoral en ratones tratados con VLPs-WT y VLPs-WT + adyuvante, sin diferencias entre estos tratamientos (Figura 15A). El crecimiento tumoral en estos grupos fue significativamente menor que el observado en ratones tratados con el vehículo PBS. Los ratones inmunizados con VLPs-neo, con y sin adyuvante mostraron un retraso significativo en el crecimiento tumoral en comparación con los ratones tratados con el vehículo y significativamente menos crecimiento tumoral que los ratones tratados con VLPs-WT (Figura 15A, 4B). Los tratamientos de VLPs-neo con el adyuvante mostraron los tamaños de tumor más pequeños hasta el día 36, incluso mostrando erradicación total de los tumores en 4 ratones de 7. Los tumores extirpados en el día 36 mostraron volúmenes mayores en los grupos PBS y VLPs-WT, sin embargo, debido a su forma irregular, es posible que los lados más grandes de estos tumores no fueran medibles con precisión *in vivo*, por lo que los volúmenes de tumores extirpados fueron mayores (Figura 15C) La adición del adyuvante mejoró parcialmente la respuesta observada del tratamiento con VLPs-WT y VLPs-neo en tumores extirpados, aunque no significativamente.

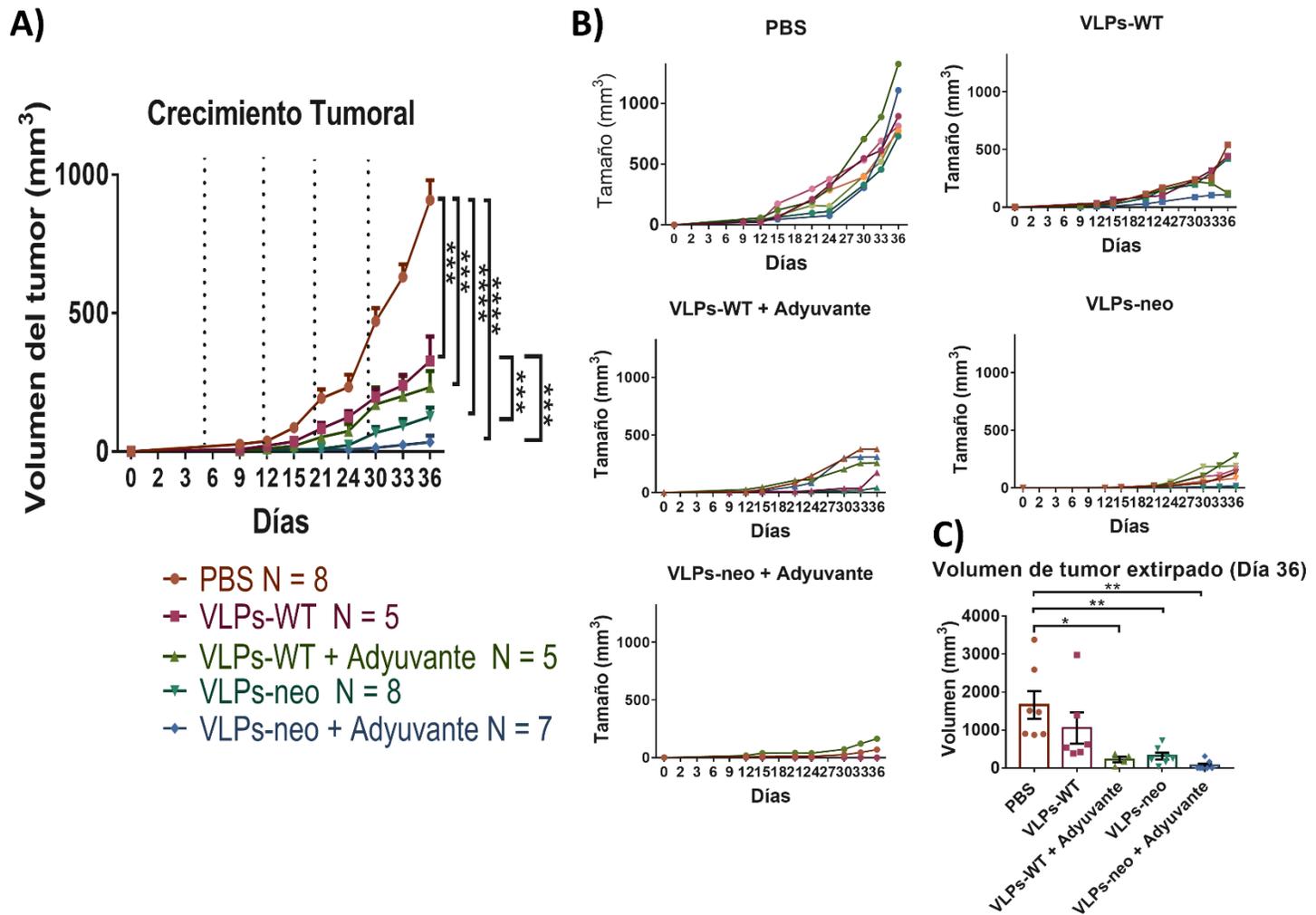


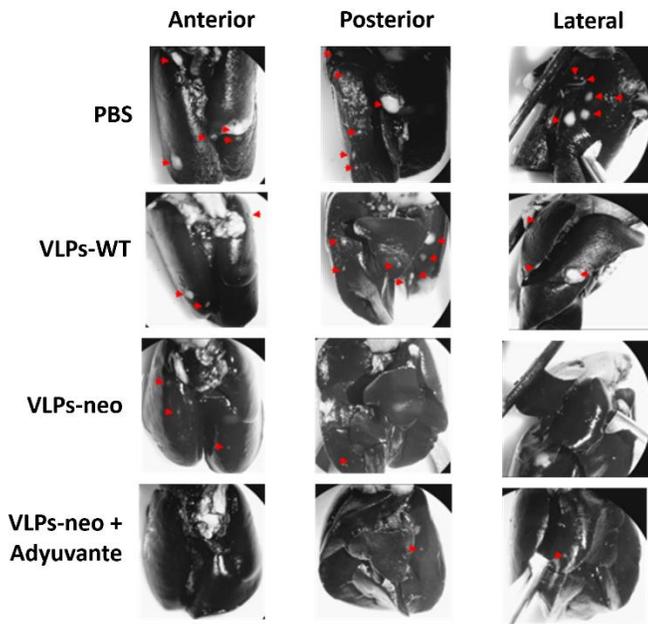
Figura 15. El tratamiento con VLPs-neo redujo el crecimiento tumoral en ratones BALB/c con TNBC. Las ratonas BALB/c fueron inyectadas s.c. con 3×10^3 células 4T1 y los tratamientos se aplicaron en los días indicados (líneas de puntos) por las rutas peri tumoral e intraperitoneal como se detalla en Materiales y Métodos. El crecimiento tumoral se registró cada tercer día. El tamaño del tumor se midió con un vernier digital y el volumen se calculó con la fórmula $V = (L \times S^2) / 2$. A) Los gráficos representan la media \pm SEM de los volúmenes de tamaño tumoral registrados durante el transcurso de los distintos tratamientos con PBS, VLPs-WT, VLPs-WT + adyuvante, VLPs-neo y VLPs-neo + adyuvante. B) Los gráficos muestran los tamaños de volumen tumoral registrados para ratones individuales dentro de cada tratamiento. C) Volumen medio de tumores extirpados y registrados en el día 36 de los distintos tratamientos. Los datos se representan como media \pm SEM. N = 5–8. *, **, ***, **** Denotan diferencias significativas, donde el valor p fue ≤ 0.05 , 0.01, 0.001 o 0.0001, respectivamente.

6.4.3. Inhibición de macrometástasis en el pulmón.

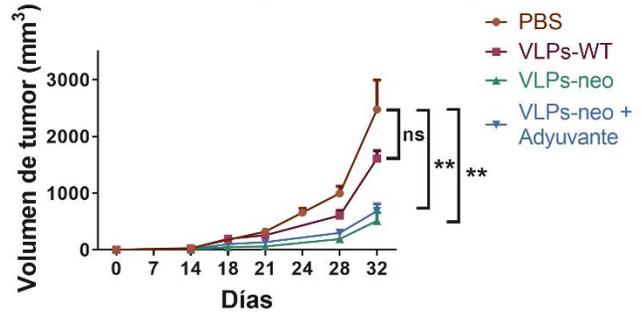
Debido a la importancia de la metástasis en la mortalidad por cáncer, decidimos evaluar el efecto de nuestro tratamiento en el establecimiento de metástasis pulmonares (formación de nódulos en pulmón). Para esto, inyectamos 1×10^4 o 3×10^3 células 4T1, por vía s.c., en la sexta mama de ratones BALB/c. Los tratamientos se aplicaron como se menciona en los Materiales y Métodos. El día 32, los pulmones de los ratones se tiñeron con tinta india al 10% para permitir la visualización de los nódulos metastásicos. Nuestros resultados mostraron que el tratamiento con VLPs-neo redujo significativamente el número y tamaño de los nódulos de metástasis inducidas por 1×10^4 células o 3×10^3 células 4T1 (Figura 16A, D), el índice metastático (número de nódulos entre peso del tumor) mostro que la reducción del número de nódulos estuvo directamente relacionada con la reducción del tumor principal. Mientras que las VLPs-WT no tuvieron ningún efecto sobre la metástasis. El crecimiento tumoral, por inyección de 1×10^4 células 4T1 en los ratones, mostró una tasa de crecimiento mucho mayor (máximo de 2500 mm^3) al observado con la inyección de 3×10^3 células 4T1 (máximo de 1500 mm^3 , a pesar de esto el tratamiento con VLPs-neo con y sin adyuvante mantuvieron el efecto de reducir el crecimiento tumoral significativamente, sin embargo, el tratamiento con las VLPs-WT tuvo un efecto en el crecimiento sin embargo este no fue significativo (Figura 16B).

El número de nódulos de metástasis por inyección de 3×10^3 células 4T1 en el grupo PBS fue mayor que el observado por la inyección de 1×10^4 células 4T1, como se ha observado y reportado con anterioridad [119] (Figura 16E). El tratamiento de ratones con VLPs-Neo, con y sin el adyuvante, disminuyó la cantidad y el tamaño de los nódulos metastásicos en los pulmones en comparación con los ratones tratados con el vehículo o con las VLPs-WT (Figura 16C). No hubo diferencias entre los ratones tratados con VLPs-neo y VLPs-neo + adyuvante.

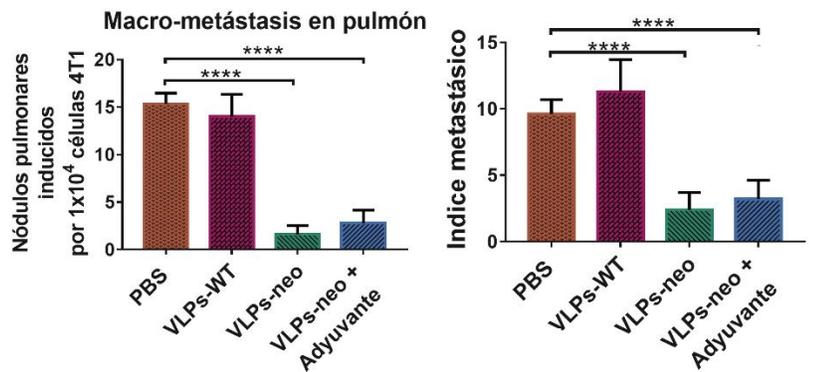
A) Nódulos metastáticos inducidos por 1×10^4



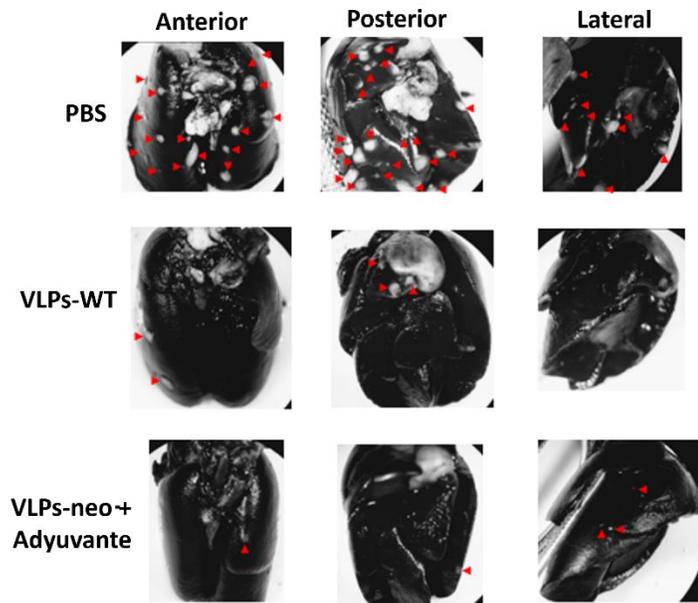
Crecimiento tumoral (1×10^4 células 4T1)



C)



D) Nódulos metastáticos inducidos por 1×10^4



E)

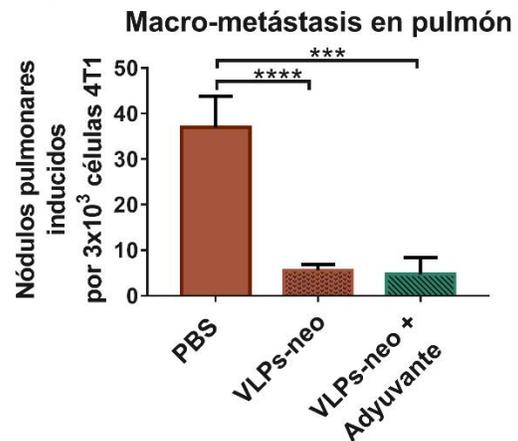


Figura 16. El tratamiento con VLPs-Neo redujo la macrometástasis pulmonar inducida por 1×10^4 y 3×10^3 células 4T1. Los ratones portadores de tumores recibieron tratamientos como se menciona en Materiales y Métodos. En el día 32, los ratones fueron sacrificados y los pulmones se llenaron con solución de tinta india al 10% a través de una traqueotomía. Los pulmones fueron extraídos, lavados, fijados y fotografiados con un microscopio estereoscópico. Se muestran las vistas anterior, posterior y lateral, donde las puntas de flecha indican ganglios metastásicos inducidos por 1×10^4 células 4T1 (A) o 3×10^3 (D). B) Curso temporal del crecimiento tumoral registrado después de inyección s.c., ortotópica de 1×10^4 células 4T1 en ratones que recibieron los tratamientos indicados cada 7 días por vía intraperitoneal y peri tumoral. C) Número de ganglios metastásicos registrados en los pulmones de cada ratón inducidos por 1×10^4 células 4T1 y el índice metastásico (número de metástasis pulmonares por peso del tumor). E) Número de ganglios metastásicos registrados en los pulmones de cada ratón inducidos por 3×10^3 células 4T1. Los datos se representan como media \pm SEM. N = 6. **, ***, **** Denotan diferencias significativas, donde el valor p fue ≤ 0.05 , 0.01 o 0.001, respectivamente.

6.4.4. Caracterización de poblaciones de linfocitos T y MDSC

Para determinar si las poblaciones inmunes fueron modificadas por los tratamientos, las poblaciones presentes en el bazo y en el tumor de los ratones tratados y no tratados se analizaron por citometría de flujo. Observamos que las proporciones de células $CD3^+CD4^+$ y $CD3^+CD8^+$ disminuyeron en sus porcentajes y números absolutos en los ratones tratados con el vehículo PBS ($CD4=12.9\%/6450$ células, $CD8=7.26\%/3630$ células), y esta disminución fue significativamente menor que los valores encontrados en ratones sanos sin tumores ($CD4=27.35\%/13675$ células, $CD8=14\%/7000$ células) (Figura 17A, B). Los tratamientos con VLPs-WT y VLPs-Neo restablecieron parcialmente los valores de estas poblaciones, sin embargo, solo las VLPs-Neo con el adyuvante ($CD4=19.72\%/9860$ células, $CD8=13.42\%/6710$ células) fueron significativamente diferentes del grupo de vehículos (en linfocito T) (Figura 17B). Para analizar las MDSC, utilizamos marcadores $CD11b$ y $Gr1$, ya que se sabe que estos dos marcadores delimitan la población supresora en este modelo, como se informó anteriormente [33, 34]. Encontramos un aumento significativo de esta población en ratones tratados con el vehículo (bazo= $44.32\%/22160$ células, tumor= $39.9\%/19950$ células), con respecto a los ratones sanos (bazo= $6.3\%/3150$ células) (sin tumores inducidos y que no recibieron ningún tratamiento) tanto en bazo como en tumor (Figura 17C). Con respecto a los tratamientos, observamos que VLPs-WT + adyuvante ($8.69\%/4345$ células) y VLPs-Neo + adyuvante ($6.29\%/3145$ células) disminuyeron esta población en el bazo, mientras que, en el tumor, todos los tratamientos disminuyeron la proporción de estas células, observándose una proporción significativamente menor solo después del tratamiento con VLPs-Neo + adyuvante ($16.45\%/8225$ células)

(Figura 17D). Es importante destacar que estos resultados muestran que la protoxina Cry1Ac como adyuvante tiene un efecto inhibitor en la población de MDSC en bazo, que merece una caracterización adicional.

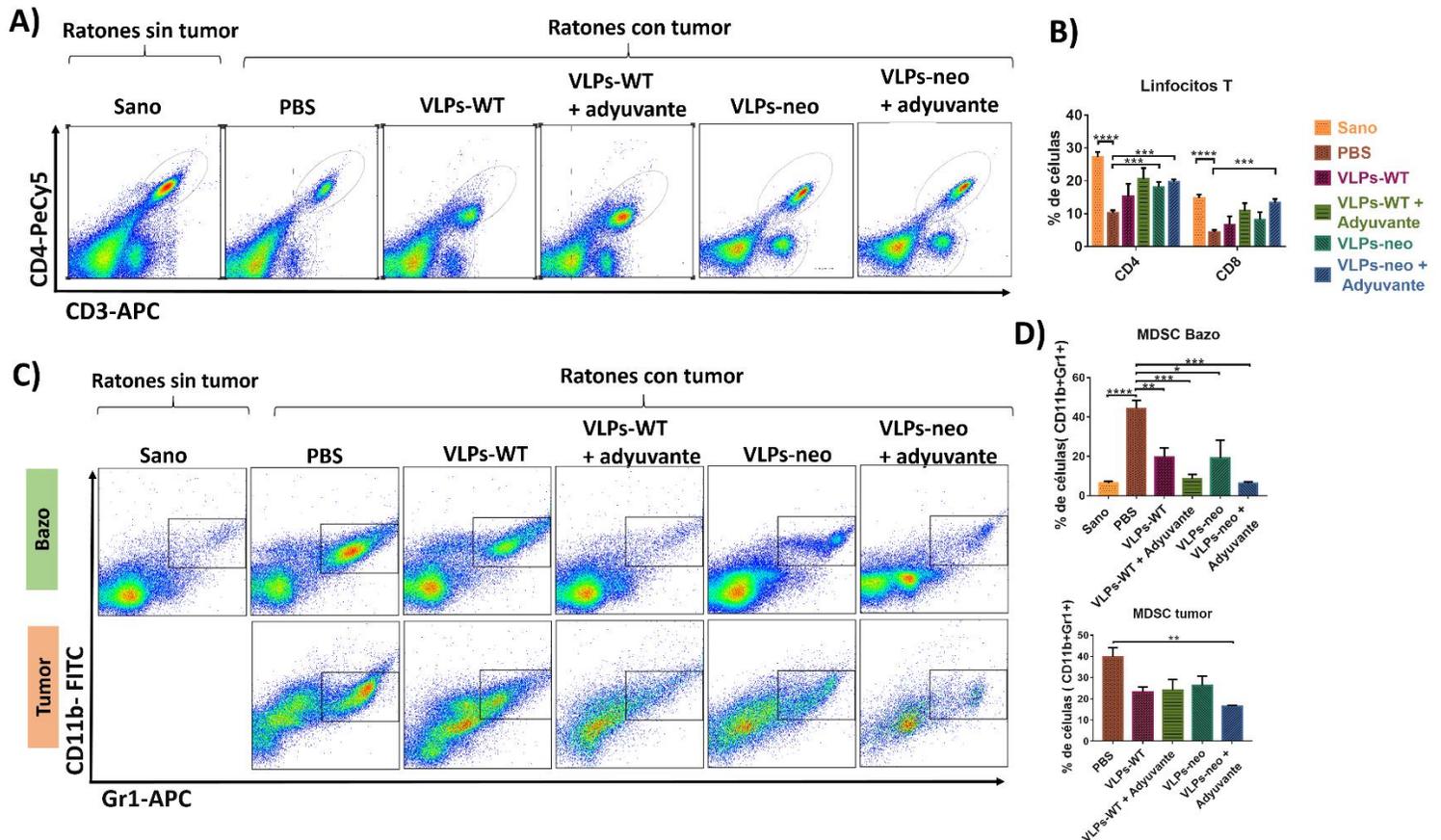


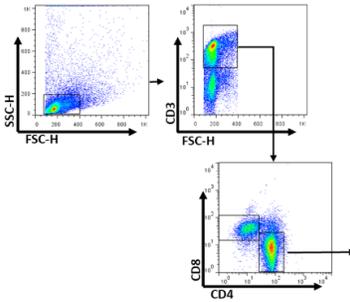
Figura 17. Los tratamientos con VLPs provocaron una reducción menor de linfocitos T y un menor porcentaje de MDSC en el bazo y tumor. Ratones BALB/c tratados como se indica en la Figura 13 fueron sacrificados a los 36 días después de la inducción del tumor. El bazo y el tumor fueron extirpados y disgregados. A) Gráficos de puntos representativos que indican la proporción de linfocitos T en los bazos de ratones sanos frente a ratones con tumores usando marcadores CD3⁺ y CD4⁺. La población CD3⁺CD4⁻ se utilizó para estimar la proporción de linfocitos CD8. B) Análisis de la proporción de linfocitos CD3⁺CD4⁺ y CD3⁺CD8 en el bazo. C) Gráficos de puntos representativos que indican poblaciones CD11b⁺Gr1⁺ MDSC en bazo o tumor que se usaron para el análisis mostrado en D se muestran en las regiones rectangulares. Los datos se obtuvieron con un citómetro FACSCalibur y se adquirieron 50000 eventos. D) Proporciones de MDSC en bazo o tumor, los datos en gráficos de barras se representan como media \pm SEM. N = 6. *, **, ***, **** Denotan diferencias significativas, donde el valor p fue \leq 0.05, 0.01, 0.001 o 0.0001, respectivamente.

6.4.5. Proliferación de linfocitos T inducido por VLPs-neo

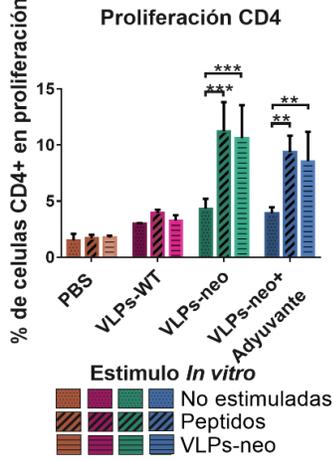
Se realizaron ensayos de proliferación, rastreando la pérdida del compuesto fluorescente CFSE, para determinar si los tratamientos fueron capaces de inducir respuestas celulares específicas hacia las células tumorales. Se eligió el día 15 post inducción del tumor, ya que en esta etapa no existe la acumulación de células supresoras derivadas mieloides en el bazo[120], las cuales podrían interferir con los ensayos de proliferación, ya que se usaron células totales de bazo, con el objetivo de vislumbrar si las células presentadoras de antígeno eran capaces de procesar las VLPs para presentarlas a linfocitos. En el día 15 de tratamiento, los animales fueron sacrificados y las células de los ganglios inguinales se tiñeron con CFSE. Las células se sembraron y estimularon durante 5 días usando un grupo de péptidos correspondientes a Tmtc2, Gprc5a, Qars y survivina o las VLPs-neo (Figura 18), además, se utilizaron como controles los estímulos con VLPs-WT o péptidos no relacionados (Figura 19).

El análisis mostró un aumento significativo en la proliferación de linfocitos T CD3+CD4+ y CD3+CD8+ en ratones tratados con VLPs-neo (Figura 18A), con y sin el adyuvante, después de la estimulación *in vitro* con los péptidos o las VLPs-neo. Estos resultados mostraron que las VLPs-neo fueron capaces de inducir respuestas específicas de células CD4 y CD8 en los ganglios inguinales (Figura 18B, C). Las respuestas proliferativas fueron similares para ambas poblaciones, observando proliferación solo después del estímulo con péptidos o VLPs-neo (Figura 18E, F). Es de importancia resaltar que en estos ensayos de proliferación no se adicionó anticuerpos anti CD3 ni ningún tipo de citocina adicional, lo que muestra que los antígenos utilizados como estímulos fueron captados y procesados por APC del ganglio inguinal y que estas fueron capaces de presentar péptidos en MHCI y MHCII, moléculas coestimuladoras y citocinas necesarias para la correcta activación de linfocitos T. El análisis de proliferación de las células del bazo mostro en mismo comportamiento con porcentajes de proliferación menores (datos no mostrados).

A)

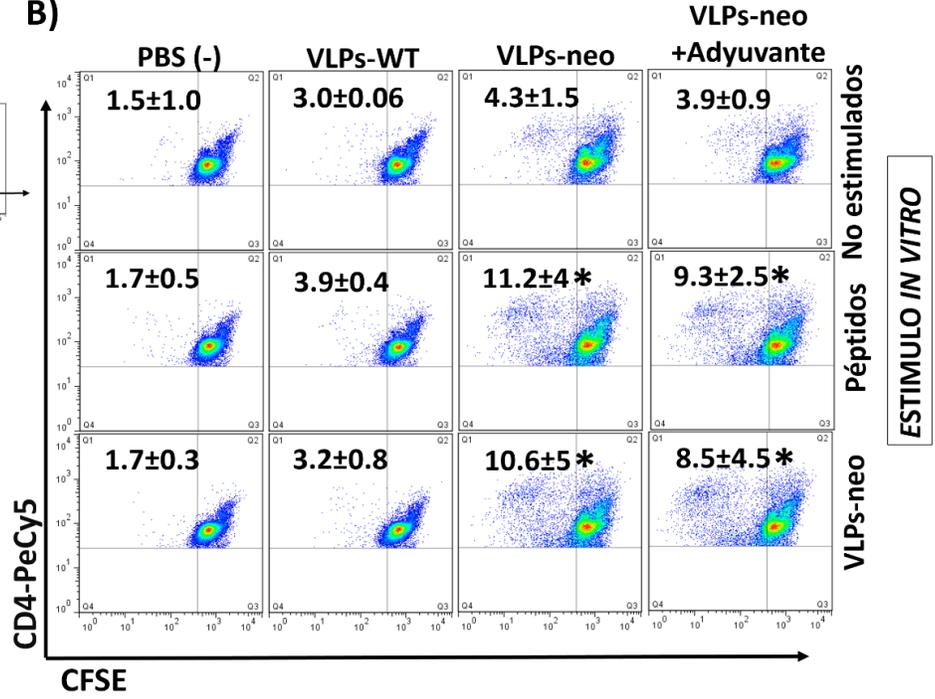


C)

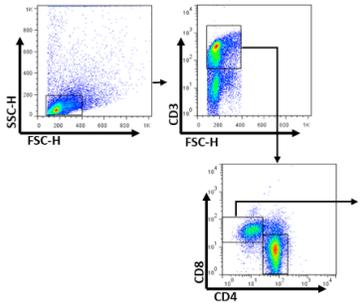


TRATAMIENTO *IN VIVO*

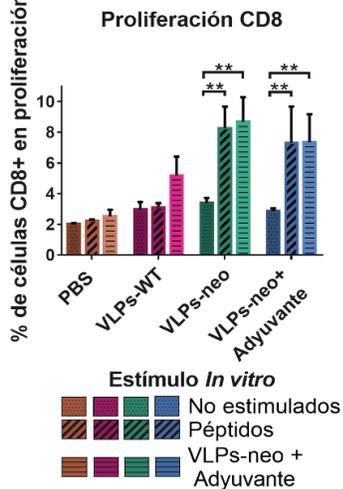
B)



D)



F)



TRATAMIENTO *IN VIVO*

E)

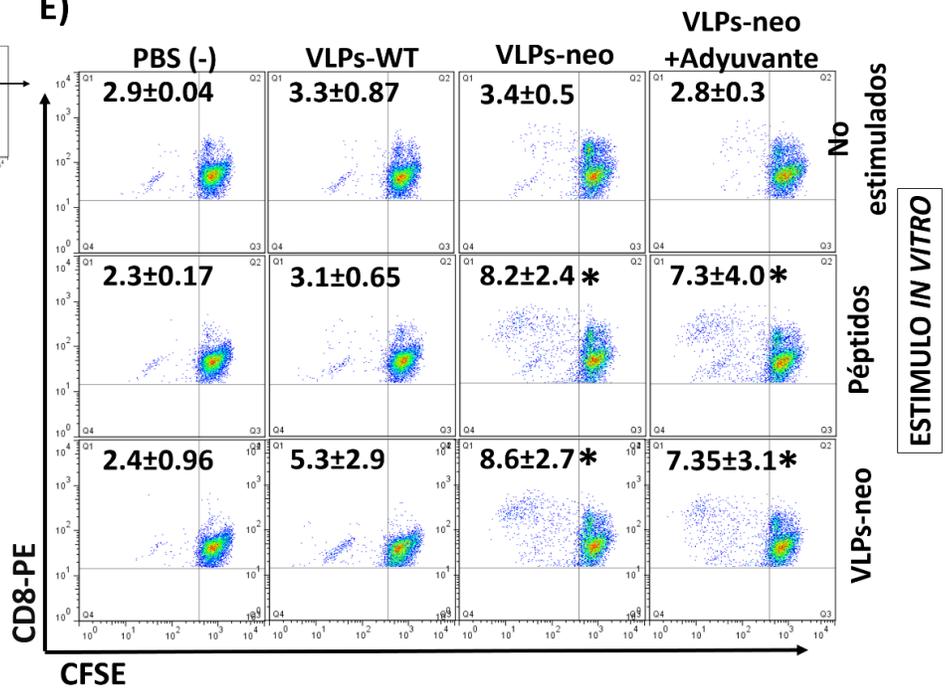


Figura 18. El tratamiento con VLPs-Neo indujo respuestas proliferativas específicas de T CD4 y T CD8 en el ganglio inguinal. Los ratones fueron inyectados por vía s.c. con 3×10^3 células 4T1 y recibieron una única inmunización en el día 7 con cualquiera de los tratamientos indicados. Los ratones fueron sacrificados el día 15 del estudio. Los ganglios linfáticos inguinales fueron extirpados y disgregados. Se tiñeron 3×10^6 células con CFSE como se describe en la sección de Materiales y Métodos. Las células se estimularon con péptidos (2 μg / ml) o con VLPs-neo (20 μg / ml) durante cinco días. Las células se recuperaron, se tiñeron con anticuerpos anti CD3, CD4 y CD8, y se analizaron por citometría de flujo con un citómetro FACSCalibur, en el que se obtuvieron 50000 eventos por muestra. A), D) Estrategia de adquisición de las poblaciones de interés por citometría de flujo, la Figura muestra las regiones utilizadas para aislar células CD4 y CD8 para el análisis de proliferación que se muestra en B y E. Representación gráfica de puntos de proliferación de células CD3⁺CD4⁺ (B) y CD3⁺CD8⁺ (E), se muestran medias \pm DE. C), F) Los datos en gráficos de barras se representan como media \pm SEM. N = 3. *, ** Denota diferencias significativas, donde el valor p fue \leq 0.05 o 0.01, respectivamente.

Los ratones tratados con VLPs-WT solo exhibieron proliferación hacia el estímulo con VLPs-WT, tanto de linfocitos T CD4 (Figura 19B, C) como CD8 (Figura 19E, F), mostrando como era esperado que el procesamiento de las VLPs quiméricas libera péptidos tanto de la región multiepitópica como de la secuencia de la VP2. En cuanto al porcentaje de proliferación, se observó que las VLPs-WT indujeron menor porcentaje de células en proliferación en comparación con ratones inmunizados con las VLPs-neo, indicando que los epítomos en la región multiepitópica fueron cargados preferencialmente en moléculas de MHC. Tanto el estímulo con el conjunto de péptidos como con las VLPs-neo mostraron porcentajes de proliferación similar en los ratones inmunizados con las VLPs-neo, esto indica que la eficiencia de procesamiento y carga de los epítomos contenidos en la construcción VLPs-neo es similar a la eficiencia de unión de los péptidos libres a las moléculas de MHC I. sería importante analizar la eficiencia de carga en el MHC de los péptidos individualmente para determinar cuáles fueron los responsables del reconocimiento por los linfocitos. No se observaron diferencias con la adición de adyuvante, lo que era de esperar ya que las VLPs poseen un efecto adyuvante intrínseco.

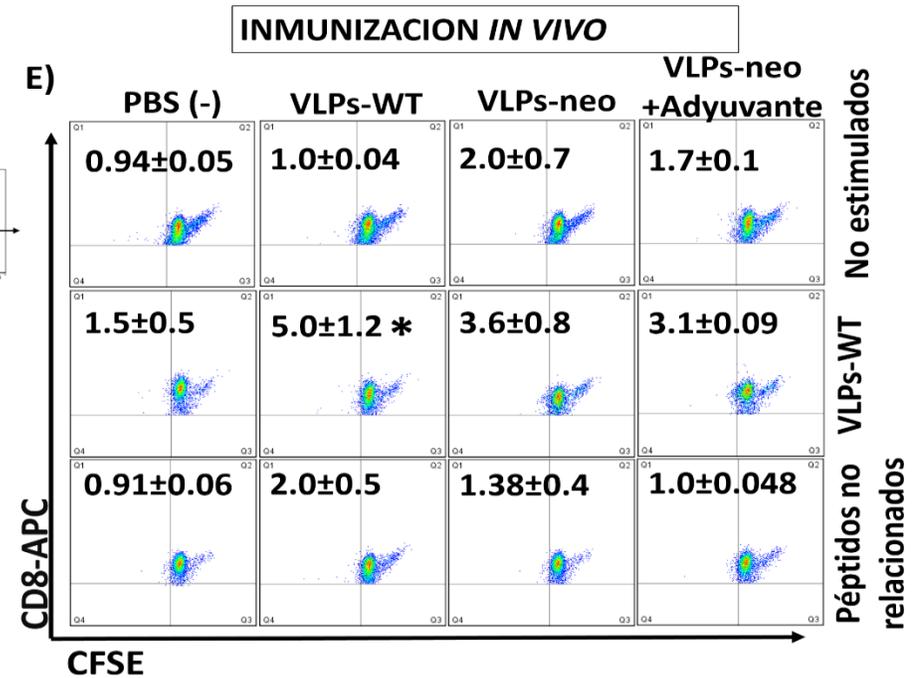
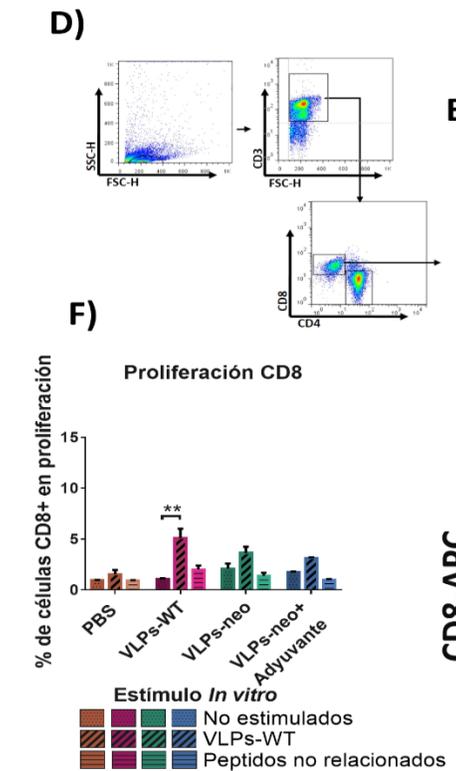
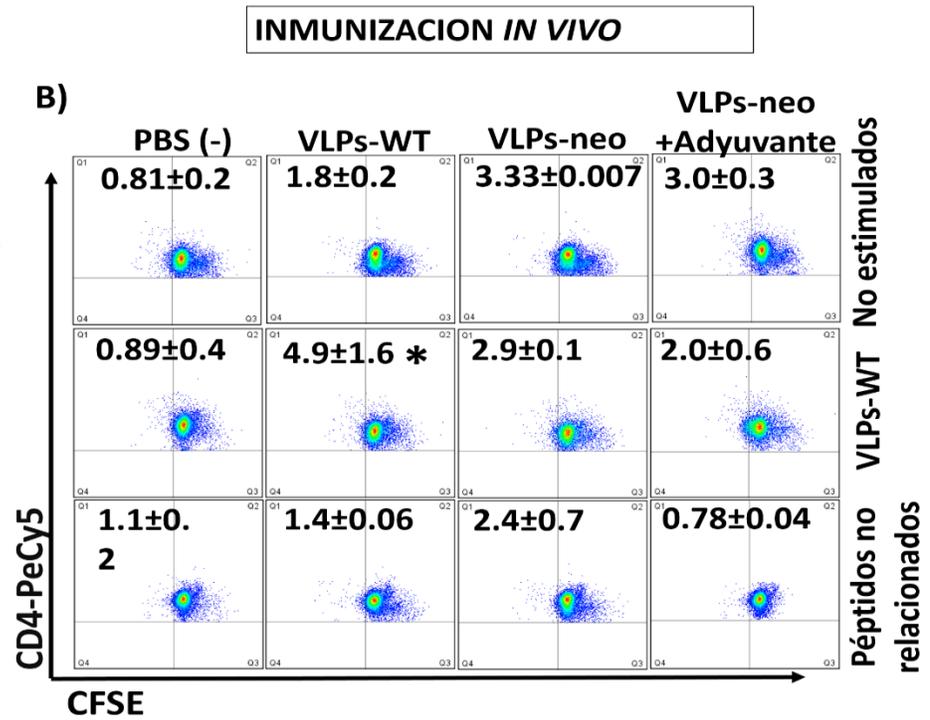
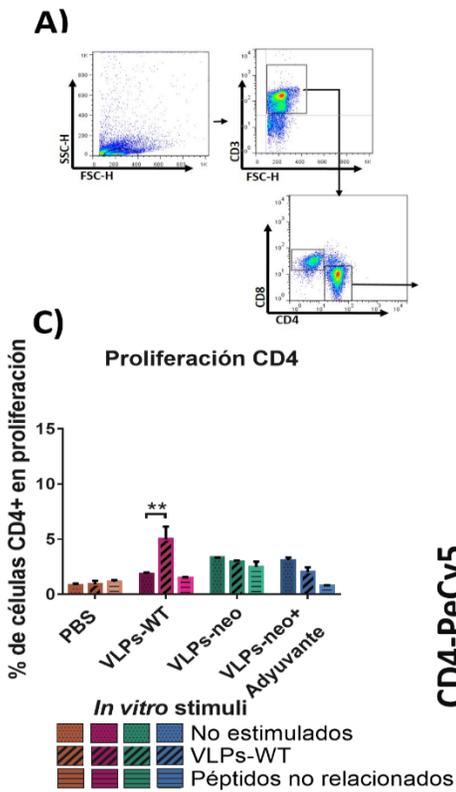


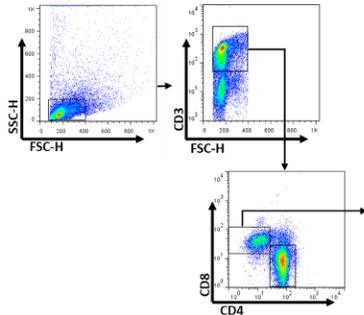
Figura 19. El tratamiento con VLPs-WT no induce respuestas proliferativas de T CD4 ni T CD8 hacia los neoepítomos en el ganglio inguinal. Los ratones fueron inyectados por vía subcutánea con 3×10^3 células 4T1 y recibieron una única inmunización en el día 7 con cualquiera de los tratamientos indicados. Los ratones fueron sacrificados el día 15 del estudio. Los ganglios linfáticos inguinales fueron extirpados y disgregados. Se tiñeron 3×10^6 células con CFSE como se describe en la sección Materiales y Métodos. Las células se estimularon con péptidos no relacionados ($2 \mu\text{g} / \text{ml}$) o con VLPs-WT ($20 \mu\text{g} / \text{ml}$) durante cinco días. Las células se recuperaron, se tiñeron con anticuerpos anti CD3-PE y anti CD4-PeCy5, y se analizaron por citometría de flujo con un citómetro FACSCalibur, en el que se obtuvieron 50000 eventos, por muestra. A), D) Estrategia de activación de citometría de flujo, la Figura muestra las regiones utilizadas para aislar células CD4 y CD8 para el análisis que se muestra en B y E. B), E) Se muestran gráficos de puntos representativos en la región de células CD3 + CD4 + y CD3 + CD8 +, Se muestran la media \pm DE. C), F) Los datos en gráficos de barras se representan como media \pm SEM. N = 3. ** denota diferencias significativas, donde el valor p fue ≤ 0.01 .

6.4.6. Citotoxicidad de linfocitos T CD8 hacia células tumorales

Para demostrar que los linfocitos CD8 tenían un perfil citotóxico, determinamos la producción de Granzima-B. Los resultados mostraron un aumento significativo en el porcentaje de células CD8⁺ Granzima-B⁺ después del estímulo con los péptidos o las VLPs-neo en ratones tratados con las VLPs-neo solo o con el adyuvante (Figura 20B, C). Esta producción de Granzima-B se observó también en células CD8 CFSE negativas (células en proliferación) indicando que las células CD8, que reconocen los epítomos mostrados por las células presentadoras, comienzan a proliferar y a producir Granzima-B, lo cual indica que tienen un perfil citotóxico y que podrían inducir la muerte de las células tumorales (Figura 20E, F).

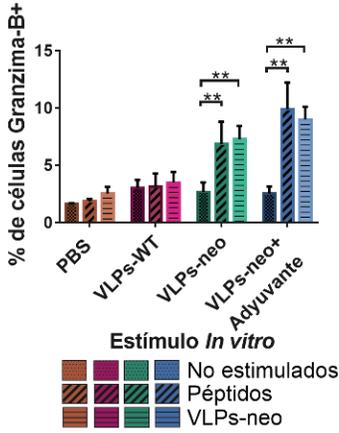
Para confirmar la citotoxicidad *in vitro* hacia las células 4T1 de linfocitos T CD8 aislados de ratones inmunizados, se aislaron linfocitos T del ganglio inguinal de ratones inmunizados o no inmunizados mediante perlas magnéticas, estos linfocitos purificados se cultivaron junto a células 4T1 marcadas con CFSE durante 4 horas. Las células se recuperaron y tiñeron con Anexina para detectar apoptosis. El análisis de las células CFSE⁺ Anexina V⁺ mostró aumento significativo en los grupos con linfocitos derivados de ratones inmunizados con respecto a ratones no inmunizados. Igualmente se observó aumento de la apoptosis de las células tumorales al incrementar el número de linfocitos T lo que confirma que los linfocitos derivados de ratones inmunizados son capaces de reconocer e inducir apoptosis de las células tumorales de la línea 4T1 (Figura 20E, F).

A)



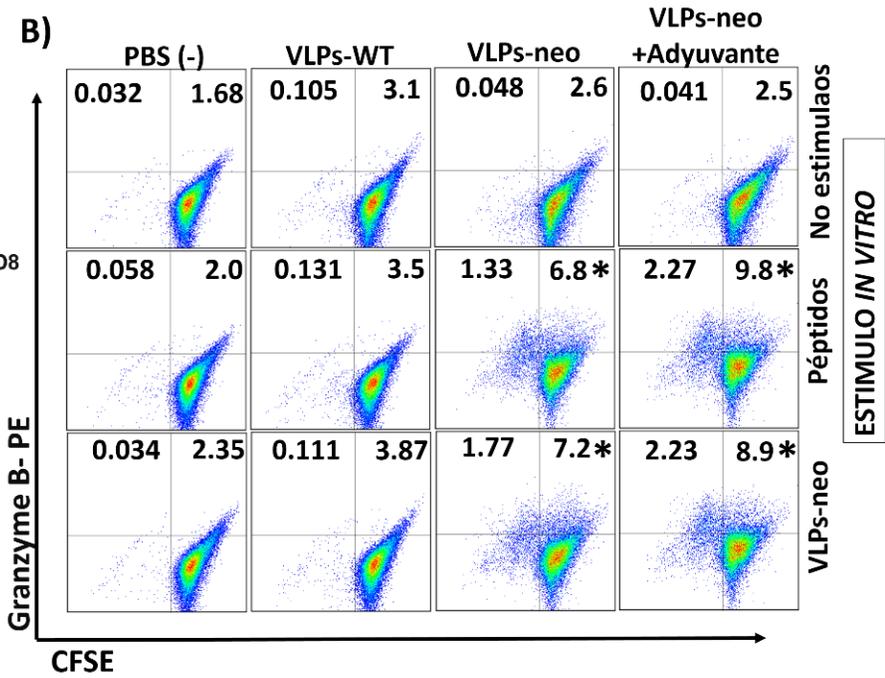
C)

Producción de Granzima-B en células T CD8

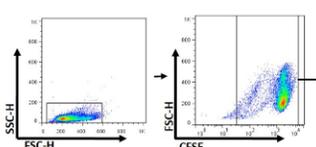


IMMUNIZACION *IN VIVO*

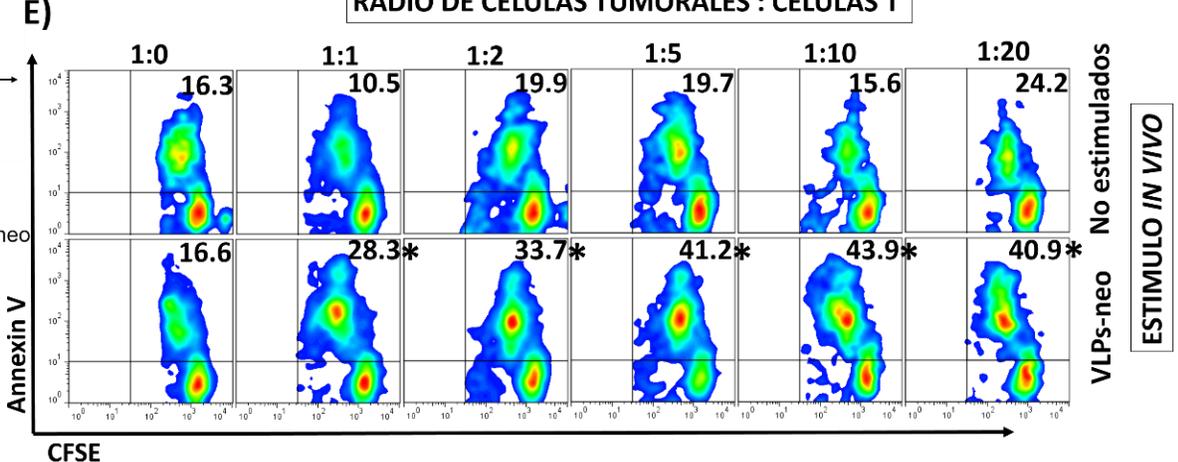
B)



D)



RADIO DE CELULAS TUMORALES : CELULAS T



F)

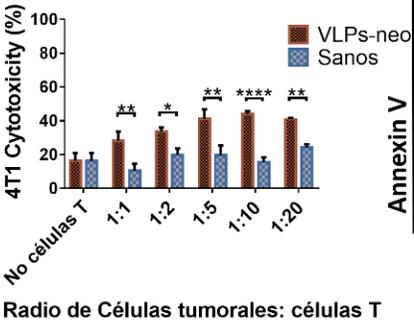


Figura 20. El tratamiento con VLPs-neo induce la producción de Granzima-B en células T CD8 de ganglio inguinal y éstas células pueden inducir apoptosis de células tumorales *in vitro*. Los ratones fueron inyectados por vía subcutánea con 1×10^4 células 4T1 y recibieron una única inmunización en el día 7 con cualquiera de los tratamientos indicados. Los ratones fueron sacrificados el día 15 del estudio. Los ganglios linfáticos inguinales fueron extirpados y disgregados. Se tiñeron 3×10^6 células con CFSE como se describe en la sección Materiales y Métodos. Las células se estimularon con péptidos ($2 \mu\text{g} / \text{ml}$) o con VLPs-neo ($20 \mu\text{g} / \text{ml}$) durante cinco días. Las células se recuperaron, se tiñeron con anticuerpos anti CD3-PeCy5 y anti CD8-APC, anti Granzima-B-PE, y se analizaron por citometría de flujo con un citómetro FACSCalibur, en el que se obtuvieron 50000 eventos, por muestra. A) La Figura muestra las regiones utilizadas para aislar las células CD8 para el análisis que se muestra en B. B) Se muestran gráficos de puntos representativos de las células CD8 CFSE productoras de Granzima-B, se muestra la media de los cuadrantes. C) Los datos en los gráficos de barras se representan como media \pm SEM. Para el análisis de la citotoxicidad celular mediada por células T, los ratones se inmunizaron como se describe en la sección de materiales y métodos, los linfocitos T del ganglio inguinal se aislaron mediante selección negativa con perlas magnéticas y se cultivaron conjunto con células 4T1-CFSE durante 4 horas. Las células se recuperaron, se tiñeron con Anexina V-APC y se analizaron mediante citometría de flujo con un citómetro FACSCalibur, en el que se obtuvieron 20000 eventos por muestra. D) La Figura muestra las regiones utilizadas para aislar células 4T1-CFSE+ para el análisis que se muestra en E. E) Gráficos representativos de células 4T1-CFSE+ positivas a Anexina V, se muestra la media de los cuadrantes. F) Porcentaje de citotoxicidad de las células 4T1, los datos en los gráficos de barras se representan como media \pm SEM. N = 3. *, **, **** Denotan diferencias significativas, donde el valor p fue ≤ 0.05 , 0.01 o 0.001 respectivamente.

6.5 VLPs como sistema de entrega de TAAs

6.5.1 Purificación y ensamblaje de VLPs-TAAs

Para evaluar si las VLPs del parvovirus B19 era capaces de inducir respuestas hacia diferentes tipos de antígenos tumorales, se evaluó otra construcción en la cual se incluyó tres epítomos de la proteína P53 para la inducción de respuestas celulares y un epítomo de MUC1 para inducir anticuerpos (Figura 12A). Esta construcción fue sintetizada y subclonada de igual forma que la construcción VLPs-neo y fue llamada VLPs-TAAs haciendo referencia a que porta TAAs, la proteína VP2-TAAs mostró igualmente cambios de solubilidad durante la purificación, encontrándose en mayor medida en la fracción soluble después de la lisis de las bacterias, sin embargo pudo ser purificada mediante IMAC con rendimientos similares a la proteína VP2 nativa (Figura 21A), una vez purificada la proteína VP2-TAAs fue capaz de auto ensamblarse en cápsides de aproximadamente 20nm lo cual coincide con los

tamaños reportados para los viriones del parvovirus B19 y las VLPs formadas por la proteína VP2 nativa (Figura 21B).

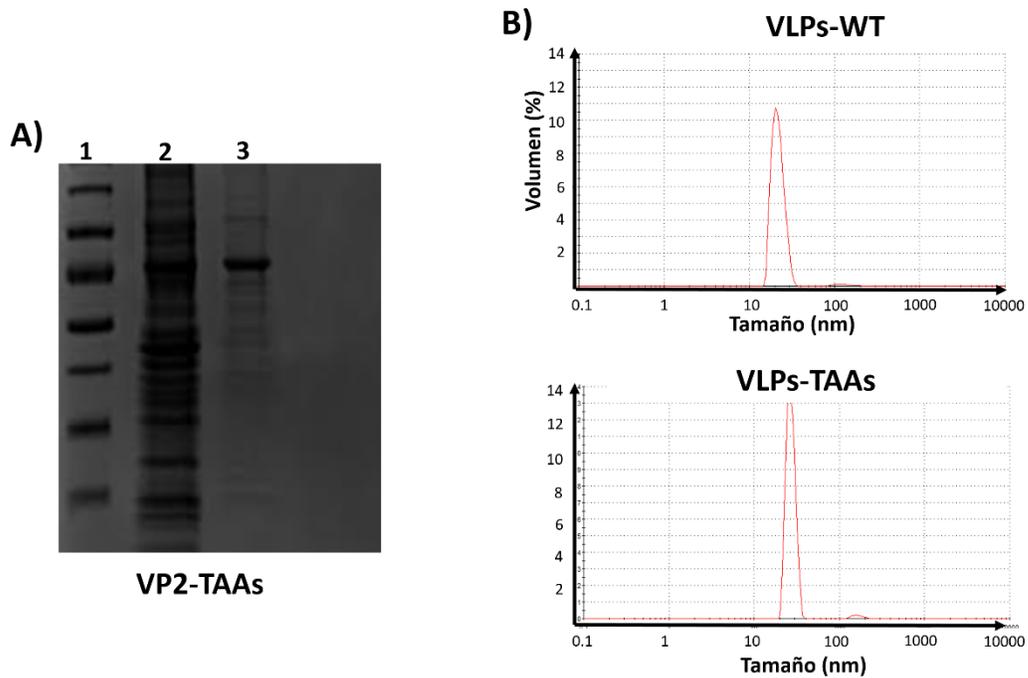


Figura 21. Expresión de proteínas y ensamblaje de VLPs-TAAs. A) Sobreexpresión de proteínas VP2-TAAs, después de la inducción de IPTG durante 18 horas a 30 ° C en células BL21DE3 *E. coli*. Proteínas de células inducidas (2). Marcador de peso molecular (1). Las bandas de ~ 75 kDa, corresponden al peso esperado para VP2-TAAs, VP2-TAAs purificadas por IMAC (3). B) Resultados del tamaño de las VLPs, adquiridos mediante dispersión dinámica de luz. Las VLPs se ensamblaron como se indica en Materiales y Métodos por diálisis de proteínas puras frente a PBS + 0.2M de arginina. Se completaron 50 mediciones para cada muestra y se observaron picos de ~ 20 nm indicando cápsides ensambladas tanto de VLPs-WT como de VLPs-TAAs.

6.5.2. Crecimiento tumoral y metástasis (VLPs-TAAs)

La construcción de VLPs-TAAs fue evaluada tanto en un esquema profiláctico como en uno terapéutico a diferencia de las VLPs-neo las cuales únicamente se evaluaron de forma terapéutica, esto con el objetivo de saber si la inducción de respuestas inmunes hacia antígenos tumorales conocidos es capaz de evitar el establecimiento de tumores. Se observó que la administración profiláctica de las VLPs-TAAs fue capaz de evitar el establecimiento de tumores en el 100% de los ratones, mientras que la coadministración de las VLPs-TAAs con el adyuvante protoxina Cry1Ac redujo este efecto a solo el 30% de protección (Figura 22A). Las VLPs-WT con y sin adyuvante y las VLPs-TAAs, redujeron significativamente el crecimiento tumoral respecto al grupo inmunizado con el vehículo PBS, sin diferencias entre ellas (Figura 22B). En el esquema terapéutico las VLPs-WT retrasaron el crecimiento tumoral con respecto al vehículo, mientras que las VLPs-TAAs tuvieron el mayor retraso del crecimiento respecto al vehículo o las VLPs-WT, la coadministración de las VLPs-TAAs con el adyuvante mostró un mayor volumen que las VLPs-TAA, aunque no existió diferencia significativa entre estas (Figura 22D).

El análisis de las macro metástasis en pulmón indicó un comportamiento similar tanto en el esquema profiláctico y el terapéutico, mostrando que solamente las VLPs quiméricas fueron capaces de disminuir significativamente el número de macro metástasis en pulmón, sin diferencia por la adición del adyuvante. Mientras que las VLPs-WT no tuvieron ningún efecto sobre el establecimiento de metástasis a distancia en ninguno de los esquemas analizados (Figura 22C, E).

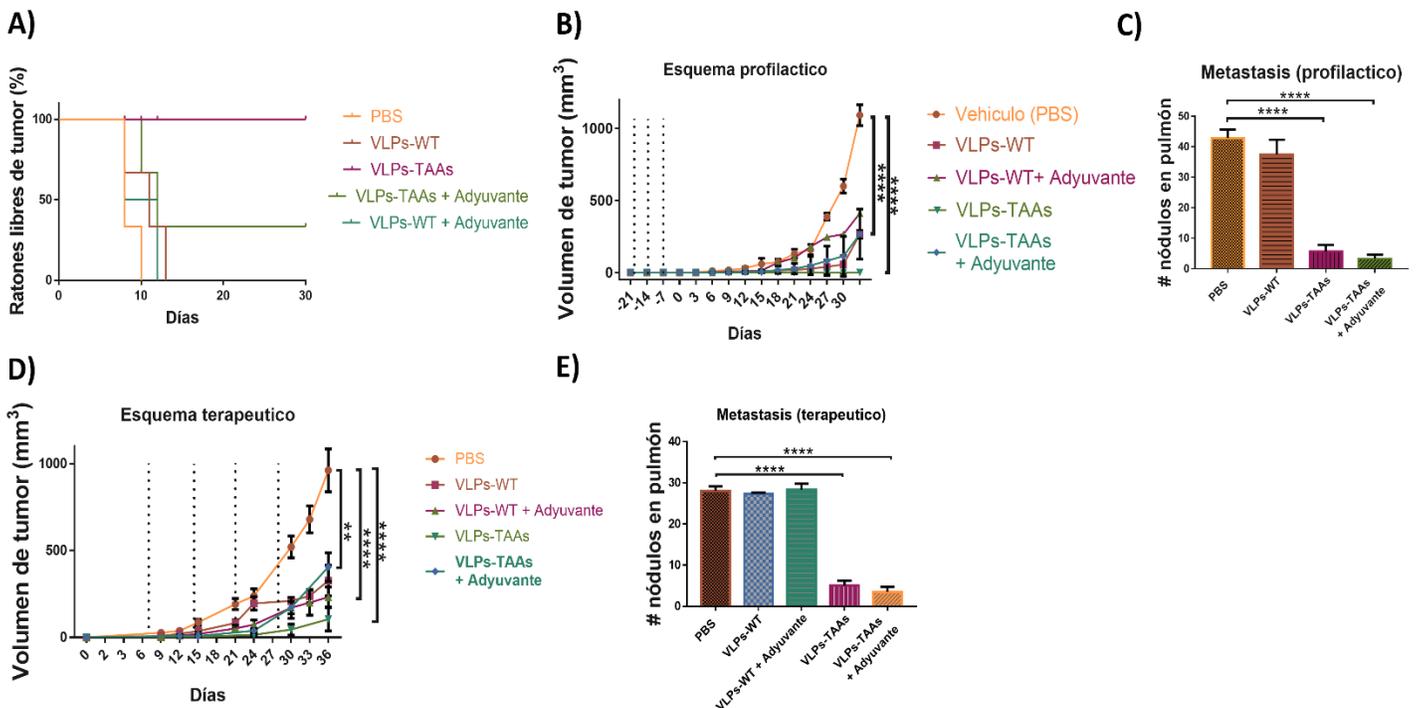


Figura 22. El tratamiento con VLPs-TAAs redujo el crecimiento tumoral en ratones BALB/c con TNBC y evita el establecimiento de tumores inducidos por la línea 4T1. A) porcentaje de ratones libres de tumor, se consideró a los ratones libres de tumor los cuales no presentaron tumores palpables ni medibles con el vernier. B, D) Las ratonas BALB/c fueron inmunizadas en los días indicados (línea de puntos) s.c. peri tumoral e intraperitoneal, 7 días después de la última inmunización (B) o antes de la primera inmunización (D) se implantaron los tumores inyectando 3×10^3 células 4T1 como se detalla en Materiales y Métodos. El crecimiento tumoral se registró cada tercer día. El tamaño del tumor se midió con un vernier digital y el volumen se calculó con la fórmula $V = (L \times S^2) / 2$. C, E) Número de nódulos metastásicos en pulmón, al final de los esquemas profiláctico y terapéutico, los pulmones fueron teñidos con india ink como se describe en Materiales y métodos y se contaron los nódulos con un microscopio estereoscópico. Los datos se representan como media \pm SEM. N = 5–8. *, **, ***, **** Denotan diferencias significativas, donde el valor p fue ≤ 0.05 , 0.01, 0.001 o 0.0001, respectivamente.

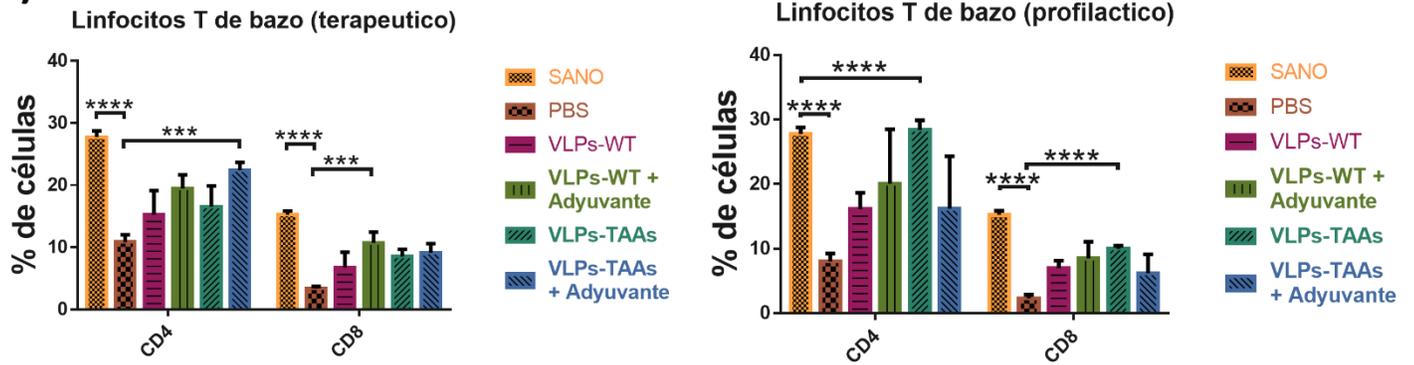
6.5.3. Análisis de linfocitos T y MDSC en bazo y tumor de ratones inmunizados con VLPs-TAAs

El análisis de las proporciones de linfocitos T en el bazo mostró igualmente que los ratones inmunizados únicamente con el vehículo PBS tuvieron una reducción significativa de las proporciones de los linfocitos T CD4 y CD8 (CD4=8.18%/4090, CD8=2.6%/1325) con respecto a ratones sanos (CD4=27.35%/13675 células, CD8=14%/7000 células), al final del esquema profiláctico, con un comportamiento similar en el esquema terapéutico. Por su parte los tratamientos con VLPs mostraron recuperación parcial de las proporciones de las poblaciones analizadas, siendo únicamente significativamente diferentes al vehículo los ratones inmunizados con las VLPs-TAAs con (CD4= 22.36%/11180 células) o sin adyuvante (CD4= 28.39%/14195, CD8= 9.97%/4985 células) (Figura 23A).

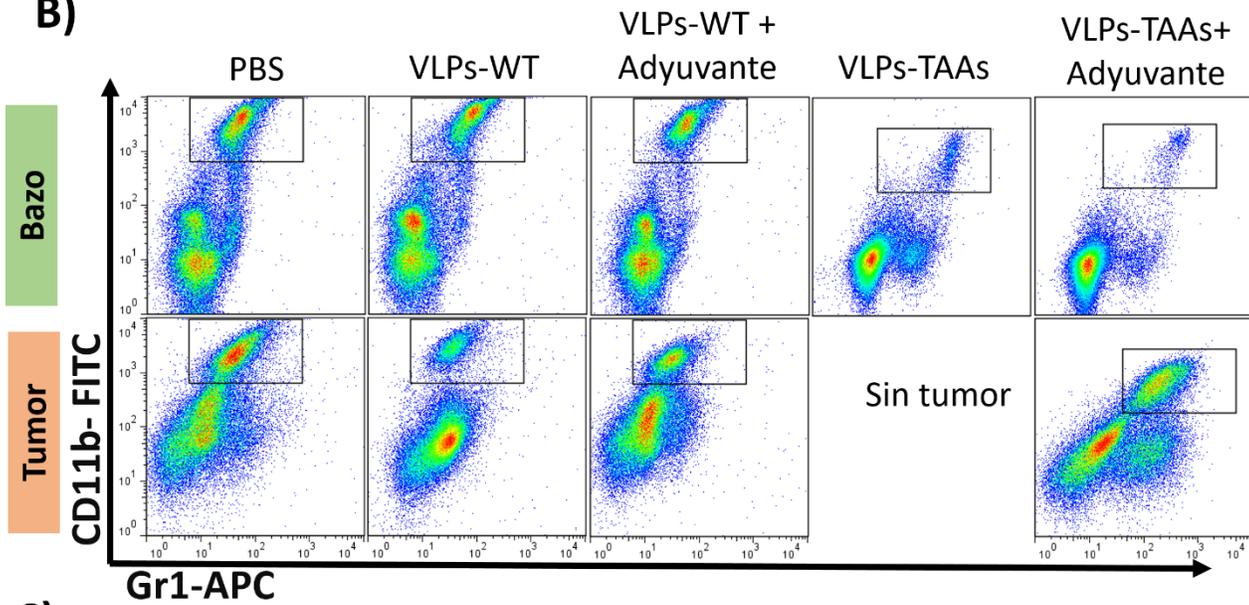
El análisis de la población doble positiva CD11b+ Gr1+ correspondiente en este modelo a las MDSC indicó, como se ha reportado, que existe un aumento significativo de estas células en bazo en los ratones tratados con el vehículo en el esquema profiláctico en bazo= 40.3%/10165 células, así como el esquema terapéutico en bazo=55.16%/27580 células con respecto a ratones sanos en donde esta población representa $\leq 4\%$ de las células en el bazo. En el esquema profiláctico, todos los tratamientos lograron reducir el porcentaje de estas células dobles positivas en el bazo (Figura 23B), aunque únicamente las VLPs-TAAs con (2.18%/1090 células) y sin adyuvante (5.6%/2800 células) lograron una disminución significativa con respecto al grupo PBS. En cuanto al esquema terapéutico, se observó un comportamiento similar, sin embargo, la adición del adyuvante mejoró significativamente la reducción de esta población en bazo, tanto en ratones inmunizados con VLPs-WT (8.69%/4345 células) o VLPs-TAAs (14.16%/7080 células) (Figura 23C).

El análisis de esta población CD11b Gr1 en el infiltrado tumoral mostró que en el esquema profiláctico ningún tratamiento logró disminuir esta población dentro del tumor, mientras que en el esquema terapéutico se observó disminución con todos los tratamientos con VLPs, no se logró un cambio significativo con respecto al grupo PBS (37.8%/18900 células) aunque si se observa claramente una tendencia (Figura 23B, C).

A)



B)



C)

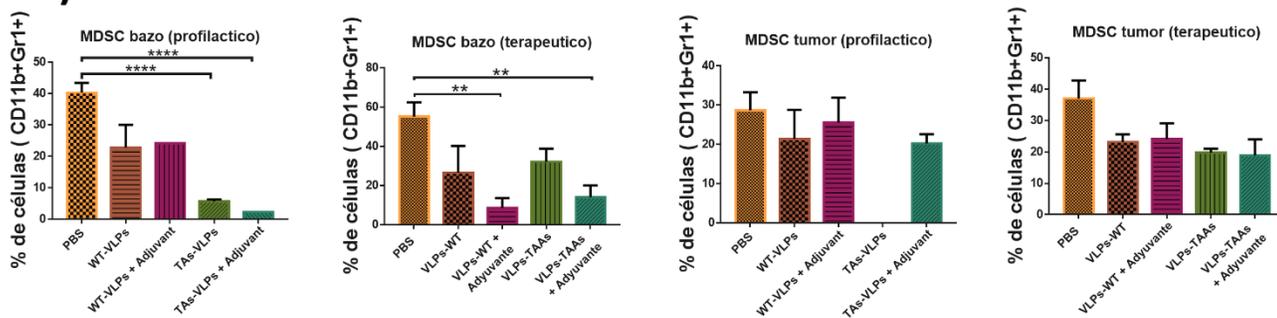


Figura 23. Los tratamientos con VLPs-TAAs provocaron menor reducción de linfocitos T y menor porcentaje de MDSC en el bazo y tumor tanto de forma profiláctica como terapéutica. Ratones BALB/c tratados como se indica en la Figura 20 fueron sacrificados a los 36 días después de la inducción del tumor. El bazo y el tumor fueron extirpados y disgregados. A) Análisis de la proporción de linfocitos CD3⁺CD4⁺ y CD3⁺CD8 en el bazo de los esquemas profilácticos (derecha) y terapéuticos (izquierda). B) Gráficos de puntos representativos que indican poblaciones CD11b⁺Gr1⁺ MDSC en bazo o tumor del esquema profiláctico. Los datos se obtuvieron con un citómetro FACSCalibur y se adquirieron 50000 eventos. C) Proporciones de MDSC en bazo o tumor de los esquemas profiláctico y terapéutico, los datos en gráficos de barras se representan como media ± SEM. N = 6. *, **, ***, **** Denotan diferencias significativas, donde el valor p fue ≤ 0.05, 0.01, 0.001 o 0.0001, respectivamente.

6.5.4. Inducción de anticuerpos por VLPs-TAAs

Para demostrar la inducción de respuestas inmunes en los ratones inmunizados hacia las VLPs-TAAs o hacia los péptidos de interés contenidos en éstas, se analizaron los títulos de anticuerpos en el suero de ratones únicamente inmunizados sin inducción de tumor. Se realizaron pruebas de ELISA para cuantificar anticuerpos IgG totales utilizando la VLPs-TAAs como antígeno o un péptido de MUC1. Se observó que la inmunización con las VLPs-TAAs indujeron altos títulos de anticuerpos hacia las cápsides de VLPs-TAAs en comparación con los sueros de ratones inmunizados con el vehículo PBS (Figura 24A), este efecto fue mayor con la adición del adyuvante protoxina Cry1Ac. Para analizar la respuesta hacia un péptido contenido en la región multiepitópica de las VLPs se analizó la respuesta hacia un péptido de MUC1, se observó que la inmunización con VLPs-TAAs induce grandes títulos de anticuerpos hacia MUC1 y que estos títulos aumentan con la coadministración con el adyuvante (Figura 24B).

6.5.5. Respuestas inmunes celulares inducidas por las VLPs-TAAs

Para el análisis de las respuestas celulares inducidas por los tratamientos se aplicaron dos inmunizaron s.c. a ratones BALB/c antes de su sacrificio, los ganglios inguinales locales al sitio de la inyección se extrajeron y disgregaron, las células totales fueron teñidas con CFSE y se incubaron sin estímulo, con péptidos de P53 o con VLPs-TAAs durante 5 días. Trascurrido el tiempo de estimulación las células fueron recuperadas y teñidas para identificar a células T CD4 y CD8, el análisis de la pérdida de CFSE (proliferación) mostró que el estímulo con péptidos de P53 o VLPs-TAAs fueron capaces de inducir entre 20 y 30% de células T CD4 en proliferación en el ganglio inguinal (Figura 24C), igualmente se observó proliferación de células T CD8 ante ambos estímulos aunque en menor medida que la observada en las células CD4 (Figura 24D).

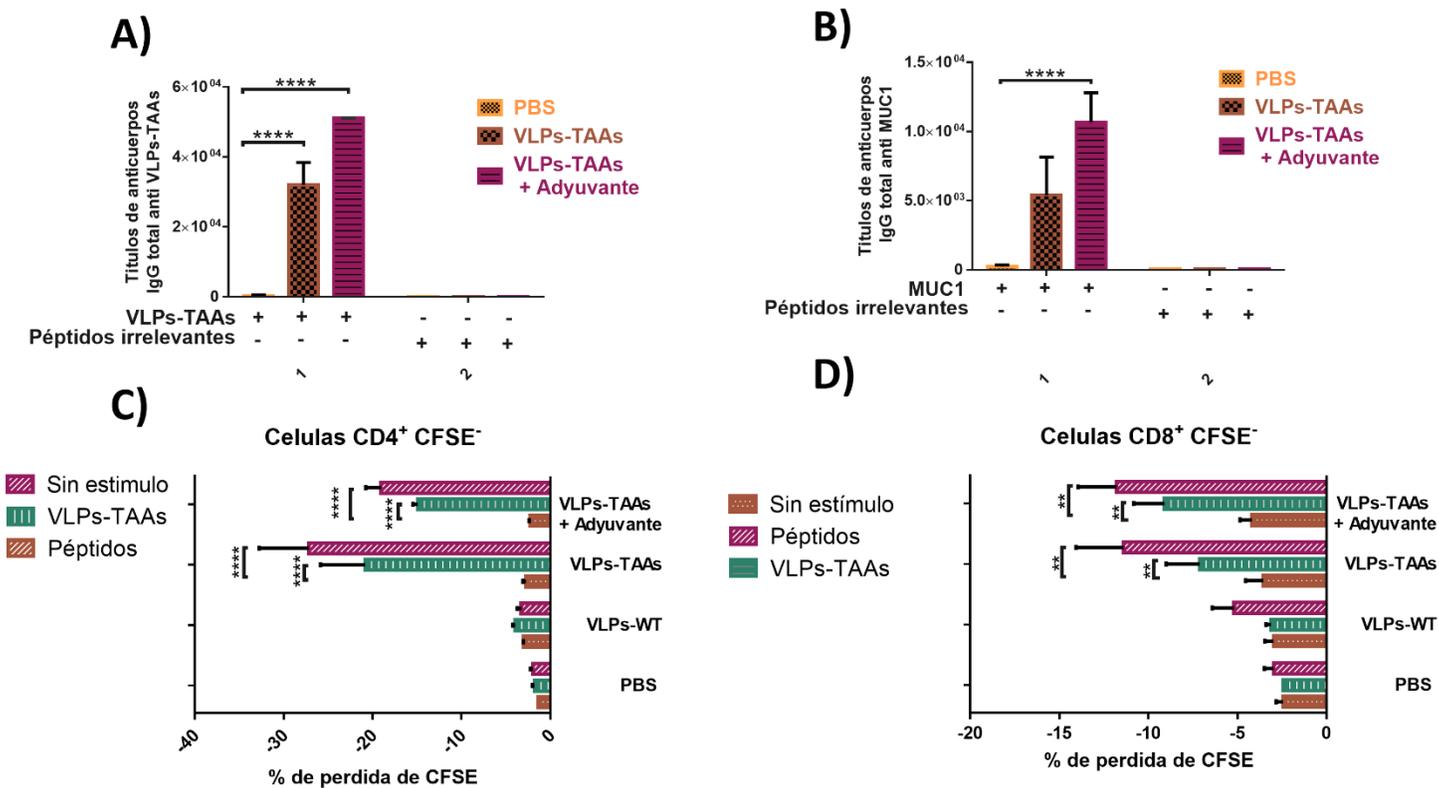


Figura 24. El tratamiento con VLPs-TAAs induce respuestas de anticuerpos y proliferativas de T CD4 y T CD8 hacia péptidos de P53 en el ganglio inguinal. A, B) Pruebas de ELISA para detectar anticuerpos anti VLPs-TAAs (A) o anti MUC1 (B), sueros de ratones inmunizados con el vehículo PBS o con las VLPs-TAAs con y sin adyuvante se colocaron en diferentes diluciones en pozos recubiertos con VLPs-TAAs o MUC1 como se describe en materiales y métodos. C) Ratones BALB/c recibieron dos inmunizaciones con cualquiera de los tratamientos indicados, los animales se sacrificaron y los ganglios linfáticos inguinales fueron extirpados y disgregados. Se tiñeron 3×10^6 células con CFSE como se describe en la sección Materiales y Métodos. Las células se estimularon con péptidos (2 $\mu\text{g/ml}$) o con VLPs-TAAs (20 $\mu\text{g/ml}$) durante cinco días. Las células se recuperaron, se tiñeron con anticuerpos anti CD3, CD4 (C) o CD3 CD8 (D), y se analizaron por citometría de flujo con un citómetro FACSCalibur, en el que se obtuvieron 50000 eventos por muestra. Los datos en gráficos de barras se representan como media \pm SEM. N = 3. *, ** Denota diferencias significativas, donde el valor p fue ≤ 0.05 o 0.01, respectivamente.

6.6. Efectos de las VLPs-WT sobre las células tumorales *in vitro*.

Debido al efecto inesperado de las VLPs-WT sobre el crecimiento tumoral, se evaluó si estas VLPs eran capaces de ingresar al tumor después de la administración peri tumoral, los resultados mostraron que las VLPs-WT marcadas con GFP (VLPs-GFP) se encontraron dentro del tumor 1 hora después de la administración y pueden ser detectadas hasta 24 horas después de la administración (Figura 25A). El análisis por in cell western mostró que las VLPs-WT pueden unirse a las células 4T1 después de 1 hora de incubación (Figura 25B). Se observó que las VLPs-WT pueden inducir altos títulos de anticuerpos en suero de ratones inmunizados (Figura 25C), estos anticuerpos muestran baja unión a las células 4T1 (Figura 25B derecha) en comparación con la unión de las VLPs. La evaluación de los efectos de la unión de las VLPs-WT y VLPs-Neo a las células tumorales mostró que puede conducir al bloqueo de la unión de las células 4T1 a una matriz de fibronectina (Figura 25D) y puede afectar su migración independientemente de la adición del adyuvante (Figura 25E). Además, después de 24 horas de estimulación con VLPs-WT se observó aumento en el porcentaje de células tumorales en apoptosis temprana (Figura 25F, G izquierda) y tardía (Figura 25G derecha), además de la disminución en el metabolismo celular medido por la reducción de MTT a cristales de formazán (Figura 25H), no se observó que las VLPs-WT indujeran apoptosis temprana o tardía en los linfocitos de cultivo primario en ninguna de las concentraciones evaluadas (datos no mostrados). En conjunto, estos resultados indican que las VLPs-WT pueden unirse a las células 4T1 e inducir apoptosis, sugiriendo efectos directos sobre las células tumorales que ayudan a explicar los efectos antitumorales observados.

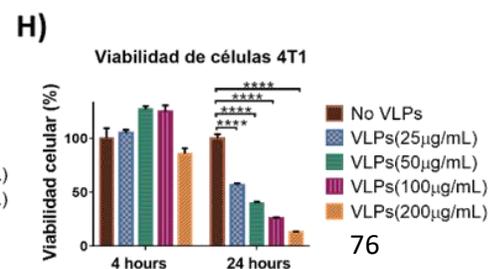
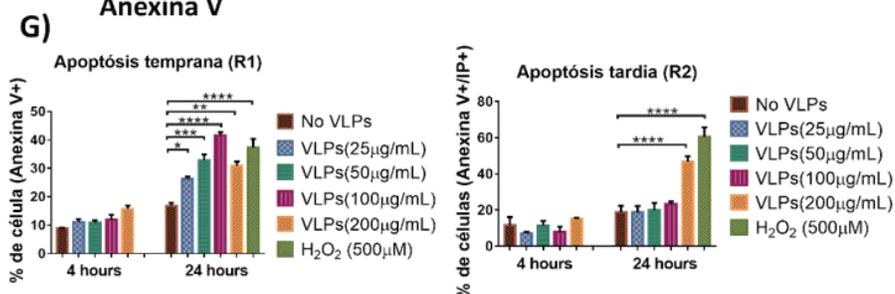
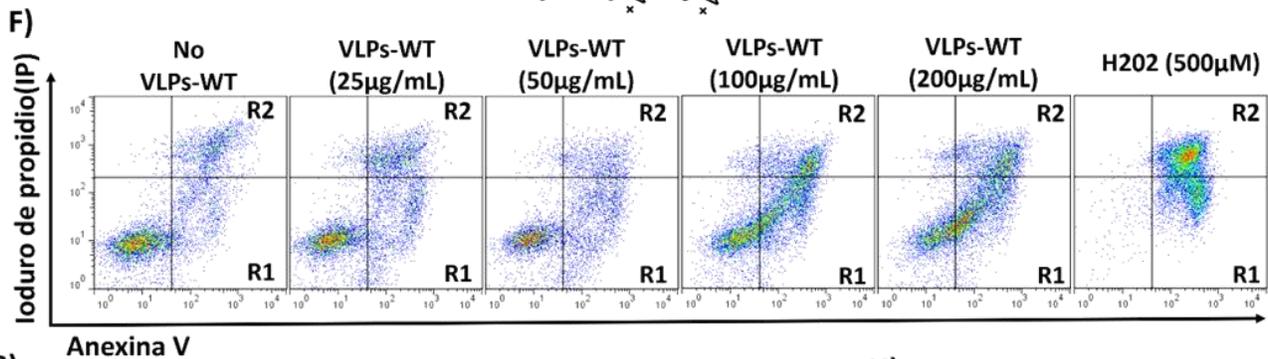
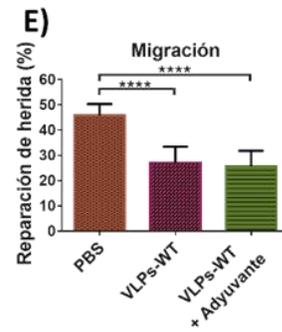
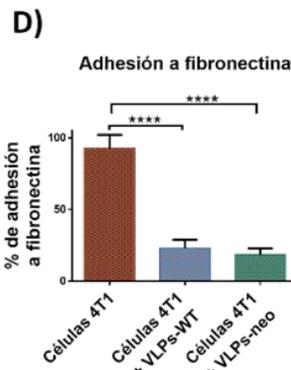
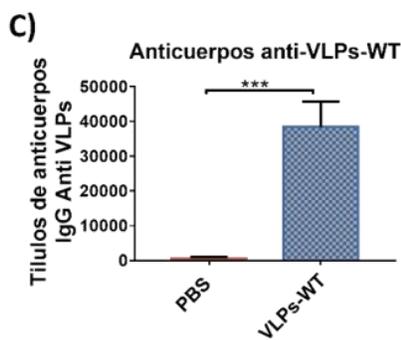
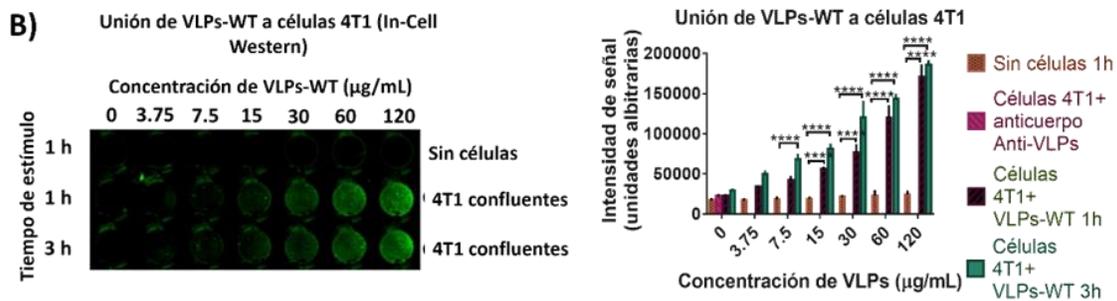
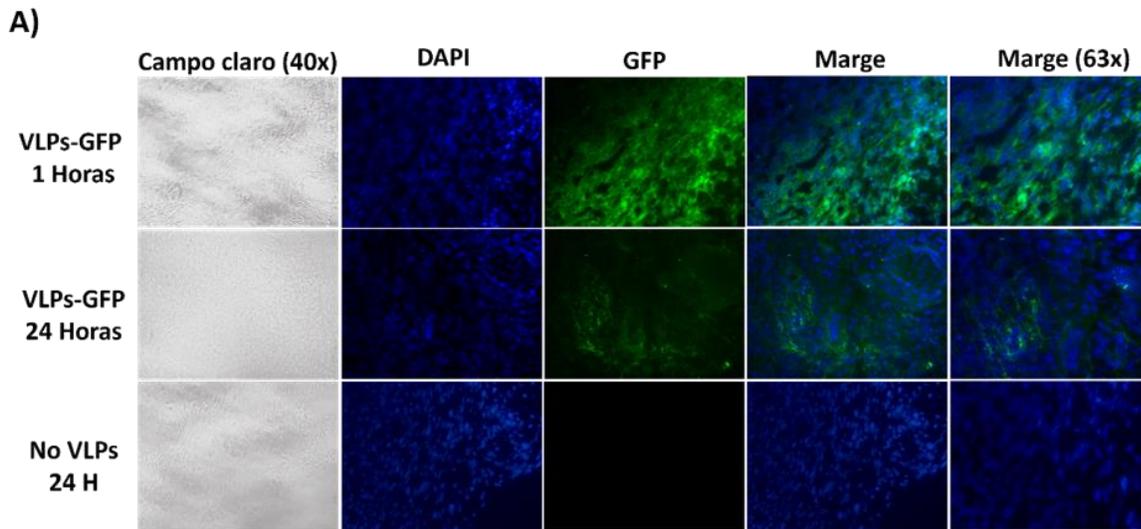


Figura 25. Las VLPs-WT pueden ingresar al tumor, unirse a las células 4T1 y afectar su migración, adhesión a fibronectina e inducir apoptosis. A) Entrada de VLPs-GFP en tumores, se inyectaron 50 µg de VLPs-GFP s.c. cerca de la sexta mama de ratónas BALB/c y se extrajo el tumor primario después de 1 y 24 horas, se hicieron cortes de 5 µm, los núcleos se tiñeron con DAPI y se tomaron fotografías (40X) con un microscopio de fluorescencia Leica. B) Unión de VLPs a células tumorales, las células 4T1 se estimularon con concentraciones crecientes de VLPs-WT, durante 1 y 3 horas. Los pocillos se lavaron y se usó anticuerpo policlonal anti-VLPs-WT, para detectar la unión de VLPs a las células 4T1 (izquierda), se usó el anticuerpo secundario monoclonal anti-conejo Dye 800. La intensidad de la señal se determinó con un escáner Oddyssey LICOR, el panel derecho muestra el análisis de la intensidad de la señal. C) Títulos de anticuerpos anti-VLPs inducidos después de 3 inmunizaciones semanales con VLPs-WT. D) Adhesión *in vitro* de células 4T1 a fibronectina. Las placas de 96 pocillos se cubrieron con fibronectina (20 µg / pocillo) y las células 4T1 no adherentes 1×10^5 se incubaron con 50 µg/ml de VLPs-WT o VLPs-neo durante 30 minutos, a temperatura ambiente. Las células se añadieron a los pocillos y se incubaron durante 2 horas. Se usó cristal violeta para determinar las células adheridas. E) Porcentaje de migración, ensayo de cierre de heridas, una monocapa confluyente de células 4T1 se rascó con una punta amarilla y se cultivó durante 24 horas. Se utilizaron PBS, VLP-WT (50 µg/ml) solo o con adyuvante (50 µg/ml) como estímulo y se calculó el cierre de heridas con el software ImageJ. F) Gráficos de puntos representativos de la inducción de apoptosis temprana (anexina V+, R1), apoptosis tardía (anexina V+ IP+, R2) y necrosis (IP +) en células 4T1 inducidas por diferentes concentraciones de VLPs-WT después de 4 o 24 horas de estimulación. G) Análisis de la inducción de apoptosis temprana (izquierda) o tardía (derecha) de células 4T1 después de 4 o 24 horas de estimulación con diferentes concentraciones de VLPs-WT. H) Análisis de la viabilidad celular de las células 4T1 estimuladas con diferentes concentraciones de VLPs-WT mediante la reducción de MTT después de 4 o 24 horas de estimulación. Los datos se representan como media ± SEM. N = 6. *, **, ***, **** denota diferencias significativas, donde el valor p fue ≤ 0.5, 0.1, 0.01 o 0.001 respectivamente.

Debido a que se observó que las VLPs-B19 eran capaces de unirse a las células tumorales murinas 4T1, se analizó si este efecto se daba también en líneas celulares de cáncer de mama humano, para ello la unión de las VLPs-GFP a células tumorales se determinó mediante citometría de flujo utilizando azul tripano para apagar la fluorescencia de la GFP y así analizar la internalización de las VLPs en las células. Los datos demostraron que las VLPs-GFP son capaces de unirse a las células CRL-1790, las cuales son células epiteliales no transformadas, sin embargo, esta unión fue menor comparada con la observada en las líneas MCF-7 y MDA-MB-231, que tuvieron una unión similar a la línea 4T1 (Figura 26A izquierda), la adición del azul tripano disminuyó la fluorescencia de la GFP casi por completo en todas las líneas tumorales y no tumorales, indicando que la internalización de las VLPs en estas células fue mínima o nula (Figura 26A derecha).

Finalmente, como una forma de caracterizar la entrada de las VLPs en las poblaciones inmunológicas de los ganglios linfáticos se analizó la unión e internalización de las VLPs en algunas poblaciones de importancia de los ganglios linfáticos, se observó que las VLPs-GFP no se unen a las células CD3+ (linfocitos T) ni CD19+ (linfocitos B) y tampoco se internalizan en estas células, mientras que se observó una gran unión de las VLPs-GFP a células CD11c+ (células dendríticas) y CD11b+ (macrófagos, neutrófilos) (Figura 26B izquierda), además se observó internalización tanto en las células CD11c+ y CD11b+, las cuales corresponden a marcadores de APC.

Estos resultados muestran que las VLPs son capaces de entrar al tumor y a los ganglios linfáticos locales y pueden unirse a las células tumorales además de ser captadas y endocitadas por las APC.

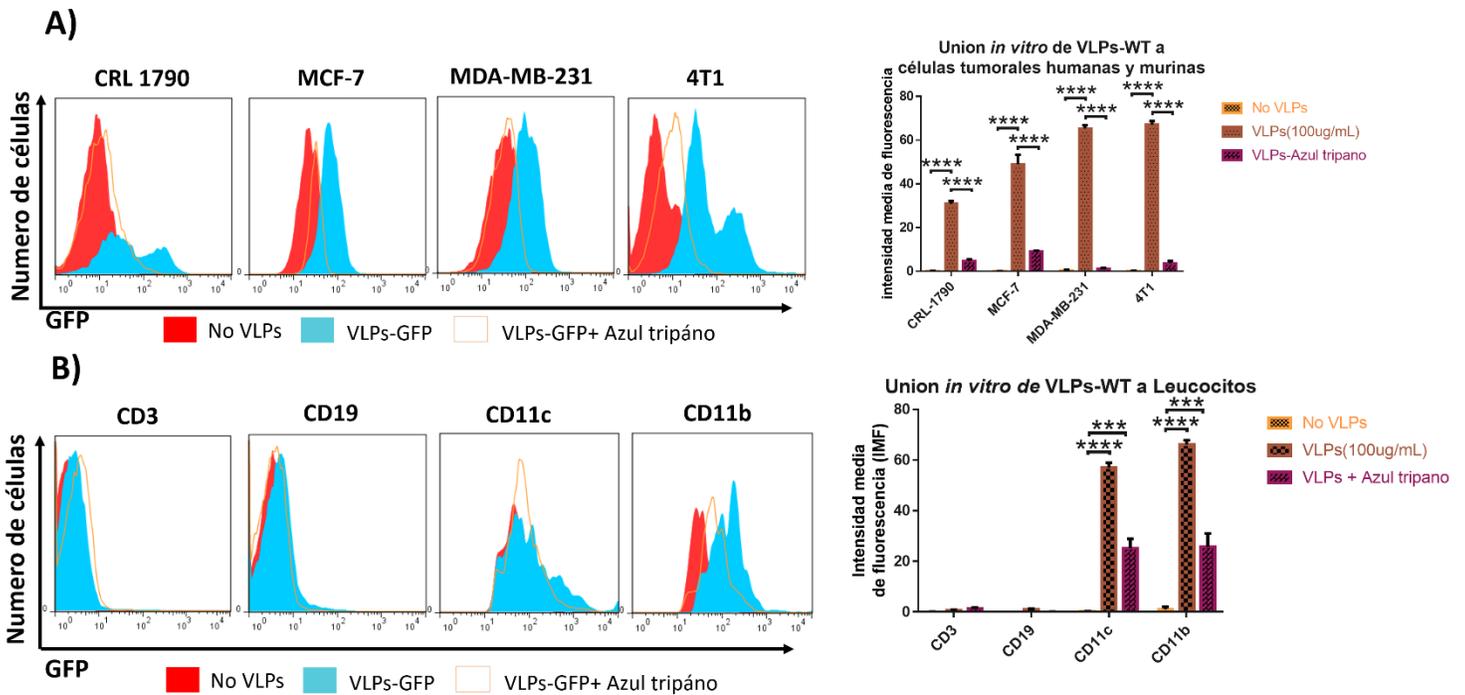


Figura 26. Las VLPs pueden unirse a líneas de cáncer de mama humano y a poblaciones de células presentadoras de los ganglios linfáticos. A) Las células fueron incubadas con las VLPs-GFP como me describe en materiales y métodos y analizadas por citometría de flujo, se muestran histogramas representativos (izquierda) y el análisis de la intensidad media de fluorescencia (derecha), para el análisis de la internalización se utilizó azul tripano para apagar la fluorescencia de la GFP. B) Se obtuvieron ganglios inguinales de ratones sanos y se disgregaron, se tiñeron las células con los marcadores indicados y se incubaron con las VLPs-GFP, se utilizó azul tripano para analizar la señal intracelular. Los datos se representan como media \pm SEM. N = 6. *, **, ***, **** denota diferencias significativas, donde el valor p fue \leq 0.5, 0.1, 0.01 o 0.001 respectivamente.

7. Discusión

Actualmente, la inmunoterapia se ha restringido a cánceres con blancos moleculares reconocidos. Por lo tanto, las neoplasias malignas como el TNBC, continúan siendo cánceres con pocas expectativas de cura y opciones de tratamiento disponibles limitadas. Como resultado, estos cánceres sin blancos moleculares reconocidos continúan siendo tratados con quimioterapia y radioterapia. El uso de neoepítomos y/o TAAs representan una alternativa para proporcionar blancos específicos en tumores que carecen de blancos moleculares reconocidos. Sin embargo, para mejorar la capacidad de los neoepítomos o TAAs de inducir inmunidad antitumoral, es necesario desarrollar sistemas de entrega de antígenos apropiados.

Los resultados de este estudio respaldan el uso de VLPs formadas por la proteína VP2-B19, como un prometedor sistema de entrega de antígenos tumorales con potencial efecto terapéutico ya que funciona en un modelo murino de TNBC. Coincidiendo con informes anteriores, nuestros resultados actuales mostraron que la adición de secuencias de epítomos en la región amino terminal de la proteína VP2-WT no altera sus propiedades de ensamblaje [121, 122], lo que respalda aún más la ventaja de este sistema VLPs para ser utilizado como sistema de entrega de antígeno .

Encontramos que la administración intraperitoneal y peritumoral de las VLPs-neo, cargadas con neoepítomos (Gprc5a, Tmtc2, Qars) o TAAs (survivina, p53, MUC1), pueden retrasar significativamente el crecimiento tumoral inducido por la inyección s.c. de 1×10^4 o 3×10^3 células 4T1 (VLPs-neo), donde 4/7 ratones alcanzaron la remisión tumoral completa después de la administración conjunta de VLPs-neo con el adyuvante, la protoxina Cry1Ac. Mientras que la administración profiláctica con VLPs-TAAs indujo una protección total ante el reto con las células 4T1. A pesar de estos resultados, la remisión total solo se logró cuando se indujeron tumores con la dosis más baja de 3×10^3 células 4T1. Sin embargo, es importante señalar que al final del estudio terapéutico se observó un retraso significativo en el crecimiento del tumor, con ambas construcciones quiméricas a diferentes concentraciones de células cancerosas.

La inmunización con VLP-neo y VLPs-TAAs también redujo significativamente el tamaño y el número de nódulos de macro-metástasis en los pulmones, que fue inducida por la administración s.c. de ambas concentraciones de células 4T1, el grupo VLP-neo también mostró un índice metastásico más bajo que los grupos VLPs-WT y PBS, por lo tanto, la disminución en el tamaño del tumor principal inducido por las VLP-neo puede estar relacionado con una menor salida de células metastásica hacia el pulmón. Igualmente este efecto puede estar relacionado con la inducción de respuestas inmunes en los ganglios linfáticos sentinelas el cual es de los primeros en ser colonizados antes de que las células tumorales se esparzan a órganos distantes. En cuanto a nuestros resultados que mostraron que una concentración más baja de células 4T1 indujo un mayor número de macro-

metástasis en los pulmones de los ratones no tratados, esto se ha reportado previamente [119], se sugiere que la inyección de una mayor cantidad de células induce una mayor tasa de muerte entre las células 4T1 inyectadas en la mama, ya que no el 100% de las células se implantan para comenzar a crecer y formar un tumor, generalmente las células que no se implantan mueren y pueden ser captadas por células presentadoras de antígeno, las cuales viajan a los ganglios linfáticos cercanos y presentan antígenos tumorales a linfocitos T, de esta manera la inyección de una mayor cantidad de células puede simular una vacunación con células 4T1 muertas y puede contribuir a la inducción de respuestas inmunes que pueden interferir con la migración de células 4T1 que salen del tumor para la colonización de órganos distantes.

Debido a su pequeño tamaño de aproximadamente 20 nm, las VLPs-B19 pueden ser capaces de ingresar directamente a los ganglios linfáticos locales al tumor, de manera similar a lo que se ha informado para las VLPs de parvovirus porcino, las cuales son capturadas en los ganglios linfáticos y procesadas por células dendríticas CD8⁺ CD11b⁺ y presentadas a los linfocitos T [102, 123] [44, 45]. Aunque la mayor parte de los epítomos contenidos en las VLPs quiméricas se eligieron como epítomos de CD8, buscando la inducción de respuestas inmunes citotóxicas; debido a su tamaño (más de 9 a.a.), también son capaces de funcionar como epítomos CD4. Asimismo, la mayoría de los neoepítomos identificados en la línea celular 4T1, por Kreiter et al, fueron reconocidos por las células CD4 [115]. Además, debido a la naturaleza exógena de las VLPs, también es posible una presentación en MHCII, por lo tanto, la inducción de ambos tipos de respuestas celulares, en los ganglios linfáticos inguinales inducidos en el presente estudio por la inmunización con VLPs-neo y VLPs-TAAs que contienen epítomos CD8, era de esperar, y también puede estar contribuyendo a favorecer la inducción de respuestas antitumorales efectivas. De hecho, la inducción de respuestas CD4 Th1 también ha demostrado desempeñar un papel importante en la inducción de fuertes respuestas antitumorales [124, 125]. Nuestros resultados también indican que los VLPs-B19 pueden entrar a los ganglios linfáticos locales en donde pueden ser capturadas y procesadas por APC CD11c⁺ y CD11b⁺ para presentar epítomos de la región multiepitópica tanto a linfocitos T CD4 como CD8. En este trabajo no evaluamos las proporciones de linfocitos T CD4 reguladores, los cuales tienen un papel importante en bloquear las respuestas citotóxicas de los linfocitos T por secreción de citocinas como TGFβ, lo cual es de gran importancia ya que la inducción de linfocitos T específicos hacia los antígenos en las construcciones no garantiza que dichos linfocitos puedan eliminar a las células tumorales dentro del microambiente tumoral

Un indicativo de la capacidad citotóxica de los linfocitos T es la producción de granzima B la cual induce apoptosis por activación de las caspasas en las células blanco de los linfocitos, nosotros observamos un aumento en el número y proporción de linfocitos T CD8 que producen Granzima-B en los ganglios inguinales después de la inmunización con VLPs quiméricas, además, cuando se evaluó la citotoxicidad de los linfocitos T CD8 sobre células 4T1 *in vitro*, las células de ratones inmunizados con VLPs-neo indujeron un aumento de la apoptosis *in vitro*. Estos resultados sugieren que la inmunización con VLPs quiméricas puede inducir respuestas

específicas de linfocitos T citotóxicos a los epítomos contenidos. Se ha informado que la inducción de respuestas inmunes específicas a antígenos tumorales en los ganglios linfáticos cercanos es importante ya que estos sitios son los primeros en ser invadidos durante la fase temprana de la metástasis [126, 127]. Por lo tanto, la inducción de respuestas celulares en este sitio puede estar relacionada con la disminución de la tasa metastásica observada.

Además de la respuesta inmune celular, las VLPs-B19 fueron capaces de inducir altos títulos de anticuerpos hacia un epítomo de MUC1 mostrado en la superficie de las cápsides, estos anticuerpos pueden estar contribuyendo al efecto antitumoral mediante la inducción de ADCC o activación del complemento. Los anticuerpos anti VLPs no parecen estar relacionados con el efecto antitumoral ya que no mostraron una unión significativa a las células 4T1 (Figura 25B derecha), las VLPs son inmunogénicas, ya que inducen títulos de anticuerpos significativos (Figura 25C), por lo que puede producirse la inducción de ADCC en presencia de VLPs, las cuales pueden unirse a las células tumorales.

También observamos cambios en las poblaciones celulares del bazo. Los ratones inmunizados con VLPs-WT o VLPs-neo/VLPs-TAAs mantuvieron la proporción de linfocitos T CD4 y CD8 a niveles normales en el bazo, los animales tratados solo con PBS mostraron una disminución significativa de estas poblaciones celulares en el bazo [128]. Esta disminución en las proporciones de linfocitos se ha asociado con el aumento de las poblaciones supresoras en este órgano que puede conducir a la anergia y la apoptosis de los linfocitos [129]. Por lo tanto, también analizamos la proporción MDSC, que se ha informado como las células supresoras principales en el modelo 4T1 [130]. Nuestros resultados mostraron que los ratones tratados con PBS presentaron aumento significativo en la población CD11b⁺ Gr1⁺ que denotan las MDSC en el bazo, mientras que los ratones inmunizados con VLPs-WT o VLPs-neo/VLPs-TAAs con y sin adyuvante mostraron disminución significativa de estas células, con una mayor disminución con la adición del adyuvante con respecto al grupo PBS. Estos resultados sugieren que el adyuvante, la protoxina Cry1Ac, puede tener algún efecto en la disminución de esta población de MDSC en bazo, este hallazgo es bastante relevante debido al papel de esta población en la progresión tumoral a nivel sistémico, este efecto podría estar relacionado con la capacidad de la protoxina Cry1Ac para entrar al bazo, en donde se ha reportado que puede interactuar con diversas poblaciones celulares como células presentadoras y linfocitos, además, por su capacidad de activación mediante la activación de las rutas de MAPK [132], la protoxina Cry1Ac podría inducir la diferenciación de las células supresoras (MDSC) hacia monocitos o granulocitos, como ha sido descrito por diversos adyuvantes, en particular por agonistas de receptores tipo toll (TLRs) 7/8 o 9 [131], otra posibilidad es la inducción de apoptosis de estas células por el núcleo tóxico de la protoxina, esta alternativa es poco probable ya que no se ha demostrado que la protoxina/toxina Cry1Ac tenga efecto citotóxico en células de vertebrados por su mecanismo de formación de poros en la membrana, sin embargo, ambas posibilidades requieren ser determinadas. El efecto del adyuvante sobre la población de MDSC se restringió al bazo, mientras que no afectó esta población dentro del tumor, esto puede ser debido a la falta de acumulación dentro

del tumor, ya que no se ha reportado si el adyuvante es capaz de entrar al tumor y si es capaz de interactuar con alguna población intratumoral como si ha demostrado hacerlo con poblaciones de bazo. Las VLPs mostraron también la capacidad de disminuir esta población en bazo y tumor, lo cual puede estar relacionado con su capacidad de inducir muerte de las células tumorales, las cuales son las principales responsables de la acumulación de células supresoras tanto en el tumor como en el bazo, sin embargo, sería importante investigar si las VLPs pueden tener algún efecto sobre la población de células supresoras como las MDSC.

Las VLPs-WT mostraron un efecto inesperado sobre el crecimiento tumoral inducido con 1×10^3 células 4T1. Se observó un tamaño medio más bajo en VLPs-WT y VLPs-WT más adyuvante, éstas VLPs también muestran efectos en la población de MDSC en el bazo, lo que sugiere que pueden tener un efecto antitumoral no mediado por respuestas inmunes celulares específicas. Algunos informes han demostrado que las VLPs formadas por la proteína VP2-WT-B19 pueden unirse al globosido Gb4 y la integrina $\alpha 5\beta 1$ [133, 134], ambas relacionadas con la inducción de proliferación en las células tumorales, a través de la activación de vías de señalización como MAPK [135-137]. En este estudio, observamos que las VLPs-B19 pueden acceder a los tumores y permanecer allí al menos 24 horas después de la inyección, esto puede deberse al efecto de mejoramiento de la permeabilidad y la retención de partículas descritas en los tumores [51]. Realizamos algunos ensayos para determinar si las VLPs-WT pueden unirse o afectar algunas funciones de las células 4T1. Observamos que las VLPs-WT pueden unirse directamente a las células 4T1, *in vitro*, y afectar su migración y unión a la fibronectina (ligando de la integrina $\alpha 5\beta 1$). Además, las VLPs fueron capaces de inducir apoptosis y disminuir la viabilidad de las células tumorales después de 24 horas de cultivo, esta unión de las VLPs a las células tumorales no se limitó a la línea 4T1, se observó la misma unión a líneas celulares de cáncer de mama humano MFC-7 y MDA-MB-231, Estos resultados indican que las VLPs-WT puede ingresar al tumor, acumularse en él, interfiriendo con la unión de las células tumorales a la matriz extracelular e induciendo apoptosis de las mismas, por lo cual pueden tener un efecto directo en el crecimiento tumoral, y ya que el tamaño del tumor principal está directamente relacionada con las poblaciones de MDSC en bazo, el efecto directo de las VLPs sobre las células tumorales puede explicar la modificación de las poblaciones supresoras en bazo, a pesar de que su administración fue peri tumoral. Este efecto directo de las VLPs parece depender de la acumulación en el tumor, ya que cuando las células metastáticas salen del tumor ya no existe VLPs en concentraciones suficientes para afectarlas, lo cual explica que las VLPs-WT no afecten la tasa de metástasis a pulmón. Estos resultados también indican que debido a su capacidad de entrada y acumulación en el tumor las VLPs-B19 podrían usarse como un sistema de entrega de fármacos antitumorales hacia el tumor. Lo cual merece mayor investigación.

Además, sería importante probar el efecto antitumoral en un modelo de cáncer diferente para establecer si el efecto antitumoral inesperado de las VLPs-WT observadas en este modelo también se produce en otros modelos de cáncer. Aunque en el presente estudio no detectamos ningún signo visible de inflamación

crónica, como se manifiesta por lesiones cutáneas o apariencia desaliñada de ratones. También sería necesario realizar una evaluación completa de los posibles efectos secundarios o autoinmunidad inducidos por las VLPs-WT y la vacunación con VLPs quiméricas en estudios posteriores.

La mejora en la identificación y priorización de los neoepítomos y TAA continúan siendo fundamental para garantizar la inducción de respuestas específicas y aumentar la probabilidad de inducir respuestas inmunes fuertes capaces de efectividad profiláctica y terapéutica. Aquí demostramos que las VLPs-B19 pueden ser utilizadas para inducir respuestas inmunes hacia neoepítomos y TAAs tanto de forma profiláctica como terapéutica, existiendo diferencias entre ambos esquemas, posiblemente debidos a la distribución diferencial de las VLPs al ser inyectadas por vía s.c., mientras que en el esquema profiláctico las VLPs drenan únicamente hacia los nódulos linfáticos cercanos, en el esquema terapéutico las VLPs pueden entrar tanto al tumor como a los ganglios, por lo cual la cantidad de VLPs que llegan a las células presentadoras para ser procesados es diferente. Esto es importante ya que la principal aplicación para estas VLPs puede ser de forma terapéutica, debido a la falta de blancos terapéuticos para utilizarse de forma profiláctica en humanos. Por lo cual es necesario optimizar la concentración de VLPs para garantizar tanto el efecto directo de las VLPs como las respuestas inmunes inducidas por estas.

Tanto el uso de TAAs como de neoepítomos muestran inducir respuestas inmunes antitumorales, el uso de neoepítomos actualmente está enfocado en el tratamiento terapéutico del cáncer, ya que como se mencionó es necesario una biopsia del tumor para identificar sus neoepítomos específicos, los cuales no son compartidos por personas con el mismo tipo de cáncer, ni incluso por el mismo paciente en diferentes estadios de la enfermedad, debido a esto también es importante el mejoramiento de las técnicas de purificación y ensamblaje para disminuir el tiempo de producción de las VLPs quiméricas, lo cual resulta primordial para el uso de neoepítomos debido a su variabilidad a través del tiempo. Por su parte el uso de TAAs se ha utilizado como antígenos de elección para la búsqueda de vacunas profilácticas ya que estos antígenos son compartidos por diferentes tipos y subtipos de cáncer, sin embargo, es difícil predecir los antígenos tumorales que van a estar presentes cuando aparezca un tumor, por lo cual los TAAs también han sido ampliamente utilizados para la inducción de respuestas de forma terapéutica. Nuestros resultados muestran que ambos tipos de antígenos son útiles para la inducción de respuestas antitumorales, por lo que puede utilizarse una combinación de TAAs y neoepítomos, siempre y cuando se haya determinado que los antígenos seleccionados se encuentran expresados en el mismo tumor.

Se requieren nuevos estudios para caracterizar aún más las VLPs-B19 como un sistema de entrega de antígenos en cáncer, tanto con neoepítomos para cánceres sin blancos moleculares conocidos como con antígenos reconocidos, como HER-2, antígeno prostático específico, etc., para establecer en qué tipos de cáncer el enfoque de las VLPs con antígenos tumorales puede ser beneficioso. También, es importante determinar si estas VLPs pueden permitir la inducción de respuestas humorales hacia epítomos conformacionales acoplados, lo que podría extender la

aplicación de este enfoque a los cánceres donde las respuestas humorales son importantes.

En cuanto a la plataforma de inmunización (profiláctica o terapéutica) actualmente el tratamiento con inmunoterapia se aplica principalmente de forma terapéutica debido a que no es posible conocer el contenido de antígenos de tumor antes de que este aparezca, con excepción de los tipos de cáncer que son inducidos por mutaciones ampliamente reconocidos, como lo es la mutación de BRCA1 y 2, sin embargo estos tipos de cáncer son una pequeña minoría en comparación con los tipos de cáncer no genéticos, por ellos es importante el mejoramiento de técnicas para la identificación temprana de células tumorales en pacientes, lo cual puede permitir tratar el cáncer en estadios más tempranos de la enfermedad lo que puede mejorar la efectividad del tratamiento ya que existe un menor número de células tumorales y existen menores mecanismos que bloqueen las respuestas antitumorales.

El avance en la tecnología para la detección temprana de células tumorales en el organismo, podrían permitir en un futuro cercano la posibilidad de tratar a los pacientes contra las células tumorales utilizando antígenos específicos incluso antes de la formación de tumores clínicamente detectables.

En conclusión, demostramos que las VLPs-B19 quiméricas multiepitópicas podrían ser una alternativa viable como sistema de entrega de neoepítomos y TAAs en el cáncer de mama, ya que fueron capaces de inducir respuestas inmunes celulares y humorales específicas hacia los antígenos en los ganglios linfáticos cercanos al tumor. afectando el establecimiento de tumores, la tasa de crecimiento tumoral y el establecimiento de macro-metástasis a distancia. Este enfoque puede facilitar la aplicación de terapias personalizadas, ya que el tratamiento puede administrarse por vía s.c. cerca del tumor, en lugar de directamente en los ganglios linfáticos. Como resultado, la administración del tratamiento puede realizarse sin un equipo especial de ultrasonido. Además, el uso de éstas VLPs como sistema de entrega podría evitar el procesamiento del antígeno por parte de las células no presentadoras, evitando así la inducción de anergia linfocitaria y promoviendo la inducción de respuestas potentes que finalmente pueden mejorar la calidad de vida de los pacientes con cáncer.

8. Conclusiones

- Las VLPs-B19 pueden ser modificadas para agregar diferentes secuencias en su porción amino terminal sin afectar sus rendimientos de producción ni su ensamblaje en VLPs.
- Las VLPs-TAAs sin adyuvante son capaces de evitar el establecimiento de tumores inducidos con la línea 4T1.
- Las VLPs-TAAs y las VLPs-neo son capaces de retasar el crecimiento tumoral de forma terapéutica con respecto al vehículo y las VLPs-WT.
- Ambas construcciones quiméricas fueron capaces de inhibir el establecimiento de metástasis en pulmón, tanto en esquemas profilácticos como terapéuticos.
- Ambas construcciones quiméricas fueron capaces de normalizar las proporciones de linfocitos T CD4+ y CD8+ en bazo a niveles similares a lo encontrado en ratones sanos.
- La inmunización con VLPs-B19 induce reducción de la población de MDSC en bazo, mejorándose con la adición del adyuvante Cry1Ac.
- Las construcciones quiméricas son capaces de inducir respuestas proliferativas de linfocitos T CD4 y CD8 específicos en los ganglios locales al tumor.
- La construcción de VLPs-TAAs son capaces de inducir altos títulos de anticuerpos contra el epítipo MUC1 en suero de ratones inmunizados.
- Los linfocitos T CD8 inducidos por las VLPs-neo pueden inducir apoptosis de las células tumorales *in vitro*.
- Las VLPs-B19 son capaces de entrar a los ganglios linfáticos locales y ser captadas por APC.
- Las VLPs-B19 son capaces de entrar al tumor, unirse a las células tumorales y afectar su adhesión, migración e inducir apoptosis.
- Las VLPs-B19 son capaces de unirse a diferentes líneas tumorales de cáncer de mama humano y murino.

9. Mecanismo de acción

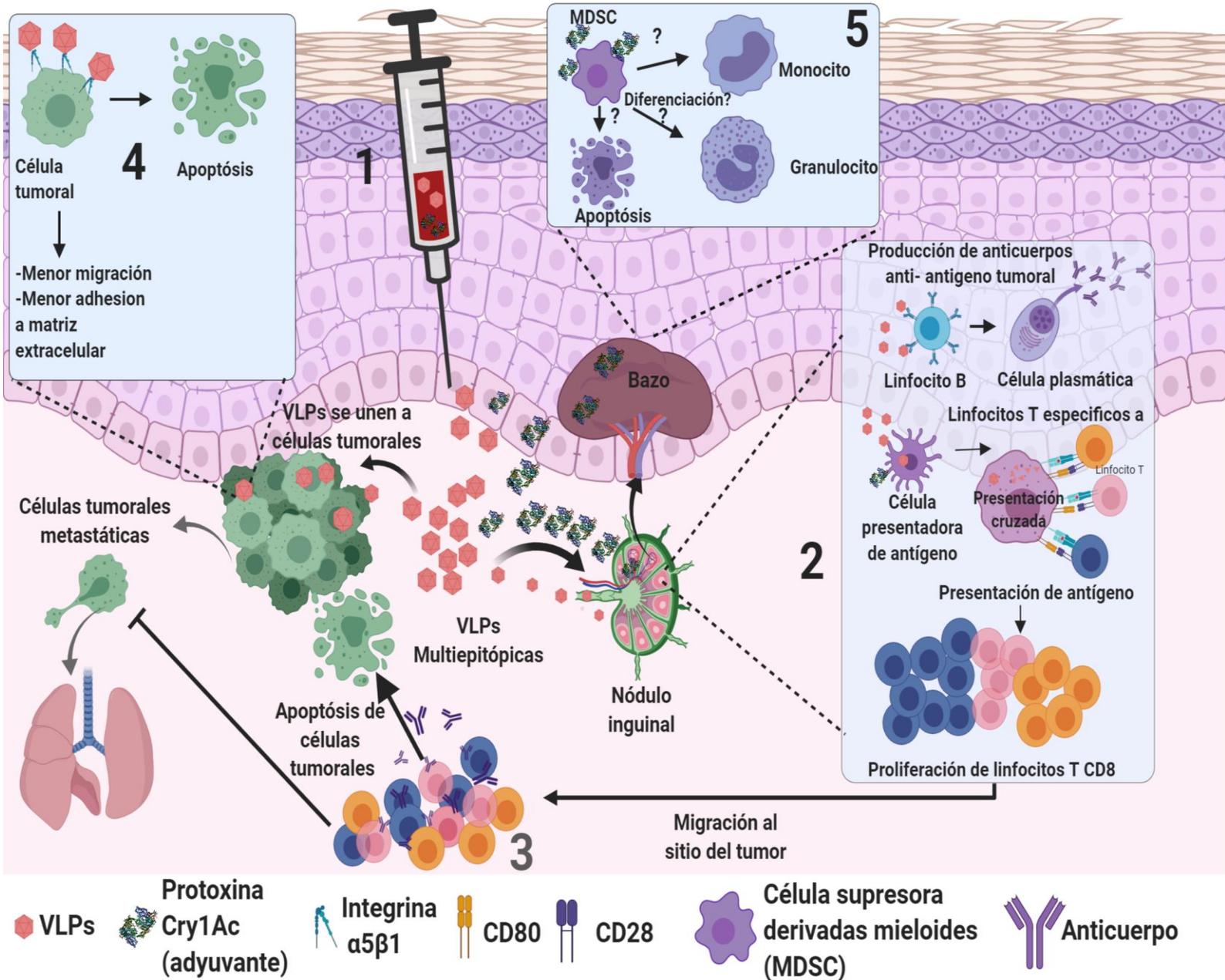


Figura 27. Mecanismo de acción de las VLPs-B19 como sistema de entrega de antígenos tumorales. 1-después de la inyección de las VLPs por vía s.c. peritumoral, las VLPs entran libremente hacia el tumor y hacia los ganglios linfáticos sentinelas (nódulo inguinal) en donde se acumulan por al menos 24 horas, cuando se administran las VLPs junto con el adyuvante (protoxina Cry1Ac), este último entra libremente al ganglio inguinal. 2- Cuando las VLPs entran al ganglio inguinal son captadas por células presentadoras de antígeno, en donde pueden inducir presentación cruzada, los epítopos de los antígenos tumorales añadidos a las VLPs

son presentados a linfocitos T, el adyuvante puede mejorar la activación de linfocitos T por inducción de moléculas coestimuladoras y citocinas por las células presentadoras, los linfocitos T específicos hacia diferentes antígenos tumorales son activados y proliferan. **3-** Los linfocitos T específicos migran desde el ganglio inguinal hacia el sitio del tumor, en donde pueden inducir la apoptosis de células tumorales, además pueden bloquear la salida de células tumorales metastásicas tanto en el tumor las que llegan al ganglio inguinal por lo que pueden disminuir las metástasis pulmonares. **4-** Las VLPs que entran en el tumor pueden unirse a las células tumorales mediante la integrina $\alpha 5\beta 1$ afectando su adhesión y migración e induciendo apoptosis de éstas. **5-** cuando el adyuvante sale del ganglio inguinal puede llegar por circulación sanguínea al bazo, en donde puede afectar a las células supresoras derivadas mieloides (MDSC) pudiendo inducir su diferenciación o su apoptosis, lo que lleva a una disminución de su número y proporción en el bazo.

10. Bibliografía

1. Parsa, N., *Environmental factors inducing human cáncers*. Iran J Public Health, 2012. **41**(11): p. 1-9.
2. Hanahan, D. and R.A. Weinberg, *The hallmarks of cáncer*. Cell, 2000. **100**(1): p. 57-70.
3. Jang, S.J., J.M. Gardner, and J.Y. Ro, *Diagnostic approach and prognostic factors of cáncers*. Adv Anat Pathol, 2011. **18**(2): p. 165-72.
4. Vesely, M.D. and R.D. Schreiber, *Cáncer immunoediting: antigens, mechanisms, and implications to cáncer immunotherapy*. Ann N Y Acad Sci, 2013. **1284**: p. 1-5.
5. Siegel, R.L., K.D. Miller, and A. Jemal, *Cáncer statistics, 2019*. CA Cáncer J Clin, 2019. **69**(1): p. 7-34.
6. Mehlen, P. and A. Puisieux, *Metástasis: a question of life or death*. Nat Rev Cáncer, 2006. **6**(6): p. 449-58.
7. Liu, B., et al., *Protecting the normal in order to better kill the cáncer*. Cáncer Med, 2015. **4**(9): p. 1394-403.
8. Bray, F., et al., *Global cáncer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cáncers in 185 countries*. CA Cáncer J Clin, 2018. **68**(6): p. 394-424.
9. Mohar-Betancourt, A., et al., *Cáncer Trends in Mexico: Essential Data for the Creation and Follow-Up of Public Policies*. J Glob Oncol, 2017. **3**(6): p. 740-748.
10. Soerjomataram, I., et al., *An overview of prognostic factors for long-term survivors of breast cáncer*. Breast Cáncer Res Treat, 2008. **107**(3): p. 309-30.
11. Tsang, J.Y.S. and G.M. Tse, *Molecular Classification of Breast Cáncer*. Adv Anat Pathol, 2020. **27**(1): p. 27-35.
12. Lebert, J.M., et al., *Advances in the systemic treatment of triple-negative breast cáncer*. Curr Oncol, 2018. **25**(Suppl 1): p. S142-S150.
13. Garcia, S.B., M. Novelli, and N.A. Wright, *The clonal origin and clonal evolution of epithelial tumours*. Int J Exp Pathol, 2000. **81**(2): p. 89-116.
14. Bailey, C.E., et al., *Increasing disparities in the age-related incidences of colon and rectal cáncers in the United States, 1975-2010*. JAMA Surg, 2015. **150**(1): p. 17-22.
15. Feng, Y., et al., *Breast cáncer development and progression: Risk factors, cáncer stem cells, signaling pathways, genomics, and molecular pathogenesis*. Genes Dis, 2018. **5**(2): p. 77-106.
16. Williams, G.H. and K. Stoeber, *The cell cycle and cáncer*. J Pathol, 2012. **226**(2): p. 352-64.
17. Shay, J.W. and W.E. Wright, *Role of telomeres and telomerase in cáncer*. Semin Cáncer Biol, 2011. **21**(6): p. 349-53.
18. Schwartz, L., C.T. Supuran, and K.O. Alfarouk, *The Warburg Effect and the Hallmarks of Cáncer*. Anticáncer Agents Med Chem, 2017. **17**(2): p. 164-170.
19. Lee, S.Y., et al., *Regulation of Tumor Progression by Programmed Necrosis*. Oxid Med Cell Longev, 2018. **2018**: p. 3537471.
20. Hanahan, D. and R.A. Weinberg, *Hallmarks of cáncer: the next generation*. Cell, 2011. **144**(5): p. 646-74.
21. Arruebo, M., et al., *Assessment of the evolution of cáncer treatment therapies*. Cáncers (Basel), 2011. **3**(3): p. 3279-330.
22. Tohme, S., R.L. Simmons, and A. Tsung, *Surgery for Cáncer: A Trigger for Metastases*. Cáncer Res, 2017. **77**(7): p. 1548-1552.
23. Moudi, M., et al., *Vinca alkaloids*. Int J Prev Med, 2013. **4**(11): p. 1231-5.

24. Pourquier, P., *[Alkylating agents]*. Bull Cáncer, 2011. **98**(11): p. 1237-51.
25. Hevener, K., et al., *Recent developments in topoisomerase-targeted cancer chemotherapy*. Acta Pharm Sin B, 2018. **8**(6): p. 844-861.
26. Ramirez, L.Y., et al., *Potential chemotherapy side effects: what do oncologists tell parents?* Pediatr Blood Cáncer, 2009. **52**(4): p. 497-502.
27. Baskar, R., et al., *Cáncer and radiation therapy: current advances and future directions*. Int J Med Sci, 2012. **9**(3): p. 193-9.
28. van Straten, D., et al., *Oncologic Photodynamic Therapy: Basic Principles, Current Clinical Status and Future Directions*. Cáncers (Basel), 2017. **9**(2).
29. Dunn, G.P., L.J. Old, and R.D. Schreiber, *The three Es of cancer immunoediting*. Annu Rev Immunol, 2004. **22**: p. 239-260.
30. Pardoli, D., *Cáncer and the immune system: basic concepts and targets for intervention*. Semin Oncol, 2015. **42**(2): p. 523-538.
31. Wang, M., et al., *Role of tumor microenvironment in tumorigenesis*. J Cáncer, 2017. **8**(5): p. 761-773.
32. Ryungsa, K., E. Manabu, and T. Kazuaki., *Cáncer immunoediting from immune surveillance to immune escape*. immunology, 2007. **121**(1): p. 1-14.
33. Snapper, C.M., *Distinct Immunologic Properties of Soluble Versus Particulate Antigens*. Front Immunol, 2018. **9**: p. 598.
34. Bachmann, M.F. and G.T. Jennings, *Vaccine delivery: a matter of size, geometry, kinetics and molecular patterns*. Nat Rev Immunol, 2010. **10**(11): p. 787-96.
35. Yu, Z., et al., *Poor immunogenicity of a self/tumor antigen derives from peptide-MHC-I instability and is independent of tolerance*. J Clin Invest, 2004. **114**(4): p. 551-9.
36. Neukirch, L., et al., *The potential of adenoviral vaccine vectors with altered antigen presentation capabilities*. Expert Rev Vaccines, 2019.
37. Thomas, S.N., et al., *Targeting the tumor-draining lymph node with adjuvanted nanoparticles reshapes the anti-tumor immune response*. Biomaterials, 2014. **35**(2): p. 814-24.
38. Lewinski, N., V. Colvin, and R. Drezek, *Cytotoxicity of nanoparticles*. Small, 2008. **4**(1): p. 26-49.
39. Chandrasekaran, S. and M.R. King, *Microenvironment of tumor-draining lymph nodes: opportunities for liposome-based targeted therapy*. Int J Mol Sci, 2014. **15**(11): p. 20209-39.
40. Abu Lila, A.S. and T. Ishida, *Liposomal Delivery Systems: Design Optimization and Current Applications*. Biol Pharm Bull, 2017. **40**(1): p. 1-10.
41. Sarkar, B., et al., *Virus like particles- A recent advancement in vaccine development*. Korean Journal of Microbiology, 2019. **55**(4): p. 327-343.
42. Sanchez-Rodriguez, S.P., et al., *Human parvovirus B19 virus-like particles: In vitro assembly and stability*. Biochimie, 2012. **94**(3): p. 870-8.
43. Peabody, D.S., et al., *Immunogenic display of diverse peptides on virus-like particles of RNA phage MS2*. J Mol Biol, 2008. **380**(1): p. 252-63.
44. Li, K., et al., *Antigen incorporated in virus-like particles is delivered to specific dendritic cell subsets that induce an effective antitumor immune response in vivo*. J Immunother, 2013. **36**(1): p. 11-9.
45. Peacey, M., et al., *Virus-like particles from rabbit hemorrhagic disease virus can induce an anti-tumor response*. Vaccine, 2008. **26**(42): p. 5334-7.
46. Kramer, K., et al., *Functionalisation of Virus-Like Particles Enhances Antitumour Immune Responses*. J Immunol Res, 2019. **2019**: p. 5364632.

47. Donaldson, B., et al., *Multi-target chimaeric VLP as a therapeutic vaccine in a model of colorectal cancer*. J Immunother Cáncer, 2017. **5**(1): p. 69.
48. Wei Chan, et al., *Development of a Novel Virus-like Particle (VLP) Vaccine for Personalized B-Cell Lymphoma and Chronic Lymphocytic Leukemia Therapy*. Blood, 2015. **126**(23): p. 2748.
49. Ding, F.X., et al., *Multiepitope peptide-loaded virus-like particles as a vaccine against hepatitis B virus-related hepatocellular carcinoma*. Hepatology, 2009. **49**(5): p. 1492-502.
50. Zhang, Y., et al., *Generation of chimeric HBc proteins with epitopes in E.coli: formation of virus-like particles and a potent inducer of antigen-specific cytotoxic immune response and anti-tumor effect in vivo*. Cell Immunol, 2007. **247**(1): p. 18-27.
51. Kazaks, A., et al., *Melanoma vaccine candidates from chimeric hepatitis B core virus-like particles carrying a tumor-associated Mage-3 epitope*. Biotechnol J, 2008. **3**(11): p. 1429-36.
52. Klamp, T., et al., *Highly specific auto-antibodies against claudin-18 isoform 2 induced by a chimeric HBcAg virus-like particle vaccine kill tumor cells and inhibit the growth of lung metastases*. Cáncer Res, 2011. **71**(2): p. 516-27.
53. Speiser, D.E., et al., *Memory and effector CD8 T-cell responses after nanoparticle vaccination of melanoma patients*. J Immunother, 2010. **33**(8): p. 848-58.
54. Palladini, A., et al., *Virus-like particle display of HER2 induces potent anti-cáncer responses*. Oncoimmunology, 2018. **7**(3): p. e1408749.
55. Brinkman, M., et al., *Beneficial therapeutic effects with different particulate structures of murine polyomavirus VP1-coat protein carrying self or non-self CD8 T cell epitopes against murine melanoma*. Cáncer Immunol Immunother, 2005. **54**(6): p. 611-22.
56. Eriksson, M., et al., *Murine polyomavirus virus-like particles carrying full-length human PSA protect BALB/c mice from outgrowth of a PSA expressing tumor*. PLoS One, 2011. **6**(8): p. e23828.
57. Greenstone, H.L., et al., *Chimeric papillomavirus virus-like particles elicit antitumor immunity against the E7 oncoprotein in an HPV16 tumor model*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. **95**(4): p. 1800-5.
58. Jemon, K., et al., *An enhanced heterologous virus-like particle for human papillomavirus type 16 tumour immunotherapy*. PLoS One, 2013. **8**(6): p. e66866.
59. Caballero, J.M., et al., *Chimeric Infectious Bursal Disease Virus-Like Particles as Potent Vaccines for Eradication of Established HPV-16 E7-Dependent Tumors*. PLOS ONE, 2012. **7**(12): p. e52976.
60. Lizotte, P.H., et al., *In situ vaccination with cowpea mosaic virus nanoparticles suppresses metastatic cancer*. Nat Nanotechnol, 2016. **11**(3): p. 295-303.
61. McCormick, A.A., et al., *TMV-peptide fusion vaccines induce cell-mediated immune responses and tumor protection in two murine models*. Vaccine, 2006. **24**(40-41): p. 6414-23.
62. da Costa Nunes, J.F., S. Pires, and D.C. Chade, *Human papillomavirus vaccination and prevention of intraepithelial neoplasia and penile cancer: review article*. Curr Opin Urol, 2020.
63. de la Cruz-Hernandez, E., A. Contreras-Paredes, and M. Lizano-Soberon, *[Toward cervical cancer prevention: strategies employed in the development of HPV vaccines]*. Rev Invest Clin, 2006. **58**(6): p. 586-97.
64. Domschke, C., et al., *Cellular Immune Responses and Immune Escape Mechanisms in Breast Cancer: Determinants of Immunotherapy*. Breast Care (Basel), 2016. **11**(2): p. 102-7.

65. Xia, A., et al., *T Cell Dysfunction in Cáncer Immunity and Immunotherapy*. Front Immunol, 2019. **10**: p. 1719.
66. Ruedl, C., et al., *Cross-presentation of virus-like particles by skin-derived CD8(-) dendritic cells: a dispensable role for TAP*. Eur J Immunol, 2002. **32**(3): p. 818-25.
67. Makarkov, A.I., et al., *Plant-derived virus-like particle vaccines drive cross-presentation of influenza A hemagglutinin peptides by human monocyte-derived macrophages*. NPJ Vaccines, 2019. **4**: p. 17.
68. Morón, V.G., Rueda, P., Sedlik, C., Leclerc, C., *In Vivo, Dendritic Cells Can Cross-Present Virus-Like Particles Using an Endosome-to-Cytosol Pathway*. J Immuno, 2003. **171**: p. 2242-2250.
69. Leclerc, D., et al., *Proteasome-independent major histocompatibility complex class I cross-presentation mediated by papaya mosaic virus-like particles leads to expansion of specific human T cells*. J Virol, 2007. **81**(3): p. 1319-26.
70. Finbloom, J.A., et al., *Evaluation of Three Morphologically Distinct Virus-Like Particles as Nanocarriers for Convection-Enhanced Drug Delivery to Glioblastoma*. Nanomaterials (Basel), 2018. **8**(12).
71. Ren, Y., et al., *Multifunctional TK-VLPs nanocarrier for tumor-targeted delivery*. Int J Pharm, 2016. **502**(1-2): p. 249-57.
72. Ao, Z., et al., *Lentivirus-Based Virus-Like Particles Mediate Delivery of Caspase 8 into Breast Cáncer Cells and Inhibit Tumor Growth*. Cáncer Biother Radiopharm, 2019. **34**(1): p. 33-41.
73. Lin, M.C., et al., *Gene therapy for castration-resistant prostate cáncer cells using JC polyomavirus-like particles packaged with a PSA promoter driven-suicide gene*. Cáncer Gene Ther, 2019.
74. Mohsen, M.O., et al., *Delivering adjuvants and antigens in separate nanoparticles eliminates the need of physical linkage for effective vaccination*. J Control Release, 2017. **251**: p. 92-100.
75. Keller, S.A., et al., *Cutting edge: limited specialization of dendritic cell subsets for MHC class II-associated presentation of viral particles*. J Immunol, 2010. **184**(1): p. 26-9.
76. Al-Barwani, F., et al., *Mannosylation of virus-like particles enhances internalization by antigen presenting cells*. PLoS One, 2014. **9**(8): p. e104523.
77. Lee, B.R., et al., *Engineered Human Ferritin Nanoparticles for Direct Delivery of Tumor Antigens to Lymph Node and Cáncer Immunotherapy*. Sci Rep, 2016. **6**: p. 35182.
78. Cubas, R., et al., *Virus-like particle (VLP) lymphatic trafficking and immune response generation after immunization by different routes*. J Immunother, 2009. **32**(2): p. 118-28.
79. Ruedl, C., et al., *Virus-like particles as carriers for T-cell epitopes: limited inhibition of T-cell priming by carrier-specific antibodies*. J Virol, 2005. **79**(2): p. 717-24.
80. Jegerlehner, A., et al., *Carrier induced epitopic suppression of antibody responses induced by virus-like particles is a dynamic phenomenon caused by carrier-specific antibodies*. Vaccine, 2010. **28**(33): p. 5503-12.
81. Mohsen, M.O., et al., *Interaction of Viral Capsid-Derived Virus-Like Particles (VLPs) with the Innate Immune System*. Vaccines (Basel), 2018. **6**(3).
82. Won, S.Y., et al., *Characterization of the innate stimulatory capacity of plant-derived virus-like particles bearing influenza hemagglutinin*. Vaccine, 2018. **36**(52): p. 8028-8038.
83. Rice-Ficht, A.C., et al., *Polymeric particles in vaccine delivery*. Curr Opin Microbiol, 2010. **13**(1): p. 106-12.
84. Win, S.J., et al., *Cross-presentation of epitopes on virus-like particles via the MHC I receptor recycling pathway*. Immunol Cell Biol, 2011. **89**(6): p. 681-8.
85. Kim, H.J. and H. Cantor, *CD4 T-cell subsets and tumor immunity: the helpful and the not-so-helpful*. Cáncer Immunol Res, 2014. **2**(2): p. 91-8.

86. Matsuzaki, J., et al., *Direct tumor recognition by a human CD4(+) T-cell subset potently mediates tumor growth inhibition and orchestrates anti-tumor immune responses*. *Sci Rep*, 2015. **5**: p. 14896.
87. Ahn, E., et al., *A loss of antitumor therapeutic activity of CEA DNA vaccines is associated with the lack of tumor cells' antigen presentation to Ag-specific CTLs in a colon cancer model*. *Cancer Lett*, 2015. **356**(2 Pt B): p. 676-85.
88. Lee, S.Y. and J.I. Sin, *MC32 tumor cells acquire Ag-specific CTL resistance through the loss of CEA in a colon cancer model*. *Hum Vaccin Immunother*, 2015. **11**(8): p. 2012-20.
89. Wittke, S., et al., *Tumor heterogeneity as a rationale for a multi-epitope approach in an autologous renal cell cancer tumor vaccine*. *Onco Targets Ther*, 2016. **9**: p. 523-37.
90. Derouazi, M., et al., *Novel Cell-Penetrating Peptide-Based Vaccine Induces Robust CD4+ and CD8+ T Cell-Mediated Antitumor Immunity*. *Cancer Res*, 2015. **75**(15): p. 3020-31.
91. Lennerz, V., et al., *Immunologic response to the survivin-derived multi-epitope vaccine EMD640744 in patients with advanced solid tumors*. *Cancer Immunol Immunother*, 2014. **63**(4): p. 381-94.
92. Lu, C., et al., *A novel multi-epitope vaccine from MMSA-1 and DKK1 for multiple myeloma immunotherapy*. *Br J Haematol*, 2017. **178**(3): p. 413-426.
93. Nezafat, N., et al., *Production of a novel multi-epitope peptide vaccine for cancer immunotherapy in TC-1 tumor-bearing mice*. *Biologicals*, 2015. **43**(1): p. 11-7.
94. Zhang, L., *Multi-epitope vaccines: a promising strategy against tumors and viral infections*. *Cell Mol Immunol*, 2018. **15**(2): p. 182-184.
95. Kuai, R., et al., *Designer vaccine nanodiscs for personalized cancer immunotherapy*. *Nat Mater*, 2017. **16**(4): p. 489-496.
96. Rueda, F., et al., *Effect of TLR ligands co-encapsulated with multiepitopic antigen in nanoliposomes targeted to human DCs via Fc receptor for cancer vaccines*. *Immunobiology*, 2017. **222**(11): p. 989-997.
97. Jiang, P., et al., *Evaluation of tandem Chlamydia trachomatis MOMP multi-epitopes vaccine in BALB/c mice model*. *Vaccine*, 2017. **35**(23): p. 3096-3103.
98. Chen, Q., et al., *Induction of Humoral and Cellular Immune Responses in Mice by Multiepitope Vaccines Composing of Both T and B Lymphocyte Epitopes of MAGE-A3 which are Recombined into HBcAg*. *Protein Pept Lett*, 2017. **24**(10): p. 947-954.
99. Sánchez-Rodríguez, S.P., et al., *Human parvovirus B19 virus-like particles: In vitro assembly and stability*. *Biochimie*, 2012. **94**(3): p. 870-878.
100. Gilbert, L., et al., *Molecular and structural characterization of fluorescent human parvovirus B19 virus-like particles*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2005. **331**(2): p. 527-535.
101. Sedlik, C., et al., *Recombinant parvovirus-like particles as an antigen carrier: a novel nonreplicative exogenous antigen to elicit protective antiviral cytotoxic T cells*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1997. **94**(14): p. 7503-8.
102. Moron, G., et al., *CD8alpha- CD11b+ dendritic cells present exogenous virus-like particles to CD8+ T cells and subsequently express CD8alpha and CD205 molecules*. *J Exp Med*, 2002. **195**(10): p. 1233-45.
103. Dubensky, T.J. and S. Reed, *adjuvants for cancer vaccines*. *semin. immunol.*, 2010. **22**(3): p. 155-161.
104. Driessens, G., J. Kline, and T.F. Gajewski, *Costimulatory and coinhibitory receptors in anti-tumor immunity*. *Immunol Rev*, 2009. **229**(1): p. 126-144.
105. Makkouk, A. and G.J. Weiner, *Cancer immunotherapy and breaking immune tolerance: new approaches to an old challenge*. *Cancer Res*, 2015. **75**(1): p. 5-10.

106. Chandramouli, S., et al., *Generation of a parvovirus B19 vaccine candidate*. Vaccine, 2013. **31**(37): p. 3872-3878.
107. Evdokimov, A.G., et al., *Structure of the full-length insecticidal protein Cry1Ac reveals intriguing details of toxin packaging into in vivo formed crystals*. Protein Sci, 2014. **23**(11): p. 1491-7.
108. Gulbitti-Onarici, S., et al., *Expression of Cry1Ac in transgenic tobacco plants under the control of a wound-inducible promoter (AoPR1) isolated from Asparagus officinalis to control Heliothis virescens and Manduca sexta*. Mol Biotechnol, 2009. **42**(3): p. 341-9.
109. Esquivel-Pérez, R. and L. Moreno-Fierros, *Mucosal and systemic adjuvant effects of cholera toxin and Cry1Ac protoxin on the specific antibody response to HIV-1 C4/V3 peptides are different and depend on the antigen co-administered*. Viral immunol, 2005. **18**(4): p. 695-708.
110. González-González, E., et al., *The protoxin Cry1Ac of Bacillus thuringiensis improves the protection conferred by intranasal immunization with Brucella abortus RB51 in a mouse model*. Vet. Microbiol, 2015. **175**(2-4): p. 382-388.
111. Torres-Martínez, M., et al., *Cry1Ac toxin induces macrophage activation via ERK1/2, JNK and p38 mitogen-activated protein kinases*. Int. J. Biochem. Cell Biol., 2016. **78**: p. 106-115.
112. Umamo, Y., et al., *Generation of cytotoxic T cell responses to an HLA-A24 restricted epitope peptide derived from wild-type p53*. Br J Cáncer, 2001. **84**(8): p. 1052-7.
113. Tarp, M.A., et al., *Identification of a novel cancer-specific immunodominant glycopeptide epitope in the MUC1 tandem repeat*. Glycobiology, 2007. **17**(2): p. 197-209.
114. Siegel, S., et al., *Induction of antitumour immunity using survivin peptide-pulsed dendritic cells in a murine lymphoma model*. Br J Haematol, 2003. **122**(6): p. 911-4.
115. Kreiter, S., et al., *Mutant MHC class II epitopes drive therapeutic immune responses to cancer*. Nature, 2015. **520**(7549): p. 692-6.
116. Kim, K., et al., *Eradication of metastatic mouse cancers resistant to immune checkpoint blockade by suppression of myeloid-derived cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2014. **111**(32): p. 11774-9.
117. Tenzer, S., et al., *Modeling the MHC class I pathway by combining predictions of proteasomal cleavage, TAP transport and MHC class I binding*. Cell Mol Life Sci, 2005. **62**(9): p. 1025-37.
118. Zhang, G.L., et al., *PREDBALB/c: a system for the prediction of peptide binding to H2d molecules, a haplotype of the BALB/c mouse*. Nucleic Acids Res, 2005. **33**(Web Server issue): p. W180-3.
119. Gregorio, A.C., et al., *Inoculated Cell Density as a Determinant Factor of the Growth Dynamics and Metastatic Efficiency of a Breast Cancer Murine Model*. PLoS One, 2016. **11**(11): p. e0165817.
120. Ouzounova, M., et al., *Monocytic and granulocytic myeloid derived suppressor cells differentially regulate spatiotemporal tumour plasticity during metastatic cascade*. Nat Commun, 2017. **8**: p. 14979.
121. Gilbert, L., et al., *Molecular and structural characterization of fluorescent human parvovirus B19 virus-like particles*. Biochem Biophys Res Commun, 2005. **331**(2): p. 527-35.
122. Bustos-Jaimes, I., et al., *Construction of protein-functionalized virus-like particles of parvovirus B19*. J Biotechnol, 2017. **263**: p. 55-63.
123. Manolova, V., et al., *Nanoparticles target distinct dendritic cell populations according to their size*. Eur J Immunol, 2008. **38**(5): p. 1404-13.
124. Tomita, Y. and Y. Nishimura, *Long peptide-based cancer immunotherapy targeting tumor antigen-specific CD4(+) and CD8(+) T cells*. Oncoimmunology, 2013. **2**(9): p. e25801.

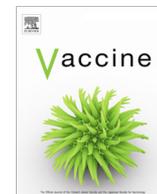
125. Zanetti, M., *Tapping CD4 T cells for cancer immunotherapy: the choice of personalized genomics*. J Immunol, 2015. **194**(5): p. 2049-56.
126. Rahman, M. and S. Mohammed, *Breast cancer metastasis and the lymphatic system*. Oncol Lett, 2015. **10**(3): p. 1233-1239.
127. Blackburn, H.L., et al., *Breast Cancer Metastasis to the Axillary Lymph Nodes: Are Changes to the Lymph Node "Soil" Localized or Systemic?* Breast Cancer (Auckl), 2017. **11**: p. 1178223417691246.
128. Zheng, K., et al., *Inhibitory Effects of 4T1 Breast Tumor Transplantation on Mouse Peripheral Blood Immune Cell Populations*. Biotechnology Journal International, 2017. **19**(4): p. 1-12.
129. Youn, J.I., et al., *Subsets of myeloid-derived suppressor cells in tumor-bearing mice*. J Immunol, 2008. **181**(8): p. 5791-802.
130. Umansky, V., et al., *The Role of Myeloid-Derived Suppressor Cells (MDSC) in Cancer Progression*. Vaccines (Basel), 2016. **4**(4).
131. Shiota, H., D. Tross, and D.M. Klinman, *CpG Oligonucleotides as Cancer Vaccine Adjuvants*. Vaccines (Basel), 2015. **3**(2): p. 390-407.
132. Moreno-Fierros, L., et al., *Cry1Ac protoxin from Bacillus thuringiensis promotes macrophage activation by upregulating CD80 and CD86 and by inducing IL-6, MCP-1 and TNF-alpha cytokines*. Int Immunopharmacol, 2013. **17**(4): p. 1051-66.
133. Brown, K.E., S.M. Anderson, and N.S. Young, *Erythrocyte P antigen: cellular receptor for B19 parvovirus*. Science, 1993. **262**(5130): p. 114-7.
134. Weigel-Kelley, K.A., Yoder, M. C. & Srivastava, A., *Alpha5beta1 integrin as a cellular coreceptor for human parvovirus B19: requirement of functional activation of beta1 integrin for viral entry*. Blood, 2003. **102**(12): p. 3927-33.
135. Seung-Yeol, P., Chan-Yeong, K., James, A. S. & Jung, H. K., *Globoside (Gb4) promotes activation of ERK by interaction with the epidermal growth factor receptor*. Biochim Biophys Acta, 2012. **1820**(7): p. 1141-1148.
136. Roman, J., Ritzenthaler, J. D., Roser-Page, S., Xiaojuan, S. & ShouWei, H., *$\alpha 5\beta 1$ -Integrin Expression Is Essential for Tumor Progression in Experimental Lung Cancer*. Am J Respir Cell Mol Biol., 2010. **43**(6): p. 684-691.
137. Mierke, C.T., Frey, B., Fellner, M., Hermann, M. & Fabry, B., *Integrin $\alpha 5\beta 1$ facilitates cancer cell invasion through enhanced contractile forces*. J Cell Sci., 2011. **124**(3): p. 369-383.

11. Artículo publicado



Contents lists available at ScienceDirect

Vaccine

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

Therapy with multi-epitope virus-like particles of B19 parvovirus reduce tumor growth and lung metastasis in an aggressive breast cancer mouse model

Ángel de Jesús Jiménez-Chávez^a, Leticia Moreno-Fierros^{a,*}, Ismael Bustos-Jaimes^b

^a Biomedicine Unit, Faculty of Higher Studies Iztacala, National Autonomous University of Mexico, Avenida de los Barrios 1, Los Reyes Iztacala, Tlalnepantla 54090, Estado de México, Mexico

^b Department of Biochemistry, Faculty of Medicine, National Autonomous University of Mexico (UNAM), Mexico City 04510, Mexico

ARTICLE INFO

Article history:

Received 2 March 2019

Received in revised form 26 August 2019

Accepted 20 September 2019

Available online xxxxx

Keywords:

Virus-like particles

Neopeptides

Vaccine

Triple negative breast cancer

ABSTRACT

Triple-negative breast cancer is a major health problem that lacks molecular targets for therapy. Neopeptides represent a viable option to induce antitumor immune responses, but they have limitations, such as low immunogenicity and tolerance induction. Parvovirus B19 virus-like particles may be used to deliver neopeptides to prime cellular immunity. We designed and evaluated the therapeutic effect of VP2 B19-virus-like particles, with multi-neopeptides, in a 4T1 breast cancer model. Balb/c mice received four therapeutic immunizations with multi-neopeptides-virus-like, wild type-virus-like, vehicle, or virus-like plus Cry1Ac adjuvant particles, intraperitoneally and peritumorally. Tumor growth, lung macro-metastasis, and specific immune responses were evaluated. Therapeutic administration of multi-epitopes virus-like particles significantly delayed tumor growth and decreased the lung macro-metastasis number, in comparison to treatment with wild type-virus-like particles, which surprisingly also elicited antitumoral effects that were improved with the adjuvant. Only treatments with multi-epitope virus-like particles induced specific proliferative responses of CD8 and CD4 T lymphocytes and Granzyme-B production in lymphatic nodes local to the tumor. Treatment with recombinant multiple neopeptides-virus-like particles induced specific cellular responses, inhibited tumor growth and macro-metastasis, thus B19-virus-like particles may function as an effective delivery system for neopeptides for personalized immunotherapy.

© 2019 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

The incidence of breast cancer continues to increase, being the first cause of cancer death in women worldwide [1,2]. Particularly, triple-negative breast cancer (TNBC) is recognized for its aggressiveness, high recurrence rate, and few available treatments due to the lack of identified therapeutic molecular targets [3]. Because of these reasons, the personalized therapy approach might be beneficial for treating this type of cancer [4].

Personalized vaccines, using neopeptides, have been shown to induce specific cellular immune responses to tumor cells, provoking tumor resection. Recently, the ability of this approach to increase progression-free survival and decrease metastasis was demonstrated in clinical trials [2,5]. In these and other reports, inducing specific cytotoxic CD8 T lymphocytes has been claimed as the main mechanism responsible of tumor elimination [6], although they also observed that Th1 CD4 cells participated in the establishment of an antitumor environment by releasing cytokines.

While the use of synthetic peptides as antigens for inducing immune responses to neopeptides is used widely [7,8], it is not efficient, as it requires a large amount of the antigen to be administered and must be accompanied by adjuvants, which are frequently associated with toxic effects [9,10]. Moreover, to avoid antigen processing by non-professional antigen presenting cells, which may result in lymphocyte anergy or regulatory T cells

Abbreviations: VLP, virus-like particle; rMe-VLPs, recombinant multi-epitope virus-like particles; TNBC, triple negative breast cancer; MDSC, Myeloid-Derived Suppressor Cells.

* Corresponding author at: Laboratory 9, Biomedicine Unit, FES Iztacala, UNAM, Av. De los barrios 1, Los Reyes Iztacala, Tlalnepantla 54090, Estado de México, Mexico.

E-mail address: lemofi@unam.mx (L. Moreno-Fierros).

<https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2019.09.068>

0264-410X/© 2019 Elsevier Ltd. All rights reserved.

[11,12], these antigens need to be applied directly into the nearby lymph nodes. So, to induce strong, long-lasting tumor specific immune responses, it is important to develop improved antigen delivery systems and effective, non-toxic adjuvants, which decrease the amount of antigen administered and favor antigen delivery to professional antigen presenting cells in local lymph nodes, for adequate processing and presentation of the antigen.

Multimeric compounds of viral structural proteins named virus-like particles (VLPs) are promising antigen delivery systems that are able to induce strong humoral and cellular responses towards coupled antigens [13,14]. VLPs are a subclass of viral nanoparticles which are spontaneously assembled from viral proteins in capsids that resemble virus morphology, they are biocompatible, biodegradable and are non-infectious, thus multiple VLPs have been evaluated for their potential use in cancer immunotherapy [15–18]. Therefore, it is important to evaluate VLPs with additional desirable characteristics of purification, stability, and versatility. In this sense, proteins which allow the formation of chimeric VLPs are preferred because they may be able to carry several epitope-containing sequences. It is also important that additions to the chosen proteins do not affect their assembly properties and/or production yields.

In previous studies, B19-VLPs were proposed as a promising antigen delivery system due to their expression, purification, and assembly characteristics. The wild type VP2 protein (WT-VP2) protein of B19 can be produced on a large scale in *E. coli*, and this protein can be purified in a denatured state and renatured. Importantly, VLPs formed from the WT-VP2 protein can be assembled in capsids of approximately 20 nm, *in vitro*, in a cell-free environment [19]. Moreover, it has been reported that the WT-VP2 protein can be modified at its amino terminus to carry several sequences without affecting its production yields or its assembly properties [20]. Additionally, several parvovirus VLPs, with similar characteristics, have been shown to induce cellular responses through antigen cross-presentation by dendritic cells [21], indicating their potential use as antigen delivery systems.

In this work, we focused on the design of VLPs formed by the VP2 protein of the human parvovirus, B19, as a tumor antigen delivery system, and tested their therapeutic effects in a murine model of TNBC, induced using the aggressive, low immunogenic, and highly metastatic 4T1 tumor cell line. The neopeptides (Tmtc2, Gprc5a, Qars) were selected from experimental studies of next generation sequencing of the 4T1 cell line [22,23], and we also included an epitope of survivin because of the role this protein plays in inhibiting apoptosis of tumor cells [24]. Although most of the identified neopeptides in 4T1 cell line are recognized by CD4 T lymphocytes, we decided to choose neopeptides recognized by CD8 T lymphocytes due their primary role in the direct elimination of tumor cells. The selected epitopes were coupled to the amino terminal region of the WT-VP2 protein of the parvovirus, as has been described for other chimeric VP2 proteins [25–27].

The recombinant VP2 multi-epitope vaccine assembled in VLPs (rMe-VLPs) was tested alone or with the adjuvant Cry1Ac protoxin, which is a delta-endotoxin from *Bacillus thuringiensis*. Cry1Ac protoxin was chosen because it has proven to be an effective systemic and mucosal adjuvant, able to improve the protection against diverse infection models, when it was used coadministered with antigens. Importantly when it was tested in a brucellosis mouse model Cry1Ac protoxin improved the cytotoxic responses [28], which are the kind of immune responses desired to achieve tumor immunity. Regarding the proposed adjuvant action mechanism of this protein it appears to rely in its capacity to activate antigen-presenting cells by upregulating the costimulatory molecules and inducing proinflammatory cytokines production [29].

2. Materials and Methods

2.1. Animals and cell line

Female, BALB/c mice, 6–8 weeks of age were used for this study. The mice were kept in micro-isolators, with sterile filter covers, had *ad libitum* access to water and food, and were housed under a dark/light period of 12:12 h in the FES Iztacala, UNAM. The animals were cared according to federal regulations (NOM-062-ZOO-1999, Ministry of Agriculture, Mexico). The immunization protocol was approved by the institutional animal care and use committee (IACUC).

4T1 mouse mammary carcinoma cells (ATCC, Manassas, Virginia, USA) were maintained for a limited time *in vitro* by passages in RPMI-1640 medium (Gibco®, Grand Island, New York, USA), containing penicillin (100 U/mL), streptomycin (100 µg/mL) and fungicide (0.75 µg/mL) (Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, USA) and supplemented with 10% FBS (Gibco®).

2.2. Design of B19 WT-VP2 chimeras

The expression vector of the WT-VP2 protein was previously constructed [19]. The sequences of the neopeptides for CD8 responses Tmtc2 (QGVTVLAVSAVDIFVFHRLKMKQILP), GPRC5a (FAICFSCLLAHALNLIKLVGRKPLSW), and Qars (FPDAINNF), which were previously identified by next generation sequencing of the 4T1 [22,23] cell line, and survivin tumor-associated antigen (GWEPDDNPI), were inserted in the amino terminal region of the WT-VP2 protein and separated from one another by three linkers with the sequence A(EAAAK)₃A. The DNA sequence was optimized for expression in *E. coli*, the recombinant multi-epitope-VP2 gene was chemically synthesized (Epoch Life Science Inc, Missouri, Texas, USA) in the pBSK vector and was subcloned to the expression vector pet22b (Novagen, Madison, Wisconsin, USA) between the NdeI and EcoRI sites. These constructs also encoded a tag of histidines at the carboxyl terminal end to facilitate purification. The final plasmids were called PETWT-VP2 and PET-rMe-VP2 whose codification for wild type VP2 and recombinant multi-epitope VP2 proteins respectively.

2.3. Expression and purification of B19V WT-VP2 and chimeras

Plasmids PETWT-VP2 and PET-rMe-VP2 were used to transform *E. coli* BL21 (DE3) cells (Novagen, Madison, Wisconsin, USA). The purification of WT-VP2, recombinant multi-epitope-VP2 (rMe-WT-VP2) proteins and GFP-WT-VP2 was based on the protocol previously reported for the purification of WT-VP2 protein with minor modifications [19,20]. Briefly, transformed bacteria were grown in LB medium (100 µg/mL) and induced to Abs600 = 0.6 with 0.1 mM of isopropyl β-D-thiogalactopyranoside (IPTG) for 16 h at 30 °C, in an orbital shaker to 200 rpm. The cells were harvested by centrifugation (5000g × 10 min) and the pellet was resuspended in lysis buffer (0.3 M NaCl, 50 mM sodium phosphate, pH 7). Cells were disrupted by ultrasonication and centrifuged at 5000g at 4 °C. The WT-VP2 and rMe-VP2 proteins remained in the insoluble fraction. To obtain the WT-VP2 proteins the pellets were washed with buffer A (0.3 M NaCl, 50 mM sodium phosphate, 2% Triton X-100, 3 M urea, pH 7), followed by buffer A containing 5 mM DTT, and finally, with lysis buffer. The remaining pellet was solubilized in column buffer (6 M guanidine hydrochloride (GuHCl), 0.3 M NaCl and 50 mM sodium phosphate, pH 6.3) and incubated for 24 h at 180 rpm and 37 °C. For the rMe-VP2 proteins, the pellets were solubilized in buffer A, and a change was made in the column buffer. The proteins were purified by immobilized metal affinity

chromatography (IMAC) under denaturing conditions, using a His-Pur Ni-NTA resin (Thermo, Waltham, Massachusetts, USA). Triton X-114 (0.1% v/v) was used in the wash buffer to eliminate Lipopolysaccharide excess [30]. The purified proteins were concentrated by filtration with 50 kDa centrifugation filters (Millipore, Burlington, Massachusetts, USA). Purity was assayed by SDS-PAGE analysis. The protein concentration was determined using the Bradford protein assay (Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, USA).

2.4. *In vitro* assembly of VLPs

VLPs were assembled by dialysis of 1.5 mL of purified WT-VP2 or rMe-VP2 protein (0.5 mg/mL) against 3 × 50 mL of PBS-arginine (0.2 M L-arginine, 137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄, 1.8 mM KH₂PO₄, pH 7.4) at 4 °C for 36 h. After dialysis, the samples were filtered using a 0.22 µm filter and stored at 4 °C until use. The chimeric VLPs, composed of 100% rMe-VP2 protein (called rMe-VLPs), were able to assemble without the addition of WT-VP2. The correct assembly of WT-VLPs and rMe-VLPs was measured by dynamic light scattering using a Zetasizer µV (Malvern, Worcestershire, UK) equipped with a photodiode laser (830 nm). For each sample, 50 measurements were taken at 20 °C. The BALB/c mice were randomly separated into experimental groups (n = 5–8) and were immunized intraperitoneally and peritumoral as follows:

2.5. Therapeutic immunization

The tumors were induced by subcutaneous injection, into the sixth breast of BALB/c mice, of 3 × 10³ 4T1 cells that were freshly obtained from cell culture, with viability greater than 90% (evaluated by trypan blue exclusion). The BALB/c mice with palpable tumors were randomly separated into groups with 5–8 mice and each mouse was simultaneously immunized intraperitoneally and s.c. peritumorally on days 7, 14, 21 and 28 post tumor induction with 50 µL of the vehicle (PBS), 50 µg of wild type VLPs (WT-VLPs) or 50 µg of recombinant multi-epitope VLPs (rMe-VLPs) alone or plus 50 µg of adjuvant (protoxin Cry1Ac). Tumor growth was monitored with a digital caliper every 3 days and tumor volume was calculated according to the formula $V = L \times S^2 / 2$, where L is the longest side and S the shortest. On day 36 post-tumor induction, the animals were sacrificed using humane methods. The spleens, inguinal nodes, lungs, and the tumors were obtained for further analysis at indicated days.

It is important to mention that in this work, we used a lower number of 4T1 cells (3 × 10³) to induce tumors in BALB/c mice. This cell concentration was chosen to avoid the induction of necrotic processes in the tumors observed when a higher concentration of cells was used. We wanted to avoid the induction of necrosis because it provokes painful tissue lesions in the animals, making it necessary to sacrifice the mice prematurely, and thus complicating the evaluation of the antitumor treatments.

2.6. Lung metastasis

For the analysis of the macro-metastases in the lungs, the same scheme described above was used. During sacrifice, the lungs were filled with 1 mL of a 10% India Ink solution (Winsor & Newton, London, UK), in PBS, through the trachea with the help of a cannula. The trachea was blocked by surgical thread and the lungs were extracted and washed 3 times with 10 mL of Fekete's solution (85 mL 70% ethanol, 10 mL 10% paraformaldehyde, and 5 mL acetic acid) and, the lungs were fixed in the same solution overnight. The macroscopic foci were counted and photographed with a stereoscopic microscope, OLYMPUS SZ CTV (Olympus, Tokyo, Japan).

Metastatic index was calculated with the number of lung metastatic nodes/primary tumor weight.

2.7. Flow cytometry analysis

The spleen, inguinal lymph nodes and tumor of the different treatment groups were mechanically disintegrated through a plastic mesh, the cell suspension was filtered, and the red cells were lysed. The cells were washed and counted by Bio-Rad TC10™ automated cell counter (Hercules, California, USA). To characterize the populations, 1 × 10⁶ cells were centrifuged at 400g for 5 min at 4 °C, and the pellet was treated with 1 µg/mL of anti-CD16/32 antibody (Biolegend, San Diego, California, USA, cat# 101302), in 0.5% BSA-PBS to avoid non-specific binding of the antibodies. The cells were washed with BSA-PBS and incubated with the indicated combination of antibodies [CD3-APC, Granzyme-B-PE, CD11b-FITC (Biolegend, San Diego, California, USA, Cat#: 100236, 372207, 1012059)] or CD4-PeCy5, CD3-PeCy5, CD8-PE, Gr1-APC (ebioscience, San Diego, California, USA, Cat#: 150041, 150031, 120081, 108412) at an appropriate dilution for 30 min at 4 °C in the dark. Subsequently, the cells were washed to remove the excess antibody and fixed in 300 µL of 1% paraformaldehyde. T cell proliferation was assayed on the 15th day of treatment by labeling 3 × 10⁶ inguinal node cells with CFSE (5 µM) (Molecular probes, Eugene, Oregon, USA, Cat#: 11524217), the cells were placed in 96-well plates and stimulated with 2 µg/mL of synthetic peptides or 20 µg/mL of rMe-VLPs for 5 days. Subsequently, the cells were recovered and stained for analysis as mentioned above. All data were acquired in a BD FACSCalibur Flow Cytometry System (RRID: SCR_000401) with the software BD CellQuest Pro (Franklin Lakes, New Jersey, USA, RRID: SCR_014489). The flow cytometry data were analyzed using the software FlowJo 7.6® (FlowJo, Ashland, Oregon, USA, RRID: SCR_008520).

2.8. Proliferation assay

T cell proliferation was assayed on the 15th day of treatment by labeling 3 × 10⁶ inguinal node cells with CFSE (5 µM) (Molecular probes, Eugene, Oregon, USA, Cat#: 11524217), the cells were placed in 96-well plates and stimulated with 2 µg/mL of synthetic peptides or 20 µg/mL of rMe-VLPs for 5 days. Subsequently, the cells were recovered and stained for analysis as mentioned above.

2.9. Cytotoxicity assay

For the analysis of the cytotoxic effect of VLPs on 4T1 tumor cells, 3 × 10⁴ 4T1 cells were seeded in 96-well plates and stimulated with 25, 50, 100 or 200 µg/mL of WT-VLPs for 4 or 24 h. To analyze the cell viability to each cell well (100 µL), 10 µL of MTT (5 mg/mL) (Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, USA) was added and an additional 4 h were incubated, the formazan crystals were solubilized in acidified isopropanol and the absorbance was recorded at 570 nm. For the analysis of early, late apoptosis and necrosis, after incubation of the VLPs with the tumor cells as described above the cells were recovered and stained with Annexin V-APC (Biolegend, San Diego, California, USA, cat # 640920) and propidium iodide (Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, USA) and analyzed by flow cytometry with a FACSCalibur cytometer, in which 10,000 events, per sample, were obtained.

The analysis of cell cytotoxicity mediated by T cells was assayed on the 15th day post immunization, non-adherent cells from the inguinal node were used to isolated T lymphocytes by negative selection with MACS CD19 microbeads (Miltenyi Biotec, Bergisch, Germany, cat no 130-121-301), T cells were counted and cocultured with 3 × 10⁴ 4T1 cells stained with CFSE for 4 h. Cells

were recovered, stained with Annexin V-APC and analyzed by flow cytometry with a FACSCalibur cytometer, in which 20,000 events, per sample, were obtained.

2.10. Statistical analysis

All the data obtained was analyzed with the Graphpad Prism software (RRID: SCR_002798), one way analysis of variance (ANOVA) and *t* test were used to determine significant differences between the groups, which were indicated when the *p*-value was ≤ 0.1 , ≤ 0.05 , ≤ 0.01 or ≤ 0.001 and were marked as *, **, *** or ****, respectively. The results are shown as mean \pm standard deviation (SD) or standard error mean (SEM), as indicated.

3. Results

3.1. Design and production of recombinant proteins

The process used to construct WT-VP2 and GFP-WT-VP2 were the same process used in previous works [19,20], while the rMe-VP2 construction was analyzed *in silico*, with the objective of determining the secondary and tertiary structure of the multi-epitope region. Several arrangements of the epitopes were tested, and the predicted arrangement, with alpha helix-forming linkers and linear epitopes, was selected because this arrangement increased the solubility of the protein, which facilitated its assembly into VLPs (data not shown).

The rMe-VP2 construction (Fig. 1A) was conformed by the WT-VP2 plus the neoepitopes, Tmtc2, Gprc5a, and Qars, which were identified by next generation sequencing of the 4T1 cell line as epitopes recognized by CD8 cells [22,23], and the tumor associated

antigen (TAA) survivin 66–74 epitope, which has been reported to induce tumor immunity in the spontaneously metastasizing 4T1 breast cancer model [31]. WT-VP2, GFP-WT-VP2 and rMe-VP2 were overexpressed in *E. coli* BL21 (DE3) cells as inclusion bodies, and subsequently, the proteins were purified under denaturing conditions, previously reported [19].

The WT-VP2 and GFP-WT-VP2 protein was purified with the previously reported protocol [19,20], with minor modifications, and was stored in elution buffer until its assembly (Fig. 1B). The rMe-VP2 protein showed slight changes in solubility, since a significant percentage of the protein was solubilized in the inclusion bodies wash buffer, unlike the WT-VP2 protein which does not solubilize in this buffer. As a result, we washed the pellets with washing buffer that did not contain urea, and then added 5 M GuHCl to the rMe-VP2 protein to solubilize it, to be then purified by Immobilized Metal Affinity Chromatography (IMAC) (Fig. 1B). This modification was performed because a concentration of 3 M GuHCl did not permit purification of the protein with IMAC. This phenomenon has already been reported for other WT-VP2 protein chimeras [20] and is possibly due to incomplete denaturation, which allows the formation of tertiary structures that block the exposure of the histidine tag. The increased concentration of this chaotropic agent resolved the problem and allowed rMe-VP2 proteins to be purified by IMAC.

The adjuvant recombinant Cry1Ac protoxin was produced and purified according to previous works without modifications and was kept at 4 °C until its use [32].

3.2. Assembly of VLPs

The assembly of VLPs with the WT-VP2 protein produced capsids 22–24 nm in diameter that coincided with reports for this

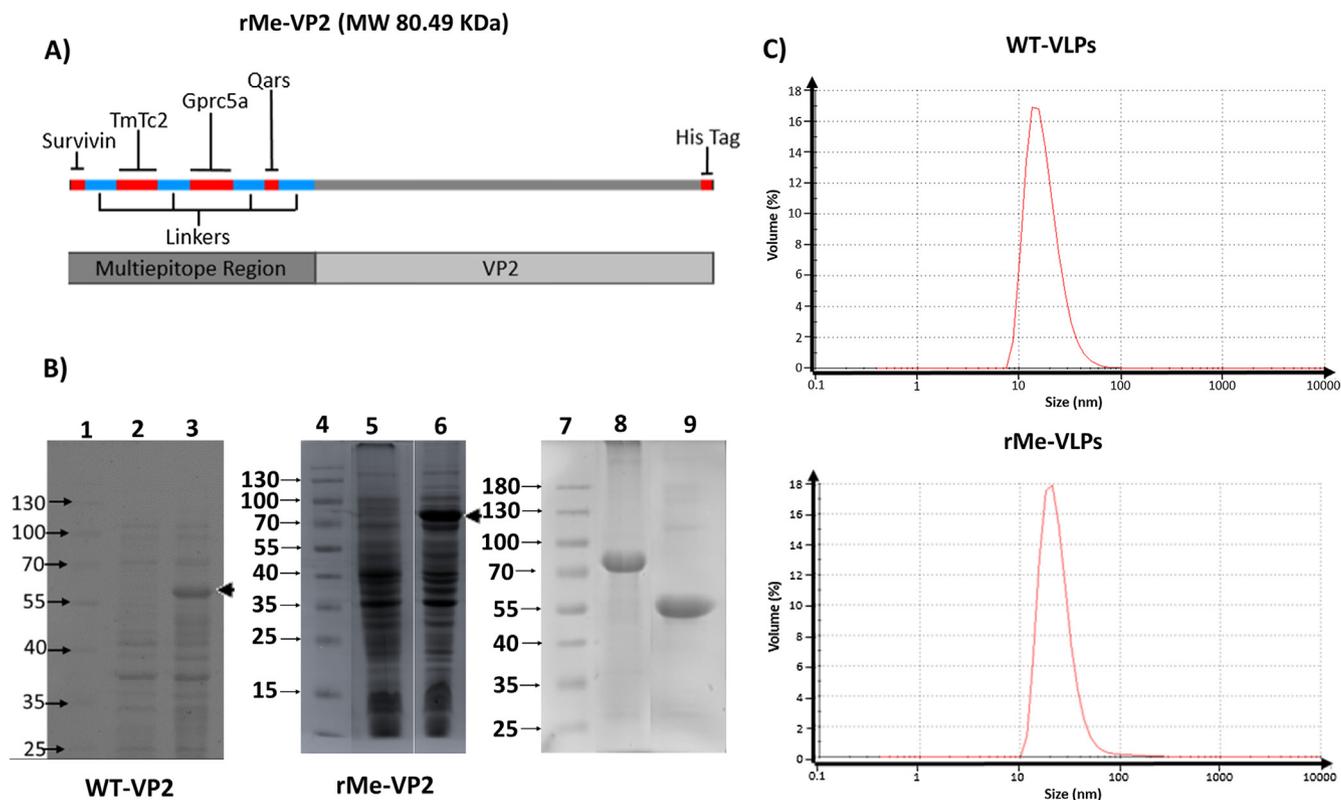


Fig. 1. Protein expression and assembly of VLPs. (A) Composition of chimeric multi-epitope construction of rMe-VP2. (B) Overexpression of WT-VP2 and rMe-VP2 proteins, following IPTG-induction for 18 h at 30 °C in BL21DE3 *E. coli* cells. Proteins from non-induced (2,5) and induced cells (3,6). The MW markers are represented by (1,4,7). The ~60 and ~80 kDa bands, corresponding to the expected MW for WT-VP2 and rMe-VP2, respectively, are marked with black arrow heads at 3 and 6. WT-VP2 (9) and rMe-VP2 (8) purified by IMAC. (C) Size results of the VLPs, acquired using dynamic light scattering. VLPs were assembled as indicated in Materials and Methods by dialysis of pure proteins against of PBS + 0.2 M arginine. 50 measurements were completed for each sample and peaks of ~20 nm were observed in both WT- and rMe-VLPs.

protein [19]. The rMe-VP2 protein was assembled alone or by adding different radii of the WT-VP2 protein (data not shown). In all cases, VLPs that coincided with the reported size of the WT-VLPs were observed. Consequently, we decided to work only with capsids formed by 100% of the rMe-VP2 protein, to ensure the presence of the multi-epitope fraction in the assembled capsids. The assembly with 100% chimeric VP2 was also recently reported [20]. The assembly of the rMe-VLPs produced monodisperse species of 20 ± 3.0 nm in diameter (Fig. 1C).

3.3. Antitumor effect of VLPs in mice

To test the possible antitumor effect of the rMe-VLPs in established tumors, mice were implanted with 4T1 cells and then immunized with rMe-VLPs with or without the adjuvant or with WT-VLPs as a control. 50 μ g of each protein in the form of VLPs, was administered intraperitoneally and peritumorally simultaneously every 7 days during the experiments. Unexpectedly, we observed a delay in tumor growth in mice treated with WT-VLPs and WT-VLPs + adjuvant, with no differences between treatment with WT-VLPs with or without the adjuvant (Fig. 2A). Tumor growth in these groups was significantly lower than that observed in mice treated with the PBS vehicle. Mice immunized with rMe-VLPs, with and without adjuvant showed a significant delay in

tumor growth compared to mice treated with the vehicle and significantly less tumor growth than mice treated with WT-VLPs (Fig. 2A, B). Treatments with rMe-VLPs with the adjuvant showed the smallest tumor sizes until day 36, even then exhibiting non-measurable tumors in 4/7 mice. The tumors excised on day 36 showed large volume with similar measurements in groups PBS and WT-VLPs, however due to their irregular shape the large sides of these tumors were not precisely measurable *in vivo*, so the volumes of excised tumors were higher (Fig. 2C). The addition of the adjuvant partially improved the response observed from treatment with WT-VLPs and rMe-VLPs in excised tumors, although not significantly.

3.4. Inhibition of macro-metastasis in the lung

Due to the importance of metastasis in cancer mortality, we decided to evaluate the effect of our treatment on the establishment of lung metastasis. For this evaluation, we injected 1×10^4 or 3×10^3 4T1 cells, subcutaneously, in the 6th breast of BALB/c mice. The treatments were applied as mentioned in the Materials and Methods. On day 32, the lungs of the mice were stained with 10% Indian ink to allow visualization of the metastatic nodules. Our results showed that treatment with rMe-VLPs significantly reduced the metastatic index and the number and size of

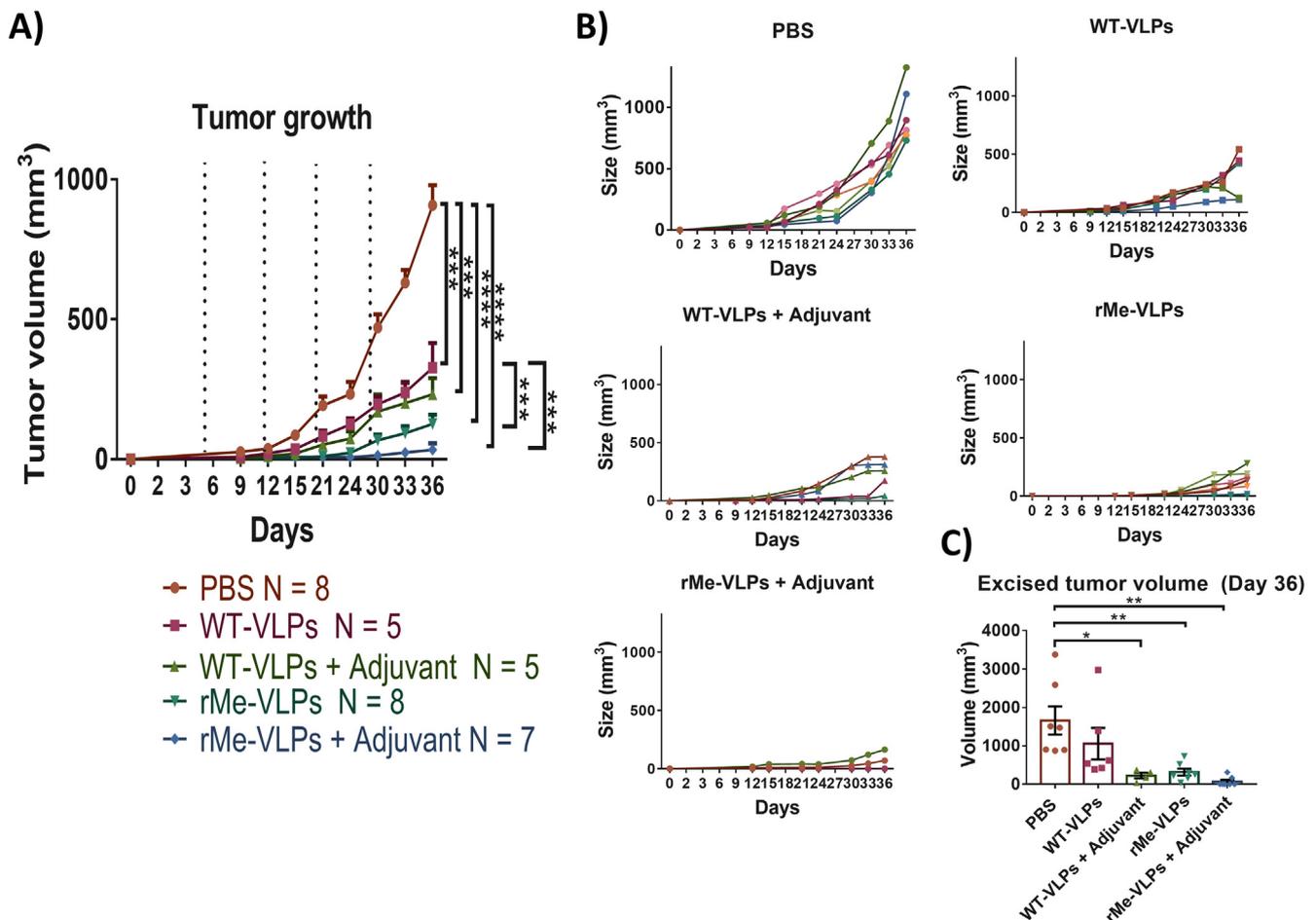


Fig. 2. rMe-VLPs treatment reduced tumor growth in BALB/c mice subcutaneously inoculated with 4T1 cells. Female BALB/c mice were subcutaneously injected in the sixth breast with 3×10^3 4T1 cells and treatments were applied on the indicated days (dotted lines) by peritumoral and intraperitoneal routes as detailed in Materials and Methods. Tumor growth was monitored every third day. The tumor size was measured with a digital caliper and the volume was calculated with the formula $V = (L \times S^2)/2$. (A) Graphs represent the mean \pm SEM of tumor size volumes recorded following the distinct treatments with PBS, WT-VLPs, WT-VLPs + adjuvant, rMe-VLPs, and rMe-VLPs + adjuvant. (B) Graphs show tumor volume sizes recorded for individual mice within each treatment. (C) Mean volume size of tumors excised and recorded at day 36, following the distinct treatments. The data is represented as mean \pm SEM. N = 5–8. *, **, ***, **** denote significant differences, where the p-value was ≤ 0.1 , 0.05, 0.01 or 0.001, respectively.

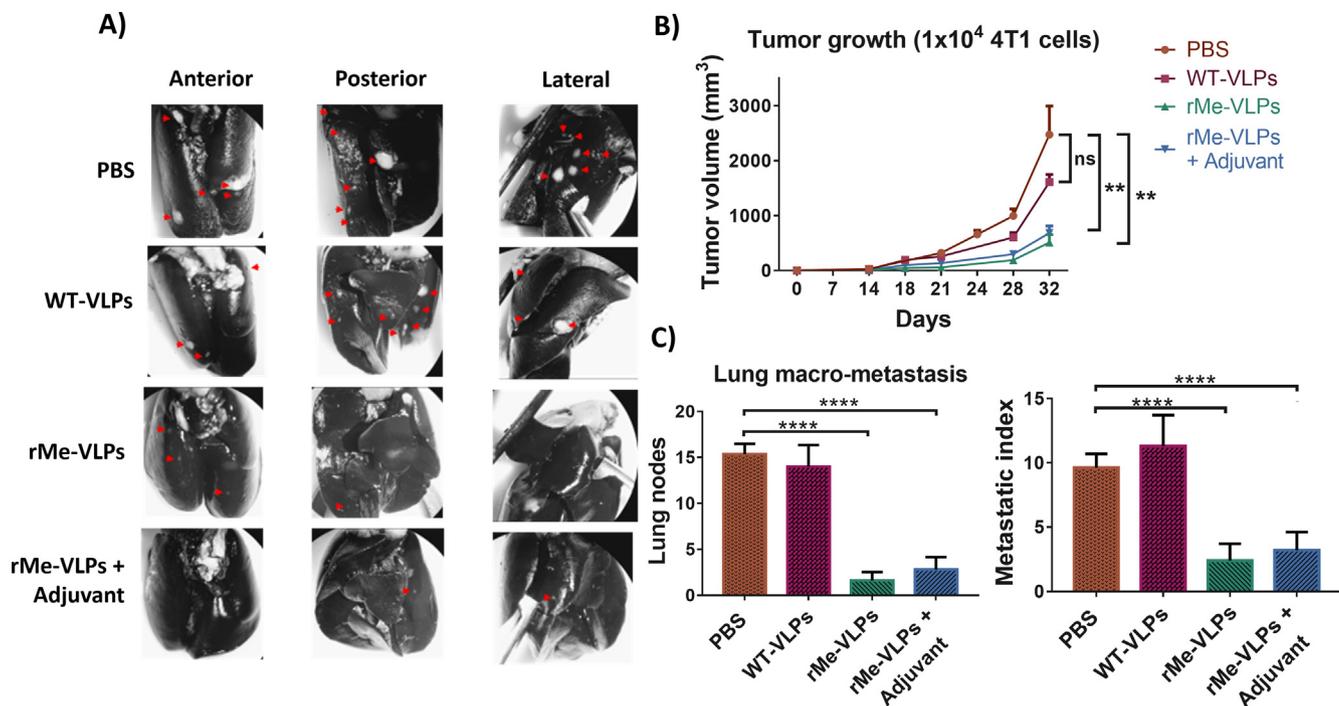


Fig. 3. rMe-VLPs treatment reduced lung macro-metastasis induced by 1×10^4 cells 4T1. (A) Tumor-bearing mice received treatments as mentioned in Materials and Methods. At day 32, the mice were euthanized and the lungs were filled with 10% India ink solution through a tracheotomy. The lungs were extracted, washed, fixed, and photographed with a stereoscopic microscope. The anterior, posterior, and lateral views are shown, where the arrowheads indicate metastatic nodes. (B) Temporal course of tumor growth recorded after subcutaneous injection of 1×10^4 cells 4T1 in mice that received the indicated treatments every 7 days by intraperitoneal and peritumoral routes. (C) The number of metastatic nodes recorded in the lungs of each mouse. The data is represented as mean \pm SEM. $N = 6$. **, **** denote significant differences, where the p -value was ≤ 0.05 or 0.01, respectively.

macro-metastases induced by 1×10^4 cells or 3×10^3 4T1 cells (Fig. 3A, S1), while WT-VLPs did not have any effect on rate of metastasis. Tumor growth by injection of 1×10^4 4T1 cells in mice showed a behavior like that observed with the injection of 3×10^3 4T1 cells (Fig. 3B), except WT-VLPs did not have a significant effect in tumor growth.

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2019.09.068>.

The number of metastases by injection of 3×10^3 4T1 cells in the PBS group was higher than that observed by the injection of 1×10^4 4T1 cells (Fig. S1). The treatment of mice with rMe-VLPs, with and without the adjuvant, decreased the amount and size of metastatic nodules in the lungs in comparison to the mice treated with the vehicle or with the WT-VLPs (Fig. 3C). There were no differences between mice treated with rMe-VLPs and rMe-VLPs + adjuvant.

3.5. Characterization of populations of T lymphocytes and MDSC

To determine if the immune populations were modified by the treatments, the populations present in the spleen and in the tumor of the treated and untreated mice were analyzed by flow cytometry. We observed that the proportions of $CD3^+CD4^+$ cells and $CD3^+CD8^+$ T lymphocytes decreased in their percentages in the mice treated with the vehicle, and this decrease was significantly lower than the values found in healthy mice without tumors (Fig. 4A, B). The treatments with WT-VLPs and rMe-VLPs partially re-established the values of these populations, however, only rMe-VLPs with and without the adjuvant were significantly different from the vehicle group (Fig. 4B). To analyze the Myeloid-Derived Suppressor Cells (MDSC), we use CD11b and Gr1 markers, as these two markers are known to delimit the suppressor population in

this model, as previously reported [33,34]. We found a significant increase of this population in mice treated with the vehicle, with respect to healthy mice (Fig. 4C). Regarding the treatments, we observed that WT-VLPs + adjuvant and rMe-VLPs + adjuvant decreased this population in the spleen, while in the tumor, all treatments decreased the proportion of these cells, with a significantly lower proportion observed only after treatment with WT-VLPs + adjuvant (Fig. 4D). Importantly, these results show that the Cry1Ac protoxin as adjuvant has an inhibitory effect on the MDSC population, which deserves further characterization.

3.6. Proliferation and cytotoxicity of T lymphocytes

Proliferation assays were performed, by tracing the loss of fluorescent compound Carboxyfluorescein succinimidyl ester (CFSE), to determine if the treatments were able to induce specific cellular responses towards the tumor. On day 15 of treatment, the animals were sacrificed, and the spleen and inguinal node cells were stained with CFSE. The cells were seeded and stimulated for 5 days using a pool of peptides of neoepitopes or rMe-VLPs as stimuli or WT-VLPs/unrelated peptides as control (Fig. S2). The analysis showed a significant increase in proliferation of lymphocytes CD4 in mice treated with rMe-VLPs, with and without the adjuvant, after the *in vitro* stimulation with the peptides or rMe-VLPs. These results showed that rMe-VLPs were able to induce CD4 specific responses in inguinal nodes (Fig. 5B). The proliferative responses of lymphocytes CD8 were similar to those of CD4, but the proliferation was observed only after the stimulus with peptides or rMe-VLPs (Fig. 5E). Mice treated with WT-VLPs only exhibited proliferation towards WT-VLPs stimulus (Fig. S2). No differences were observed with the adjuvant addition. To prove that CD8 lymphocytes had a cytotoxic profile, we determined the production of Granzyme-B. Results showed a significant increase in the

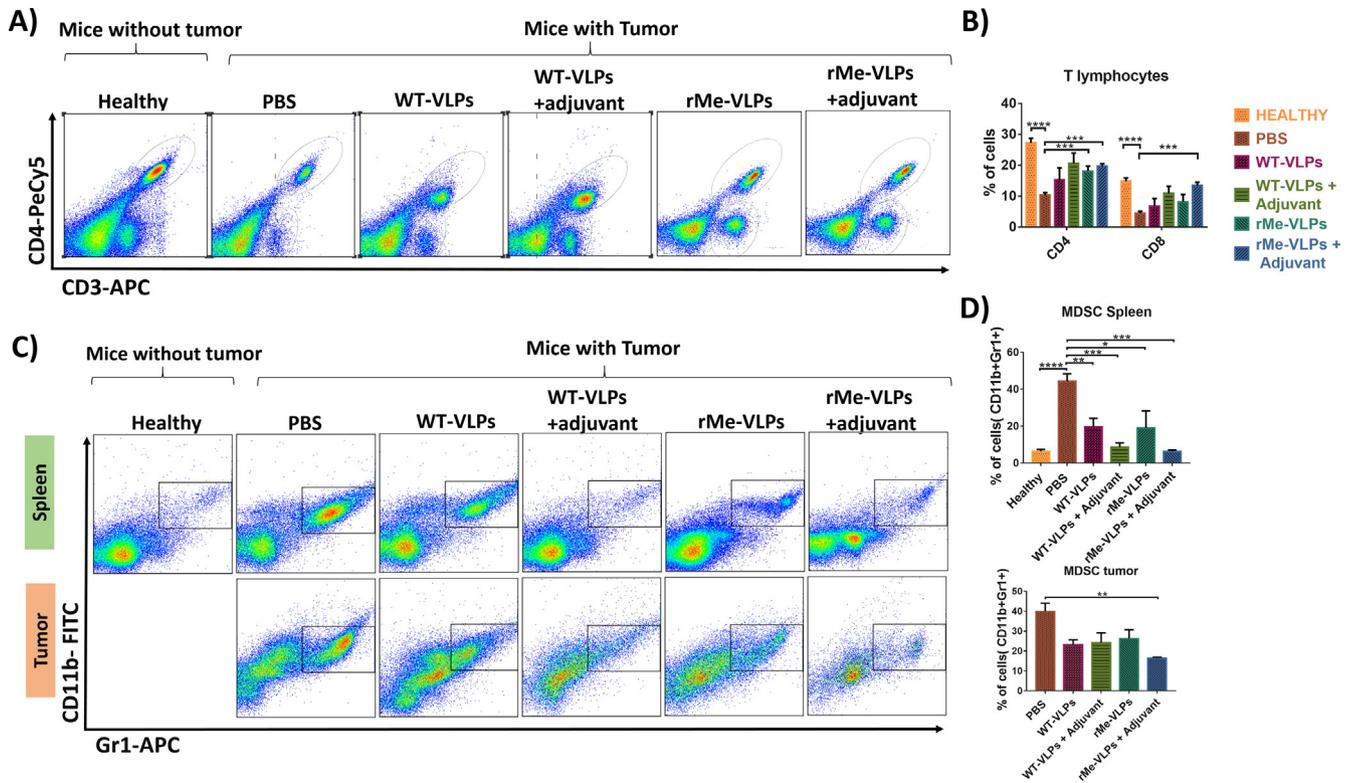


Fig. 4. Treatments with VLPs provoked a minor reduction of T lymphocytes and a lower percentage of MDSC in the spleen and tumor. BALB/c mice treated as indicated in Fig. 2 were euthanized at 36 days post tumor induction. The spleen and tumor were extirpated and disaggregated. (A) Representative dot plots indicating the proportion of T lymphocytes in the spleens of healthy vs tumor induced mice using CD3+ and CD4+ markers. The population CD3+CD4⁻ was used to estimate the proportion of CD8 lymphocytes. (B) Analysis of the proportion of CD3+CD4+ and CD3+CD8+ lymphocytes in the spleen. (C) Representative dot plots indicating CD11b+Gr1+ MDSC populations in spleen or tumor which were used for the analysis shown in D, are shown in the rectangle regions. Data was acquired with a FACSCalibur cytometer and 50,000 events were acquired. (D) Proportions of MDSC in spleen or tumor, the data in bar graphs is represented as mean \pm SEM. N = 6. *, **, ***, **** denote significant differences, where the *p*-value was \leq 0.1, 0.05, 0.01 or 0.001, respectively.

percentage of CD8 + Granzyme-B + cells after stimulus with the peptides or rMe-VLPs in mice treated with rMe-VLPs alone or with the adjuvant (Fig. 6B). Furthermore the cytotoxicity on 4T1 cells of CD8 T lymphocytes isolated from immunized mice, was also evaluated *in vitro*, increased apoptosis evaluated by the expression of annexin-V in CFSE stained 4T1 cells was induced by cells from rMe-VLPs immunized mice in comparison with lymphocytes unimmunized, further confirming the induction of specific cytotoxic responses (Fig. 6E).

4. Effect of WT-VLPs on 4T1 tumor cells

Due to the unexpected effect of WT-VLPs on tumor growth, it was evaluated whether they were able to enter the tumor after peritumoral administration, the results showed that GFP-VLPs [20] can enter the tumor after 1 h administration and can be detected even 24 h after administration (Fig. 7A). In-cell western analysis showed that VLPs can bind to 4T1 cells after 1 h of incubation (Fig. 7B). It was observed that WT-VLPs can induce high antibody titers in serum from immunized mice (Fig. 7C), these antibodies show low binding to 4 T1 cells (Fig. 7B right) in comparison with the binding of VLPs. The evaluation of the effects of this union of the WT-VLPs to the tumor cells showed that can lead to the blockage of the union of the 4T1 cells to a fibronectin matrix (Fig. 7D) and can affect their migration (Fig. 7E). Besides, after 24 h of stimulation with WT-VLPs, an increase in the percentage of tumor cells in early (Fig. 7F, G left) and late apoptosis (Fig. 7G right) was observed, in addition to a decrease in cell metabolism measured by the reduction of MTT to formazan crystals (Fig. 7H),

it was not observed that VLPs induce early apoptosis in primary culture lymphocytes at any of the concentrations evaluated (Fig. S3). Altogether these results indicating WT-VLPs can bind to 4T1 cells and induce apoptosis suggest direct effects on tumor cells which help to explain the antitumor effects observed.

5. Discussion

Currently, immunotherapy has been restricted to cancers with recognized molecular targets. Therefore, cancers, such as TNBC, continue to be cancers with little expectation of a cure and limited, available treatment options. As a result, these cancers without recognized molecular targets continue to be treated with chemotherapy and radiotherapy. The use of neoepitopes represents an alternative to provide specific targets in tumors that lack recognized molecular targets. However, to improve the ability of neoepitopes to induce antitumor immunity, it is still necessary to develop appropriate antigen delivery systems.

The results of this study support the use of VLPs, formed by the VP2 protein of the human parvovirus B19, as a promising tumor antigen delivery system, with the potential therapeutic effect as it functions in a murine a model of triple-negative breast cancer. Coinciding with previous reports, our present results showed that additions of epitope sequences at the amino terminal region of WT-VP2 does not alter its assembly properties [20,27], further supporting the advantage of this VLP system to be used as antigen delivery system.

We found that intraperitoneal and peritumoral administration of rMe-VLPs, loaded with multiple neoepitopes (Gprc5a, Tmtc2,

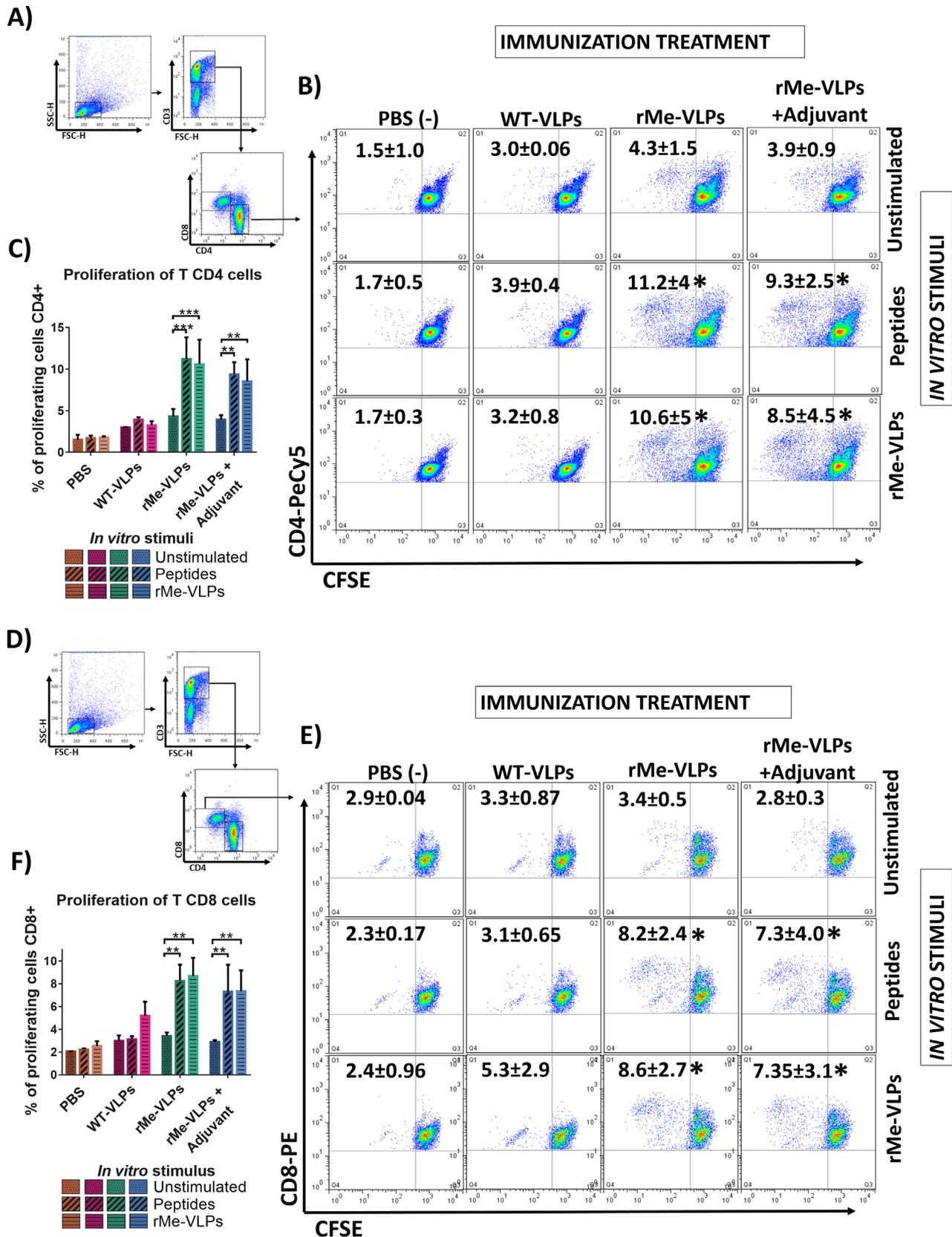


Fig. 5. rMe-VLPs treatment induced specific T CD4 and T CD8 proliferative responses in the inguinal node. Mice were injected subcutaneously with 3×10^3 4T1 cells and received a single immunization at day 7 with any of the indicated treatments. The mice were sacrificed on day 15 of the study. Inguinal lymph nodes were removed and disaggregated. 3×10^6 cells were stained with CFSE as is described in the Materials and Methods section. The cells were stimulated with peptides (20 μ g/mL) or with rMe-VLPs (20 μ g/mL) for five days. Cells were recovered, stained with anti CD3, CD4 and CD8 antibodies, and analyzed by flow cytometry with a FACSCalibur cytometer, in which 50,000 events, per sample, were obtained. (A), (D) Flow cytometry gating strategy, the figure shows the regions used to isolated CD4 and CD8 cells for the proliferation analysis shown in B and E. Representative dot plot of proliferation of CD3+CD4+ (B) and CD3+CD8+ (E) gated cells, mean \pm SD are shown. (C), (F) The data in bar graphs is represented as mean \pm SEM. N = 3. **, *** denote significant differences, where the p-value was ≤ 0.05 or 0.01, respectively.

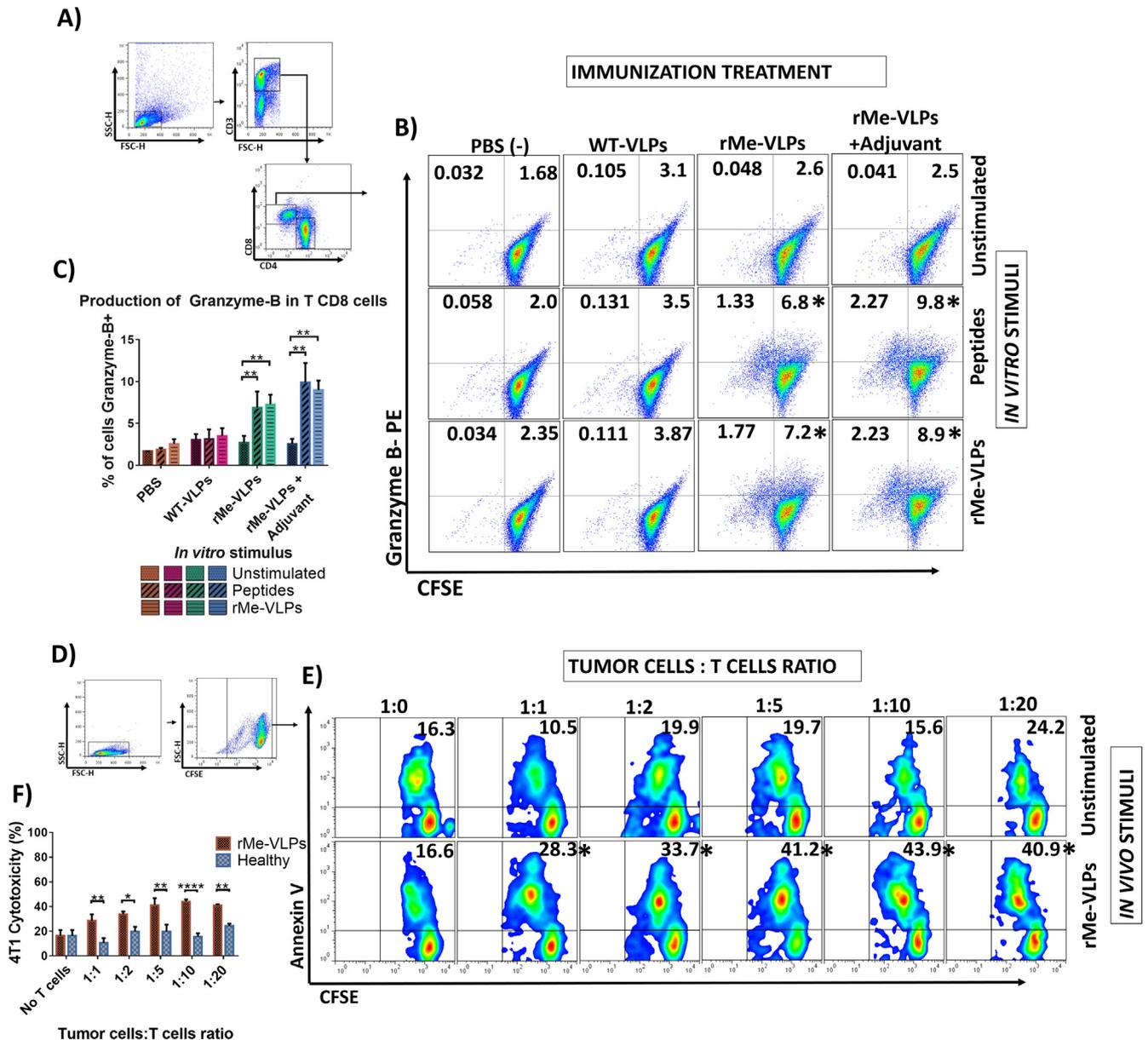


Fig. 6. rMe-VLPs treatment induces Granzima-B production in T CD8 cells and induce cytotoxicity of tumor cells mediated by T cells of inguinal node. Mice were injected subcutaneously with 1×10^4 4T1 cells and received a single immunization at day 7 with any of the indicated treatments. The mice were sacrificed on day 15 of the study. Inguinal lymph nodes were removed and disaggregated. 3×10^6 cells were stained with CFSE as described in the Materials and Methods section. The cells were stimulated with peptides (2 $\mu\text{g}/\text{mL}$) or with rMe-VLPs (20 $\mu\text{g}/\text{mL}$) for five days. Cells were recovered, stained with anti CD3-PeCy5 and anti CD8-APC, anti Granzyme-B-PE antibodies, and analyzed by flow cytometry with a FACSCalibur cytometer, in which 50,000 events, per sample, were obtained. (A) Flow cytometry gating strategy, the figure shows the regions used to isolated CD8 cells for the analysis shown in B. (B) Representative dot plots of CD8 gated cells are shown, mean of the quadrants are shown. (C) The data in bar graphs is represented as mean \pm SEM. For the analysis of cell cytotoxicity mediated by T cells, the mice were immunized as described in the materials and methods section, the inguinal node T lymphocytes were isolated by negative selection with magnetic beads and were co-cultured with 4T1-CFSE cells for 4 h. Cells were recovered, stained with Annexin V-APC and analyzed by flow cytometry with a FACSCalibur cytometer, in which 20,000 events, per sample, were obtained. (D) Flow cytometry gating strategy, the figure shows the regions used to isolated 4T1- CFSE+ cells for the analysis shown in E. (E) Representative dot plots of 4T1- CFSE+ cells positives to Annexin V, mean of the quadrants are shown. (F) % of cytotoxicity of 4T1 cells, the data in bar graphs is represented as mean \pm SEM. N = 3. *, **, **** denote significant differences, where the p-value was ≤ 0.1 , 0.05 or 0.001 respectively.

Qars) and a TAA (survivin), are able to significantly delay tumor growth induced by the s.c. injection of 1×10^4 or 3×10^3 4T1 cells, where 4/7 mice reached complete tumor remission after the co-administration of rMe-VLPs with the adjuvant, Cry1Ac protoxin. Despite this result, total remission was only attained when tumors were induced with the lower dose of 3×10^3 4T1 cells. However, it is important to point out that a significant delay in tumor growth was observed, with both concentrations of cancer cells, at the end of the study.

Immunization with rMe-VLPs also significantly reduced the size and number of nodules of macro-metastases in the lungs, which

was induced by s.c administration of both concentrations of 4T1 cells, rMe-VLPs group also showed lower metastatic index than WT-VLPs and PBS groups, therefore, the decrease in the size of the main tumor induced by rMe-VLPs may be related to a lower metastatic seeding in the lung. Moreover, our results are similar to a previous report that showed a lower concentration of 4T1 cells induced a greater number of macro-metastasis in the lungs of untreated mice [35].

Due to their small size of approximately 20 nm, B19-VLPs may be capable of directly entering lymph nodes local to the tumor, in a similar way that has been reported for porcine parvovirus VLPs,

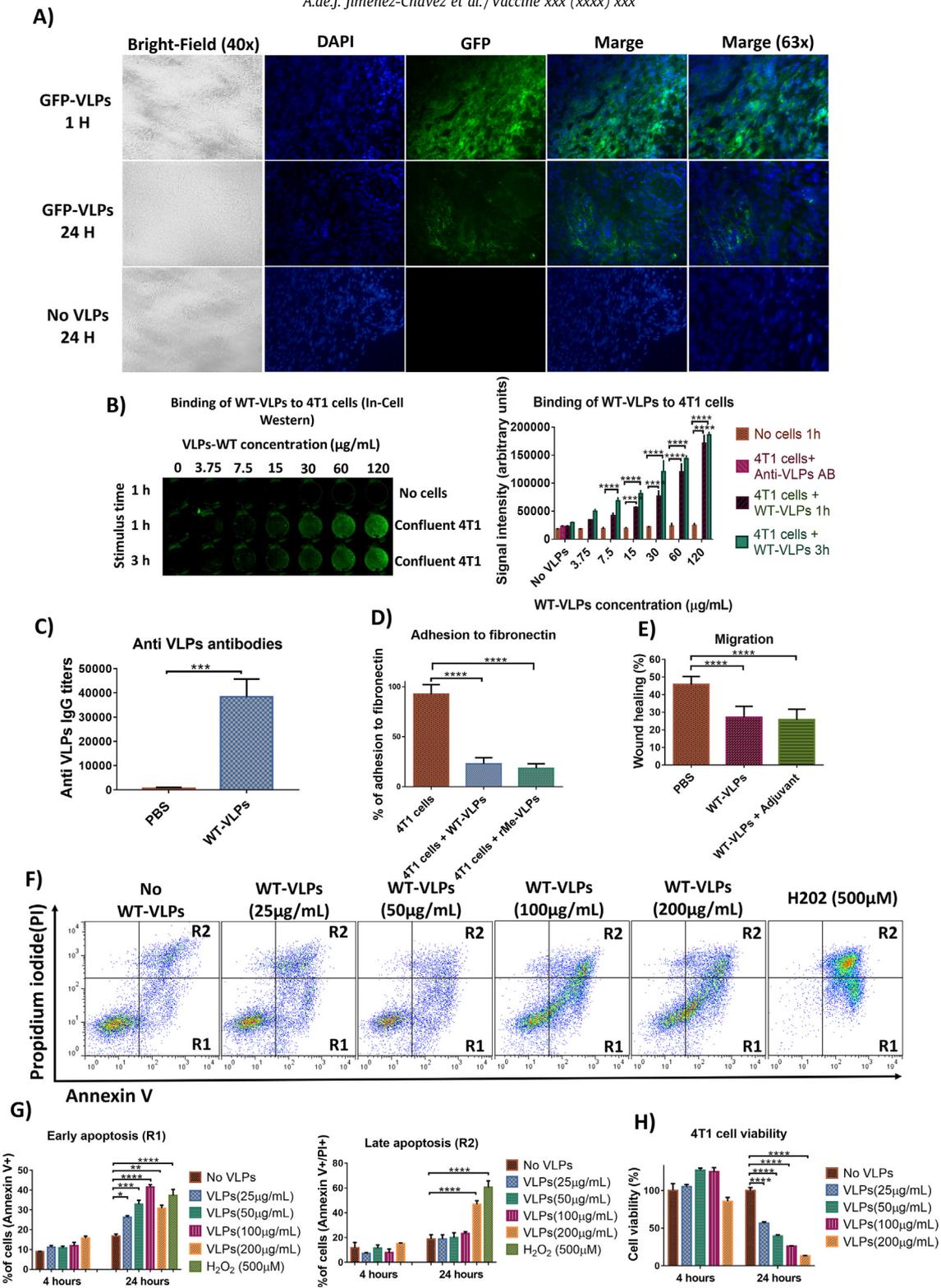


Fig. 7. WT-VLPs can entry to tumor, bound to 4T1 cells and affected migration, adhesion to fibronectin and induce apoptosis. (A) Entry of GFP-VLPs into tumors, 50 μg of GFP-VLPs were injected s.c. Near the breast and the primary tumor was removed after 1 and 24 h, 5 μm cuts were made, the nuclei were stained with DAPI and photographs (40 \times) were taken with a Leica fluorescence microscope. (B) Binding of VLPs to tumor cells, 4T1 cells were stimulated with increasing concentrations of WT-VLPs, for 1 and 3 h. The wells were washed and polyclonal antibody, anti-VLPs, was used to detect VLPs binding to 4T1 cells (left), secondary Dye 800 anti-rabbit monoclonal antibody was used. Signal intensity was determined with an Odyssey LICOR scanner, right panel shown analysis of signal intensity. (C) Anti-VLPs antibody titers induced after 3 weekly immunizations with WT-VLPs. (D) In vitro adhesion of 4T1 cells to fibronectin. 96-well plates were covered with fibronectin (20 $\mu\text{g}/\text{well}$) and 1×10^5 4T1 non-adherent cells were incubated with 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of WT-VLPs or rMe-VLPs for 30 min, at room temperature. The cells were added to the wells and incubated for 2 h. Crystal violet was used to determinate adhered cells. (E) Percentage of migration, Wound healing assay of 4T1, confluent monolayer was scratched with a yellow tip and cultured for 24 h. PBS, WT-VLPs (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$) alone or with adjuvant (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$) were used as a stimulus and wound healing was calculate with ImageJ software. (F) Dot plots representative of the induction of early apoptosis (Annexin V+, R1), late apoptosis (Annexin V+/PI+, R2) and necrosis (PI+) in 4T1 cells induced by different concentrations of WT-VLPs after 24 h of stimulation. (G) Analysis of the induction of early (left) or late (right) apoptosis of 4T1 cells after 4 or 24 h of stimulation with different concentrations of WT-VLPs. (H) Analysis of the cell viability of 4T1 cells stimulated with different concentrations of WT-VLPs by reducing MTT after 4 or 24 h of stimulation. The data is represented as mean \pm SEM. N = 6. *, **, ***, **** denotes significant differences, where the p-value was ≤ 0.1 , 0.05, 0.01 or 0.001 respectively. (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

which were captured in lymph nodes, processed by CD8 + CD11b + dendritic cells, and presented to T lymphocytes [21,36–38]. Although the neoepitopes contained in rMe-VLPs were chosen as CD8 epitopes, searching for the induction cytotoxic of immune responses; due to their size (more than 9 a.a.), they are also capable of functioning as CD4 epitopes. Likewise, most of the neoepitopes identified in the 4T1 cell line, by Kreiter et al were recognized by CD4 cells [22]. Moreover, due to the exogenous nature of VLPs, a presentation in MHC II is also possible, thus the induction of both types of cellular responses, in the inguinal lymph nodes induced in present study by the immunization with rMe-VLPs containing CD8 epitopes, was expected to occur, and may also be contributing to favor the induction of effective antitumor responses. Indeed the induction of CD4 Th1 responses also has been shown to play an important role in the induction of strong antitumor responses [39,40]. Our results also indicate that rMe-VLPs can be captured, processed, and presented to CD4 and CD8 T lymphocytes at the inguinal lymph nodes.

In addition, an increase in the proportion of CD8 T lymphocytes producing Granzyme-B was also observed in inguinal nodes, moreover when cytotoxicity on 4T1 cells of CD8 T lymphocytes was evaluated *in vitro* increased apoptosis was induced by cells from rMe-VLPs immunized mice. These results suggest that immunization with rMe-VLPs can induce specific cytotoxic T lymphocyte responses to neoepitopes. The induction of specific immune responses to tumor antigens in nearby lymph nodes has been reported to be important since these sites are the first to be invaded during the early phase of metastasis [41,42]. Therefore, the induction of cellular responses at this site may be related to the decrease in the observed metastatic rate.

Although in present study we focused in the characterization of the cellular immune response and the antibody response was not analyzed, because the CD8 epitopes used contained non exposed domains, the contribution of antibody responses in the anti-tumor effects induced by immunization with WT-VLP and rMe-VLP, rest to be determined. Despite anti VLPs antibodies did not show significant binding to 4T1 cells (Fig. 7B right) VLPs are immunogenic, as induce significant antibody titers (Fig. 7C), so the induction of ADCC in the presence of VLPs, which can bind to tumor cells might occur.

In addition to the induction of cellular responses at the local level, we also observed changes in cell populations of the spleen. Mice immunized with WT-VLPs and rMe-VLPs maintained the proportion of CD4 and CD8 T lymphocytes at normal levels in the spleen, animals treated with PBS only displayed a significant decrease of these cell populations in the spleen [43]. This decrease in lymphocyte proportions has been associated with the increase of suppressor populations in this organ that can lead to anergy and lymphocyte apoptosis [44]. So, we also analyzed the MDSC proportion, which has been reported as the main suppressor cell in the 4T1 model [45]. Our results showed that PBS treated mice presented a significant increase in the CD11b + Gr1 + population that denotes the MDSC in the spleen, while the mice immunized with WT-VLPs or rMe-VLPs with and without adjuvant showed a significant decrease of these cells, with a greater decrease with the addition of the adjuvant with respect to the PBS group. These results suggest that the adjuvant, protoxin Cry1Ac, may have some effect in decreasing this MDSC population, this finding is quite relevant due to the role of this population in tumor progression, this effect could be related with the capacity of Cry1Ac protoxin to induce the differentiation of these cells, as has been described by diverse adjuvants, particularly by agonists targeting TLRs 7/8 or 9 [46], but this possibility remains to be determined. The adjuvant mechanism of Cry1Ac protoxin is related with the capacity to

activate antigen presenting cells by activating MAPK pathways [29]. Another possibility of the effect of Cry1Ac might be the induction of apoptosis in MDSC, but this deserves further investigation.

WT-VLPs showed an unexpected effect on tumor growth induced with 1×10^3 4T1 cells. A lower median size was observed in WT-VLPs and WT-VLPs plus adjuvant, these VLPs also show effects in MDSC population in the spleen, suggesting that they may have an antitumoral effect not mediated by specific cellular immune responses. Some reports have shown that VLPs formed by the WT-VP2 protein of parvovirus B19 are able to bind to the Gb4 globoside and $\alpha 5\beta 1$ integrin [47,48], both of which have been related to the induction of proliferation in tumor cells, through the activation of signaling pathways such as MAPK [49–51]. In this study, we observed that VLPs can access into tumors and stay there at least 24 h after injection, this may be due to the effect of enhancing permeability and retention of particles described in tumors [51]. We performed some assays to determine whether WT-VLPs may bind to or affect some 4T1 functions. We observed that WT-VLPs could bind directly to 4T1 cells, *in vitro*, and affected their migration and binding to fibronectin (ligand of $\alpha 5\beta 1$ integrin). In addition, the VLPs were able to induce apoptosis and decrease the viability of tumor cells after 24 h of culture. These results indicate WT-VLP can enter the tumor and affect the tumor cells, so they could be used as a delivery system to the tumor. However additional studies are required to prove this possibility.

Moreover, it would be important to test the antitumoral effect in a different cancer model to establish whether the unexpected antitumoral effect of WT-VLPs seen in this model also occurs in other cancer models, as these VLPs may be used to improve tumor immunity. Although in present study we did not detect any visible signs of chronic inflammation, as manifested by skin lesions or scruffy appearance of mice. It would be also necessary to perform a complete evaluation of possible side-effects or autoimmunity induced by WT-VLPs and rMe-VLP vaccination in further studies.

Improvement in the identification and prioritization of neoepitopes and TAAs continues to be fundamental to guarantee the induction of specific responses and increase the probability of inducing strong immune responses capable of therapeutic effectiveness. Here we demonstrated that the use of neoepitopes delivered with B19-VLPs may have a therapeutic effect on tumor growth and on the establishment of macro-metastases. However, in this study we tested the potential of B19-VLPs as an antigen delivery system using a few epitopes.

Novel studies are required to further characterize the B19-VLPs as a delivery system for antigens in cancer, both with neoepitopes for cancers without known molecular targets and with recognized antigens, such as Her2, prostate-specific antigen, etc., to establish in which types of cancer the approach of VLPs with tumor antigens may be beneficial. It is also important to ascertain if these VLPs can allow the induction of humoral responses towards coupled antigens, which could extend the application of this approach to cancers where humoral responses are important.

In conclusion, we demonstrated that recombinant multi-epitope-B19-VLPs could be a viable alternative as a delivery system for neoepitopes and TAAs in breast cancer, as they were able to induce specific immune responses towards the neoepitopes in lymphatic nodes near the tumor, which impacts the rate of tumor growth and the establishment of distal macro-metastasis. This approach can facilitate the application of personalized therapies, as the treatment can be delivered subcutaneously near the tumor, instead of directly in the lymph nodes. As a result, treatment administration can be performed without special ultrasound equipment. Additionally, the use of these VLPs as delivery system could avoid the processing of the antigen by non-presenting cells,

thus avoiding the induction of lymphocyte anergy and promoting the induction of powerful responses that can ultimately affect the quality of life of patients.

Declaration of Competing Interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

Acknowledgments

This work was supported by Grants from Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT) 1N2233319 and Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) CB283319. Ángel de Jesús Jiménez Chávez is a doctoral student from Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) and was supported by CONACYT (CVU 659430).

Author contributions

Conceptualization, J.C. and M.F.; Methodology, J.C.; Resources, B.J.; Investigation, J.C.; Writing – Original Draft, J.C.; Writing – Review & Editing, M.F. and B.J.; Project Administration, M.F.; Funding Acquisition, M.F.

References

- Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin* 2018;68:394–424. <https://doi.org/10.3322/caac.21492>.
- Sahin U, Derhovanessian E, Miller M, Kloke BP, Simon P, Lower M, et al. Personalized RNA mutanome vaccines mobilize poly-specific therapeutic immunity against cancer. *Nature* 2017;547:222–6. <https://doi.org/10.1038/nature23003>.
- Wahba HA, El-Hadaad HA. Current approaches in treatment of triple-negative breast cancer. *Cancer Biol Med* 2015;12:106–16. <https://doi.org/10.7497/ij.issn.2095-3941.2015.0030>.
- Brennick CA, George MM, Corwin WL, Srivastava PK, Ebrahimi-Nik H. Neopeptides as cancer immunotherapy targets: key challenges and opportunities. *Immunotherapy* 2017;9:361–71. <https://doi.org/10.2217/imt-2016-0146>.
- Ott PA, Hu Z, Keskin DB, Shukla SA, Sun J, Bozym DJ, et al. An immunogenic personal neoantigen vaccine for patients with melanoma. *Nature* 2017;547:217–21. <https://doi.org/10.1038/nature22991>.
- Martinez-Lostao L, Anel A, Pardo J. How do cytotoxic lymphocytes kill cancer cells? *Clin Cancer Res* 2015;21:5047–56. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-15-0685>.
- Marqus S, Pirogova E, Piva TJ. Evaluation of the use of therapeutic peptides for cancer treatment. *J Biomed Sci* 2017;24:21. <https://doi.org/10.1186/s12929-017-0328-x>.
- Yavari B, Mahjub R, Saidijam M, Raigani M, Soleimani M. The potential use of peptides in cancer treatment. *Curr Protein Pept Sci* 2018;19:759–70. <https://doi.org/10.2174/138920371966618011150008>.
- Khong H, Overwijk WW. Adjuvants for peptide-based cancer vaccines. *J Immunother Cancer* 2016;4:56. <https://doi.org/10.1186/s40425-016-0160-y>.
- Petrovsky N. Comparative safety of vaccine adjuvants: a summary of current evidence and future needs. *Drug Saf* 2015;38:1059–74. <https://doi.org/10.1007/s40264-015-0350-4>.
- Abraham M, Karni A, Dembinsky A, Miller A, Gandhi R, Anderson D, et al. In vitro induction of regulatory T cells by anti-CD3 antibody in humans. *J Autoimmun* 2008;30:21–8. <https://doi.org/10.1016/j.jaut.2007.11.007>.
- Chen L, Flies DB. Molecular mechanisms of T cell co-stimulation and co-inhibition. *Nat Rev Immunol* 2013;13:227–42. <https://doi.org/10.1038/nri3405>.
- Zdanowicz M, Chroboczek J. Virus-like particles as drug delivery vectors. *Acta Biochim Pol* 2016;63:469–73. <https://doi.org/10.18388/abp.2016.1275>.
- Ong HK, Tan WS, Ho KL. Virus like particles as a platform for cancer vaccine development. *PeerJ* 2017;5:e4053. <https://doi.org/10.7717/peerj.4053>.
- Palladini A, Thrane S, Janitzek CM, Pihl J, Clemmensen SB, de Jongh WA, et al. Virus-like particle display of HER2 induces potent anti-cancer responses. *Oncoimmunology* 2018;7:e1408749. <https://doi.org/10.1080/2162402X.2017.1408749>.
- Lin MC, Wang M, Chou MC, Chao CN, Fang CY, Chen PL, et al. Gene therapy for castration-resistant prostate cancer cells using JC polyomavirus-like particles packaged with a PSA promoter driven-suicide gene. *Cancer Gene Ther* 2019. <https://doi.org/10.1038/s41417-019-0083-0>.
- Ao Z, Chen W, Tan J, Cheng Y, Xu Y, Wang L, et al. Lentivirus-based virus-like particles mediate delivery of caspase 8 into breast cancer cells and inhibit tumor growth. *Cancer Biother Radiopharm* 2019;34:33–41. <https://doi.org/10.1089/cbr.2018.2566>.
- Jia C, Yang T, Liu Y, Zhu A, Yin F, Wang Y, et al. A novel human papillomavirus 16 L1 pentamer-loaded hybrid particles vaccine system: influence of size on immune responses. *ACS Appl Mater Interfaces* 2018. <https://doi.org/10.1021/acsami.8b11556>.
- Sanchez-Rodriguez SP, Munch-Anguiano L, Echeverria O, Vazquez-Nin G, Mora-Pale M, Dordick JS, et al. Human parvovirus B19 virus-like particles: In vitro assembly and stability. *Biochimie* 2012;94:870–8. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2011.12.006>.
- Bustos-Jaimes I, Soto-Roman RA, Gutierrez-Landa IA, Valadez-Garcia J, Segovia-Trinidad CL. Construction of protein-functionalized virus-like particles of parvovirus B19. *J Biotechnol* 2017;263:55–63. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2017.09.014>.
- Moron G, Rueda P, Casal I, Leclerc C. CD8alpha-CD11b+ dendritic cells present exogenous virus-like particles to CD8+ T cells and subsequently express CD8alpha and CD205 molecules. *J Exp Med* 2002;195:1233–45. <https://doi.org/10.1084/jem.20011930>.
- Kreiter S, Vormehr M, van de Roemer N, Diken M, Lower M, Diekmann J, et al. Mutant MHC class II epitopes drive therapeutic immune responses to cancer. *Nature* 2015;520:692–6. <https://doi.org/10.1038/nature14426>.
- Kim K, Skora AD, Li Z, Liu Q, Tam AJ, Blosser RL, et al. Eradication of metastatic mouse cancers resistant to immune checkpoint blockade by suppression of myeloid-derived cells. *PNAS* 2014;111:11774–9. <https://doi.org/10.1073/pnas.1410626111>.
- Jaiswal PK, Goel A, Mittal RD. Survivin: A molecular biomarker in cancer. *Ind J Med Res* 2015;141:389–97. <https://doi.org/10.4103/0971-5916.159250>.
- Amexis G, Young NS. Parvovirus B19 empty capsids as antigen carriers for presentation of antigenic determinants of dengue 2 virus. *J Infect Dis* 2006;194:790–4. <https://doi.org/10.1086/506361>.
- Ogasawara Y, Amexis G, Yamaguchi H, Kajigaya S, Leppla SH, Young NS. Recombinant viral-like particles of parvovirus B19 as antigen carriers of anthrax protective antigen. *vivo* 2006;20:319–24.
- Gilbert L, Toivola J, White D, Ihalainen T, Smith W, Lindholm L, et al. Molecular and structural characterization of fluorescent human parvovirus B19 virus-like particles. *Biochem Biophys Res Commun* 2005;331:27–35. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2005.03.208>.
- Gonzalez-Gonzalez E, Garcia-Hernandez AL, Flores-Mejia R, Lopez-Santiago R, Moreno-Fierros L. The protoxin Cry1Ac of *Bacillus thuringiensis* improves the protection conferred by intranasal immunization with *Brucella abortus* RB51 in a mouse model. *Vet Microbiol* 2015;175:382–8. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2014.11.021>.
- Moreno-Fierros L, Garcia-Hernandez AL, Ilhuicatz-Alvarado D, Rivera-Santiago L, Torres-Martinez M, Rubio-Infante N, et al. Cry1Ac protoxin from *Bacillus thuringiensis* promotes macrophage activation by upregulating CD80 and CD86 and by inducing IL-6, MCP-1 and TNF-alpha cytokines. *Int Immunopharmacol* 2013;17:1051–66. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2013.10.005>.
- Zimmerman T, Petit Frere C, Satzger M, Raba M, Weisbach M, Dohn K, et al. Simultaneous metal chelate affinity purification and endotoxin clearance of recombinant antibody fragments. *J Immunol Methods* 2006;314:67–73. <https://doi.org/10.1016/j.jim.2006.05.012>.
- Pulaski BA, Ostrand-Rosenberg S. Mouse 4T1 breast tumor model. *Curr Prot Immunol* 2001. <https://doi.org/10.1002/0471142735.im2002s39>. Chapter 20: Unit 20.2.
- Rojas-Hernandez S, Rodriguez-Monroy MA, Lopez-Revilla R, Resendiz-Albor AA, Moreno-Fierros L. Intranasal coadministration of the Cry1Ac protoxin with amoebal lysates increases protection against *Naegleria fowleri* meningoencephalitis. *Infect Immun* 2004;72:4368–75. <https://doi.org/10.1128/IAI.72.8.4368-4375.2004>.
- Li Z, Pang Y, Gara SK, Achyut BR, Heger C, Goldsmith PK, et al. Gr-1+CD11b+ cells are responsible for tumor promoting effect of TGF-beta in breast cancer progression. *Int J Cancer* 2012;131:2584–95. <https://doi.org/10.1002/ijc.27572>.
- Tsubaki T, Kadosono T, Sakurai S, Shiozawa T, Goto T, Sakai S, et al. Novel adherent CD11b(+) Gr-1(+) tumor-infiltrating cells initiate an immunosuppressive tumor microenvironment. *Oncotarget* 2018;9:11209–26. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.24359>.
- Gregorio AC, Fonseca NA, Moura V, Lacerda M, Figueiredo P, Simoes S, et al. Inoculated cell density as a determinant factor of the growth dynamics and metastatic efficiency of a breast cancer murine model. *PLoS One* 2016;11:e0165817. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0165817>.
- Manolova V, Flace A, Bauer M, Schwarz K, Saudan P, Bachmann MF. Nanoparticles target distinct dendritic cell populations according to their size. *Eur J Immunol* 2008;38:1404–13. <https://doi.org/10.1002/eji.200737984>.
- Li K, Peers-Adams A, Win SJ, Scullion S, Wilson M, Young VL, et al. Antigen incorporated in virus-like particles is delivered to specific dendritic cell subsets that induce an effective antitumor immune response in vivo. *J Immunother* 2013;36:11–9. <https://doi.org/10.1097/CJI.0b013e3182787f5e>.
- Peacey M, Wilson S, Perret R, Ronchese F, Ward VK, Young V, et al. Virus-like particles from rabbit hemorrhagic disease virus can induce an anti-tumor response. *Vaccine* 2008;26:5334–7. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2008.07.074>.

- [39] Tomita Y, Nishimura Y. Long peptide-based cancer immunotherapy targeting tumor antigen-specific CD4(+) and CD8(+) T cells. *Oncoimmunology* 2013;2:e25801. <https://doi.org/10.4161/onci.25801>.
- [40] Zanetti M. Tapping CD4 T cells for cancer immunotherapy: the choice of personalized genomics. *J Immunol* 2015;194:2049–56. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1402669>.
- [41] Rahman M, Mohammed S. Breast cancer metastasis and the lymphatic system. *Oncol Lett* 2015;10:1233–9. <https://doi.org/10.3892/ol.2015.3486>.
- [42] Blackburn HL, Ellsworth DL, Shriver CD, Ellsworth RE. Breast cancer metastasis to the axillary lymph nodes: are changes to the lymph node “Soil” localized or systemic? *Breast Canc Basic Clin Res* 2017;11:1. <https://doi.org/10.1177/1178223417691246>. 1178223417691246.
- [43] Zheng K, Li Q, Fu C, Ma S. Inhibitory effects of 4T1 breast tumor transplantation on mouse peripheral blood immune cell populations. *Biotechnol J Int* 2017;19:1–12. <https://doi.org/10.9734/BJI/2017/36382>.
- [44] Youn JI, Nagaraj S, Collazo M, Gabrilovich DI. Subsets of myeloid-derived suppressor cells in tumor-bearing mice. *J Immunol* 2008;181:5791–802. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.181.8.5791>.
- [45] Umansky V, Blattner C, Gebhardt C, Utikal J. The role of myeloid-derived suppressor cells (MDSC) in cancer progression. *Vaccines* 2016;4. <https://doi.org/10.3390/vaccines4040036>.
- [46] Shirota H, Tross D, Klinman DM. CpG oligonucleotides as cancer vaccine adjuvants. *Vaccines* 2015;3:390–407. <https://doi.org/10.3390/vaccines3020390>.
- [47] Brown KE, Anderson SM, Young NS. Erythrocyte P antigen: cellular receptor for B19 parvovirus. *Science* 1993;262:114–7. <https://doi.org/10.1126/science.8211117>.
- [48] Weigel-Kelley KA, Yoder MC, Srivastava A. Alpha5beta1 integrin as a cellular coreceptor for human parvovirus B19: requirement of functional activation of beta1 integrin for viral entry. *Blood* 2003;102:3927–33. <https://doi.org/10.1182/blood-2003-05-1522>.
- [49] Seung-Yeol P, Chan-Yeong K, James AS, Jung HK. Globoside (Gb4) promotes activation of ERK by interaction with the epidermal growth factor receptor. *BBA* 2012;1820:1141–8. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2012.04.008>.
- [50] Roman J, Ritzenthaler JD, Roser-Page S, Xiaojuan S, ShouWei H. $\alpha 5\beta 1$ -integrin expression is essential for tumor progression in experimental lung cancer. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2010;43:684–91. <https://doi.org/10.1165/rcmb.2009-0375OC>.
- [51] Mierke CT, Frey B, Fellner M, Hermann M, Fabry B. Integrin $\alpha 5\beta 1$ facilitates cancer cell invasion through enhanced contractile forces. *J Cell Sci* 2011;124:369–83. <https://doi.org/10.1242/jcs.071985>.